

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041083**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.09.09

(21) Номер заявки
201490796

(22) Дата подачи заявки
2012.11.02

(51) Int. Cl. **C12N 5/0735** (2010.01)
C12N 5/074 (2010.01)
A61K 35/12 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)

(54) СПОСОБ ИНДУКЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК IN VITRO

(31) **61/555,828**

(32) **2011.11.04**

(33) **US**

(43) **2014.10.30**

(86) **PCT/US2012/063339**

(87) **WO 2013/067362 2013.05.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МЕМОРИАЛ СЛОУН-КЕТТЕРИНГ
КЭНСЭ СЕНТР (US)**

(72) Изобретатель:
**Студер Лоренц, Шим Чжае-Вон,
Крикс Соня (US)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **US-A-6071889**

US-A-5874301

EMILY GALE et al., "Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells" MOLECULAR BRAIN, 2008, vol. 1:8, pp. 1-10
WO-A2-2010096496

FASANO, CHRISTOPHER A. et al., 'Efficient Derivation of Functional Floor Plate Tissue from Human Embryonic Stem Cells, Cell Stem Cell', 2 April 2010, Vol. 6, No. 4, pp. 336-347, ISSN 1934-5909. See abstract; pp. 338 and 345; figure 6.

CHAMBERS, STUART M. et al., 'Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling', Nature Biotechnology, 1 March 2009, Vol. 27, No. 3, pp. 275-280, ISSN 1087-0156. See abstract; p. 275, column right.

WO-A1-03000868

US-A1-20030211605

KRIKS, SONJA et al., Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease, Nature, 6 November 2011, Vol. 480, No. 7378, pp. 547-551, ISSN 0028-0836. See abstract.

(57) Настоящее изобретение относится к области биологии стволовых клеток, в частности к области линиеспецифической дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток. Способ включает осуществление контакта плюрипотентных стволовых клеток с ингибитором передачи сигнала SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic), и осуществление контакта указанных клеток с активатором передачи сигнала SHH (Sonic hedgehog) и активатором передачи сигнала wingless (Wnt), причем контакт указанных клеток с активатором передачи сигнала Wnt осуществляют в промежуток времени с третьего (3) по одиннадцатый (11) день после первичного контакта клеток с ингибитором передачи сигнала SMAD с получением популяции клеток, причем более 10% указанной популяции клеток экспрессирует как белок forkhead box A2 (FOXA2), так и LIM гомеобокс-содержащий фактор транскрипции 1 альфа (LMX1A). Полученные стволовые клетки могут применяться в терапевтическом лечении.

B1**041083****041083****B1**

Лицензионные права Государства

Настоящее изобретение было сделано при частичной государственной поддержке по гранту NS052671NIH/NINDS и гранту P50 NS047085 NIH/NINDS, полученных от Национального института здравоохранения США (NIH) и Национального института неврологических расстройств и инсульта (NINDS). Соответственно, Правительство Соединенных штатов обладает определенными правами на настоящее изобретение.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области биологии стволовых клеток, в частности, к области линиеспецифической дифференцировки плюрипотентных или мультипотентных стволовых клеток, которые могут включать, но не ограничиваются перечисленными: эмбриональные стволовые клетки человека (hESC, ЭСКч), помимо неэмбриональных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (hiPSC, иПСКч), соматические стволовые клетки, стволовые клетки от больных пациентов или любые другие клетки, способные к линиеспецифической дифференцировке. В частности, описаны способы обеспечения линиеспецифической дифференцировки ЭСКч и/или иПСКч в клетки-предшественники вентральной пластинки среднего мозга и затем далее в крупные популяции FOXA2+LMX1A+TH+ дофаминовых (ДА) нейронов среднего мозга с применением новых условий культивирования. FOXA2+LMX1A+TH+ дофаминовые (ДА) нейроны среднего мозга, полученные с применением способов согласно настоящему изобретению, далее применяют по различным назначениям, включая, но не ограничиваясь, применение в *in vitro* анализах для разработки лекарственных средств и в качестве терапевтического средства для обращения заболевания, повреждения или недостатка дофаминовых нейронов у пациента. Далее, предложены композиции и способы для обеспечения дифференцировки FOXA2+LMX1A+TH+ дофаминовых (ДА) нейронов среднего мозга из плюрипотентных стволовых клеток человека для применения в моделировании заболеваний, в частности болезни Паркинсона. Кроме природных ДА нейроны содержат большое количество маркеров, таких как CD142, и нейрональные клетки типа A9.

Предпосылки создания изобретения

Популяции клеток, сохраняющие способность дифференцироваться в многочисленные специализированные типы клеток можно применять для разработки большого числа дифференцированных линиеспецифическим образом популяций клеток. Эти популяции клеток, которые сохраняют способность к дальнейшей дифференцировке в специализированные клетки, содержат плюрипотентные клетки. Плюрипотентные клетки могут происходить из эмбриональных и/или неэмбриональных стволовых клеток. Предполагается, что эти популяции линиеспецифически дифференцированных клеток найдут применения в заместительной клеточной терапии для пациентов с заболеваниями, причиной которых является потеря функции определенной популяции клеток. Помимо прямого терапевтического значения, линиеспецифически дифференцированные клетки также представляют собой ценные исследовательские инструменты для различных целей, включая скрининговые *in vitro* анализы для идентификации и верификации, а также тесты для исследования функций или для исследования доставки терапевтических молекул для лечения заболеваний, связанных с определенными линиями клеток.

Ранее эмбриональные и соматические стволовые клетки применяли в качестве терапевтических средств и модельных систем для нейродегенеративных заболеваний. За последние годы были осуществлены исследовательские и технологические разработки, связанные с направленной дифференцировкой эмбриональных и соматических стволовых клеток, в области заболеваний центральной нервной системы (ЦНС), таких как хорее Хантингтона, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и рассеянный склероз. Однако результаты этих исследований показали низкую способность этих клеток обеспечивать восстановление нейрональных функций у пациента при применении *in vivo* способность этих клеток, и что их применение часто приводит к росту нежелательных опухолей у пациентов.

Соответственно, существует потребность в композициях и способах для получения популяций клеток, пригодных для применения как в исследованиях, так в качестве терапевтических средств для лечения заболеваний, причиной которых является потеря клеток, обладающих определенной функцией.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к области биологии стволовых клеток, в частности линиеспецифической дифференцировки плюрипотентных или мультипотентных стволовых клеток, которые могут включать, но не ограничиваются следующими: эмбриональные стволовые клетки человека (hESC, ЭСКч), а также неэмбриональные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (hiPSC, иПСКч), соматические стволовые клетки, стволовые клетки от пациентов с заболеванием или любые другие клетки, способные к линиеспецифической дифференцировке.

В частности, настоящее изобретение обеспечивает способ индукции дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток *in vitro*, охарактеризованный в следующих пп.1-32.

1) Способ индукции дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток *in vitro*, включающий осуществление контакта плюрипотентных стволовых клеток с ингибитором передачи сигнала SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic), и осуществление контакта указанных клеток с активатором передачи сигнала SHH (Sonic hedgehog) и активатором передачи сигнала wingless (Wnt), причем контакт

указанных клеток с активатором передачи сигнала Wnt осуществляют в промежуток времени с третьего (3) по одиннадцатый (11) день после первичного контакта клеток с ингибитором передачи сигнала SMAD с получением популяции клеток, причем более 10% указанной популяции клеток экспрессирует как белок forkhead box A2 (FOXA2), так и LIM гомеобокс-содержащий фактор транскрипции 1 альфа (LMX1A).

2) Способ по п.1, в котором указанная передача сигнала SMAD включает передачу сигнала ТФР- β /активин-нодаль.

3) Способ по п.1 или 2, в котором указанная передача сигнала SMAD включает передачу сигнала белка морфогенеза костей (BMP).

4) Способ по любому из пп.1-3, в котором по меньшей мере 20% указанной популяции клеток экспрессирует как белок FOXA2, так и LMX1A.

5) Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что клетки приводят в контакт с активатором передачи сигнала белка SHH по меньшей мере между 24 и 36 ч от первичного контакта клеток с ингибитором SMAD.

6) Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что клетки приводят в контакт с активатором передачи сигнала wingless (Wnt) по меньшей мере между 24 и 36 ч от первичного контакта клеток с активатором передачи сигнала белка SHH.

7) Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что по меньшей мере 40% указанной популяции клеток экспрессирует белок FOXA2 и LMX1A.

8) Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанные плюрипотентные стволовые клетки выбирают из группы, состоящей из неэмбриональных стволовых клеток, эмбриональных стволовых клеток, индуцированных неэмбриональных плюрипотентных стволовых клеток и модифицированных плюрипотентных стволовых клеток человека, примата, отличного от человека, или грызуна.

9) Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что указанная популяция клеток, экспрессирующая FOXA2 и LMX1A, дополнительно экспрессирует по меньшей мере один маркер, выбранный из группы, состоящей из тирозингидроксилазы (TH), ортодентикл гомеобокс 2 (OTX2), родственного ядерному рецептору белка 1 (NURR1), нейрон-специфичного бета-тубулина класса III (Tuj1), фактора 3 семейства трилистника (TTF3), гомеобоксного белка 3, содержащего домен, подобный спаренному 3 (PITX3), комплекса achaete-scute (ASCL), раннего фактора 1 В-клеток (EBF-1), раннего фактора 3 В-клеток (EBF-3), транстиретина (TTR), синапсина, транспортера дофамина (DAT), сопряженного с G-белком калиевого канала внутреннего выпрямления (Kir3.2/GIRK2), CD142, DCSM1, CD63 и CD99.

10) Способ по любому из пп.1-9, в котором указанные плюрипотентные стволовые клетки дифференцируются в указанную популяцию клеток в течение 11 дней от первичного контакта указанных клеток с по меньшей мере одним ингибитором передачи сигнала SMAD.

11) Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что плюрипотентные стволовые клетки дифференцируются в дофаминовые нейроны не позднее 25 дней после первичного контакта указанных клеток с ингибитором передачи сигнала SMAD.

12) Способ по п.11, отличающийся тем, что по меньшей мере 20% указанных дофаминовых нейронов экспрессирует FOXA2 и LMX1A и дополнительно экспрессирует по меньшей мере еще один маркер дофаминовых нейронов среднего мозга человека подтипа A9, выбранный из группы, состоящей из Girk2, CD142 и DCSM1.

13) Способ по п.11 или 12, дополнительно включающий отбор популяции дофаминовых нейронов, экспрессирующей CD142 или DCSM1, или оба маркера.

14) Способ по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что указанная популяция клеток характеризуется существенно низким уровнем экспрессии по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из PAX6, EMX2 и LHX2.

15) Способ по любому из пп.1-14, дополнительно включающий осуществление контакта указанной популяции клеток с мозговым нейротрофным фактором (BDNF), аскорбиновой кислотой (AA), нейротрофным фактором глиальных клеток (GDNF), дибутирил цАМФ (dbcAMP) и трансформирующим фактором роста типа $\beta 3$ (TGF $\beta 3$) с получением дофаминовых нейронов.

16) Способ по любому из пп.1-15, дополнительно включающий осуществление контакта указанной популяции клеток с активатором передачи сигнала FGF.

17) Способ по п.16, отличающийся тем, что указанный активатор сигнала FGF представляет собой FGF8.

18) Способ по п.16 или 17, отличающийся тем, что контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала FGF осуществляют в течение до 144 ч с первичного контакта указанных клеток с ингибитором передачи сигнала SMAD.

19) Способ по любому из пп.1-18, отличающийся тем, что указанный ингибитор сигнала SMAD выбран из группы, состоящей из LDN-193189, SB431542, Noggin, дорсоморфина и комбинаций перечисленного выше.

20) Способ по любому из пп.1-19, отличающийся тем, что указанный ингибитор сигнала SMAD

представляет собой 4-[4-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-5-(2-пиридинил)-1H-имидазол-2-ил]бензамид (SB431542).

21) Способ по любому из пп.1-20, отличающийся тем, что активатор передачи сигнала SHH выбран из группы, состоящей из SHHs, агонистов Smoothened (SAGs) и комбинаций перечисленного выше.

22) Способ по любому из пп.1-21, отличающийся тем, что активатор передачи сигнала SHH представляет собой агонисты Smoothened (SAG).

23) Способ по п.21 или 22, отличающийся тем, что указанный SAG представляет собой пурморфамин.

24) Способ по п. 21, отличающийся тем, что указанный SHH представляет собой рекомбинантный белок SHH.

25) Способ по п.24, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный белок SHH по меньшей мере на 95% идентичен N-концевому фрагменту мышинного SHH.

26) Способ по п.24 или 25, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный белок SHH представляет собой SHH C25II.

27) Способ по любому из пп.1-26, отличающийся тем, что указанный активатор передачи сигнала wingless (Wnt) представляет собой соединение, способное снижать передачу сигнала гликогенсинтазы 3-бета 3β (GSK3 β).

28) Способ по любому из пп.1-26, отличающийся тем, что указанный активатор передачи сигнала Wnt выбран из группы, состоящей из CHIR99021, Wnt3A, Wnt1 и комбинации перечисленного выше.

29) Способ по любому из пп.1-28, отличающийся тем, что указанный активатор передачи сигнала Wnt представляет собой CHIR99021.

30) Способ по любому из пп.1-29, отличающийся тем, что указанные клетки приводят в контакт с двумя ингибиторами передачи сигнала SMAD, которые представляют собой SB431542 и LDN-193189, и активатор сигнала wingless (Wnt) представляет собой CHIR99021.

31) Способ по любому из пп.1-30, дополнительно включающий трансфекцию указанных плюрипотентных стволовых клеток полисиалилтрансферазой (PST) перед приведением указанных плюрипотентных стволовых клеток в контакт с ингибитором передачи сигнала SMAD.

32) Способ по любому из пп.1-30, дополнительно включающий обработку указанной популяции клеток экзогенной PST.

В частности, описаны способы обеспечения линииспецифической дифференцировки ЭСКч и/или иПСКч в клетки-предшественники вентральной пластинки среднего мозга и затем далее в крупные популяции FOXA2+LMX1A+TH+ дофаминовых (ДА) нейронов среднего мозга с применением новых условий культивирования. FOXA2+LMX1A+TH+ дофаминовые (ДА) нейроны среднего мозга, полученные с применением способов согласно настоящему изобретению, далее применяют по различным назначениям, включая, но не ограничиваясь, применением в *in vitro* анализах для разработки лекарственных средств, в неврологических исследованиях и в качестве терапевтического средства для обращения заболевания, повреждения или недостатка дофаминовых нейронов у пациента. Далее, предложены композиции и способы для обеспечения дифференцировки FOXA2+LMX1A+TH+ дофаминовых (ДА) нейронов среднего мозга из плюрипотентных стволовых клеток человека для применения в моделировании заболеваний, в частности болезни Паркинсона. Кроме того, природные ДА нейроны содержат большое количество маркеров, таких как CD142, и нейрональные клетки типа A9.

Набор, содержащий первый ингибитор передачи сигнала, второй ингибитор передачи сигнала и третий ингибитор передачи сигнала, где указанный первый ингибитор способен снижать передачу сигнала трансформирующего фактора роста бета (TGF β , ТФР-бета)/Нодаль-активина, указанный второй ингибитор способен снижать передачу сигнала SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic), и указанный третий ингибитор способен снижать передачу сигнала киназы гликогенсинтазы 3-бета (GSK3 β) для активации Wnt(wingless). В одном варианте реализации указанный первый ингибитор представляет собой LDN-193189. В других вариантах реализации указанный первый ингибитор выбран из группы, состоящей из LDN-193189, его производных и их смесей. В одном варианте реализации указанный второй ингибитор представляет собой SB431542. В других вариантах реализации указанный второй ингибитор выбран из группы, состоящей из SB431542, его производных и их смесей. В одном варианте реализации указанный третий ингибитор представляет собой CHIR99021. В других вариантах реализации указанный третий ингибитор выбран из группы, состоящей из CHIR99021, его производных и их смесей. В одном варианте реализации указанный набор дополнительно содержит активатор передачи сигнала белка Sonic hedgehog (SHH) и активатор передачи сигнала семейства рецептора фактора роста фибробластов (FGF,ФРФ) 8. В одном варианте реализации указанный набор дополнительно содержит нейротрофический фактор мозга (BDNF), аскорбиновую кислоту (АК), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии, дибутрил-цАМФ и трансформирующий фактор роста типа β 3. В одном варианте реализации указанный набор дополнительно содержит антитела, выбранные из группы, состоящей из антител к тирозингидроксилазе (TH), антитела к белку forkhead box A2 (FOXA2) и антитело к LIM и гомеобокс-содержащем фактору транскрипции 1, альфа (LMX1A). В одном варианте реализации указанный набор

дополнительно содержит клетку, выбранную из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки и модифицированной клетки. В одном варианте реализации указанный набор дополнительно содержит инструкции по обеспечению дифференцировки клеток-предшественников и FOXA2/LMX1A+ дофаминовых (ДА) нейронов среднего мозга. В одном варианте реализации указанный набор дополнительно содержит инструкции по получению клетки от пациента, больного болезнью Паркинсона (БП).

Композиция, содержащая популяцию клеток в контакте с первым ингибитором передачи сигнала и вторым ингибитором передачи сигнала, где больше 40% указанной популяции клеток положительно по белку forkhead box A2 (FOXA2), где указанная популяция клеток была ранее приведена в контакт с первым ингибитором передачи сигнала, третьим ингибитором передачи сигнала и активатором передачи сигнала белка Sonic hedgehog (SHH), причем указанный первый ингибитор способен снижать передачу сигнала трансформирующего фактора роста бета (TGFβ)/Активин-нодаль, указанный второй ингибитор способен снижать передачу сигнала киназы гликогенсинтазы 3-бета (GSK3β) для активации передачи сигнала Wnt(wingless), и указанный третий ингибитор способен снижать передачу сигнала SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic). В одном варианте реализации указанный первый ингибитор представляет собой низкомолекулярное соединение, выбранное из группы, состоящей из LDN-193189, его производных и их смесей. В одном варианте реализации указанный второй ингибитор выбран из группы, состоящей из CHIR99021 и его производных. В одном варианте реализации указанный третий ингибитор выбран из группы, состоящей из SB431542, его производных и их смесей. В одном варианте реализации указанный активатор передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) выбран из группы, состоящей из Низкомолекулярного агониста рецептора Smoothened (SMO) и Sonic hedgehog (SHH) C25II, причем указанный агонист представляет собой пурморфамин. В некоторых вариантах реализации указанную популяцию клеток дополнительно предварительно приводили в контакт с фактором роста фибробластов 8 (FGF8). В одном варианте реализации указанное большинство клеток, составляющих указанную популяцию являются белок forkhead box A2 (FOXA2)⁺, LIM+гомеобокс-содержащий фактор транскрипции 1, альфа (LMX1A)⁺, NGN2+ и DDC+ клетками-предшественниками вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанная популяция клеток выбрана из группы, состоящей из клеток грызуна, клеток приматов и клеток человека. В одном варианте реализации указанные клетки получены из клеток пациента с болезнью Паркинсона (БП). В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 50% положительна по белку forkhead box A2 (FOXA2). В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 60% положительна по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 70% положительна по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 80% положительна по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 90% положительна по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 95 до 100% положительна по белку forkhead box A2.

Композиция, содержащая *in vitro* популяцию клеток, где большинство клеток, составляющих указанную популяцию клеток, являются тирозингидроксилаза (TH)⁺, белок forkhead box A2 (FOXA2)⁺, LIM+гомеобокс-содержащий фактор транскрипции 1, альфа (LMX1A)⁺ дофаминовыми (ДА) нейронами вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанные более 40% указанных дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга положительны по тирозингидроксилазе (TH⁺). В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 50% положительна по тирозингидроксилазе. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 60% положительна по тирозингидроксилазе. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 70% положительна по тирозингидроксилазе. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 80% положительна по тирозингидроксилазе. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 90% положительна по тирозингидроксилазе. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 95% до 100% положительна по тирозингидроксилазе. В некоторых вариантах реализации указанная популяция клеток содержит большей частью дофаминовые (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейроны среднего мозга. В одном варианте реализации указанные дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга положительны по маркерам, выбранным из группы, состоящей из: ядерного рецептора NURR1 (NR4A2), нейрон-специфичного бета-тубулина класса III (Tuj1), фактора 3 семейства трилистника (TTF3), гомеобоксного белка 3, содержащего домен, подобный спаренному и гомеобокс белку 3 (PITX3), комплекса achaete-scute(ASCL), раннего фактора 1 В-клеток(EBF-1), раннего фактора 3 В-клеток (EBF-3) и транстиретина (TTR). В одном варианте реализации указанная популяция FOXA2/LMX1A+ дофаминовых (ДА) рецепторов среднего мозга положительна по соединению, выбранному из группы, состоящей из ДА, 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (DOPAC) и гомованилиновой кислоты (HVA). В одном варианте реализации указанный маркер выбран из группы, состоящей из белка и нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации указанная популяция FOXA2/LMX1A+ дофаминовых (ДА) рецепторов среднего мозга способна приживаться *in vivo* у пациента, выбранного из группы, состоящей из паци-

ента с болезнью Паркинсона (БП). В одном варианте реализации указанные дофаминовые (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейроны среднего мозга способны приживаться *in vivo* и выполнять функцию дофаминовых (ДА) нейронов.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую популяцию клеток в контакте с LDN-193189 и CHIR99021, где больше 40% указанной популяции клеток положительно по белку forkhead box A2 (FOXA2), и где указанная популяция клеток была ранее приведена в контакт с LDN-193189, SB431542, активатором передачи сигнала белка Sonic hedgehog (SHH) и CHIR99021. В одном варианте реализации указанный активатор передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) выбран из группы, состоящей из Sonic hedgehog (SHH) C25II и пурморфамин. В одном варианте реализации указанные более 10% указанной популяции клеток дважды положительно по белку forkhead box A2 (FOXA2) и кодируемому гомеобоксным геном LIM фактору транскрипции 1, альфа (LMX1A). В одном варианте реализации указанная большая часть указанной популяции клеток представляет собой популяцию клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанную популяцию предварительно приводят в контакт с фактором роста фибробластов 8 (FGF8). В одном варианте реализации указанная популяция клеток выбрана из группы, состоящей из клеток грызуна, клеток примата и клеток человека. В одном варианте реализации указанные клетки человека представляют собой клетки от человека с неврологическим симптомом болезни Паркинсона (БП). В одном варианте реализации указанная популяция клеток получена из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC, иПСК). В одном варианте реализации более 10% указанной популяции клеток выбрано из группы, состоящей из дважды положительных по белку forkhead box A2 (FOXA2)/кодируемому гомеобоксным геном LIM фактору транскрипции 1, альфа (LMX1A) и дважды положительных по белку forkhead box A2 (FOXA2)/ортодентикл гомеобокс 2 (OTX2).

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ индукции направленной дифференцировки клеток в популяцию клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга, включающий а) обеспечение: i) популяции клеток, причем указанная популяция клеток выбрана из группы, состоящей из неэмбриональной стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, индуцированной неэмбриональной плюрипотентной клетки и модифицированной плюрипотентной клетки; и ii) первого ингибитора передачи сигнала, второго ингибитора передачи сигнала, активатора передачи сигнала белка Sonic hedgehog (SHH) и третьего ингибитора передачи сигнала, где указанный первый ингибитор способен снижать передачу сигнала трансформирующего фактора роста бета (TGFβ)/активин-нодаля, указанный второй ингибитор способен снижать передачу сигнала SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic), и указанный третий ингибитор способен снижать передачу сигнала киназы гликоген-синтазы 3-бета (GSK3β) для активации передачи сигнала Wnt(wingless); б) осуществление контакта указанной популяции клеток с указанным первым и указанным вторым ингибитором, в) после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным первым и указанным вторым ингибитором далее приведение в контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) в условиях для дифференцировки популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга; и) после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) далее приведение в контакт указанных клеток с указанным третьим ингибитором для дифференцировки указанной популяции клеток в популяцию клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанный контакт с указанным первым и указанным вторым ингибитором осуществляют в условиях, допускающих возможность получения указанной дифференцированной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанный контакт с указанным первым и указанным вторым ингибитором осуществляют в течение 1 ч после посадки клеток *in vitro*. В одном варианте реализации указанный контакт с указанным первым и указанным вторым ингибитором осуществляют в течение 48 ч после посадки клеток *in vitro*. В одном варианте реализации указанный контакт с указанным первым и указанным вторым ингибитором осуществляют в течение 62 ч после высевания клеток *in vitro*. В одном варианте реализации указанный контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) осуществляют в условиях, допускающих возможность получения указанной дифференцированной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанный контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) осуществляют через по меньшей мере 24 и до 36 ч после осуществления контакта указанной популяции клеток с указанным первым и указанным вторым ингибитором. В одном варианте реализации указанный контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) составляет до 144 ч. В одном варианте реализации указанный контакт указанных клеток с указанным третьим ингибитором осуществляют в условиях, допускающих возможность получения указанной дифференцированной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанный контакт указанных клеток с указанным третьим ингибитором осуществляют через по меньшей мере 24 и до 36 ч после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH). В одном

варианте реализации указанный контакт указанных клеток с указанным третьим ингибитором составляет до 192 ч. В одном варианте реализации указанная популяция клеток дифференцируется в указанные клетки-предшественники вентральной пластинки среднего мозга к по меньшей мере 11 дню после приведения к контакт указанных клеток с указанным первым и указанным указанный вторым ингибитором. В одном варианте реализации указанный первый ингибитор представляет собой SB431542. В одном варианте реализации указанный второй ингибитор представляет собой LDN-193189. В одном варианте реализации указанный третий ингибитор представляет собой CHIR99021. В одном варианте реализации указанный активатор передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) выбран из группы, состоящей из Sonic hedgehog (SHH) C25II и пурморфамин. В одном варианте реализации в указанном способе дополнительно обеспечивают фактор роста фибробластов 8 (FGF8) и приводят в контакт указанную популяцию клеток с указанным FGF8 в условиях, допускающих возможность получения указанной дифференцированной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанный контакт указанных клеток в указанным FGF8 осуществляют через по меньшей мере 24 ч и до 36 ч после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным первым и указанным вторым ингибитором. В одном варианте реализации указанный контакт указанных клеток с указанным FGF8 составляет до 144 ч. В одном варианте реализации указанная популяция клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга содержит более 40 forkhead box A2 (FOXA2)⁺ клеток. В одном варианте реализации указанная популяция клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга содержит более 40% клеток, положительных по forkhead box A2 (FOXA2), кодируемому гомеобоксным геном LIM фактору транскрипции 1, альфа (LMX1A). В одном варианте реализации указанный способ дополнительно включает этап е) приведения в контакт указанной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга со средой для созревания нейронов, причем указанная среда содержит среду N2, нейротрофический фактор мозга (BDNF), аскорбиновую кислоту (AA), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии, дибутирил-цАМФ (dbcAMP) и трансформирующий фактор роста типа $\beta 3$, для дифференцировки клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга в дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанный способ дополнительно включает этап е) приведения в контакт указанной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга со средой для созревания нейронов с добавкой B27 для дифференцировки клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга в дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанные клетки, приведенные в контакт с нейробазальной средой с добавкой B27, приводят в контакт с нейротрофическим фактором мозга (BDNF), аскорбиновой кислотой (AA), нейротрофическим фактором глиальной клеточной линии, дибутирил-цАМФ (dbcAMP) и трансформирующим фактором роста типа $\beta 3$ для дифференцировки клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга в дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанные дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга положительны по белку forkhead box A2 (FOXA2), кодируемому гомеобоксным геном LIM фактору транскрипции 1, альфа (LMX1A), родственному ядерному рецептору белку 1 (NURR1) и тирозингидроксилазе (TH). В одном варианте реализации более 40% указанных дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга положительны по тирозингидроксилазе (TH)⁺. В одном варианте реализации указанная популяция дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга дифференцируется к по меньшей мере 25 дню после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным первым и указанный вторым ингибитором. В одном варианте реализации указанные дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга положительны по маркерам, идентифицирующим молекулы. В одном варианте реализации указанные маркеры выбраны из группы, состоящей из тирозингидроксилазы (TH), белка forkhead box A2 (FOXA2), кодируемого гомеобоксным геном LIM фактора транскрипции 1, дофамина, 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (DOPAC) и гомованилиновой кислоты (HVA), альфа, ядерного рецептора NURR1 (NR4A2), нейрон-специфичного бета-тубулина класса III (Tuj1), TTF3, гомеобоксного белка 3, содержащего домен, подобный спаренному, 3 (PITX3), комплекс achaete-scute(ASCL), ранний фактор 1 В-клеток(EBF-1), ранний фактор 3 В-клеток (EBF-3), транстиретин(TTR), синапсин, транспортер дофамина (DAT) и сопряженного с G-белком калиевого канала внутреннего выпрямления (Kir3.2/GIRK2). В одном варианте реализации указанная молекула выбрана из группы, состоящей из белка и нуклеиновой кислоты. В одном варианте реализации указанную молекулу идентифицируют с применением маркера, выбранного из группы, состоящей из антитела, ПЦР-прайма, последовательности нуклеиновой кислоты и теста с применением фермента. В одном варианте реализации указанные дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга способны приживаться *in vivo* у пациента с болезнью Паркинсона (БП) и обеспечивать функцию дофаминовых (ДА) нейронов. В одном варианте реализации указанный способ дополнительно включает, обеспечение пациента, нуждающегося в дофамин-продуцирующих нейронах, причем указанный пациент демонстрирует по меньшей мере один неврологический симптом, у этап трансплантации дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга указанному пациенту для обеспечения функции дофаминовых (ДА) нейронов. В одном

варианте реализации указанные неврологические симптомы выбраны из группы, состоящей тремора, брадикинезии (сильной замедленности движений), сутулой позы, постуральной неустойчивости и ригидности. В одном варианте реализации у указанного пациента происходит снижение выраженности указанного неврологического симптома. В одном варианте реализации указанная клетка выбрана из клетки грызуна, клетки приматы и клетки человека. В одном варианте реализации указанные клетки человека представляют собой клетки от человека с неврологическим симптомом болезни Паркинсона (БП). В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ обеспечения приживления *in vivo* для терапевтического лечения, включающий а) обеспечение: i) популяции дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга, где больше 40% указанной популяции экспрессируют тирозингидроксилазу (TH); и ii) субъекта, причем у указанного субъекта наблюдают по меньшей мере один неврологический симптом; и б) трансплантацию указанных дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга указанному субъекту в условиях, обеспечивающих приживление *in vivo* для обеспечения функции дофаминовых (ДА) нейронов. В одном варианте реализации указанные неврологические симптомы выбраны из группы, состоящей из тремора, брадикинезии (сильной замедленности движений), сутулой позы, постуральной неустойчивости и ригидности. В одном варианте реализации у указанного субъекта происходит снижение выраженности указанного неврологического симптома. В одном варианте реализации указанная популяция дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга получена из популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга, обработанных в соответствии со способами согласно настоящему изобретению. В одном варианте реализации указанная популяция дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга получена из популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга, обработанных в соответствии со способом, дополнительно включающим этап приведения в контакт указанной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга со средой для созревания нейронов, причем указанная среда содержит среду N2, нейротрофический фактор мозга (BDNF), аскорбиновую кислоту (AA), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии, дибутирил-цАМФ и трансформирующий фактор роста типа $\beta 3$ для дифференцировки клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга в дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанная популяция клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга получена из популяции клеток, обработанной в соответствии со способом согласно настоящим изобретениям. В одном варианте реализации указанная популяция клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга получена из популяции клеток, обработанной в соответствии со способом индукции направленной дифференцировки клеток в популяцию клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга, включающим а) обеспечение: i) популяции клеток, причем указанная популяция клеток выбрана из группы, состоящей из неэмбриональной стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, индуцированной неэмбриональной плюрипотентной клетки и модифицированной плюрипотентной клетки; и ii) первого ингибитора передачи сигнала, второго ингибитора передачи сигнала, активатора передачи сигнала белка Sonic hedgehog (SHH), и третьего ингибитора передачи сигнала, где указанный первый ингибитор способен снижать передачу сигнала трансформирующего фактора роста бета (TGF β)/активин-Нодаль, указанный второй ингибитор способен снижать передачу сигнала SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic), и указанный третий ингибитор способен снижать передачу сигнала киназы гликоген-синтазы 3-бета (GSK3 β) для активации передачи сигнала Wnt(wingless); б) приведение в контакт указанной популяции клеток с указанным первым и указанным вторым ингибитором, в) после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным первым и указанным вторым ингибитором далее приведение в контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) в условиях для дифференцировки популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга; и г) после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) далее приведение в контакт указанных клеток с указанным третьим ингибитором для дифференцировки указанной популяции клеток в популяцию клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанная популяция дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга получена из популяции клеток, выбранной из группы, состоящей из животных, приматов и людей. В одном варианте реализации указанные клетки человека являются клетками пациента с симптомом болезни Паркинсона (БП).

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую популяцию клеток в контакте с LDN-193189 и CHIR99021, где больше 40% указанной популяции клеток положительно по белку forkhead box A2 (FOXA2), и где указанная популяция клеток была ранее приведена в контакт с LDN-193189, SB431542, активатором передачи сигнала белка Sonic hedgehog (SHH) и CHIR99021, причем указанный активатор передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) выбран из группы, состоящей из Sonic hedgehog (SHH) C25II и пурморфамин. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 50% положительно по белку forkhead box A2 (FOXA2). В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 60% положительно по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 70% поло-

жительна по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 80% положительна по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 90% положительна по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 95 до 100% положительна по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации более 10% указанной популяции клеток выбрано из группы, состоящей из клеток, дважды положительных: по белку forkhead box A2 (FOXA2)/кодируемому гомеобоксным геном LIM фактору транскрипции 1, альфа (LMX1A), и дважды положительных: по белку forkhead box A2 (FOXA2)/LIM гомеобокс 2 (OTX2). В одном варианте реализации указанная популяция клеток является положительной по меньшей мере на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, по меньшей мере на 95 до 100%. В одном варианте реализации по меньшей мере 20% указанной популяции клеток положительно по маркеру, выбранному из группы, состоящей из Nurr1+, CD142, DCSM1, CD63 и CD99. В некоторых вариантах реализации указанная популяция клеток является положительной по меньшей мере на 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, по меньшей мере на 95 до 100%. В некоторых вариантах реализации указанная популяция клеток является положительной по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, по меньшей мере на 95 до 100%. В одном варианте реализации указанная популяция клеток выбрана из группы, состоящей из клеток грызуна, клеток примата, клеток человека и клеток человека от пациента с неврологическим симптомом болезни Паркинсона (БП). В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ индукции направленной дифференцировки клеток в популяцию клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга, включающий, а) обеспечение: i) популяции клеток, причем указанная популяция клеток выбрана из группы, состоящей из неэмбриональной стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, индуцированной неэмбриональной плюрипотентной клетки и модифицированной плюрипотентной клетки; и ii) первого ингибитора передачи сигнала, второго ингибитора передачи сигнала, активатора передачи сигнала белка Sonic hedgehog (SHH) и третьего ингибитора передачи сигнала, причем указанный первый ингибитор представляет собой SB431542, указанный второй ингибитор представляет собой LDN-193189, указанный активатор передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) выбран из группы, состоящей из Sonic hedgehog (SHH) C25II и пурморфамин, и указанный третий ингибитор представляет собой CHIR99021; b) приведение в контакт указанной популяции клеток с указанным первым и указанным вторым ингибитор, причем указанный контакт с указанным первым и указанным вторым ингибитором осуществляют в условиях, допускающих возможность получения указанной дифференцированной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга, таким образом, что указанный контакт с указанным первым и указанным вторым ингибитором осуществляют в течение 48 ч после посадки клеток *in vitro*, c) после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным первым и указанным вторым ингибитором далее приведение в контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) в условиях для дифференцировки популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга; и d) после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) далее приведение в контакт указанных клеток с указанным третьим ингибитором для дифференцировки указанной популяции клеток в популяцию клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) осуществляют в условиях, допускающих возможность получения указанной дифференцированной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга, таким образом, что указанный контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) осуществляют по меньшей мере через 24 и до 36 ч после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным первым и указанным вторым ингибитором. В одном варианте реализации контакт указанных клеток с указанным третьим ингибитором осуществляют в условиях, допускающих возможность получения указанной дифференцированной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга, таким образом, что указанный контакт указанных клеток с указанным третьим ингибитором осуществляют через по меньшей мере 24 и до 36 ч после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH). В одном варианте реализации популяция клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга содержит более 40% клеток. Положительных по белку forkhead box A2 (FOXA2), LIM+гомеобокс-содержащему фактору транскрипции 1, альфа (LMX1A). В одном варианте реализации способ дополнительно включает этап e) приведения в контакт указанной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга со средой для созревания нейронов, причем указанная среда содержит среду N2, нейротрофический фактор мозга (BDNF), аскорбиновую кислоту (AA), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии, дибутирил-цАМФ и трансформирующий фактор роста типа $\beta 3$ для дифференцировки клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга в дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанные дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга положительны по набору маркеров, выбранных из группы, состоящей из: белка forkhead box A2 (FOXA2)/кодируемого гомеобоксным геном LIM фактора транскрипции 1 альфа (LMX1A)/тирозингидроксилазы (TH); белка forkhead box A2/ кодируемого гомеобоксным геном LIM фактора транскрипции 1 альфа/тирозингидроксилазы/CD142; белка forkhead box A2/кодируемого

гомеобоксным геном LIM фактором транскрипции 1 альфа/тирозингидроксилазы/родственного ядерному рецептору белка 1 (NURR1); белка forkhead box A2/кодируемого гомеобоксным геном LIM фактора транскрипции 1 альфа/тирозингидроксилазы/CD142/родственного ядерному рецептору белка 1 и тирозингидроксилазы/α-синуклеина. В одном варианте реализации указанный способ дополнительно включает этап f) сортировки указанных дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга по экспрессии CD142 в популяцию клеток, по меньшей мере на 80% положительную по CD142. В одном варианте реализации указанные дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга положительны по маркеру, идентифицирующему молекулу, выбранную из группы, состоящей из тирозингидроксилазы (TH), белка forkhead box A2 (FOXA2), кодируемого гомеобоксным геном LIM фактора транскрипции 1, дофамина, 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (DOPAC) и гомованилиновой кислоты (HVA), альфа, ядерного рецептора NURR1 (NR4A2), нейрон-специфичного бета-тубулина класса III (Tuj1), TTF3, гомеобоксного белка 3, содержащего домен, подобный спаренному, 3 (PITX3), комплекса achaete-scute(ASCL), раннего фактора 1 В-клеток(EBF-1), раннего фактора 3 В-клеток (EBF-3), транстиретаина (TTR), синапсина, транспортера дофамина (DAT) и сопряженного с G-белком калиевого канала внутреннего выпрямления (Kir3.2/GIRK2), CD142, DCSM1, CD63 и CD99. В одном варианте реализации в способе дополнительно берут пациента, нуждающегося в дофаминпродуцирующих нейронах и дополнительно осуществляют этап e) лечения указанного пациента путем трансплантации указанных дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга для обеспечения функции дофаминовых (ДА) нейронов. В одном варианте реализации у указанного пациента есть по меньшей мере один неврологический симптом, выбранный из группы, состоящей из тремора, брадикинезии (сильной замедленности движений), сутулой позы, постуральной неустойчивости и ригидности. В одном варианте реализации у указанного пациента наблюдают наличие по меньшей мере одного неврологического симптома, выбранного из группы, состоящей из тремора, брадикинезии (сильной замедленности движений), сутулой позы, постуральной неустойчивости и ригидности. В одном варианте реализации у указанного пациента происходит снижение выраженности по меньшей мере одного из указанных неврологических симптомов.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ приживления *in vivo* для терапевтического лечения, включающий а) обеспечение: i) популяции дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга, где больше 40% указанной популяции экспрессирует тирозингидроксилазу (TH); и ii) субъекта, причем у указанного субъекта наблюдается по меньшей мере один неврологический симптом, выбранный из группы, состоящей из тремора, брадикинезии (сильной замедленности движений), сутулой позы, постуральной неустойчивости и ригидности; и б) трансплантацию указанных дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга указанному пациенту в условиях, подходящих для *in vivo* приживления для обеспечения функции дофаминовых (ДА) нейронов. В одном варианте реализации у указанного субъекта происходит снижение выраженности по меньшей мере одного симптома. В одном варианте реализации указанная популяция дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга получена из популяции клеток с применением дополнительно этапа сортировки указанных дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга по экспрессии CD142 в популяцию, по меньшей мере на 80% положительную по CD142. В одном варианте реализации указанную популяцию дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга получают из популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга после этапа сортировки указанных дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга по экспрессии CD142 в популяцию клеток, по меньшей мере на 80% положительную по CD142. В одном варианте реализации указанную популяцию дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга получают из популяции клеток, выбранных из группы, состоящей из животных, приматов, людей и пациента с симптомами болезни Паркинсона (БП). В одном варианте реализации указанная популяция дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга получена из популяции клеток, выделенных из группы, состоящей из животных, приматов, людей и пациента с симптомами болезни Паркинсона (БП).

Определения.

В настоящем тексте термин "моделирование заболевания" относится к процессу применения экспериментального организма или культур клеток *in vitro* для имитации конкретных признаков или симптомов, возникающих у человека в результате заболевания. В одном варианте реализации плюрипотентные стволовые клетки, полученные из модельного животного с генетической мутацией, приводящей к неврологическому расстройству, такому как болезнь Паркинсона (БП), могут выращиваться и дифференцироваться в нервные клетки для идентификации новых характеристик нейронов, связанных с БП. В одном варианте реализации плюрипотентные клетки человека, взятые у лица с генетической мутацией, приводящей к неврологическому расстройству, такому как болезнь Паркинсона (БП), могут выращиваться и дифференцироваться в нервные клетки, имеющие дефект, аналогичный наблюдаемому в организме указанного лица.

В настоящем описании термин "паркинсонизм" относится к группе заболеваний, каждое из которых связано с дефицитом дофамина в базальных ганглиях, которые являются частью мозга, контроли-

рующей движения. Симптомы включают тремор, брадикинезию (сильную замедленность движений), сутулую позу, постуральную неустойчивость и ригидность. Диагноз "паркинсонизм" ставят только в случае наличия по меньшей мере двух из этих симптомов, одним из которых должны быть тремор или брадикинезия. Наиболее распространенной формой паркинсонизма является идиопатическая, или классическая, болезнь Паркинсона (БП), но в случае значительного меньшинства диагнозов, примерно 15 процентов от общего числа, может присутствовать один из паркинсон-плюс синдромов (ППС). Эти синдромы, также известные как атипичный паркинсонизм, включают кортикобазальную дегенерацию, деменцию с тельцами Леви, мультисистемную атрофию и прогрессирующий супрануклеарный паралич. В целом, болезнь Паркинсона включает нарушение функции и гибель важнейших нервных клеток в мозге, в первую очередь, в области мозга, называемой черной субстанцией - substantia nigra. Многие из этих важных нервных клеток производят дофамин, поэтому в случае гибели таких нейронов количество дофамина, зависящее от дифференцировки мозга, снижается, что приводит к неспособности нормально управлять движениями. В кишечнике также имеются дофаминовые клетки, которые разрушаются у пациентов с болезнью Паркинсона, что может быть важным фактором симптомов со стороны ЖКТ, которые являются частью этого заболевания. Комплексы симптомов у разных больных различны. К первым двигательным признакам болезни Паркинсона относятся следующие: тремор кистей, рук, ног, челюсти и лица, брадикинезия или замедленность движений, ригидность или снижение подвижности суставов и туловища и постуральную неустойчивость или нарушения равновесия и координации.

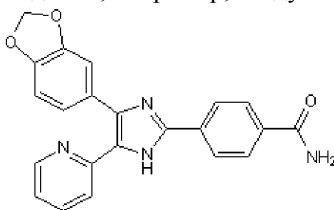
В настоящем тексте термин "субъект" относится к млекопитающему (человеку и животным, т.е. животным, не являющимся человеком), который будет реципиентом определенного лечения, включая любой тип контроля. Обычно термины "субъект" и "пациент" используются здесь взаимозаменяемо применительно к субъекту-человеку.

В настоящем тексте термин "животные, отличные от человека" обозначает всех животных, не являющихся человеком, включая позвоночных, таких как грызуны, приматы кроме человека, бараны, быки, жвачные, зайцеобразные, свиньи, козы, лошадиные, собачьи, кошачьи, птицы и т.д., но не ограничиваясь перечисленными.

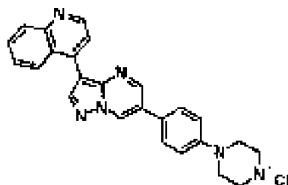
В настоящем тексте термин "дофамин" (дофамин) обозначает химическое соединение, продуцируемое дофаминовыми нейронами, которое переносит сигналы в часть мозга, которая содержит нейроны, управляющие движениями и координацией.

В настоящем тексте термин "LSB" обозначает комбинацию двух компонентов LDN-193189 и SB431542, способную снижать или блокировать передачу сигнала, заключающуюся в передаче сигнала трансформирующего фактора роста бета (TGFβ)/активин-Нодаль и передачи сигнала SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic), в клетке.

В настоящем тексте термин "SB431542" обозначает соединение, способное снижать или блокировать передачу сигнала трансформирующего фактора роста бета (TGFβ)/активин-Нодаль, имеющее номер CAS 301836-41-9, молекулярную формулу $C_{22}H_{18}N_4O_3$ и название 4-[4-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-5-(2-пиридинил)-1Н-имидазол-2-ил]-бензамид. См., например, следующую структуру



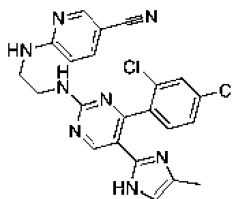
В одном примере SB431542 представляет собой SB431542 Stemolecule™, Stemgent, Inc. Cambridge, Massachusetts, США. В настоящем тексте термин "LDN-193189" обозначает низкомолекулярное соединение DM-3189, название по ИЮПАК 4-(6-(4-(пиперазин-1-ил)фенил)пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-ил)хинолин с химической формулой $C_{25}H_{22}N_6$. LDN-193189 может действовать как ингибитор передачи сигнала SMAD. LDN-193189 также является высокоэффективным низкомолекулярным ингибитором ALK2, ALK3 и ALK6, протинтирозинкиназ (PTK), ингибируя передачу сигнала семейств ALK1 и ALK3 рецепторов TGFβ I типа, что приводит к ингибированию передачи множества биологических сигналов, включая сигналы белков морфогенеза костей (BMP) BMP2, BMP4, BMP6, BMP7 и цитокина активина и последующему фосфорилированию белков SMAD Smad1, Smad5 Smad8 (Yu et al. (2008) Nat Med 14:1363-1369; Cuny et al. (2008) Bioorg. Med. Chem. Lett. 18: 4388-4392, указанный источник включен в настоящий текст посредством ссылки).



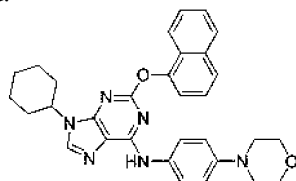
В одном примере реализации LDN-193189 представляет собой LDN-193189 Stemolecule™, Stemgent, Inc. Cambridge, Массачусетс, США.

В настоящем тексте термин "ингибитор киназы гликогенсинтазы 3β" или "ингибитор GSK3β" обозначает соединение, которое ингибирует киназу гликогенсинтазы 3β, см., например, Doble, et al., J Cell Sci. 2003;116:1175-1186 (данный источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Для целей настоящего изобретения ингибитор GSK3β способен активировать каскад передачи сигнала WNT, см., например, Cadigan, et al., J Cell Sci. 2006; 119:395-402; Kikuchi, et al., Cell Signaling. 2007;19:659-671 (этот источник включен в настоящее описание посредством ссылки).

В настоящем тексте термин "CHIR99021", или "CHIR", или "аминопиримидин", или "3-[3-(2-карбоксиэтил)-4-метилпиррол-2-метиленидил]-2-индолиной" соответствует названию 6-(2-(4-(2,4-дихлорфенил)-5-(4-метил-1H-имидазол-2-ил)пиримидин-2-иламино)этиламино)никотиннитрил по ИЮПАК. CHIR99021 является одним из примеров низкомолекулярных ингибиторов киназы гликогенсинтазы 3β (GSK3β), который активирует каскад передачи WNT и отличается высокой селективностью, демонстрируя приблизительно тысячекартную селективность в отношении панели родственных и неродственных киназ с IC₅₀=6,7 нМ в отношении человеческой GSK3β и наномолярные значения IC₅₀ в отношении гомологичных GSK3β грызунов.



В одном примере реализации CHIR99021 представляет собой CHIR99021 Stemolecule™, Stemgent, Inc. Cambridge, Massachusetts, США. В настоящем тексте термин "пурморфамин" обозначает производное пурина, такое как производное, имеющее номер CAS: 483367-10-8. Одним из примеров является соединение, имеющее приведенную ниже структуру, которое активирует каскад Hedgehog, включая направленное воздействие на Smoothed.



В одном примере реализации пурморфамин представляет собой пурморфамин Stemolecule™, Stemgent Inc. Cambridge, Massachusetts (США).

В настоящем тексте термин "сигнальный" применительно к "сигнальному белку" относится к белкам, которые активирует или на которые каким-либо другим образом влияет связывание лиганда с мембранным рецепторным белком или какой-либо другой стимул. Примеры сигнальных белков включают SMAD, комплексный белок WNT, в другом варианте реализации, комплексный белок WNT, включая бета-катенин, белки Sonic hedgehog (SHH), NOTCH, трансформирующий фактор роста бета (TGFβ), активин, Нодаль, киназа гликогенсинтазы 3β (GSK3β) и подобные им. Для многих рецепторов клеточной поверхности или внутренних рецепторных белков лиганд-рецепторные взаимодействия не связаны напрямую с ответом клетки. Активированный лигандом рецептор должен сначала провзаимодействовать с другими белками внутри клетки для осуществления конечного физиологического воздействия лиганда на поведение клетки. Часто после активации или ингибирования рецептора происходит изменение поведения цепи из нескольких взаимодействующих клеточных белков. Полный комплекс изменений в клетке, инициируемый активацией рецептора, называется механизмом сигнальной трансдукции (передачи сигнала) или каскадом передачи сигнала.

В настоящем тексте термин "LSB/S/F8/CHIR" или "LSB/SHH/FGF8/CHIR" относится к приведению клеток в контакт с LDN-193189 и SB431542 (т.е. LSB) в дополнение к S, активатору белка Sonic Hedgehog, F8, FGF8 и CHIR в соответствии с настоящим изобретением. В отличие от "LSB/S/F8", или "SHH/FGF8", или "SHH/FGF", которые относятся к приведению клеток в контакт с LDN-193189 и SB431542 (т.е. LSB) в дополнение к S, активатору белка Sonic Hedgehog, F8, FGF8, но в отсутствие CHIR, согласно описанным ранее способам. В близких аббревиатурах "LDN/SB" относится к приведению клеток в контакт с LDN, LDN-193189 и SB, SB431542.

В настоящем тексте термин "ингибировать" или "блокировать" означает снижение уровня активности определенного каскада передачи сигнала клетки после обработки соединением (т.е. ингибитором) по сравнению с активностью указанного каскада передачи сигнала в клетке, которую не обрабатывали таким соединением или подвергли контрольной обработке.

В настоящем тексте термин "активировать" обозначает увеличение уровня активности определен-

ного каскада передачи сигнала клетки после обработки соединением (т.е. активатором) по сравнению с активностью указанного каскада передачи сигнала в клетке, которую не обрабатывали таким соединением или подвергли контрольной обработке. Любой уровень ингибирования или активации конкретного каскада передачи сигнала считается вариантом реализации настоящего изобретения, если такое ингибирование или активация приводят к направленной дифференцировке стволовой клетки.

В настоящем тексте термин "SMAD" (или "Sma Mothers Against Decapentaplegic" или "Small Mothers Against Decapentaplegic") относится к сигнальной молекуле.

В настоящем тексте термин "WNT" или "wingless" применительно к лиганду обозначает группу секретлируемых белков (а именно, Int1 (integration 1) у человека), которые могут взаимодействовать с рецептором WNT, таким как рецептор семейства Frizzled и LRPDerailed/RYK.

В настоящем тексте термин "WNT" или "wingless" применительно к каскаду передачи сигнала обозначает путь передачи сигнала, состоящий из лигандов семейства Wnt и рецепторов семейства Wnt, таких как рецепторы Frizzled и LRPDerailed/RYK, опосредуемый β -катенином или без него. Для описанных здесь целей предпочтительный каскад передачи сигнала WNT включает участие β -катенина, т.е. комплекса WNT/ β -катенин.

В настоящем тексте "канонический каскад" или "классическая активация" применительно к WNT обозначает один из множества нижележащих сигнальных каскадов Wnt, например в каноническом каскаде основным эффектом связывания лиганда Wnt с его рецептором является стабилизация цитоплазматического комплекса деградации бета-катенина. Другие каскады Wnt являются неканоническими.

В качестве одного примера, низкомолекулярное соединение CHIR влияет на нижележащий каскад передачи сигнала Wnt.

В настоящем тексте термин "Sonic hedgehog (SHH или Shh)" обозначает белок, который является одним из по меньшей мере трех белков в семействе каскада сигнальной трансдукции млекопитающих, называемого hedgehog (еж), другим является DHH (DHH (пустынный еж, desert hedgehog), а третьим - IHH (индийский еж, Indian hedgehog). Shh взаимодействует по меньшей мере с двумя трансмембранными белками путем взаимодействия с трансмембранными молекулами Patched (PTC) и Smoothened (SMO). Обычно Shh связывается с PTC, что обеспечивает дальнейшую активацию SMO - переносчика сигнала (сигнального трансдуктора). В отсутствие SHH PTC обычно ингибирует SMO, который, в свою очередь, активирует репрессор транскрипции, вследствие чего не происходит транскрипция некоторых генов. Если Shh присутствует и связывается с PTC, PTC не может вмешиваться в функционирование SMO. В отсутствие ингибирования SMO некоторые белки могут проникать в ядро и действовать как факторы транскрипции, что обеспечивает активацию некоторых генов (см. Gilbert, 2000 Developmental Biology (Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers).

В настоящем тексте термин "активатор" или "активирующий" относится к малым молекулам, пептидам, белкам и соединениям для активации молекул, приводящей к направленной дифференцировке клеток в соответствии с настоящими изобретениями. Примеры активаторов включают, но не ограничиваются перечисленными: CHIR, Sonic hedgehog (SHH) C25II, низкомолекулярный агонист белка Smoothened пурморфаминфактор роста фибробластов (FGF, ФРФ) и т.д.

В настоящем тексте термин "активатор передачи сигнала белка Sonic hedgehog (SHH)" относится к любой молекуле или соединению, которые активируют путь передачи сигнала SHH, включая молекулы или соединения, которые связываются с PTC или агонистом Smoothened, и подобные им. Примерами таких соединений являются белок Sonic hedgehog (SHH) C25II и низкомолекулярный агонист белка Smoothened пурморфамин.

В настоящем тексте термин "Sonic hedgehog (SHH) C25II" обозначает рекомбинантный N-концевой фрагмент полноразмерного мышинного белка hedgehog, способный связываться с рецептором SHH и активировать SHH, см, например, номер по каталогу R&D Systems: 464-SH-025/CF.

В настоящем тексте термин "сигналы" относится к внутренним и внешним факторам, которые контролируют изменения в структуре и функции клетки. Они могут иметь химическую или физическую природу. В настоящем тексте термин "лиганд" относится к молекулам и белкам, которые связываются с рецептором (R), примеры включают, но не ограничиваются трансформирующим фактором роста-бета, активинами, белком нодаль, белками морфогенеза костей (BMP) и т.д.

В настоящем тексте термин "ингибитор" или "ингибитор передачи сигнала" относится к ингибированию сигнальной молекулы или сигнального молекулярного каскада, как например, в случае ингибитора передачи сигнала SMAD, ингибитор киназы гликогенсинтазы 3β (GSK3 β) обозначает соединение или молекулу (например, малую молекулу, пептид, пептидомиметик, природное соединение, белок, мРНК, антисмысловую нуклеиновую кислоту, аптамер или антитело), которое нарушает (т.е. снижает, или подавляет, или устраняет, или блокирует) сигнальную функцию молекулы или каскада. Другими словами, ингибитор представляет собой любое соединение или молекулу, которая изменяет любой вид активности названного белка (сигнальной молекулы, любой молекулы, взаимодействующей с сигнальной молекулой, названной связанной молекулы, такой как киназа гликогенсинтазы 3β (GSK3 β)) (например, включая описанные здесь сигнальные молекулы, но не ограничиваясь ими), в качестве одного из примеров по-

средством осуществления прямого контакта с передачей сигнала SMAD, осуществления контакта со SMAD мРНК, что приводит к конформационным изменениям SMAD, снижению уровней белка SMAD или нарушению взаимодействия SMAD с партнерами по передаче сигнала (например, включая партнеров, описанных здесь) и ослабление экспрессии целевых генов SMAD (например, таких генов, как описанные здесь). Ингибиторы включают также молекулы, которые опосредованно регулируют биологическую активность SMAD, перехватывая молекулы выше по каскады сигнализации. Соответственно, в одном варианте реализации ингибитор согласно настоящему изобретению индуцирует (изменяет) или меняет дифференцировку с клеточного типа в отсутствие воздействия (типичного) на другой клеточный тип (атипичный), один из способов согласно настоящему изобретению, включающий применение LDN/SB, CHIR и активатора SHH (который может ингибировать киназу гликогенсинтазы 3β) обеспечивал дифференцировку клеток-предшественников в в атипичный нейрональные клетки-предшественники. В предпочтительном варианте реализации ингибитор согласно настоящему изобретению "изменяет" или "снижает" или "блокирует" исходную передачу сигнала, направляя дифференцировку клеток по пути к атипичному типу клеток, например, как описано в данном тексте для дифференцировки клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга и дофаминовых (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейронов среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями. Соответственно, ингибитор согласно настоящему изобретению представляет собой природное соединение или малую молекулу, которая изменяет активность сигнальной молекулы, таким образом, что это способствует дифференцировке исходной популяции клеток (день 0) в клетки-предшественники вентральной пластинки среднего мозга. Если клетки-предшественники приводят в контакт с ингибиторами, эти малые молекулы способствуют дальнейшей дифференцировке в дофаминовые (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейроны среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями. Ингибиторы описаны в терминах конкурентного ингибирования (связывается с активным сайтом, что приводит к исключению или снижению связывания с другим известным связывающим соединением) и аллостерического ингибирования (связывается с белком, что приводит к изменению конформации белка, что нарушает связывание соединения с активным сайтом этого белка) в дополнение к ингибированию в дополнение к ингибированию, индуцированному связыванием с и воздействием на молекулу выше по каскаду, чем названная сигнальная молекула, что, в свою очередь, вызывает ингибирование названной молекулы. В некоторых случаях ингибитор называется "прямым ингибитором", что обозначает ингибирование сигнальной мишени или пути передачи сигнала, являющегося мишенью; например, прямым ингибитором гамма-секретазы является молекула DAPT, которая связывается с белком гамма-секретазой.

В настоящем тексте термин "производное" относится к химическому соединению с близкой основной структурой.

В настоящем тексте термин "клетка-предшественник вентральной пластинки среднего мозга" применительно к *in vivo* клетке, расположенной в среднем мозге, включая период эмбрионального развития нейронов среднего мозга, обозначает клетку, которая может дифференцироваться в дофаминпродуцирующую клетку. В некоторых вариантах реализации "клетка-предшественник вентральной пластинки среднего мозга" относится к клетке в культуре, которая используется для искусственного получения культуральной клетки *in vitro*, которая экспрессирует наборы маркеров, идентичные и пересекающиеся с наборами маркеров, экспрессируемыми клетками *in vivo*, т.е. экспрессирует совместно маркер вентральной пластинки FOXA2 и маркеры покрывки LMX1A, OTX2, NGN2 и DDC, как в культивируемых клетках в соответствии с настоящими изобретениями около дня 11 после инициации направленной дифференцировки, как описано здесь. В предпочтительном варианте клетка-предшественник вентральной пластинки среднего мозга является "FOXA2+LMX1A+" или "FOXA2/LMX1A+". В некоторых вариантах реализации небольшое число клеток в популяции дифференцированных предшественников является FOXA2/LMX1A/TH+.

В настоящем тексте термин "ДА нейроны покрывки" или "аутентичные ДА нейроны среднего мозга" или "FOXA2+LMX1A+ дофаминовые (ДА) нейроны линии среднего мозга" или "дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга" или "приживляемые ДА нейроны среднего мозга" или "mДА нейроны", или "FOXA2+LMX1A+TH+", или "FOXA2/LMX1A/TH", или "FOXA2+LMX1A+NURR1+TH+", или "FOXA2/LMX1A/NURR1/TH" относится к популяции приживляемых ДА нейронов среднего мозга, полученных описанным здесь способом, обычно приблизительно на 25 день или к 25 дню после инициации направленной дифференцировки. В предпочтительном варианте реализации "аутентичные ДА нейроны среднего мозга" являются FOXA2+LMX1A+/NURR1+/TH+. Эти нейроны обозначали как "приживляемые" после эксперимента по трансплантации на мышах и приматах, что указывает на способность этих нейронов обращать неврологические состояния, подобные паркинсонизму, и при этом вызывают меньше проблем, связанных с чрезмерным ростом нейронов и образованием тератом. Дофаминовые (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейроны среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями выдерживали *in vitro* в течение нескольких месяцев при сохранении способности к приживлению.

Согласно настоящему раскрытию, клетки, применяемые для получения клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга и дофаминовых (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейронов среднего мозга получают из различных источников, включая эмбриональные и неэмбриональные источники, например ЭЧКч и неэмбриональные иПСКч, соматические стволовые клетки, стволовые клетки с заболеванием,

т.е. изолированные плюрипотентные клетки и модифицированные производные стволовые клетки, взятые у пациентов с болезнью Паркинсона, раковые стволовые клетки, плюрипотентные клетки человека или млекопитающего и т.д.

В настоящем тексте термин "стволовая клетка" относится к клетке, обладающей способностью делиться в течение неопределенного периода в культуре и давать начало специализированным клеткам. Стволовая клетка может быть получена из организмы животных и пациентов, включая людей; например, человеческая стволовая клетка представляет собой стволовую клетку, которая является человеческой. Стволовая клетка может быть получена из различных источников, включая эмбриональные инеэмбриональные, такие как клетки пуповинной крови, клетки детей и клетки взрослых. Для целей настоящих изобретений стволовые клетки взрослых в целом относятся к клеткам, которые не были первоначально получены из плода, другими словами, клетки младенцев, из неиспользуемых пуповин, неиспользуемой плаценты, клетки детей, клетки взрослых и т.д.

В настоящем тексте термин "стволовые клетки пуповинной крови" относится к стволовым клеткам, полученным из пуповины при родах, которые обладают способностью давать начало, по меньшей мере, всем клеткам крови в организме (гематопозитические).

В настоящем тексте термин "соматические стволовые клетки" (стволовые клетки взрослых) относится к относительно редкой недифференцированной форме клеток, встречающейся во многих органах и дифференцированных тканях, обладающих ограниченной способностью к самообновлению (в лаборатории) и дифференцировке. Способность таких клеток к дифференцировке варьирует, но обычно ограничивается типами клеток органа, из которого они происходят.

В настоящем тексте термин "соматическая клетка" относится к любой клетке тела, за исключением гамет (яйцеклетки и сперматозоида), иногда они называются "клетками взрослых".

В настоящем тексте термин "нейрональная клеточная линия" относится к клетке, которая принимает участие в развитии нервной системы (как центральной, так и периферической) или клеток нервного валика в процессе развития или во взрослом организме. Линии клеток нервного валика включают краниальные, клетки ствола, вагусные и сердечные, из которых образуются мезодерма, черепной хрящ, кости черепа, тимус, зубы, меланоциты, пигментные клетки радужной оболочки, черепные ганглии, ганглии задних корешков, симпатические/парасимпатические ганглии, эндокринные клетки, клетки кишечной нервной системы и части сердца.

В настоящем тексте термин "стволовая клетка взрослого" относится к соматической стволовой клетке, например "гематопозитической стволовой клетке", что обозначает стволовую клетку в организме младенцев, детей и взрослых, которая дает начало всем эритроцитам и тромбоцитам и тромбоцитам.

В настоящем тексте термин "эмбриональная стволовая клетка" относится к первичной (недифференцированной) клетке, которая получена из одного из нескольких источников, включая эмбрион до имплантации, искусственно созданный эмбрион, т.е. полученный в результате оплодотворения *in vitro* и т.д., но не ограничиваясь перечисленными, способной к делению без дифференцировки в течение длительного культивирования; известно, что эти клетки обладают способностью развиваться в клетки и/или ткани трех первичных зародышевых листков: эктодерму, мезодерму и энтодерму.

В настоящем тексте термин "энтодерма" относится к слою клеток, образованных из внутренней клеточной массы бластоцисты; он обладает способностью *"in vivo"* давать начало легким, другим дыхательным структурам и органам пищеварения, или, в общем "кишке", а также разнообразным типам клеток *in vitro*.

В настоящем тексте термин "линия эмбриональных стволовых клеток" относится к популяции эмбриональных стволовых клеток, которые культивируются в условиях *in vitro*, которые обеспечивают пролиферацию без дифференцировки в течение дней, месяцев или лет, например, как клетки линии WA-09 человеческих клеток.

В настоящем тексте термин "эмбриональные стволовые клетки человека" или "hESC" (ЭСКч) относится к типу плюрипотентных стволовых клеток, полученных из эмбрионов на ранних стадиях до стадии бластоцисты включительно, которые способны делиться без дифференцировки в течение продолжительного периода культивирования и о которых известно, что они развиваются в клетки и ткани первичных зародышевых листков: эктодерму, мезодерму и энтодерму.

В настоящем тексте термин "индуцированная плюрипотентная стволовая клетка" или "iPSC" (иПСК) относится к типу плюрипотентных стволовых клеток, близкому к эмбриональным стволовым клеткам, состоящему из соматических (взрослых) клеток, перепрограммированных таким образом, что они переходят в состояние, подобное эмбриональным стволовым клеткам, за счет того, что их заставляют экспрессировать факторы, важные для поддержания "стволовости" эмбриональных стволовых клеток (ESCs, ЭСК). Мышиные иПСК были описаны в 2006 г. (Takahashi and Yamanaka), а человеческие иПСК были описаны в конце 2007 г. (Takahashi et al. and Yu et al). Мышиные иПСК демонстрируют важные свойства плюрипотентных стволовых клеток, включая экспрессию маркеров стволовых клеток, образование опухолей из всех трех зародышевых слоев и принимать участие в образовании различных тканей при инъекции эмбрионы на очень ранней стадии развития. Человеческие иПСК также экспрессируют маркеры стволовых клеток и способны образовывать клетки, характерные для

всех четырех зародышевых слоев. В отличие от эмбриональной стволовой клетки иПСК получают искусственно путем введения определенных эмбриональных генов (таких как трансгены OCT4, SOX2 и KLF4) (см., например, Takahashi, Yamanaka Cell 126, 663-676 (2006), данный источник включен в настоящий текст посредством ссылки) в соматическую клетку, например в клеточные линии из индуцированных клеток, C14, C72 и подобных. Другим примером иПСК являются клетки кожи взрослого человека, или фибробласты, трансформированные генами (OCT4, SOX2, NANOG, LIN28 и KLF4), клонированными в плазмиду, см. Yu, et al., Science DOI: 10.1126/science. 1172482 (этот источник включен в настоящее описание посредством ссылки).

В настоящем тексте термин "тотипотентный" относится к способности давать начало всем типам клеток организма плюс все типа клеток, которые образуют экстраэмбриональные ткани, такие как плацента.

В настоящем тексте термин "мультипотентный" относится к способности развиваться в больше чем один тип клеток организма.

В настоящем тексте термин "плюрипотентный" относится к клетке, обладающей способностью давать начало по меньшей мере двум, но часто многим различным типам клеток организма. Плюрипотентные клетки часто образуют тератому после инъектирования мышам с подавленным иммунитетом.

В настоящем тексте термин "плюрипотентная стволовая клетка" относится к способности этой клетки развиваться в по меньшей мере два различных типа клеток в зависимости от факторов окружающей среды, т.е. факторов роста, морфогенов, сигнальных молекул, активаторов или ингибиторов, и т.д. В некоторых вариантах реализации плюрипотентная стволовая клетка относится к способности клетки развиваться в любой из трех зародышевых листков в ходе индивидуального развития организма, в том числе энтодерму, мезодерму и эктодерму.

В настоящем тексте термин "специализированная клетка" относится к типу клеток, выполняющему специфическую функцию в многоклеточных организмах. Например, группы специализированных клеток, таких как нейроны, совместно функционируют с образованием системы, такой как нервная система.

В настоящем тексте термин "нейроэктодерма" относится к клетке или направлению дифференцировки клеток, обнаруживаемых в ранних периодах индивидуального развития или во время дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток, которые могут давать начало клеткам нейронной линии.

В настоящем тексте термин "маркеры пролиферации клеток" относится к экспрессии молекул, ассоциированных с быстро делящимися клетками, которые, как правило, не присутствуют в зрелых медленно делящихся или неделящихся клетках, т.е. присутствуют в активно делящихся клетках, в отличие от клеток с увеличенной продолжительностью клеточного цикла или неделящихся клеток. Примеры таких маркеров включают маркер пролиферации клеток Ki67 (Gerdes, et al., Int J Cancer 31:13-20 (1983), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки) и маркеры G2/M-фаз митоза фосфогистоны H3 (Hendzel, et al., Chromosoma 106:348-360 (1997), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки).

В настоящем тексте термин "пролиферация" относится к увеличению числа клеток.

В настоящем тексте термин "дифференцировка" относится к процессу, в ходе которого неспециализированный эмбриональная клетка приобретает признаки специализированной клетки, например специфического типа нейронов, клетки головного мозга, сердца, печени или мышечной клетки. Контроль дифференцировки обеспечивает взаимодействие генов клетки с физическими и химическими условиями вокруг указанной клетки, обычно посредством сигнальных путей, задействующих белки, внедренные в поверхность клетки.

В настоящем тексте термин "дифференцировка" применительно к клеткам системы дифференцирующихся клеток относится к процессу, в ходе которого клетки дифференцируются из одного типа клеток (например, из мультипотентной, тотипотентной или плюрипотентной способной к дифференцировке клетки) в другой тип клеток, такой как целевая дифференцированная клетка.

В настоящем тексте термин "дифференцировка клетки" относится к пути, посредством которого менее специализированная клетка (т.е. стволовая клетка) развивается или созревает с приобретением более выраженной формы и функции (например, иПСК, развивающаяся в предшественник нервного гребня, в клетку нейрональной линии, в клетки-предшественники вентральной пластинки среднего мозга, в клетки пути среднего мозга дофаминовые (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейроны в соответствии с настоящими изобретениями).

В настоящем тексте термин "недифференцированный" относится к клетке, еще не развившейся в специализированный тип клеток.

В настоящем тексте термин "по умолчанию" или "пассивный" применительно к пути дифференцировки клеток относится к пути, в ходе которого менее специализированная клетка становится клеткой определенного типа дифференцированных клеток в культуре, в отсутствие обработки определенными соединениями, т.е. в нормальных условиях культивирования клеток без контакта по меньшей мере с одним морфогеном. Другими словами, заданная по умолчанию клетка образуется, когда клетку не приводят в контакт с молекулой, способной изменять тип дифференцированных клеток (т.е. с морфогеном), например культивирование с обработкой отдельно LSB, однако, не активатором SHH или активатором Wnt для получения положительной по белку Forkhead A2 (FOXA2)+ клетки в соответствии с настоящими

изобретениями, приводит вместо этого к экспрессии маркеров HES5, PAX6, LHX2 и EMX2. И напротив, "не заданный по умолчанию" применительно к клетке относится к типу дифференцированных клеток, дающему в результате тип клеток, отличный от заданной по умолчанию клетки, т.е. не заданная по умолчанию клетка относится к типу дифференцированных клеток, образующихся в не заданных по умолчанию условиях, например представляет собой клетку в соответствии с настоящими изобретениями, в том числе положительную по белку Forkhead A2 (FOXA2)+ нейрональную клетку, клетку-предшественник вентральной пластинки среднего мозга и дофаминовый (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейрон пути среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями; и т.д. Заданная по умолчанию клетка может также представлять собой заданную по умолчанию клетку, которая после контакта с морфогеном становится не заданной по умолчанию клеткой, без последующего контакта с морфогенным соединением; например, не заданную по умолчанию клетку-предшественник вентральной пластинки среднего мозга, которая затем становится заданной по умолчанию клеткой, не относящейся к дофаминовым (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейронам пути среднего мозга, ввиду отсутствия контакта с морфогеном, таким как SHIR.

В настоящем тексте термин "морфоген" относится к соединению, которое влияет на дифференцировку клетки, т.е. определяет, по меньшей мере, частично, направление дифференцировки клеток. Морфоген также может влиять на клетку таким образом, что происходит ее дифференцировка в не заданный по умолчанию тип клеток.

В настоящем тексте термин "направленная дифференцировка" относится к манипуляциям с условиями культивирования стволовых клеток для индукции дифференцировки в конкретный (например, требуемый) тип клеток, например, в клетки-предшественники вентральной пластинки среднего мозга и дофаминовые (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейроны линии среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями. В одном варианте реализации термин "направленная дифференцировка" применительно к клетке относится к применению малых молекул, белков - факторов роста и других условий роста, способствующих переходу клетки из плюрипотентного состояния к более зрелому или специализированному направлению дифференцировки клеток (например, в клетку центральной нервной системы, нервную клетку, клетку-предшественник вентральной пластинки среднего мозга и дофаминовый (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейрон линии среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями; и т.д.). В одном предпочтительном варианте реализации начало направленной дифференцировки происходит при приведении клетки в контакт с LDN/SB на 0 день. Прохождение клеткой направленной дифференцировки согласно описанию в настоящем документе приводит к образованию не заданного по умолчанию типа клеток клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга и дофаминовых (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейрон линии среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями. В настоящем тексте термин "индукция дифференцировки" применительно к клетке относится к изменению заданного по умолчанию типа клеток (генотипа и/или фенотипа) на не заданный по умолчанию тип клеток (генотип и/или фенотип). Соответственно, "индукция дифференцировки в стволовой клетке" относится к индукции образования при делении клетки дочерних клеток с характеристиками, отличающимися от указанной стволовой клетки, например характеристиками генотипа (т.е. изменение генной экспрессии по оценке с применением генетического анализа, например, с микрочипом) и/или фенотипа (т.е. изменение экспрессии белка, такого как белок Forkhead A2 (FOXA2), или набора белков, например, клетки, положительные (+) по белку Forkhead A2 (FOXA2) и кодируемому гомеобоксным геном LIM фактору транскрипции 1-альфа (LMX1A), но отрицательные (-) по PAX6).

В настоящем тексте термин "направление (линия) дифференцировки" применительно к клетке, например "определение направления дифференцировки клеток" относится в целом к клетке генетически определенной линии, потомство которой способно становиться клетками различных типов или нескольких специфических типов, в зависимости от условий *in vivo* или условий культивирования *in vitro*. Другими словами, заранее заданное направление дифференцировки клетки определяет окружающая среда, предопределяя конкретный путь дифференцировки; таким образом, клетка становится клеткой одного, а не другого типа, например потомство стволовых клеток с "нейральным направлением дифференцировки" становится нервными клетками, а не мышечными клетками и не клетками кожи.

В настоящем тексте термин "разрастание нейритов" или "разрастание нейронов" относится к наблюдаемым удлинением окруженным мембраной выступам цитоплазмы из клеток.

В отличие от "избыточного нейронного разрастания", которое относится к нежелательному неограниченному росту нейронов, т.е. неконтролируемому росту нейронов из трансплантированных клеток в участке приживления трансплантата. В настоящем тексте термин "тератома" относится к нераковой опухоли из ткани любого типа, образующейся из трансплантированных клеток.

В настоящем тексте термин "образование тератомы" относится к нежелательному росту ткани различных типов с образованием нераковых опухолей в результате роста трансплантированных клеток.

В настоящем тексте термин "дофаминовый нейрон" или "дофаминергический нейрон" в общем случае относится к клетке, способной экспрессировать дофамин. "Дофаминовые нейроны среднего мозга", или "мДА" относятся к предположительно экспрессирующим дофамин клеткам в структурах переднего мозга и экспрессирующим дофамин клеткам в структурах переднего мозга.

В настоящем тексте термин "нейральная стволовая клетка" относится к стволовой клетке, обнару-

живаемой в нейральной ткани во взрослом возрасте, способной давать начало нейронам и глиальным (поддерживающим) клеткам. Примеры глиальных клеток включают астроциты и олигодендроциты.

В настоящем тексте термин "вентральная пластинка", или "FP", или "fp" относится к области нервной трубки *in vivo*, проходящей вдоль всей вентральной средней линии, также описанной как непарная вентральная продольная зона нейральной трубки или называемая сигнальным центром нейральной трубки. Другими словами, нейральная трубка была разделена на разные области, при этом вентральные клетки, расположенные ближе всего к средней линии, составляют вентральную пластинку. В одном примере дальнейшей идентификации клеток FP среднего мозга цыпленка может быть разделена на медиальную (MFP) и латеральную (LFP) области на основании генной экспрессии, способа индукции и функции. Клетки вентральной пластинки обнаруживаются *in vivo* в нескольких областях развивающегося эмбриона, например клетки вентральной пластинки среднего мозга, заднего мозга и т.д. Считается, что *in vivo* клетки вентральной пластинки в области среднего мозга дают начало клеткам, отличным от клеток, дифференцирующихся из клеток вентральной пластинки в других областях. Одним из первичных маркеров вентральной пластинки в области среднего мозга является FOXA2.

В настоящем тексте термин "пластинка четверохолмия (покрышка)" относится к дорсальным клеткам, расположенным ближе всего к средней линии. Один из маркеров пластинки четверохолмия представлен LMX1A. Во время эмбрионального развития клетки вентральной пластинки и пластинки четверохолмия локализованы в отдельных положениях в ЦНС (вентрально/дорсально) и отличаются диаметрально противоположными требованиями к паттернам для индукции.

В настоящем тексте термин "средний мозг" относится к области развивающегося головного мозга позвоночных между передним мозгом (антериально) и задним мозгом (постериально). В областях среднего мозга берут начало многие области головного мозга, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, ретикулярная формация, представляющая собой часть покрышки, область ствола головного мозга, влияющая на моторные функции, ножка мозга, которая состоит из нервных волокон, соединяющих полушария головного мозга с мозжечком, и большое пигментированное ядро, называемое черным веществом. Уникальным признаком развивающегося среднего мозга является коэкспрессия маркера вентральной пластинки FOXA2 и маркера пластинки четверохолмия LMX1A.

В настоящем тексте термин "нейрон" относится к нервной клетке, основной функциональной единице нервной системы. Нейрон состоит из тела клетки и отростков - аксона и один или более дендритов. Нейроны передают информацию в другие нейроны или клетки путем высвобождения нейротрансмиттеров в синапсах.

В настоящем тексте термин "культура клеток" ("культивирование клеток") относится к росту клеток *in vitro* в искусственной среде, для исследований или медицинского лечения.

В настоящем тексте термин "культуральная среда" относится к жидкости, покрывающей клетки в культуральном сосуде, таком как чашка Петри, многолуночный планшет и т.п., и содержащей питательные вещества для питания и поддержки клеток. Культуральная среда может также включать факторы роста, которые добавляют для индукции требуемых изменений в клетках.

В настоящем тексте термин "среда для нейронального созревания", или среда "BAGCT" относится к культуральной среде, содержащей среду N2 с добавлением нейротрофического фактора головного мозга (BDN), аскорбиновой кислоты (АК), нейротрофического фактора глиальной клеточной линии, дибутирил-цАМФ и трансформирующего фактора роста типа $\beta 3$ для дофаминовых (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейронов линии среднего мозга.

В настоящем тексте термин "фидерный слой" относится к клетке, используемой при совместном культивировании для поддержания плюрипотентных стволовых клеток. В случае культур эмбриональных стволовых клеток человека типичные фидерные слои включают эмбриональные фибробласты мыши (МЭФ) или эмбриональные фибробласты человека, которые прошли обработку для предотвращения деления в культуре.

В настоящем тексте термин "пассаж" применительно к культуре клеток относится к процессу, в ходе которого клетки разъединяют, промывают и высевают в новые культуральные сосуды после раунда роста и пролиферации клеток. Число пассажей, которому подверглись культивируемые клетки, представляет собой показатель их возраста и ожидаемой стабильности.

В настоящем тексте термин "экспрессия" в отношении гена или белка относится к получению мРНК или белка, которое можно наблюдать с применением анализов, таких как анализы на микрочипах, анализы с окрашиванием антител и т.п.

В настоящем тексте термин "ген парного бокса 6", или "PAX6" относится к маркеру отличной от заданной по умолчанию нейропрогениторной клетки.

В настоящем тексте термин "TUJ1", или "нейрон-специфичный бета-тубулин класса III" применительно к дифференцирующей клетке в соответствии с настоящими изобретениями относится к маркеру ранней нейральной дифференцировки клеток человека, например нейральных клеток-предшественников, и его экспрессия обнаруживается в нейронах ПНС и ЦНС.

В настоящем тексте термин "гомодимер" применительно к молекуле SMAD относится к по меньшей мере двум молекулам SMAD, соединенным между собой, например, дисульфидными связями.

В настоящем тексте термин "приведение клеток в контакт" с соединением в соответствии с настоящими изобретениями относится к размещению указанного соединения в локализации, позволяющей соприкосновение с клеткой, с получением (обеспечением) "приведенных в контакт" клеток. Приведение в контакт может осуществляться с применением любого подходящего способа. Например, в одном варианте реализации приведение в контакт происходит путем добавления указанного соединения в пробирку с клетками. Приведение в контакт может также быть осуществлено путем добавления указанного соединения в культуру клеток.

В настоящем тексте термин "прикрепленная клетка" относится к клетке, растущей *in vitro*, отличающейся тем, что указанная клетка прикрепляется ко дну или стенкам культурального сосуда; прикрепленная клетка может вступать в контакт с сосудом за счет молекул внеклеточного матрикса и т.п., и для отсоединения указанной клетки от культуральной емкости/контейнера требуется применение фермента, т.е. трипсина, диспазы и т.д. "Прикрепленная клетка", в отличие от клетки в суспензионной культуре, не прикрепленной и не требующей применения фермента для извлечения клеток из культурального сосуда. В настоящем тексте термин "маркер" или "клеточный маркер" относится к гену или белку, указывающему на определенную клетку или тип клеток. Маркер для клетки может не ограничиваться одним маркером, маркеры могут относиться к "паттерну" маркеров, т.е. обозначенная группа маркеров может обеспечивать идентификацию клетки или типа клеток, отличая их от других клеток или типов клеток. Например, дофаминовые (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейроны линии среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями экспрессируют один или большее число маркеров, которые отличают клетку-предшественника вентральной пластинки среднего мозга от слабее дифференцированной клетки-предшественника, т.е. положительна по белку Forkhead A2 (FOXA2) и положительна по кодируемому гомеобоксным геном LIM фактору транскрипции 1 альфа (LMX1A), в отличие от HES5+ и PAX6+ клеток, например, как видно из паттернов экспрессии, показанных на фиг. 1e и 1f. В настоящем тексте термин "положительный" применительно к клетке, включая сочетание "положительная клетка", относится к клетке, которая экспрессирует маркер, в качестве одного из примеров, антитело "окрашивает" по этому маркеру при применении системы окрашивания антителами (детекции) или последовательности нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты маркера, по оценке с применением репортерной молекулы, т.е. флуоресцентной молекулы, которая присоединяется к двуниевым последовательностям нуклеиновых кислот, в детектируемом количестве для количественного и/или качественного анализа, превышающем количество для контрольной или сопоставляемой клетки. Например, под клеткой, положительной по такому маркеру, такие как белок Forkhead A2 (FOXA2) и т.д., подразумевается клетка, которая экспрессирует мРНК и/или белок FOXA2, согласно детекции в ходе анализа, например, с применением генного чипа или антитела, соответственно. Такая положительная клетка может быть названа FOXA2+. Если клетка положительна более чем по одному маркеру, например, если используется обозначение FOXA2/LMX1A+, указанная клетка или большая часть популяции указанных клеток положительна как по FOXA2, так и по LMX1A.

В настоящем тексте термин "отрицательный" применительно к клетке или популяции клеток, в том числе "отрицательная клетка" относится к клетке или популяции, в которой отсутствует детектируемый сигнал маркера, или присутствует сигнал на уровне контрольных популяций. Например, клетка, которая не окрашивается с применением способа детекции, предусматривающим приведение в контакт с антителом к белку Forkhead A2 (FOXA2), или способа с генным чипом, который включает детекцию мРНК FOXA2, и т.д., является FOXA2-, или отрицательной по FOXA2.

В настоящем тексте термины "репортерный ген" или "репортерная конструкция" относятся к генетическим конструкциям, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, который легко поддается детекции или анализу, такой как окрашенный белок, флуоресцентный белок, такой как GFP, или фермент, такой как β -галактозидаза (ген *lacZ*).

В настоящем тексте термин "GFP" относится к любой последовательности ДНК зеленого флуоресцентного белка, экспрессия которой в клетке может давать флуоресцентный белок, обычно используемый в качестве маркера экспрессии целевого гена. Примеры GFP включают последовательности GFP, выделенные из кишечноротовых, таких как тихоокеанская метдуза, *Aequoria Victoria*, и производные синтетические последовательности, такие как "eGFP".

Термин "образец"(проба) используется в самом широком смысле. В другом смысле он включает образец или культуру, полученные из любого источника и включает жидкости, твердые вещества и ткани. Образцы из окружающей среды включают материалы окружающей среды, такие как поверхностные материалы, почву, воду и промышленные материалы. Эти примеры не следует рассматривать как ограничивающие типы образцов, которые можно применять в настоящем изобретении.

Термины "очищенный", "очищать", "очистка", "изолированный", "изолировать", "изолирование" и их грамматические эквиваленты в настоящем тексте относятся к снижению количества по меньшей мере одной примеси в образце. Например, целевой тип клеток очищен по меньшей мере на 10%, в предпочтительном варианте, по меньшей мере на 30%, в более предпочтительном варианте, по меньшей мере на 50%, в еще более предпочтительном варианте, по меньшей мере на 75%, и в наиболее предпочтительном варианте, по меньшей мере на 90%, с соответствующим снижением нецелевых типов клеток, например,

направленная дифференцировка в соответствии с настоящими изобретениями приводила к желаемому повышению чистоты дифференцированных клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга или дофаминовых (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейронов среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями. Другими словами, "очищать" и его эквиваленты относятся к удалению некоторых клеток (например, нежелательных клеток) из образца, либо механически, например путем сортировки в потоочном цитометре, либо посредством направленной дифференцировки. Например, для обеспечения дифференцировки очищенной популяции положительных по белку forkhead box A2 (FOXA2) и кодируемому гомеобоксным геном LIM фактору транскрипции 1, альфа (LMX1A) клеток-предшественников в соответствии с настоящими изобретениями, клетки-предшественники очищают путем удаления примеси нервных клеток PAX6 путем сортировки смешанной популяции клеток с получением дважды положительных: по белку forkhead box A2 (FOXA2) и кодируемому гомеобоксным геном LIM фактору транскрипции 1, альфа (LMX1A) клеток методом потоочной цитометрии; дофаминовые (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейроны среднего мозга также очищают или "отбирают" от недофаминовых (ДА) (типичных клеток) с применением определенного способа культивирования клеток, включающего композиции и способы в соответствии с настоящими изобретениями. Удаление или отбор клеток, отличных от FOXA2/LMX1A+ дофаминовых (ДА) нервных клеток среднего мозга, приводит к повышению процентной доли целевых дофаминовых (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейронов среднего мозга в образце. Соответственно, очистка типа клеток приводит к "обогащению", т.е. повышению количества целевых клеток, т.е. дофаминовых (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейронов среднего мозга, в образце.

В настоящем тексте термин "природный" применительно к объекту (такому как клетка, ткань и т.д.) и/или химическому соединению (такому как белок, последовательность аминокислот, кодон и т.д.) обозначает, что указанные объект и/или соединение встречаются/встречались в природе. Например, природная клетка - это клетка, присутствующая в организме, который может быть выделен из природного источника, такая как эмбриональная клетка, причем указанная клетка не подвергалась целенаправленной модификации человеком в лаборатории.

В настоящем тексте термин "in vitro" относится к искусственному окружению и к процессам или реакциям, которые происходят в этом искусственном окружении. Примерами In vitro окружения являются, помимо прочего, пробирки и культуры клеток.

В настоящем тексте термин "in vivo" относится к природному окружению (например, животному или клетки) и к процессам или реакциям, которые происходят в природном окружении, таким как развитие эмбриональных клеток, дифференцировка клеток, формирование нервной трубки и т.д.

Термин "полученный из", или "образованный из", или "дифференцированный из", употребляемый применительно любой описанной здесь клетке, обозначает клетку, которая получена из (например, выделена, очищена и т.д.) родительской клетки в клеточной линии, ткани (такой как разрушенный эмбрион или жидкости) с применением любых манипуляций, таких как, без ограничения, выделение единственной клетки, культивирование in vivo, обработка и/или мутагенез. Клетка может быть получена из другой клетки с применением, например, химической обработки, облучения, индукции экспрессии новых белков, например, путем инфицирования вирусом, трансфицирования последовательностями ДНК, приведение в контакт с (обработка) морфогеном и т.д., и отбор (например, путем серийного культивирования) любого типа клеток, содержащегося в культивируемых родительских клетках). Полученные клетки могут быть отобраны из смешанной популяции по ответу на фактор роста, цитокин, выбранную последовательность обработки цитокинами, способности к адгезии, отсутствию адгезивности, с применением процедур сортировки и т.п.

В настоящем тексте термин "клетка" относится к единственной клетке, также к популяции клеток (т.е. к клеткам в количестве больше). Популяция может представлять собой чистую популяцию, содержащую один тип клеток, такую как популяция нейронов или популяция недифференцированных эмбриональных клеток. В альтернативном варианте популяция может содержать больше одного типа клеток, например, смешанная популяция. Не предполагается ограничения числа клеток в популяции, например, в одном варианте реализации смешанная популяция клеток может содержать по меньшей мере одну дифференцированную клетку. В настоящих изобретениях отсутствует ограничение числа типов клеток, которые могут содержаться в популяции.

В настоящем тексте термин "высоко обогащенная популяция" относится к популяции клеток, такой как популяция клеток в культуральной чашке, экспрессирующей более высокое количество или процентную долю маркера, чем популяция сравнения, например, обработка приведенной в контакт с LSB культуры клеток в день 1 пурморфамином, а в день 3 соединением CHIR приводит к получению высоко обогащенной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга относительно обработки только LSB. В других примерах обогащенная популяция представляет собой популяцию, полученную в результате сортировки или отделения клеток, экспрессирующих один или большее число маркеров, от клеток не экспрессирующих целевые маркеры, такую как CD142-обогащенную популяцию, A9-обогащенную популяцию.

Термин "биология клетки" или "клеточная биология" относится к изучению живых клеток, например, анатомии и функционирования клеток, например физиологических свойств клеток, структуры, оргanelл и взаимодействий с их окружением, их жизненного цикла, деления и гибели.

Термин "представляющая интерес нуклеотидная последовательность" относится к любой нуклеотидной последовательности (например, РНК или ДНК), манипуляции с которой средний специалист может посчитать желательными по каким-либо причинам (например, для лечения болезни, обеспечения улучшенных свойств, экспрессии представляющего интерес белка в клетке-хозяине, экспрессии рибозима и т.д.). Такие нуклеотидные последовательности включают, но не ограничиваются структурными генами (например, репортерными генами, генами маркеров селекции, онкогенами, генами лекарственной устойчивости, факторами роста и т.д.) и некодирующими регуляторными последовательностями, которые не кодируют продукт - иРНК или белок (например, последовательность промотора, последовательность полиаденилирования, последовательность терминации, последовательность энхансера и т.д.).

В настоящем тексте термин "представляющий интерес белок" относится к белку, кодируемому представляющей интерес нуклеиновой кислотой.

Термин "ген" относится к последовательности нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК), которая содержит кодирующую последовательность, необходимую для получения полипептида или предшественника (например, проинсулина). Полипептид может кодироваться полноразмерной кодирующей последовательностью или частью кодирующей последовательности, при условии сохранения активности или функциональных свойств (например, ферментативной активности, связывания лиганда, сигнальной трансдукции и т.д.) полноразмерного соединения или фрагмента. Этот термин также охватывает кодирующий участок структурного гена, прилегающий к кодирующей области как на 5'-, так и на 3'-конце на расстоянии около 1кб или больше на любом из концов, т.е. ген соответствует длине полноразмерной мРНК. Последовательности, которые расположены в направлении 5' от кодирующей области, и которые присутствуют в мРНК, называются 5'-нетранслируемыми последовательностями. Последовательности, которые расположены в направлении 3' или ниже от кодирующей области, и которые присутствуют в мРНК, называются 3'-нетранслируемыми последовательностями. Термин "ген" охватывает как кДНК, так и геномные формы гена. Геномная форма или клон гена содержит кодирующую область, внутри которой расположены некодирующие последовательности, называемые "интронами" или "промежуточные области" или "промежуточные последовательности". Интроны представляют собой сегменты гена, транскрибируемые в ядерную РНК (hnRNA, чЯРНК); интроны могут содержать регуляторные элементы и энхансеры. Интроны удаляются или "вырезаются" при сплайсинге из ядерного или первичного транскрипта; соответственно, интроны отсутствуют в информационной РНК (иРНК-транскриптах). В процессе трансляции иРНК определяет последовательность или порядок аминокислот в образующемся полипептиде.

В настоящем тексте термин "экспрессия гена" относится к процессу перевода генетической информации, закодированной в гене, в РНК (например, мРНК, рРНК, тРНК или мяРНК) посредством "транскрипции" гена (т.е. в результате ферментативной активности РНК-полимеразы), и, в случае генов, кодирующих белок, в белок посредством "трансляции" мРНК. Экспрессия генов может регулироваться на многих стадиях процесса. "Повышающая регуляция" или "активация" относится к регуляции, которая повышает продукцию продуктов экспрессии гена (т.е. РНК или белка), а "понижающая регуляция" или "репрессия" относится к регуляции, которая снижает продукцию. Молекулы (например, факторы транскрипции), которые участвуют в повышающей регуляции или понижающей регуляции часто называют "активаторами" и "репрессорами" соответственно.

В настоящем тексте термины "молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая", "последовательность ДНК, кодирующая", "ДНК, кодирующая", "последовательность РНК, кодирующая" и "РНК, кодирующая" относятся порядку или последовательности дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов вдоль нити дезоксирибонуклеиновой или рибонуклеиновой кислоты. Порядок этих дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов определяет порядок аминокислот в цепи полипептида (белка). Таким образом, последовательность ДНК или РНК кодирует последовательность аминокислот.

Термин "изолированный" (выделенный) применительно к нуклеиновой кислоте, как в сочетаниях "изолированный олигонуклеотид" или "изолированный полинуклеотид" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, идентифицированной и отделенной от по меньшей мере одного компонента или примеси, с которыми она обычно встречается в ее природном источнике. Изолированная нуклеиновая кислота - это нуклеиновая кислота, существующая в форме или окружении, отличающихся от тех, в которых они встречаются в природе. Неизолированные нуклеиновые кислоты, напротив, представляют собой нуклеиновые кислоты, такие как ДНК и РНК, в том состоянии, в котором они встречаются в природе. Например, определенная последовательность ДНК (например, ген) существует в хромосоме клетки-хозяина вблизи соседних генов; последовательности РНК, такие как определенная последовательность мРНК, кодирующая определенный белок, присутствуют в клетке в виде смеси с многочисленными другими мРНК, которые кодируют множество белков. Однако изолированная нуклеиновая кислота, кодирующая определенный белок, включает, в качестве примера, такую нуклеиновую кислоту в клетке, в норме экспрессирующей указанный белок, где положение этой нуклеиновой кислоты в хромосоме отличается от наблюдаемого в природе. Изолированная нуклеиновая кислота, олигонуклеотид или полинуклеотид могут иметь одонитивную или двунитивную форму. В случае, когда изолированная нуклеиновая кислота, олигонуклеотид или полинуклеотид применяю для экспрессии белка, указанный олигонуклеотид или полинуклеотид должен содержать по меньшей мере смысловую или кодирующую нить (т.е. оли-

гонуклеотид или полинуклеотид могут быть одонитиевыми), но может содержать и смысловую и анти-смысловую нити (т.е. олигонуклеотид или полинуклеотид может быть двунитиевым).

В настоящем тексте термин "набор" относится к любой системе доставки для доставки материалов. В контексте дифференцировки клеток "набор" может относиться к комбинации материалов для приведения в контакт со стволовыми клетками, такие системы доставки включают системы доставки, которые обеспечивают возможность хранения, транспортировки или доставки реакционных реагентов из одного места в другое в подходящих контейнерах (таких как пробирки и т.д.) и/или со вспомогательными материалами (например, буферами, письменными инструкциями по осуществлению дифференцировки клеток и т.д.) (например, соединениям, белками, детектирующими агентами (таких как антитела, которые связываются с тирозингидроксилазой (TH), белком forkhead box A2 (FOXA2), кодируемым гомеобоксным геном LIM фактором транскрипции 1, альфа (LMX1A), и т.д.) и т.д. Например, набор включает одну или более емкостей (например, коробок, мешков, пробирок, пробирок эппендорф, капиллярных пробирок, многоруночных планшетов и т. п.), содержащих реакционные реагенты для ингибирования каскадов передачи сигнала, например, ингибитор для снижения передачи сигнала трансформирующего фактора роста бета (TGF β)/активин-Нодаль, такой как SB431542 (или заместитель SB431542) и т.п., ингибитор для снижения передачи сигнала, SMAD, LDN-193189 (или заместитель LDN-193189) и т.п., ингибитор для снижения киназы гликогенсинтазы 3 β (GSK3 β), в качестве одного из примеров, для активации передачи сигнала wingless (Wnt или Wnts), известного также как активатор передачи сигнала WNT (агонист WNT), такой как CHIR99021 (или заместитель CHIR99021) и т.д.) и т.п., активатор передачи сигнала белка Sonic hedgehog (SHH) (такой как низкомолекулярный агонист рецептора (SMO)), например, молекулы Sonic hedgehog (SHH) C25II, пурморфамин и подобные, молекула, обладающая активностью фактора роста фибробластов 8 (FGF8), такая как фактор роста фибробластов 8 (FGF8) и т.д. и молекулы, связанные с созревaniem нейронов, например, (BDNF), аскорбиновая кислота (AA), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии, дибутирил-цАМФ и трансформирующий фактор роста типа β 3, включая молекулы, способные заменять эти компоненты и/или вспомогательные материалы. Реагенты в наборе в одном варианте реализации могут быть в форме раствора, могут быть заморожены или лиофилизированы. Реагенты в наборе в одном варианте реализации могут содержаться в отдельных контейнерах или представлены в форме определенных комбинаций, таких как комбинация LSB (LDN-193189 с SB431542), молекулы Sonic hedgehog (SHH) C25II с пурморфамином, молекулы Sonic hedgehog (SHH) C25II с пурморфамином с CHIR99021 или пурморфамин с CHIR99021, молекулами, связанными с созреванием нейронов и т.п.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 в качестве примера продемонстрирована индукция и нейрогенная конверсия предшественников вентральных пластинок среднего мозга, полученных из клеток ES человека, зависящая от добавления CHIR990221. а) Иммуноцитохимический анализ на 11 день дифференцировки для экспрессии FOXA2 (красный), NESTIN (зеленый, верхние панели), LMX1A (зеленый, средние панели) и OTX2 (зеленый, нижние панели). б, с) Обсчет данных, представленных в (а). Представлены данные трех независимых экспериментов, каждый из которых осуществлялся в трех повторях (среднее $\pm$ ошибка среднего (SEM)). Уровни значимостей для индивидуальных маркеров представлены в сравнении с данными, полученными при обработке только LSB: ANOVA; критерий Даннета: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; $p < 0,05$). d) Схематическое изображение условий культивирования, использовавшихся для трех условий обработки. е, f) Списки отобранных дифференциально экспрессирующихся генов на 11 день в сравнении с условиями LSB/S/F8/CHIR либо с LSB (е), либо LSB/S/F8 (f). g, h) Анализ временной экспрессии генов отобранных маркеров, характерных для идентификации предшественников DA среднего мозга (g), переднего мозга и идентификации вентральных предшественников, не являющихся DA (h). Отрезки для определения масштаба соответствуют 50 мкм.

На фиг. 2 в качестве примера продемонстрированы иммуноцитохимический и молекулярный анализы пути развития DA нейронов среднего мозга при обработке LSB/S/F8/CHIR в сравнении с путями LSB/S/F8 (вентральный/гипоталамический) и LSB (дорсальный передний мозг). А) Иммуноцитохимический анализ на 25 день экспрессии FOXA2 (синий) в комбинации с Tuj1 (красный)/LMX1A (зеленый) (верхние панели) и NURR1 (красный)/TH (зеленый) (нижние панели). В) Количественный анализ одновременной экспрессии в культурах, обработанных LSB/S/F8/CHIR. Представлены данные трех независимых экспериментов, каждый из которых осуществлялся в трех повторях (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM)). С, D) Анализ общей экспрессии генов осуществляли на 25 день (образцы в трех повторях для всех трех условий). Отобранные списки наиболее дифференциально экспрессирующихся генов при сравнении данных на 13 и на 25 дни в условиях LSB/S/F8/CHIR (С) и при сравнении обработки LSB/S/F8/CHIR с LSB (D, левая панель) и LSB/S/F8 (D, правая панель). Е) Анализ нормализованной дифференциальной экспрессии генов для ключевых маркеров DA нейронов среднего мозга. Уровни значимости для индивидуальных маркеров представлены в сравнении с данными обработки только LSB: ANOVA; критерий Даннета: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; $p < 0,05$). Отрезки для определения масштаба соответствуют 50 мкм.

На фиг. 3(1) и 3(2) в качестве примера продемонстрировано созревание *in vitro*, характеристика и функциональная оценка ДА нейронов среднего мозга, полученных из вентральных пластинок, в сравнении с ДА нейронами среднего мозга, полученными из розеткообразных структур. На фиг. 3(1): продемонстрирован типичный: а) иммуноцитохимический анализ на 50 день дифференцировки для TH (красный), в комбинации с LMX1A (зеленый, левые панели), FOXA2 (синий, левые панели) и NURR1 (зеленый, правые панели). б) Подсчет клеток TH+, FOXA2+, LMX1+ и NURR1+ среди общего количества клеток в культуре, полученной из розеткообразных структур, в сравнении с культурой, полученной из вентральных пластинок (LSB/S/F8/CHIR). в) Подсчет нейронных подтипов серотонин+ (5-HT), и GABA+ на 50 день в культуре ДА нейронов, полученной из вентральных пластинок, и в культуре ДА нейронов, полученной из розеткообразных структур. d, e) Анализ ВЭЖХ для измерения ДА и метаболитов, d) репрезентативная хроматограмма электрохимической детекции ДА в образце культур, полученных из вентральных пластинок, e) сравнение уровней ДА, DOPAC и HVA среди культур, полученных из вентральных пластинок и из розеткообразных структур. f) Иммуноцитохимический анализ культур, полученных из вентральных пластинок, (80 день) для TH (красный) и синапсина (зеленый). g-i) Электрофизиологические анализы культур вентральных пластинок на 80 день дифференцировки ДА нейронов. Фазовое контрастное изображение соединенного в цепь нейрона (g) и соответствующие записи показаний (h). i) Анализ энергопотребления, показывающий характеристики осцилляции мембранного потенциала, являющиеся отличительной особенностью ДА нейрона (от 2 до примерно 5 Гц). Уровни значимости для индивидуальных маркеров (панели b, c, e) представлены как сравнение культур, полученных из вентральных пластинок и из розеткообразных структур: критерий Стьюдента: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; $p < 0,05$). Отрезки для определения масштаба соответствуют 50 мкм в (a), 20 мкм в (f, верхняя панель), 5 мкм в (f, нижняя панель) и 20 мкм в (g) j) Созревание ДА нейронов мыши *in vitro* (d65). TH-положительные нейроны все еще экспрессируют FoxA2 и распространяют длинные волокна, характерные для ДА нейронов мыши, и к: измерение высвобождения ДА с помощью ВЭЖХ: TH+ нейроны возраста 65 дней являются функциональными *in vitro*. На фиг. 3(2) продемонстрирован типичный краткий обзор клеток, полученных по описанному в настоящей заявке протоколу ДА нейронов среднего мозга на основе вентральных пластинок. а) В противоположность предшествующим стратегиям (например, Perrier, A.L. и др. Derivation of mid-brain dopamine neurons from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 101, 12543-8 (2004)), описанный в настоящей заявке новый протокол основан на получении LMX1A/FOXA2-положительных вентральных пластинок среднего мозга (левая панель) с последующей нейронной конверсией (средняя панель) и созреванием ДА нейронов (правая панель). В зрелых клетках ДА нейронов, полученных из вентральных пластинок, сохраняется экспрессия FOXA2/LMX1A.

На фиг. 4 в качестве примера продемонстрированы выживаемость *in vivo* и функционирование ДА нейронов человека, полученных из вентральных пластинок, в мозгу мышей, крыс и обезьян, использованных в качестве моделей заболевания Паркинсона. а-d) Трансплантация ДА нейронов, полученных из вентральных пластинок, во взрослых мышей с повреждениями, вызванными 6-OHDA (штамм NOD-SCID IL2Rgc null). а) Экспрессия TH и морфология трансплантата через 4,5 месяца после трансплантации. б) Экспрессия специфического маркера человека (hNCAM, синий), TH (зеленый), и FOXA2 (красный). в) Подсчет FOXA2+, TH+ и дважды меченых клеток в трансплантатах, полученных на основе вентральных пластинок (среднее $\pm$ SEM, $n=4$ через 4,5 месяца после трансплантации). d) Индуцированный амфетамин анализ вращения в трансплантатах, полученных из вентральных пластинок, (синий) в сравнении с трансплантатами, полученными из розеткообразных структур (зеленый). Отрезки для определения масштаба соответствуют 500 мкм в (a), 100 мкм в (b) и 40 мкм в (4c). e-p) Трансплантация ДА нейронов, полученных из вентральных пластинок, во взрослых крыс с повреждениями, вызванными 6-OHDA. Иммуногистохимический анализ для одновременной экспрессии TH (зеленый) и специфических маркеров человека (красный) hNA. e) и hNCAM (4f). g) Стереологический подсчет общего количества клеток (hNA+), клеток TH+ и клеток TH+, одновременно экспрессирующих FOXA2. Средний объем трансплантата составлял $2,6 \pm 0,6$ мм³. h-j) Изображения высокого разрешения, показывающие одновременную экспрессию TH (зеленый) со специфическими факторами транскрипции среднего мозга FOXA2, PITX3 и NURR1 (красный), k-m) Анализ поведения животных, обработанных трансплантатами ДА нейронов, полученных из вентральных пластинок, в сравнении с фиктивно обработанными животными. k) Асимметрия вращения, вызванная амфетамин. l) Шаговый тест: измерение акинезии передних конечностей стороны, подвергнутой обработке, в сравнении со стороной, не подвергнутой обработке. m) Тест в цилиндре: измерение предпочтения ипсилатеральной лапы в сравнении с контралатеральной лапой при подъема не задние конечности. Животные с трансплантатами продемонстрировали существенное улучшение в по меньшей мере трех тестах ($p < 0,01$ на 4,5-5 месяц; $n=4-6$ в каждом случае). n-p) Иммуногистохимический анализ для TH (зеленый) и одновременной экспрессии (красный) с DAT (n), GIRK2 (o) и кальбиндином (p). Уровни значимости (панели d, k, l, m) следующие: ** $p < 0,01$; $p < 0,05$). Отрезки для определения масштаба соответствуют 200 мкм в (e), 50 мкм в (f), 20 мкм в (h-j) и 40 мкм в (n-p). q-t) Трансплантация ДА нейронов, полученных из вентральных пластинок, во взрослую макаку-резус с повреждениями, вызванными 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (MPTP). q) Обзор репрезентативного участка трансплантата через 1 месяц после трансплантации, маркированный за счет экспрессии специ-

фического цитоплазматического маркера SC-121 человека (зеленый), г) Экспрессия TH трансплантате, окруженном гало TH+ волокон (стрелки), s) Исследование одновременной экспрессии SC-121 (красный) и TH (зеленый) в ядре трансплантата, t) Анализ одновременной экспрессии FOXA2 (красный) в TH+ нейронах (зеленый). Отрезки для определения масштаба соответствуют 2 мм для (q), 500 мкм для (г), 200 мкм для (s), и 50 мкм для (t). u) разрастание волокон из трансплантата (huNCAM+) в стриатум реципиента, v) Клетки, полученные из трансплантата, не дифференцируются в глиальные клетки. Однако трансплантаты содержали несколько серотонинергических волокон в дополнение к популяции TH+ клеток.

На фиг. 5 в качестве примера продемонстрирован хронометраж индукции предшественников вентральных пластинок среднего мозга FOXA2/LMX1A, опосредованный воздействием CHIR99021. А) Иммуноцитохимический анализ FOXA2 (красный)/LMX1A (зеленый) на 11 день дифференцировки с последующей обработкой отдельно LSB/S/F8 treatment или в комбинации с CHIR, начинающейся в различные отмеченные промежутки времени. В) Подсчет процентного содержания FOXA2+, LMX1A+ и дважды меченых клеток на 11 день дифференцировки с последующим началом дифференцировки под действием CHIR, как описано в (А). Уровни значимости для индивидуальных маркеров представлены в сравнении с условиями без обработки CHIR: ANOVA; критерий Даннета: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; $p < 0,05$). Отрезки для определения масштаба соответствуют 50 мкм.

На фиг. 6 в качестве примера продемонстрировано, что обработка FGF8 не играет основную роль в индукции предшественников вентральных пластинок среднего мозга FOXA2/LMX1A. Репрезентативные изображения экспрессии FOXA2 (красный)/LMX1A (зеленый), полученные методом иммуноцитохимии на 11 день дифференцировки. Клетки обрабатывали LSB/CHIR в присутствии или в отсутствие SHH (пурморфамин+SHH C25II) и FGF8. Отрезки для определения масштаба соответствуют 50 мкм.

На фиг. 7 в качестве примера продемонстрировано, что требуется обработка большой дозой SHH и/или мягким агонистом, представляющим собой малую молекулу, (пурморфамин) для эффективной индукции вентральных пластинок среднего мозга в присутствии CHIR99021. Репрезентативные изображения иммуноцитохимии FOXA2 (красный)/LMX1A (зеленый) на 11 день дифференцировки. Клетки обрабатывали LSB/F8/CHIR в присутствии различных концентраций SHH (SHH-C25II) и мягкого агониста пурморфамина. Отрезки для определения масштаба соответствуют 50 мкм.

На фиг. 8 в качестве примера продемонстрирован анализ генов, дифференциально экспрессирующихся в культурах, обработанных LSB/S/F8/CHIR в сравнении с культурами, обработанными LSB и LSB/S/F8, на 11 и 25 день дифференцировки. а) Иерархическая кластеризация данных общей экспрессии генов, полученных для трех условий в дни 0, 1, 3, 5, 7, 11 и 13 (образцы оценивали в тройных повторах для каждого условия и в каждый день). б) Анализ генного обогащения в соответствии с классами GO с применением DAVID; <http://david.abcc.ncifcrf.gov>. Сравнение в 11 день выявило обогащение для сигнальных путей SHH и WNT в условиях обработки LSB/S/F8/CHIR, что согласуется с активацией канонического сигнального пути WNT при обработке CHIR99021. Альтернативные пути развития, такие как "развитие переднего мозга" и "промежуточный мозг", а также "гомеобокс", являются другими элементами GO, которые являются высоко обогащенными на 11 и 25 дни. с) Проверка данных в режиме реального времени с применением базы данных экспрессии генов человека Allen (<http://human.brain-map.org>) для кандидатов в маркеры, обогащенные в условиях для получения ДА нейронов среднего мозга (LSB/S/F8/CHIR). TTF3, EBF1, EBF3 и TTR экспрессировали на основании доступных данных на микро-чипах, специфических для участка мозга человека. TTR, классическая транскрипционная мишень FOXA2, слабо экспрессировался только во substantia nigra взрослой особи, что позволяет предположить, что он может играть основную роль в развитии или что обработка SHH может приводить к искусственно высоким уровням экспрессии TTR в ходе дифференцировки *in vitro*.

На фиг. 9 в качестве примера продемонстрирован протокол дифференцировки для индукции вентральных пластинок и развития ДА нейронов среднего мозга в репрезентативных независимых линиях hESC и hiPSC. Представлены данные, полученные на линии hESC H1, а также на линиях hiPSC 2C6 (из случайного пациента с заболеванием Паркинсона) и SeV6 (на основе линии Sendai, не подвергавшейся интеграции). Использовали протокол на основе вентральных пластинок, описанный на фиг. 1d и 10, с последующим анализом экспрессии FOXA2 (красный) на 11 день и TH (зеленый)/FOXA2 (красный) на 25 день дифференцировки.

На фиг. 10 в качестве примера продемонстрировано схематичное краткое описание условий дифференцировки, использовавшихся для культур ДА нейронов, полученных из вентральных пластинок и розеткообразных структур. В обоих протоколах использовали двойное ингибирование SMAD для ускорения выбора нейронного пути развития. В указанном протоколе с применением вентральных пластинок использовали LDN для ингибирования BMP, в то время как для розеткообразных структур использовали традиционную для мозга индукцию. Сокращения следующие: LDN: LDN-193189, SB: SB431542, SHH (пурморфамин+SHH C25II), FGF8: FGF8, BAGCT: BDNF+аскорбиновая кислота+GDNF+dbcAMP+TGFβ3. В качестве SHH/FGF8 в протоколе с розеткообразными структурами использовали только SHH C25I в отсутствие пурморфамина, следуя начальной рекомендации для структурирования культур ДА нейронов, полученных из розеткообразных структур. Замечание: обработка пурморфамином на стадии розеткообразных структур продемонстрировала токсичность при концентрации,

подходящей для структурирования клеток вентральных пластинок. BASF: BDNF+аскорбиновая кислота+SHH/FGF8.

На фиг. 11 в качестве примера продемонстрировано созревание *in vitro* культур ДА нейронов, полученных из вентральных пластинок. а) Иммуноцитохимический анализ ТН нейронов, полученных из вентральных пластинок, (зеленый) на экспрессию DAT (красный; день 80). б) Обширные участки с Tuj1+ волокнами (красный), простирающиеся на расстояние >2 мм, наблюдали на 60 день дифференцировки. с) На 80 день дифференцировки, одновременная экспрессия GIRK2 (красный) в ТН+ нейронах (зеленый). Отрезки для определения масштаба соответствуют 20 мкм в (а), 100 мкм в (б) и 20 мкм в (с).

На фиг. 12 в качестве примера продемонстрирован иммуногистохимический анализ краткосрочного (6 недель) исследования выживаемости *in vivo* в полосатом теле взрослых интактных (без повреждений) мышей (штамм NOD-SCID IL2Rgc null). Исследование трансплантатов, полученных из вентральных пластинок (клетки на 25 день; 150×10^3 клеток/животное). А) Репрезентативное изображение ядра трансплантата, демонстрирующее ТН+ клетки, окруженные ТН+ волокнами реципиента. В среднем 6,200 ТН+ клеток ($n=3$) присутствовало в трансплантате через 6 недель после трансплантации. В) клетки, экспрессирующие FOXA2, (красный) были обнаружены в только трансплантате, но не в окружающем полосатом теле реципиента, демонстрируя происхождение трансплантата и отличительные черты клеток среднего мозга. Почти все ТН+ нейроны (зеленый) одновременно экспрессировали FOXA2 (красный). Однако существенная часть FOXA2+ клеток одновременно не экспрессировала ТН, что позволяет предположить, что эти клетки не приобрели взрослый фенотип ДА или представляют другую FOXA2+ популяцию нейронов, не содержащую маркеры ДА нейронов. Отрезки для определения масштаба соответствуют 50 мкм.

На фиг. 13 в качестве примера продемонстрировано гистологическое долгосрочное (4,5 месяца) исследование мышей с трансплантатами, у которых внесены повреждения с помощью 6-OHDA (штамм NOD-SCID IL2Rgc null strain), путем сравнения поведения у мышей с трансплантатами, полученными из вентральных пластинок, трансплантатами, полученными из розеткообразных структур. Исследование трансплантатов, полученных из вентральных пластинок. а) Пример одного из самых больших трансплантатов, полученных из вентральных пластинок. Указанный трансплантат сохраняет хорошо описанную hNCAM+ (красный) citoархитектуру. б) На периферии трансплантата наблюдалось сильное разрастание hNCAM+ волокон. с) Серотонинергические (5-HT+) волокна (зеленый) в трансплантате в значительной степени являются негативными по hNCAM (красный), что позволяет предположить их происхождение из реципиента. d) GABA-ергические нейроны и волокна (зеленый) в трансплантате. Исследование трансплантатов, полученных из розеткообразных структур. е) Разрастание нейронов с компрессией ткани мозга реципиента. Большинство клеток были позитивными как в отношении NCAM (красный), так и в отношении DCX (зеленый), что позволяет предположить их нейронное происхождение. f) NCAM+/DCX+ волокна распространились в нетрансплантированную контралатеральную область мозга. g) Внутри ядра трансплантата обнаружены множественные DCX+ кластеры. h) Несколько ТН+ клеток (зеленый) и волокон были обнаружены на периферии трансплантата, а практически все ТН+ клетки, полученные из розеткообразных структур, *in vivo* были негативными в отношении FOXA2 (синий). Иммуногистохимическое исследование трансплантатов возраста 4,5 месяца, полученных из вентральных пластинок, в сравнении трансплантатами, полученными из розеткообразных структур. Представлены репрезентативные изображения экспрессии маркера пролиферации Ki67 (красный) и маркера предшественника нейронов PAX6 (зеленый) (i), экспрессии FOXA2/DCX (j), FOXG1/hNCAM (j, врезка), маркера астроцитов GFAP (зеленый) (k). Отрезки для определения масштаба соответствуют 500 мкм в (а), 50 мкм в (b-d), 500 мкм в (е), 50 мкм в (g-h), 50 мкм в (i), 40 мкм в (j) и 20 мкм в (k).

На фиг. 14 в качестве примера продемонстрировано гистологическое долгосрочное (5 месяцев) исследование мышей SD с трансплантатами, у которых внесены повреждения с помощью 6-OHDA. А) Большинство hNA+ (красный) клеток экспрессировали Tuj1 (зеленый), что указывало на характерные особенности развития по нейронному пути. В) GFAP+ волокна (зеленый) внутри трансплантата одновременно не экспрессировали hNA (красный), что позволяет предполагать их происхождение из реципиента. С) Было обнаружено несколько серотонинергических образований (5-HT+) клеток (зеленый), хотя большинство серотонинергических волокон были получены из реципиента, также как в данных на реципиентах-мышцах (на фиг. 13с). D) Дополнительный пример ТН+ нейронов (зеленый) внутри трансплантата, охарактеризованного по экспрессии hNCAM (красный) для подтверждения того, что клетки в мозгу реципиента являются клетками человека. Отрезки для определения масштаба соответствуют 25 мкм в панелях.

На фиг. 15 в качестве примера продемонстрировано гистологическое исследование трансплантатов, полученных из вентральных пластинок, в мозгу приматов. Полученные из вентральных пластинок ДА нейроны, полученные из H9 hESCs и из H9-GFP hESCs, (культуры на 25 день; 1.25×10^6 клеток/тракт, 3 тракта/полусфера, в общем 6 трактов) трансплантировали в стриатум взрослых макаков-резус, у которых были получены повреждения с помощью MPTP (=2). А) Верхние левая и правая панели: Реконструкция изображения высокого разрешения репрезентативных участков трансплантата (1 месяц после трансплантации). Цитоархитектура трансплантата проиллюстрирована иммуногистохимическим методом с приме-

нением специфического маркера человека SC-121 (отсутствие кросс-реактивности с тканями примата, не являющегося человеком). Нижняя левая панель: SC-121+ волокна, распространяющиеся из ядра трансплантата. Нижняя правая панель: изображение более высокого разрешения SC-121+ клеток, демонстрирующее морфологии нейронных предшественников. В) Исследование экспрессии GFP в ядрах трансплантата, дополнительно подтвердило человеческую идентичность клеток, дополняя данные по SC-121. Замечание: У каждого животного в каждую полусферу трансплантировали немеченые клетки - производные H9, в то время как в другую полусферу клетки, полученные из клеток H9-GFP (экспрессия GFP под контролем промотора EF1a). С) Изображение более высокого разрешения GFP+ трансплантата с применением детекции DAB, демонстрирующее множество GFP+ клеток на периферии трансплантата, показывающие нейробластную морфологию. D) Иммуногистохимические исследования областей в ядре трансплантата, негативных в отношении GFP и SC-121. Эти области содержали большое количество микроглий реципиента, что основывается на данных об экспрессии Iba1 (красный), а также на нескольких ED1+ макрофагах (синий), что позволяет предположить длительное воспаление несмотря на иммуносупрессию циклоспорином. Отрезки для определения масштаба соответствуют 500 мкм в (А, верхняя панель), 50 мкм в (А, нижняя левая панель), 20 мкм в (А, нижняя правая панель), 2 мм в (b), 500 мкм в (С, левая панель), 50 мкм (С, верхняя правая панель), 100 мкм (С, нижняя правая панель), 100 мкм (D).

На фиг. 16 в качестве примера продемонстрировано образование TH+ клеток из hESCs на основе способа с применением предшествующих питающих клеток MS5, в котором клетки дифференцировались в клетки, подобные нейронам DA через (посредством) интермедиаты розеткообразных клеток. Верх) на стадии P0 клетки hESCs вводили в контакт с молекулами для начала индукции нейронов из Oct4+ клеток в розеткообразные клетки с применением питающих клеток MS5 (Perrier et al., 2004). На стадии P1 розеткообразные клетки развивали путем введения клеток в контакт с дополнительными молекулами для дифференцировки клеток в клетки на стадии P2 со специфическими конфигурациями экспрессии, включая Pax2+/En1+ клетки - предшественники DA в дальнейшем дифференцирующие в TH+/En1+ DA нейроны. Эти клетки использовали для трансплантации в крыс, содержащих повреждения, вызванные 6ОНДА, и подверженных иммуносупрессии посредством обработки циклоспорином А. Эти исследования по трансплантации продемонстрировали очень низкую выживаемость *in vivo* нейронов, подобных DA, включая потерю TH+ фенотипа, и выявили проблемы, касающиеся дальнейшего роста нежелательных, вероятно летальных, клеток у трансплантированных животных, например тератом, а также вырастание клеток неподходящего нейронного типа, что может приводить к дополнительным медицинским проблемам у пациентов. А) наблюдалось очень малое количество выживших TH+ нейронов после 4,5 месяцев после трансплантации (<50 TH+ клеток / животное) в трансплантатах из предшественников DA нейронов, полученных из розеткообразных структур. Однако в противоположность TH+ клеткам, клетки, меченые GFP, (GFP находился под контролем убиквитарного промотора) выживали достаточно хорошо после трансплантации. Это позволяет предположить, что большинство выживших после трансплантации клеток были нервными клетками, не являющимися DA нейронами (16В). С) несколько клеток, полученных трансплантата (hNA+ (зеленый) одновременно экспрессировали TH (красный), что позволяет предположить, что большинство трансплантированных клеток человека обладают фенотипом нейронов, не являющихся DA. Панели 16 D-E демонстрируют, что D-E, несмотря на очень плохую выживаемость *in vivo*, наблюдалось некоторое (хотя и очень ограниченное и очень изменчивое) улучшение в нескольких исследованиях поведения, таких как вращения, индуцированные амфетамином, (D), тест в цилиндре и спонтанные вращения (E).

На фиг. 17 в качестве примера продемонстрирован протокол для получения небольшого количества клеток вентральных пластинок. Модифицированный протокол с двойным ингибированием SMAD позволяет получать клетки вентральных пластинок (fp). Высокие концентрации SHH были необходимы для индукции FoxA2+ клеток вентральных пластинок, а такая добавка стимуляторов, вызывающих образование конфигурации каудализации, таких как FGF8, Wnt1 или RA не приводило к снижению экспрессии FOXA2, но вызывало изменение региональных характерных черт. А) Левая панель: клетки на 11 день дифференцировки после обработки NSB (Noggin/ SB431542); левая центральная панель: обработка NSB+SHH (Sonic C25II); центральная панель: NSB+SHH+RA; центральная правая панель: NSB+SHH+Wnt1; NSB+SHH+FGF8; замечание: только обработка NSB не приводит к индукции экспрессии FoxA2. Только FoxA2+ клетки вентральных пластинок индуцировались в присутствии высокой дозы SHH. Добавление RA, Wnt1 и FGF8 не приводит к ингибированию индукции FoxA2. В) Количественный анализ ОТ-ПЦР экспрессии генов FOXA2 и SIX6 демонстрирует сохранение уровня (или даже его увеличение) экспрессии FOXA2 после обработки RA или FGF с сопутствующим уменьшением экспрессии SIX6 с получением самых ранних предшествующих клеток, подобных вентральным пластинкам. С) Индукция экспрессии генов - маркеров предшественников среднего мозга и вентральных пластинок среднего мозга в присутствии FGF8 и Wnt1.

На фиг. 18 в качестве примера продемонстрирован протокол получения клеток вентральных пластинок, демонстрирующий высокие уровни характеристик среднего мозга в сравнении с низкими или отсутствующими уровнями в клетках, полученными в ходе процедур, использовавшихся на фиг. 16 и 17. А) Индукция вентральных пластинок среднего мозга в популяции клеток, контактировавших с высокими

уровнями SHH, FGF8 и CHIR, приводящая к одновременной экспрессии FoxA2 и маркеров среднего мозга LMX1A и Otx2 на 11-й день дифференцировки в сравнении с клетками, контактировавшими с молекулами, описанными в двух других процедурах, показанных на фиг. 16 и 17 (N/SB и SHH/FGF8, соответственно). В) Исследование общей экспрессии генов на 11-й день, сравнивающее три группы клеток, контактировавших с молекулами из каждой из трех процедур, включая третью процедуру согласно настоящему изобретению (LDN/SB, SHH/FGF8, LSB/SHH/FGF8/CHIR). На графике В специфически продемонстрированы гены, которые являются общими для всех трех условий обработки в сравнении с генами, которые являются уникальными для каждого индивидуального условия. График В является предварительным анализом, использовавшимся для результатов на микрочипах, представленных на фиг. 1. С) Уровни мРНК маркеров среднего мозга FoxA2, LMX1A являются высоко обогащенными в группе, обработанной LSB/SHH/FGF8/CHIR, в сравнении с группой, обработанной SHH/FGF.

На фиг. 19 в качестве примера продемонстрирована характеристика *in vitro* дофаминовых нейронов, полученных из вентральных пластинок участка среднего мозга. А) Одновременное мечение FoxA2+ нейронов маркерами ДА нейронов мыши TH, Nurr1 и LMX1A на 25-й день дифференцировки. В) уровни экспрессии мРНК, определенные количественной ОТ-ПЦР, маркеров ДА нейронов мыши, а также других типов клеток среднего мозга в группах, обработанных LDN/SB+SHH/FGF8+SHH/FGF8+CHIR.

На фиг. 20 в качестве примера продемонстрирован потенциал сравнения дифференцировки по пути ДА нейронов среднего мозга в клетках PD-iPS с мутацией PINK1 и клетках дикого типа hES (или iPS). Линия БП-иПСК, мутантная по PINK1 Q456X, была дифференцирована в соответствии с новыми способами получения ДА нейронов среднего мозга на основе вентральных пластинок согласно настоящему изобретению с получением профилей дифференцировки среднего мозга, сравнимых с профилями, полученными на линии Н9. А-С) Иммуноцитохимический анализ линии БП-иПСК, мутантной по PINK1, на 11-й день дифференцировки (стадия предшественников клеток среднего мозга) для FOXA2 (красный), LMX1A (зеленый) и DAPI (синий) (А), на 25-й день дифференцировки (ранняя постмитотическая стадия ДА нейронов) для FOXA2 (красный) и TH (зеленый) (В) и для NURR1 (красный) и TH (зеленый) (С). D-F) Некоторый набор иммуноцитохимических исследований, осуществленных с применением клеток, полученных из Н9, на 11-й день дифференцировки для FOXA2 (красный), LMX1A (зеленый) и DAPI (синий) (D), на 25-й день дифференцировки для FOXA2 (красный) и TH (зеленый) (E) и для NURR1 (красный) и TH (зеленый) (F).

На фиг. 21 в качестве примера приведена линия БП-иПСК, мутантная по PINK1, демонстрирующая фенотип, подобный фенотипу заболевания Паркинсона с агрегацией белков после продолжительной дифференцировки и созревания *in vitro*. На 55-й день дифференцировки, линия БП-иПСК, мутантная по PINK1, продемонстрировала доказательства экспрессии α -синуклеина (основного компонента образования телец Леви в пациентах с заболеванием Паркинсона) в цитозоле TH+ ДА нейронов. Указанные клетки также продемонстрировали высокую экспрессию убиквитина (классического маркера телец Леви). В противоположность этому, ДА нейроны, полученные из контрольной линии iPS продемонстрировали экспрессию сходную с нормальной синаптической (в противоположность цитозольной) экспрессией α -синуклеина и очень низкие уровни убиквитина. А, В) Иммуноцитохимический анализ линии БП-иПСК, мутантной по PINK1, на 55-й день дифференцировки для α -синуклеина (LB509, красный), TH (зеленый) и совмещенное изображение (А) и для α -синуклеина (красный) и убиквитина (зеленый) (В). С, D) Иммуноцитохимический анализ контрольной линии iPSC на 55-й день дифференцировки для α -синуклеина (красный) и TH (зеленый) (С) и α -синуклеина (красный) и убиквитина (зеленый) (D).

На фиг. 22 в качестве примера продемонстрирована экспрессия агрегированной формы α -синуклеина. В мозгу пациентов с заболеванием Паркинсона димеризованные нерастворимые формы α -синуклеина приводят к агрегации в тельца Леви. У димеризованных форм α -синуклеина показано фосфорилирование серина-129 в α -синуклеине. Клетки, полученные из линии БП-иПСК, мутантной по PINK1, демонстрируют сильную экспрессию α -синуклеина, фосфорилированного по Ser129, в сравнении с контрольными клетками, полученными из iPSC, которые демонстрируют очень низкие уровни экспрессии. А, В) Иммуноцитохимический анализ α -синуклеина, фосфорилированного по Ser129, (зеленый) и DAPI (синий) в линии клеток, полученной из БП-иПСК, мутантной по PINK1, на 55-й день дифференцировки (А) и контрольной линии клеток, полученной из iPSC (В).

На фиг. 23 в качестве примера продемонстрированы различия в профилях экспрессии α -синуклеина, которые наблюдаются в зависимости от протокола дифференцировки. Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что "аутентичные" ДА нейроны среднего мозга обладают уязвимостью, специфичной для заболеваний Паркинсона, и соответствующими, специфическими фенотипами *in vitro*. ДА нейроны, полученные с применением классического протокола дифференцировки, основанного на стромальных питающих клетках MS5, (Pettier et al., PNAS 2004, включен в настоящее описание посредством ссылки) могут приводить к большому количеству TH+ нейронов. Однако основываясь на данных согласно настоящему изобретению, указанные TH+ клетки, получающиеся в результате дифференцировки в ходе классического протокола на стромальных питающих клетках MS5, не являются аутентичными ДА нейронами среднего мозга. В культурах, дифференцированных посредством протокола MS5, было большое количество α -синуклеин положительных клеток. Однако эти клетки одновременно

не экспрессировали TH. Более того, не было различий в профилях экспрессии между БП-иПСК и контрольными iPSC при использовании стратегии дифференцировки MS5. Эти данные указывают на то, что α -синуклеин также экспрессировался в других типах клеток, не являющихся клетками DA, и что такой α -синуклеин в клетках, не являющихся клетками DA, не отличается в клетках заболевания в сравнении с контрольными клетками, полученными из iPSC, в частности, при использовании стандартного протокола дифференцировки MS5. Наконец, новый протокол дифференцировки согласно настоящему изобретению на основе вентральных пластинок приводит к получению большого количества TH⁺ клеток, одновременно экспрессирующих α -синуклеин. Такие TH⁺ клетки экспрессируют α -синуклеин в виде профиля экспрессии в цитозоле. А, В) Иммуноцитохимический анализ для α -синуклеина (LB509, красный), TH (зеленый) линии БП-иПСК, мутантной по PINK1, на 60 день дифференцировки на основе MS5 (А) и контроль PSC (В). С) Иммуноцитохимический анализ линии БП-иПСК, мутантной по PINK1, на 55-1 день дифференцировки на основе вентральных пластинок для α -синуклеина (красный), TH (зеленый).

На фиг. 24 в качестве примера продемонстрировано, что DA нейроны, полученные из линии БП-иПСК, мутантной по PINK1, являются более уязвимыми к токсической стимуляции. TH⁺ DA нейроны, полученные из БП-иПСК посредством протокола на основе вентральных пластинок согласно настоящему изобретению, были более уязвимыми к воздействию токсинов (валиномицин: митохондриальный ионифор, 5 мкМ, 48 ч), чем контрольные клетки, полученные из iPSC. В противоположность этому, TH⁺ нейроны, полученные посредством классического протокола на основе MS5, не продемонстрировали различную уязвимость между клетками, полученными из PD, в сравнении с контрольными клетками. А-Г) Репрезентативный иммуноцитохимический анализ TH на 60 день дифференцировки: нормальные условия (без обработки токсином) как для клеток, полученных при заболевании Паркинсона, так и для клеток, полученных из контрольных iPSC клеток, полученных с применением протокола на основе вентральных пластинок (А, показаны клетки, полученные из БП-иПСК), практически полная дегенерация TH⁺ DA нейронов в БП-иПСК после обработки токсином (В), частично дегенерированные TH⁺ DA нейроны из контрольных iPSC (С), нормальные условия как для культур, полученных при заболевании Паркинсона, так и для клеток, полученных из контрольных iPSC клеток, полученных с применением протокола на основе MS5 (D, показаны клетки, полученные из БП-иПСК), TH⁺ нейроны после воздействия токсина БП-иПСК (Е), и культуры, полученные из контрольных iPSC (F) при использовании протокола MS5. G-H) иммуноцитохимические изображения низкого разрешения для Tuj1 (красный) и TH (зеленый) при использовании протокола на основе вентральных пластинок на 60 день дифференцировки: БП-иПСК в нормальных условиях (G) в сравнении с условиями воздействия токсина (H) и контрольные iPSC в нормальных условиях (I) в сравнении с условиями воздействия токсина (J). K-N) иммуноцитохимические изображения низкого разрешения для Tuj1 (красный) и TH (зеленый) при использовании протокола на основе MS5 на 60 день дифференцировки: БП-иПСК в нормальных условиях (K) в сравнении с условиями воздействия токсина (L) и контрольные iPSC в нормальных условиях (M) в сравнении с условиями воздействия токсина (N).

На фиг. 25 в качестве примера продемонстрирован подсчет данных исследования выживаемости клеток в зависимости от дозы при воздействии токсина. Исследование выживаемости клеток с применением красителя "alarmar-blue" через 48 ч после обработки валиномицином продемонстрировало различную выживаемость клеток в специфическом диапазоне дозировок при воздействии токсина (5 и 10 мкМ) при сравнении БП-иПСК и контрольных iPSC (60 день дифференцировки на основе вентральных пластинок согласно настоящему изобретению). Замечание: в настоящем исследовании оценивается общая гибель клеток, хотя наиболее драматические эффекты наблюдались в особенности у DA нейронов (см. фиг. 14). Следовательно, подсчет, основанный на данных с применением "alarmar blue", вероятно будет недооценивать степень различия в эффектах, наблюдавшихся в линиях DA нейронов.

На фиг. 26 в качестве примера продемонстрировано, что трансплантированные DA нейроны человека, полученные из плюрипотентных стволовых клеток, обладают электрофизиологическими характеристиками, типичными для характеристик, обнаруженных в части компактов черного тела (substantia nigra pars compacta, SNpc) мышей. А) Сверху - реконструкция нейрона - создателя ритма (нейрона-ритмоводителя) в участке трансплантата. Снизу - типичная фотомикрография полученного из крысы среза мозга, в который 9-ю месяцами ранее были введены нейроны, полученные из hES; трансплантат очерчен; изображение с большим увеличением приведено внизу в виде вставки. Срез был обработан тирозингидроксилазой, которая показана белым. В). Сверху - типичная присоединенная накладка, производящая запись с предполагаемого DA нейрона в трансплантате; снизу - типичная запись с целой клетки той же самой клетки. Записи осуществляли в присутствии антагонистов рецепторов глутамата и GABA (50 мкМ AP5, 10 мкМ CNQX и 10 мкМ GABAzine) для того, чтобы элиминировать синаптический входной сигнал. Эти записи продемонстрировали, что указанные нейроны, полученные из PS, были нейронами-ритмоводителями с нормальными интрасоматическими траекториями напряжения. Другие нейроны, записанные в образце трансплантата, имели схожие свойства. С) Для сравнения приведены записи с присоединением к клетке и записи целой клетки дофаминергических нейронов в SNpc взрослой мыши. Сокращения (CTx=кортекс, STx=стриатум, SNpc=часть компактов черного тела, DA=дофаминергический).

На фиг. 27 в качестве примера продемонстрирован кандидат в поверхностные маркеры A9 и проверка CD в hPSC. а) Диаграмма Венна данных транскриптома из ДА нейронов мыши, полученных из ESC мыши, очищенных с помощью FACS. Среди 107 генов, поделенных между PITX3 и Nurr1, большинство составляли известные маркеры ДА нейронов среднего мозга, а также было подтверждено, что новые маркеры экспрессируются в вентральном среднем мозге. б) Одним из этих маркеров был DCSM1, предполагаемый поверхностный маркер, который, как кажется на основании данных экспрессии мРНК *in situ*, обогащен в участке A9 (Allen Brain Atlas, Lein, E.S. et al., Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain, Nature 445: 168-176 (2007)). с-ф) проверка CD: с) репрезентативный 96-луночный планшет (1 из 3×96 планшетов, использовавшихся для проверки всей панели CD). В темных лунках отмечены маркеры CD, которые сильно экспрессируются в ДА нейронах hESC на 25 день. е) Краткий обзор результатов проверки CD в нейронах, полученных из hESC. ф) Был обнаружен один типичный маркер, CD142, поверхностный маркер, обогащающийся селективно в ДА нейронах на стадии Nurr1+, который затем был выделен с помощью FACS из CD142+ клеток в сравнении с CD142- клетками и проанализирован на 7 день после сортировки.

На фиг. 28 в качестве примера продемонстрирован CD142, обогащенный на стадии Nurr1+ ДА нейронов среднего мозга и истощенный для GABA- и серотонинергических нейронов. а) Проточная цитометрия продемонстрировала репрезентативную экспрессию CD142 на 25 день дифференцировки. б) CD142, обогащенный на стадии Nurr1+ у FOXA2/TH ДА нейронов среднего мозга ДА в hESCs (например, WA09; на фиг. 27f) и проверенных линиях hiPSC (C29 и M3X представляют собой две линии iPSC человека на 25 день дифференцировки). с, d) CD142 истощает GABA-эргические и серотонэргические загрязнители после сортировки на 25 день и культивируется *in vitro* в течение 3 недель. е, ф) CD142 истощает GABA-эргические и серотонэргические нейроны *in vivo* через 3 месяца после трансплантации. Клетки сортировали по CD142 на 25-1 день. Замечание: клетки CD142 также обогащены в отношении TH и AADC.

На фиг. 29 в качестве примера продемонстрировано предполагаемое экспериментальное использование PSA. ДА нейроны, экспрессирующие PST и экспонирующие PSTnm, полученные из hESC будут оцениваться *in vitro* на предмет влияния на фенотип ДА и разрастание волокон. В исследованиях *in vivo* в модели на крысах с повреждениями от 6OHDA будет проверяться, может ли меньшее количество ДА нейронов с усиленной экспрессией PSA приводить к восстановлению поведения, достигаемого при использовании стандартных трансплантатов, и возможно ли, чтобы усиленная экспрессия PSA в ДА нейронах, полученных из hESC, приводила к выздоровлению, определяемому в исследованиях комплексной моторной функции.

На фиг. 30 в качестве примера продемонстрировано использование PST. Повышенная экспрессия (PST мыши) приводит к повышенным уровням PSA-NCAM в дифференцирующихся клетках ES мыши. А) Подсчет мРНК PST с применением количественной ПЦР в контрольных клетках (Nurr1) и в клетках с повышенной экспрессией PST (Nurr1/PST). Данные представлены в виде кратного обогащения уровней PST в клетках Nurr1/PST в сравнении с клетками Nurr1. В) Иммуноокрашивание PSA в культурах ДА нейронов на 14 день дифференцировки продемонстрировало повышенные уровни PSA в клетках Nurr1/PST (отрезок для определения масштаба: 100 мкм). С) Вестерн-блоттинг NCAM в дифференцированных клетках. Клетки Nurr1/PST (дорожка 2) продемонстрировали повышенные уровни полисиализированной формы NCAM (пятна, скобки) в сравнении с контролем (дорожка 1). PSA удаляется с NCAM после обработки endoN (дорожка 3). D) Подсчет интенсивности пятен PSA, выраженный в произвольных единицах. E) Исследование PSA с применением FACS на 14 день дифференцировки. Обработка клеток 20 единицами endoN за 24 ч до конца дифференцировки отменяла эффект от PST. F) Репрезентативные фотомикрографии со сравнением Nurr1 и Nurr1/PST дифференцированных клеток в отношении иммунофлюоресценции GFP и маркеров ДА. Клетки, отсортированные по GFP, а затем высеванные обратно, сохраняли фенотип ДА (после сортировки). Отрезок для определения масштаба: 100 мкм.

На фиг. 31 в качестве примера продемонстрировано исследование ДА нейронов, полученных из ES, с применением FACS. Выделение GFP+ и SSEA-1- клеток с применением проточной цитометрии. В качестве двойного отрицательного контроля и GFP-отрицательного контроля использовали клетки ES мышей J1. Примерно от 5 до 10% клеток было отсортировано как положительные.

На фиг. 32 в качестве примера продемонстрировано, что трансплантаты Nurr1/PST были более эффективными в индукции восстановления поведения на модели с мышами с повреждениями, вызванными 6OHDA. Клетки Nurr1::GFP дифференцировали и сортировали на 14 день для получения GFP+/SSEA-1- популяции. Клетки, обработанные 20 единицами endoN, выращивали в течение 12 ч перед сортировкой. 55000 клеток трансплантировали в 1 мл среды N2 с BDNF и AA. А) Животных оценивали по вращению, вызванному амфетамином, (вращения/мин в течение 20 мин) в течение 3 недель перед трансплантацией, а затем через 7 недель после трансплантации. Клетки Nurr1/PST существенно улучшили результат в сравнении с контрольными клетками Nurr1 (2-факторный тест ANOVA: $p < 0,01$, с критерием Бофферони после исследования: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$; 6 животных в каждой группе). Удаление PSA ферментом endoN отменяло эффект от PST ($p = 0,26$). В) В конце исследования в трансплантате PST было больше GFP+ клеток, чем в контроле ($p < 0,05$, критерий Стьюдента). С) Соотношение иммунофлюорес-

ценции PSA/GFP в ядре. $^{**}p<0,01$. Критерий Стьюдента ($n=5$ /тип трансплантата). D) Иммуофлюоресценция GFP, TH и PSA. Отрезок для определения масштаба: 200 мкм. E) Трансплантированные клетки экспрессируют маркеры DA. Приведены отдельные z-уровни конфокальных микрофотографий. Отрезок для определения масштаба: 20 мкм. Значения приведены в виде среднее $\pm$ SEM.

На фиг. 33 продемонстрирована аугментация PSA, которая усиливала иннервацию полосатого тела реципиента DA нейронами, полученными из ES. Повышенная экспрессия PSA-NCAM усиливала процесс разрастания. A) Репрезентативные фотомикрографии GFP/TH+, GFP/Girk2+ и GFP/синапсин+ процессов в контролях. Окрашивание образцов Nurr1/PST было похожим. Отрезок для определения масштаба: 20 мкм. B) Репрезентативные проекции z-стопок, демонстрирующие GFP+ процесс распространения из обоих трансплантатов, Nurr1 и Nurr1/PST. В трансплантате Nurr1/PST было больше GFP+ процессов распространения из трансплантата (Отрезок для определения масштаба: 50 мкм). Вставки демонстрируют GFP+/TH+ процессы в тех же сечениях. Стрелка: направление роста. C-E) Подсчет интенсивности GFP+ (C, E) и TH+ (D) процессов на различных расстояниях от места трансплантата, нормализованный по интенсивности вблизи от места инъекции (участки были разделены на 5 зон на расстоянии ~ 100 мкм в стороне. Нормализацию проводили по отношению к зоне I; двухфакторный тест ANOVA, $p<0,01$ для данных как GFP, так и TH, $n=5$ /тип клеток; значения представлены в виде среднее $\pm$ SEM). Трансплантаты Nurr1/PST прорастали в стриатум реципиента больше аксонов, при этом рост был частично подавлен (E) при обработке endoN. F) Восстановление животных коррелировало со степенью процессов прорастания. В указанном трансплантате продемонстрирована корреляция (анализ линейной регрессии) между интенсивностью прорастания GFP+ аксонов в зоне IV и восстановлением у необработанных животных и животных с трансплантатами Nurr1, обработанными endoN, и Nurr1/PST. Каждое значение представляет данные по одному животному ($r^2=0,65$, $p<0,001$, $n=17$).

На фиг. 34 в качестве примера продемонстрировано использование PST в методах, имеющих отношение к повреждению спинного мозга и экспрессии мотонейронов. В спинном мозге, использовавшемся в качестве контроля, трансплантированные шванновские клетки с GFP (SCs) были отделены от места повреждения рубцовой тканью реципиента (A), в то время как шванновские клетки, модифицированные PST, свободно мигрировали незначительные расстояния (B). Такое конструирование с применением PSA привело к улучшению локомоторной активности, промежуточный счет BBB (показана верхняя линия в (C) в сравнении с нижней линией контроля) и двигательные возможности задней конечности (тест ходьбы по решетке; нижняя линия (D) в сравнении с верхней линией контроля). E, H) дифференцировка HB9::GFP клеток ESC мыши в мотонейроны, в которых введение PST повышает разрастание волокон и миграцию клеток (острия стрелок) *in vitro* (E, F). Трансплантация этих PST-клеток в седалищный нерв приводит к лучшей целевой иннервации, как это показано на множестве нейромышечных слияний (стрелки) в мышцах EDL (G, H).

На фиг. 35 в качестве примера продемонстрировано использование фермента PSTnm. A) PSA, полученный с помощью PSTnm, ингибирует адгезию шванновских в суспензии к монослою шванновских клеток даже более эффективно (красная линия - самая нижняя линия), чем PSA, полученный в результате усиленной экспрессии PST (зеленая линия - средняя линия). B) Иммуоблоттинг PSA в мотонейронах HB9, полученных из ESC, продемонстрировал, что у контрольных образцов, обработанных PSTnm, были недетектируемые уровни PSA. Выращивание с PSTnm + субстрат (CMP - сиаловая кислота) приводило к появлению большой полосы PSA, которая исчезала после обработки endoN. C, D) Подобно эффектам, полученным с геном PST, полисиалилирование этих клеток с помощью PSTnm и субстрата в ходе дифференцировки усиливало разрастание аксонов и миграцию клеток (острия стрелок). E) Иммуоокрашивание PSA DA нейронов возрастом 30 дней, полученных из hESC. F) Это окрашивание существенно усилилось после обработки PSTnm и субстратом. G) Инъекция *in vivo* PSTnm отдельно не имела эффекта, в то время как его одновременное добавление с субстратом (H) приводило к сильной экспрессии PSA в полосатом теле мыши.

Описание изобретения

Настоящее изобретение относится к области биологии стволовых клеток, в частности к области линиеспецифической дифференцировки плюрипотентных или мультипотентных стволовых клеток, которые могут включать, но не ограничиваются перечисленными: эмбриональные стволовые клетки человека (hESC, ЭСКч), помимо неэмбриональных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (hiPSC, иПСКч), соматические стволовые клетки, стволовые клетки от больных пациентов или любые другие клетки, способные к линиеспецифической дифференцировке. В частности, описаны способы обеспечения линиеспецифической дифференцировки ЭСКч и/или иПСКч в клетки-предшественники вентральной пластинки среднего мозга и затем далее в крупные популяции FOXA2+LMX1A+TH+ дофаминовых (ДА) нейронов среднего мозга с применением новых условий культивирования. FOXA2+LMX1A+TH+ дофаминовые (ДА) нейроны среднего мозга, полученные с применением способов согласно настоящему изобретению, далее применяют по различным назначениям, включая, но не ограничиваясь, применение в *in vitro* анализах для разработки лекарственных средств и в качестве терапевтического средства для обращения заболелания, повреждения или недостатка дофаминовых нейронов у пациента. Далее, предложены композиции и способы для обеспечения дифференцировки

FOXA2+LMX1A+TH+ дофаминовых (ДА) нейронов среднего мозга из плюрипотентных стволовых клеток человека для применения в моделировании заболеваний, в частности болезни Паркинсона.

Настоящее изобретение относится к характеристикам болезни Паркинсона (БП), включая выборочную дегенерацию дофаминовых нейронов среднего мозга (mDA, смДА) в мозге пациента. Поскольку основной причиной симптомов БП является селективная потеря ДА нейронов в черной субстанции вентральной части среднего мозга, БП считается одним из заболеваний, наиболее подходящих для применения клеточно-заместительных терапевтических стратегий лечения. Соответственно, были предприняты многочисленные попытки трансплантации клеток в мозг пациента для возмещения утраченной функции дофаминовых нейронов среднего мозга (mDA). Однако эти эксперименты были неудачными, а степень успешности современных симптоматических видов лечения, применяемых для пациентов, сильно варьирует. Соответственно, существует потребность в новых видах лечения для пациентов с БП, которые обеспечили бы замедление потери функции нейронов.

Плюрипотентные стволовые клетки человека (ПСКч) являются источником клеток для применения в регенеративной медицине. Направленная дифференцировка ПСКч в специализированные клетки, такие как нейроны спинного мозга (Li, et al. *Nat. Biotechnol.* 23, 215-221 (2005), включена в настоящее описание посредством ссылки) или дофаминовые (ДА) нейроны, полученные способами, отличными от способов согласно настоящему изобретению. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что, как описано выше в данном документе, нейроны, называвшиеся ранее дофаминовыми (ДА) нейронами (т.е. в работе Perrier, et al *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 12543-8 (2004), которая включена в настоящий текст посредством ссылки) или ДА-подобными нейронами (нейронами, подобными дофаминовым) среднего мозга не являются аутентичными дофаминовыми (ДА) нейронами среднего мозга (см. фиг. 3, 10, 13 и 16). Соответственно, авторы настоящего изобретения обозначали полученные из вентральной пластинки дофаминпродуцирующие нейроны, полученные описанными здесь способами, т.е. дофаминпродуцирующие нейроны в соответствии с настоящими изобретениями как "аутентичные", поскольку, в отличие от дофаминпродуцирующих нейронов, полученных описанными в публикациях способами, при трансплантации "аутентичных" дофаминпродуцирующих нейронов в соответствии с настоящими изобретениями грызунам и приматам, они обращают состояния, подобные перкинсонизму, и вызывают меньше сложностей, связанных с избыточным ростом нейронов и образованием тератомы. Также, в отличие от более ранних способов получения дофаминпродуцирующих нейронов, "аутентичные" дофаминовые нейроны в соответствии с настоящими изобретениями получают в более высоком процентном отношении относительно исходной популяции, а также они сохраняют способность к приживлению в течение нескольких месяцев культивирования.

Соответственно, были созданы способы получения аутентичных ДА нейронов среднего мозга с применением описанных здесь способов дифференцировки. Однако эффективное применение ПСКч для клеточной терапии сильно отстает от успехов в культивировании клеток. Хотя была показана эффективность ДА нейронов, полученных из ПСК мышей в моделях болезни Паркинсона (БП) (Tabar, et al. *Nature Med.* 14, 379-381 (2008); Wernig, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 5856-5861 (2008), все источники включены в настоящее описание посредством ссылки), ДА нейроны, полученные из ПСК человека обычно плохо работают *in vivo* (Lindvall and Kokaia, *J. Clin. Invest* 120, 29-40 (2010), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Помимо отсутствия компенсации потери эндогенной нейрональной функции, имеют место серьезные проблемы в отношении безопасности применения полученных из ПСКч нейронов для трансплантации, которые связаны с тем, что они могут образовывать тератомы или приводить к избыточному росту нейронов Roy, et al. *Nature Med.* 12, 1259-1268 (2006); Elkabetz, et al. *Genes Dev.* 22, 152-165 (2008), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки).

Другим возможным источником клеток для трансплантации являются ДА нейроны, полученные из человеческих ЭСК. Предшествующие попытки применения этих клеток в качестве исходной популяции клеток для получения дифференцированных клеток, которые считались ДА-подобными нейронами среднего мозга, полученными из эмбриональных стволовых клеток человека (hESC, ЭСКч), которые трансплантировали грызуна в модели БП, характеризовались низкой *in vivo* выживаемостью, трансплантатов после трансплантации. Эта неудача скорее всего связана с неполной дифференцировкой ДА нейронов среднего мозга *in vitro*, в результате которой образовывались клетки, которые казались ДА нейронами среднего мозга, но не обладали способностью приживаться и восполнять потерю функции нейронов. Фактически, авторы настоящего изобретения показали, что ДА-подобные нейроны, которые ранее производились в лабораториях и описывались в публикациях, не относились к тому же типу клеток, что и ДА нейроны вентральной пластинки среднего мозга согласно настоящим изобретениям, и не обладают сходными с ними функциями или способностью к приживлению, см., например, фиг. 16 и 17. Соответственно, авторы также обнаружили, что для обеспечения направленной дифференцировки клеток в лаборатории и получения популяций клеток, содержащих большое количество адекватно функционирующих нейронов, клетки должны пройти через конкретные стадии развития, чтобы образовать подходящую популяцию клеток для применения в заместительной терапии. Авторы также обнаружили, что, по меньшей мере, для получения приживляемых ДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями,

должны иметь место определенные стадии развития, такие как FOX2A/LIM1A+ промежуточная стадия 11 дня. Авторы обнаружили, что если клетки не проходят такие стадии развития, образующиеся в результате ДА-подобные нейроны не обладают теми же функциональными способностями, что и ДА нейроны среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями, которые получают из промежуточных FOX2A/LIM1A+клеток 11 дня.

В отличие от того, что наблюдали ранее, в настоящем документе описаны новые методики культивирования, относящиеся к основанным на индукции клеток вентральной пластинки стратегиям получения человеческих ДА нейронов, которые эффективно приживаются *in vivo*. Соответственно, предполагается, что то, что раньше не удавалось получить популяции клеток, состоящие в основном из комитированных ДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями (т.е. FOXA2+ и LMX1A+ДА нейронов, способных к эффективному приживлению), является причиной неудач трансплантации ДА-подобных нейронов, т.е. вследствие незавершенной специализации ДА-подобных клеток. Ранее предполагали, что причиной неудач трансплантации является особая уязвимость клеток, т.е. ДА-подобные нейроны из культуры были неспособны пережить стресс при трансплантации. Как описано здесь, FOXA2+/LMX1A+ предшественники вентральной пластинки среднего мозга получали из ПСКч через 11 дней после обработки низкомолекулярными активаторами белка sonic hedgehog (SHH) и канонической передачи сигнала WNT. Эти клетки 11 дня, являющиеся дважды положительными: по FOXA2+ и LMX1A+, приводят в контакт с дополнительными малыми молекулами для индукции дальнейшей дифференцировки в приживающиеся ДА нейроны среднего мозга, положительные по TH+, FOXA2+ и LMX1A+, к 25 дню. Эти зрелые ДА нейроны вентральной пластинки среднего мозга можно поддерживать *in vitro* в течение нескольких месяцев. Масштабное молекулярное *in vitro* исследование, биохимические и электрофизиологические данные показали развитие и подтвердили идентичность полученных из ЭСКч ДА нейронов среднего мозга. Выживание и функционирование *In vivo* было продемонстрировано в моделях БП на животных, в трех видах-хозяевах. Долгосрочная приживаемость у мышей и крыс с индуцированными 6-OHDA повреждениями продемонстрировала устойчивую выживаемость ДА нейронов среднего мозга, полное восстановление вызванного амфетамином поведения с вращением и улучшения в тестах на использование передних конечностей и акинезию. Наконец, масштабируемость была продемонстрирована путем трансплантации обезьянам с паркинсонизмом. Прекрасная выживаемость и функционирование нейронов и отсутствие избыточного роста нейронов в трех моделях с применением животных указывает на перспективы для разработки клеточных терапевтических средств для применения при БП на основе композиций и способов в соответствии с настоящими изобретениями.

Соответственно, основной областью применения своей разработки авторы считают обеспечение возможности получения неограниченного источника полностью функциональных ДА нейронов среднего мозга из вентральной пластинки, пригодных для доклинических и клинических терапевтических приложений. В поверхностном изложении, авторы обнаружили новый протокол для эффективной дифференцировки смДА нейронов, по меньшей мере, из популяций плюрипотентных клеток, выделенных из организма грызунов и людей (эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСКч) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (hiPSCs, ИПСКч)). В этих исследованиях использовали мутантные линии iPC клеток PINK1, полученные из организма пациента-человека с болезнью Паркинсона (Seibler, et al., The Journal of Neuroscience, 2011, 31(16):5970-5976, цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Популяции стволовых клеток человека (ЭСКч и ИПСКч) дифференцировали в клетки с фенотипом среднего мозга, которые после приведения в контакт с молекулами для созревания нейронов давали начало более аутентичным приживляемым ДА нейронам. Этот протокол использовали для демонстрации высокого выхода потомства ЭСКч к 11 дню направленной дифференцировки фенотипа ДА нейронов среднего мозга (mDA, смДА), который включал экспрессию ключевых факторов транскрипции, например, TH, FoxA2 и LMX1A, которое посыл дальнейшей дифференцировки давало дополнительные ключевые белки, например TH. Трансплантация этих полученных из ЭСКч смДА нейронов грызунам с и приматам-хозяевам с ослабленным иммунитетом, в отличие от применения полученных ранее *in vitro* ДА нейронов, показало хорошую *in vivo* выживаемость привитых клеток и функциональное восстановление нарушений поведения.

Преимущества применения способов в соответствии с настоящими изобретениями для получения ДА нейронов перед другими способами станут частично ясны из приведенной ниже информации. Применение соматических стволовых клеток и нейрональных стволовых клеток в других способах с целью получения аутентичных ДА нейронов среднего мозга, эффективно приживающихся *in vivo*, не было успешным (обзор можно найти в публикации Kriks & Studer, Protocols for generating ES cell-derived dopamine neurons in Development and engineering of dopamine neurons (под ред. Pasterkamp, et al.) (Landes Biosciences, 2008, цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Плюрипотентные стволовые клетки, такие как ЭС клетки затем применяли в качестве источников приживающихся клеток. Ранние исследования 1990х с применением ЭС клеток мышей продемонстрировали пригодность производных специфических линий из плюрипотентных клеток *in vitro*, включающих нейроны (Okabe, et al., Mech. Dev. 59:89-102 (1996); Bain, et al., Dev. Biol. 168v342-357 (1995), все источники включены в настоящее описание посредством ссылки). Фактически ДА нейроны среднего мозга получали с примени-

ем стратегии направленной дифференцировки (Lee, et al., *Nat. Biotechnol.* 18:675-679 (2000), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки) на основании информации о развитии, полученной в ранних исследованиях с трансплантатами (Ye, et al., *Cell* 93:755-766 (1998), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Другие стратегии направленной дифференцировки использовали для получения других типов нейронов, таких как соматические мотонейроны (Wichterle, et al., *Cell* 110, 385-397 (2002), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Однако эти усилия не принесли результата в случае популяций клеток, содержащих высокую долю ДА нейронов среднего мозга или клеток, способных восстанавливать функцию нейронов *in vivo*. Фактически, получаемая популяция содержала смесь типов клеток в дополнение к ДА нейронам среднего мозга. Далее авторы изобретения разработали другие способы получения ДА нейронов среднего мозга, частично описанные ниже, однако эти популяции клеток также представляли собой смеси типов клеток и не восстанавливали нейрональную функцию. В частности, человеческие ЭС клетки дифференцировались в ранние нейроэпителиальные клетки, называемые нервными розетками, с последующей индукцией клеток стадии розетки в клетки, экспрессирующие предшественник ДА нейронов среднего мозга и дифференцированные маркеры. Эти клетки продолжали демонстрировать функциональные свойства нейронов в электрофизиологических исследованиях, высвобождение ДА *in vitro* и образование положительных по ТН в "иммунозолотом" анализе синаптических контактов (Perrier, et al. *From the Cover: Derivation of midbrain dopamine neurons from Human Embryonic Stem Cells. Proc Natl Acad Sci USA* 101, 12543-8 (2004), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Однако несмотря на многообещающие результаты *in vitro*, трансплантация клеток мышам с 6ОНДА-индуцированными поражениями давала очень небольшое число выживших дофаминергических нейронов. Такой отрицательный результат был неожиданным, учитывая убедительные свидетельства функциональности полученных из мышинных ЭС клеток ДА нейронов *in vivo* (Barberi, et al., *Nat. Biotechnol.* 21:1200-1207 (2003); Tabar, et al. *Nature Med.* 14:379-381 (2008); Bjorklund, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:2344-2349 (2002); Kim, et al. *Nature* 418:50-56 (2002), все источники включены в настоящее описание посредством ссылки), устойчивые функциональные свойства *in vitro* ДА нейронов, полученных из ЭС клеток человека (Perrier, et al., *From the Cover: Derivation of midbrain dopamine neurons Human Embryonic Stem Cells. Proc Natl Acad Sci USA* 101:12543-8 (2004), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки) и явные свидетельства того, что фетальные ДА нейроны человека могут выживать в форме ксенографта в полосатом теле (Brundin, et al. *Exp. Brain Res.* 70:192-208 (1988); Bjorklund, et al., *Neuronal replacement by intracerebral neural implants in animal models of neurodegenerative disease. Raven. Press., New. York.* 455-492 (1988), все источники включены в настоящее описание посредством ссылки). В течение почти 8 лет после первых неудачных попыток трансплантации ДА нейронов, полученных из ЭС клеток человека, в этой области почти не наблюдалось прогресса. Некоторые ограниченные улучшения наблюдали при применении источников плюрипотентных стволовых клеток приматов (Sanchez-Pernaute, et al. *Long-term survival of dopamine neurons derived from parthenogenetic primate embryonic stem cells (Cynol) in rat and primate striatum. Стволовые клетки* 23:914-922 (2005), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки), клетки, предварительно обработанные FGF20 или Wnt5A, или ЭС клетки человека, дифференцировались в присутствии факторов, секретируемых иммортализованными астроцитами среднего мозга (Roy, et al., *Nature Med.* 12:1259-1268 (2006), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Однако ни одна из предыдущих стратегий не обеспечивала получения обогащенной популяции ДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями для применения в процедурах приживления для восстановления функции нейронов *in vivo*.

I. Способы культивирования клеток для индуцирования (линии) нейрональных клеток-предшественников: приведение в контакт плюрипотентных стволовых клеток человека с SB431542 и LDN-193189 давало линию дифференцированных нейрональных клеток.

В приведенных ниже примерах описаны примеры способов получения клеток нейрональной линии для применения в разработках в соответствии с настоящими изобретениями.

Двойное ингибирование SMAD ранее использовалось в качестве быстрого и эффективного способа индукции одного типа клеток нейрональной линии из ПСКч (Chambers, et al., *Nat Biotechnol* 27, (2009), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Эти нейрональные линии, индуцированные молекулами, включая Noggin, обычно (в отсутствие воздействия) дифференцируются по пути, который обеспечивает дифференцировку в клетки центральной нервной системы, что соответствует судьбе нервных клеток. В последующих исследованиях было выявлено, что применение низкомолекулярного дорсоморфина (DM) вместо Noggin, по меньшей мере, частично, близкие, но не идентичные дифференцированные клетки, причем основные различия проявлялись в культурах (Kim, et al, *Robust enhancement of neural differentiation from human ES and iPS cells regardless of their innate difference in differentiation propensity. Stem Cell Rev* 6, 270-281, (2010); Zhou, et al., *High-Efficiency Induction of Neural Conversion in hESCs and hiPSCs with a Single Chemical Inhibitor of TGF-beta Superfamily Receptors. Stem Cells*, 504, (2010), цитируемые источники включены в настоящий текст посредством ссылки). Авторы изобретения наблюдали, что клетки, полученные с применением Noggin, хотя и находятся на той же стадии развития, что и клетки, обработанные LDN, экспрессируют в основном те же маркеры и обладают близкими способностями к разви-

тию в различные нейрональные линии, также имеют некоторые отличия, например находятся в более "переднем" положении на передне-задней оси (т.е. ближе к переднему мозгу, больше клеток экспрессируют FOXG1 и т.п.) от нервных клеток, индуцированных с применением LDN. Соответственно, хотя LDN использовался вместо Noggin для ингибирования BMP, среди других сигнальных путей, Noggin и LDN возможно обладают другими типами активности, помимо ингибирования BMP.

Частично из-за высокой стоимости применения Noggin авторы изобретения исследовали возможность применения ингибитора BMP вместо Noggin для дифференцировки клеток по нейрональному пути. Соответственно, использовали низкомолекулярный ингибитор BMP, LDN-193189, (Yu, et al., Nat Med 14, 1363-1369, (2008), цитируемый источник включен в настоящий текст путем ссылки) и обнаружили, что он может заменять Noggin в ходе развития в соответствии с настоящими изобретениями в комбинации с SB431542, обеспечивая получение примитивной нейроэктодермы из ПСКЧ, клеток нейрональной судьбы (линии), т.е. клеток ЦНС (фиг. 2А). Такую комбинированную обработку обозначили LSB, в соответствии с комбинацией этих двух ингибиторов LDN-193189 и SB431542.

Обычно дифференцировку клеток инициировали путем обработки высоко конфлюэнтного монослоя ЭСЧ или иПСЧ путем двойного ингибирования передачи сигнала SMAD. В предпочтительных вариантах реализации процент конфлюэнтности составляет 50-100%, а наиболее предпочтительна конфлюэнтность 70-80%. Для специалиста очевидно, что исходная плотность клеток, необходимая для достижения предпочтительной конфлюэнтности согласно настоящему изобретению, будет зависеть от типа и размера клеток, эффективности посева, выживаемости, адгезии и других параметров, которые могут быть определены эмпирическим путем специалистом без слишком трудоемких экспериментов. Двойное ингибирование SMAD может быть осуществлено с использованием различных соединений, включая Noggin, SB431542, LDN-193189, дорсоморфина или других молекул, которые блокируют передачу сигнала TGF β , BMP и Activin/Нодаля. В предпочтительном варианте реализации используется композиция, содержащая SB431542 и LDN-193189 (совместно, LSB) в концентрации 0,1-250 мкМ или, более предпочтительно 1-25 мкМ, или, в наиболее предпочтительном варианте, 10 мкМ соединения SB431542 и 10-5000 нМ или, наиболее предпочтительно 100-500 нМ соединения LDN-193189.

II. Образование ДА нейронов из ЭСКЧ через промежуточные розеточные клетки и результаты исследований трансплантатов, в которых использовались эти ДА-подобные нейроны.

Ранее авторы изобретения использовали несколько других способов направленной дифференцировки, которые давали популяции клеток, содержащие ДА-подобные нейроны. Эти ДА-подобные нейроны использовали в исследованиях по трeнсплантации, результаты которых вызвали сомнения в возможности последующего применения этих клеток в терапевтических приложениях. В качестве примеров, процедуры, описанные у Perrier et al., 2004 и Fasano et al., 2010, включая индукцию нейронов на основе MS5, приводили к образованию розеточных клеток и использовались для получения предшественников 11 дня, (см. фиг. 2, 16 и 17 в качестве примеров), которые далее применяли для получения ДА-подобных нейронов. Эти нейроны получались из небольшой доли клеток-предшественников в образующихся на 11 день популяциях клеток. Исследования трансплантации с использованием этих нейронов продемонстрировали низкую выживаемость после трансплантации и утрату ДА-подобного фенотипа нейронов в дополнение к наблюдавшемуся после трансплантации развитию неприемлемых типов нервных клеток и потерю контроля над ростом клеток, которая приводила к образованию тератом. См. фиг. 16 и 17.

В частности, на стадии P0 ЭСКс приводили в контакт с молекулами для начала превращения Oct4+ клеток в розеточные клетки с использованием фидерных клеток MS5 (Perrier et al., 2004). На стадии P1 розеточные клетки размножали путем приведения клеток в контакт с дополнительными соединениями для обеспечения дифференцировки клеток в клетки стадии P2 со специфическим паттерном экспрессии, включая Pax2+/En1+ клетки-предшественники ДА, которые затем дифференцировались в TH+/En1+ ДА нейроны. Эти клетки использовали для трансплантации крысам с вызванными 6ОНДА повреждениями, иммуносупрессированными циклоспорином А. Описанные эксперименты по трансплантации показали плохую выживаемость *in vivo*, потерю фенотипа TH+, проблемы, связанные с дальнейшим разрастанием в нежелательные, возможно летальные, клетки, такие как тератомы, и перерастанием в неприемлемые типы нейронов, которые могут вызвать дополнительные медицинские проблемы у пациента.

Наблюдалось очень маленькое количество выживших TH+ нейронов через 4,5 месяца после трансплантации (<50 TH+ клеток/животное) в трансплантатах из предшественников ДА нейронов, полученных из розеток, фиг. 16А. Однако в противоположность TH+ клеткам, клетки, маркированные GFP (GFP находился под контролем убиквитарного промотора), показали довольно хорошую выживаемость после трансплантации. Это говорило о том, что клетками с наиболее хорошей выживаемостью после трансплантации были нейронные клетки, не относящиеся к ДА нейронам (16В). Несколько клеток, полученных из трансплантата (hNA+, зеленые), одновременно экспрессировали TH (красные), что также говорило о том, что большинство трансплантированных клеток человека относятся к фенотипам нейронов, не являющихся ДА нейронами, фиг. 16С. Секции фиг. 16 D-E показывают, что, несмотря на очень плохую выживаемость *in vivo*, наблюдалось некоторое улучшение (варьируемое в низкой и высокой степени) в нескольких поведенческих тестах, таких как тест на вращение, индуцированное амфетамином, (D), тест с цилиндром и спонтанные вращения (E).

Индукцию нейронов без фидерных клеток осуществляли как описано ранее (Chambers и др., 2009), но с модификациями для получения клеток вентральных пластинок (Fasano и др., 2010, цитируемый источник включен в настоящий текст путем ссылки).

При использовании модифицированного способа двойного ингибирования SMAD для дифференцировки плюрипотентных клеток в клетки вентральной пластинки авторы настоящего исследования ранее обнаружили, что для индукции FP к 11 дню требовались высокие концентрации SHH. Например, в некоторых вариантах осуществления добавляли Sonic C25II в концентрации 200 нг/мл. В некоторых экспериментах добавляли DKK-1 (R&D; 100 нг/мл), FGF8 (R&D; 50 нг/мл), Wnt-1 (Peprotech; 50 нг/мл) и ретиновую кислоту (R&D; 1 мМ), см. фиг. 17. При этом ни одна из популяций клеток, полученных с использованием ранее известных методов, не содержала на 11 день высокой доли предшественников клеток FOXA2+/LMX1A+ вентральных пластинок среднего мозга, получаемых с использованием способа согласно настоящему изобретению.

III. Соединения для применения в направленной дифференцировке: скрининг низкомолекулярных соединений с использованием клеток нейрональных линий в соответствии с настоящими изобретениями давал соединения, которые обеспечивали дифференцировку клеток в FOX2A+ и LIMX1A+ нервные клетки к 11 дню культивирования.

В приведенных ниже примерах описано применение примеров клеток из раздела I для скрининга низкомолекулярных соединений и определения, приведет ли их применение к направленной дифференцировке популяции клеток, содержащей высокую долю нейронов вентральной пластинки среднего мозга к 11 дню после первичного контакта с двойными ингибиторами SMAD. Результаты этого скрининга вначале показали что соединение, активирующее SHH, совместно с активацией FGF8 и Wnt обеспечивало эффективное образование FOXA2+/LMX1A+ положительных клеток вентральной пластинки среднего мозга к 11 дню дифференцировки. Здесь приведены результаты примеров экспериментов, в которых устанавливали, какие молекулы необходимы, и определяли оптимальное время контакта для получения делаемых FOXA2+/LMX1A+ положительных популяций клеток на 11 день.

Недавние генетические исследования на мышах продемонстрировали важную роль фактора транскрипции FOXA2 в развитии и выживании ДА нейронов среднего мозга. Уникальным свойством развивающегося среднего мозга является одновременная экспрессия маркера вентральной пластинки FOXA2 и маркера покрывки среднего мозга LMX1A. Обычно клетки вентральной пластинки и крыши расположены в различных участках ЦНС (одни - вентрально, а другие - дорсально) и требуют резко противоположных паттернов индукции. Недавно было описано получение область-специфичных предшественников вентральной пластинки из ЭСКч с использованием модифицированного протокола двойного ингибирования. Каноническая передача сигнала Wnt была важна как для функционирования покрывки, так и для развития ДА нейронов среднего мозга.

А. CHIR99021 (CHIR) индуцировал высокие уровни предшественников ДА нейронов среднего мозга к 11 дню культивирования. Как описано в настоящем документе, обработка соединением CHIR99021 (CHIR) эффективным ингибитором GSK3 β , который, как известно, существенно активирует передачу сигнала WNT, индуцировала LMX1A в FOXA2+ предшественники вентральной пластинки (фиг. 1a). CHIR был более эффективен, чем рекомбинантный Wnt3A или Wnt1, в индукции экспрессии LMX1A. Эффективность индукции LMX1A зависела от времени обработки CHIR, максимальный эффект достигался на 3-11 день (фиг. 5). CHIR индуцировал совместную экспрессию FOXA2/LMX1A, а другие факторы, такие FGF8, обладали только незначительными эффектами (фиг. 6). Индукция совместной экспрессии FOXA2/LMX1A требовала значительной активации передачи сигнала SHH с использованием пурморфина, низкомолекулярного агониста, самостоятельно или в комбинации с рекомбинантным SHH (фиг. 7).

Обработка агонистами SHH (пурморфин+SHH) и FGF8 (S/F8) в отсутствие CHIR99021 демонстрировала гораздо более низкую экспрессию FOXA2 к 11 дню и полное отсутствие экспрессии LMX1A (фиг. 1a, b). Двойное ингибирование SMAD (обработка LDN-193189+SB431542="LSB") не приводила к образованию экспрессирующих FOXA2 клеток, но не давала подгруппы LMX1A+ клеток (фиг. 1a, b). Маркер передней области OTX2 был устойчиво индуцирован в культурах, обработанных LSB и LSB/S/F8/CHIR, но не в условиях LSB/S/F8 (фиг. 1a, c). Проводились систематические сравнения этиз трех условий культивирования (фиг. 1d) с использованием глобального временного профайлинга экспрессии генов. Иерархическое выделение кластеров дифференциально экспрессировавшихся генов позволило различать эти три набора условий обработки на 11 день дифференцировки (фиг. 8a). FOXA1, FOXA2 и несколько других мишеней SHH ниже по каскаду, включая PTCH1, были среди наиболее дифференциально регулировавшихся транскриптов в LSB/S/F8/CHIR в сравнении с наборами обработки LSB (фиг. 1e). Экспрессия LMX1A, NGN2, и DDC указывала на предопределенность пути развития в предшественника ДА нейрона среднего мозга уже на 11 день (фиг. 1e, f). В отличие от этого, культуры LSB на 11 день были обогащены маркерами предшественников дорсального заднего мозга, такими как HES5, PAX6, LHX2, и EMX2. Прямое сравнение LSB/S/F8/CHIR с обработкой LSB/S/F8 (фиг. 1f) подтвердило селективное обогащение маркеров предшественников ДА нейронов среднего мозга в группе LSB/S/F8/CHIR и указывало на идентичность предшественников гипоталамуса в культурах, обработан-

ных LSB/S/F8, на основании дифференциальной экспрессии RAX1, SIX3, и SIX6 (см. также экспрессию POMC, OTP на фиг. 2D ниже). Полный список дифференциально экспрессировавшихся транскриптов в табл. 1, 2 и онтологический анализ генов на фиг. 8b (DAVID; <http://david.abcc.ncifcrf.gov>), подтвердили обогащение канонического сигнального пути WNT при обработке CHIR. Первичные данные еще недоступны на GEO worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov/geo/accession#: [TBD]). Сравнительный временной анализ экспрессии генов маркеров предшественников ДА среднего мозга (фиг. 1g) с маркерами пути развития передних и вентральных нейронов, не являющихся ДА (фиг. 1h), привел к выявлению трех типов индукции: i) LSB: дорсальный задний мозг; ii) LSB/S/F8: вентральный/гипоталамический и iii) LSB/S/F8/CHIR: соответствующий предшественнику ДА среднего мозга.

Клетки, полученные с применением описанного здесь протокола, для обеспечения развития в соответствии с настоящими изобретениями, сравнивали с клетками, полученными предшествующими методами. На фиг. 2 и 18 показаны примеры визуального сравнения с SHH/FGF8+ клетками, обработанными CHIR, в соответствии с настоящими изобретениями. На фиг. 19A приведены примеры клеток, дважды меченых FOXA2/Tuj1, после обработки LSB/S/F8/CHIR (верхние панели) и совместного мечения FOXA2 метками TH, Nurr1 и LMX1A (нижние панели). Эти комбинации маркеров позволяют выявлять предшественники ДА нейронов на ранних стадиях. На фиг. 19B приведены данные по экспрессии генов (для сравнения с фиг. 2E) для ключевых маркеров предшественников дофаминовых нейронов.

Материалы и методы в целом описаны в настоящем документе: линии человеческих ЭСК ESC (H9, H1) и iPСК (2C6 и SeV6) обрабатывали в соответствии с модифицированным протоколом индукции вентральных пластинок (Fasano, и др., *Cell Stem Cell* 6:336-347 (2010), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки), основанном на двойном ингибировании SMAD (Dual SMAD-inhibition) (Chambers, и др. *Nat. Biotechnol.* 27:275-280 (2009), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Время воздействия реагентов SHH C25II, пурморфамин, FGF8 и CHIR99021 на вентральные пластинки среднего мозга оптимизировали для получения новых популяций ДА нейронов (см. фиг. 1d). После индукции вентральных пластинок последующее созревание (11-25 дней или дольше 25 дней в культуре до по меньшей мере 100 дней в культуре) осуществляли в среде для дифференцировки на основе Neurobasal/B27 в присутствии факторов выживаемости и созревания ДА нейронов (Perrier, и др. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12543-8 (2004), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки), таких как AA, BDNF, GDNF, TGFβ3 и dbcAMP (подробности приведены в полном описании метода). Фенотип полученной популяции ДА нейронов тщательно исследовали иммуноцитохимическими методами, методом количественной ОТ-ПЦР, определения глобального профиля экспрессии генов, ВЭЖХ-анализа для определения дофамина и регистрации электрофизиологических характеристик *in vitro*. Исследования *in vivo* осуществляли на грызунах с гемипаркинсонизмом (мыши или крысы, которым токсин 6ОНДА был введен в одно полушарие мозга). Указанные исследования проводили на невзрослых мышах NOD-SCID IL2Rgc (Jackson labs) и взрослых крысах Sprague Dawley из Taconic Farms, у которых вызывали повреждения 6-гидроксидопамном посредством стереотаксических инъекций указанного токсина как описано ранее, а также на двух взрослых макаках-резус, получавших односторонние инъекции MPTP в сонную артерию.

ДА нейроны вводили путем стереотаксической инъекции в полосатое тело животных (150×103 клеток мышам, 250×103 клеток крысам) и суммарно 7,5×106 клеток (распределенных в 6 участков; по 3 с каждой стороны мозга) макакам. Поведенческие тесты проводили ежемесячно после трансплантации, включая тест на вращение, индуцированное амфетаминном, а также тест на фокальную акинезию ("stepping test", шаговый тест) и тест на использование конечностей (тест в цилиндре). Крыс и мышей умерщвляли на 18-20 неделе, а приматов - через 1 месяц после трансплантации. Изучение характеристик трансплантатов осуществляли посредством стереологического анализа количества клеток и объема трансплантата, а также посредством тщательного исследования фенотипа с использованием иммуногистохимических методов.

Культура недифференцированных ЭС клеток человека. Линии клеток hESC H9 (WA-09, XX, 27-55 пассажей после 10/2009), H1 (WA-01, XY, 30-40 пассажей после 6/2010) и линии клеток iPSC 2C6 (Kim, и др. *Cell Stem Cell* 8:695-706 (2011), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) (XY, 20-30 пассажей) и SeV6 (XY, 20-30 пассажей; получены из эмбриональных фибробластов MRC-5 с применением неинтегрирующей 4-х факторной векторной системы Sendai (Ban, и др. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* (2011) 108(34):14234-14239;10.1073/pnas.1103509108, цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) поддерживали на эмбриональных фибробластах мыши при расчетных концентрациях посева в диапазоне от $0,5 \times 10^3$ на см^2 до 100×10^3 на см^2 на по ЭС клеткам человека, при которых клетки склонны к образованию кластеров (MEF, Global Stem, Rockville, MD) в оптимальной среде для ЭС клеток человека, содержащей 20% заменителя сыворотки Knockout serum replacement (KSR, Invitrogen, Carlsbad, California) (как описано ранее (Kim, и др. *Cell Stem Cell* 8:695-706 (2011), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Используемое количество заменителя сыворотки Knockout может варьировать в диапазоне от 0 до 40%.

Индукция нейронов. Для индукции дофаминовых нейронов вентральной пластинки среднего мозга

использовали модифицированную версию двойного ингибирования SMAD (Chambers, и др. *Nat. Biotechnol.* 27:275-280 (2009), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) и протокол индукции вентральных пластинок (Fasano, и др. *Cell Stem Cell* 6:336-347 (2010), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки), основанного на воздействии в течение определенного времени реагентами LDN-193189 (100 нМ (в диапазоне концентраций 0,5-50 мкМ, Stemgent, Cambridge, Massachusetts), SB431542 (10 мкМ (в диапазоне концентраций 0,5-50 мкМ, Tocris, Ellisville, MI), SHH C25II (100 нг/мл (в диапазоне концентраций 10-2000 нг/мл, R&D, Minneapolis, MN), пурморфинамином (2 мкМ (в диапазоне концентраций 10-500 нг/мл, Stemgent), FGF8 (100 нг/мл (в диапазоне концентраций 10-500 нг/мл, R&D) и CHIR99021 (CHIR; 3 мкМ (в диапазоне концентраций 0,1-10 мкМ, Stemgent). Замечание: в протоколе индукции вентральных пластинок обработка "SHH" относится к обработке, т.е. приведение клеток в контакт с комбинацией SHH C25II 100 нг/мл+пурморфамин (2 мкМ). Клетки высевали ($35\text{-}40 \times 10^3$ клеток/см²) и выращивали в течение 11 дней на геле "matrigel" или "geltrex" (использовались в том виде, в котором приобретены) (BD, Franklin Lakes, New Jersey, США) в среде с заменителем сыворотки Knockout (KSR), содержащей DMEM, 15% KSR, 2 мМ L-глутамин и 10 мкМ (в диапазоне концентраций 1-25 мкМ) β-меркаптоэтанол. Среда KSR последовательно замещали средой N2, начиная с 5 дня дифференцировки, смешивая их в соотношениях 75%(KSR):25%(N2) на 5-6 день, 50% (KSR):50%(N2) на 7-8 день и 25% (KSR):75% (N2) на 9-10 день, как описано ранее (Chambers, и др. *Nat. Biotechnol.* 27:275-280 (2009), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). На 11 день среду заменяли на среду Neurobasal/B27 (разведение 1:50) /L-Glut-содержащую (эффективный диапазон 0,2-2 мМ) среду (NB/B27; Invitrogen), дополненную CHIR (до 13 дня) и BDNF (полученный из мозга нейротрофный фактор, 20 нг/мл в диапазоне от 5 до 100; R&D), аскорбиновой кислотой (AA; 0,2 мМ (в диапазоне концентраций 0,01-1 мМ), Sigma, St Louis, MI), GDNF (нейтрофный фактор глиальных клеток, 20 нг/мл (в диапазоне концентраций 1-200 нг/мл); R&D), TGFβ3 (трансформирующий фактор роста типа β3, 1 нг/мл (в диапазоне концентраций 0,1-25 нг/мл); R&D), дибутирил цАМФ (0,5 мМ (в диапазоне концентраций 0,05-2 мМ); Sigma), и DAPT (10 мМ (в диапазоне концентраций 0,5-50 нМ); Tocris,) в течение 9 дней. На 20 день клетки подвергали диссоциации с применением Accutase® (Innovative Cell Technology, San Diego, California) и пересевали в условиях повышенной плотности клеток (например, 300-400 тыс. клеток/см²) на чашки, предварительно покрытые полиорнитин (PO); 15 мкг/мл (в диапазоне концентраций 1-50 мкг/мл)/ламинином (1 мкг/мл) (в диапазоне концентраций 0,1-10 мкг/мл)/фибронектином (2 мкг/мл (в диапазоне концентраций 0,1-20 мкг/мл) в среде для дифференцировки (NB/B27+BDNF, AA, GDNF, dbcAMP (в диапазоне концентраций, указанных в настоящем описании), TGFβ3 и DAPT (в диапазоне концентраций, указанных в настоящем описании) до достижения желаемой стадии созревания для конкретного эксперимента.

Для индукции ДА нейронов, основанной на розеточных структурах, частично использовали ранее описанные протоколы (Perrier, и др. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12543-8 (2004), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) с по меньшей мере одним исключением, когда двойное ингибирование SMAD использовали для ускорения начальной стадии индукции нейронов. Вкратце, ЭСКч индуцировали для нейронного пути развития совместным культивированием с облученными клетками MS5 в среде KSR с добавлением SB431542 и Noggin (250 нг/мл (в диапазоне концентраций 10-1000 нг/мл); R&D), с 2-8 дней и SHH+FGF8 с 6-11 дней дифференцировки. После 11 дней в среде KSR нейронные розетки собирали вручную и выращивали (стадия P1) в среде N2 с добавлением SHH, FGF8, BDNF и AA как описано ранее (Perrier, и др. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12543-8 (2004), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). После 5-7 дней на стадии P1 розетки снова собирали вручную и измельчали в порошок с последующей инкубацией в не содержащем Ca²⁺/Mg²⁺ сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) в течение 1 ч и пересевали на чашки, покрытые полиорнитин (PO)/ламинином/фибронектином. Составление паттерна с SHH/FGF8 продолжали в течение 7 дней на стадии P2 с последующей окончательной дифференцировкой в присутствии BDNF, AA, GDNF, TGFβ3 и dbcAMP как описано выше до достижения желаемой стадии созревания для конкретного эксперимента (обычно 5-7 дней для экспериментов по трансплантации или 32 дня для функциональных экспериментов *in vitro*).

Анализ экспрессии генов. Тотальную РНК выделяли в ходе дифференцировки в следующие дни: 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 и 25 для каждого эксперимента с условиями: контроль LSB, LSB/SHH/FGF8 и LSB/SHH/FGF8/CHIR с применением набора RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Для анализа на биочипах тотальную РНК обрабатывали на аппарате MSKCC Genomic core и гибридизовали на биочипах в виде бусин Illumina Human ref-12 в соответствии с инструкцией производителя. Сравнения осуществляли каждый день и для каждого набора условий с применением пакета LIMMA от Bioconductor ([worldwideweb.bioconductor.org](http://www.worldwideweb.bioconductor.org)). Гены, у которых скорректированное значение Р было меньше 0,05, а кратность изменения экспрессии была выше двух, считали статистически значимыми. Некоторые из описательных анализов данных на биочипах и представление выполняли с применением коммерчески доступного программного пакета (Partek Genomics Suite (версия 6.10.0915)). Для анализа количественной ОТ-ПЦР тотальную РНК на 25 день для каждого набора условий подвергали обратной транскрипции (Quan-

titech, Qiagen) и амплифицированный материал анализировали с применением коммерчески доступной тест-системы "Taqman gene expression assays" (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) с нормировкой данных по HPRT. Каждая точка представляет 9 технических повторов из 3 независимых биологических образцов. Первичные данные экспериментов на биочипах еще не доступны на GEO world-wide web.ncbi.nlm.nih.gov/geo).

Хирургическое вмешательство у животных. Эксперименты на грызунах и обезьянах осуществляли в соответствии с инструкциями Национального института здравоохранения (NIH), и они были одобрены местным институтским комитетом охраны и использования животных (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC), ведомственным комитетом биобезопасности (Institutional Biosafety Committee, IBC), а также научно-исследовательским комитетом по эмбриональным стволовым клеткам (Embryonic Stem Cell Research Committee, ESCRO).

Мыши. Мышей, нокаутных по NOD-SCID IL2R γ c (весом 20-35 г; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, США) подвергали анестезии кетамин (90 мг/кг; Akorn, Decatur, IL) и ксилазином (4 мг/кг; Fort Dodge, IA). 6-гидроксидофамин (10 мкг (в диапазоне концентраций 0,1- 20 мкг), 6-OHDA (Sigma-Aldrich) вводили стереотактически в полосатое тело (стриатум) со следующими координатами (в миллиметрах): AP, 0,5 (от брегмы; в качестве точки отсчета для стереотактического хирургического вмешательства использовали шов черепа); ML, -2,0; DV, -3,0 (от твердой мозговой оболочки, мембраны покрывающей мозг, использовавшейся в качестве точки отсчета). Мыши с успешными поражениями (в среднем >6 вращений в минуту) были выбраны для трансплантации. Общее количество 150×10^3 клеток вводили в объеме 1,5 мкл в стриатум по следующим координатам (в мм): AP, 0,5; ML, -1,8; DV, 3,2. Мышей умерщвляли через 18 недель после трансплантации.

Крысы. Взрослых самок крыс Sprague-Dawley (Taconic, Hudson, NY, США) массой 180-230 г в ходе хирургических процедур анестезировали кетамин (90 мг/кг) и ксилазином (4 мг/кг). На одной стороне наносили повреждения медиального пучка переднего мозга нигростриального пути при помощи стереотактических инъекций 6-OHDA (3,6 мг/мл в 0,2% аскорбиновой кислоте и 0,9% физрастворе, Sigma в два участка (Studer, et al. *Nature Neurosci.* 1:290-295 (1998), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Крыс отбирали для трансплантации, если вызванное амфетамином вращение превышало 6 поворотов в минуту через 6-8 недель после инъекции. 250×10^3 клеток трансплантировали в стриатум каждого животного (Координаты: AP +1,0 мм, ML -2,5 мм и V -4,7 мм; гребенка установлена на -2,5). Контрольные животные получали вместо этого ФБР. Хирургические процедуры описаны ранее (Studer, и др. *Nature Neurosci.* 1:290-295 (1998), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Ежедневные внутрибрюшинные инъекции циклоспорина 15 мг/кг (Bedford Labs, Bedford, OH) были начаты за 24 ч перед трансплантацией клеток и продолжались до умерщвления, через 20 недель после трансплантации клеток.

Приматы. Двух взрослых (17-18 лет; 10-12 кг; самки) макак-резус приводили в гемипаркинсоновское состояние посредством введения МРТР в сонную артерию с последующим еженедельным внутривенным введением МРТР для создания двустороннего паркинсоновского синдрома (Kordower, и др. *Science* 290:767-773 (2000), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). У обоих животных наблюдались паркинсоновские симптомы, соответствующие повреждениям от умеренной до тяжелой степеней, основанным на анализе поведения, включая сторбленную позу, подволакивание ноги и симптомы мышечной ригидности (непластичность движений), игнорирование (моторное восприятие латерального стимула) и брадикинезию (замедленная инициация движения). Эти параметры могут быть оценены на обезьянах с применением модифицированной клинической шкалы оценки паркинсонизма (CRS). В день операции по трансплантации животным вводили транквилизатор кетамин (3,0 мг/кг внутримышечно) и дексдомитора (0,02-0,04 мг/кг внутримышечно), интубировали, чтобы поддерживать стабильную вентиляцию дыхательных путей и подвергали анестезии изофлураном. Затем их помещали в стереотактическую рамку для хирургического вмешательства. Обоим макак-резус подвергали операции однократно, с тремя внутривенными инъекциями культур ДА, полученные из вентральных пластинок человека, основываясь на стереотаксических координатах (Paxinos, и др. *The Rhesus Monkey Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press, 2000), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Двусторонние инъекции клеток (10 мкл на инъекцию; 125000 клеток/мкл) осуществляли в три положения (1 - задний хвостовой придаток, 2-пре-комиссуральную скорлупу и вышележащее белое вещество) общим объемом 30 мкл на полушарие. Использовали инфузионный насос, присоединенный к стереотаксическому микроманипулятору, для доставки клеток при скорости 1 мкл/мин с применением шприца Hamilton объемом 50 мкл с иглой 28 G. После завершения инъекций иглу оставляли на месте на 2-5 мин, чтобы инфузат смог диффундировать из кончика шприца, а затем медленно извлекали шприц. Немедленно после операции животные получали анальгетик (бупренекс, 0,01 мг/кг внутримышечно, два раза в день в течение 72 ч после хирургического вмешательства; мелоксикам, 0,1 мг/кг подкожно, один раз в день в течение 72 ч после хирургического вмешательства), а также антибиотик (цефазолин, 25 мг/кг внутримышечно, два раза в день) в течение 72 ч после хирургического вмешательства. Животные получали циклоспорин А (Neoral, Sandimmune) перорально (30 мг/кг со снижением до 15 мг/кг)

ежедневно, начиная за 48 ч до хирургического вмешательства и до момента умерщвления, в течение одного месяца после трансплантации.

Поведенческие тесты. Тест с вызванным амфетаминами вращением (мыши и крысы) и тест с шаганием (крысы) проводили перед трансплантацией и через 4, 8, 12, 18 недель после трансплантации. Вращательное поведение у мышей регистрировали через 10 мин после внутривенного введения d-амфетамина (10 мг/кг, Sigma) и регистрировали в течение 30 мин. Вращательное поведение у крыс регистрировали через 40 мин после внутривенного введения d-амфетамина (5 мг/кг) автоматически оценивали с применением системы VideoMot2 (TSE, Германия). Данные представляли в форме среднего числа вращений в минуту. Использовали модифицированный шаговый тест с Blume, et al. *Exp. Neurol.* 219:208-211 (2009) and Crawley, et al. *What's Wrong With My Mouse: Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice* (Wiley-Liss, 2000), все источники включены в настоящее описание посредством ссылки. Вкратце, каждую крысу помещали на плоскую поверхность, задние ноги поднимали, аккуратно держа за хвост таким образом, что стола касались только передние лапы. Экспериментатор оттаскивал крысу назад на 1 метр с равномерной скоростью. Подсчитывал число компенсирующих шагов контралатеральной и ипсилатеральной лапами. Данные представляли в форме процентного отношения шагов контралатеральной лапой/количество компенсирующих шагов контралатеральной лапой+ипсилатеральной лапой. Тест с цилиндром проводили, помещая крысу с стеклянный цилиндр и подсчитывая число касаний ипсилатеральной лапой по сравнению с контралатеральной (из 20 касаний) стенки цилиндра, как описано ранее (Tabar, et al. *Nature Med.* 14:379-381 (2008), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Ниже описана обработка тканей для грызунов и приматов.

Мыши и крысы: животным (мыши и крысы) вводили повышенные дозы фенobarбитала внутривенно (50 мг/кг) для глубокой анестезии и перфузировали в 4% параформальдегиде (ПФА). Извлекали головной мозг, фиксировали в 4% ПФА, а затем погружали в 30% раствор сахарозы на 2-5 дней. Готовили срезы на криостате после фиксации в соединении O.C.T. (Sakura-Finetek, Torrance, California, США).

Приматы: животных умерщвляли под глубокой анестезией кетамин (10 мг/кг, внутримышечно (В.М.)) и фенobarбиталом (25 мг/кг, внутривенно (ВВ)) путем перфузирования сердца гепаринизированным 0,9% физраствором, а затем свежим холодным 4% фиксирующим ПФА (pH7.4). Непосредственно после первичной фиксации мозг извлекали из черепа и фиксировали в 4% ПФА, где он свободно плавал в течение 24-36 ч. Затем мозги промывали и ресуспендировали в 10% сахарозе при медленном встряхивании 4°C и оставляли "вымачиваться". Затем это процесс повторяли в 20% сахарозе, а затем в 30% сахарозе. Целые мозги нарезали по фронтальной плоскости (венечному шву) на серийные срезы толщиной 40 мкм на охлаждаемом санном микротоме и хранили плавающим в криопротективной среде при -20°C.

Иммуногистохимия: Клетки фиксировали в 4% PFA и блокировали 1% бычьим сывороточным альбумином (БСА) с 0,3% буфером Triton. Срезы ткани мозга промывали в холодном ФБР и обрабатывали аналогичным образом. Первичные антитела разбавляли в 1-5% БСА или нормальной сыворотке козы и инкубировали в соответствии с инструкциями производителя, подробный список антител и источников приведен в табл. 6. Соответствующие Alexa488, Alexa555 и Alexa647-конъюгированные вторичные антитела (Molecular Probes, Carlsbad, California, США) с веществом для контрастного окрашивания ядер 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (Thermo Fisher, Rockford, Illinois, США). Для некоторых анализов использовали биотинилированные вторичные антитела с последующей визуализацией хромогеном DAB (3,3'-диаминобензидин).

ВЭЖХ-анализ. Обращенно-фазовую ВЭЖХ с электрохимическим детектированием для измерения уровней дофамина, гомованилиновой кислоты (HVA) и DOPAC (3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты) осуществляли, как описано ранее (Roy, et al. *Nature Med.* 12:1259-1268 (2006); Studer, et al. *Brain Res. Bull.* 41:143-150 (1996), все источники включены в настоящее описание посредством ссылки), образцы культур отбирали в перхлорную кислоту на 65 день дифференцировки. Для некоторых экспериментов ДА измеряли напрямую в среде с применением той же системы детектирования, но после альбуминовой экстракции дофамина и его метаболитов с применением коммерчески доступного набора, как описано ранее (Studer, et al. *Brain Res. Bull.* 41:143-150 (1996), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки).

Регистрация электрофизиологических параметров: Культуры переносили в регистрирующую камеру на прямой микроскоп, оборудованный 40X водоиммерсионным объективом (Eclipse E600FN; Nikon); культуры перфузировали физраствором, содержащим, в mM: 125 NaCl, 2,5 KCl, 25 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ и 25 глюкозы (34°C; насыщенным 95% O₂-5% CO₂; pH 7,4; 298 мОсм/л). Скорость потока физраствора составляла 2-3 мл/мин при пропускании через встроенный нагреватель (SH-27B с контроллером TC-324B; Warner Instruments). Нейроны визуализировали методом видеомикроскопии с охлаждаемой цифровой ПЗС-камерой (CoolSNAP ES², Photometries, Roper Scientific, Tucson, Arizona, США). Для регистрации электрофизиологических параметров отбирали клетки, похожие по форме на нейроны, с хорошим ветвлением дендритов. Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp) на целых соматических клетках в текущей конфигурации фиксации осуществляли с применением усилителя MultiClamp 700B (Molecular Devices). Сигналы фильтровали в диапазоне 1-4 кГц и оцифровывали.

вали на 5-20 к ГЦ с применением Digidata 1440A (Molecular Devices). Регистрирующие контактные электроды были выполнены из волокна из боросиликатного волокна (Sutter Instruments), вытянутого на пуллере Flaming-Brown (P-97, Sutter Instruments) имели сопротивление 4-6 МОм в ванне. Электроды заполняли внутренним раствором, содержащим в мМ: 135 K-MeSO₄, 5 KCl, 5 HEPES, 0,25 EGTA, 10 фосфокреатина-ди(трис), 2 АТФ-Mg и 0,5 ГТФ-Na (pH 7,3, осмолярность доводили до 290-300 мосм/л). Мостиковый усилитель настраивали таким образом, чтобы компенсировать сопротивление электродов, и следовали за ним. Емкость электродов компенсировали. Если последовательное соединение возрастало >20% в ходе фиксации потенциала данные отбрасывали, поскольку повышение сопротивления указывает на частичные технические неполадки в ходе измерения.

Подсчет клеток и стереологические анализы. Процентную долю клеток, положительных по маркеру, на вентральной пластинке (день 11), фиг. 1, предшественников дофаминовых нейронов среднего мозга (день 25), фиг. 2, и на стадии зрелых ДА нейрона (день 50 или позже), фиг. 3 и 11, определяли в образцах, полученных в по меньшей мере 3 независимых экспериментах для каждого. Изображения для подсчета выбирали случайным образом (равномерное распределение), каждое изображение оценивали сначала по числу DAPI-положительных ядер, после чего подсчитывали число клеток, экспрессирующих представляющий интерес маркер. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM (стандартная ошибка среднего). Количество человеческих клеток (идентифицируемых при помощи анти-hNA) и TH+ нейронов в трансплантате описывали подсчитывали на каждом десятом срезе, если удавалось определить трансплантат. Количество клеток и объем трансплантата определяли с применением оптического зонда аппарата для фракционного зондирования и оценочного устройства Cavalieri с применением программы Stereo Investigator software (MBF bioscience, Vermont, США) как описано у Tabar, et al. Nat. Biotechnol. 23:601-606 (2005); цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки. Данные представлены в форме оценочного общего числа клеток и общего объема трансплантата $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). Приведенные ниже составы характеризуют примеры среды для культивирования клеток для реализации настоящих изобретений.

Поддерживающая среда для ЭСКч (1 л): 800 мл DMEM/F12, 200 мл заменителя сыворотки Knockout Serum Replacement, 5 мл 200 мМ L-глутамина, 5 мл Pen/Strep, 10 мл 10 мМ раствора 15 незаменимых аминокислот в минимальной среде MEM, 55 мкМ 13-меркаптоэтанола, и ФРФ-бета (bFGF, конечная концентрация 4 нг/мл).

Среда KSR для дифференцировки ЭСКч (1 л): 820 мл среды Knock out DMEM, 150 мл заменителя сыворотки Knock out Serum Replacement, 10 мл 200 мМ L-глутамина, 10 мл Pen/Strep, 10 мл 10 мМ MEM и 55 мкМ 13-меркаптоэтанола.

Среда N2 для дифференцировки ЭСКч (1 л): 985 мл дистиллированной H₂O с порошком DMEM/F12, 1.55 г глюкозы (Sigma, № по каталогу G7021), 2.00 г бикарбоната натрия (Sigma, № по каталогу S5761), путресцин (аликвота объемом 100 мкл из раствора 1.61 грамм в 100 мл дистиллированной воды; Sigma, № по каталогу P5780), прогестерон (аликвота 20 мкл раствора 0.032 грамм в 100 мл 100% этанола; Sigma, № по каталогу P8783), селенит натрия (аликвоты объемом 60 0,5 мМ раствора в дистиллированной воде; Bioshop Canada, № по каталогу SEL888), и 100 мг трансферрина (Celtiance/Millipore, № по каталогу 4452-01), и 25 мг инсулина (Sigma, № по каталогу 16634) в 10 мл 5 мМ NaOH.

Среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM) с 10% ФБС для приготовления PMEF ((первичных мышинных эмбриональных фибробластов (PMEF)) - фидерных клеток) (1 л): 885 мл среды DMEM, 100 мл ФБС, 10 мл Pen/Strep и 5 мл L-глутамина.

Минимальная поддерживающая среда Alpha (MEM) с 10% ФБС для приготовления for среды для фидерных клеток MS-5 (1 л): 890 мл Alpha MEM, 100 мл ФБС, 10 мл раствора желатина с Pen/Strep (500 мл): растворяют 0,5 желатина в 500 мл теплой (50-60°C) воды Milli-Q. Охлаждают до комнатной температуры.

В целом, ниже приведен краткий обзор примеров методов мониторинга продукции зрелых ДА нейронов для использования для трансплантации (см. также условия, показанные в табл. 7. День 13 - это стадия вентральной пластинки, характеризующаяся одновременной экспрессией FOXA2/LMX1A.

В целом, ниже приведен краткий обзор примеров методов мониторинга продукции зрелых ДА нейронов для использования для трансплантации (см. также условия, показанные в табл. 7. День 13 - это стадия вентральной пластинки среднего мозга, характеризующаяся одновременной экспрессией FOXA2/LMX1A. В дополнение к экспрессии FOXA2 и LMX1A наблюдаются потеря экспрессии OCT4 и отсутствие индукции маркеров переднего мозга PAX6 и FOXG1. День 25 - это стадия предшественников ДА нейронов среднего мозга, характеризующаяся продолжающейся экспрессией FOXA2/LMX1A и экспрессией нейрональных (TUJ1) и ДА маркеров (NURR1, TH). В ходе пролиферации Ki67+ клеток наблюдают число предшественников нейронов среднего мозга PAX6 и FOXG1, где эти маркеры нежелательны. Для несмещенного и быстрого получения количественных данных иммунофлюоресценции использовали микроскоп Operetta High Content Microscope (Perkin Elmer). Для каждого маркера также осуществляли анализ методом кПЦР в реальном времени для подтверждения результатов иммунофлюоресцентного анализа. В некоторых вариантах реализации линии клеток (культуры), прошедшие эти предварительные in vitro тесты, используют для трансплантации, см. табл. 7. В некоторых вариантах реализа-

ции зрелые ДА нейроны на 25 день подвергали криоконсервации без сыворотки (в диапазоне от 20 до 25 дней) в культуральной среде+7% ДМСО (в диапазоне 3-12%) до размораживания для применения в трансплантации. В некоторых вариантах реализации образцы клеток хранят в жидком азоте. В некоторых вариантах реализации клетки хранят в холодильниках с низкой температурой. В других вариантах реализации предусмотрено применение криопротекторов, таких как миоинозитол, поливиниловый спирт, заменитель сыворотки, ингибиторы каспазы, в дополнение к ДМСО. После размораживания исследовали клетки перед трансплантацией на жизнеспособность, экспрессию маркеров и т.д. В некоторых вариантах реализации размороженные клетки исследовали на сохранение функции в продолжительных *in vitro* и *in vivo* тестах для мониторинга условий замораживания и хранения.

В. Исследования, направленные на выявление дополнительных факторов для получения функциональных ДА нейронов. Предусмотрены дополнительные эксперименты по "исключению" и "включению" для компонентов тканевой культуры для применения в получении клеток в соответствии с настоящими изобретениями. Например, было показано, что хотя применение FGF8 приводило к получению клеток в соответствии с настоящими изобретениями, он не был обязательным компонентом для получения этих клеток. Эти эксперименты будут продолжены с дополнительными реагентами, например, с теми, которые приведены в табл. 8, которые могут служить добавками к культурам клеток в дополнение к четырем "основным" молекулам, которые обеспечивали получение ДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями, т.е. i) ингибитору Alk4/5/7 ("TGF β -") (SB431542), ii) ингибитору Alk2/3 ("BMP") (LDN-193189), iii) агонисту Smoothed ("SHH") (Пурморфамин) и iv) ингибитору GSK3 β - (CHIR99021).

Как описано здесь, применение SB431542 и LDN193189 продемонстрировало эффективное превращение плюрипотентных стволовых клеток, а добавление пурморфамин и CHIR99021 к этим клеткам продемонстрировало индукцию вентральной пластинки среднего мозга. Другие химические соединения и белки использовались или могут использоваться для обеспечения долговременной трофической поддержки и/или ускоренной дифференцировки. Некоторые из этих соединений будут использоваться в дальнейших тестах для определения их роли в описанной здесь дифференцировке клеток.

Для этих экспериментов поведение других соединений будет сравниваться по типичным ограничениям для дифференцировки ДА нейронов (табл. 7) с применением 4 основных факторов (табл. 8).

Эти типы экспериментов предназначены для определения минимального числа факторов, необходимых для получения аутентичных ДА нервных клеток в соответствии с настоящими изобретениями.

С. Реализация для получения кривых доза-ответ для потенциально способных пролиферации примесей (плюрипотентных ЭСКч, розеткоподобных структур нейронов). В ходе развития в соответствии с настоящими изобретениями, образование тератом или избыточный повышенный рост в трансплантате отсутствовали в течение по меньшей мере 5 месяцев выживания *in vivo*. Для мониторинга безопасности в исследованиях большей продолжительности, направленных на установление предполагаемой способности трансплантата к продолжительному существованию в организме человека, изучают пороговое число клеток для определения клинически значимого предела содержания примесных проблемных типов клеток, таких как недифференцированные ЭСКч, которые могут развиваться в тератомы или примитивные нейроэктодермальные предшественники, способные к значительной пролиферации. Соответственно, некоторые варианты реализации предназначены для обогащения клеток для применения в трансплантации дофаминергическими нейронами, т.е. снижения содержания примесных типов клеток перед трансплантацией, см., например, табл. 7, где приведены примеры ограничений.

Ниже приведен пример стандартизированного выбора в тестах для улучшения стратегий валидации. В случае ЭСКс, заранее определенная смесь недифференцированных (Oct4+/Nanog+) клеток с полученными из ЭСч ДА нейронами будет применяться для отслеживания клинических симптомов, указывающих на масс-эффект и/или гибель животного, в экспериментах с животными. Будут выполняться измерения ответа на дозу для одной ЭС клетки человека на 10000 полученных из ЭСКч ДА нейроны, 1/5000, 1/1000 и 1/100. Клетки будут вводить в стриатум и животных будут подвергать иммуноподавляющей обработке. За крысами будут тщательно следить и умертвят после проявления неврологических симптомов или не позднее, чем через 6 месяцев. Мозги будут исследовать на объем и состав трансплантата, как описано в настоящем тексте. Соотношения клеток будут корректировать пока не будет установлен явный порог для образования тератом *in vivo*. Для определения мешающих уровней примитивных нейроэктодермальных предшественников будет использоваться аналогичная стратегия. Присутствие ранних нейрональных предшественников связано со значительным потенциалом для пролиферации и широким спектром дифференцировки по пути центральной нервной системы, а также по пути периферической нервной системы (ПНС). Исследование трансплантата будет заключаться ИГХ анализа клеток розеткоподобных структур (экспрессия PLZF), их потомства в ЦНС (нейрональных предшественников, экспрессирующих Nestin/Sox2 или предшественников переднего мозга, экспрессирующих FoxG1), а также объемов трансплантатов и коэффициентов пролиферации (% Ki67+ от общего числа выживших клеток).

IV. Болезнь Паркинсона.

Болезнь Паркинсона (БП) является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием; согласно оценкам им страдают 4,1-4,6 миллиона пациентов в мире, и согласно предсказанием эта

цифра удвоится к 2030. Это заболевание является вторым по распространенности после болезни Альцгеймера, им страдает приблизительно 1 миллион пациентов в США, и этот диагноз ставят еще 60000 пациентам каждый год. Данное заболевание несет серьезную социально-экономическую нагрузку и связано с высокой смертностью и опасностью для пациентов, объединенные прямые и косвенные затраты, связанные с БП, включая затраты на здравоохранение и потерю дохода оцениваются приблизительно в \$25 миллиардов в год только в США. С настоящее время не существует средства лечения болезни Паркинсона (БП), являющейся возрастным, прогрессирующим заболеванием, приводящим к потере трудоспособности. Патогенез болезни Паркинсона характеризуется выборочной потерей ДА нейронов в черной субстанции. Соответственно, основной характеристикой БП является прогрессирующая, тяжелая и необратимая потеря дофаминовых (ДА) нейронов, приводящая в итоге двигательной дисфункции, в конечном итоге ведущей к утрате трудоспособности. Несмотря на то, что были разработаны фармакологические, основанные на упражнениях и хирургические средства лечения БП, ни один из этих подходов не обеспечивает адекватное восстановление функции ДА нейронов. Долгосрочное управление двигательными симптомами у пациентов часто остается субоптимальным, и, несмотря на понимание важности прогрессирующих не реагирующих на дофамин двигательных и не двигательных симптомов, фундаментальная проблема долгосрочного управления реагирующими на дофамин симптомами по-прежнему представляет собой область настоятельной терапевтической потребности. При БП обнаруживаются многочисленные патологии, поражающие как центральную, так и периферическую нервную систему, основные признаки БП (брадикинезия, ригидность и частично тремор) глубоко связаны с потерей ДА нейрональных клеток и реагируют на дофамин. Соответственно, предусмотрено лечение БП с применением замещения нейрональных клеток ввиду достаточно селективной потери ДА нейронов среднего мозга, отвечающей за большинство двигательных симптомов указанного заболевания. В головном мозге здорового человека содержится приблизительно 1 млн ДА нейронов. Соответственно, в одном варианте реализации предусмотрено, что для замещения ДА нейронов требуется относительно незначительное число выживших клеток по сравнению с большинством других расстройств в ЦНС.

Одна из проблем при разработке клеточной терапии БП заключалась в идентификации подходящего источника клеток для применения при замещении нейронов. Указанный поиск продолжался более 30 лет, и были предложены многие потенциальные источники для замещения ДА нейронов (Kriks, Protocols for generating ES cell-derived dopamine neurons in Development and engineering of dopamine neurons (eds. Pasterkamp, R.J. Smidt, & Burbach) (Landes Biosciences, 2008; Fitzpatrick, et al., *Antioxid. Redox. Signal.* 11:2189-2208 (2009)). В прошлом некоторые из указанных источников были доведены до ранних стадий клинических испытаний, в том числе катехоламинергические клетки мозгового вещества надпочечников, Madrazo, et al., *N. Engl. J. Med.* 316, 831-834 (1987), трансплантаты каротидного тельца (Arjona, et al., *Neurosurgery* 53: 321-328 (2003)) или инкапсулированные клетки пигментного эпителия сетчатки (исследование сферамина, Bakay, et al., *Front Biosci.* 9, 592-602 (2004). Однако указанные испытания в большинстве своем не показывали клинической эффективности и приводили к неудовлетворительному долгосрочному выживанию и низким уровням высвобождения ДА из привитых клеток. Другой подход заключался в трансплантации ДА нейронов фетального среднего мозга, проведенной более чем у 300 пациентов в мире (Brundin, et al., *Prog. Brain Res.* 184, 265-294 (2010); Lindvall, & Kokaia, *J. Clin. Invest* 120:29-40 (2010). При терапии с применением фетальной ткани человека у указанных пациентов наблюдались признаки, свидетельствующие о выживании ДА нейронов, и высвобождение ДА *in vivo* в течение до 10 или 20 лет после трансплантации у некоторых пациентов. Однако у многих пациентов трансплантация фетальной ткани не обеспечивала замещения функции ДА нейронов. Кроме того, при трансплантации фетальной ткани возникает ряд проблем, в том числе малое количество и низкое качество донорной ткани, этические и практические сложности, связанные с получением ткани, и недостаточно охарактеризованная гетерогенная природа трансплантируемых клеток; указанные проблемы относятся к факторам, вносящим вклад в вариабельность клинических исходов. Примеры фетальной трансплантации описаны в источниках: Mendez, et al. *Nature Med.*(2008)); Kordower, et al. *N. Engl. J. Med.* 332:1118-1124 (1995); Piccini, et al. *Nature Neuroscience* 2:1137-1140 (1999). Однако к указанным клиническим результатам прибавились определенные позитивные результаты ранних открытых исследований (Lindvall, et al. *Science* 247:574-577 (1990); Widner, et al. *N. Engl. J. Med.* 327:1556-1563 (1992); Brundin, et al. *Brain* 123:1380-1390 (2000); Freed, et al. *N. Engl. J. Med.* 327:1549-1555 (1992); Freeman, et al. *Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. Ann Neurol* 38:379-388 (1995). Однако в ходе двух более крупных спонсированных НИИ (Национальными институтами здравоохранения) плацебо-контролируемых клинических испытаний в США были получены скромные результаты (Freed, et al. *N. Engl. J. Med.* 344, 710-719 (2001); Olanow, et al. *Ann. Neurol.* 54:403-414 (2003)). Существует множество гипотез относительно ограниченной эффективности, наблюдаемой в ходе испытаний фетальной пересадки у человека, в том числе гипотеза о том, что фетальная пересадка может не обеспечивать достаточного количества клеток, находящихся на надлежащей стадии развития для оптимального благоприятного терапевтического эффекта. Кроме того, фетальная ткань довольно плохо характеризуется в отношении клеточных типов и отличается вариабельностью стадий и качества для каждого из образцов ткани Bjorklund, et al. *Lancet Neurol.* 2, 437-445 (2003). Другим вносящим вклад фактором может быть вялоте-

кущий воспалительный ответ на трансплантат у хозяина (Bjorklund, et al. Lancet Neurol. 2, 437-445 (2003)).

И напротив, предполагается, что применение источника клеток, происходящего из стволовых клеток, или другого типа совместимых клеток для получения клеток для трансплантации позволит преодолеть многие из проблем, ассоциированных с пересадкой фетальной ткани, и обеспечить неограниченный источник ДА нейронов на оптимальной стадии для трансплантации. После почти 20 лет предпринимаемых попыток использования различных потенциальных источников стволовых клеток авторы настоящего изобретения преуспели в получении аутентичных ДА нейронов среднего мозга человека из плюрипотентных стволовых клеток, способных обращать вспять неврологические дефекты у мышей и приматов. Указанная новая стратегия дифференцировки была высокоэффективной и приводила к устойчивому приживлению трансплантата клеток *in vivo*, индукции функционального восстановления при БП в моделях заболевания и отсутствию нежелательных явлений, таких как неадекватная пролиферация клеток, о чем свидетельствуют доклинические данные. Предполагается, что стратегия лечения БП на основе ЭС-клеток человека может получить одобрение FDA, поскольку FDA было одобрено тестирование других производных ЭС-клеток человека при повреждении спинного мозга (Strauss, Nat. Biotechnol. 28:989-990 (2010) и макулярной дегенерации (Schwartz, et al. Lancet 379:713-720 (2012)).

Предусмотрены дополнительные варианты реализации, включающие стратегии "усовершенствования" для контроля чистоты клеток, содействия разрастанию аксональных волокон, а также включающие новые характеристики безопасности/регуляторные функции стратегий пересадки. Например, в некоторых вариантах реализации продемонстрирован способ очищения клеток, начиная от простого скрининга на поверхностный маркер представляющего интерес типа клеток (такой как CD142) до целенаправленной стратегии обогащения по специфическому типу нейронов. В некоторых вариантах реализации предусмотрено применение указанного способа при получении клеток для применения у человека. Кроме того, в других вариантах реализации предусмотрена сконструированная экспрессия PSA-NCAM для усиления аксонального разрастания для применения при восстановлении нервной ткани *in vivo*. Такое применение включает стимуляцию дистанционного аксонального роста для лечения болезни двигательных нейронов, болезни Гентингтона или других расстройств, в первую очередь, влияющих на проекционные нейроны. Предусмотрены дополнительные варианты реализации соответствующего стандартам надлежащей производственной практики (GMP) источника плюрипотентных клеток, и т.п. Поскольку для трансплантации с применением способов, описанных в настоящем документе, требуется небольшое число ДА нейронов, и они основаны на относительно простых, экономически эффективных способах с использованием малых молекул, разработанных для индукции ДА нейронов, подразумевается, что стоимость заместительной терапии ДА нейронами в пересчете на пациента будет разумной. Одно из потенциальных биологических ограничений подхода с трансплантацией при БП заключается в том факте, что дегенерация нейронов при БП распространяется на многие типы клеток помимо дофаминовых нейронов среднего мозга, в частности, на поздних стадиях указанного заболевания. Фактически, при долгосрочном исследовании на поздних стадиях БП преобладают не реагирующие на ДА симптомы, приводящие к дисфагии, падениям, деменции и другим значимым патологическим проявлениям. Однако при восстановлении дофаминергической функции предположительно могут улучшаться некоторые двигательные симптомы. Кроме того, предполагается, что применение происходящих из чЭСК ДА нейронов на ранних стадиях указанного заболевания может предотвращать некоторые из вторичных симптомов БП, в том числе дегенерацию восприимчивых к дофамину популяций стриатума. Однако даже в отсутствие влияния не реагирующих на ДА симптомов указанного заболевания долгосрочное функциональное дофаминергическое восстановление стриатума может представлять собой значительное достижение в рамках лечения указанного, в настоящее время неизлечимого, расстройства. В случае болезни Паркинсона существует несколько альтернативных доступных вариантов терапии, в том числе стратегии на основе применения лекарственных средств и хирургические подходы, такие как глубокая стимуляция головного мозга. Предполагается, что в некоторых вариантах реализации эффективность восстановления будет сопоставима с уровнями, достигаемыми при применении альтернативных вариантов терапии, или будет выше указанных уровней. Предполагается, что в других вариантах реализации применение терапии с трансплантацией указанных зрелых ДА нейрональных клеток будет, в частности, благоприятным для конкретной подгруппы пациентов. В других вариантах реализации предполагается применение указанной терапии с трансплантацией зрелых ДА нейрональных клеток в дополнение к существующим подходам с использованием лекарственных средств и хирургии. Одно значимое преимущество применения терапии с трансплантацией зрелых ДА нейрональных клеток в соответствии с настоящими изобретениями состоит в уникальной неировосстановительной природе посттрансплантационного периода, а именно, долгосрочном восстановлении нейрональной функции, что предполагается использовать у пациентов при постепенном снятии лекарственной терапии. Трансплантация клеток предположительно влияет на спектр связанных с ДА симптомов, отличающийся от отвечающего на лекарственные средства или другую терапию. Соответственно, в одном варианте реализации предусмотрено применение трансплантации зрелых ДА нейронов с глубокой стимуляцией головного мозга (DBS). Согласно другому варианту реализации предусмотрено применение трансплантации зрелых ДА нейронов с терапией.

А) Болезнь Паркинсона и современные варианты терапии. Значительный прогресс был достигнут в идентификации редких генетических изменений, вносящих вклад в семейные формы БП. Однако в большинстве случаев БП вклад какой-либо потенциальной генетической предрасположенности остается неясным. Традиционные терапевтические стратегии при БП ограничены тем фактом, что к началу клинических симптомов 30-70% всех ДА нейронов черной субстанции необратимо деградируют. Одна из терапевтических опций заключается в фармакологическом замещении дефицита ДА нейронов с применением предшественника ДА L-ДОФА. Однако, несмотря на ярко выраженный начальный ответ на терапию L-ДОФА у некоторых БП-пациентов, долгосрочный клинический исход остается неудовлетворительным, и на поздних стадиях заболевания часто наблюдаются серьезные побочные эффекты терапии L-ДОФА, в том числе двигательные флуктуации и дискинезии. Пульсирующая доставка L-ДОФА играет основную роль в развитии указанных двигательных осложнений на поздних стадиях, соответственно, более "плавная" и более физиологическая доставка дофамина, т.е., например, из трансплантированных клеток в соответствии с настоящими изобретениями, соответственно, была бы очень желательной. Помимо фармакологических стратегий, существует несколько хирургических вариантов лечения. Указанные варианты включают абляцию или функциональную инактивацию клеток в базальных ганглиях посредством паллидотомии, или глубокой стимуляции головного мозга путем нацеленного воздействия на субталамическое ядро или внутреннюю часть бледного шара. Хотя указанные хирургические опции являются альтернативой для некоторых пациентов, они обеспечивают облегчение симптомов заболевания, но не восстанавливают нормальную ДА-функцию. Кроме того, сообщалось о побочных эффектах хирургического и нехирургического лечения, в том числе неправильное функционирование, инфекции, инсульт, кровотечение и т.п. Другие варианты лечения включают доставку факторов роста, таких как ГНТФ или нейротурин, с применением прямой внутривнутрипаренхимной инфузии или вирусной экспрессии путем генной терапии. Хотя начальные открытые исследования при БП продемонстрировали многообещающие результаты для ГНТФ, последующие контролируемые испытания на большей группе пациентов не подтвердили какого-либо преимущества и указали на потенциальную угрозу безопасности из-за продуцирования антител против ГНТФ у подгруппы пациентов. При доставке нейротурина, молекулы, связанной с ГНТФ, на основе AAV (аденоассоциированного вируса) также не показала какого-либо значимого клинического преимущества в масштабном плацебо-контролируемом многоцентровом исследовании. Недавно появились предварительные результаты исследования фазы 2 инъекций происходящей из AAV декарбоксилазы глутаминовой кислоты (GAD) в субталамическое ядро (Lancet Neurology, апрель 2011 г.), однако, клинические преимущества в указанном исследовании были в лучшем случае умеренными. Хотя попытки использования стратегий на основе нейротрофических факторов или альтернативных нейропротекторных стратегий могут приносить пациентам временное облегчение, ни одна из указанных стратегий не способна вернуть /заместить ДА нейроны, уже утраченные в результате заболевания, что является главной целью клеточной заместительной терапии.

В. Клеточная терапия при БП. Клинические симптомы при БП становятся очевидными после потери 70-80% дофаминовых нейронов стриатума и приблизительно 50% дофаминовых нейронов черной субстанции. Однако дофаминовые нейроны среднего мозга развиваются к 8,5 неделям после зачатия, при этом убедительные данные о замещении дофаминовых нейронов на протяжении жизни отсутствуют. Соответственно, возраст дофаминовых нейронов к моменту начала заболевания составляет несколько десятилетий, и естественный механизм замещения указанных клеток отсутствует, соответственно, для замещения указанных клеток в головном мозге БП-пациентов может быть необходима трансплантация клеток. Замещение ДА нейронов при БП проводили в 1980-х годах, используя происходящие из мозгового вещества надпочечников хромаффинные клетки. Указанные гормонпродуцирующие клетки, как было показано, переключают нейротрансмиттерный фенотип с адреналина на ДА при эктопическом введении в ЦНС. Пересадка с применением указанного подхода была проведена у нескольких сотен БП-пациентов по всему миру, однако со временем выяснилось, что выживаемость пересаженных клеток была крайне неудовлетворительной, и они обеспечивали в лучшем случае временный эффект. Соответственно, от клинического применения указанного подхода в скором времени отказались. Напротив, применение пересадки фетальной ткани среднего мозга было основано на более интенсивных доклинических исследованиях в моделях на грызунах, продемонстрировавших устойчивое долгосрочное приживление трансплантатов и функциональное улучшение в панели связанных с ДА поведенческих анализов. Указанные доклинические данные послужили стимулом для продолжения проведения фетальной пересадки в нескольких центрах в конце 1980-х - начале 1990-х г. Указанные исследования ясно показали, что функциональное долгосрочное приживление трансплантата с увеличенным высвобождением ДА в области пересадки по оценке с применением ПЭТ с флюородопа и последующих гистологических исследований для некоторых пациентов, смерть которых наступила по независимым причинам. Однако при применении фетальных трансплантатов возникают две потенциальные проблемы, связанные с методами клеточной терапии. Первая неожиданная проблема при применении фетальных трансплантатов заключалась в индукции индуцированных трансплантатом дискинезий (GID) у приблизительно 15% пациентов. Хотя механизм GID остается спорным, недавно полученные данные свидетельствуют о том, что серотонинергические нейроны способны к неадекватному накоплению и высвобождению ДА. Другой потенциальный

механизм, предложенный для объяснения GID, заключается в неравномерности распределения ДА нейронов, приводящей, соответственно, к образованию "горячих точек" высвобождения ДА. Однако при разработке настоящих изобретений были открыты способы детекции и уменьшения количества серотонинергических нейронов, которые могут обеспечить снижение частоты GID. Кроме того, инъектирование зрелых ДА нейронов может обеспечить равномерное распределение зрелых нейронов, в том числе распространение окончаний дофаминергических волокон в стриатуме хозяина. Другая проблема при лечении с применением фетальной пересадки заключалась (и заключается) в ограниченной доступности фетальной ткани среднего мозга на подходящей стадии развития. В клинике была опробована альтернативная стратегия для решения проблемы ограниченности ресурсов путем применения фетальных ДА нейронов свиньи. Однако выживание ДА нейронов в указанных ксенотрансплантатах было неудовлетворительным и от указанного подхода отказались полностью. Недавнее исследование с применением пигментного эпителия сетчатки также не показало каких-либо преимуществ. Напротив, применение ЭС-клеток человека в качестве источников трансплантируемых клеток предположительно обеспечит неограниченный источник клеток для получения дофаминовых нейронов для применения при трансплантации.

V. Были открыты соединения и способы культивирования для направленной дифференцировки FOXA2+ и LMX1A+ положительных клеток-предшественников нейронов в ДА нейроны среднего мозга (нейроны мезенцефалона, мДА) в соответствии с настоящими изобретениями.

При разработке настоящих изобретений авторы обнаружили, что временные характеристики воздействия CHIR99021 определяют индукцию FOXA2/LMX1A-предшественников вентральной пластинки среднего мозга. Соответственно, авторы настоящего изобретения проводили тестирование путем иммуноцитохимического анализа FOXA2/LMX1A на 11 день дифференцировки после LSB/S/F8 (т.е. обработки клеток LSB, S, т.е. SHH, и обработки FGF8 (F8) по отдельности или в комбинации с CHIR, с началом в различных точках времени: d0-d11 (дни 0-11), d1-d11, d3-d11, d5-d11, d7-d11 по сравнению с культурами клеток без обработки CHIR в двух повторностях. Затем проводили количественное определение процента FOXA2+, LMX1A+ и клеток с двумя метками на день 11 дифференцировки после дифференциального начала воздействия CHIR согласно описанию иммуноцитохимического анализа.

A. CHIR99021 (C) представляет собой фактор индукции FOXA2+/LMX1A+ клеток на 11 день из культивированных с LSB клеток, приведенных в контакт с активатором Hedgehog и пурморфамином. В примере ниже описано применение иллюстративных способов для тестирования эффективности каждого соединения для индукции направленной нейрональной дифференцировки мДА нейронов.

В этом примере описано обнаружение малых молекул и временных характеристик контакта для обеспечения направленной дифференцировки FOXA2+/LMX1A+ ДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями. Ниже представлено краткое описание некоторых из экспериментальных открытий, описанных в настоящем документе: При обработке клеток с двойным ингибированием SMAD антагонистами SHH (пурморфамин + SHH) и FGF8 (S/F8) в отсутствие CHIR99021 наблюдалась значимо более низкая экспрессия FOXA2 на 11 день и полное отсутствие экспрессии LMX1A (фиг. 1a, b). Стабильная индукция антиерального маркера OTX2 происходила в обработанных LSB и LSB/S/F8/CHIR культурах, однако не в условиях с LSB (фиг. 1a,c). Авторы настоящего изобретения выбирали популяцию клеток, содержащую плюрипотентные клетки, в качестве стартовой популяции, и высевали на 0 день. Клетки культивировали до достижения предконфлюентности до дифференцировки (60-100% конфлюентности). Указанные клетки приводили в контакт с двойными ингибиторами SMAD (т.е. воздействовали LDN-193189+SB431542="LSB") на 0 день. Авторы настоящего изобретения продолжали наблюдение за популяцией клеток при регулярной подкормке, содержащей свежий LSB, до 11 дня, и обнаружили, что некоторые оставшиеся клетки представляли собой клетки LMX1A+, однако, не экспрессировали FOXA2 (фиг. 1a, b). Авторы настоящего изобретения высевали в двух повторностях стартовые популяции клеток, затем проводили тестирование на типы клеток (т.е. паттерны экспрессии генов/белков) после приведения в контакт со смесями, содержащими любые из следующих агонистов SHH (пурморфамин+SHH), и приведения в контакт с FGF8 (S/F8), с использованием разных схем воздействия, т.е. приведение клеток в контакт на 0 день, или 1 день, или 2 день и т.д., на протяжении определенного времени, т.е. 24 ч, 48 ч и т.д. Три протестированных варианта примеров условий первичного культивирования приведены ниже: 1) клетки приводили в контакт с LDN/SB (LSB) на 0 день, затем приводили в контакт со свежим LSB до 5 дня, на 5 день клетки приводили в контакт со свежим LDN без SB до 11 дня, 2) клетки приводили в контакт с LDN/SB (LSB) на 0 день, затем приводили в контакт со свежим LSB до дня 5, на день 5 клетки приводили в контакт со свежим LDN без SB до 11 дня, при этом в течение указанного периода клетки дополнительно приводили в контакт со свежим пурморфамином, SHH и FGF8 до 7 дня и 3) клетки приводили в контакт с LDN/SB (LSB) на 0 день, затем приводили в контакт со свежим LSB до 5 дня, на 5 день клетки приводили в контакт со свежим LDN без SB до 11 дня, при этом в течение указанного периода клетки дополнительно приводили в контакт со свежим пурморфамином, SHH и FGF8 до 7 дня, и дополнительно приводили в контакт со свежим CHIR, начиная с 3 дня культивирования и до 11 дня, с несколько варьирующими указанными первичными условиями для определения оптимального выхода типов клеток. B. Определение сравнительных характеристик *in vitro* FOXA2+/LMX1A+ клеток, происходящих из области вентральной пластинки среднего мозга и предшественников ДА клеток, полученных с

применением других техник. Систематическое сравнение трех вариантов условий культивирования (фиг. 1d) выполняли с применением глобального временного профилирования генной экспрессии. При иерархической кластеризации дифференциально экспрессируемых генов три варианта обработки разделялись к 11 дню дифференцировки (фиг. 8a). FOXA1, FOXA2 и ряд других нижерасположенных мишеней SHN, в том числе, PTCN1 входили в число большинства дифференциально регулируемых транскриптов в наборах данных для обработки LSB/S/F8/CHIR либо LSB (фиг. 1e). Экспрессия LMX1A, NGN2 и DDC указывала на определение направления дифференцировки предшественников ДА нейронов среднего мозга уже к 11 дню (фиг. 1e, f). Напротив, культуры с LSB были обогащены маркерами предшественников дорсальной части переднего мозга, такими как HES5, PAX6, LHX2 и EMX2. Прямое сравнение обработки LSB/S/F8/CHIR с обработкой LSB/S/F8 (фиг. 1f) подтверждает селективное обогащение по маркерам предшественников ДА нейронов среднего мозга в группе LSB/S/F8/CHIR и свидетельствует о наличии гипоталамических предшественников в обработанных LSB/S/F8 культурах на основании дифференциальной экспрессии RAX1, SIX3 и SIX6 (см. также фиг. 2D, ниже: экспрессия POMC, OTP). Приведен иллюстративный перечень дифференциально экспрессируемых транскриптов, см. табл. 1, 2; онтологический анализ генов для 11 дня, фиг. 8b (DAVID; <http://david.abcc.ncifcrf.gov>), подтвердил обогащение по компонентам канонической WNT-сигнализации при обработке CHIR. Исходные данные пока недоступны (GEO, worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov/geo/, № доступа подлежит уточнению). Сравнительный временной анализ генной экспрессии маркеров предшественников ДА нейронов среднего мозга (фиг. 1g) и маркеров направления дифференцировки в антериальные и вентральные клетки, не являющиеся ДА нейронами (фиг. 1h), позволяет разделить три варианта условий индукции следующим образом: i) LSB: характеристики дорсальной части переднего мозга; ii) LSB/S/F8: характеристики вентральной / гипоталамической части и iii) LSB/S/F8/CHIR: характеристики предшественников ДА нейронов среднего мозга.

VI. Дальнейшая дифференцировка FOXA2+/LMX1A+ клеток 11 дня в ДА нейроны среднего мозга к 25 дню и поддержание до 65 дня.

Для дальнейшей дифференцировки FOXA2+/LMX1A+ клетки-предшественники поддерживали в среде, стимулирующей созревание нейронов (BAGCT, см. пример I). Для сравнения применяли две другие методики получения клеток-предшественников ДА нейронов. Были осуществлены следующие типы сравнений между популяциями дифференцированных клеток, полученных с использованием разработанных ранее способов и способов в соответствии с настоящими изобретениями: А) иммуногистохимический анализ на 50 день дифференцировки в ТН в комбинации с LMX1A, FOXA2 и NURR1, В) Определение количества ТН+, FOXA2+, LMX1+ и NURR1+ клеток от общего числа клеток для культур, полученных из розеток, в сравнении с культурами, полученными из вентральной пластинки (LSB/S/F8/CHIR). С) определение процентной доли положительных по серотонину (5-HT+) и ГАМК+ подтипов нейронов (примеси, отличные от ДА нейронов) на 50 день в культурах ДА нейронов, полученных из розеток. И D) ВЭЖХ-анализ для измерения количества дофамина и метаболитов. Сравнение уровней ДА, DOPAC (диоксифенилуксусной кислоты) и HVA (гомованилиновой кислоты) между культурами, полученными из вентральной пластинки и розеток. К 25 дню в трех популяциях клеток-предшественников формировались Tuj1+ нейроны (фиг. 2A) и клетки, экспрессирующие ТН, ограничивающий скорость фермент при синтезе ДА. Однако обработка LSB/S/F8/CHIR давала ТН+ клетки, коэкспрессирующие LMX1A и FOXA2 и демонстрирующие выраженную индукцию ядерного рецептора NURR1 (NR4A2) (фиг. 2A, B). Сравнение генной экспрессии в культурах на 13 день и на 25 день подтвердило устойчивую индукцию других постмитотических маркеров ДА нейронов (фиг. 2C). Определение характеристик ДА нейронов на 25 день при сравнении обработанных LSB и LSB/S/F8 культур подтвердило обогащение известными транскриптами ДА нейронов среднего мозга и позволило идентифицировать несколько новых кандидатных маркеров (фиг. 2D, табл. 3-5, фиг. 8b). Например, в культурах LSB/S/F8/CHIR (группа ДА нейронов среднего мозга) наблюдалось наибольшее обогащение по транскрипту TTF3, гена, ранее не ассоциировавшегося с развитием ДА нейронов среднего мозга, однако, высокоэкспрессируемого в черной субстанции у человека (фиг. 8c; атлас головного мозга Allen Brain Atlas: <http://human.brain-map.org>).

Аналогичные данные были получены для EBF-1, EBF-3 (фиг. 8c), а также TTR, известной транскрипционной мишени FOXA2 в печени. Данные, полученные при разработке настоящих изобретений, указывают на обогащение по нескольким генам PITX в клетках-предшественниках ДА нейронов среднего мозга. PITX3, классический маркер ДА нейронов среднего мозга, также стабильно экспрессировался на 25 день дифференцировки (фиг. 2E). Наконец, индукция как вентральной пластинки среднего мозга, так и ДА нейронов может быть легко воспроизведена в независимых линиях чЭСК и чиПСК (фиг. 9). Продемонстрированные в настоящем документе данные показали, что протокол LSB/S/F8/CHIR, в отличие от других протестированных протоколов, обеспечивал получение клеток с профилем экспрессии маркеров, соответствующим направлению дифференцировки в ДА нейроны среднего мозга.

In vitro и in vivo свойства происходящих из вентральной пластинки ДА нейронов сравнивали со свойствами ДА-подобных нейронов, полученных из промежуточных клеток нейрональных розеток (фиг. 10 и 16). Формирование из нейрональных розеток представляет собой наиболее широко используемую в настоящее время стратегию получения ДА нейронов из чПСК. Оба протокола, на основе вентральных пластинок и на основе розеток, были эффективными для получения ТН+ нейронов, способных к долго-

срочному выживанию *in vitro* (50 день дифференцировки; фиг. 3(1)a). Однако процент TH+ клеток был значимо выше в происходящих из вентральной пластинки культурах (фиг. 3(1)b). Хотя в TH+ клетках при использовании обоих протоколов наблюдалась коэкспрессия NURR1, происходящие из вентральной пластинки ДА нейроны коэкспрессировали FOXA2 и LMX1A (фиг. 3(1)a, b и 3(2)).

Наблюдались немногочисленные ГАМК и положительные по серотонину (5-HT) нейроны (фиг. 3(1)c). ДА и его метаболиты DOPAC и HVA, присутствовали в культурах, полученных с применением любого из протоколов, однако, уровни ДА были приблизительно в 8 раз выше в культурах из вентральной пластинки (фиг. 3(1)d, e). ДА нейроны среднего мозга демонстрировали экстенсивное разрастание волокон и устойчивую экспрессию зрелых нейрональных маркеров, в том числе синапсина, транспортера дофамина (DAT), и сопряженного с G-белком калиевого канала внутреннего выпрямления (Kir3.2, также называемый GIRK2, экспрессируется в ДА нейронах компактной части черного вещества (SNpc)) (фиг. 3(1)f, 11). ДА нейроны SNpc *in vivo* демонстрируют электрофизиологический фенотип, отличающий их от большинства других нейронов в головном мозге. В частности, они спонтанно генерируют спайки на низкой частоте (1-3 Гц). Кроме того, указанные медленные спайки сопровождаются медленным подпороговым осциллирующим потенциалом. Через 2-3 недели *in vitro* те же указанные физиологические признаки демонстрируют культивированные ДА нейроны SNpc мышей в раннем постнатальном периоде. ДА нейроны, дифференцированные из чЭСК, стабильно (4/4 тестов) демонстрировали указанный отдельный физиологический фенотип (фиг. 3(1)g-i).

При поддержании мДА нейронов *in vitro* на 65 день (d65) наблюдались положительные по TH нейроны, по-прежнему экспрессирующие FoxA2 и образующие длинные волокна, типичные для мДА нейронов (фиг. 3(1)j). Измерение высвобождения ДА с помощью ВЭЖХ показало, что TH+ нейроны в возрасте d65 функциональны *in vitro* (фиг. 3(1)k).

В целом, нейрогенная конверсия предшественников вентральной пластинки среднего мозга и разработки оптимизированного протокола дифференцировки ДА нейронов среднего мозга из вентральной пластинки описаны в настоящем документе. Происходящие из вентральной пластинки ДА нейроны получали из ЭС-клеток человека, с применением основанной на малых молекулах активации SHN и канонической WNT-сигналикации на ранних стадиях дифференцировки (фиг. 3(2)). Указанные чЭС-клетки прогрессировали от двойной позитивной по FOXA2/LMX1A стадии вентральной пластинки среднего мозга в незрелые Tuj1+ нейроны с коэкспрессией FOXA2/LMX1A, и затем в зрелые ДА нейроны (фиг. 3(2)a, b), отличающиеся устойчивым высвобождением ДА и электрофизиологическими свойствами, характерными для ДА нейронов компактной части черного вещества (SNpc; A9-тип) среднего мозга, в том числе автономной пейсмейкерной активностью (фиг. 3(2)c). Неожиданным образом, этот способ был высокоэффективным, обеспечивая приобретение профиля маркеров зрелого среднего мозга более чем половиной клеток в культуральных чашках (см. фиг. 3(2)b).

VII. Определение характеристик происходящих из вентральной пластинки дофаминовых нейронов среднего мозга *in vivo* в качестве привитых нейронов.

В примере ниже описано применение иллюстративных способов в соответствии с настоящими изобретениями при терапевтическом замещении клеток. Одной из главных задач в данной области техники является возможность получения происходящих из чПСК ДА нейронов среднего мозга, способных к функциональному приживлению *in vivo* без риска избыточного разрастания нейронов или неадекватной дифференцировки в не являющиеся нейронами среднего мозга клетки или развития тератом. На основании исследований с трансплантацией фетальной ткани авторы настоящего изобретения предположили, что время выхода из клеточного цикла, для которого характерна экспрессия NURR1, может представлять собой подходящую стадию для пересадки (приблизительно 25 день дифференцировки, фиг. 2). Начальные исследования с применением клеток 25 дня у взрослых мышей без очаговых поражений продемонстрировали устойчивое выживание происходящих из чПСК FOXA2+/TH+ нейронов через 6 недель после трансплантации (фиг. 12). Тестировали долгосрочное выживание FOXA2+/TH+ клеток у хозяев с паркинсонизмом, не приводящее к избыточному разрастанию нейронов. С этой целью получали индуцированные 6-гидроксидофамином (6-OHDA) очаговые поражения (Tabar, et al. Nature Med. 14:379-381 (2008), цитируемый источник включен в настоящий текст путем ссылки) у мышей NOD-SCID с молчащим IL2Rgc, линии, эффективно поддерживающей выживание ксенотрансплантатов, с конкретной чувствительностью к воздействию редких опухолевых клеток (Quintana, et al. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. Nature 456:593-598 (2008), цитируемый источник включен в настоящий текст путем ссылки). Культуры как происходящих из вентральной пластинки, так и происходящих из розеток ДА нейронов прививали (150×103 клеток/животное) без предварительного очищения для обнаружения потенциальных загрязняющих клеток с высоким пролиферативным потенциалом. Через 4,5 месяцев после трансплантации полученных из вентральной пластинки ДА нейронов наблюдалась хорошо выраженная центральная часть трансплантата, состоящая из TH+ клеток, коэкспрессирующих FOXA2 и специфический маркер человека hNCAM (фиг. 4a-c). Функциональный анализ показал полное устранение индуцированного амфетамином вращательного поведения. Напротив, в происходящих из розеток нейрональных трансплантатах наблюдались немногочисленные TH+ нейроны, они не обеспечивали значимого уменьшения вращательного поведения (фиг. 4d), а также наблюдалось массивное избыточное

разрастание нейронов (объем трансплантата >20 мм³; фиг. 13). Интенсивное избыточное разрастание происходящих из розеток нейрональных клеток, использованных для пересадки, согласно описанию в настоящем документе, было сопоставимо с предыдущей работой группы изобретателей с происходящими из розеток ДА-трансплантатами (Kim, et al. *miR-371-3 Expression Predicts Neural Differentiation Propensity in Human Pluripotent Stem Cells*. *Cell Stem Cell* 8:695-706 (2011), цитируемый источник включен в настоящий текст путем ссылки) и др. (Hargus, et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:15921-15926 (2010), цитируемый источник включен в настоящий текст путем ссылки). Указанное избыточное разрастание было предположительно обусловлено более длительными периодами выживания (4,5 месяцев против 6 недель), отсутствия очищения с применением FACS перед трансплантацией и выбором в качестве хозяев мышей NOD-SCID с молчащим IL2R γ c. Число пролиферирующих Ki67+ клеток в полученных из вентральной пластинки трансплантатах было минимальным (<1% от общего количества клеток), тогда как в происходящих из розеток трансплантатах сохранились включения пролиферирующих предшественников нейронов. Избыточное разрастание нейронов, как полагают, вызвано наличием примитивных антериальных нейроэктодермальных клеток в составе трансплантата (Elkabatz, et al. *Genes Dev.* 22:152-165 (2008); Aubry, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:16707-16712 (2008), цитируемый источник включен в настоящий текст путем ссылки). Указанную гипотезу подтверждает экспрессия маркера переднего мозга FOXG1 в происходящих из розеток, но не в происходящих из вентральной пластинки трансплантатах. Незначительный процент астроглиальных клеток присутствовал как в происходящих из вентральной пластинки, так и в происходящих из розеток трансплантатах, хотя большинство GFAP+ клеток были отрицательными по маркерам человека, что указывает на происхождение от хозяина (фиг. 13).

Результаты для мышей NOD-SCID с молчащим IL2R γ c, описанные в настоящем документе, продемонстрировали устойчивое долгосрочное выживание FOXA2+/TH+ нейронов, полное обращение индуцированного амфетамином вращательного поведения и отсутствие каких-либо признаков избыточного разрастания нейронов. Однако некоторые из указанных исходов могут быть объяснены специфическим использованием мышей NOD-SCID с молчащим IL2R γ c. Для тестирования указанной гипотезы культуры полученных из вентральной пластинки ДА нейронов (250×103 клеток) трансплантировали взрослым крысам с очаговыми поражениями 6-ОНДА и фармакологически индуцированным циклоспорином А иммунодефицитом. Через пять месяцев после трансплантации выживание трансплантатов было устойчивым (фиг. 4e-h), в среднем более чем с 15000 TH+ клеток, коэкспрессирующих FOXA2 (фиг. 4g) и ядерный антиген человека (hNA) (фиг. 4e); волокна TH+/hNCAM+ выходили из центральной части трансплантата в окружающий стриатум хозяина (фиг. 4f). Помимо FOXA2, TH+ клетки экспрессировали маркеры ДА нейронов среднего мозга PITX3 и NURR1 (фиг. 4h-j). Поведенческие анализы показали полное устранение индуцированной амфетамином вращательной асимметрии, в отличие от подвергшихся ложной трансплантации животных, у которых не наблюдалось улучшений (фиг. 4k). У подвергшихся трансплантации животных также наблюдались улучшения в тесте с шаганием (фиг. 4l) для измерения акинезии передних конечностей, и в тесте с цилиндром (фиг. 4m) - в анализах, независимых от фармакологической стимуляции ДА-системы. Для ДА нейронов человека позднее начало восстановления (приблизительно через 3-4 месяца после трансплантации) является ожидаемым и зависит от скорости созревания *in vivo*, например, уровней экспрессии DAT (фиг. 4n). Присутствие TH+ клеток, экспрессирующих каналы Kir3.2 (GIRK2) или кальбиндин показывает, что в трансплантате присутствуют ДА нейроны как SNpc (A9), так и вентральной области покрышки (A10) (фиг. 4o, p). Как и у мышей (фиг. 13), среди клеток крыс серотонинергические и ГАМК-ергические клетки встречались редко (<1% от общего количества клеток), как и происходящие в основном от хозяина GFAP+ глиальные клетки (7% от общего количества клеток; (фиг. 14). При том, что в трансплантате было детектировано незначительное число положительных по серотонину нейронов, наблюдались отрицательные по hNCAM клетки, представлявшие собой, вероятно, происходящие от хозяина серотонинергические волокна (фиг. 14). При приживлении трансплантата происходящих из вентральной пластинки ДА нейронов у мышей, крыс и обезьян наблюдалось неожиданное восстановление нейрональной функции у видов грызунов и приматов. Анализы краткосрочной (6 недель) выживаемости были продлены для исследования неожиданной долгосрочной выживаемости до 5 месяцев после трансплантации в стриатум мышей-хозяев с очаговыми поражениями 6ОНДА и иммунной недостаточностью. Фактически, прямое сравнение традиционного способа получения ДА нейронов на основе розеток (Perrier, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 12543-8 (2004)) и нового протокола дифференцировки ДА нейронов на основе вентральных пластинок, описанного в настоящем документе, показало, что происходящие из вентральной пластинки ДА нейроны были способны обеспечивать долгосрочное приживление трансплантата ДА нейронов, в отличие от нейронов на основе розеток (фиг. 4a-c).

В частности, устойчивая индукция восстановления поведения у мышей с вращательным поведением, вызванным амфетаминами, у мышей с нанесенными соединением 6-ОН повреждениями после применения полученных из вентральной пластинки нейронов (fr, синяя линия) и полученных из розеток (красная линия) ДА нейронов (фиг. 4d) показала, что происходящие из вентральной пластинки нейроны обеспечивали более высокую степень восстановления. Мыши с трансплантированными ДА нейронами,

полученными из вентральной пластинки, продемонстрировали практически полное восстановление по амфетаминовой шкале. Животные с трансплантатами из полученных из розеток ДА нейронов продемонстрировали более низкое улучшение поведенческих симптомов, в некоторых случаях с течением времени восстанавливалось исходное высокое число поворотов.

В модели с использованием мышей с повреждениями, вызванными 6ОНДА, также обнаруживали устойчивое функционирование трансплантата. Крысы, в отличие от мышей с БП, позволяют проводить более сложные поведенческие тесты и исследовать выживание ДА нейронов в ксенографтных моделях после фармакологической иммуносупрессии (обработка, которая более близко имитирует протоколы трансплантации у человека). Прекрасное выживание трансплантата, свидетельство разрастания ДА-волокон и сохранение экспрессии специфических факторов транскрипции подтверждали долговременное выживание полученных из вентральной пластинки нейронов, экспрессирующих маркеры аутентичных ДА нейронов среднего мозга (фиг. 4е-ж). Ряд функциональных анализов продемонстрировал значительное улучшение как в тестах с лекарственно индуцированным поведением (индуцированное амфетаминами вращение), так и в тестах со спонтанным поведением (тесты с цилиндром и шаганием).

Приведенные здесь результаты продемонстрировали прекрасные выживаемость трансплантата и результаты, связанные с поведением, в двух независимых моделях на мышах. Однако количество ДА нейронов, необходимых для мыши или крысы, составляет малую долю количества клеток, необходимых для трансплантации приматам и людям. Для исследования масштабируемости этого протокола провели пилотные исследования по трансплантации на двух взрослых макаках резус с повреждениями, вызванными МРТР. Кроме того, вначале не было известно, сохраняют ли описанные здесь способы и клетки свою функцию у приматов; эта информация могла бы помочь реализовать применение этих способов и клеток у людей. Соответственно, проводили начальные исследования по меньшей мере на двух обезьянах для исследования краткосрочного (4-6 недель) выживания *in vivo* и сохранения фенотипа ДА нейронов среднего мозга в мозге приматов. Описанные здесь исследования продемонстрировали устойчивое выживание ТН/FOXA2-положительных ДА нейронов и указывали на реиннервацию стриатума реципиентов (фиг. 4q-t). Трансплантация большего количества клеток, близкого к диапазону значений, необходимому для будущих исследований на людях, демонстрировали устойчивое выживание ДА нейронов среднего мозга. В дополнение к этим результатам краткосрочных исследований, был проведен ряд более долгосрочных исследований на макаках-резус, в которых оценивали выживание клеток в течение 3 месяцев и оптимизированный режим иммуносупрессии с ежедневным введением препаратов селлсепт, програф и преднизон ежедневно (использовавшихся как тройная терапия в комбинации). Неожиданно было обнаружено устойчивое выживание полученных из ЭС клеток ДА нейронов среднего мозга в мозге приматов, а также значительно сниженная воспалительная реакция реципиента на трансплантаты по сравнению с выраженной реакцией микроглии реципиента, наблюдавшейся в исходном исследовании по трансплантации (см. фиг. 15).

В частности, способы, связанные с исследованиями на обезьянах, включали партии, содержащие 50×10^6 трансплантируемых предшественников ДА нейронов, полученных на 25 день дифференцировки с применением протокола, основанного на использовании вентральной пластинки. Классическая доза составляла 3 мг МРТР-НCL, инъектируемых в сонную артерию (диапазон 0,5-5 мг). За этим следовала системная инъекция 0,2 мг/кг МРТР в/в. Клетки инъектировали в три участка (задний отдел хвостатого ядра и прекомиссуральную часть скорлупы) с каждой стороны головного мозга (в общей сложности в 6 трактов, $1,25 \times 10^6$ клеток/тракт), и иммунитет животных подавляли циклоспорином-А. С одной стороны головного мозга инъектировали ДА-предшественники из экспрессирующего GFP субклона Н9, тогда как с другой стороны прививали клетки, происходящие из немеченых клеток Н9. Результаты, демонстрирующие приживление трансплантата нейронов у макак-резус с продолжением экспрессии FOX2A и продуцирования ТН показаны на фиг. 4q-t. Через месяц после трансплантации наблюдалось устойчивое выживание ДА нейронов среднего мозга по оценке на основании экспрессии GFP (фиг. 15) и специфического цитоплазматического маркера человека (SC-121) (фиг. 4q). Центральную часть каждого трансплантата окружал ореол ТН+ волокон, выходящих на расстояние до 3 мм в организм хозяина (фиг. 4r). Центральная часть трансплантатов состояла из ТН+ нейронов, коэкспрессирующих SC-121 (фиг. 4s) и FOXA2 (фиг. 4t). Отрицательные по SC-121 и GFP области в составе трансплантата содержали Iba1+ микроглию хозяина (фиг. 15), что указывает на неполное подавление иммунитета.

Таким образом, показано приживление трансплантата новой популяции ДА нейрональных клеток у приматов, т.е. у взрослых макаков-резус с очаговыми поражениями МРТР (3 мг МРТР-НCL (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; диапазон концентраций 0,5-5 мг МРТР-НCL) с серьезной, более чем 95% потерей эндогенных ДА нейронов среднего мозга. Воздействие МРТР вызывало поддающиеся наблюдению изменения и симптомы, аналогичные таковым при болезни Паркинсона у человека.

Таким образом, был обнаружен новый протокол дифференцировки чПСК на основе вентральной пластинки, обеспечивающий точное воспроизведение развития ДА нейронов среднего мозга. Доступность клеток, обладающих основными признаками ДА нейронов среднего мозга, позволит использовать их для широкого спектра вариантов биомедицинского применения, такие как базовые исследования раз-

вития, высокоэффективный поиск новых лекарственных средств и моделирование заболеваний на основе БП-иПСК. Важно отметить, что в указанном исследовании наконец был разработан способ получения масштабируемого источника FOXA2+/TH+ нейронов для нейрональной трансплантации - значительный шаг на пути к клеточной терапии БП.

Кроме того, при получении аутентичных ДА нейронов среднего мозга из чЭСК продемонстрирована превосходная результативность *in vivo* (см. фиг. 4) и получение ДА нейронов в момент пересадки (приблизительно 40% зрелых нейронов в популяции на 25-30 день дифференцировки, что было выше процентного содержания при препарировании фетальной ткани вентрального отдела среднего мозга человека (составляющего, как правило, приблизительно 10%) (Sauer, et al., *Restor. Neurol. Neurosci.* 2:123-135 (1991)).

Ниже приведено краткое описание материалов и методов для применения при оценке двух главных параметров после приживления трансплантата: продолжительность выживания и показатели поведенческих оценок. Для краткосрочных исследований, например, с целью подтверждения выживания клеток или фенотипического состава, предусмотрены поведенческие оценки; тестирование на выживание у животных проводят приблизительно через 4-8 недель после пересадки. Долгосрочные исследования включают поведенческую оценку после пересадки и выживание животных на протяжении по меньшей мере 5 месяцев после пересадки. При анализе стратегий усовершенствования, например, модификаций PSA-NCAM, предусмотрено включение в поведенческую оценку более сложных параметров, например лестничного теста для оценки ловкости использования передних конечностей.

Примеры протоколов для оценки результативности *in vivo* содержат по меньшей мере четыре главных компонента и включают следующее: i - индукция очаговых поражений, ii - основной поведенческий анализ, iii - пересадка, и iv - анализ тканей. Хотя указанные процедуры применяли у крыс, согласно некоторым вариантам реализации указанные процедуры могут применяться у других видов.

i) Индукция очаговых поражений. Односторонние инъекции 6-гидроксидофамина (6-OHDA) в медиальный пучок переднего мозга (MFB) представляет собой один из стандартных способов индукции паркинсоноподобных симптомов у крыс. 6-OHDA представляет собой нейротоксин, посредством ретроградного транспорта через нигростриальный путь в MFB попадающий обратно в черную субстанцию, приводя к смерти нейрональных клеток в результате повреждения митохондриальных дыхательных ферментов. Целевые нейроны включают дофаминергические нейроны A9 в составе компактной части черного вещества (SNc), а также нейроны A10 в вентральной области покрышки. Указанная модель очагового поражения широко исследуется и считается превосходной доклинической моделью для исследования нейрхимических и поведенческих последствий поздних стадий БП, поскольку приводит к экстенсивному одностороннему истощению дофамина в составе комплекса хвостатое ядро/скорлупа (CPU). Поведенческие последствия также хорошо описаны и включают спонтанное и индуцированное лекарственными средствами вращение, а также нарушения функционирования конечностей (см. ниже). Двусторонние модели паркинсонизма могут лучше имитировать заболевание человека, однако, приводят к адипсии и афагии у крыс.

Процедуру выполняли у анестезированных животных (кетамин/ксилазин) посредством стереотаксической инъекции в 2 участка вдоль медиального пучка переднего мозга. Эффективность индукции полного очагового поражения в значительной степени зависит от опыта оператора и при разработке настоящих изобретений варьировала от 60 до 80%. Животным позволяли восстановиться, а затем проводили серию поведенческих тестов с началом через 2 недели после хирургических процедур.

ii) Основной поведенческий анализ. Поведенческий анализ начинают через 2 недели после хирургических процедур и продолжают после трансплантации и до умерщвления животного. Целью указанного анализа является 1) установление того, что очаговое поражение является стабильным и полным, и что у животного не наблюдалось спонтанного обращения симптомов: явление, которое наблюдалось у животных с частичными очаговыми поражениями, 2) демонстрация влияния трансплантации дофаминовых нейронов на установленные поведенческие показатели.

(a) Вращательное поведение. Крыс наблюдают для установления спонтанных вращений и индуцированных D-амфетамином (ипсилатеральных) вращений (10 мг/кг). Индикатором значимого очагового поражения является превышение порогового значения >6 вращений в минуту. Также может быть проведен анализ на индуцированные апоморфином вращения, однако считается, что положительные результаты требуют >80-90% истощения дофаминовой иннервации в области хвостатого ядра/скорлупы, и менее стабильны при очаговых поражениях MFB по сравнению с очаговыми поражениями CPU. Три набора данных получают с 2-недельными интервалами и усредняют. Крыс с показателями вращения <6 не включают с исследования.

(b) Тест с шаганием. Указанный тест предназначен для определения акинезии передних конечностей. Экспериментатор удерживает крысу одной рукой, фиксируя задние конечности (слегка приподнимая туловище), а другой рукой фиксирует переднюю конечность, мониторинг которой не проводится. Таким образом, весь вес переносится на другую переднюю лапу. Крысу медленно передвигают в боковом направлении как спереди, так и сзади. Подсчитывают число корректирующих шагов в обоих направлениях для обеих лап.

(с) Тест с цилиндром. Указанный тест предназначен для определения асимметрии использования передних конечностей. Крысу помещают в прозрачный цилиндр. В течение периода, составляющего 5 минут, оценивают поведение крысы при подъеме на задние лапы. Поведение анализируют во время подъема и опускания. Определяют процент одновременного и асимметричного использования лап при указанных движениях. Это может быть осуществлено с применением компьютерной системы видеомониторинга. Известно, что отрицательные результаты в указанных тестах коррелируют с истощением по дофамину, и было показано, что результаты улучшались после восстановительной пересадки согласно описанию в настоящем документе.

iii) Пересадка. Животные получали стереотаксические инъекции дофаминовых нейронов в стриатум через 3 недели после внесения индуцирующих паркинсонизм очаговых поражений, если поведенческие тесты подтверждали адекватное очаговое поражение. Координаты для инъекций общеизвестны. После пересадки дважды в месяц проводят ту же группу поведенческих тестов на протяжении варьирующих периодов времени (в среднем для достижения стабильного поведенческого восстановления требуется 5 месяцев).

iv) Анализ тканей. Животных умерщвляют и перфузируют. Головной мозг препарируют и подготавливают для иммуногистохимического исследования и стереологического анализа. Антитела включают TH, FoxA2, Pitx3, Nurr1, Lmx1a, Girk2, DAT для идентификации и определения функции дофаминовых нейронов; 5-HT для идентификации серотонинергических нейронов; NCAM человека или ядерный антиген человека для идентификации принадлежности человеку; нестин, Sox2 для определения предшественников нейронов; Ki-67 для определения пролиферации; Oct4, Nanog в качестве маркеров плюрипотентности; альфа-фетопротеин; миозин; цитокератин в качестве маркеров мультилинейности для исключения образования тератом. Количественные показатели включают объем трансплантатов (оценка по методу Кавальери), общее число клеток и число дофаминергических клеток (с применением двойного мечения нейронов TH/FoxA2); и пролиферативный индекс (% Ki67+). Перечисленные антитела коммерчески доступны и были использованы при разработке настоящих изобретений.

В некоторых вариантах реализации предусмотрено использование крыс Спрег-Дули (SD) для лучшего моделирования ситуации, характерной для человека. SD-крысы ежедневно получают внутривентрально инъекции циклоспорина (15 мг/кг), начиная за день до пересадки и до умерщвления. При долгосрочном инъецировании водных форм циклоспорина (неорал, пероральный раствор, применяемый у человека) наблюдалась пренебрежимая частота осложнений.

В некоторых вариантах реализации предложены примеры способов масштабирования культур мДА нейронов, см. табл. 9. Согласно конкретным вариантам реализации, такие способы предусмотрены для применения при получении культур соответствующего требованиям GMP уровня для клинического применения.

Оценочные параметры. Предусмотрено тестирование *in vivo* для применения в способах краткосрочной и долгосрочной оценки эффективности трансплантатов. Результаты, полученные при разработке настоящих изобретений, показали в обоих случаях идентичные тканевые характеристики, с ожидаемым увеличением доли TH+ клеток при долгосрочной выживаемости за счет дифференцировки привитых предшественников.

В среднем при трансплантации 15000 TH+/FoxA2+ нейронов на 250000 клеток животные выживали на протяжении 5 месяцев после пересадки. При краткосрочной выживаемости выживало и было подсчитано значительно меньшее число клеток с двумя метками. Соответственно, предполагаемые результаты *in vivo*, приведенные в табл. 9, соответствуют консервативной оценке. Примеры показателей, используемых для оценки статуса успешности/неуспешности для состава трансплантатов приведены в табл. 10.

Для долгосрочных трансплантатов поведенческая оценка представляет собой имеющий существенное значение компонент оценки результативности продуктов чЭС-линий. Ориентировочные принципы для определения утраты функции и восстановления были полнее всего описаны для индуцированных амфетамином вращений, при этом устойчивый трансплантат должен нормализовать поведение и иногда приводить к контралатеральным движениям из-за дисбаланса ДА. Нормативы, приведенные в табл. 11, представляют собой примеры ориентиров, определенных при разработке настоящих изобретений.

В некоторых вариантах реализации источники клеток для применения в способах дифференцировки в соответствии с настоящими изобретениями включают, не ограничиваясь перечисленными, линии клеток WA09, ACT (M09), Bio-Time и Roslin. В некоторых вариантах реализации источники клеток для применения в способах дифференцировки в соответствии с настоящими изобретениями включают, не ограничиваясь перечисленными, соответствующие требованиям GMP линии. В некоторых вариантах реализации источники клеток для применения в способах дифференцировки в соответствии с настоящими изобретениями включают, не ограничиваясь перечисленными, получение зрелых ДА нейронов для применения в анализах краткосрочного выживания прижившихся трансплантатов. В некоторых вариантах реализации источники клеток для применения в способах дифференцировки в соответствии с настоящими изобретениями включают, не ограничиваясь перечисленными, получение зрелых ДА нейронов для применения в экспериментах по приживлению трансплантатов, которые включают поведенческие оценки. Контрольные группы получают WA09 категории "для исследований" и симулирующий солевой раствор. Для статистического анализа используют ANOVA с апостериорным тестом Даннетта.

А. Комплексные поведенческие анализы для оценки степени реиннервации стриатума. В стандартных поведенческих тестах (согласно описанию в настоящем документе) продемонстрирована прямая корреляция с числом выживших дофаминовых нейронов в составе трансплантата. Крысы, получавшие лечение зрелыми ДА нейрональными клетками в соответствии с настоящими изобретениями, в поведенческих тестах демонстрируют максимальное восстановление с расчетным показателем восстановления, составляющим приблизительно 30% ДА нейронов, что необходимо для снижения уровня индуцированных амфетамином вращений. Соответственно, после достижения порога выживания ДА нейронов у хозяина (расчетный показатель: 800-1200 ДА нейронов в модели на крысах), может быть трудно отличить поведенческие различия, отражающие стратегии усовершенствования. Был описан способ с применением микротрансплантации, при котором в пределах стриатума размещают несколько трансплантатов небольшого размера, а не трансплантаты большого размера. Контролируя общее число трансплантированных ДА клеток, наблюдали различия поведенческих исходов при сравнении 2 групп: у крыс с несколькими трансплантатами небольшого размера наблюдалось более раннее и более экстенсивное поведенческое восстановление в отношении индуцированных лекарственными средствами вращений и в тестах с шаганием по сравнению с животными с одним трансплантатом большого размера, при таком же числе ДА нейронов и таком же уровне высвобождения дофамина. Неожиданным образом, имело место отчетливое различие в ловкости использования передних конечностей: у животных с широко распределенными трансплантатами небольшого размера наблюдалось улучшение, в отличие от крыс -носителей стандартных трансплантатов. Считается, что ловкость использования передних конечностей является задачей, требующей пространственного и временного контроля над высвобождением ДА, и, соответственно, надлежащей взаимосвязи между пересаженными нейронами и стриатумом хозяина. Соответственно, в некоторых вариантах реализации применение зрелых ДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями для процедур трансплантации приводило к восстановлению использования передних конечностей. Соответственно, в некоторых вариантах реализации зрелые ДА нейроны в соответствии с настоящими изобретениями вводят в один участок стриатума. В других вариантах реализации зрелые ДА нейроны в соответствии с настоящими изобретениями вводят по меньшей мере в 2 или более участков в составе стриатума.

В. Тест на ловкость использования передних конечностей (или лестничный тест).

Тест на использование передних конечностей для анализа выполняемых передними конечностями движений вытягивания и захвата выполняли до и после очагового поражения, а также после трансплантации. Животным не давали пищи в течение 48 ч перед тестом, и проводили тестирование ежедневно в течение 5 дней до очагового поражения, и затем дважды после очагового поражения с 3-недельным интервалом. После пересадки тест повторяли еще 2 раза, на 3 и 5 месяц. Животных помещали в плексигласовую камеру, оснащенную двойной лестницей. Гранулы корма размещают на 5 ступеньках с двух сторон при тестировании до трансплантации, и с одной стороны (со стороны пораженной конечности, контралатерально к вращению) после пересадки. Животных тестируют на протяжении заданного временного промежутка (например, 10 мин), подсчитывают число и долю съеденных гранул (успешное извлечение) и гранул, которые были захвачены, и сравнивают с результативностью у индивидуального животного до очагового поражения. Использовали несколько вариаций указанного теста, отличающихся числом повторений и временными характеристиками теста.

VIII. Дифференцированные с применением описанных в настоящем документе способов клетки демонстрировали электрофизиологические ответы, аналогичные ответам ДА клеток *in situ*.

В примере ниже описано применение иллюстративных способов в соответствии с настоящими изобретениями для определения функциональной способности ДА нейронов среднего мозга, полученных в результате дифференцировки с применением способов, описанных в настоящем документе. ДА нейроны компактной части черного вещества (SNpc) *in vivo* проявляют электрофизиологический фенотип, отличающий их от большинства других нейронов в головном мозге. В частности, они спонтанно генерируют спайки на низкой частоте (1-3 Гц). Кроме того, указанные медленные спайки сопровождаются медленным подпороговым осциллирующим потенциалом. Через 2-3 недели *in vitro*, те же указанные физиологические признаки демонстрируют культивированные ДА нейроны SNpc мышей в раннем постнатальном периоде. Для определения того, демонстрируют ли мДА нейроны в соответствии с настоящими изобретениями сопоставимый электрофизиологический фенотип, тестировали уникальные характеристики электрического ответа мДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями. ДА нейроны среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями тестировали на 80-100 день культивирования методом регистрации отдельных клеток. Указанные дифференцировавшие из чЭСК мДА нейроны стабильно (4/4 тестов) демонстрировали указанный отдельный физиологический фенотип со специфическими автономными спайками и осциллирующими изменениями мембранного потенциала (фиг. 3g-i). Указанное поведение известно как автономная пейсмейкерная активность, представляет собой специфическое свойство ДА нейронов среднего мозга и, в частности, подтипа дофаминовых нейронов среднего мозга, наиболее релевантных при болезни Паркинсона (тип ДА нейронов черной субстанции среднего мозга).

Предусмотрено применение электрофизиологических измерений на препаратах живых срезов, т.е. биоптатов из привитых областей. В одном варианте реализации ДА нейроны A9 или A10 типа, происхо-

дящие из трансплантатов, идентифицируют *in vivo* на основании тестирования на автономную пейсмейкерную активность, специфическую для дофаминовых нейронов А9-типа, на которые в наибольшей степени влияет БП. Другими словами, нейроны А10-типа не обладают пейсмейкерной активностью. Задавали условия для регистрации *in vivo* происходящих из плюрипотентных стволовых клеток человека ДА нейронов в препаратах живых срезов, см. фиг. 26. В частности, оценивали электрофизиологические признаки трансплантированных ДА нейронов человека, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, и было обнаружено, что они обладают электрофизиологическими признаками, типичными для нейронов компактной части черного вещества мышей (SNpc); на фиг. 26А сверху представлена реконструкция нейрона-пейсмейкера в области трансплантата. Снизу приведен пример микрофотографии среза головного мозга крысы, в который за 9 месяцев до этого были инъектированы происходящие из чЭС-клеток нейроны; трансплантат обведен; изображение с большим увеличением приведено на вставке снизу. Срез обрабатывали для выявления тирозингидроксилазы, которая окрашена белым, фиг. 26В. Кроме того, сверху представлен пример пЭТЧ-регистрации в конфигурации "присоединенная клетка" с предполагаемого ДА нейрона в трансплантате; снизу представлен пример регистрации в конфигурации "целая клетка" с той же клетки. Регистрацию проводили в присутствии глутамата и антагонистов рецептора ГАМК (50 мкМ AP5, 10 мкМ CNQX и 10 мкМ габазин) для элиминации синаптического входа. Результаты указанной регистрации показали, что происходящие из ПС-клеток нейроны представляли собой автономные пейсмейкеры с нормальной внутрисоматической динамикой напряжения. Другой зарегистрированный нейрон в образце трансплантата обладал аналогичными свойствами, фиг. 26С. Для сравнения представлены способы регистрации в конфигурации "присоединенная клетка" и регистрации в конфигурации "целая клетка" с дофаминергического нейрона SNpc взрослой мыши. Сокращения (СТх=кора, СТг=стриатум, SNpc=компактная часть черного вещества, ДА=дофаминергический). Указанные данные отражают функциональные исследования *in vivo* в стриатуме крыс после пересадки через месяцы после трансплантации. Соответственно, в некоторых вариантах реализации функциональные исследования *in vivo* на привитой ткани демонстрируют восстановление компактной части черного вещества (SNpc).

IX. При направленной дифференцировке мутантных генетически обусловленных БП-иПС клеток PINK1 (мутация PINK1) в ДА нейроны обнаруживались паркинсоноподобные аномалии в зрелых ДА нейронах.

В указанном примере описано открытие, заключающееся в получении больших популяций дифференцированных ДА нейронов среднего мозга с характеристиками нейронов БП-пациента при использовании линии клеток БП-пациента, т.е. мутантных клеток БП-иПС PINK1, полученных способом, не приводящим к уничтожению эмбриона, в качестве популяции клеток для получения FOXA2/LIM1X/TH+ ДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями.

В одном варианте реализации авторы настоящего изобретения предложили выделение стартовой популяции клеток пациента для применения в способах получения аутентичных ДА нейронов *in vitro*, если у указанного пациента имеется симптом болезни Паркинсона (БП), обеспечивающее потенциальное преимущество при применении обработанных клеток в тестах *in vitro* для 1) наблюдения дифференцировки или функциональных аномалий, по сравнению с аутентичными ДА нейронами людей, у которых отсутствует неврологический симптом, и затем 2) использования наблюдаемой аномалии для разработки терапевтического лечения для обращения указанной аномалии; и 3) лечения указанного пациента с применением терапевтического лечения для уменьшения, т.е. обращения симптома болезни Паркинсона.

В одном варианте реализации авторами настоящего изобретения предложено выделение стартовой популяции клеток из организма того же пациента для получения аутентичных ДА нейронов для применения при трансплантационном лечении, при этом у указанного пациента имеется симптом болезни Паркинсона (БП), обеспечивающее потенциальное преимущество в виде уменьшения иммунологического отторжения, т.е. отторжения трансплантата. В других вариантах реализации предусмотрено уменьшение отторжения трансплантата за счет применения источника исходных клеток, выделенного из организма человека с совпадающими антигенами главного комплекса гистосовместимости (МНС) (т.е. близнеца) или человека с приемлемым для трансплантации уровнем совпадения тканей по МНС (например, родственника пациента или не являющегося родственником человека, у которого экспрессируются частично совпадающие молекулы МНС).

А. Направленная дифференцировка показала, что генетически обусловленные БП-иПС клетки PINK1 обладали способностью развиваться в ДА нейроны, подобные ДА нейронам среднего мозга. См. фиг. 20-25. Дифференцировку мутантной линии БП-иПС PINK1 Q456X в ДА нейроны среднего мозга осуществляли с применением нового протокола (способа) на основе вентральной пластинки, описанного в настоящем документе, который обеспечивал получение ДА нейронов среднего мозга, демонстрировавших профили дифференцировки, сопоставимые с профилями дифференцированных ДА нейронов, полученных с помощью нового протокола на основе вентральной пластинки среднего мозга из линии Н9. (фиг. 20). В указанном примере описано открытие, заключающееся в получении больших популяций дифференцированных ДА нейронов среднего мозга с характеристиками нейронов БП-пациента при использовании линии клеток от БП-пациента, т.е. мутантных клеток БП-иПС PINK1, полученных способом, не приводящим к уничтожению эмбриона, в качестве популяции клеток для получения

FOXA2/LIM1XA/TH+ ДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями.

Клетки мутантной линии БП-иПСК PINK1 Q456X дифференцировали в ДА нейроны среднего мозга с применением нового протокола (способа) на основе вентральной пластинки в соответствии с настоящими изобретениями, который обеспечивает профили дифференцировки в нейроны среднего мозга, сопоставимые с профилями для иПСК линии Н9. А-С) Иммуноцитохимический анализ мутантных БП-иПСК линии PINK1 на 11 день дифференцировки (стадия предшественников среднего мозга), на FOXA2 (красный), LMX1A (зеленый) и DAPI (синий) (А), 25 день дифференцировки (ранняя постмитотическая стадия ДА нейронов), на FOXA2 (красный) и TH (зеленый) (В) и на NURR1 (красный) и TH (зеленый) (С). D-F) Та же группа иммуноцитохимических анализов, проведенных с применением происходящих из Н9 клеток, на 11 день дифференцировки, на FOXA2 (красный), LMX1A (зеленый) и DAPI (синий) (D), на 25 день дифференцировки, на FOXA2 (красный) и TH (зеленый) (E); и на NURR1 (красный) и TH (зеленый) (F).

В. Генетически обусловленные БП-иПСК проявляли БП-подобный фенотип с агрегацией белков. Фиг. 21-24. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что мутантные БП-иПСК PINK1 демонстрировали наличие экспрессии α -синуклеина (основной компонент телец Леви у БП-пациентов) в цитозоле TH+ ДА нейронов на день 55 дифференцировки с применением нового протокола индукции ДА нейронов среднего мозга на основе вентральной пластинки (фиг. 21А-В). А, В). Иммуноцитохимический анализ мутантных БП-иПСК линии PINK1 на день 55 дифференцировки на α -синуклеин (LB509, красный), TH (зеленый); и объединенное изображение (А) для α -синуклеина (красный) и убиквитина (зеленый) (В). Указанные положительные по α -синуклеину клетки также демонстрировали высокие уровни экспрессии убиквитина (классический маркер телец Леви). Напротив, ДА нейроны, происходящие из линии контрольных иПСК-клеток, демонстрировали нормальную синаптическую (в противоположность цитозольной) экспрессию α -синуклеина и очень низкие уровни убиквитина (фиг. 21С-Д). С, D) Иммуноцитохимический анализ линии контрольных иПСК на день 55 дифференцировки на α -синуклеин (красный) и TH (зеленый) (С); и α -синуклеин (красный) с убиквитином (зеленый) (D).

С. Экспрессия агрегированной формы α -синуклеина. В головном мозге БП-пациента димеризованная нерастворимая форма α -синуклеина приводит к агрегации в тельцах Леви. В указанной димеризованной форме α -синуклеина наблюдается фосфорилирование серина 129 на α -синуклеине. В тот же день дифференцировки мутантные происходящие из БП-иПСК клетки PINK1 демонстрировали выраженную экспрессию Ser129-фосфорилированного α -синуклеина, в отличие от происходящих из контрольных иПСК клеток, которые демонстрировали очень низкие уровни экспрессии (фиг. 22).

В мутантных происходящих из БП-иПСК клетках PINK1 наблюдалась выраженная экспрессия Ser129-фосфорилированного α -синуклеина, в отличие от происходящих из контрольных иПСК клеток, которые демонстрировали очень низкие уровни экспрессии. А, В) Иммуноцитохимический анализ на Ser129-фосфорилированный α -синуклеин (зеленый) и DAPI (синий) в мутантных происходящих из БП-иПСК клетках PINK1 на день 55 дифференцировки (А) и соответствующих происходящих из контрольных иПСК клетках (В).

Д. Различия в паттернах экспрессии α -синуклеина наблюдаются в зависимости от протокола дифференцировки. Авторы настоящего изобретения предположили, что происходящие из вентральной пластинки "аутентичные" ДА нейроны среднего мозга демонстрировали БП-специфическую уязвимость и соответствующие специфические фенотипы *in vitro*. ДА нейроны, полученные с применением классического протокола дифференцировки на основе стромальных клеток-фидеров MS5 (Perrier et al., PNAS 2004, цитируемый источник включен в настоящий текст путем ссылки), давали значительные количества TH+ нейронов. Однако на основании данных, полученных при разработке настоящих изобретений, авторы настоящего изобретения показали, что TH+ клетки на основе MS5 не представляли собой аутентичные происходящие из вентральной пластинки ДА нейроны среднего мозга. В культурах, дифференцированных с применением протокола MS5, присутствовало много положительных по α -синуклеину клеток. Однако указанные клетки не коэкспрессировали TH. Кроме того, отсутствовали различия в паттернах экспрессии БП-иПСК и контрольных иПСК при применении стратегии дифференцировки MS5 (фиг. 23А-В). Эти данные показывают, что α -синуклеин также экспрессируется в других типах клеток, не являющихся ДА клетками, и что такой не-ДА α -синуклеин не изменяется в пораженных заболеванием клетках относительно происходящих из контрольных иПСК клеток, в частности, при применении стандартных протоколов дифференцировки с MS5. Указанные клетки представлены ДА-подобными происходящими из розеток нейронами, описанными в опубликованных источниках (например, Perrier PNAS 2004). Указанные TH+ клетки на основе MS5 (=ДА-подобные клетки) использованы для сравнения на фиг. 3, 10, 13 и 16. Эти данные показывают, что α -синуклеин также экспрессируется в других, не-ДА типах клеток, и что такой не-ДА α -синуклеин не изменяется в пораженных заболеванием клетках относительно происходящих из контрольных иПСК клеток, в частности, при применении стандартных протоколов дифференцировки MS5. Наконец, новый протокол дифференцировки на основе вентральной пластинки, описанный в настоящем документе, дает значительное число TH+ клеток, коэкспрессирующих α -синуклеин.

Указанные TH+ клетки экспрессируют α -синуклеин согласно цитозольному паттерну экспрессии. Фиг. 24А, В) иммуноцитохимический анализ на α -синуклеин (LB509, красный), TH (зеленый) мутантных БП-иПСК линии PINK1 на день 60 дифференцировки на основе MS5 (А) и контрольных иПСК (В); С) иммуноцитохимический анализ мутантных БП-иПСК линии PINK1 на день 55 дифференцировки на основе вентральной пластинки на α -синуклеин (красный), TH (зеленый).

Е. ДА нейроны, происходящие из генетически обусловленных БП-иПС клеток, более уязвимы для токсической стимуляции. Фиг. 24-25. Происходящие из БП-иПСК TH+ ДА нейроны, полученные с помощью протокола на основе вентральной пластинки, были более уязвимы для стимуляции токсином (валиномицин: ионофор митохондрий, 5 мкМ (диапазон концентраций 1-10 мкМ), 48 ч), чем происходящие из контрольных иПСК клетки. Напротив, TH+ нейроны, полученные с применением классического протокола на основе MS5, не демонстрировали дифференциальной уязвимости происходящих из БП-иПСК и происходящих из контрольных иПСК клеток (фиг. 24). Анализ общей жизнеспособности клеток с аламаровым синим через 48 ч обработки валиномицином также продемонстрировал дифференциальное выживание клеток при стимуляции токсином в специфическом диапазоне доз (5 и 10 мкМ) при сравнении БП-иПСК и контрольных иПСК (фиг. 25). Нормальные условия: происходящие из БП-иПСК и контрольных иПСК культуры, полученные с применением протокола на основе MS5 (D, показаны происходящие из БП-иПСК клетки); TH+ нейроны после стимуляции токсином в происходящих из БП-иПСК (E), и происходящих из контрольных иПСК культурах (F), полученных с применением протокола MS5. G-H) Изображения на малом увеличении при иммуноцитохимическом анализе на Tuj1 (красный) и TH (зеленый) на день 60 дифференцировки с применением протокола на основе вентральной пластинки: БП-иПСК в нормальных условиях (G) и при стимуляции токсином (H); контрольные иПСК в нормальных условиях (I) и при стимуляции токсином (J). K-N) Изображения на малом увеличении при иммуноцитохимическом анализе на Tuj 1 (красный) и TH (зеленый) на 60 день дифференцировки с применением протокола на основе MS5: БП-иПСК в нормальных условиях (K) и при стимуляции токсином (L); и контрольные иПСК в нормальных условиях (M) и при стимуляции токсином (N).

Е. Пример количественного определения жизнеспособности клеток - анализ зависимости "доза-эффект" при стимуляции токсином. Анализ на жизнеспособность клеток с аламаровым синим через 48 ч обработки валиномицином продемонстрировал дифференциальное выживание клеток при стимуляции токсином в специфическом диапазоне доз (5 и 10 мкМ) при сравнении БП-иПСК и контрольных иПСК (60 день дифференцировки на основе вентральной пластинки). Отметим, что указанные аналитические тесты предназначены для определения общих показателей гибели клеток, тогда как большинство резко выраженных эффектов наблюдалось конкретно в ДА нейронах (см. фиг. 14). Соответственно, при основном на аламаровом синем количественном определении, вероятно, происходит недооценка степени дифференциального эффекта, наблюдаемого в линиях ДА нейронов.

Х. Предложенное крупномасштабное культивирование с применением композиций и способов в соответствии с настоящими изобретениями для получения типовых мДА нейронов.

В приведенных в настоящем документе описаниях представлены типовые способы и применения для крупномасштабного получения нервных клеток мДА в результате дифференцировки с применением композиций и способов согласно описанию в настоящем документе. Масштабируемое получение (т.е. способы, предположительно подходящие для успешного получения мДА нервных клеток из культур, содержащих относительно небольшое количество клеток), как было показано, дает популяции клеток, способные обеспечить подходящие для трансплантирования мДА нейроны на 25 день. В частности, для иПСК PINK. См. табл. 9).

XI. Способы обогащения ДА нейронами среднего мозга.

Были разработаны и протестированы несколько способов, до и во время разработки настоящих изобретений, обогащения популяций клеток предшественниками ДА нейронов среднего мозга, за счет решения проблем, например, путем истощения контаминирующих клеточных популяций, в том числе, но не ограничиваясь указанными, контаминирующих плюрипотентных стволовых клеток. Начальные исследования проводились с применением первичных эмбриональных нейронов мыши, эмбриональных нейронов крысы и полученных из ЭСК мыши популяций. Помимо цели, заключающейся в увеличении популяций нейронов для применения при обогащении ДА нейронами, исследования на ЭСК мыши включали разработку процедур для предотвращения образования тератом, представлявшего собой проблему при предыдущих процедурах. Указанные стратегии включали негативный отбор на поверхностные клеточные маркеры, экспрессируемые на плюрипотентных клетках (таких как SSEA1) наряду с позитивным отбором клеток, экспрессирующих нейронный маркер (NCAM). Был предложен ряд генетических репортерных стратегий, задействующих клетки мыши, для применения при идентификации обогащения нервными клетками в парадигмах трансплантации ДА нейронов (например, идентификация клеток, экспрессирующих SOX1, Corin/Lmx1a, Ngn2, TH, Pitx или DAT). Функциональное тестирование проводили на первичных клетках от Ngn2-репортерных мышей (Thompson et al., *Exp Neurol.* 198(1): 183-98 (2006) и Lmx1A-репортерных мышей, также отсортированная по Corin (Jönsson, *Exp Neurol.* 219(1):341-54 (2009). В случае популяций, полученных из ЭСК мыши, исследования проводили с применением ре-

портерных линий ЭСК мышцы с маркерами SOX1 (Barraud et al., Eur J Neurosci. 2005 22(7):1555-69), тирозингидроксилазой TH (TH) (Kelly et al., Minerva Endocrinol. 1991 16(4):203-6), Pitx3 (Hedlund et al., Stem Cells. 2008 26(6):1526-36) и переносчиком дофамина DAT (Zhou et al., Stem Cells. 2009 27(12):2952-61). Кроме того, при разработке настоящих изобретений авторы изобретения провели комплексное трансплантационное исследование с непосредственным сравнением *in vivo* показателей трех очищенных полученных из ЭСК мышцы популяций, представляющих последовательные стадии развития ДА нейронов: предшественники среднего мозга (Hes5::GFP), ранние постмитотические клетки (Nurr1::GFP), и зрелые ДА нейроны (Pitx3::YFP). Указанные исследования выявили, что Nurr1-экспрессирующие развивающиеся ДА клетки, в частности, подходят для трансплантации, и показали, что очищенные ДА нейроны способны эффективно приживаться при трансплантировании *in vivo*. Кроме того, указанные результаты использовали для отбора клеток на 25 день дифференцировки (начало экспрессирования Nurr1) для применения при трансплантировании чЭСК-ДА нейронов в моделях БП на мышах, крысах и макаках резус.

При разработке настоящих изобретений при получении аутентичных ДА нейронов среднего мозга из чЭСК наблюдались прекрасные показатели *in vivo* (см. фиг. 4); применение протоколов согласно описанию в настоящем документе приводило к выходу приблизительно 40% ДА нейронов к моменту трансплантации. Указанный процент выше процента ДА нейронов, полученных при препарировании фетальной ткани вентрального отдела среднего мозга человека (составляющего, как правило, приблизительно 10%). Соответственно, предполагается, что применение источника ДА нейронов на основе чЭСК согласно описанию в настоящем документе обеспечит дальнейшее повышение чистоты при применении стратегий очистки клеток. Кроме того, были разработаны генетические репортерные линии для применения с чЭСК, аналогичные используемым в исследованиях на мышах, включая линию клеток человека в качестве линии Nurr1::GFP. Тем не менее, применение генетических репортеров может быть проблематичным при трансляции у человека, так как GFR (ЗФБ) является для человека иммуногенным, и, соответственно, не подходит для применения у человека. Кроме того, может представлять трудности FACS-сортировка для создания маточного банка ДА нейронов клинического класса (т.е. получение замороженных культур ДА нейронов человека для применения при трансплантации), учитывая продолжительность времени, необходимого для сортировки партий размером приблизительно 10^9 клеток, необходимых для каждого трансплантата, помимо потенциальной высокой стоимости и более низкого выхода клеток при восстановлении после хранения. Вместо использования генетических репортерных систем и выделения клеток на основе метода FACS, авторы изобретения предложили выделение ДА нейронов на основе экспрессии поверхностных маркеров с применением альтернативных стратегий с использованием техник разделения клеток, предложенных для применения у пациентов с БП. Так, сортировка с применением магнитных частиц (например, система CliniMACS®) широко применялась в одобренных FDA методах на основе клеток, и обеспечивала быстрое, экономически эффективное выделение до 10^{10} клеток в соответствующих правилах надлежащей медицинской практики (GMP) условиях, т.е. условиях, одобренных для выделения клеток, предназначенных для применения у человека. Соответственно, в некоторых вариантах реализации предложена сортировка с применением магнитных частиц для обогащения зрелыми ДА нейронами, например с применением CD142, присоединенного к магнитным частицам для обогащения Nurr1+ нейронами, предназначенными для применения в трансплантатах.

XII. Идентифицирование поверхностных клеточных маркеров для применения в способах получения зрелых ДА нейронов.

Данные об экспрессии маркеров клеточной поверхности, собранные при разработке настоящих изобретений, позволили идентифицировать несколько новых маркеров клеточной поверхности, экспрессируемых на ДА нейронах среднего мозга. В частности, были обнаружены маркеры для дополнительного идентифицирования клеток, таких как специфические клетки, дифференцирующие в зрелые ДА нейроны, зрелые ДА нейроны в соответствии с настоящими изобретениями и клетки A9. Для идентификации таких поверхностных маркеров применялись две главные стратегии: во-первых, несмещенный скрининг генной экспрессии в генетических репортерных линиях (фиг. 27a) показал наличие нескольких кандидатных маркеров, включая CD142 и маркер, называемый DCSM1, который избирательно экспрессировался в ДА нейронах среднего мозга и, как обнаружено, представлял собой, в частности, маркер ДА нейронов A9-типа (фиг. 27b). Вторая стратегия состояла в использовании скрининга на CD-маркеры клеточной поверхности в полученных из чЭСК ДА нейронах, которые тестировали с 242 коммерчески доступными антителами в 96-луночном формате (фиг. 27c, d). Результаты такого типового скрининга (фиг. 27e) позволили идентифицировать по меньшей мере 5 подтвержденных маркеров, которыми богаты ДА нейроны среднего мозга, включая CD142, избирательный маркер, характерный для стадии Nurr1+ ДА нейронов (фиг. 27f), помимо CD63, CD99 и DCSM1.

В частности, как видно из фиг. 27, скрининг поверхностных CD-маркеров полученных из WA09 ДА нейронов на 25 день дифференцировки, протестированных с индивидуальными антителами в количестве до 242. Указанные результаты сравнивали с дублирующим скринингом широкого спектра других полученных из WA09 типов нервных клеток (например, полученных из чЭСК HB9::GFP+ мотонейронов, полученных из чЭСК кортикальных нейронов, полученных из чЭСК Nkx2.1::GFP+ предшественников вентральной части переднего мозга, и нескольких других полученных из чЭСК типов нейронов. Получен-

ную базу данных экспрессионных профилей поверхностных маркеров затем использовали для отбора кандидатных CD-маркеров, избирательно обогащающих любой заданный подтип, например, ДА нейроны среднего мозга (фиг. 27). Один из выявленных маркеров, связанный с дифференцировкой ДА нейронов из чЭСК, представлял собой CD142. Отбор клеток по CD142, специфически обогащенных, в частности, полученными из чЭСК ДА нейронами на стадии Nurr1+ при истощении других подтипов нейронов. В некоторых вариантах реализации CD142 экспрессируется до Nurr1+. В некоторых вариантах реализации популяция ДА нейронов среднего мозга, отсортированная по CD142, содержит клетки Nurr1+ и Nurr1-. В некоторых вариантах реализации популяция ДА нейронов среднего мозга, отсортированная по CD142, содержит клетки Nurr1-. В некоторых вариантах реализации популяция культивируемых отсортированных по CD142+ Nurr1- ДА нейронов среднего мозга начинает экспрессировать Nurr1 (т.е. становится Nurr1+) в течение периода до двух дней после сортировки.

Помимо CD142, полученные из чЭСК ДА нейроны были обогащены маркерами CD63 и CD99. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации, ДА-культуры нервных клеток обогащают ДА нейронами путем сортировки или отбора по маркерам, включая, но не ограничиваясь перечисленными, CD142, CD63, CD99, DCSM1, Nurr1+ и т.д. Маркер CD142, как правило, присутствует у приблизительно 30% общего количества клеток в популяции на 25 день дифференцировки (фиг. 28a). Избирательность CD142 в отношении стадии Nurr1+ ДА нейронов была подтверждена для нескольких независимых линий чЭСК и чиПСК (фиг. 28b). Важно, что, помимо обогащения ДА нейронами, CD142 избирательно истощает другие подтипы нейронов, такие как GABA и серотонинергические нейроны. (фиг. 28c-f). Проводились исследования *in vivo*, демонстрирующие способность CD142 приводить к формированию высокочистых ДА нейронных трансплантатов без детектируемых примесей GABA и серотонинергических нейронов. Серотонинергические нейроны представляют собой тип клеток, при трансплантировании фетальных тканей человека задействованный в качестве потенциального источника трансплантат-индуцированной дискинезии. Хотя применение способов трансплантации согласно описанию в настоящем документе с применением неочищенных клеток уже приводило к немногочисленности серотонинергических нейронов, применение CD142 должно снизить указанный риск в еще большей степени.

А. Маркеры для идентификации зрелых мДА нейронов А9-типа. Было обнаружено, что полученные из А9/полученные из А10 ДА нейроны обладают, *in vitro* и *in vivo*, различными функциональными характеристиками и специфическими паттернами иннервации, соответствующими их роли для функционирования мезостриатума/мезолимбической системы. При разработке настоящих изобретений авторы обнаружили, что аутентичные мДА нейроны, полученные посредством способов в соответствии с настоящими изобретениями (фиг. 4), приводят к появлению нейронов, обладающих свойствами, характерными в большей степени для А9, чем для А10. В частности, по меньшей мере, часть аутентичных мДА нейронов, позитивных по ТГ (ТН+), экспрессировала Girk2, маркер, используемый для определения ДА нейронов А9-типа. Кроме того, многие зрелые ДА нейроны демонстрировали автономную пейсмейкерную активность, представляющую собой функциональную характеристику А9-типа, но не А10-типа ДА нейронов. Тем не менее, некоторые ТН+ клетки, полученные *in vitro*, не принадлежали типу А9. Соответственно, авторами изобретения предложены процедуры для обогащения, например, описанные в настоящем документе, для получения очищенных популяций аутентичных мДА нейронов человека А9-типа (а не А10-типа). Согласно описанию в настоящем документе, авторы изобретения обнаружили по меньшей мере два маркера, уникальных для нейронов типа А9, и по меньшей мере два маркера, уникальных, по меньшей мере, для нейронов типа А10. Соответственно, в некоторых вариантах реализации нейроны типа А9 идентифицируют по маркерам (Girk2, Aldh1), отличным от маркеров А10 (кальбиндин, Otx2).

В. Определение набора маркеров, повышающий выход ДА нейронов среднего мозга подтипа А9. Для определения А9-специфических поверхностных маркеров были предложены по меньшей мере два стратегии: кандидатные маркеры получали с применением скрининга генной экспрессии, например, согласно описанию в настоящем документе, и кандидатные CD-антитела - с применением скрининга на поверхностные маркеры, согласно описанию в настоящем документе. Популяции в другом методе проводят глобальный анализ транскриптома в очищенных популяциях полученных из ЭСК мыши мДА нейронов на разных этапах дифференцировки (с применением трансгенной технологии ВАС; см. фиг. 27a, b). Присутствие поверхностных маркеров обнаруживали в профиле поверхностных маркеров на ДА нейронах, полученных из RCB WA09, с помощью следующих типовых способов. Полученные из RCB WA09 ДА нейроны на 25 день дифференцировки разъединяли и повторно высевали в 96-луночные планшеты, а затем обрабатывали 242 CD-антителами и проводили анализ данных с применением сканера для многопараметрического анализа Operetta (Operetta High Content). Величину ДА-обогащения проверяли по меньшей мере для 5 дополнительных антител, связывавшихся с CD-маркерами, идентифицированными в ходе указанных скринингов (например, CD142, CD63 и CD99). Кандидатные CD-позитивные/CD-негативные клетки оценивали с применением анализа на соответствие показателям ДА (ДА QC), включая экспрессию FOXA2/ТН и ТН/Nurr1 (см. табл. 7). В некоторых вариантах реализации предложено использование профилей глобальной генной экспрессии для сравнения не отсортированных по CD142 (CD142+) клеток. В некоторых вариантах реализации экспрессию требуемого маркера в отсортированных/разделенных клетках использовали для краткосрочных и долгосрочных *in vivo* исследований со-

гласно описанию в настоящем документе. Среди специфических для ДА нейронов маркеров, идентифицированных в ходе указанных исследований, присутствовал ген поверхностного маркера, названного DCSM1 (поверхностный маркер 1 ДА клеток). На основе данных относительно экспрессии *in situ* экспрессия соответствует вентральной части среднего мозга, однако, как было более неожиданно обнаружено, экспрессия по меньшей мере частично избирательна в отношении А9, и в развивающемся и взрослом головном мозге мышей (фиг. 27), и во взрослом головном мозге человека. В полученных из чЭСК ДА нейронах наблюдалось множество клеток, экспрессирующих DCSM1. *In vitro* анализы на принадлежность А9/А10 включали долгосрочную дифференцировку позитивных по маркеру клеток (50 день и 75 день дифференцировки) и анализ i) экспрессии маркеров А9, (Girk2, Aldh1) или же А10 (кальбиндин, Otx2) в зрелых нейронах, (ii) дифференциального аксонального наведения в ответ на Netrin-1 и Sema3, и (iii) анализ А9-обогащенных нейронов с помощью электрофизиологических тестов. ДА нейроны А9 демонстрировали специфические функциональные характеристики согласно описанию в настоящем документе в случае полученных из чЭСК А9-нейронов. Клетки, экспрессирующие DCSM1 и другие маркеры, исследовали *in vivo* для подтверждения i) экспрессии маркеров А9 (Girk2, Aldh1) или маркеров А10 (кальбиндин, Otx2), ii) разрастание волокон ДА-трансплантата и iii) электрофизиологических свойств А9 срезов трансплантированных клеток (см. фиг. 26).

XIII. Применение полисиаловой кислоты (ПСК) и фермента полисиалилтрансферазы (PST).

Интеграция трансплантата и степень разрастания ДА-волокон представляют собой проблемные вопросы методов трансплантации, включая исследования трансплантации фетальных тканей у пациентов с БП. Одной из проблем, возникающих в трансплантированных тканях и клетках, является ограниченное разрастание волокон из указанных трансплантатов при лечении пациентов. Указанная проблема является особенно критичной для человека, поскольку восстановление у пациента требует обширной реиннервации стриатума. В ранее существовавших методах для достижения адекватной реиннервации после трансплантации ткани требовалось неоднократное инъектирование порций клеток в разные области стриатума. Каждая из инъекций может привести к повреждению стриатума и воспалению, а также связана с другими хирургическими рисками. Такие риски включают повреждение кровеносного сосуда во время инъектирования клеток, что потенциально может спровоцировать инсульт или судороги у пациента. ПСК представляет собой природный гомополимер сиаловой кислоты (а именно, альфа-2,8-связанную сиаловую кислоту) на поверхности клеток, который, как было обнаружено, является пострансляционным модификатором (за счет действия фермента полисиалилтрансферазы (PST)) других молекул клеточной поверхности, таких как (полисиалилированная) молекула адгезии нервных клеток (NCAM), NCAM (CD56) и т.п. Обнаружено, что ПСК задействован в регуляции пластичности некоторых типов поведения клеток, требующих изменения межклеточных взаимодействий, включая миграцию клеток и разрастание аксонов. Интенсивно экспрессируясь в организме эмбриона, ПСК понижаясь регулируется в тканях взрослого организма, за исключением локальных участков ЦНС, обеспечивающих поддержание структурной и физиологической пластичности (таких как гиппокамп, супрахиазмальное ядро, СВЗ). Соответственно, в некоторых вариантах реализации полисиаловая кислота (ПСК) предложена для применения для стимуляции разрастания волокон успешно трансплантированных клеток. Примеры применения ПСК в других типах клеток приведены в WO 2006/042105, полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации авторы настоящего изобретения предполагают применение аутентичных ДА нейронов в комбинации с ПСК согласно описанию в настоящем документе.

А. Увеличение количества ПСК в ДА нейронах для применения у пациентов с БП. Остается множество проблем при разработке способов и получении клеток на основе полученных ранее в моделях на небольших животных результатов, включая ограниченную выживаемость трансплантируемых клеток и недостаточную иннервацию хозяйской ткани волокнами. Влияние указанных ограничений предположительно будет более серьезным в большем по размеру стриатуме человека, и, соответственно, улучшение выживаемости и иннервации необходимо для эффективного клинического применения полученных из ЭСК ДА нейронов. Улучшение разрастания волокон и интеграции трансплантата в моделях на животных, включающих применение по меньшей мере одной и до нескольких инъекции, предположительно будет снижать риски, связанные с неоднократными инъекциями или недостаточным распространением ДА нейронов *in vivo*.

Регуляция клеточных взаимодействий полисиаловой кислотой (ПСК) представляет собой один из факторов, способствующих распространению клеток, разрастанию аксонов и направленной иннервации при развитии позвоночных животных, см., например, Rutishauser, Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 9, 26-35 (2008). ПСК представляла собой углеводный полимер, присоединенный к молекуле адгезии нервных клеток (NCAM), ослаблявший межклеточные взаимодействия, и таким образом способствовавший тканевой пластичности. В глиальном рубце повышенная экспрессия ПСК во взрослом ГМ способствовала миграции предшественников нейронов из субвентрикулярной зоны в кортекс и улучшению аксонального роста (El et al. Use of polysialic acid in repair of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 16989-16994 (2006). Согласно описанию в настоящем документе, искусственное повышение экспрессии ПСК на очищенных полученных из ЭСК мыши ДА нейронов приводило к увеличению числа клеток трансплантата, обширному разраста-

нию волокон ДА нейронов в стриатум хозяина и, неожиданным образом, улучшению восстановления поведенческих функций у мышей с болезнью Паркинсона. Далее, применение генной инженерии для повышения уровней ПСК на поверхности полученных из ЭСК ДА нейронов одновременно повышало *in vivo* выживание и разрастание волокон в стриатум хозяина. Один типовой вариант реализации с применением гена PST млекопитающих, т.е. мыши или человека, представлен на фиг. 29. В других типовых вариантах реализации, проиллюстрированных фиг. 29, представлено применение бактериальной PST, т.е. PSTnm. В частности, согласно описанию в настоящем документе, увеличение количества ПСК на клетках при клеточной терапии на основе зрелых ДА нейронов предложено для применения при лечении БП.

В. Применение PST мыши для повышения экспрессирования ПСК. Результаты *in vivo* указывают на улучшенное распространение нейритов и значимый регресс индуцированного амфетамином вращения у мышей 6-OHDA, которым трансплантировали модифицированные PST клетки мыши, тогда как равные количества клеток, не модифицированных PST, не обеспечивали такого результата (фиг. 33). Кроме того, наблюдалась корреляция между улучшением иннервации волокнами ДА и улучшением поведенческих результатов в модели БП на мышах, например, при введении небольших (инъекции приблизительно 50000 клеток) ПСК-позитивных клеточных трансплантатов последние обеспечивали интеграцию трансплантата и разрастание волокон, составляющие приблизительно 70% захваченных областей относительно сопоставимых трансплантатов большего размера (100000 или более клеток). Сравнение клеток полученных из ЭСК ДА нейронных трансплантатов после стимуляции ПСК и после контрольной обработки показало восстановление поведенческих функций в группе с ПСК (каждый из трансплантатов состоял из 55000 трансплантированных клеток), но не наблюдалось для контрольных клеток. При трансплантировании 100000 полученных из ЭСК ДА нейронов в головной мозг мышей наблюдалось восстановление поведенческих функций за счет полученных из ЭСК ДА нейронов, прошедших либо обработку ПСК, либо контрольную обработку, что, предположительно, означает, что объем трансплантатов, составляющий 100000 клеток, достаточен для реиннервации головного мозга мыши в отсутствие ПСК-стимуляции. Соответственно, в другом варианте реализации искусственная экспрессия ПСК на поверхности аутентичных ДА нейронов предложена для применения в процедурах для лечения пациентов с БП. При индуцировании ПСК на нервных клетках в соответствии с настоящими изобретениями указанная ПСК была идентична полимеру ПСК, встречающемуся в природе в клетках головного мозга, соответственно, в отличие от применения других молекул клеточной поверхности для конструирования терапевтических типов клеток, клетки, сконструированные для экспрессирования ПСК, предположительно обладают малой антигенностью *in vivo* при использовании для трансплантационных процедур у человека. Кроме того, высокие уровни ПСК на успешно трансплантированных клетках, либо эндогенных нейрональных предшественников (Battista et al., J. Neurosci. 30(11):3995-4003 (2010)), шванновских клетках (Ghosh et al., Glia. 60(6):979-92(2012)), либо полученных из ЭСК ДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями, не вызывали детектируемых побочных эффектов при использовании в различных моделях на взрослых грызунах. При искусственном экспрессировании эффективных уровней ПСК задействован один фермент, полисиалилтрансфераза (PST), единственный продукт которого представлен указанным уникальным гликополимером. Неожиданным образом, количество экспрессируемого белка и природа продукта указанного фермента оставались в значительной степени постоянными и близкими к показателям ПСК, обнаруживаемой в естественных условиях в эмбриональных тканях.

Согласно описанию в настоящем документе предложено искусственное экспрессирование ПСК на нервных клетках для применения в процедурах трансплантации. В частности, предложено применение ПСК при подготовке клеток для терапевтического применения, для решения проблем, возникающих при использовании индуцируемой экспрессии других типов маркеров клеточной поверхности. Кроме того, применение экспрессирования ПСК обеспечивало воспроизводимость в межвидовых протоколах для позвоночных животных (например, при использовании генов PST мыши для экспрессирования в клетках человека), так как ее акцепторы также отличаются совместимой структурой у разных видов и обнаруживаются на поверхности большинства клеток. Встраивание генов PST в чЭСК для увеличения количества ПСК на ДА нейронах. Ген, кодирующий полисиалилтрансферазу человека (чPST), вводили в линию клеток чЭСК (WA01) с применением лентивирусного вектора (pLenty, Invitrogen) и согласно описанию в настоящем документе. Двадцать отобранных клонов размножали и анализировали экспрессию PST. PST-экспрессирующие чЭСК клоны дифференцировали для подтверждения того, что ген PST в ДА нейронах не сайленсирован. Количественное определение ПСК-NCAM на разных этапах дифференцировки (дни 0, 11, 25, и 50) выполняли с применением FACS-анализа и иммунофлюоресценции (Operetta). Показатели позитивных клонов сравнивали с совокупностью качественных контрольных показателей ДА нейронов, приведенных в табл. 7. По меньшей мере 3 клон, у которых сохранялись высокие постоянные уровни ПСК-NCAM на протяжении дифференцировки, и которые демонстрировали хорошие контрольные качественные показатели (табл. 7), отбирают для оценки разрастания нейритов в сверхэкспрессирующих PST полученных из чЭСК ДА нейронах. Отсортированные контрольные и PST-сверхэкспрессирующие чЭСК клоны дифференцировали в ДА нейроны с применением стандартного протокола согласно описанию в настоящем документе, после чего фиксировали и анализировали клетки на 25 и 50 дни. Число и длину положительных по ТГ волокон в таких культурах количественно определяли с помощью микроскопа

Operetta High Content. С помощью модуля для анализа нейритов программы Harmony 3.0 количественно определяли число и длину нейритов, с PST или без PST, и данные статистически анализировали с применением двустороннего анализа ANOVA. Сверхэкспрессирующие PST и контрольные клоны чЭСК, отобранные в ходе описанных выше *in vitro* исследований, снова дифференцировали в ДА нейроны и трансплантировали крысам в модели БП. Проводили краткосрочные трансплантационные исследования (4-6 недель) для определения выживаемости, экспрессии ПСК-NCAM и разрастания нейритов. Все клоны, прошедшие краткосрочные испытания *in vivo* с удовлетворительными показателями, использовали для долгосрочных трансплантационных исследований. В указанных исследованиях животным вводили половину или четверть стандартной (200×10^3) дозы клеток. Указанные исследования были направлены на выяснение того, приводит ли увеличение количества ПСК к повышению долгосрочной выживаемости после трансплантации (5 месяцев), и способны ли меньшие количества ДА нейронов обеспечить такие же или лучшие функциональные возможности по сравнению не содержащими PST трансплантатами, содержащими стандартные дозы клеток (фиг. 27).

Дополнительно проводили комплексные поведенческие тесты, чувствительные к степени реиннервации стриатума, для дополнительного мониторинга отличий функционального потенциала PST-трансплантатов и контрольных ДА нейронных трансплантатов. После завершения поведенческих тестов животных умерщвляли и количественно определяли разрастание волокон с применением специфических антител человека NCAM и SC121 и антител против ТГ (см. также фиг. 29). Измеряли интенсивность и распределение в трансплантате hNCAM+, SC121+ и ТН+, а также процент клеток человека, коэкспрессирующих маркеры ДА нейронов (ТН, FOXA2) и ПСК. Количественно определяли плотность NCAM/ТН+ ореола нейритов, распространяющихся из трансплантата, на разных расстояниях. Данные сравнивали между группами с применением двустороннего анализа ANOVA с поправкой Бонферрони. Дополнительно исследовали срезы для обнаружения качественных изменений (например, ветвления, толщины, распространения и формы трансплантата). Кроме того, получают срезы некоторых трансплантатов для электрофизиологических исследований (см. фиг. 26) в отношении принадлежности А9-фенотипу, формирования синапсов со стриатом хозяина, а также иннервации эндогенными афферентами.

В приведенном ниже примере описана стимуляция экспрессии полисиаловой кислоты, улучшавшая функционирование трансплантатов из полученных из ЭСК дофаминовых нейронов у мышей с болезнью Паркинсона.

Клетки ЭСК, экспрессирующие ЗФБ под контролем промотора Nurr1 (Nurr1::GFP ЭСК) стабильно трансфицировали лентивирусным вектором, убиквитарно экспрессирующим полисиалилтрансферазу (PST). В трансфицированных клетках наблюдалось резкое увеличение содержания мРНК PST по сравнению с контролем (фиг. 30А). Экспрессия PST была, согласно наблюдениям, достаточной для синтеза ПСК на NCAM. Соответственно, экспрессия ПСК-NCAM значительно увеличивалась в PST-модифицированных клетках на 14 день дифференцировки ДА нейронов (фиг. 30В-Е). Как эндогенная, так и индуцированная ПСК на клеточной поверхности полученных из ЭСК ДА нейронов может быть удалена (фиг. 30Е) с помощью фаговой эндонейраминидазы (endoN), расщеплявшей, в частности, уникальные альфа-2,8-связанные полимеры сиаловой кислоты в ПСК. Неожиданным образом, оказалось, что трансфекция PST, согласно наблюдениям, не влияла на экспрессию нейронных маркеров или маркеров среднего мозга в ЗФБ-очищенных ДА нейронах (фиг. 30F).

Другие исследования на гемипаркинсонических мышах с индуцированными 6ОНДА повреждениями показали, что для обеспечения надежного функционального восстановления требуется трансплантация приблизительно 100000 полученных из ЭСК предшественников ДА нейронов, по оценке с применением теста со стимулированным амфетамином вращением. В ходе настоящих исследований авторы стремились трансплантировать субоптимальное число клеток, чтобы иметь возможность провести оценку улучшений за счет стимулированной экспрессии ПСК. Для трансплантации высокообогащенных ДА нейронами популяций в истощенных по контаминирующим плюрипотентным клеткам очищенных с помощью FACS культурах на 14 день дифференцировки проводили тестирование на управляемую Nurr1 экспрессию ЗФБ и отсутствие экспрессии SSEA-1 (фиг. 31). В отсутствие свехэкспрессирования PST при снижении минимального эффективного размера трансплантата в два раза (55000 Nurr1+ДА клеток) детектируемое восстановление поведенческих функций не происходило. С другой стороны, при повышенном экспрессировании ПСК такое же количество Nurr1/PST ДА нейронов обеспечивало значимую коррекцию обусловленных БП расстройств поведения ($p < 0,01$; двусторонний анализ ANOVA), с полным восстановлением приблизительно через 5 недель после хирургического вмешательства (фиг. 32А). Удаление ПСК до трансплантации путем инкубирования с endoN показало специфичность стимуляции ПСК, так как обработка endoN частично обращало восстановление функций за счет применения Nurr1/PST (фиг. 32А).

Для изучения характеристик трансплантированных клеток проводили иммуногистохимическое исследование животных через два месяца после трансплантации. Наблюдалось различие в количестве живых Nurr1+ нейронов; у тех животных, которым трансплантировали клетки PST-трансфицированной линии, в среднем присутствовало в два раза больше положительных по ЗФБ (GFR+) клеток, чем у животных, которым трансплантировали контрольные клетки (9300 ± 1400 против 4230 ± 1010 GFR+ клеток на

трансплантат, для PST или контрольных образцов, соответственно; фиг. 32B, $p < 0,05$, критерий Стьюдента). Кроме того, трансплантаты Nurr1/PST также демонстрировали более высокие уровни экспрессирования ПСК *in vivo* (фиг. 32C, D). При этом пропорции клеток, экспрессирующих маркеры ДА нейронов среднего мозга ТГ и FoxA2 в центре трансплантата, были сопоставимыми для Nurr1 и Nurr1/PST клеток (ТГ: $62,0\% \pm 8,0$ против $51,3\% \pm 7,0$; $p = 0,33$; FoxA2: $63,2\% \pm 8,6$ против $55,4\% \pm 2,0$, $p = 0,3$, соответственно; фиг. 32E).

Нейронные процессы, обусловленные клетками Nurr1 и Nurr1/PST, указывают на сопоставимые уровни ТГ, Girk2 (связанный с G-белком калиевый канал внутреннего выпрямления) и синапсина (фиг. 33A). В отличие от других исследований с трансплантацией шванновских клеток (Ghosh, et al. *Glia* 60, 979-992 (2012)), повышенная экспрессия ПСК оказывает незначительный эффект на миграцию ДА клеток из области трансплантирования. Тем не менее, наблюдались отчетливые изменения разрастания нейритов. Как видно на фиг. 33B, клетки Nurr1/PST обуславливали большее число ДА нейронных процессов по сравнению с контрольными клетками Nurr1+. При количественном определении интенсивности иммунофлюоресценции ЗФБ и ТГ в пяти последовательных зонах по 100 мкм на разном удалении от трансплантата, трансплантаты Nurr1/PST демонстрировали значительно более высокую относительную плотность процессов (фиг. 33C, D; $p < 0,01$ как для ЗФБ, так и для ТГ, двусторонний анализ ANOVA). При количественном анализе указанного эффекта нормализовали относительную плотность процессов по плотности, наблюдаемой в ближайшей непосредственно к центру трансплантата зоне. Такая нормализация была необходима для компенсации большего числа жизнеспособных клеток в трансплантатах Nurr1/PST и подтверждения специфического эффекта ПСК на разрастание нейритов. Специфичность также была продемонстрирована при удалении ПСК с поверхности клеток до трансплантирования путем обработки endoN. Соответственно, предварительная обработка endoN снижала периферическое разрастание волокон до контрольных уровней (фиг. 33E).

Указанные открытия показали, что, по меньшей мере, некоторые из эффектов ПСК на функционирование трансплантата являются результатом увеличения иннервации стриатума волокнами. Соответственно, имела место высокая корреляция между функционированием трансплантата и относительным уровнем разрастания ЗФБ-позитивных волокон, например в зону IV (фиг. 33F; $p < 0,001$, $r^2 = 0,65$, $n = 17$). Неожиданным образом, связь разрастания волокон с поведенческой функцией в экспериментальных группах (контрольной, ПСК-стимулированной и обработанной endoN) была стабильной, указывая на то, что иннервация трансплантат→хозяин представляет собой показатель восстановления поведенческой функции в модели БП на мышах. Ряд факторов механически способствовал увеличению разрастания волокон, например повышение проницаемости зоны реактивной глии, инкапсулирующей центр трансплантата, увеличение способности к спраутингу, улучшенное разрастание в окружающую ткань хозяина (например, более легкое перемещение конуса роста), и предотвращение преждевременного формирования связей с тканью хозяина в непосредственной близости от центра трансплантата. Типовые механизмы согласуются с ролью ПСК, способствующей процессу разрастания при нормальном развитии и в нервной системе взрослого организма.

Эксперименты, описанные в настоящем документе, демонстрируют применение искусственно стимулированной ПСК при трансплантировании ДА нейронов, обеспечивавшее превосходные результаты по сравнению с трансплантатами из других типов клеток. Данные ясно показывают, что стимуляция ПСК обеспечивает значимое увеличение способности трансплантированных ДА нейронов иннервировать стриатум хозяина и ослаблять функциональные расстройства при БП. Соответственно, предложен переход к клиническому применению, включающему ДА нейроны в соответствии с настоящими изобретениями, для получения клеток до трансплантации. В некоторых вариантах реализации клетки генетически модифицируют для экспрессирования ПСК. В некоторых вариантах реализации PST может доставляться непосредственно в клетки путем обработки очищенными ферментом и субстратом *in vitro*, до трансплантации. В некоторых вариантах реализации предложена включающая ПСК стратегия для перехода к применению у человека при БП-трансплантировании для минимизации необходимости в повторных инъекциях и, таким образом, снижения хирургических рисков, обусловленных указанными повторными инъекциями.

В других вариантах реализации указанная технология предложена для применения с другими типами и видами клеток, например, для увеличения миграции трансплантированных шванновских клеток при создании мостика (например, межклеточного сообщения) для возобновления роста аксонов на участке повреждения спинного мозга.

Ниже представлены типовые материалы и способы, используемые в этом примере.

Животные: Мышей 129S3/SvImJ в возрасте 6 недель (Jackson Laboratory) содержали в условиях контролируемой температуры и свободного доступа к пище и воде. Экспериментальные процедуры проводили в соответствии с правилами Национального института здоровья (NIH) и институционального содержания и использования животных, и были одобрены локальным Комитетом по институциональному уходу за животными и их использованию (IACUC) и Комитетом по институциональной биобезопасности (IBC).

Инъекции бонда и тест с индуцированным амфетамином вращением: Животных анестезировали пентобарбиталом натрия (10 мг/кг) и инъектировали в стриатум с правой стороны 2 мкл бонда (4

мкг/мкл в солевом растворе, 0,5% аскорбиновой кислоты). Инъекции осуществляли с помощью шприца Hamilton в участок с координатами: 0,5 мм в постериальном и 1,8 мм в латеральном направлении от брегмы и на 2,5 мм вентральнее поверхности ГМ. Перед хирургическим вмешательством животные получали одну интраперитонеальную инъекцию дезипрамина (25 мг/кг, Sigma). Через две недели после хирургического вмешательства животных оценивали в тесте с индуцированным амфетамином вращением. Животных помещали на прозрачные пластиковые цилиндры диаметром 30 см на полчаса, после чего они получали одну интраперитонеальную инъекцию амфетамина (10 мг/кг, Sigma). Через 20 мин и на протяжении следующих 20 мин подсчитывают число ипсилатеральных/контралатеральных вращений. Животных тестировали один раз в неделю на протяжении семи недель, затем под глубокой анестезией перфузировали через сердце ФСБ и 4% параформальдегида в 0,1М фосфатном буфере (ФБ, pH 7,4). Головной мозг извлекали и дополнительно фиксировали в течение ночи при 4°C в 4% параформальдегиде, а затем получали с помощью вибратора (Pelco-101, Ted Pella) сагиттальные срезы толщиной 40 мкм. Дифференцировка и трансплантация клеток: Клетки Nurr1::GFP ВАС-трансгенной репортерной линии ЭСК ВАС-мышей (т.е. экспрессия ЗФБ регулируется промотором Nurr1) 5 трансфицировали лентивирусом (pLenti, Invitrogen), содержащим ген PST мыши под контролем промотора ЦМВ. ЭСК размножали на обработанных митомицином С клетках ЭФМ (StemCell Technologies) в среде DMEM (Invitrogen), 10% ФБС (HyClone) с добавлением 1400 единиц/мл ЛИФ (ESGRO; Invitrogen), 2 мМ L-глутамин, 1 мМ β-меркаптоэтанол, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen). Дифференцировку ДА клеток индуцировали в соответствии с Barberi et al., NatBiotechnol 21, 1200-1207 (2003), с некоторыми модификациями. Вкратце, клетки дифференцировали на фидерных клетках MS5 на покрытых желатином чашках (10000 клеток на чашку диаметром 10 см) и культивировали в течение 4 дней на заменяющей сыворотку среде (SRM). На 4 день добавляли белки Sonic hedgehog (SHH, 200 нг/мл) и ФРФ-8 (100 нг/мл). На 7 день дифференцировки среду заменяли на N2 с добавлением SHH, ФРФ-8 и ОФРФ (10 нг/мл). На 11 день индуцировали конечную дифференцировку, удаляя SHH, ФРФ-8 и ОФРФ, и добавляя аскорбиновую кислоту (АК, 200 мМ) и BDN (нейротрофический фактор головного мозга, 20 нг/мл).

Клетки собирали на 14-15 день с обработкой аккутазой в течение 45 мин, однократно промывали N2 и инкубировали с конъюгированным с AlexaFluor-647 антителом против SSEA-1 (BD Pharmingen) в течение 25 мин. Клетки однократно промывали N2, ресуспендировали в буфере HEPES с 0,1% БСА. Добавляли DAPI для оценки жизнеспособности. Проводили FACS-сортировку на клеточном сортере MoFlo и отбирали представляющую интерес популяцию по флуоресценции ЗФБ (Nurr1). По популяции, позитивной по AlexaFluor-647 (SSEA-1), проводили негативную сортировку. Для негативного контроля ЗФБ использовали непримированные ЭСК мышей J1 на такой же стадии дифференцировки.

Отсортированные по Nurr1::GFP клетки анализировали на жизнеспособность и ресуспендировали в N2 с BDN и АК с получением конечной концентрации 55000 клеток/мкл. 1 мкл инъекции в поврежденный стриатум мышей с помощью 50 мкм заостренного тонкого стеклянного капилляра в участок с координатами: 0,3 мм в постериальном, 1,5 мм в латеральном направлении от брегмы, и на 2,2 мм вентральнее поверхности ГМ. Аликвоту суспензии клеток повторно высевали на покрытые матригелем 6 мм чашки для дальнейшего исследования.

Для иммунофлуоресцентного анализа клетки фиксировали параформальдегидом в течение 10 мин при 40°C, дважды промывали ФСБ, блокировали 5% БСА (0,1% Triton X-100 в ФСБ) и инкубировали с первичными антителами в течение 2 ч при комнатной температуре: антителом кролика против ЗФБ (1:1000, Invitrogen), антителом мыши IgM против ПСК (1:2000, 5A5), антителом мыши против NeuN (1:800, Chemicon), антителом мыши против TH (1:1000, Sigma), козым против FoxA2 (1:800, Santa Cruz), козым против Engrailed (1:800, Santa Cruz). Затем клетки инкубировали с Су-конъюгированными вторичными антителами (1:1000, Jackson).

Обработка EndoN: Для удаления ПСК с NCAM, вечером накануне сбора клеток клетки обрабатывали 20 единицами endoN, фагового фермента, в частности, устраняющего ПСК 7-9. Затем клетки собирали и инъекции, как описано выше, но ресуспендировали в N2 с BDN и АК и 5 единицами endoN. Ранее авторы установили, что инъекции того же количества endoN отдельно мышам с повреждениями не улучшает поведенческую функцию у животных. Анализ PST мРНК и ПСК-NCAM in vitro: Для проведения вестерн-блоттинга клетки обрабатывали буфером для вестерн-блоттинга (WB) (ФСБ с 1% NP40, 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA и 1×ингибиторов протеазы/фосфатазы, добавляемых непосредственно перед экстрагированием, при pH 7,4), обрабатывали ультразвуком дважды в течение 5 секунд, центрифугировали и ресуспендировали в буфере Лэммли (ЛБ). Аликвоты, не содержащие ЛБ, сохраняли для определения белка. Равные количества белка загружали на 6% полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия для гель-электрофореза (BioRad). Белки переносили с помощью электрофореза на поливинилиденные мембраны (Millipore). Мембраны блокировали в течение 1-6 ч в 0,1% Triton X-100 TBS (TBS-T) с 5% обезжиренного сухого молока и инкубировали в течение ночи с антителом против NCAM (1:10000, Santa Cruz) в TBS-T с 5% молока. Блоты инкубировали с конъюгированным с пероксидазой вторичным антителом (1:10000, Jackson) и проводили детекцию с применением метода усиленной хемилюминесценции (ECL) (Amersham Pharmacia Biotech). Уровни белка количественно определяли с применением про-

граммного обеспечения ImageJ. Для анализа к ОТ-ПЦР экстрагировали тотальную РНК тризолом (Sigma), проводили обратную транскрипцию (Qiagen) и амплифицировали 10 мкл реакционной смеси 2х SYBR и прямым и обратным праймером в концентрации 0,2 мкМ до получения конечного объема 20 мкл. Для FACS-анализа ПСК-NCAM клетки собирали с обработкой аккутазой в течение 45 мин, однократно промывали и инкубировали с IgM мыши против ПСК (1:250, 5A5) в течение 25 мин на льду, однократно промывали средой N2 и инкубировали с Cy3-конъюгированным антителом против IgM мыши (1:250, Jackson) в течение еще 25 мин на льду. Клетки однократно промывали N2 и ресуспендировали в 0,1% БСА с 7AAD и проанализировали на клеточном сортере FACS Calibur. В контроле не добавляли первичное антитело.

Иммуногистологические и стереологические процедуры: Свободноплавающие коронарные срезы блокировали в 0,1% Triton X-100, 5% сыворотке осла в ФСБ в течение 30 мин при комнатной температуре и инкубировали на протяжении 48 ч при 4°C с различными антителами: кролика против ЗФБ (1:300), курицы против ЗФБ (1:200, Chemicon), мыши против TH (1:200), IgM мыши против ПСК (1:1000), мыши против NeuN (1:400), козым против FoxA2 (1:300), кролика против Girk2 (1:300, Alomone Labs), мыши против синапсина (1:200, BD Transduction Laboratories). Затем срезы промывали и инкубировали с вторичными антителами: Cy2, Cy3 и Cy5-конъюгированными антителами осла (1:400, Jackson). Для ПСК использовали Cy5-конъюгированный анти-IgM осла (1:500 Jackson). Инкубирование проводили на протяжении 2 ч при комнатной температуре. Срезы дважды промывали в ФСБ и монтировали в Mowiol (Calbiochem). Каждый третий из коронарных срезов мозга анализировали для каждого иммуноокрашивания.

Цифровые изображения получали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 с тремя лазерами (аргоновый 488, HeNe 543 и HeNe 633) с объективом с-Apochromat 40х(водная иммерсия). Число GFR+ и TH+ клеток подсчитывали на каждом третьем из срезов, охватывающих включающих весь головной мозг, с использованием объектива 40х, и оценивали общее число клеток на трансплантат. Клетки с двойными метками анализировали в отдельных оптических плоскостях вдоль всей оси Z.

Для анализа процента клеток, меченых GFR/TH+ и GFR/FoxA2+, 100 GFR+ клеток анализировали для каждого маркера. Для анализа процесса разрастания получали конфокальные Z-сканы с интервалами 0,8 мкм по всей оси Z (20-40 мкм) с отверстием размером 1 мкм с использованием объектива 40х. Срезы сканировали от места инъекции в латеральном направлении до тех пор, пока не переставали наблюдаться какие-либо процессы. Трехмерные проекции, охватывающие всю просканированную площадь, последовательно совмещали. Для анализа интенсивности ЗФБ и ТГ всю просканированную площадь разделяли на пять последовательных 100 мкм зон на разном расстоянии от трансплантата и измеряли интенсивность с применением программного обеспечения ImageJ. Данные нормализовали по интенсивности в зоне, ближайшей к трансплантату (зона I) для контроля любых потенциальных различий размера трансплантата.

Статистический анализ: данные представлены как среднее±стандартная ошибка среднего (SEM). Сравнение проводили с применением теста Стьюдента или двустороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с последующей поправкой Бонферрони. Проводили линейный регрессионный анализ и количественную оценку с применением коэффициента корреляции Пирсона.

С. Сверхэкспрессия гена PST (полисиалилтрансферазы) человека. Группы имеющих повреждения животных получали одну из 3 доз: клетки дикого типа, либо клетки, экспрессирующие PST, либо клетки, предварительно обработанные ферментом PST. На них проводили поведенческие тесты согласно парадигмам, представленным в табл. 11 (индуцированное амфетамином вращение, тест с цилиндром, степ-тест). Выбранные дозы (например, 200 тыс., 100 тыс., 50 тыс. клеток) успешно применялись у мышей, таким образом, что полученные нейроны демонстрировали результаты согласно описанию в настоящем документе для генов PST мыши.

D. Непосредственное введение очищенного фермента PST в клетки. Другими словами, нетрансгенный способ индукции PST. Предварительная обработка клеток ферментом PST, которая приводит к полисиалилированию и повышенной экспрессии поверхностного PST. Несмотря на то, что PST млекопитающих представляют собой малораспространенные мембранные белки, функционирующие в аппарате Гольджи, очищенная α 2,8-полисиалилтрансфераза *Neisseria meningitidis* (PST-NM) функционировала во внеклеточной среде при использовании коммерчески доступного нетоксичного субстрата (а именно, ЦМФ-сиаловой кислоты) и синтезировала полимер, химически идентичный PST млекопитающих. В одном из примеров активный фрагмент указанного фермента эффективно добавлял PST в терапевтические белки *in vitro*, улучшая фармакокинетику *in vivo*. В присутствии ЦМФ-сиаловой кислоты PST синтезировался PST-NM непосредственно на поверхности клеток разнообразных типов *in vitro*, в том числе на ЭСК мыши и человека (фиг. 35A-E). Прямая инъекция PST-NM и субстрата *in vivo* запускает повышенное накопление PST на поверхности клеток в областях зрелого головного мозга, в том числе в коре головного мозга, стриатуме и спинном мозге (фиг. 35G, H). PST, синтезированный PST-NM, разлагался эндонейраминидазой (эндо-N) (фиг. 35B), удалявшей индуцированный PST, демонстрируя, что синтезируемый

PST-NM PST обладал функциональными свойствами, сравнимыми с свойствами эндогенного PST (фиг. 35A, C, D). Экспрессирование PST с помощью PST-NM происходило менее чем через час, что превосходит скорость медленного трансгенного индуцирования PST. Экспрессирование продолжалось на протяжении нескольких недель *in vivo*, после чего уровень маркеров PST снижался, таким образом, удавалось избежать побочных эффектов продолжительной индукции трансгена PST. Соответственно, предложено применение *in vitro* обработки клеток PST-NM+ субстрат как простая альтернативная стратегия стимуляции повышенных уровней PST в полученных из ЭСКч ДА нейронах и других типах клеток для применения при процедурах трансплантации. Кроме того, указанный альтернативный подход при трансляции, т. е. переходу к применению для процедур трансплантации у человека, обладает преимуществами неинвазивности, т. е. исключает применение трансгенных методов; для указанных процедур используют отвечающие стандартам GMP реагенты для соответствия протоколам применения в клинической практике, и обеспечивает временную биохимически стимулированную экспрессию PST, соответствующую ожидаемым временным рамкам, для ДА-волокон, выходящих из области трансплантата и проникающих в мозг хозяина, что необходимо для недопущения некоторых опасных побочных эффектов применения клеток, сконструированных для трансплантации.

Приведенные ниже примеры иллюстрируют ферментативно-инженерное получение PST на происходящих из ЭСКч ДА нейронах с применением очищенной бактериальной полисиалилтрансферазы, PST-NM, для повышения эффективности трансплантата.

Несмотря на эффективность, трансфекция геном PST требовала генетической модификации клеток ЭСКч с ограниченным контролем на протяжении полисиалилирования. В данном примере описано открытие того, что применение внешнего PST-NM в качестве альтернативы доставки генов индуцировало образование PST (см. фиг. 35). На фиг. 35A время адгезии обработанных PST шванновских клеток (ШК) (зеленая линия - средняя линия) повышено, тогда как синтезированный с помощью PST-NM PST подавлял адгезию. В частности, (A) синтезированный с помощью PST-NM PST подавляет адгезию шванновских клеток в суспензии к монослою шванновских клеток даже более эффективно (красная линия - нижняя линия), чем PST, полученный с применением принудительной экспрессии PST (зеленая линия - средняя линия). (B) Иммуноблоттинг на PST в полученных из ЭСКч HB9 двигательных нейронов показывает, что контрольные образцы, обработанные только PST-NM, содержали недетектируемые уровни PST. Инкубирование с PST-NM и субстратом ЦМФ-сиаловой кислотой, дает обширную полосу PST, которая исчезает при обработке эндо-Н. (C, D) Аналогично эффектам, получаемым при применении гена PST, полисиалилирование указанных клеток ферментом PST-NM и субстратом во время дифференцировки усиливает разрастание нейритов и миграцию клеток (стрелки). (E) Иммуноокрашивание на PST 30-дневных полученных из ЭСКч ДА нейронов. (F) Указанное окрашивание значительно усиливается после обработки PST-NM и субстратом. (G) *In vivo* инъекции только PST-NM не оказывают эффекта, тогда как совместное введение с субстратом (H) обеспечивает значительные уровни экспрессии PST в стриатуме мышей.

Соответственно, для применения в получении клеток для трансплантации рассматриваются зрелые ДА нейроны, внешне обработанные PST-NM. Как PST млекопитающих, так и PST-NM давали химически идентичные цепи PST. Повышенные уровни PST на полученных из ЭСКч ДА нейронах (фиг. 35F) должны сохраняться в течение нескольких недель, достаточных для того, чтобы ДА-волокна вышли из области трансплантата. Так как PST-NM удаляют до трансплантации, необходимость брать в расчет иммуногенность указанного фермента, контаминирующего трансплантируемые клетки, отсутствует.

PST-NM получали из искусственного фрагмента, обладающего свойствами повышенной растворимости и активности (Willis et al., Characterization of the alpha-2,8-polysialyltransferase from *Neisseria meningitidis* with synthetic acceptors, and the development of a self-priming polysialyltransferase fusion enzyme. *Glycobiology* 18, 177-186 (2008)). В культурах ЭСКч индуцировали дифференцировку в ДА нейроны до обработки PST-NM, субстратом или и первым, и вторым. Культуры анализировали при обработке в различные моменты времени (от 10 мин до 6 ч) с применением количественной иммунофлюоресценции (Opereita) и вестерн-блоттинга для определения скорости и уровней полисиалилирования. Таким образом, 25-дневные дифференцировавшиеся полученные из ЭСКч ДА нейроны инкубируют с оптимальными концентрациями PST-NM и субстрата в условиях, описанных в настоящем документе. PST+ мДА нейроны трансплантируют в ходе краткосрочного и длительного анализа согласно приведенному здесь описанию и фиг. 29.

Е. Применение при повреждении спинного мозга. В нескольких исследованиях, направленных на конечное применение у пациентов-людей, а также при использовании описанных в настоящем документе стратегий было показано, что указанные процедуры, в том числе доставка генов PST путем введения лентивирусных векторов, экспрессирующих PST непосредственно в ЦНС, для содействия регенерации аксонов и миграции эндогенных предшественников, обладают широким потенциалом. Одна из таких стратегий для применения у человека направлена на применение при повреждении спинного мозга. В одном из типов процедур для регенерации спинного мозга применяли трансплантаты шванновских клеток как часть терапии для восстановления клеточных мостиков при регенерации аксонов *in vivo*. Тем не менее, никакое терапевтическое вмешательство не обеспечивало восстановления двигательной функции

у пациента, в том числе контроля тонких мышечных движений. В соответствии с настоящим описанием повышение экспрессирования PST на шванновских клетках, применяемых для трансплантации, приводило к усиленной миграции шванновских клеток и аксональному росту, что впоследствии приводило к сильно выраженному стимулирующему действию на двигательные функции (фиг. 30A-D). Соответственно, в некоторых вариантах реализации повышенное экспрессирование PST на шванновских клетках *in vitro* рассматривается для применения при процедурах трансплантации у человека с повреждением спинного мозга. Другая стратегия применения искусственной экспрессии PST за счет повышенной экспрессии генов PST в применяемых у человека процедурах включала полученные из ЭСК NB9 двигательные нейроны, при этом введение гена PST в указанные нейроны с помощью экспрессии генов на основе лентивирусного вектора приводило к резкому повышению разрастания аксонов как в культуре, так и после трансплантирования мышам для восстановления механически индуцированного повреждения седалищного нерва. Последнее приводило к улучшенному специфичному направленному действию на мышечную ткань (фиг. 30E-H). Соответственно, в другом варианте реализации искусственное экспрессирование PST на поверхности полученных из ЭСК двигательных нейронов применяется для восстановления функции седалищного нерва.

IVX. Повышенная безопасность трансплантируемых ДА нейронов.

Ниже описаны предполагаемые варианты реализации для дальнейшего снижения риска для здоровья пациентов для применения в способах получения клеток в соответствии с настоящими изобретениями.

Несмотря на то, что клетки, полученные с применением способов, описанных в настоящем документе, демонстрировали такие характеристики, как пониженный риск для пациентов при использовании для трансплантации, рассматриваются дополнительные варианты реализации для дальнейшего снижения возможного риска для здоровья пациентов, получающих клеточные трансплантаты. Одной из ряда проблем при процедурах клеточной терапии на основе ЭСКч является возможность введения примеси недифференцированных клеток, не поддавшихся дифференцировке, которые в посттрансплантационных условиях развиваются в клетки, причиняющие пациенту вред. В случае плюрипотентных клеток одним из возможных пагубных результатов является образование тератомы, что ставит под угрозу жизнь пациента. Описано образование тератомы в результате спонтанной дифференцировки клеток при применении полученных из ЭСКч клеток после использования краткосрочных протоколов нейронной дифференцировки. Тем не менее, применение авторами настоящего изобретения полученных из ЭС-клеток человека нервных клеток, в отличие от аналогов, полученных из ЭСК мыши, редко приводило к образованию тератом после применения соответствующих стратегий нейронной дифференцировки, описанных в настоящем изобретении (т.е. монослойная культура, протокол двойного ингибирования SMAD-сигналикации и культивирование с цитокинами, которые не способствуют пролиферации). Фактически, образования тератом не наблюдалось за последние 10 лет при анализе нескольких сотен животных с трансплантатами клеток человека на фоне применения ряда стратегий нейронной дифференцировки. Более того, тератомы не наблюдались при процедурах БП-трансплантации в соответствии с настоящими изобретениями с применением клеток человека для трансплантатов. Разница при применении клеток человека относительно применения клеток мыши для процедур трансплантации для применения у человека, предположительно, связана с разными стадиями плюрипотентности, на которых находятся ЭСК человека/мыши, поэтому свойства клеток человека, как считают, соответствуют стадии плюрипотентности, описанной как Epi-SC, в отличие от ЭСК мыши, которые могут находиться на другой стадии развития. При этом по меньшей мере одна из проблем при применении клеток в предшествующих трансплантационных исследованиях, состоящая в постоянном риске избыточного нейронального роста, существенно выраженного при протоколе Perrier et al., PNAS 2004 и аналогичных протоколах, неожиданным образом отсутствует при применении зрелых ДА нейронов и способов трансплантации в соответствии с настоящими изобретениями. Далее, другая проблема, обнаруженная при трансплантационных экспериментах в ходе предыдущих исследований, заключалась в образовании происходящих из ЭСКч нейроэпителиальных структур (т.е. нейрональных розеток), продолжающих пролиферировать *in vivo*. Указанная экспансия трансплантированных нейроэпителиальных клеток *in vivo* наблюдалась при различных парадигмах нейрональной трансплантации, в том числе в трансплантационных исследованиях с применением полученных из ЭСКч ДА нейронов в моделях на грызунах с болезнью Паркинсона и хореей Гентингтона. Указанные "нейрональные розеткообразующие" пролиферирующие клетки представляли собой нетрансформированные первичные клетки с высоким собственным потенциалом роста, что приводило к образованию у животных после трансплантации трансплантатов значительного размера, состоящих из эктопической, по большей части кортикально-подобной ткани. В соответствии с настоящим описанием был использован ряд стратегий для устранения примесей плюрипотентных или нейроэпителиальных клеток во время трансплантации (например, отбор по SSEA-4 (маркер плюрипотентности) или Forse-1 (нейроэпителиальный маркер). Указанные стратегии были отчасти успешными при применении стратегий дифференцировки на основе розеток, при этом избыточный нейрональный рост по-прежнему наблюдался в подгруппе трансплантатов, отобранных по Forse1, или при негативном отборе на SSEA-4. Неожиданным образом, после освоения указанной процедуры дифференцировки в ДА нейроны на основе вен-

тральной пластинки, а не розеткообразующих клеток, проблема разрастания нейроэпителлия была решена. Происходящие из трансплантата пролиферирующие клетки в функциональных полученных из ЭСКч вентральной пластинки ДА нейронных трансплантатах наблюдались редко.

Судя по нежелательным результатам других процедур трансплантации, другой связанной с безопасностью проблемой при применении для трансплантации ДА нейронов у человека являются побочные эффекты указанной терапии, такие как возникновение трансплантат-индуцированной дискинезии (GID), которая наблюдается приблизительно у 15% пациентов, получающих фетальную ткань при участии в трансплантационных исследованиях. При этом в соответствии с изложенным в настоящем документе почти полное отсутствие происходящих из трансплантата серотонинергических клеток, наряду с применением более подходящего источника клеток с возможностью последующего очищения от нежелательных клеточных типов (см. текст, относящийся к фиг. 28), и возможностью контроля распространения ДА-волокон *in vivo* (см. фиг. 29; а именно, предотвращение образования "очагов" нейрональных кластеров, секретирующих L-ДОФА и другие соединения), являются основными преимуществами применения способов в соответствии с настоящими изобретениями по сравнению с другими способами получения клеток для применения при процедурах трансплантации. Таким образом, применение указанных способов в соответствии с настоящими изобретениями предположительно будет сводить к минимуму риск для пациентов.

VX. Применение ЭСКч у человека для перехода к клиническим испытаниям на людях.

В предпочтительных вариантах реализации предложены ЭСК человека для применения в способах получения и использования клеток для процедур трансплантации у человека, иными словами, клеточной терапии для лечения БП. В частности, применение ЭСК человека обладает многочисленными преимуществами по сравнению с применением иСК человека в способах согласно настоящим изобретениям, например, в качестве примера, при получении подходящих для трансплантации ДА нейронов среднего мозга для применения в качестве клеточной терапии БП. В частности, применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иСК) в качестве источника клеток для образования ДА нейронов имеет ряд преимуществ, таких как обеспечение генетически совместимого источника клеток для каждого пациента. Тем не менее, в результате нескольких недавних исследований возникли сомнения относительно безопасности и полной генетической совместимости иСК. Перепрограммированные клетки, как было показано, являются носителями потенциально опасных генетических и эпигенетических нарушений, нежелательных при клиническом применении. Далее, в работах на иСК мыши было показано, что полученные из иСК клетки не полностью иммуносовместимы, что является главным возражением против их применения для трансплантации у человека. Далее, не существует одобренных FDA процедур с применением иСК для трансплантации. Наконец, потенциальное создание удовлетворяющих стандартам GMP с полным контролем качества (QC) банков клеток для каждого отдельного пациента было бы непрактичным и слишком затратным. Наряду с этим, генетическая стабильность иСКч по сравнению с ЭСКч интенсивно изучалась. Несмотря на то, что в культивируемых ЭСКч, согласно наблюдениям, со временем возникают мутации, время и скорость возникновения таких мутаций, как оказалось, отличаются от собственных иСКч, при этом ЭСКч в целом признаны более генетически стабильными, чем иСК, см. примеры у Hussein, et al., *Nature* 471, 58-62 (2011); Mayshar, et al. *Cell Stem Cell* 7, 521-531 (2010); Lister, et al. *Nature* 471, 68-73 (2011); Laurent, et al. *Cell Stem Cell* 8, 106-118 (2011). Кроме того, для нескольких линий ЭСКч были разработаны стандартные операционные процедуры, удовлетворяющие требованиям безопасности при тщательной проверке, обязательной согласно FDA для продуктов, применяемых для клеточной и генной терапии. Две группы в США получили разрешение FDA на переход к клиническому применению клеточной терапии на основе ЭСКч. Так, компания Geron Corporation начала исследование фазы I полученных из ЭСКч клеток-предшественников олигодендроцитов (GRNOPC1), а Advanced Cell Technology (ACT), Inc. в настоящее время проводит два исследования фазы I/II с применением полученных из ЭСКч пигментных эпителиальных клеток сетчатки для лечения макулярной дистрофии Штаргардта (исследование NCT01345006) и прогрессирующей сухой возрастной макулярной дегенерации (исследование NCT01344993). Наконец, тот факт, что оба одобренных FDA клинических исследования с применением ЭСКч направлены на терапию расстройств нервной системы, демонстрирует преимущества применения способов на основе ЭСКч для получения материала для трансплантации для лечения заболеваний и повреждений нервной системы. Нервная система считается иммуно-привилегированной областью, так как в НС чужеродная ткань (аллотрансплантаты) вызывает слабый иммунный ответ по сравнению с таким же трансплантатом, размещенным на периферии. Так, спустя 25 лет после трансплантации фетальных клеток в мозг человека, было обнаружено, что некоторые аллогенные нейроны сохраняли жизнеспособность в мозге человека до 16 лет при транзитной иммуносупрессии. Таким образом, как оказалось, полная антигенная совместимость источника клеток и реципиента трансплантата не является обязательной. Соответственно, в качестве универсального аллогенного источника ДА нейронов для лечения БП, помимо других заболеваний, расстройств и повреждений нервной системы предложены ЭСКч. Предполагается, что пациентам, получающим клетки в соответствии с настоящими изобретениями предложены, поставлен клинический диагноз БП. Предложены аутентичные ДА нейронные трансплантаты для применения при ранних вмешательствах и при БП от умеренной до тяжелой формы, включая пациентов, у которых

наблюдается недостаточный контроль симптомов при применении доступных медикаментозных средств, таких как леводопа, вспомогательные лекарственные средства и т.д. В некоторых вариантах реализации предложено введение нейронных трансплантатов пациентам, у которых наблюдаются слабовыраженные симптомы ранней БП (например, при применении нейровизуализации для обнаружения дофаминергической недостаточности, ФДГ-ПЭТ, симптомы дискинезии и т.д. Оценку дискинезии при мониторинге пациентов до и после трансплантации предложено проводить согласно унифицированной шкале двигательных расстройств UDysRS ("Unified Dyskinesia Rating scale") (Goetz, et al., *Mov Disord.* 23, 2398-2403 (2008)). Также для пациентов могут быть характерны "томограммы без признаков дофаминергической недостаточности" (SWEDDS), у некоторых из указанных пациентов может наблюдаться дистония или эссенциальный тремор. Необходимо проведение МРТ головного мозга для идентификации пациентов, у которых имеются другие (не-ДОФА) предрасполагающие факторы развития паркинсонизма. В некоторых вариантах реализации у пациентов наблюдается положительный отклик на леводопу. Определение претрансплантационных и посттрансплантационных параметров и конечных точек для мониторинга субъектов, таких как оценка моторной функции, немоторных функций, качества жизни, а также применение нейровизуализации и других биомаркеров. Моторная функция: Для оценки моторных симптомов БП широко применяют UPDRS и недавно валидированную MDS-UPDRS (Goetz, et al., *Mov Disord.* 23, 2129-2170 (2008)). Наряду с этим предложены и другие тесты, в том числе тесты с 10-минутной или 6-минутной ходьбой, TUG-тест (оценка времени до начала ходьбы, "Timed Up and Go Test"), оценка функциональной походки, функциональной досягаемости и др. для более пациент-ориентированного подхода к оценке результатов. Пациентов тестируют в период "выключения", а также "включения"; должны быть включены оценочные шкалы для периодов "выключения" (например, согласно рекомендациям Общества двигательных расстройств (Movement Disorder Society), основанным на клинометрических свойствах валидированных шкал для оценки истощения (Antonini, et al. *Mov Disord.* 26, 2169-2175 (2011)) и шкалы для оценки дискинезии (например, UdysRS (Goetz, et al., *Mov Disord.* 23, 2398-2403 (2008)). Предполагается осуществление видеозаписи стандартизированных обследований пациентов как в состоянии "включения", так и в состоянии "выключения". Другие функции помимо моторной: Оценивают, в первую очередь, когнитивные, психиатрические исходы и дисавтономию, помимо когнитивных способностей, депрессии, тревожности, апатии, сна, усталости, психозов и других немоторных симптомов до и после трансплантации. Качество жизни: Для мониторинга результатов у пациентов предложены БП-специфические опросники (PD-QUALIF) и/или хорошо валидированные шкалы оценки качества жизни, такие как SF-36.

Нейровизуализация и другие биомаркеры: функциональная визуализация широко использовалась в действующих хирургических методах исследованиях БП. Хотя анализ состояния трансплантата предусматривает применения визуализации на основе дофамина (например, ФДОПА-ПЭТ), предложены для применения техники нейровизуализации с применением других лигандов, включая визуализацию на основе маркеров, например, нацеленных на воспаление, а также не визуализируемых системных маркеров, например сбор экспериментальных данных. Визуализация может быть использована для предоперационного планирования, например для определения степени и локализации ДА-истощения в базальных ганглиях, и включение данных ПЭТ при индивидуальном хирургическом планировании для каждого пациента. Локализация трансплантата и число вводимых клеток. В некоторых вариантах реализации сайтами трансплантации (введения) клеток является скорлупа (Freed, et al. *N. Engl. J. Med.* 344, 710-719 (2001); Lindvall, et al. *Prog. Brain Res.* 82, 729-734 (1990) и посткомиссуральная часть скорлупы (Olanow, et al. *Ann. Neurol.* 54, 403-414 (2003)). В некоторых вариантах реализации предложено несколько точек размещения с применением различных вариантов хирургического доступа. Для мониторинга трансплантированных клеток предложено использовать МРТ с системой ClearPoint, обеспечивающей построение и визуализацию траектории в реальном масштабе времени и точность нацеливания. Указанную систему размещают в месте входа электродов для глубокой стимуляции головного мозга у пациентов с БП. Число клеток и состав трансплантата. Фетальные исследования проводили с применением по существу неизвестного числа ДА нейронов, так как использовался фетальный трансплантируемый материал, содержащий множество клеточных типов. На основании данных, представленных в настоящем документе, для восстановления функции ДА нейронов предложено расчетное количество, равное 100000-200000 жизнеспособных TH⁺ нейронов.

Иммуносупрессия. В некоторых вариантах реализации предусмотрена иммуносупрессия пациентов с трансплантатами, по меньшей мере на протяжении 6 месяцев и до продолжения в течение всей жизни пациента. В некоторых вариантах реализации у пациентов не проводят иммуносупрессию для трансплантации тканей.

Таблица 1. Результаты анализа экспрессии генов для генов, экспрессия которых значительно повышена или понижен на 11 день дифференцировки в популяции на основе вентральной пластинки, обработанной SHH/FGF8/Chir, по сравнению с популяцией, обработанной LSB

№	ID Колонки	Кратное изменение	p-значение
7304	FOXA1	22.5512	5.03E-16
7305	FOXA2	17.3328	5.70E-17
31270	SPON1	16.4393	2.14E-14
31684	SYT4	13.2693	9.61E-12
4334	COL22A1	8.54042	2.05E-17
6616	FBLN1	8.24162	4.97E-18
32035	TFF3	8.01805	1.08E-13
5324	DKK1	7.95664	1.19E-09
3244	CAPN6	7.58928	1.77E-08
2544	C20ORF56	7.58575	6.71E-15
27591	PKDCC	7.42271	2.02E-11
23584	LOC91461	5.43556	9.86E-09
5037	DDC	5.19301	2.09E-08
13598	LDB2	4.76303	2.92E-09
723	AMOT	4.58838	5.68E-08
4978	DBX1	4.40946	2.36E-09
31138	SOX8	4.32227	9.29E-08
30193	SILV	4.3198	2.52E-07
30148	SHISA2	4.31109	1.60E-07
31509	STK39	3.65624	2.90E-06
27661	PLCL2	3.63607	6.81E-11
24425	MGST1	3.59223	2.48E-11
32945	TSPAN7	3.57361	7.36E-07
29082	RHOU	3.51768	5.89E-06
9283	HS.19193	3.49663	6.24E-13
5478	DOCK10	3.43476	8.18E-07
25094	MMP11	3.40705	2.13E-08
29975	SERPINF1	3.36169	1.97E-10
29042	RGS4	3.33544	7.01E-06
926	APCDD1	3.33059	3.47E-10
№	ID колонки	кратное изменение	p-значение
12640	IRX3	3.32454	1.65E-05
26837	OSBPL10	3.3051	9.55E-07
32086	THBS4	3.29135	9.77E-07
14581	LOC100130506	3.1293	5.81E-09
4931	DAB2	3.02851	4.80E-09
12642	IRX5	2.95938	2.73E-08
13774	LMX1A	2.81057	1.42E-06
31516	STOM	2.76317	2.01E-07
26374	ODZ4	2.75644	3.06E-06
8210	GSC	2.75053	3.47E-07
26170	NRCAM	2.71264	1.82E-08
28414	PTCH1	2.63379	2.99E-08
31578	SULF2	2.59351	1.42E-07
7366	FREM1	2.5697	2.25E-07
13743	LITAF	2.55681	3.65E-08
26236	NTNG1	2.55383	1.78E-07
25869	NEUROG2	2.55012	5.05E-06
26132	NPY	2.54575	4.48E-06
25967	NKX2-1	2.52195	0.00023
27101	PCDH18	2.46481	1.69E-05
32557	TNFRSF19	2.45297	4.06E-08
5759	EFEMP1	2.44308	7.78E-09
31148	SP5	2.43459	5.34E-06
28069	PQLC3	2.42685	2.59E-05
30313	SLC20A2	2.40457	1.24E-06

30743	SNHG4	2.35277	8.69E-08	29606	SIPR3	2.08344	0.000479
27607	PKP2	2.34734	5.34E-05	27681	PLEKHA5	2.08285	0.000217
25520	MYL4	2.3327	3.93E-08	11495	HS.570308	2.08044	1.67E-06
26128	NPTX2	2.29568	1.08E-05	26232	NTN1	2.06755	2.49E-08
26006	NMD3	2.29039	3.18E-05	12635	IRS1	2.06435	0.000109
16924	LOC391019	2.28656	1.25E-05	20404	LOC648343	2.05497	0.000791
19975	LOC646966	2.26444	6.23E-05	29352	RPL15	2.05205	2.82E-06
29894	SEMA6A	2.25036	0.000844	33800	WNT5A	2.03874	1.08E-06
6161	EYA2	2.23175	0.00024	30481	SLC38A4	2.03653	1.13E-06
26105	NPFFR2	2.23095	7.31E-05	12059	HS.7093	2.01993	2.66E-06
4818	CXXC4	2.23047	1.66E-05	22500	LOC728126	2.0183	1.16E-06
2764	C4ORF14	2.22128	5.73E-06	16095	LOC136143	2.01775	5.71E-05
18269	LOC642989	2.22053	0.000735	12718	ITPR3	2.01384	1.67E-05
13059	KIAA1324L	2.21906	4.75E-05	4004	CHN2	2.00649	7.18E-06
23663	LRIG3	2.21159	4.38E-07	32162	TIPARP	2.00538	0.000633
6196	FABP5L2	2.19875	3.09E-05	482	ADSS	2.00282	0.000136
29347	RPL13A	2.19362	0.000122	2196	C17ORF45	2.00241	6.15E-05
12446	ILIRAPL1	2.19134	1.75E-05	3447	CCDC51	-2.00054	0.000177
28455	PTN	2.18577	9.36E-05	5945	ENC1	-2.0038	0.000468
30746	SNHG7	2.18224	4.35E-07	27915	POU3F2	-2.00877	2.04E-07
28788	RASL12	2.16856	1.39E-05	23143	LOC729779	-2.01527	0.000972
17150	LOC401074	2.16782	1.07E-06	23972	MAP1LC3A	-2.01892	3.37E-06
30283	SLC16A3	2.16541	6.06E-05	7611	GAS6	-2.02463	9.63E-08
15378	LOC100133008	2.16461	3.15E-05	17062	LOC399959	-2.02793	2.39E-05
32180	TLE6	2.16433	6.35E-07	29519	RSPO3	-2.03762	1.61E-05
12887	KCNQ1OT1	2.1641	2.97E-06	29038	RGS20	-2.04076	3.60E-09
31210	SPATS2L	2.16393	0.000597	19157	LOC644936	-2.04097	0.000128
4241	CMTM8	2.16297	0.000392	30502	SLC3A2	-2.04467	5.58E-05
30933	SNORD25	2.15953	0.000363	33508	VCAM1	-2.05421	2.51E-06
2803	C5ORF13	2.15734	3.94E-05	490	AFAP1L2	-2.05673	8.23E-07
32131	TIGA1	2.15335	1.80E-05	23275	LOC730167	-2.06009	0.000652
1667	BMP7	2.14281	0.000497	29215	RNF175	-2.06406	6.81E-05
20837	LOC649946	2.14098	8.39E-05	5923	EMILIN2	-2.06713	2.81E-06
25756	NCRNA00219	2.12543	6.42E-07	34367	ZNF462	-2.07292	1.63E-05
8003	GPM6B	2.08967	3.45E-05	26244	NUAK1	-2.0732	0.000172
5650	DYM	2.08942	0.000179	25818	NEBL	-2.07351	1.55E-06

29624	SALL3	-2.0787	2.15E-06	33806	WNT8B	-2.34155	3.96E-08
33491	VANGL2	-2.08497	0.000402	31388	SST	-2.34663	1.83E-06
30581	SLC7A8	-2.08722	1.40E-08	3188	CALCB	-2.34833	3.49E-06
875	ANXA3	-2.08727	0.000227	1075	ARHGEF6	-2.35421	1.54E-08
34075	ZFP36L1	-2.08803	5.08E-05	26885	OTX1	-2.35607	0.00023
15637	LOC100133760	-2.09319	8.14E-05	26393	OLFM3	-2.35759	2.32E-07
1227	ASNS	-2.10169	8.03E-05	33087	TUBB2A	-2.36013	0.000777
33804	WNT7B	-2.1052	3.00E-08	31747	TAGLN	-2.36809	2.16E-05
24064	MARS	-2.107	0.000146	5372	DMRTA1	-2.36884	5.28E-08
33725	WDR72	-2.11201	0.000617	3614	CD200R1	-2.37345	1.25E-14
31295	SPRY1	-2.12339	2.43E-05	17147	LOC401056	-2.37854	8.57E-10
7495	GABARAPL1	-2.12367	1.70E-05	33801	WNT5B	-2.3794	3.01E-08
4331	COL1A2	-2.12521	1.97E-05	28590	RAB11FIP1	-2.40833	6.65E-07
6821	FILIP1	-2.1288	0.00026	23362	LOC730525	-2.41129	1.59E-06
24246	METRN	-2.13118	1.99E-05	27658	PLCH1	-2.4212	3.31E-07
12056	HS.66187	-2.13789	2.97E-05	7000	FLJ32310	-2.42179	5.77E-06
28438	PTGIS	-2.14246	7.36E-06	3339	CBX4	-2.43314	1.13E-07
12980	KIAA0367	-2.15304	1.92E-05	6073	ERRFI1	-2.44539	1.44E-05
1575	BCMO1	-2.16946	7.40E-05	32521	TMSB15A	-2.45505	1.31E-05
25473	MXRA5	-2.17542	3.63E-06	13242	KLHL14	-2.51767	2.71E-11
32537	TNFAIP1	-2.17984	7.66E-06	30201	SIPA1L2	-2.52018	3.67E-06
34064	ZFHX4	-2.23036	0.00046	32760	TRIB1	-2.52274	1.73E-06
28787	RASL11B	-2.23056	0.000115	13641	LFNG	-2.53204	5.33E-07
5632	DUSP6	-2.23366	0.000732	12285	IER3	-2.54594	1.65E-07
3149	CACHD1	-2.23514	5.39E-05	28506	PTPRZ1	-2.55447	1.62E-06
3221	CAMKV	-2.25983	5.01E-08	1608	BEX2	-2.56331	0.000109
7248	FLNC	-2.26856	1.13E-05	32179	TLE4	-2.56513	0.000135
28307	PRSS8	-2.28456	1.35E-05	10888	HS.551307	-2.56708	0.000405
12662	ISYNA1	-2.29255	1.40E-05	683	ALPK2	-2.57443	2.83E-06
7524	GADD45A	-2.2962	7.46E-07	32551	TNFRSF12A	-2.59274	4.02E-06
5921	EMID2	-2.29995	1.55E-05	32610	TNRC9	-2.59782	3.23E-07
941	APLP1	-2.31453	2.03E-07	777	ANKRD1	-2.61554	3.15E-05
30576	SLC7A5	-2.32091	0.000757	13622	LEMD1	-2.62351	2.97E-05
7474	FZD3	-2.32644	6.13E-06	26777	OR7E156P	-2.64884	3.51E-07
5940	EMX2OS	-2.3303	2.65E-07	24377	MGC39900	-2.66479	1.46E-05
1259	ATF3	-2.34034	2.59E-06	12267	ID1	-2.66562	6.68E-07

27726	PLP1	-2.69279	9.13E-07	4121	CLDN1	-3.15492	1.93E-06
4350	COL4A6	-2.69704	1.17E-07	627	ALDH1A1	-3.15745	1.18E-12
4320	COL11A1	-2.71039	1.79E-09	629	ALDH1A3	-3.17887	4.46E-13
3127	CA2	-2.71276	2.35E-08	33501	VAT1L	-3.18253	1.21E-06
26151	NR2E1	-2.72059	4.25E-14	4912	CYR61	-3.18856	3.58E-07
31267	SPOCK1	-2.7283	3.38E-05	12781	KANK4	-3.20054	7.99E-12
13744	LIX1	-2.73818	9.34E-06	3067	C9ORF171	-3.24146	3.73E-11
32038	TFPI	-2.77685	6.23E-05	12363	IGFBP3	-3.34999	1.02E-06
32776	TRIM24	-2.79151	8.73E-08	4533	CRIP1	-3.45501	6.62E-08
32756	TRH	-2.79963	3.98E-07	3740	CDH11	-3.48609	2.23E-08
32652	TOX3	-2.81075	9.35E-06	816	ANKRD38	-3.48622	6.93E-12
2405	C1ORF21	-2.81457	9.49E-09	12730	JAG1	-3.58463	3.83E-08
5371	DMRT3	-2.82614	4.28E-09	12271	ID4	-3.72402	1.78E-12
32381	TMEM2	-2.83489	1.83E-05	810	ANKRD34B	-3.76606	1.15E-11
2437	C1ORF61	-2.85324	3.53E-09	12850	KCNJ13	-3.81092	2.16E-09
2868	C6ORF141	-2.8569	6.05E-06	6112	ETV5	-3.81591	4.37E-10
1178	ARX	-2.87861	0.000122	9265	HS.181245	-3.86611	1.24E-09
26245	NUAK2	-2.95666	4.14E-08	633	ALDH2	-3.87108	1.97E-09
33796	WNT2B	-2.96258	1.15E-10	26180	NRIP3	-3.92066	6.08E-08
28507	PTRF	-2.97439	2.07E-07	30413	SLC2A1	-4.11899	1.18E-05
7662	GCNT1	-2.98108	1.49E-06	5479	DOCK11	-4.35251	5.67E-09
5930	EMP1	-2.9918	1.11E-06	25658	NAV1	-4.35259	1.02E-10
31844	TBC1D9	-3.00324	2.53E-09	5349	DLL1	-4.47474	1.58E-07
4352	COL5A2	-3.02084	1.26E-07	34418	ZNF533	-4.49025	1.16E-09
4699	CTNNA2	-3.04046	6.91E-09	327	ACTC1	-4.63509	7.37E-09
2516	C20ORF177	-3.04277	4.86E-08	1037	ARHGAP15	-4.67561	9.89E-10
3518	CCL2	-3.04332	9.50E-11	31132	SOX3	-4.72958	7.45E-09
34315	ZNF385B	-3.05084	5.56E-07	26153	NR2F1	-4.73849	1.53E-09
12058	HS.7023	-3.0642	3.72E-08	3129	CA4	-4.7904	3.00E-09
23661	LRIG1	-3.07681	3.30E-07	33071	TTYH1	-4.79045	8.94E-14
7813	GLI3	-3.07936	1.22E-08	5766	EFHD1	-4.86615	1.16E-09
31513	STMN2	-3.09098	4.93E-06	867	ANXA1	-4.95401	1.41E-08
30023	SFRP1	-3.09686	1.13E-06	8500	HES4	-5.24189	1.63E-11
1128	ARMCX2	-3.09746	2.91E-06	4299	CNTNAP2	-6.14001	2.94E-08
4689	CTGF	-3.11416	4.47E-08	23947	MAMDC2	-6.36522	2.23E-10
6365	FAM181A	-3.1422	2.56E-09	7605	GAS1	-6.38074	2.63E-11
31151	SP8	-8.88965	4.42E-20	26065	NOS2A	-20.0139	2.83E-16
30024	SFRP2	-9.73482	4.24E-14	1501	BARHL1	-20.6077	2.59E-14
13677	LHX2	-10.9076	6.16E-11	26064	NOS2	-25.1751	7.45E-17
5939	EMX2	-11.5085	1.34E-19	8501	HES5	-38.4549	8.90E-22
21068	LOC650757	-12.1496	7.71E-20				
27068	PAX6	-15.7636	2.24E-22				
5554	DRD4	-17.3929	3.17E-16				

Таблица 2. Результаты анализа экспрессии генов для генов, экспрессия которых значительно повышена или понижен на 11 день дифференцировки в популяции на основе вентральной пластинки, обработанной SHH/FGF8/Chir, по сравнению с популяцией, обработанной только SHH/FGF8

№ колонки	ID набора данных	кратное изменение	p-значение
31575	SYT4	14.8775	3.24E-12
7195	FOXA1	11.8929	2.65E-13
4225	COL22A1	8.26361	3.21E-17
5215	DKK1	6.39507	1.32E-08
7956	GPR177	5.98201	5.65E-12
13508	LEF1	5.07514	2.45E-11
2435	C20ORF56	5.02955	2.71E-12
4928	DDC	5.0147	3.23E-08
11952	HS.71947	4.81098	5.13E-09
13665	LMX1A	4.7485	3.59E-10
12427	INHBE	4.72434	3.41E-07
32562	TPBG	4.63162	1.44E-09
1152	ATF5	4.48583	0.000153048
5369	DOCK10	4.23427	4.29E-08
31414	STOX1	4.20695	3.94E-10
4869	DBX1	4.17519	5.31E-09
31977	THBS4	4.13195	3.66E-08
2694	C5ORF13	4.0095	7.84E-10
31469	SULF2	3.83814	8.51E-11
31468	SULF1	3.81974	3.96E-07
34285	ZNF503	3.81092	2.76E-08
12531	IRX3	3.73598	3.93E-06
4935	DDIT4	3.73152	3.78E-05
31369	STC2	3.70632	8.48E-08
№ колонки	ID набора данных	кратное изменение	p-значение
27482	PKDCC	3.69823	2.20E-07
4257	COLEC12	3.6503	5.20E-06
31926	TFF3	3.62059	1.12E-08
25244	MSX1	3.60243	0.000146141
23475	LOC91461	3.58231	2.08E-06
26777	OTX2	3.47814	3.97E-09
13489	LDB2	3.44124	3.22E-07
13657	LMO3	3.29197	2.61E-12
817	APCDD1	3.21277	6.95E-10
4822	DAB2	3.18324	1.84E-09
25760	NEUROG2	3.16851	1.30E-07
31101	SPATS2L	3.15744	2.80E-06
1311	AXIN2	3.13274	1.80E-06
32448	TNFRSF19	3.11104	2.48E-10
4934	DDIT3	3.08248	4.83E-05
26776	OTX1	3.05293	6.14E-06
28360	PTPN13	3.03567	5.18E-06
994	ARL4A	2.98803	1.45E-07
26728	OSBPL10	2.94508	5.19E-06
32836	TSPAN7	2.86094	1.65E-05

5665	EFNB2	2.78085	0.000222563	5681	EGLN3	2.23059	0.000841858
8101	GSC	2.75066	3.46E-07	3837	CHAC1	2.22744	2.61E-05
6426	FAM84B	2.74213	7.89E-07	26045	NR2F2	2.21836	1.71E-05
29866	SERPINF1	2.73192	1.26E-08	7196	FOXA2	2.21691	8.01E-05
924	ARHGAP10	2.72522	3.36E-07	12950	KIAA1324L	2.18683	6.09E-05
31039	SP5	2.68162	9.57E-07	3667	CDK6	2.1717	0.00076066
28210	PSAT1	2.64735	9.82E-06	9540	HS.36053	2.15618	5.44E-07
28933	RGS4	2.6312	0.000148375	19012	LOC644860	2.15508	7.00E-06
13547	LGI1	2.61567	1.30E-06	4366	CPNE8	2.15418	9.80E-06
7369	FZD7	2.61404	2.46E-06	4936	DDIT4L	2.14147	0.000195501
25351	MUSTN1	2.55841	4.85E-07	29691	SDCBP	2.13721	3.10E-05
25411	MYL4	2.55345	4.77E-09	7144	FLRT3	2.11969	0.00033768
28424	PVRL3	2.55083	1.04E-07	5851	ENPP2	2.10048	0.000485738
299	ADAMTS9	2.53131	2.88E-08	1558	BMP7	2.0876	0.000718573
1555	BMP4	2.52708	9.40E-05	23514	LPAR4	2.08062	1.96E-06
31161	SPON1	2.5133	0.000145864	23554	LRIG3	2.07935	1.81E-06
26265	ODZ4	2.50312	1.46E-05	5964	ERRFI1	2.07249	0.000220066
33730	XBP1	2.50164	1.72E-06	3623	CDCA7	2.07177	0.000280326
28766	RBP1	2.49237	6.12E-05	30635	SNHG5	2.0594	4.95E-06
12533	IRX5	2.48929	7.43E-07	32620	TRAM2	2.04784	0.000111169
1118	ASNS	2.47416	4.50E-06	12809	KCTD6	2.04602	0.000114945
2770	C6ORF160	2.40219	3.58E-05	28901	RGL1	2.04043	0.000167278
12337	IL1RAPL1	2.40145	3.15E-06	30628	SNHG1	2.03706	0.000252445
12526	IRS1	2.3994	7.70E-06	27947	PPPDE1	2.02017	2.69E-05
7221	FOXJ1	2.39492	8.89E-05	5434	DPYSL3	-2.00257	0.000139976
28647	RARB	2.37013	9.11E-09	23863	MAP1LC3A	-2.00377	4.01E-06
14472	LOC100130506	2.36331	1.36E-06	24226	MGC18216	-2.01184	0.000204988
3979	CITED2	2.36201	2.92E-05	4818	D4S234E	-2.01244	8.77E-05
31430	STT3B	2.34069	1.29E-05	4825	DACH2	-2.01277	8.71E-07
26023	NPY	2.3346	1.98E-05	4386	CPXM2	-2.02106	2.02E-05
6052	EYA2	2.3192	0.000136915	32224	TMEM169	-2.02651	0.000222019
26991	PCDH17	2.31776	8.71E-05	151	ACBD7	-2.03074	6.94E-05
26127	NTNG1	2.31615	1.30E-06	8643	HOOK1	-2.03984	1.85E-05
373	ADSS	2.29099	1.20E-05	4278	COPG2IT1	-2.04004	8.62E-07
6120	FAM107A	2.26256	0.000677009	32981	TUBB3	-2.04044	0.000989413
28387	PTPRM	2.25934	1.41E-05	5887	EPHA1	-2.05082	1.41E-06
31572	SYT17	2.257	7.10E-05	28929	RGS20	-2.06283	2.60E-09
7143	FLRT2	2.24042	1.35E-07	28068	PRKCH	-2.06869	4.13E-06
32372	TMEM88	2.2394	4.55E-05	33539	WBP2	-2.0692	0.000157614
27552	PLCL2	2.23488	1.24E-06	23711	LY6E	-2.07026	8.93E-05

29803	SEPP1	-2.08034	2.48E-05	27531	PLAC9	-2.24346	9.11E-08
12713	KCND2	-2.08768	1.63E-08	25743	NES	-2.2469	3.16E-06
34309	ZNF533	-2.08871	0.000231468	31405	STMN3	-2.25856	0.000796798
14009	LOC100129034	-2.09106	4.54E-07	7536	GCA	-2.27697	1.34E-05
25915	NMU	-2.09244	0.000184692	12275	IGSF3	-2.28535	4.08E-06
24132	MEST	-2.09269	2.92E-06	17038	LOC 401056	-2.2854	2.45E-09
2715	C5ORF41	-2.09563	1.42E-05	4533	CSRP2	-2.28899	0.000244001
27778	PON2	-2.09758	1.79E-05	31606	TACSTD1	-2.28933	0.000115538
24105	MEG3	-2.10214	5.69E-07	29372	RRAGD	-2.29258	0.000537359
31812	TCF7L2	-2.10261	0.000153698	5884	EPCAM	-2.29475	0.00099285
33783	YBX2	-2.1118	6.90E-06	28398	PTRF	-2.29476	1.92E-05
28329	PTGIS	-2.11465	9.61E-06	12672	KANK4	-2.29735	1.73E-08
6694	FHDC1	-2.11553	8.86E-06	3505	CD200R1	-2.30795	3.06E-14
24175	MFNG	-2.11579	2.95E-05	33264	UPK2	-2.30847	1.37E-10
6640	FEZ1	-2.11631	2.58E-06				
2407	C20ORF177	-2.12232	3.62E-05	24978	MMD	-2.317	1.46E-05
26783	OVOL2	-2.12627	3.53E-07	6002	ETV4	-2.32842	6.04E-09
28883	RFTN2	-2.13498	7.25E-08	27655	PMP22	-2.33585	4.94E-12
19038	LOC644919	-2.13675	2.95E-06	5657	EFHD1	-2.33997	7.47E-05
30004	SH3BP4	-2.13785	0.000314453	31186	SPRY1	-2.34859	3.56E-06
31020	SOX2	-2.14642	0.000107169	3631	CDH11	-2.35006	1.77E-05
16268	LOC284422	-2.16056	1.07E-05	29555	SAT1	-2.35602	2.21E-05
4819	DAAM1	-2.16701	3.85E-05	33268	UPP1	-2.36162	5.38E-08
32404	TMPRSS2	-2.1693	6.26E-07	1968	C14ORF4	-2.36739	2.59E-06
26668	OR7E156P	-2.17193	1.53E-05	9512	HS.34447	-2.37168	7.49E-08
12609	ITPR3	-2.18226	3.09E-06	16243	LOC283953	-2.38022	4.57E-07
6372	FAM65B	-2.18271	1.37E-06	3203	CAV2	-2.38208	1.09E-11
12635	JARID2	-2.18541	4.46E-05	26223	NYNRIN	-2.40311	1.90E-05
25024	MOBKL2B	-2.19737	5.45E-05	22623	LOC728715	-2.41353	0.000504831
31567	SYT13	-2.19832	2.30E-05	25084	MPPED2	-2.42024	6.42E-10
25658	NDRG1	-2.20101	5.25E-07	13403	LAMC2	-2.42245	5.32E-10
24318	MGST3	-2.20252	3.24E-07	25083	MPPED1	-2.42332	3.73E-14
2147	C18ORF26	-2.2117	2.55E-06	13402	LAMC1	-2.43845	7.40E-05
31010	SOSTDC1	-2.21381	2.23E-08	15722	LOC 100134265	-2.44777	4.60E-06
4662	CXCL14	-2.21955	1.81E-08	5836	ENC1	-2.45175	1.84E-05
33161	UCA1	-2.21966	2.19E-05	244	ACVR2A	-2.46307	1.87E-06
12176	IER3	-2.21992	2.75E-06	33616	WDR72	-2.46656	6.61E-05
7171	FNBP1	-2.23104	1.98E-05	28509	RAB31	-2.47199	1.57E-06
12199	IFITM3	-2.23167	4.22E-06				
25635	NCRNA00153	-2.24173	2.01E-05				

3629	CDH1	-2.4799	3.05E-06	31158	SPOCK1	-3.02198	8.12E-06
28905	RGMA	-2.50113	4.45E-06	25849	NKD2	-3.02555	4.12E-11
29475	S100A11	-2.50568	3.24E-06	25471	MYT1	-3.03712	6.21E-09
8259	HAPLN1	-2.50809	7.14E-07	6856	FLJ25404	-3.03813	1.95E-08
3942	CHST7	-2.51075	9.78E-08	30304	SLC2A1	-3.05478	0.000275534
12543	ISL1	-2.51716	2.76E-10	12256	IGFBP5	-3.06686	2.00E-06
28305	PTCH1	-2.52418	7.32E-08	23779	MAF	-3.07491	2.81E-08
32541	TOX	-2.5288	5.34E-09	28198	PRSS8	-3.08336	6.31E-08
6067	F2RL1	-2.54309	2.36E-08	9923	HS.509165	-3.09539	2.57E-07
32334	TMEM54	-2.57701	2.04E-06	4243	COL5A2	-3.10066	8.01E-08
3436	CCND1	-2.58061	6.72E-05	3112	CAMKV	-3.10668	3.37E-11
707	ANKRD38	-2.58621	4.12E-09	29915	SFRP2	-3.13051	3.42E-07
5241	DLL3	-2.5911	8.77E-08	13092	KIT	-3.13441	8.27E-12
33424	VGF	-2.59836	0.000406676	6684	FGFR3	-3.13726	7.73E-09
23253	LOC730525	-2.61609	3.32E-07	8646	HOPX	-3.15424	1.07E-14
31368	STC1	-2.63136	1.20E-05	29497	S1PR3	-3.15587	8.43E-07
31910	TFAP2C	-2.63773	4.72E-08	33399	VCAM1	-3.15952	2.02E-10
25012	MN1	-2.6469	8.33E-08	5240	DLL1	-3.18075	1.28E-05
28419	PVALB	-2.67012	1.23E-10	28112	PRODH	-3.18595	2.33E-07
6960	FLJ37644	-2.67066	1.78E-12	23200	LOC730278	-3.27115	1.92E-07
7417	GADD45G	-2.68804	2.14E-06	1202	ATP1B2	-3.29446	2.34E-08
4709	CXXC4	-2.68958	5.39E-07	6720	FJX1	-3.3039	6.85E-07
8050	GRHL3	-2.73097	4.15E-11	3609	CDC42EP4	-3.33348	2.25E-09
23990	MBIP	-2.73995	9.29E-07	12198	IFTIM2	-3.35237	3.41E-11
5418	DPPA4	-2.75778	5.66E-08	3679	CDKN1C	-3.37225	1.15E-09
32212	TMEM158	-2.77503	9.30E-06	3202	CAV1	-3.37517	5.73E-13
5896	EPHB1	-2.77518	2.29E-06	31171	SPRED1	-3.42954	3.76E-08
31404	STMN2	-2.79651	2.03E-05	30010	SH3GL3	-3.43813	3.73E-11
12454	INSM1	-2.81526	1.15E-09	8335	HDC	-3.45787	1.51E-12
13142	KLHL24	-2.81638	2.31E-07	8391	HES4	-3.49495	1.00E-08
9856	HS.475334	-2.82304	1.09E-05	33335	USP44	-3.50303	6.22E-11
33125	UBL3	-2.85607	2.77E-08	1101	ASCL1	-3.54534	1.26E-11
13655	LMO1	-2.90621	4.10E-06	29945	SFTA3	-3.5611	1.59E-07
6003	ETV5	-2.90987	5.54E-08	13619	LIPA	-3.56979	1.34E-08
966	ARHGEF6	-2.92751	9.82E-11	27178	PDPN	-3.72978	5.33E-12
31187	SPRY2	-2.94814	6.74E-09	7370	FZD8	-3.74383	7.14E-09
28501	RAB25	-2.97139	5.77E-07	3647	CDH3	-3.80687	3.54E-09
4675	CXCR7	-2.9864	6.13E-07	2759	C6ORF141	-3.94476	5.10E-08
32652	TRIB2	-2.99455	8.47E-08	13595	LIMCH1	-3.94759	2.52E-11
28397	PTPRZ1	-3.02099	8.00E-08	13513	LEMD1	-3.98954	6.68E-08

5961	ERP27	-4.02755	8.38E-13	32962	TTYH1	-6.33607	1.00E-15
29666	SCRG1	-4.03799	1.96E-17	5523	DUSP6	-6.34711	8.15E-10
7286	FRZB	-4.04927	2.19E-05	6091	FABP7	-6.56016	2.28E-09
12977	KIAA1598	-4.04996	4.12E-09	5248	DLX5	-6.56829	8.74E-13
2380	C20ORF100	-4.16273	2.94E-12	12754	KCNK12	-6.912	1.07E-12
25866	NKX6-2	-4.17171	1.46E-10	30165	SLC15A3	-7.17663	1.60E-19
31030	SOX9	-4.21749	9.69E-10	6675	FGF8	-7.58196	1.32E-18
27805	POU3F1	-4.22404	1.53E-11	31023	SOX3	-7.63996	1.53E-11
7879	GPC4	-4.23918	8.64E-08	8395	HESX1	-8.28818	3.36E-10
17977	LOC642590	-4.36113	1.29E-10	28692	RAX	-8.87763	6.24E-12
19608	LOC646347	-4.53146	1.77E-08	20959	LOC650757	-9.74543	1.18E-18
5238	DLK1	-4.62809	8.12E-05	14470	LOC100130502	-10.333	1.53E-10
8401	HEY1	-4.68961	2.52E-12	13568	LHX2	-14.1638	4.81E-12
30592	SMS	-4.74656	5.18E-12	30111	SIX3	-15.019	8.24E-13
29914	SFRP1	-4.84227	1.53E-09	12197	IFITM1	-16.4704	9.16E-16
13376	L1TD1	-4.85832	6.96E-08	25859	NKX2-2	-18.6642	7.93E-20
7984	GPR56	-4.87971	1.88E-13	12254	IGFBP3	-19.1294	8.81E-16
7367	FZD5	-5.00247	2.43E-11	8392	HES5	-33.7356	2.69E-21
25858	NKX2-1	-5.06868	2.84E-08	30114	SIX6	-39.4411	2.59E-18
7801	GNG8	-5.39693	2.22E-13				
9156	HS.181245	-5.99308	1.43E-12				

Таблица 3. Результаты анализа экспрессии генов для генов, экспрессия которых значительно повышена или понижена на 25 день дифференцировки по сравнению с днем 13 в популяции на основе вентральной пластинки, обработанной SHH/FGF8/Chir

№ колонки	ID колонки	кратное изменение	p-значение	4342	COL3A1	10.0606	3.86E-06
				12149	HS.7023	9.60731	3.97E-08
				5691	EBF3	9.28771	5.13E-11
				29820	SCG2	9.22584	1.02E-06
				12655	INSM2	9.01409	3.73E-12
				27988	POSTN	8.79262	1.09E-10
№ колонки	ID колонки	кратное изменение	p-значение				
				28590	PTPRO	8.70512	3.13E-10
				30386	SLC17A6	8.22904	2.02E-06
				31767	SYT13	8.1735	3.63E-07
1209	ASCL1	33.085	1.60E-09				
3978	CHGA	28.1727	4.44E-13				
31604	STMN2	20.9978	1.47E-08				
32159	TH	15.2965	2.12E-08				
31606	STMN4	15.2102	3.72E-09				
7685	GAP43	12.5729	5.42E-09				
4926	D4S234E	10.7914	4.91E-08				
8593	HES6	10.6527	2.94E-09				

30390	SLC18A1	8.15448	6.47E-15
5689	EBF1	8.05344	2.30E-06
5029	DCX	8.00552	8.30E-08
2470	CIQL1	7.47022	8.68E-10
12609	INA	6.92121	5.72E-07
26250	NR4A2	6.75723	1.27E-13
29624	RTN1	6.6247	6.52E-07
9374	HS.19193	6.58382	1.95E-08
436	ADCYAP1	6.49154	9.75E-11
1607	BEX2	6.33986	8.93E-09
34098	ZCCHC12	6.19663	9.95E-07
7056	FLJ25404	6.19296	2.14E-06
31605	STMN3	6.17605	8.77E-07
№	ID колонки	кратное	p-значение
колонк		изменен	
и		ие	
7997	GNG3	6.1196	1.26E-06
25922	NEFM	6.11347	2.51E-04
12359	ID2	6.07844	1.32E-06
29017	REEP1	6.04393	2.25E-06
30810	SNAP25	6.03677	3.62E-06
25671	MYT1	5.86419	8.19E-06
33297	UBE2J1	5.76887	6.22E-08
5349	DLL3	5.76451	4.92E-08
29133	RGS4	5.69761	1.87E-06
28123	PPP2R2B	5.56067	2.80E-08
27287	PCSK1N	5.43156	3.22E-09
32126	TFF3	5.26964	3.17E-08
27288	PCSK2	5.22877	9.14E-10
4533	CRIP2	5.18375	8.40E-08
12506	IL13RA2	5.1246	1.31E-06
32417	TMEM163	5.01765	7.55E-09
30813	SNAP91	4.92061	4.28E-05
13260	KIF5C	4.86241	2.93E-06
15798	LOC100133923	4.83074	3.74E-07
32412	TMEM158	4.76646	4.81E-06
3770	CDK5R1	4.75524	1.18E-05
5739	EEF1A2	4.75232	9.53E-05
32697	TNRC4	4.75179	1.29E-05
5455	DNER	4.71709	1.52E-05
6700	FAT3	4.68785	1.91E-06
6197	ETS2	4.67343	1.08E-10
25753	NBEA	4.65265	6.99E-07
12944	KCNJ16	4.53077	3.54E-12
3979	CHGB	4.52218	7.76E-05
25562	MXD4	4.445	7.25E-07
3941	CGNL1	4.44195	7.24E-06
26499	ONECUT2	4.37403	2.39E-07
2867	C6ORF141	4.35252	2.58E-10
12362	ID4	4.32183	6.05E-05
26011	NHLH2	4.31928	5.91E-05
2035	C14ORF132	4.31666	9.46E-07
9428	HS.204481	4.29602	1.66E-09
8288	GRM8	4.17846	1.62E-06
7617	GADD45G	4.17663	2.21E-06
4298	CNTNAP2	4.13552	4.10E-05
1408	AUTS2	4.13111	2.79E-05
23822	LRRC4C	4.11703	1.27E-09
31454	SRRM4	4.11574	8.04E-07
4003	CHN2	4.09589	3.30E-07
27665	PITX2	4.08382	1.94E-11
13296	KLC1	4.0528	4.19E-06
27773	PLEKHA6	4.0464	2.57E-07
25618	MYLIP	3.99268	2.96E-06
5036	DDC	3.96553	8.46E-05
33181	TUBB3	3.93922	1.52E-04
24522	MIAT	3.93906	9.87E-05
27411	PEG10	3.9374	3.48E-05
32343	TMEFF2	3.92112	6.49E-07
29821	SCG3	3.92108	6.47E-06
31759	SYP	3.89869	2.51E-04
9425	HS.202577	3.89053	2.85E-07

33943	XKR4	3.87043	1.49E-06	15034	LOC100131718	3.0686	4.01E-05
33178	TUBB2A	3.86265	6.11E-05	8706	HIST1H4K	3.06394	1.84E-06
12654	INSM1	3.84646	5.59E-05	28238	PRICKLE2	3.06341	1.98E-06
13236	KIF1A	3.84543	3.27E-05	31429	SRGAP3	3.0575	7.84E-06
25721	NAPB	3.81995	3.50E-05	13760	LHFP	3.04812	0.000126565
31765	SYT11	3.77827	1.14E-05	3181	CADPS	3.03806	6.60E-06
5877	ELAVL3	3.70028	9.69E-05	3186	CALCA	3.03372	3.13E-08
13858	LMO4	3.69359	2.09E-06	1672	BMPR2	3.03171	9.26E-06
4103	CLASP2	3.64468	1.79E-05	25861	NDRG4	3.00851	0.000239868
2956	C7ORF41	3.63616	5.69E-05	2265	C18ORF8	2.99462	9.07E-06
33362	UCHL1	3.61003	5.64E-05	4698	CTNNA2	2.962	6.07E-05
29645	RUNDC3A	3.54448	8.42E-05	1606	BEX1	2.96088	5.37E-05
24063	MAP1LC3A	3.53736	4.36E-06	32769	TPH1	2.96087	2.88E-07
5944	ENC1	3.51677	0.000141473	31986	TCEAL7	2.95947	3.43E-05
28730	RAB40B	3.48084	4.57E-07	3322	CBLN2	2.95729	1.12E-04
25162	MLLT11	3.4633	3.13E-05	29639	RUFY3	2.95504	2.59E-05
7469	FRMD4A	3.46181	7.40E-06	3851	CELSR3	2.9545	6.27E-04
13070	KIAA0363	3.43032	6.39E-05	3177	CADM1	2.95335	1.81E-04
13342	KLHL24	3.41191	3.34E-05	20895	LOC649841	2.94392	2.21E-05
7988	GNB3	3.38669	3.31E-09	13713	LEMD1	2.93152	9.17E-06
31840	TAGLN3	3.36355	1.67E-03	8184	GPR56	2.93095	3.08E-04
12147	HS.66187	3.34592	0.000125172	31935	TBC1D9	2.92862	6.60E-05
4549	CRMP1	3.32015	2.42E-04	8046	GOLSYN	2.9099	2.80E-06
23453	LOC730525	3.31501	1.64E-03	33004	TSHZ1	2.90158	2.76E-07
31514	ST6GALNAC5	3.29449	1.19E-05	5876	ELAVL2	2.90115	0.00136166
27054	PAFAH1B1	3.25816	1.30E-04	12733	IRX5	2.88659	1.21E-04
32432	TMEM170B	3.25165	2.44E-05	1254	ATCAY	2.86583	7.41E-04
27686	PKIA	3.24255	4.29E-05	31763	SYT1	2.86449	1.02E-03
1748	BSN	3.2101	0.000169219	29193	RIMBP2	2.84834	6.29E-06
6213	EVL	3.17682	3.36E-05	28741	RAB6B	2.84821	0.000698361
34217	ZMIZ1	3.16249	3.29E-04	27533	PHF21B	2.8457	6.44E-05
16419	LOC283514	3.15057	4.57E-06	24135	MAPT	2.83633	5.22E-04
32081	TERF2IP	3.13818	3.43E-05	10116	HS.505676	2.83499	1.50E-05
4932	DACH1	3.11457	7.79E-06	8712	HIST2H2BE	2.82687	0.000157254
5424	DNAJC19	3.09946	1.64E-09	24061	MAP1B	2.82235	0.000357426
8093	GPM6A	3.07619	1.59E-03	13054	KIAA0182	2.8162	2.66E-04

34044	ZBTB20	2.81539	8.77E-08	6514	FAM36A	2.56726	7.62E-05
29509	RPRM	2.81168	0.000475144	13640	LBH	2.56551	1.34E-05
34007	YPEL5	2.81061	1.16E-04	9920	HS.437111	2.55902	4.44E-05
13609	LANCL2	2.80004	8.07E-06	33904	WSB2	2.55865	5.08E-04
940	APLP1	2.77078	2.57E-05	9757	HS.369017	2.55838	4.25E-05
29849	SCN3B	2.76654	7.14E-05	18920	LOC644250	2.55607	0.000475214
29201	RIMS3	2.76205	2.94E-04	27311	PDCD4	2.55148	0.000139052
27394	PDZD4	2.75594	0.000212095	7562	FZD1	2.54808	2.48E-06
1364	ATP6V1G2	2.75366	0.0012022	13191	KIAA1688	2.54643	9.31E-05
31778	SYT7	2.74946	4.15E-05	4292	CNTN2	2.53802	2.29E-04
32351	TMEM106A	2.73965	0.000217998	32474	TMEM200A	2.53495	4.93E-07
7717	GATS	2.72521	3.10E-05	6635	FAM89B	2.5341	1.64E-05
506	AGAP3	2.71696	2.07E-05	23500	LOC730990	2.53197	3.94E-05
24141	MARCH4	2.70659	8.96E-04	1375	ATP9A	2.52973	1.09E-04
5348	DLL1	2.7028	2.05E-04	8126	GPR137C	2.52944	0.000217768
6212	EVI5L	2.6886	6.79E-05	19248	LOC644936	2.52867	4.31E-04
3196	CALM1	2.68129	8.50E-05	4916	CYTH2	2.5213	6.31E-06
31386	SPRY1	2.67788	1.15E-03	20654	LOC648921	2.51994	1.76E-03
33128	TTR	2.66999	2.76E-05	2445	C1ORF71	2.50491	9.78E-04
				21820	LOC652726	2.49851	5.58E-05
297	ACPL2	2.66551	1.52E-06	16100	LOC100134868	2.49288	0.00076351
5325	DKK3	2.65119	5.63E-05	27105	PAPSS2	2.49026	0.000148906
23853	LRRN3	2.64615	1.37E-03	32246	TIMP2	2.48501	3.26E-05
32615	TMSL3	2.63733	4.56E-05	27648	PIP5K2B	2.48028	0.000236563
29822	SCG5	2.63452	1.42E-04	12214	HSBP1	2.47723	1.82E-04
32000	TCF12	2.63327	1.80E-06	32754	TP53INP2	2.47324	2.42E-05
3497	CCDC92	2.6296	2.23E-05	29037	REM2	2.46751	0.000170127
5610	DUSP1	2.60841	1.78E-04	34742	ZNF84	2.46625	2.39E-04
14524	LOC100130053	2.60135	4.53E-04	3872	CENTA1	2.46106	3.74E-04
26279	NRSN1	2.59336	0.00111467	23918	LY6H	2.45793	0.000317539
25711	NANOS3	2.58916	4.15E-06	29595	RSBN1	2.45785	8.01E-04
5543	DPYSL4	2.58236	0.000223516	1733	BRP44L	2.45488	5.07E-04
6231	EXOC7	2.58163	4.89E-06	2751	C3ORF70	2.45314	1.92E-06
24134	MAPRE3	2.57689	4.85E-05	12862	JUN	2.4481	4.37E-04
9382	HS.193784	2.57602	2.18E-06	15357	LOC100132727	2.44481	0.00058635
1608	BEX4	2.57251	9.83E-05	13224	KIDINS220	2.43944	0.00068445

33183	TUBB4Q	2.43584	0.00171503	30325	SKP1	2.28675	1.76E-04
685	ALPP	2.43222	3.60E-05	2743	C3ORF58	2.28463	0.000119256
14002	LOC100128274	2.43042	1.90E-04	27566	PHYHIPL	2.28388	1.72E-03
20699	LOC649095	2.42655	0.00040167	27332	PDE4D	2.28016	3.70E-05
7123	FLJ35390	2.39837	0.00162187	760	ANK2	2.27803	3.84E-05
16740	LOC387856	2.39594	8.21E-04	1101	ARL3	2.26792	1.03E-03
7033	FLJ22184	2.3897	4.07E-04	25218	MNX1	2.26631	4.41E-07
20602	LOC648740	2.38616	8.38E-06	7255	FLJ44048	2.26493	6.84E-06
10392	HS.538962	2.38583	0.000324449	30029	SERINC1	2.26355	3.12E-04
31615	STOX2	2.38135	4.42E-04	34800	ZSWIM6	2.2634	3.19E-04
23592	LOC731895	2.3779	0.000838915	13943	LOC100128062	2.26302	0.000498795
32863	TRIM2	2.37536	5.63E-04	18811	LOC644033	2.2611	5.93E-04
30075	SERTAD4	2.36897	0.000363024	20075	LOC646996	2.25787	1.36E-04
26135	NOL4	2.36463	0.000261492	7976	GNAO1	2.25676	0.00121073
27620	PIK3R1	2.35977	1.01E-07	22799	LOC728661	2.25642	0.000599836
27073	PAK3	2.34949	1.62E-04	979	APPBP2	2.25324	6.41E-04
27855	PMP22	2.34705	7.89E-06	25716	NAPIL3	2.24879	9.43E-04
27636	PINK1	2.34687	1.17E-05	14359	LOC100129502	2.24469	1.52E-04
3223	CAMSAP1	2.34021	1.96E-04	25580	MYCBP2	2.24333	0.000445387
9323	HS.168950	2.33738	1.84E-04	27083	PAM	2.23671	0.00170991
17248	LOC401115	2.33367	0.000151535	22583	LOC728105	2.2358	0.000601193
6270	F3	2.32945	2.00E-08	29747	SARM1	2.2285	5.83E-07
2256	C18ORF32	2.32914	4.41E-04	7602	GABRB3	2.22682	4.00E-04
777	ANKRD10	2.32837	2.48E-04	30261	SIAH3	2.22476	1.89E-05
5372	DMRTA2	2.32784	5.27E-06	27664	PITX1	2.22382	0.00102378
6347	FAM117B	2.32504	9.42E-04	19467	LOC645452	2.21703	0.000168591
731	AMY1A	2.3232	0.000158787	6533	FAM46A	2.21591	1.24E-03
7610	GABRR1	2.31983	8.23E-08	26308	NT5C2	2.21285	0.00159191
1520	BAZ2B	2.30948	5.18E-04	1086	ARID5B	2.21184	0.000139405
7920	GLRA2	2.30858	6.83E-05	494	AFF3	2.21139	1.28E-03
10190	HS.522924	2.30739	1.62E-03	29124	RGS16	2.21012	2.33E-05
7762	GDAP1	2.30342	6.22E-05	10056	HS.475334	2.20669	1.41E-03
31325	SPHK2	2.29983	1.68E-04	3738	CDH10	2.20522	0.000389319
31499	ST18	2.2969	9.74E-04	9819	HS.388347	2.2022	2.82E-05
15124	LOC100131989	2.29335	1.57E-04	34703	ZNF786	2.20193	1.65E-03
23665	LOC88523	2.29171	0.000476299	8705	HIST1H4J	2.19897	4.86E-06

9740	HS.36053	2.19737	3.65E-05	4229	CMIP	2.10246	0.000705627
651	ALG13	2.19414	4.86E-05	30224	SHANK2	2.10164	0.000611099
33588	VASH2	2.19373	0.000586609	23763	LRP1B	2.09999	4.76E-05
28810	RALGPS1	2.19311	0.000999046	6724	FBXL16	2.09975	8.65E-04
5774	EFNB3	2.191	0.000919096	26092	NLRP8	2.09701	0.00161834
1745	BSCL2	2.18758	8.17E-04	17496	LOC440704	2.09699	0.0015232
29151	RHBDL3	2.18758	4.86E-05	2543	C20ORF56	2.09698	4.79E-07
3740	CDH12	2.18674	0.000112317	32624	TMX4	2.09279	8.41E-04
24064	MAP1LC3B	2.18347	2.00E-04	20006	LOC646821	2.0917	5.47E-05
32539	TMEM59	2.17758	1.77E-03	25809	NCOA6	2.09025	1.61E-03
33171	TUBA3E	2.17556	2.58E-04	2811	C5ORF28	2.08938	6.33E-04
526	AGPAT4	2.17042	1.95E-04	3279	CASD1	2.0821	6.10E-05
27832	PLXNA1	2.16997	0.000477137	28256	PRKAR1A	2.08207	0.00119569
34219	ZMPSTE24	2.16821	0.00130116	6208	EVI1	2.07806	4.85E-05
34669	ZNF738	2.16494	0.00145642	6920	FJX1	2.07539	1.80E-03
28749	RAB9B	2.16376	1.41E-03	31199	SORBS2	2.07266	7.37E-05
3350	CCBE1	2.16311	2.69E-04	3968	CHD6	2.06939	4.92E-05
5875	ELAVL1	2.15865	6.37E-04	34605	ZNF652	2.06441	0.00172675
13154	KIAA1370	2.15727	5.07E-05	4838	CYCS	2.06436	1.39E-03
1356	ATP6V1B2	2.15309	0.000839601	34025	ZADH2	2.05857	3.02E-05
6457	FAM181B	2.15303	6.91E-04	17246	LOC401098	2.05589	1.58E-03
25137	MKL2	2.14461	0.000214816	27462	PFN2	2.05533	1.58E-03
27876	PNMA1	2.14384	0.000290225	27137	PARP6	2.05441	5.65E-04
23806	LRRC37B2	2.14195	4.81E-04	5651	DYNC1I1	2.04874	0.000834135
6851	FGD3	2.139	1.84E-04	7587	GABARAPL2	2.04534	0.00165234
1746	BSDC1	2.13842	0.000430355	149	AASDHPPT	2.04017	7.58E-04
27997	POTEF	2.13305	0.000655028	1970	C12ORF51	2.038	0.000668525
2969	C7ORF55	2.12929	5.66E-05	31721	SVOP	2.03603	7.00E-04
29923	SEC11C	2.12843	8.11E-04	1389	ATXN1	2.03408	3.27E-05
31488	SSX2IP	2.12215	5.19E-06	20667	LOC648980	2.03345	0.00062575
29277	RNF128	2.12203	5.41E-06	24523	MIB1	2.03159	3.22E-04
30348	SLC12A2	2.12048	0.000343525	31982	TCEAL3	2.03073	0.00151379
8277	GRK5	2.11347	0.000106085	12229	HSD17B7	2.03003	1.50E-03
8573	HEPACAM2	2.11332	2.39E-09	27402	PDZRN4	2.02983	2.33E-05
1610	BEXL1	2.10951	2.62E-04	6395	FAM13B	2.02944	3.18E-04

1349	ATP6V0C	2.02572	1.08E-03	13396	KNTC1	-2.04704	1.95E-05
12828	JAKMIP2	2.01869	8.10E-04	19027	LOC644464	-2.051	0.000744833
34227	ZMYND11	2.01687	0.00171037	1355	ATP6V1B1	-2.0528	0.000263628
31603	STMN1	2.00603	0.000940483	32263	TKT	-2.05643	0.000380042
29145	RHBDD2	2.00523	6.87E-04	1039	ARHGAP19	-2.05734	6.74E-05
25808	NCOA5	2.00244	0.000102715	4923	CYYR1	-2.05748	1.68E-05
30330	SLAIN1	2.00203	1.00E-03	30076	SESN1	-2.05841	2.09E-04
2195	C17ORF45	-2.00166	0.00119767	5054	DDX10	-2.06089	0.000505
23469	LOC730746	-2.00168	1.67E-03	12782	ITGB3BP	-2.06492	6.73E-06
30825	SND1	-2.00433	0.00128091	17492	LOC440589	-2.06666	4.64E-04
19456	LOC645436	-2.00559	1.69E-03	23246	LOC729816	-2.06873	0.000791801
6242	EXOSC7	-2.00603	0.000798232	24128	MAPKAPK3	-2.06933	0.00146997
17727	LOC442232	-2.00726	7.96E-05	12221	HSD17B11	-2.07106	2.25E-05
28062	PPIH	-2.00996	8.70E-04	32916	TRIM71	-2.07489	2.28E-05
23234	LOC729779	-2.01096	4.05E-04	16186	LOC136143	-2.07533	4.81E-04
33239	TYK2	-2.01275	0.000787726	31614	STOX1	-2.07691	0.000191887
27020	P4HA2	-2.01467	1.30E-03	28717	RAB38	-2.07726	6.33E-04
4563	CRTAP	-2.01592	2.86E-06	21994	LOC653156	-2.07967	1.41E-03
29147	RHBDF1	-2.01731	9.21E-04	29560	RPSA	-2.08096	0.000379606
18367	LOC643007	-2.01867	0.000867101	17241	LOC401074	-2.08141	6.58E-08
2331	C1ORF106	-2.02039	2.06E-04	8588	HES1	-2.08285	0.000819562
1332	ATP5G2	-2.02135	0.00169599	29494	RPLP1	-2.08688	1.30E-03
25354	MRPL45	-2.02158	0.00179523	6884	FGFR3	-2.09082	5.89E-06
11023	HS.552799	-2.02363	1.41E-04	4977	DBX1	-2.09957	0.000222703
17333	LOC402112	-2.02644	0.00178903	29544	RPS5	-2.10042	0.00138553
4341	COL2A1	-2.03118	0.00112645	29213	RIPK2	-2.10641	0.000218454
14518	LOC100130009	-2.03222	1.54E-05	14423	LOC100129685	-2.1066	1.19E-03
23928	LYN	-2.03236	0.000609191	27816	PLOD3	-2.10673	0.000954258
20489	LOC648294	-2.0327	0.0004778	8805	HNRNPA1	-2.10967	1.74E-05
32244	TIMM9	-2.03469	0.0015035	6898	FHL3	-2.1127	5.26E-05
29412	RPA1	-2.03493	1.70E-03	18250	LOC642741	-2.1147	1.02E-03
33756	WDR12	-2.03533	5.96E-04	32523	TMEM45A	-2.1169	0.000464867
25781	NCAPD2	-2.03535	0.00132141	17691	LOC441876	-2.11785	1.02E-03
19436	LOC645385	-2.03595	0.00151373	1488	BAIAP2L1	-2.11832	3.63E-05
2095	C14ORF93	-2.04138	6.93E-06	4156	CLEC2D	-2.11902	0.000733653
33243	TYRO3	-2.04437	4.26E-04	6966	FLJ10986	-2.12606	0.000420546

14281	LOC100129237	-2.12997	4.96E-04	31760	SYPL1	-2.20452	0.000128778
16802	LOC388556	-2.13532	6.52E-04	14389	LOC100129585	-2.20627	8.87E-05
25385	MRPS30	-2.13565	3.28E-04	29490	RPL8	-2.20725	1.35E-04
18023	LOC642250	-2.13595	0.00107704	15083	LOC100131866	-2.20753	2.67E-05
31129	SNRPA	-2.13825	6.40E-04	2915	C6ORF48	-2.20788	0.000428494
3730	CDCA5	-2.14343	0.0016145	19976	LOC646766	-2.21365	0.00033802
26121	NOB1	-2.14482	3.43E-06	28801	RAI14	-2.21753	0.000675636
3733	CDCA8	-2.14728	0.000158263	18557	LOC643433	-2.21779	0.000542767
33839	WDYHV1	-2.14889	0.000901318	16862	LOC389141	-2.21829	0.000459763
15213	LOC100132299	-2.14934	3.42E-05	5715	ECT2	-2.21838	1.41E-03
23294	LOC729964	-2.14942	0.000145725	29558	RPS8	-2.22068	0.00161471
23388	LOC730246	-2.15222	5.52E-04	19556	LOC645691	-2.22442	0.00107987
29474	RPL36	-2.15341	1.12E-03	16693	LOC347544	-2.22526	0.000534957
20693	LOC649076	-2.15494	0.000533848	23972	MAD2L1	-2.22823	0.000457464
14136	LOC100128771	-2.15556	6.32E-05	18286	LOC642817	-2.23024	0.00054939
29459	RPL27	-2.15569	8.13E-04	31588	STK24	-2.23459	3.03E-04
20894	LOC649839	-2.15637	0.000233819	31024	SNORD25	-2.236	5.13E-05
5649	DYM	-2.15657	5.43E-04	1282	ATIC	-2.24113	0.000182776
6676	FANCG	-2.15913	2.75E-04	33110	TTK	-2.24337	4.48E-04
26223	NPY	-2.15981	4.99E-04	23352	LOC730107	-2.24665	0.000445574
22700	LOC728428	-2.16464	0.00122727	8727	HJURP	-2.24769	2.63E-05
27540	PHGDH	-2.17929	0.000926407	23237	LOC729789	-2.24864	3.21E-04
23875	LSM4	-2.18409	0.00036081	29503	RPP40	-2.25604	1.62E-04
15295	LOC100132528	-2.18468	8.34E-04	17594	LOC441246	-2.25891	4.60E-04
14997	LOC100131609	-2.187	0.000875169	17228	LOC400963	-2.26592	0.000542002
29442	RPL14L	-2.18734	4.55E-04	29521	RPS18	-2.26781	0.00151457
16653	LOC343184	-2.19197	6.17E-05	32392	TMEM144	-2.27099	5.66E-08
5697	EBPL	-2.19209	2.05E-05	7652	GALK1	-2.27206	9.50E-04
2763	C4ORF14	-2.19304	0.00128088	27192	PCDH18	-2.27211	0.000113843
4474	CPNE8	-2.19514	2.56E-04	4297	CNTNAP1	-2.2794	2.43E-04
17500	LOC440737	-2.19615	0.000989795	23041	LOC729279	-2.28142	5.88E-05
22974	LOC729102	-2.1963	0.000282713	5840	EIF3H	-2.28165	0.000193064
21275	LOC651149	-2.19678	1.31E-03	8828	HNRPC	-2.28204	0.00128473
17403	LOC440055	-2.19775	1.17E-03	30493	SLC27A3	-2.29001	2.85E-04
29440	RPL13L	-2.19817	2.16E-05	5742	EEF1D	-2.29339	0.000126152
27368	PKD3	-2.20067	3.05E-04	30601	SLC44A1	-2.29419	0.000172089

3866	CENPN	-2.2944	0.000143689	17458	LOC440359	-2.38691	5.63E-04
29449	RPL22	-2.29465	0.00105741	28560	PTPN13	-2.39211	0.000413752
20804	LOC649447	-2.29999	0.000262246	15180	LOC 100132199	-2.39337	2.68E-05
28036	PPAT	-2.3009	0.000393145	4955	DARS	-2.39728	1.56E-03
25509	MTP18	-2.30185	3.55E-05	1882	C11ORF1	-2.39828	2.51E-05
3538	CCNA2	-2.30784	0.000412267	23282	LOC729926	-2.39973	7.65E-04
33891	WNT5A	-2.3104	3.36E-04	15041	LOC 100131735	-2.40035	2.35E-05
28110	PPP1R3C	-2.31108	3.02E-06	22829	LOC728732	-2.40089	6.11E-05
1659	BMP2	-2.32278	2.31E-05	3973	CHEK1	-2.40178	1.16E-06
18725	LOC643863	-2.32406	1.02E-03	600	AKR1A1	-2.40346	0.000695089
359	ADA	-2.3269	2.14E-05	15586	LOC100133372	-2.40481	1.53E-04
13751	LGMN	-2.32715	4.54E-05	31607	STOM	-2.40533	3.40E-07
12250	HSP90AB1	-2.32781	1.49E-03	22710	LOC728453	-2.40686	0.0001068
5850	EIF4B	-2.32818	1.13E-03	29457	RPL26	-2.4112	0.000285349
13724	LEPREL1	-2.32851	0.000169338	29921	SEC11A	-2.41182	0.00102718
17534	LOC440991	-2.33062	1.54E-04	16776	LOC388275	-2.41288	5.56E-06
29559	RPS9	-2.33092	1.06E-04	29438	RPL13A	-2.41592	0.000922424
3724	CDC7	-2.33576	0.000342965	3795	CDKN3	-2.41856	0.000112421
27035	PABPC4	-2.33611	0.000164425	30404	SLC20A2	-2.41879	6.23E-06
33241	TYMS	-2.34068	0.00106577				
30229	SHC1	-2.34608	0.00105777	32648	TNFRSF19	-2.42065	6.93E-05
21754	LOC652624	-2.34734	2.21E-04	31239	SP5	-2.42085	2.37E-09
5846	EIF3M	-2.34987	0.00181367	23974	MAD2L2	-2.42585	0.000123115
15032	LOC100131713	-2.35114	0.000201749	12602	IMPA2	-2.42996	1.90E-06
29432	RPL10A	-2.35345	0.00131867	17525	LOC440927	-2.43391	0.00119949
24235	MCM6	-2.35636	0.00108431	29414	RPA3	-2.43719	0.00177478
19046	LOC644511	-2.36244	0.000514797	16156	LOC127295	-2.43999	5.06E-04
5044	DDIT4L	-2.36718	0.000107365	29565	RPUSD3	-2.44425	1.98E-07
545	AHCY	-2.3677	0.000431822	16979	LOC390578	-2.44648	8.18E-08
18592	LOC643531	-2.37199	1.01E-03	15104	LOC 100131940	-2.44655	2.19E-05
5744	EEF1G	-2.37611	0.000630065	26103	NME4	-2.44757	0.00114224
5765	EFHD1	-2.38043	1.20E-03	8825	HNRPA1L-2	-2.45235	5.46E-04
32637	TNFRSF10B	-2.38066	1.53E-05	1537	BCAR3	-2.45546	0.000368573
26099	NME1-NME2	-2.38426	4.44E-05				
22757	LOC728564	-2.38494	3.69E-04				
8826	HNRPAIP4	-2.38609	3.87E-05				

14206	LOC100129028	-2.45901	3.51E-04	14814	LOC	-2.57639	4.33E-05
16672	LOC345041	-2.46013	0.000101781		100130980		
3125	CA14	-2.46417	0.000205741	31821	TAF1D	-2.57677	6.27E-06
32089	TET1	-2.46774	3.21E-05	27653	PIR	-2.58392	2.26E-06
12231	HSD17B8	-2.47022	0.000519001	7564	FZD2	-2.58518	0.000146094
4479	CPS1	-2.47967	2.21E-06	28778	RAD51AP1	-2.59104	5.06E-06
25464	MTA3	-2.48169	8.09E-05	14695	LOC	-2.59563	3.41E-05
5758	EFEMP1	-2.48833	1.42E-05		100130562		
28160	PQLC3	-2.48845	0.000585543	8547	HEATR1	-2.59617	5.95E-07
30245	SHMT2	-2.48964	0.00117427	22591	LOC728126	-2.59998	3.37E-05
23103	LOC729423	-2.50041	6.49E-06	29483	RPL4	-2.62451	7.56E-05
12741	ISG20L1	-2.50404	9.70E-05	25783	NCAPG	-2.62632	6.41E-05
29539	RPS3	-2.50954	0.000103446	20366	LOC647856	-2.6267	1.31E-05
22857	LOC	-2.5096	5.69E-06	29462	RPL29	-2.62809	4.36E-07
	728791			23274	LOC729903	-2.63121	4.28E-05
23391	LOC	-2.50972	1.22E-03	15975	LOC	-2.6327	2.71E-04
	730255				100134393		
24097	MAP4K2	-2.51767	5.17E-06	9745	HS.363526	-2.6341	0.000643774
7686	GAPDH	-2.51826	0.00128279	561	AIF1L	-2.63663	1.37E-04
2433	C10RF57	-2.51861	1.49E-03	8597	HEXB	-2.63709	1.51E-03
2262	C18ORF56	-2.51885	0.000156088	5993	EPDR1	-2.63912	0.00156376
1792	BUB1	-2.52119	9.50E-06	7966	GMPS	-2.64155	1.99E-04
5831	EIF2S3	-2.52373	3.38E-04	27563	PHYH	-2.64322	2.14E-05
29039	RENBP	-2.53102	4.92E-07	4100	CKS1B	-2.64512	1.68E-04
29481	RPL39L	-2.53153	0.00013954	7898	GLDC	-2.64809	0.00143371
17141	LOC399804	-2.5389	3.38E-05	5513	DPH5	-2.6481	2.11E-05
34552	ZNF581	-2.54051	9.37E-05	18914	LOC644237	-2.66097	0.0011589
1156	ARRDC4	-2.54054	2.88E-05				
8789	HMMR	-2.54277	8.17E-05	20185	LOC647285	-2.66563	1.82E-04
28953	RBMX	-2.5493	5.57E-05	22536	LOC727984	-2.67684	0.000223687
32179	THEM2	-2.55298	5.30E-04	8625	HIBADH	-2.68374	0.00144114
13239	KIF20A	-2.55316	1.13E-05	684	ALPL	-2.69266	2.39E-06
1403	AURKA	-2.55681	5.93E-05	17636	LOC441506	-2.70546	6.10E-05
27066	PAICS	-2.55763	0.00111653	30602	SLC44A2	-2.70757	1.24E-03
5836	EIF3D	-2.56061	6.72E-05	16741	LOC387867	-2.71424	2.45E-05
13252	KIF2C	-2.56757	1.70E-06	23060	LOC729340	-2.7157	0.000999351

27743	PLCD1	-2.72	1.14E-07	20614	LOC648771	-2.91567	7.23E-05
22597	LOC728139	-2.72434	4.77E-05	27493	PGM1	-2.92082	0.000287518
28530	PTGR1	-2.72675	7.39E-05	30836	SNHG6	-2.92725	2.13E-05
5741	EEF1B2	-2.7289	4.84E-05	20015	LOC646849	-2.95184	3.75E-05
18360	LOC642989	-2.73236	0.000921883	16783	LOC388339	-2.95309	4.55E-05
20058	LOC646942	-2.74335	5.41E-05	3785	CDKN1A	-2.95807	0.000310093
16737	LOC387825	-2.74954	5.93E-06	29436	RPL12P6	-2.97114	2.40E-06
16236	LOC148430	-2.76485	2.32E-05	5258	DIMT1L	-2.97803	1.83E-06
29441	RPL14	-2.76505	4.49E-06	15940	LOC100134304	-2.98223	4.08E-08
31176	SNX5	-2.77426	4.41E-08	13733	LGALS1	-2.98473	0.00160731
13592	LAMA1	-2.77535	2.89E-07	27902	PODXL	-3.00627	2.35E-08
16814	LOC388707	-2.77694	1.99E-06	16630	LOC341315	-3.02065	1.10E-04
29179	RHPN2	-2.78226	0.00110049	481	ADSS	-3.02244	4.06E-06
23133	LOC729500	-2.78295	8.63E-06	29557	RPS7	-3.06985	2.69E-06
2524	C20ORF199	-2.79683	8.26E-05	1406	AURKB	-3.07612	5.67E-07
27370	PDLIM1	-2.79852	0.000250318	23373	LOC730187	-3.08276	4.32E-06
27030	PABPC1	-2.7998	0.000107149	25214	MND1	-3.08698	3.39E-07
7486	FRZB	-2.81189	5.35E-04	14412	LOC 100129657	-3.08986	0.00120608
17023	LOC391075	-2.82637	0.00139394	33282	UBE2C	-3.09218	4.69E-06
6705	FBL	-2.8276	2.59E-05	30114	SFRP1	-3.10477	0.000250519
13708	LEF1	-2.83207	1.15E-05	17015	LOC391019	-3.10602	2.05E-05
4101	CKS2	-2.83376	0.000537912	28602	PTTG1	-3.11309	2.05E-05
13438	KRT19	-2.83803	2.34E-05	17541	LOC441013	-3.11866	6.73E-07
28410	PSAT1	-2.8451	8.29E-07	20657	LOC648931	-3.12515	3.24E-09
33979	YAP1	-2.84569	0.00106156	31661	SUCLG2	-3.13505	5.75E-07
29435	RPL12	-2.85091	4.23E-05	1559	BCL2L12	-3.13599	4.40E-07
22553	LOC728031	-2.85482	8.14E-05	32222	TIGA1	-3.13783	7.09E-05
29524	RPS2	-2.85918	1.32E-05	7770	GDF15	-3.14204	1.42E-07
23861	LRTM1	-2.85972	1.48E-12	2878	C6ORF160	-3.15022	0.000111744
26404	NUSAP1	-2.86459	9.00E-05	15382	LOC100132795	-3.21797	1.51E-05
20473	LOC648249	-2.86802	4.01E-06	4930	DAB2	-3.2203	2.91E-05
23319	LOC730029	-2.87607	3.58E-05	32933	TRIP6	-3.23132	1.32E-06
24516	MGST1	-2.87812	2.82E-06	20091	LOC647030	-3.23731	4.86E-05
349	ACVR1	-2.88477	0.000447642	26048	NKD1	-3.24181	4.37E-06
30500	SLC29A1	-2.91375	2.94E-06	6320	FAM107A	-3.24905	0.000449795
17086	LOC391833	-2.91531	4.06E-05				

16552	LOC286444	-3.25137	6.05E-06	28975	BPMS2	-3.82727	3.95E-06
26390	NUP37	-3.26236	3.70E-05	23218	LOC729742	-3.84552	7.82E-07
19783	LOC646294	-3.28211	1.06E-06	13597	LAMB1	-3.85107	1.24E-07
2210	C17ORF61	-3.28907	2.68E-05	6291	FABP7	-3.85422	0.000335025
19553	LOC645688	-3.29172	3.95E-06	12606	IMPDH2	-3.85952	4.79E-06
25847	NCRNA00219	-3.29327	7.23E-05	13834	LITAF	-3.86	4.66E-05
28663	QPRT	-3.29832	2.04E-05	3953	CHCHD10	-3.91295	4.20E-06
31361	SPON1	-3.32269	5.27E-06	2439	C1ORF64	-3.9544	5.48E-10
30835	SNHG5	-3.32459	0.000204237	8473	HAUS4	-3.96227	4.95E-12
4596	CSDA	-3.3629	0.000363294	925	APCDD1	-3.97854	6.09E-08
455	ADM	-3.40482	4.11E-05	5952	ENO3	-4.00663	6.90E-09
23228	LOC729768	-3.41997	2.20E-05	27019	P4HA1	-4.01147	0.00032695
1753	BST2	-3.42742	1.17E-07	4724	CTSL2	-4.01208	1.47E-06
20685	LOC649049	-3.46913	1.63E-06	19348	LOC645173	-4.02454	2.71E-06
17292	LOC401537	-3.50501	3.79E-07	28605	PTTG3P	-4.02805	3.37E-06
6707	FBLN1	-3.53279	3.88E-06	4239	CMTM7	-4.08386	7.09E-09
28241	PRIM1	-3.53892	1.17E-06	8089	GPI	-4.08821	1.18E-05
8754	HLA-E	-3.54293	2.03E-07	1616	BGN	-4.11601	0.000348095
643	ALDOA	-3.55096	0.000184641	23196	LOC729679	-4.2525	4.55E-08
14422	LOC100129681	-3.55393	9.42E-07	3694	CDC20	-4.28351	3.38E-06
8773	HMGB2	-3.56419	9.08E-05	32729	TOP2A	-4.29945	1.43E-06
32964	TRPM4	-3.5945	2.41E-06	30828	SNHG1	-4.38641	2.77E-06
12398	IFITM2	-3.59918	1.38E-03	3243	CAPN6	-4.44794	4.50E-07
32177	THBS4	-3.6116	6.59E-07	30284	SILV	-4.59486	1.80E-07
3540	CCNB1IP1	-3.62989	3.35E-08	15342	LOC 100132673	-4.69254	2.18E-07
5477	DOCK10	-3.64495	7.09E-07	29716	SALL4	-4.95909	2.66E-08
28387	PRSS23	-3.67253	0.000258012	3541	CCNB2	-5.23718	4.33E-08
26369	NUDT7	-3.67565	7.62E-05	30511	SLC2A3	-5.39887	5.64E-07
26207	NPM3	-3.69114	1.35E-06	13691	LDHA	-5.76362	0.000569306
23887	LTA4H	-3.69913	6.82E-05	7500	FST	-5.82949	8.74E-09
12399	IFITM3	-3.70541	0.000779898	1543	BCAT1	-6.13131	3.52E-06
8769	HMGA1	-3.72752	3.30E-08	5323	DKK1	-6.17493	4.94E-08
323	ACTA2	-3.74071	1.75E-04	4343	COL4A1	-6.21986	6.18E-07
1530	BBS9	-3.7636	3.82E-07	8078	GPC3	-6.35513	0.000466041
7501	FSTL1	-3.80754	0.000136961	4333	COL22A1	-6.371	1.87E-08
27805	PLIN2	-3.82123	4.77E-10				
32774	TPM2	-6.8139	1.85E-08				
2430	C1ORF54	-7.81915	1.70E-07				
965	APOE	-9.10671	6.03E-07				
13804	LIN28	-26.8821	1.20E-13				

Таблица 4. Результаты анализа экспрессии генов для генов, экспрессия которых значительно повышена или понижен на 25 день дифференцировки в популяции на основе вентральной пластинки, обработанной SHH/FGF8/Chir, по сравнению с контрольной колонкой, обработанной LSB

				31361	SPON1	4.93795	4.69E-08
				13857	LMO3	4.83578	7.25E-08
				13865	LMX1A	4.63407	1.51E-06
				2543	C20ORF56	4.4431	3.63E-13
32126	TFF3	25.0585	2.47E-14	12733	IRX5	4.2929	1.45E-06
1209	ASCL1	14.9328	1.97E-07	7988	GNB3	4.13634	1.52E-10
7395	FOXA1	12.9897	4.15E-14	32159	TH	4.08743	0.000370318
29133	RGS4	11.0181	6.65E-09	5346	DLK1	4.02203	1.73E-05
27988	POSTN	8.20403	2.16E-10	31775	SYT4	4.00669	0.000372793
7396	FOXA2	7.98132	1.60E-14	9428	HS.204481	3.88697	6.71E-09
4342	COL3A1	7.58625	2.49E-05	6197	ETS2	3.70155	3.07E-09
12731	IRX3	7.42399	1.64E-06	5036	DDC	3.61254	0.000194062
9374	HS.19193	7.27196	7.36E-09	26250	NR4A2	3.55879	9.29E-10
3978	CHGA	7.14305	2.77E-08	2867	C6ORF141	3.48146	6.97E-09
2470	CIQL1	7.1366	1.38E-09	26928	OSBPL10	3.27941	3.81E-07
30390	SLC18A1	7.04751	3.52E-14	5372	DMRTA2	3.26437	1.81E-08
22823	LOC728715	6.5801	8.79E-09	33930	XBP1	3.2414	0.000921089
№	ID колонки	кратное	р-значение	27664	PITX1	3.23009	1.10E-05
колонк		изменен		9819	HS.388347	3.14523	8.26E-08
и		ис		30239	SHISA2	3.13411	4.23E-05
				2743	C3ORF58	3.10109	1.50E-06
12456	IGFBP5	6.15962	3.65E-05	623	ALCAM	3.00487	0.000307411
27665	PITX2	6.10679	6.79E-14	6533	FAM46A	2.99243	3.45E-05
12655	INSM2	5.18438	1.70E-09	28590	PTPRO	2.94164	4.45E-05
12944	KCNJ16	4.98753	8.89E-13	18750	LOC643911	2.93448	1.14E-06
436	ADCYAP1	4.94597	2.43E-09				

31669	SULF2	2.92397	8.02E-05	19806	LOC646345	-2.02311	0.000183202
5348	DLL1	2.92274	8.36E-05	23846	LRRIQ1	-2.02718	0.000541683
30066	SERPINF1	2.76873	0.000156193	27746	PLCE1	-2.02761	0.000217281
5349	DLL3	2.75425	0.000173675	2727	C3ORF39	-2.03023	0.000131521
3186	CALCA	2.71125	2.10E-07	26072	NLGN3	-2.03154	2.45E-05
30590	SLC39A8	2.67444	2.25E-05	2770	C4ORF22	-2.03489	0.00113778
32000	TCF12	2.66777	1.46E-06	3491	CCDC88C	-2.03515	0.00112864
3941	CGNL1	2.63848	0.00120585	25751	NAV3	-2.03716	8.63E-05
32769	TPH1	2.62647	1.95E-06	30413	SLC22A17	-2.03749	0.000703407
25941	NENF	2.55992	0.000599552	13014	KDELC2	-2.04133	0.00147391
29509	RPRM	2.53138	0.00135525	27749	PLCH1	-2.0426	0.000234672
32144	TGFBR3	2.46754	8.27E-07	16489	LOC284988	-2.04353	0.000785305
13689	LDB2	2.40983	2.56E-05	9938	HS.440518	-2.04573	0.000285223
2850	C6ORF117	2.4009	0.000508473	28076	PPMIH	-2.04637	0.00038276
31806	TACSTD1	2.38661	0.00154495	429	ADCY3	-2.05728	0.000712376
24375	MFNG	2.31488	5.04E-05	31199	SORBS2	-2.05812	8.31E-05
5424	DNAJC19	2.30405	4.42E-07	17624	LOC441453	-2.0676	3.05E-06
12986	KCNS3	2.28802	0.000136062	13793	LIM2	-2.07092	0.00040641
27855	PMP22	2.27371	1.36E-05	33165	TUB	-2.07384	0.000187156
4003	CHN2	2.26467	0.000550787	3462	CCDC65	-2.07613	0.00151516
5691	EBF3	2.26453	0.000571924	4305	COBL	-2.07819	0.000485834
3187	CALCB	2.11359	2.49E-06	6912	FILIP1	-2.07924	9.69E-05
28325	PROX1	2.08192	0.000135872	5195	DGCR6	-2.07943	0.000935686
25218	MNX1	2.05528	3.37E-06	33905	WSCD1	-2.08212	0.00033792
6270	F3	2.01261	5.71E-07	12933	KCNIP1	-2.08721	3.72E-05
2245	C18ORF10	-2.00297	0.00129421	4933	DACH2	-2.09051	9.24E-05
28546	PTN	-2.003	0.000354472	25960	NEUROG2	-2.09361	0.00111856
5920	EMID2	-2.00456	1.77E-05	25930	NEK2	-2.09683	0.00144313
24405	MGC11082	-2.00498	2.75E-05	3288	CASP3	-2.09925	0.000130992
5949	ENKUR	-2.00742	0.000107398	12971	KCNMB4	-2.09934	0.00140267
26398	NUP93	-2.01111	0.00124009	3125	CA14	-2.10277	0.00147559
10837	HS.545615	-2.01378	2.65E-05	17153	LOC399959	-2.10829	0.000816932
12688	IQCC	-2.01383	0.00019749	15855	LOC100134073	-2.10866	0.000366572
6196	ETS1	-2.01751	0.000848186	26322	NTM	-2.10973	0.000159062
27290	PCSK5	-2.02079	0.00122771	7595	GABRA2	-2.11173	0.00169771
16112	LOC100192378	-2.0216	4.35E-05	5618	DUSP18	-2.11289	8.90E-05

4289	CNTFR	-2.11375	0.00132713	32380	TMEM132D	-2.22662	0.000463067
3760	CDH8	-2.11381	7.41E-05	2705	C3ORF15	-2.2299	0.000615847
3196	CALM1	-2.11418	0.00157715	27781	PLEKHG1	-2.23885	1.49E-05
13615	LARGE	-2.11685	2.37E-05	29607	RSPH9	-2.24091	0.000109859
32933	TRIP6	-2.11829	0.00047459	23965	MAB21L1	-2.24222	2.00E-05
2242	C17ORF97	-2.12666	0.000851745	25942	NEO1	-2.24511	2.27E-05
5478	DOCK11	-2.12763	0.000306132	34157	ZFP106	-2.24688	0.00129693
7377	FNDC4	-2.13338	0.000482465	33083	TTC29	-2.24927	0.000317648
29672	RYS3	-2.13573	0.000392208	3415	CCDC19	-2.25412	0.000638581
30669	SLC7A6	-2.13865	0.000299041	30209	SH3GL2	-2.2573	0.00175354
29816	SCD5	-2.14266	9.40E-05	839	ANKS1B	-2.25784	6.46E-05
12212	HS6ST2	-2.14751	0.00020473	3472	CCDC74A	-2.25911	3.66E-05
4213	CLSTN2	-2.15117	2.14E-05	27561	PHTF1	-2.26039	0.00113655
16924	LOC389816	-2.15626	4.60E-09	26505	OPCML	-2.26062	2.34E-05
2102	C15ORF26	-2.15663	0.000242005	23859	LRRTM4	-2.26387	0.00050229
1103	ARL4C	-2.16184	0.00049625	27040	PACRG	-2.26701	8.08E-05
31151	SNX10	-2.16614	0.000623725	24318	MELK	-2.27019	0.000423662
16382	LOC255783	-2.17123	0.000592438	10017	HS.452398	-2.27201	0.000477927
30372	SLC16A14	-2.17701	0.000382805	9237	HS.147562	-2.27279	0.000798954
13177	KIAA1598	-2.1779	0.000634174	26976	OTX1	-2.27327	0.000877908
28587	PTPRM	-2.17848	0.000334455	8046	GOLSYN	-2.27724	0.000100581
8661	HIST1H2AC	-2.18157	0.00018782	1074	ARHGEF6	-2.27982	0.000748746
30015	SEPT6	-2.18483	0.00101243	4639	CSRNP3	-2.28361	0.000213299
6572	FAM65B	-2.18593	1.46E-05	27547	PHLDA1	-2.28667	2.70E-05
4614	CSMD2	-2.18777	0.000579739	3537	CCNA1	-2.28864	6.92E-05
19737	LOC646168	-2.18864	0.000417767	26071	NLGN2	-2.29131	0.000215422
2429	C1ORF53	-2.19182	0.0017844	5325	DKK3	-2.29195	0.000372444
17855	LOC641785	-2.19315	0.000255891	6326	FAM108C1	-2.29624	0.000567659
5570	DSCR6	-2.20122	0.00137487	28721	RAB3B	-2.30577	0.000211905
13835	LIX1	-2.20141	6.32E-06	2372	C1ORF158	-2.3174	0.00184147
23979	MAF	-2.20457	6.38E-05	32499	TMEM231	-2.32173	0.000378145
4734	CTXN1	-2.21039	0.0007813	5550	DRD1IP	-2.3265	0.00129147
2049	C14ORF159	-2.2127	0.000171696	12785	ITGB5	-2.32837	0.00143999
30388	SLC17A8	-2.21639	0.000916084	30937	SNORA79	-2.32935	0.000394221
26228	NQO1	-2.21974	0.000753734	2538	C20ORF46	-2.34101	0.000827542
23817	LRRC46	-2.22159	0.000756129	5939	EMX2OS	-2.34991	1.28E-05

3153	CACNA1E	-2.35127	0.000755994	4965	DBC1	-2.53221	0.000370596
28906	RBKS	-2.35486	1.25E-05	32507	TMEM31	-2.53343	2.39E-06
3806	CDRT4	-2.36622	0.000173226	1927	C11ORF75	-2.53649	0.000498243
32129	TFPI	-2.36876	0.000644776	6740	FBXO15	-2.54184	0.00139562
5763	EFHC1	-2.36977	0.00112503	27370	PDLIM1	-2.54956	0.000681773
3746	CDH18	-2.37821	6.60E-06	728	AMPH	-2.55801	6.39E-06
33006	TSHZ3	-2.38415	0.00160322	33718	VWC2	-2.56363	0.000340976
6901	FHOD3	-2.38572	0.00106294	13724	LEPREL1	-2.56798	4.43E-05
13805	LIN28B	-2.38688	0.000393414	1057	ARHGDIB	-2.573	5.20E-06
1806	C10ORF107	-2.39735	0.000750154	5765	EFHD1	-2.59294	0.000474204
32034	TCTEX1D1	-2.40988	0.00160003	3758	CDH6	-2.6075	0.000303268
31146	SNTN	-2.42893	0.000945171	7043	FLJ23152	-2.60944	0.000143522
30057	SERPINB6	-2.43305	1.01E-05	31282	SPATA17	-2.61656	0.00020388
28580	PTPRD	-2.43513	6.24E-05	7106	FLJ33590	-2.61873	0.00025779
28210	PRDM8	-2.44594	0.000113613	16264	LOC151162	-2.62005	0.000666466
2614	C22ORF15	-2.45467	0.000112958	32440	TMEM178	-2.62313	0.00011953
12892	KBTBD9	-2.45472	2.16E-06	1987	C12ORF69	-2.62861	5.06E-06
6246	EXT1	-2.4653	0.000117948	2970	C7ORF57	-2.63494	0.000118643
25946	NETO2	-2.46601	0.000568595	23830	LRRC6	-2.63632	0.000197619
493	AFF2	-2.4707	0.0012124	6173	ESM1	-2.63913	0.000368518
31610	STOML3	-2.48765	0.000560404	153	ABAT	-2.64114	3.81E-06
31577	STIL	-2.49103	0.000199457	2793	C4ORF47	-2.64571	0.00134045
4826	CYB5D1	-2.49147	0.000128822	2301	C19ORF51	-2.64617	7.44E-05
2078	C14ORF45	-2.49501	0.000787004	34155	ZFHX4	-2.66127	5.12E-06
33501	USP13	-2.49771	6.06E-05	5762	EFHB	-2.66338	0.000148296
34226	ZMYND10	-2.50015	0.000105158	6920	FJX1	-2.66433	8.09E-05
28507	PTCHD1	-2.50016	0.00120417	12872	KANK4	-2.66744	0.000457332
5322	DKFZP781N1041	-2.50483	0.000661286	26104	NME5	-2.66836	0.000118819
3253	CAPSL	-2.50626	0.000844682	3148	CACHD1	-2.67846	0.000100474
14289	LOC100129268	-2.508	0.000176359	25628	MYO16	-2.67972	8.67E-05
17551	LOC441054	-2.5088	0.00166136	28838	RAPGEF2	-2.68049	7.06E-05
26395	NUP62CL	-2.51081	0.000373281	5553	DRD4	-2.68408	0.000500735
1776	BTG3	-2.51582	0.00131261	4087	CITED2	-2.68818	0.00192224
33005	TSHZ2	-2.51649	3.77E-05	23790	LRRC26	-2.68889	2.44E-06
4705	CTNND2	-2.52798	0.00038507	2631	C22ORF42	-2.69089	0.00039382
29792	SCARNA11	-2.53148	3.35E-06	25564	MXRA5	-2.69302	0.00192861

12836	JAZF1	-2.70808	5.58E-05	10979	HS.551307	-3.04712	1.13E-05
13346	KLHL29	-2.71506	5.11E-06	29794	SCARNA13	-3.05568	4.35E-05
25749	NAV1	-2.71696	0.000248061	32378	TMEM132B	-3.06408	1.54E-06
29306	RNF175	-2.71799	3.04E-05	2690	C2ORF77	-3.07752	4.19E-05
13815	LINGO2	-2.71868	2.30E-05	27660	PITPNM1	-3.09871	2.62E-05
25208	MMRN1	-2.73481	0.000116097	32963	TRPM3	-3.10437	0.000937085
3918	CFDP1	-2.73575	0.000150699	3640	CD36	-3.10624	0.000121554
31242	SP8	-2.73862	5.04E-05	26070	NLGN1	-3.1408	9.93E-05
1311	ATP1B3	-2.7498	8.64E-05	5749	EFCAB1	-3.15705	0.000423897
25939	NELL1	-2.7509	0.00086776	3121	CA10	-3.15947	0.000537722
32531	TMEM51	-2.77628	6.84E-06	3215	CAMK2N1	-3.16181	0.000561888
15778	LOC100133887	-2.78135	1.17E-05	8016	GNRH1	-3.16554	1.25E-05
815	ANKRD38	-2.79552	0.000168264	13037	KHDRBS3	-3.16572	0.000269437
33758	WDR16	-2.80194	0.000532777	5681	E2F7	-3.17981	2.36E-07
12801	ITM2C	-2.81062	7.32E-05	8174	GPR37	-3.18311	2.85E-05
32847	TRH	-2.84178	0.00148109	29510	RPRML	-3.19177	0.000271322
2881	C6ORF165	-2.84456	6.28E-05	4349	COL4A6	-3.1938	5.88E-05
15644	LOC100133542	-2.84572	9.65E-05	27887	PNOC	-3.19863	4.88E-05
29811	SCARNA8	-2.84646	9.99E-06	1543	BCAT1	-3.20615	0.000858798
33964	XPR1	-2.85352	5.49E-06	28813	RALYL	-3.21662	0.000509498
25940	NELL2	-2.86423	0.00024831	30531	SLC32A1	-3.24737	0.0002618
5455	DNER	-2.87832	0.00127284	25216	MNS1	-3.25707	0.000109366
33807	WDR63	-2.88707	4.43E-05	3364	CCDC109B	-3.26787	0.000147649
3038	C9ORF116	-2.89396	0.000215965	4004	CHODL	-3.28962	0.00114785
2553	C20ORF85	-2.89405	7.84E-05	965	APOE	-3.29237	0.00155578
5531	DPY19L1	-2.90287	0.000183171	5764	EFHC2	-3.29611	0.000143319
31955	TBR1	-2.90815	7.60E-06	29002	RDH10	-3.30034	0.000369857
8655	HIST1H1C	-2.91043	9.46E-05	29600	RSHL3	-3.30753	6.17E-05
3401	CCDC146	-2.91057	0.000155147	12317	HTRA1	-3.31522	0.000437969
31935	TBC1D9	-2.91662	6.93E-05	2398	C1ORF194	-3.31829	1.21E-05
7421	FOXJ1	-2.94694	0.000577632	5895	ELMOD1	-3.32218	0.000142072
32783	TPPP3	-2.95648	0.000353912	3066	C9ORF171	-3.33251	4.78E-05
5337	DLG2	-2.96987	1.13E-06	33592	VAT1L	-3.3402	0.000247714
27810	PLK4	-2.98102	1.71E-06	12399	IFITM3	-3.3542	0.0016376
24315	MEIS2	-3.03243	0.00109977	28319	PROM1	-3.35504	5.84E-05
31243	SPA17	-3.03709	0.000523067	29034	RELN	-3.43956	1.30E-05

2397	C1ORF192	-3.45738	0.000124675	31257	SPAG6	-3.86214	1.74E-05
586	AKAP14	-3.46559	1.94E-05	7865	GJA1	-3.88524	0.000511853
5032	DDAH1	-3.46896	1.42E-05	3274	CASC1	-3.88963	2.00E-05
3766	CDK2AP2	-3.4706	3.31E-06	7696	GAS1	-3.95396	2.45E-07
3652	CD47	-3.47334	6.18E-05	7805	GFRA2	-4.00209	0.000116201
4283	CNR1	-3.48521	9.70E-05	3050	C9ORF135	-4.09611	3.21E-05
12694	IQCG	-3.4934	2.59E-05	23853	LRRN3	-4.2728	1.34E-05
10300	HS.537002	-3.49808	0.000142247	29603	RSPH1	-4.35627	1.08E-05
12506	IL13RA2	-3.50471	5.79E-05	6458	FAM183A	-4.40302	2.73E-05
28709	RAB31	-3.51372	7.79E-05	3220	CAMKV	-4.47543	4.97E-05
28536	PTH2	-3.54413	0.000188892	27284	PCP4	-4.64191	1.37E-05
31283	SPATA18	-3.54742	5.71E-05	29723	SAMD3	-4.7132	2.41E-06
3071	C9ORF24	-3.55395	9.04E-05	31223	SOX3	-4.74012	8.45E-06
7432	FOXN4	-3.57299	5.14E-09	29396	ROPN1L	-4.86578	3.17E-06
27171	PBX3	-3.57487	0.000447274	29972	SEMA3C	-5.03965	4.16E-05
32270	TLE4	-3.57637	7.16E-05	3695	CDC20B	-5.17405	5.72E-07
28981	RCAN2	-3.61105	0.000608261	4298	CNTNAP2	-5.33902	4.01E-06
32069	TEKT1	-3.61846	8.36E-05	2006	C13ORF30	-5.4414	1.12E-06
17491	LOC440585	-3.62588	0.000175217	33600	VCAN	-5.47499	0.000917643
5660	DYNLRB2	-3.6297	6.28E-05	1936	C11ORF88	-5.55748	2.96E-06
5938	EMX2	-3.66175	1.17E-06	30115	SFRP2	-6.27713	3.81E-08
24314	MEIS1	-3.68295	0.000402893	27159	PAX6	-6.64236	3.94E-10
13856	LMO2	-3.74164	7.37E-06	866	ANXA1	-7.3691	4.96E-06
6004	EPHB1	-3.77917	0.000119962	3561	CCNO	-9.3158	2.19E-08
7504	FSTL5	-3.80048	0.000392914	13768	LHX2	-9.53566	3.56E-05
1119	ARMC3	-3.82142	2.66E-05				

Таблица 5. Результаты анализа экспрессии генов для генов, экспрессия которых значительно повышена или понижена на 25 день дифференцировки в популяции на основе вентральной пластинки, обработанной SHH/FGF8/Chir, по сравнению с популяцией, обработанной только SHH/FGF8

по сравнению с популяцией, образующей эмбриональные стволовые клетки SH-EG				
№ колонки	ID колонки	Кратное изменение	p-значение	
	32126	TFF3	24.0181	3.37E-14
	1209	ASCL1	22.1637	1.69E-08
	9374	HS.19193	14.7045	1.42E-11
	7395	FOXA1	13.8748	2.30E-14

13865	LMX1A	10.953	4.33E-10	5036	DDC	4.37185	3.55E-05
12456	IGFBP5	9.56964	1.58E-06	6700	FAT3	4.28732	4.74E-06
4342	COL3A1	9.49528	5.64E-06	9428	HS.204481	4.25031	1.93E-09
12361	ID3	9.45077	3.33E-08	8288	GRM8	4.16549	1.67E-06
27988	POSTN	9.10453	7.82E-11	28590	PTPRO	4.13365	8.06E-07
7396	FOXA2	8.85174	5.07E-15	32159	TH	4.10876	0.000355952
3941	CGNL1	8.71553	1.37E-08	31361	SPON1	4.063	4.56E-07
30390	SLC18A1	8.37911	4.77E-15	34166	ZFP36L1	4.05459	0.000219198
5689	EBF1	8.02385	2.37E-06	13689	LDB2	3.9497	1.90E-08
2470	C1QL1	7.76325	5.90E-10	32057	TEAD2	3.94608	6.68E-06
22823	LOC728715	7.73246	1.77E-09	12731	IRX3	3.93674	0.000270763
27665	PITX2	7.32855	7.16E-15	28942	RBM47	3.91109	0.000154758
12655	INSM2	7.04572	4.97E-11	30066	SERPINF1	3.84276	3.72E-06
26250	NR4A2	6.75415	1.28E-13	1666	BMP7	3.83782	1.66E-05
8156	GPR177	6.28979	1.08E-05	25444	MSX1	3.74709	3.45E-05
13857	LMO3	6.20624	4.64E-09	8593	HES6	3.66092	5.43E-05
33930	XBPI	5.8436	6.74E-06	12149	HS.7023	3.65165	0.000170814
12944	KCNJ16	5.71955	1.37E-13	30239	SHISA2	3.60636	8.64E-06
27821	PLS3	5.62251	8.45E-07	9819	HS.388347	3.52316	1.46E-08
5372	DMRTA2	5.61111	8.09E-12	7564	FZD2	3.48734	3.69E-06
7988	GNB3	5.55425	2.56E-12	26928	OSBPL10	3.44485	1.91E-07
31669	SULF2	5.51821	6.78E-08	27664	PITX1	3.40016	5.92E-06
33128	TTR	5.48234	2.88E-09	2743	C3ORF58	3.31658	5.91E-07
2543	C20ORF56	5.42131	2.00E-14	30590	SLC39A8	3.30002	1.28E-06
32762	TPBG	5.30583	7.23E-05	32144	TGFBR3	3.28727	6.00E-09
436	ADCYAP1	5.20834	1.29E-09	18750	LOC643911	3.2583	2.43E-07
26977	OTX2	5.10526	6.89E-06	17491	LOC440585	3.24609	0.000469294
3978	CHGA	5.07311	7.78E-07	24375	MFNG	3.24122	3.31E-07
№	ID колонки	Кратное	р-значение	5346	DLK1	3.21349	0.000161289
колонк		изменен		7562	FZD1	3.15302	8.07E-08
и		и		3186	CALCA	3.14299	1.75E-08
32000	TCF12	5.05883	1.27E-10	27772	PLEKHA5	3.09727	0.000150905
4003	CHN2	4.53859	9.76E-08	26335	NUAK1	3.08699	1.10E-05
2867	C6ORF141	4.43629	1.97E-10	34155	ZFHX4	3.05463	6.49E-07
32417	TMEM163	4.40645	3.65E-08	27855	PMP22	3.03785	1.12E-07
26245	NR2F2	4.38488	8.32E-05	4491	CPVL	3.02972	0.000317992

7421	FOXJ1	3.01784	0.000461499	29887	SDC2	2.34674	3.00E-05
2850	C6ORF117	3.00725	3.47E-05	27402	PDZRN4	2.29374	2.31E-06
27105	PAPSS2	2.97981	1.49E-05	16112	LOC100192378	2.2867	4.57E-06
12358	ID1	2.94361	0.000160308	21088	LOC650494	2.27924	4.94E-06
33004	TSHZ1	2.93637	2.29E-07	8583	HERC5	2.27663	2.89E-07
5691	EBF3	2.92465	2.26E-05	1775	BTG2	2.27014	6.72E-06
1086	ARID5B	2.92012	2.33E-06	30719	SLK	2.24997	3.57E-05
32769	TPH1	2.88914	4.24E-07	19806	LOC646345	2.232	3.69E-05
5424	DNAJC19	2.87234	6.43E-09	25137	MKL2	2.22229	0.00012672
6208	EVII	2.86069	2.04E-07	7610	GABRR1	2.21011	2.33E-07
13858	LMO4	2.85216	4.81E-05	8573	HEPACAM2	2.17226	1.17E-09
12733	IRX5	2.84963	0.000139911	29151	RHBDL3	2.16408	5.80E-05
5879	ELF1	2.78573	1.43E-06	27016	P2RY5	2.16065	5.91E-06
23752	LRIG1	2.77491	0.000210665	30261	SIAH3	2.14795	3.46E-05
23822	LRRC4C	2.77041	5.37E-07	30517	SLC2A8	2.13975	8.81E-05
4780	CXCR4	2.72468	5.12E-07	7457	FREM1	2.12587	7.87E-08
27696	PKNOX2	2.7166	1.59E-05	1102	ARL4A	2.11255	0.000248586
31514	ST6GALNAC5	2.70116	0.00012729	29277	RNF128	2.07512	8.41E-06
32854	TRIL	2.66182	5.76E-06	29124	RGS16	2.06237	7.60E-05
7617	GADD45G	2.62149	0.000385727	8211	GPRC5C	2.04839	5.12E-05
5349	DLL3	2.62131	0.000304562	26002	NGF	2.01869	9.29E-08
8399	GULP1	2.58556	2.34E-07	33375	UCP2	2.00568	0.000336807
16419	LOC283514	2.55654	7.18E-05	11039	HS.553187	-2.00024	0.000182185
12986	KCNS3	2.51225	3.59E-05	7972	GNAI1	-2.00345	0.000400577
6270	F3	2.50649	4.09E-09	1241	ASTN1	-2.00503	0.000267753
32177	THBS4	2.48547	9.17E-05	29957	SEL1L3	-2.00817	9.40E-06
6457	FAM181B	2.48092	0.0001071	9721	HS.348844	-2.06728	9.46E-05
12644	INPPL1	2.47363	7.08E-06	403	ADAMTS5	-2.09516	8.41E-07
28624	PVRL3	2.47112	3.32E-05	5268	DIRAS2	-2.10442	0.000137286
2885	C6ORF173	2.45642	9.25E-05	1042	ARHGAP22	-2.11082	9.20E-05
25218	MNX1	2.44999	9.15E-08	24440	MGC27121	-2.11477	1.75E-08
3835	CEBPD	2.44764	0.000160544	28124	PPP2R2C	-2.12982	0.000152152
6197	ETS2	2.43482	2.74E-06	2812	C5ORF30	-2.14976	2.66E-06
8206	GPR98	2.37781	0.000437636	8046	GOLSYN	-2.15553	0.000225269
30664	SLC7A2	2.36837	5.80E-11	7626	GAGE12C	-2.16085	1.15E-07
7853	GINS2	2.3541	7.75E-05	728	AMPH	-2.19127	7.33E-05

28104	PPP1R1C	-2.2262	3.10E-07	1986	C12ORF68	-2.67913	0.000114615
28251	PRKACB	-2.27738	6.28E-05	25516	MTSS1	-2.69402	0.000290278
26252	NR5A1	-2.3262	1.83E-08	32535	TMEM55A	-2.70095	5.71E-06
153	ABAT	-2.33538	2.64E-05	25864	NDST3	-2.72344	9.29E-06
28721	RAB3B	-2.33887	0.000174687	33591	VAT1	-2.74928	0.000228555
31151	SNX10	-2.35266	0.000210353	26498	ONECUT1	-2.77372	1.86E-05
26936	OSBPL8	-2.36481	0.000356878	12634	INPP1	-2.79095	5.83E-05
30232	SHC4	-2.36756	5.88E-06	5703	ECEL1	-2.83259	0.000107266
28689	RAB15	-2.37701	4.57E-05	16740	LOC387856	-2.84534	0.000116969
31222	SOX2OT	-2.37929	5.44E-06	5631	DUSP6	-2.85825	8.35E-05
10203	HS.525171	-2.37949	0.000112764	31568	STC1	-2.8677	0.000365825
27287	PCSK1N	-2.39396	0.000122619	227	ABLIM2	-2.8948	2.50E-06
30200	SH3BGRL2	-2.39696	0.000352607	27415	PELI2	-2.9135	2.07E-05
23918	LY6H	-2.3986	0.000426406	2538	C20ORF46	-2.92994	6.05E-05
31543	STAMBPL1	-2.40424	0.000210764	4639	CSRNP3	-2.9364	6.80E-06
12256	HSPA12A	-2.4161	5.00E-06	31628	STS-1	-2.94215	9.63E-07
12209	HS3ST5	-2.42056	1.64E-08	30210	SH3GL3	-2.94559	0.000343973
1764	BTBD3	-2.43171	9.02E-05	10017	HS.452398	-3.01786	1.26E-05
32742	TOX2	-2.47449	6.41E-06	4705	CTNND2	-3.02031	4.91E-05
896	AP1S2	-2.4814	0.000411095	24516	MGST1	-3.02712	1.36E-06
13764	LHFPL4	-2.49494	0.000177306	4283	CNR1	-3.13389	0.000271812
12801	ITM2C	-2.50635	0.000289334	13313	KLF6	-3.16185	3.73E-05
1641	BLCAP	-2.52288	0.000363648	7613	GAD1	-3.18763	0.000116615
30231	SHC3	-2.53075	2.70E-06	29400	RORB	-3.1967	5.32E-08
33964	XPR1	-2.55331	2.67E-05	27566	PHYHIPL	-3.21046	3.97E-05
28266	PRKCE	-2.55567	1.75E-07	25628	MYO16	-3.21287	9.14E-06
26521	OPTN	-2.57271	0.000282119	25284	MPPED2	-3.23371	0.000114488
5325	DKK3	-2.57389	8.27E-05	30531	SLC32A1	-3.23601	0.000270573
33325	UBL3	-2.58024	0.000136606	29034	RELN	-3.32027	1.95E-05
6859	FGF13	-2.58447	3.31E-05	26058	NKX2-1	-3.35392	4.84E-06
32210	THY1	-2.60259	0.000107047	30114	SFRP1	-3.38198	0.00010787
30015	SEPT6	-2.63038	0.000101624	4965	DBC1	-3.3928	1.25E-05
30351	SLC12A5	-2.64265	0.000195945	31763	SYT1	-3.47973	0.00017165
607	AKR1C4	-2.66634	0.000217452	29624	RTN1	-3.48718	0.000208889
7635	GAGE2B	-2.67196	4.87E-10	3121	CA10	-3.49466	0.000217475
13177	KIAA1598	-2.67619	4.25E-05	24095	MAP4	-3.54296	0.000118613

041083

9476	HS.223856	-3.61087	5.18E-05
32343	TMEFF2	-3.6559	1.52E-06
713	AMHR2	-3.65957	2.10E-08
28417	PSD2	-3.70127	0.000123589
7106	FLJ33590	-3.74166	4.19E-06
4386	COPG2IT1	-3.9994	7.98E-05
3207	CALY	-4.03219	3.21E-06
30824	SNCG	-4.48956	2.76E-06
5455	DNER	-4.58982	1.95E-05
5550	DRD1IP	-4.64486	5.89E-07
26253	NR5A2	-4.70942	1.65E-11
12954	KCNK12	-4.77483	2.25E-06
5352	DLX1	-4.89802	0.000316228
26332	NTS	-4.92922	0.000411631
33565	UTS2	-5.26698	2.91E-07
3220	CAMKV	-5.35563	1.08E-05
2631	C22ORF42	-5.4488	2.15E-07
29220	RIT2	-5.49937	9.53E-12
31359	SPOCK2	-5.66406	5.68E-06
12746	ISLR2	-5.6746	0.000247482
32591	TMOD1	-5.689	7.66E-12
3215	CAMK2N1	-5.84508	2.30E-06
33592	VAT1L	-6.26024	7.74E-07
27971	POMC	-6.74106	6.72E-05
26219	NPTX2	-7.85511	1.15E-05
25939	NELL1	-8.58778	1.80E-08
33624	VGF	-8.61516	1.37E-05
31223	SOX3	-10.3701	8.71E-09
30314	SIX6	-12.5834	1.04E-12
26965	OTP	-14.2469	6.08E-10
12743	ISL1	-21.0507	6.48E-05
31479	SST	-21.3179	0.000281588
12746	ISLR2	-5.6746	0.000247482
32591	TMOD1	-5.689	7.66E-12
3215	CAMK2N1	-5.84508	2.30E-06

Таблица 6. показан примерный список антител, применяемых в качестве маркеров, включая концентрацию (т.е. разбавление) антител, применяемых в качестве примера источника антител.

В некоторых вариантах реализации, связанные антитела идентифицировали с применением вторичных антител, конъюгированных с Alexa488, Alexa555 или Alexa647 (Molecular Probes, Carlsbad, Калифорния, США).

В некоторых вариантах реализации применяли вторичные биотинилированные антитела для идентификации связанных первичных антител, с последующей визуализацией с применением хромогена DAB (3,3'-диаминобензидина)

антитело (primary)	разбавление	источник	месторасположения
ядерный антиген человека	1:100	Millipore	Billerica, MA
адгезивная молекула клеток человека	1:100	Santa Cruz	Santa Cruz, CA
Тирозингидроксилаза (TH)	1:1000/1:500	Pel-Freez/ImmunoStar	Rogers, AR/Hudson, WI
β-тубулин III	1:500/1:2000	Covance	Littleton, CO/ Princeton, NJ
даблкаротин	1:100	Millipore	Billerica, MA
специфичный лоя человека Nestin	1:300	R&D	Minneapolis, MN
Nestin # 130	1:50	R. McKay	NINDS, NIH
FoxA2	1:100	Santa Cruz	Santa Cruz, CA
Pitx3	1:100	Millipore	Billerica, MA
β-катенин	1:100	BD	Franklin Lakes, NJ
коллаген	1:100	Oncogene	LaJolla, CA
цитокертин	1:100	DAKO	Glostrup DK

Oct-4	1:200	Santa Cruz	Billerica, MA
Ki-67	1:200 / 1:400	Zymed / DAKO	San Francisco, CA
поликлональная GABA	1:2000	Sigma	St Louis, MI
серотонин (5-HT)	1:2000	Sigma	St Louis, MI
поликлональная GFAP	1:2000	DAKO	Glostrup, DK
калбидин	1:300	Abcam	Cambridge, MA
VMAT2	1:200	Millipore	Billerica, MA
DAT	1:1000 / 1:2000	Millipore	Billerica, MA
GFP	1:1000	Molecular Probes	Carlsbad, CA
Girk2	1:200	Abcam / Alomone	Cambridge, MA / Israel
FoxG1	1:100	NeuraCell	Rensselaer, NY
Pax6	1:100	Covance	Princeton, NJ
Otx2	1:2000	Strategic Diagnostics	Newark, DE
Lmx1a	1:2000	Millipore	Pittsburgh, PA
синапсин	1:1000	Sigma	St Louis, MI
Iba-1	1:200	Millipore	Billerica, MA
ED-1	1:200	Millipore	Pittsburgh, PA
NCAM человека (Eric-1)	1:100	Santa Cruz	Santa Cruz, CA
специфичный для человека цитоплазматический (SC-121)	1:1000	Stem Cells Inc.	Newark, CA
Nurr-1	1:1500	Perseus Proteomics	Япония

Таблица 7. Примеры предусмотренной дифференцировки в ДА нейроны с ограничением по типу клеток

Тип клеток	маркер	описание анализа	предполагаемые пределы
FP/ ДА среднего мозга	FOXA2/L MX1A	ИГХ: со-экспрессия @ в день 13 & день 25; валидация количественной ПЦР-ОТ	> 50%
предшественник ДА нейронов	FOXA2/T H; TH/NURR1	ИГХ: со-экспрессия @ в день 25; валидация количественной ПЦР-ОТ	> 25%
Плюрипотентные клетки	ОСТ-4;	ИГХ: @ в день 25; валидация количественной ПЦР-ОТ	< 2 %
Пролиферирующие клетки	Ki67	ИГХ	< 25 %
предшественник (переднего мозга)	FOXG1; PAX6	ИГХ: @ в день 25; валидация количественной ПЦР-ОТ	< 10%
выход ДА нейронов	TH/FOXA 2	ИГХ: со-экспрессия @ в день 25 из ЭСКч, посеянных в день 0	> 1DA п/ЭСКч
выживание <i>In vivo</i>	TH/FOXA 2 (in vivo)	Гистология <i>in vivo</i> @ 4 недели после приживления	> 2,000 / животное
		200 тыс клеток	

Таблица 8. Примеры экспериментов по определению значения некоторых факторов в получении ДА нейронов

	LDN	SB	PURM	CHIR	SHH	BDNF	GDNF	AA	Dbc	TGFB3	DAPT
Контроль											
полное выживание											
+/-S											
HH											
+/-BDNF											
+/-GDNF											
+/-AA											
+/-dbcAMP											
+/-TGFB3											
+/-DAPT											

Таблица 9. Примеры способов масштабирования культуры см/ДА нейронов, в частности, в получении культур уровня GMP для применения в клинике

	Пилотный масштаб (x 3)	промежуточный масштаб (x ≥ 1)	клинический масштаб
размороженные лейкоциты	1 флакон – 1x10 ⁶ на 6 см чашке	7 флаконов - 7x10 ⁶ на 15 см x 1	42 флаконов – 7x10 ⁶ на 15 см x 6
Пассаж 1 – кластеры	1:1 – 1:5 на 6 см чашках	1:1 – 1:5 на 15 см чашках	1:1 – 1:5 на 15 см чашках
Пассаж 2 – кластеры	2 x 15 см чашках	6 x 15 см чашках	36 x 15 см чашках
Пассаж 3 – Accutase (нейральная индукция)	1 x 15 см чашке при высокой плотности (приблизительно 3.0x10 ⁷ клеток)	3 x 15 см чашках при высокой плотности (приблизительно 9.0x10 ⁷ клеток)	18 x 15 см чашках при высокой плотности (приблизительно 5.4 x10 ⁸ клеток)
Пассаж 4 – Аккутаза (день 15-20)	1:1	1:1	1:1
Криоконсервация (день 25)	приблизительно 1.2 x 10 ⁸ , при предположительно 50% потерях после криоконсервации = приблизительно 6 x 10 ⁷ жизнеспособных клеток	приблизительно 3.6 x 10 ⁸ , при предположительно 50% потерях после криоконсервации = приблизительно 1.8 x 10 ⁸ жизнеспособных клеток	приблизительно 2.16 x 10 ⁹ , при предположительно 50% потерях после криоконсервации = приблизительно 1 x 10 ⁹ жизнеспособных клеток

Таблица 10. Пример in vivo оценки продуктов линии
ЭСКч - состав трансплантата

Тип клеток	Маркер	Описание анализа	Предполагаемые пределы
выход ДА нейронов	TH/FOXA2	Тереологическая оценка общего числа TH/FoxA2 клеток (ИГХ) в трансплантате	> 5,000 на 200,000 привитых
Коэффициент пролиферации	Ki67 (MIB-1)	ИГС на Ki67; процент от общего числа клеток	<1%
Плюрипотентные клетки	OCT-4 / Nanog	ИГХ	<0.5 %
Серотонинергические нейроны	5-HT (серотонин)	ИГХ	< 1 %
Предшественники переднего мозга	FOXG1; PAX6	ИГХ	< 10%
Производные тератомы	Myosin;cytokeratins; αfetoprotein	ИГХ	<1%

Таблица 11. Пример in vivo оценки продуктов линии
ЭСКч - поведенческие тесты

Тест	Параметр	Описание анализа	Предполагаемые пределы
Асфетаминовые повороты (*)	Общее число поворотов/мин (ипси-минус, контралатеральные)	Повороты в сторону повреждения после интраперитонеальной инъекции амфетамина	< 1 поворотов/мин
Шаговый тест	% компенсация контралатеральных шагов /общая компенсация	Начало шагания с использованием конечности на контралатеральной стороне	40-50%
тест с цилиндром	% использование ипсилатеральной конечности /общее число	Спонтанное исследование ипси-конечностью по сравнению с контралатеральной конечностью	Мин. 20% улучшение по сравнению с состоянием до пересадки

(*) В некоторых вариантах реализации крысы делают >6 поворотов/мин, стабильно пересаженные трансплантаты.

Экспериментальная часть.

Приведенные ниже примеры служат для иллюстрации конкретных вариантов осуществления и аспектов настоящего изобретения, и не предназначены для ограничения его объема. В последующих описаниях экспериментов применяются следующие сокращения: N (Н) (нормальный); М (молярный); mM (миллимолярный); мкМ (микромолярный); моль (моль); ммоль (миллимоль); мкмоль (микромоль); нмоль

(наномоль); пмоль (пикомоль); г (грамм); мг (миллиграмм); мкг (микрограмм); нг (нанограмм); пг (пикограмм); л (литр); мл (миллилитр); мкл (микролитр); см (сантиметр); мм (миллиметр); мкм (микрометр); нм (нанометр); U (единица); мин (минута); с и сек (секунда); град. (градус); pen (пенициллин), strep (стрептомицин) и °C (градус Цельсия).

Пример I.

Материалы и методы.

Краткое описание методов: Линии человеческих ЭСК (ESC) (H9, H1) и iPСК (2C6 и SeV6) обрабатывали в соответствии с модифицированным протоколом индукции вентральных пластинок (Fasano, и др., *Cell Stem Cell* 6:336-347 (2010), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки), основанном на двойном ингибировании SMAD (Dual SMAD-inhibition) (Chambers, и др. *Nat. Biotechnol.* 27:275-280 (2009), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Время воздействия реагентов SHH C25II, пурморфамин, FGF8 и CHIR99021 на вентральные пластинки среднего мозга оптимизировали для получения новых популяций ДА нейронов (см. фиг. 1d). После индукции вентральных пластинок последующее созревание (11-25 дней или дольше 25 дней в культуре до по меньшей мере 100 дней в культуре) осуществляли в среде для дифференцировки на основе Neurobasal/B27 в присутствии факторов выживаемости и созревания ДА нейронов (Perrig, и др. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12543-8 (2004), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки), таких как AA, BDNF, GDNF, TGFβ3 и dbcAMP (подробности приведены в полном описании метода). Фенотип полученной популяции ДА нейронов тщательно исследовали иммуноцитохимическими методами, методом количественной ОТ-ПЦР, определения глобального профиля экспрессии генов, ВЭЖХ-анализа для определения дофамина и регистрации электрофизиологических характеристик *in vitro*. Исследования *in vivo* осуществляли на грызунах с гемипаркинсонизмом (мыши или крысы, которым токсин 6OHDA был введен в одно полушарие мозга). Указанные исследования проводили на незрелых мышцах NOD-SCID IL2Rgc (Jackson labs) и взрослых крысах Sprague Dawley из Taconic Farms, у которых вызывали повреждения 6-гидроксидопамном посредством стереотактических инъекций указанного токсина как описано ранее, а также на двух взрослых макаках-резус, получавших односторонние инъекции МРТР в сонную артерию.

ДА нейроны вводили стереотактически в стриатум указанных животных (150×10^3 клеток в мышей, 250×10^3 клеток в крыс) и суммарно 7.5×10^6 клеток (распределенных в 6 участков; по 3 с каждой стороны мозга) макакам. Поведенческие тесты осуществляли ежемесячно после трансплантации, включая тест на вращение, индуцированное амфетамином, а также тест на фокальную акинезию ("stepping test", шаговый тест) и тест на использование конечностей (тест в цилиндре). Крыс и мышей умерщвляли на 18-20 неделе, а приматов - через 1 месяц после трансплантации. Изучение характеристик трансплантатов осуществляли посредством стереологического анализа количества клеток и объема трансплантата, а также посредством тщательного исследования фенотипа с применением иммуногистохимических методов.

ДА нейрон. Линии ЭСКч H9 (WA-09, XX, 27-55 пассажей после 10/2009), H1 (WA-01, XY, 30-40 пассажей после 6/2010) и линии iPСК 2C6 (Kim, и др. *Cell Stem Cell* 8:695-706 (2011), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) (XY, 20-30 пассажей) и SeV6 (XY, 20-30 пассажей; получены из эмбриональных фибробластов MRC-5 с применением неинтегрирующей 4-х факторной векторной системы Sendai (Ban, и др. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (2011) 108(34):14234-14239; 10.1073/pnas.1103509108, цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) поддерживали на эмбриональных фибробластах мыши при расчетных концентрациях посева в диапазоне от $0,5 \times 10^3$ на см^2 до 100×10^3 на см^2 на по ЭС клеткам человека, при которых клетки склонны к образованию кластеров (MEF, Global Stem, Rockville, MD) в оптимальной среде для ЭС клеток человека, содержащей 20% заменителя сыворотки Knockout serum replacement (KSR, Invitrogen, Carlsbad, California) (как описано ранее (Kim, и др. *Cell Stem Cell* 8:695-706 (2011), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Используемое количество Knockout serum replacement может варьировать в диапазоне от 0 до 40%.

Индукция нейронов. Для индукции дофаминовых нейронов вентральной пластинки среднего мозга использовали модифицированную версию двойного ингибирования SMAD (Chambers, и др. *Nat. Biotechnol.* 27:275-280 (2009), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) и протокол индукции вентральных пластинок (Fasano, и др. *Cell Stem Cell* 6:336-347 (2010), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки), основанного на обработке в течение определенного времени реагентами LDN-193189 (100 нМ (в диапазоне концентраций 0,5-50 мкМ, Stemgent, Cambridge, Massachusetts), SB431542 (10 мкМ (в диапазоне концентраций 0,5-50 мкМ, Tocris, Ellisville, MI), SHH C25II (100 нг/мл (в диапазоне концентраций 10-2000 нг/мл, R&D, Minneapolis, MN), пурморфамином (2 мкМ (в диапазоне концентраций 10-500 нг/мл, Stemgent), FGF8 (100 нг/мл (в диапазоне концентраций 10-500 нг/мл, R&D) и CHIR99021 (CHIR; 3 мкМ (в диапазоне концентраций 0,1-10 мкМ, Stemgent). Замечание: в протоколе индукции вентральных пластинок обработка "SHH" относится к обработке, т.е. осуществлению контакта, клеток комбинацией SHH C25II 100 нг/мл+пурморфамин (2 мкМ). Клетки высевали ($35-40 \times 10^3$ клеток/ см^2) и выращивали в течение 11 дней на геле "matrigel" или "geltrex"

(использовались в том виде, в котором приобретены) (BD, Franklin Lakes, New Jersey, США) в среде с заменителем сыворотки Knockout serum replacement (KSR), содержащей DMEM, 15% KSR, 2 мМ L-глутамин и 10 мМ (в диапазоне концентраций 1-25 мМ) β-меркаптоэтанол. Среда KSR последовательно замещали средой N2, начиная с 5 дня дифференцировки, смешивая их в соотношениях 75%(KSR):25%(N2) на 5-6 день, 50% (KSR):50%(N2) на 7-8 день и 25% (KSR):75% (N2) на 9-10 день, как описано ранее (Chambers, и др. *Nat. Biotechnol.* 27:275-280 (2009), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). На 11 день среду заменяли на среду Neurobasal/B27 (разведение 1:50) /L-Glut-содержащую (эффективный диапазон 0,2-2 мМ) среду (NB/B27; Invitrogen), дополненную CHIR (до 13 дня) и BDNF (полученный из мозга нейротрофный фактор, 20 нг/мл в диапазоне от 5 до 100; R&D), аскорбиновой кислотой (AA; 0,2 мМ (в диапазоне концентраций 0,01-1 мМ), Sigma, St Louis, MI), GDNF (нейтрофный фактор глиальных клеток, 20 нг/мл (в диапазоне концентраций 1-200 нг/мл); R&D), TGFβ3 (трансформирующий фактор роста типа β3, 1 нг/мл (в диапазоне концентраций 0,1-25 нг/мл); R&D), дибутирил цАМФ (0,5 мМ (в диапазоне концентраций 0,05-2 мМ); Sigma), и DAPT (10 мМ (в диапазоне концентраций 0,5-50 нМ); Tocris,) в течение 9 дней. На 20 день клетки подвергали диссоциации с применением Accutase® (Innovative Cell Technology, San Diego, California) и пересевали в условиях повышенной плотности клеток (например, 300-400 тыс. клеток/см²) на чашки, предварительно покрытые полиорнитинном (PO); 15 мкг/мл (в диапазоне концентраций 1-50 мкг/мл)/ламинином (1 мкг/мл) (в диапазоне концентраций 0,1-10 мкг/мл)/фибронектином (2 мкг/мл (в диапазоне концентраций 0,1-20 мкг/мл) в среде для дифференцировки (NB/B27+BDNF, AA, GDNF, dbcAMP (в диапазоне концентраций, указанных в настоящем описании), TGFβ3 и DAPT (в диапазоне концентраций, указанных в настоящем описании) до достижения желаемой стадии созревания для конкретного эксперимента.

Для индукции ДА нейронов на основе розеток частично использовали ранее описанные протоколы (Perrier, и др. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12543-8 (2004), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) с по меньшей мере одним исключением, когда двойное ингибирование SMAD использовали для ускорения начальной стадии индукции нейронов. Вкратце, ЭСКЧ индуцировали для нейронного пути развития совместным культивированием с облученными клетками MS5 в среде KSR с добавлением SB431542 и Noggin (250 нг/мл (в диапазоне концентраций 10-1000 нг/мл); R&D), с 2-8 дней и SHH+FGF8 с 6-11 дней дифференцировки. После 11 дней в среде KSR нейронные розетки собирали вручную и выращивали (стадия P1) в среде N2 с добавлением SHH, FGF8, BDNF и AA как описано ранее (Perrier, и др. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12543-8 (2004), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). После 5-7 дней на стадии P1 розетки снова собирали вручную и измельчали в порошок с последующей инкубацией в не содержащем Ca²⁺/Mg²⁺ сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) в течение 1 ч и пересевали на чашки, покрытые полиорнитинном (PO) / ламинином / фибронектином. Составление паттерна с SHH/FGF8 продолжали в течение 7 дней на стадии P2 с последующей окончательной дифференцировкой в присутствии BDNF, AA, GDNF, TGFβ3 и dbcAMP как описано выше до достижения желаемой стадии созревания для конкретного эксперимента (обычно 5-7 дней для экспериментов по трансплантации или 32 дня для функциональных экспериментов *in vitro*).

Анализ экспрессии генов. Тотальную РНК выделяли в ходе дифференцировки в следующие дни: 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 и 25 для каждого эксперимента с условиями: контроль LSB, LSB/SHH/FGF8 и LSB/SHH/FGF8/CHIR с применением набора RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Для анализа на биочипах тотальную РНК обрабатывали на аппарате MSKCC Genomic core и гибридизовали на биочипах в виде бусин Illumina Human ref-12 в соответствии с инструкцией производителя. Сравнения осуществляли каждый день и для каждого набора условий с применением пакета LIMMA от Bioconductor (worldwideweb.bioconductor.org). Гены, у которых скорректированное значение Р было меньше 0,05, а кратность изменения экспрессии была выше двух, считали статистически значимыми. Некоторые из описательных анализов данных на биочипах и представление выполняли с применением коммерчески доступного программного пакета (Partek Genomics Suite (версия 6.10.0915)). Для анализа количественной ОТ-ПЦР тотальную РНК на 25 день для каждого набора условий подвергали обратной транскрипции (Quantitech, Qiagen) и амплифицированный материал анализировали с применением коммерчески доступной тест-системы "Taqman gene expression assays" (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) с нормировкой данных по HPRT. Каждая точка представляет 9 технических повторов из 3 независимых биологических образцов. Первичные данные экспериментов на биочипах еще не доступны на GEO worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov/geo).

Хирургическое вмешательство у животных. Эксперименты на грызунах и обезьянах осуществляли в соответствии с инструкциями Национального института здравоохранения (NIH), и они были одобрены местным институтским комитетом охраны и использования животных (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC), ведомственным комитетом биобезопасности (Institutional Biosafety Committee, IBC), а также научно-исследовательским комитетом по эмбриональным стволовым клеткам (the Embryonic Stem Cell Research Committee, ESCRO).

Мыши. Мышей, нокаутных по NOD-SCID IL2Rgc (весом 20-35 г; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, США) подвергали анестезии кетаминном (90 мг/кг; Akorn, Decatur, IL) и ксилазином (4 мг/кг; Fort

Dodge, IA). 6-Гидроксидофамин (10 мкг (в диапазоне концентраций 0,1-20 мкг), 6-OHDA (Sigma-Aldrich) вводили стереотактически в стриатум со следующими координатами (в миллиметрах): AP, 0,5 (от бregмы; в качестве точки отсчета для стереотактического хирургического вмешательства использовали шов черепа); ML, -2,0; DV, -3,0 (от твердой мозговой оболочки, мембраны покрывающей мозг, использовавшейся в качестве точки отсчета). Мыши с успешными поражениями (в среднем > 6 вращений в минуту) были выбраны для трансплантации. Общее количество 150×10^3 клеток вводили в объеме 1,5 мкл в стриатум по следующим координатам (в мм): AP, 0,5; ML, -1,8; DV, 3,2. Мышей умерщвляли через 18 недель после трансплантации.

Крысы. Взрослых самок крыс Sprague-Dawley (Taconic, Hudson, NY) (180-230 г) подвергали анестезии кетамин (90 мг/кг) и ксилазином (4 мг/кг) в процессе хирургических процедур. Односторонние повреждения медиального переднемозгового пучка нигростриального пути были получены стереотаксической инъекцией 6-OHDA (3,6 мг/мл в 0,2% аскорбиновой кислоте и 0,9% солевом растворе, Sigma) в двух местах (Studer, и др. *Nature Neurosci.* 1:290-295 (1998), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Крыс отбирали для трансплантации, если количество вращений, индуцированных амфетамином, превышало 6 вращений в минуту через 6-8 недель после инъекции. 250×10^3 клеток трансплантировали в стриатум каждого животного (Координаты: AP +1,0 мм, мл -2,5 мм и V-4,7 мм; гребенка установлена на -2,5). Контрольные животные получали вместо этого ФБР. Хирургические процедуры описаны ранее (Studer, и др. *Nature Neurosci.* 1:290-295 (1998), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Ежедневные внутрибрюшинные инъекции циклоспорина 15 мг/кг (Bedford Labs, Bedford, OH) были начаты за 24 ч перед трансплантацией клеток и продолжались до умерщвления, через 20 недель после трансплантации клеток.

Приматы. Двух взрослых (17-18 лет; 10-12 кг; самки) макак-резус приводили в состояние гемипаркинсонизма введением МРТР в сонную артерию с последующим еженедельным внутривенным введением МРТР для создания двустороннего паркинсоновского синдрома (Kordower, и др. *Science* 290:767-773 (2000), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). У обоих животных наблюдались паркинсоновские симптомы, согласующиеся с повреждениями от средней до сильной тяжести, основанные на анализе поведения, включая искривленную осанку, подволакивание ноги и симптомы мышечной ригидности (непластичность движений), пренебрежения (моторное восприятие латерального стимула) и брадикинезия (замедленная инициация движения). Эти параметры могут быть оценены на обезьянах с применением модифицированной паркинсоновской клинической шкалы оценки (CRS). В день операции по трансплантации животным вводили транквилизатор кетамин (3,0 мг/кг внутримышечно) и дексдомитора (0,02-0,04 мг/кг внутримышечно), интубировали, чтобы поддерживать стабильную вентиляцию дыхательных путей и подвергали анестезии изофлураном. Затем их помещали в стереотаксическую рамку для хирургического вмешательства. Обоим макак-резус подвергали операции однократно с тремя внутрочерепными инъекциями культур ДА, полученные из вентральных пластинок человека, основываясь на стереотаксических координатах (Paxinos, и др. *The Rhesus Monkey Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press, 2000), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Двусторонние инъекции клеток (10 мкл в инъекции; 125,000 клеток/мкл) осуществляли в три положения (1 - задний хвостовой придаток, 2-пре-комиссуральную скорлупу и вышележащее белое вещество) общим объемом 30 мкл на полушарие. Использовали инфузионный насос, присоединенный к стереотаксическому микроманипулятору, для доставки клеток на скорости 1 мкл/мин посредством шприца Hamilton объемом 50 мкл с иглой 28 G. После завершения инъекций иглу оставляли на месте на 2-5 мин, чтобы инфузат смог диффундировать из наконечника шприца, а затем медленно извлекали шприц. Немедленно после хирургического воздействия животные получали анальгетик (бупренекс, 0,01 мг/кг внутримышечно, два раза в день в течение 72 ч после хирургического вмешательства; мелоксикам, 0,1 мг/кг подкожно, один раз в день в течение 72 ч после хирургического вмешательства), а также антибиотик (цефазолин, 25 мг/кг внутримышечно, два раза в день) в течение 72 ч после хирургического вмешательства. Животные получали циклоспорин А (Neoral, Sandimmune) орально (30 мг/кг со снижением до 15 мг/кг) ежедневно, начиная за 48 ч до хирургического вмешательства и до момента умерщвления, в течение одного месяца после трансплантации.

Поведенческие тесты. Тест на вращение, индуцированное амфетамином, (мыши и крысы) и тест на фокальную акинезию (крысы) проводили перед трансплантацией и через 4, 8, 12, 18 недель после трансплантации. Вращательное поведение у мышей регистрировали через 10 мин после внутрибрюшинной инъекции d-амфетамина (10 мг/кг, Sigma) и записывали в течение 30 мин. Вращательное поведение у крыс записывали в течение 40 мин после внутрибрюшинной инъекции d-амфетамина (5 мг/кг) и автоматически оценивали с помощью системы TSE VideoMot2 (Germany). Данные были представлены в виде среднего количества поворотов в минуту. Тест на фокальную акинезию был модифицирован по сравнению с описанием у Blume et al. *Exp. Neurol.* 219:208-211 (2009) и Crawley, и др. *What's Wrong With My Mouse: Behavioral Phenotyping of Transgenic и Knockout Mice* (Wiley-Liss, 2000), каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки. Вкратце, каждую крысу помещали на плоскую поверхность; ее задние ноги поднимали за счет мягкого подъема хвоста так, чтобы передние лапы касались

стола. Экспериментатор тянул крысу назад на расстояние 1 метр с постоянной скоростью. Подсчитывали число компенсирующих шагов как контралатеральной, так и ипсилатеральной лапами. Данные представляли как процент числа компенсирующих шагов контралатеральной лапой/количество компенсирующих шагов контралатеральной лапой + число шагов ипсилатеральной лапой. Тест в цилиндре осуществляли, помещая каждое животное в стеклянный цилиндр и считая количество касаний стенки цилиндра ипсилатеральной лапой количеству касаний контралатеральной лапой (на 20 касаний), как описано ранее (Tabar, и др. *Nature Med.* 14:379-381 (2008), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки).

Обработка тканей.

Мыши и крысы: Животные (мыши и крысы) получали повышенную дозу пентобарбитала (50 мг/кг) внутривенно для индукции глубокой анестезии, а затем им осуществляли перфузию 4% параформальдегидом (PFA). Мозг извлекали, фиксировали в 4% ПФА, а затем вымачивали в 30% растворе сахаразы в течение 2-5 дней. Срезы получали с помощью криостата после введения О.С.Т. (Sakura-Finetek, Torgance, California).

Приматы: Животных умерщвляли после глубокой анестезии кетамин (10 мг/кг, внутримышечно (IM)) и пентобарбиталом (25 мг/кг, внутривенно (IV)) последствием сердечной инфузии с 0,9% физиологическим раствором с последующим введением свежего холодного фиксирующего раствора 4% PFA (pH7.4). Немедленно после первичной фиксации, мозги извлекали из черепа и осуществляли последующую фиксацию погружением в 4% PFA на 24-36 ч. Затем их промывали и выдерживали в 10% сахарозе в качалке с медленным перемешиванием при 4°C, позволяя им "погружаться". Затем процесс повторяли в 20% сахарозе и 30% сахарозе. Целые мозги коронально разрезали на последовательные срезы толщиной 40 мкм на холодном санном микротоме и хранили в состоянии сводобного плавания в криоконсервирующей среде при -20°C.

Иммуногистохимия: Клетки фиксировали в 4% PFA и блокировали 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA) с 0,3% Тритоном. Секции тканей мозга отмывали в холодном PBS и обрабатывали одинаковым образом. Первичные антитела разбавляли в 1-5% BSA или нормализованной козьей сыворотки и инкубировали в соответствии с рекомендациями производителя. Полный список антител и источников приведен в табл. 6. Подходящие вторичные антитела, конъюгированные с Alexa488, Alexa555 и Alexa647 (Molecular Probes, Carlsbad, California), использовали с ядерным контрастным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (Thermo Fisher, Rockford, Illinois). Для некоторых анализов использовали биотинилированные антитела с последующей визуализацией с помощью хромогена DAB (3,3'-диаминобензидин).

Анализ ВЭЖХ. Для измерения уровней дофамина, гомованилиновой кислоты (HVA) и DOPAC (3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты) проводили обращенно-фазовую ВЭЖХ с электрохимической детекцией как описано ранее (Roy, и др. *Nature Med.* 12:1259-1268 (2006); Studer, и др. *Brain Res. Bull.* 41:143-150 (1996), каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки). Образцы культур отбирали в перхлорную кислоту на 65 день дифференцировки. В некоторых экспериментах DA измеряли непосредственно в среде с применением той же системы обнаружения, но с последующей экстракцией дофамина и его метаболитов с применением коммерчески доступного набора, как описано ранее (Studer, и др. *Brain Res. Bull.* 41:143-150 (1996), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки).

Регистрация электрофизиологических параметров: Культуры переносили в регистрирующую камеру на прямой микроскоп, оборудованный 40X водоиммерсионным объективом (Eclipse E600FN; Nikon); культуры перфузировали физраствором, содержащим, в mM: 125 NaCl, 2,5 KCl, 25 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ и 25 глюкозы (34°C; насыщенным 95% O₂-5% CO₂; pH 7.4; 298 мОсм/л). Скорость потока физраствора составляла 2-3 мл/мин при пропускании через втроенный нагреватель (SH-27B с контроллером TC-324B; Warner Instruments). Нейроны визуализировали методом видео-микроскопии с охлаждаемой цифровой ПЗС-камерой (CoolSNAP ES², Photometries, Rona Scientific, Tucson, Arizona, США). Для регистрации электрофизиологических параметров отбирали клетки, похожие по форме на нейроны, с хорошим ветвлением дендритов. Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp) на целых соматических клетках в текущей конфигурации фиксации осуществляли с применением усилителя MultiClamp 700B (Molecular Devices). Сигналы фильтровали в диапазоне 1-4 кГц и оцифровывали на 5-20 к Гц с применением Digidata 1440A (Molecular Devices). Регистрирующие контактные электроды были выполнены из волокна из боросиликатного волокна (Sutter Instruments), вытянутого на пуллере Flaming-Brown (P-97, Sutter Instruments) и имели сопротивление 4-6 МОм в ванне. Электроды заполняли внутренним раствором, содержащим в mM: 135 K-MeSO₄, 5 KCl, 5 HEPES, 0,25 EGTA, 10 фосфокреатинади(трис), 2 АТФ-Mg и 0,5 ГТФ-Na (pH 7,3, осмолярность доводили до 290-300 мОсм/л). Мостиковый усилитель настраивали таким образом, чтобы компенсировать сопротивление электродов, и следили за ним. Емкость электродов компенсировали. Если последовательное соединение возрастало >20% в ходе фиксации потенциала данные отбрасывали, поскольку повышение сопротивления указывает на частичные технические неполадки в ходе измерения.

Подсчет клеток и стереологические анализы. Процентную долю клеток, положительных по марке-

ру, на вентральной пластинке (день 11), фиг. 1, предшественников дофаминовых нейронов среднего мозга (день 25), фиг. 2, и на стадии зрелых ДА нейронов (день 50 или позже), фиг. 3 и 11, определяли в образцах, полученных в по меньшей мере 3 независимых экспериментах для каждого. Изображения для подсчета выбирали случайным образом (равномерное распределение), каждое изображение оценивали сначала по числу DAPI-положительных ядер, после чего подсчитывали число клеток, экспрессирующих представляющий интерес маркер. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM (стандартная ошибка среднего). Количество человеческих клеток (идентифицируемых при помощи анти-hNA) и TH+ нейронов в трансплантате освещали подсчитывали на каждом десятом срезе, если удавалось определить трансплантат. Количество клеток и объем трансплантата определяли с применением оптического зонда аппарата для фракционного зондирования и оценочного устройства Cavalieri с применением программы Stereo Investigator software (MBF bioscience, Vermont, США) как описано у Tabar, et al. *Nat. Biotechnol.* 23:601-606 (2005); цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки. Данные представлены в форме оценочного общего числа клеток и общего объема трансплантата $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). Приведенные ниже составы характеризуют примеры среды для культивирования клеток для реализации настоящих изобретений.

Приведенные ниже составы характеризуют примеры среды для культивирования клеток для реализации настоящих изобретений.

Поддерживающая среда для ЭСКч (1 л): 800 мл DMEM/F12, 200 мл заменителя сыворотки Knock-out Serum Replacement, 5 мл 200 мМ L-глутамина, 5 мл Pen/Strep, 10 мл 10 мМ раствора 15 незаменимых аминокислот в минимальной среде MEM, 55 мкМ 13-меркаптоэтанола, и ФРФ-бета (bFGF, конечная концентрация 4 нг/мл).

Среда KSR для дифференцировки ЭСКч (1 л): 820 мл среды Knock out DMEM, 150 мл заменителя сыворотки Knock out Serum Replacement, 10 мл 200 мМ L-глутамина, 10 мл Pen/Strep, 10 мл 10 мМ MEM и 55 мкМ 13-меркаптоэтанола.

Среда N2 для дифференцировки ЭСКч (1 л): 985 мл дистиллированной H₂O с порошком DMEM/F12, 1,55 г глюкозы (Sigma, № по каталогу G7021), 2,00 г бикарбоната натрия (Sigma, № по каталогу S5761), путресцин (аликвота объемом 100 мкл из раствора 1,61 грамм в 100 мл дистиллированной воды; Sigma, № по каталогу P5780), прогестерон (аликвота 20 мкл раствора 0,032 грамм в 100 мл 100% этанола; Sigma, № по каталогу P8783), селенит натрия (аликвота объемом 60 0,5 мМ раствора в дистиллированной воде; Bioshop Canada, № по каталогу SEL888), и 100 мг трансферрина (Celliance/Millipore, № по каталогу 4452-01), и 25 мг инсулина (Sigma, № по каталогу 16634) в 10 мл 5 мМ NaOH.

Среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM) с 10% ФБС для приготовления PMEF ((первичных мышечных эмбриональных фибробластов (PMEF)) - фидерных клеток) (1 л): 885 мл среды DMEM, 100 мл ФБС, 10 мл Pen/Strep и 5 мл L-глутамина.

Минимальная поддерживающая среда Alpha (MEM) с 10% ФБС для приготовления среды для фидерных клеток MS-5 (1 л): 890 мл Alpha MEM, 100 мл ФБС, 10 мл раствора желатина с Pen/Strep (500 мл): Растворяют 0.5 желатина в 500 мл теплой (50-60°C) воды Milli-Q. Охлаждают до комнатной температуры.

Пример II.

В настоящем примере описано обнаружение малых молекул и установление времени обработки для обеспечения направленной дифференцировки нейронов FOXA2+LMX1A+DA согласно настоящему изобретению.

Следующее описание является кратким изложением некоторых экспериментальных находок, описанных в заявке: Обработка клеток, подвергнутых двойному ингибированию SMAD, агонистами SHH (пурморфамин+SHH) и FGF8 (S/F8) в отсутствие CHIR99021 обеспечивала значительное понижение экспрессии FOXA2 на 11 день и полное отсутствие экспрессии LMX1A (фиг. 1a, b). Предшествующий маркер OTX2 был сильно индуцирован в культурах, обработанных LSB и LSB/S/F8/CHIR, но не в условиях LSB/S/F8 (фиг. 1a, c).

Авторы настоящего изобретения ранее использовали несколько других методов направленной дифференцировки, которые приводили к получению популяции клеток, содержащих ДА-подобные нейроны. Эти ДА-подобные нейроны использовали в экспериментах по трансплантации, которые выявили проблемы при дальнейшем использовании этих клеток в терапевтических приложениях. Например, процедуры, описанные у Perrier и др., 2004 и Fasano и др., 2010, включая индукцию нейронов MS5, привели к получению розеткообразных структур клеток и были использованы для получения предшественников на 11 день, см. например, фиг. 2, 16 и 17, которые в дальнейшем были использованы для получения ДА-подобных нейронов. Эти нейроны были получены из низкого процента клеток-предшественников из популяций клеток на 11 день. Эксперименты по трансплантации, в которых использовали эти нейроны, продемонстрировали плохую выживаемость после трансплантации и потерю фенотипа ДА-подобных нейронов в дополнение к наблюдаемому после трансплантации образованию неприемлемых типов нейронов вместе с утратой контроля роста, что приводило к развитию тератом. См. фиг. 16 и 17.

В частности, ЭСКч клетки в фазе P0 приводили в контакт с молекулами для начала нейронной индукции клеток Oct4+ в клетки розеткообразных структур с применением фидерных клеток MS5 (Perrier и

др., 2004). На стадии P1 клетки розеткообразных структур развивались в результате контакта клеток с дополнительными молекулами для дифференцировки клеток в клетки стадии P2 с характерным паттерном экспрессии, включая клетки-предшественники Pax2+/En1+DA, и затем дифференцировались в нейроны TH+/En1+DA. Эти клетки использовали для приживления трансплантата у крыс с вызванными 6ОНДА повреждениями и иммуносупрессией, индуцированной циклоспином А. Описанные эксперименты по трансплантации показали плохую выживаемость *in vivo*, потерю фенотипа TH+, проблемы, связанные с дальнейшим разрастанием в нежелательные, возможно летальные, клетки, такие как тератомы, и ростом в неприемлемые типы нейронов, которые могут вызвать дополнительные медицинские проблемы у пациента.

Наблюдалось очень маленькое количество выживших TH+ нейронов через 4,5 месяца после трансплантации (<50 TH+ клеток/животное) в трансплантатах из предшественников DA нейронов, полученных из рош структур, фиг. 16A. Однако в противоположность клеткам TH+, клетки, маркированные GFP (GFP находился под контролем убиквитарного промотора), показали довольно хорошую выживаемость после трансплантации. Это говорило о том, что клетками с наиболее хорошей выживаемостью были нейронные клетки, не относящиеся к DA нейронам (16B). Несколько клеток, полученных из трансплантата (hNA+, зеленые), одновременно экспрессировали TH (красные), что также говорило о том, что большинство трансплантированных клеток человека относятся к фенотипам нейронов, не являющихся DA нейронами, фиг. 16C. Секции фиг. 16D-E показывают, что, несмотря на очень плохую выживаемость *in vivo*, наблюдалось некоторое улучшение (варьируемое в низкой и высокой степени) в нескольких тестах поведения, таких как тест на вращение, индуцированное амфетамином, (D), тест в цилиндре и спонтанные вращения (E).

Индукцию нейронов без питающих клеток осуществляли как описано ранее (Chambers и др., 2009), но с модификациями для получения клеток вентральных пластинок (Fasano и др., 2010). При использовании модифицированного способа двойного ингибирования SMAD для дифференцировки плюрипотентных клеток в клетки вентральной пластинки авторы настоящего исследования ранее обнаружили, что для индукции FP на 11 день требовались высокие концентрации SHH. Например, в некоторых вариантах осуществления добавляли Sonic C25II в концентрации 200 нг/мл. В некоторых экспериментах добавляли DKK-1 (R&D; 100 нг/мл), FGF8 (R&D; 50 нг/мл), Wnt-1 (Peprotech; 50 нг/мл) и ретиноевую кислоту (R&D; 1 мМ), см. фиг. 17. При этом ни одна из популяций клеток, полученных с применением ранее известных методов, не содержала на 11 день высокий процент предшественников клеток FOXA2+/LMX1A+ вентральных пластинок среднего мозга, получаемых с применением способа согласно настоящему изобретению.

Как показано в настоящем описании, популяция клеток, содержащая плюрипотентные клетки, была выбрана авторами настоящего изобретения в качестве исходной популяции и посеяна в день 0. Перед дифференцировкой клетки выращивали до состояния, близкого к полной заселенности (между 60-100% конфлюентности). Эти клетки приводили в контакт с двойными ингибиторами SMAD (т.е. обрабатывали LDN-193189+SB431542="LSB") в день 0. Авторы настоящего изобретения поддерживали популяцию клеток с периодической подкормкой, содержащей свежий LSB до 11 дня и обнаружили, что некоторые из оставшихся клеток были LMX1A+, но не экспрессировали FOXA2 (фиг. 1a, b). Авторы посеяли дубликат исходной популяции клеток, а затем протестировали тип клеток (т.е. паттерны экспрессии генов/белков) после обработки смесями, содержащими любой из следующих агонистов SHH (пурморфамин+SHH) и FGF8 (S/F8), приводившихся в контакт с клетками в различных режимах обработки, т.е. контактировавшими с клетками в день 0, или 1 день, или 2 день, и т.д. в течение определенного периода времени, т.е. 24 ч, 48 ч и т.д. Исследовали три первичных примера условий культивирования, а именно: 1) клетки контактировали с LDN/SB (LSB) в день 0, затем контактировали со свежим LSB до 5 дня, на 5 день клетки приводили в контакт со свежим LDN без SB до 11го дня, 2) клетки контактировали с LDN/SB (LSB) в день 0, затем контактировали со свежим LSB до 5 дня, на 5 день клетки приводили в контакт со свежим LDN без SB до 11 дня, при этом в течение этого времени клетки дополнительно контактировали со свежим пурморфамином, SHH и FGF8 до 7 дня, и 3) клетки приводили в контакт с LDN/SB (LSB) в день 0, затем приводили в контакт со свежим LSB до 5 дня, на 5 день клетки приводили в контакт со свежим LDN без SB до 11 дня, при этом в течение этого времени клетки дополнительно контактировали со свежим пурморфамином, SHH и FGF8 до 7 дня, а также дополнительно контактировали со свежим CHIR, начиная с 3 дня культивирования до 11 дня с несколькими вариациями этих первичных условий. Эти эксперименты были направлены на определение оптимального выхода типов клеток. Систематические сравнения этих трех условий культивирования (фиг. 1d) осуществляли, путем определения глобального временного профиля экспрессии генов. См. примеры на фиг. 8 и табл. 1-6. Иерархическое выделение кластеров дифференциально экспрессировавшихся генов позволило различать эти три набора условий обработки на 11 день дифференцировки (фиг. 8a). FOXA1, FOXA2 и несколько других мишеней SHH ниже по каскады, включая PTCH1, были среди наиболее дифференциально регулировавшихся транскриптов в LSB/S/F8/CHIR в сравнении с наборами обработки LSB (фиг. 1e). Экспрессия LMX1A, NGN2, и DDC указывала на предопределенность пути развития в предшественника DA нейрона среднего мозга уже на 11 день (фиг. 1e, f). В отличие от этого, культуры LSB на 11 день были обогащены

маркерами предшественников дорсального заднего мозга, такими как HES5, PAX6, LHX2, и EMX2. Прямое сравнение LSB/S/F8/CHIR с обработкой LSB/S/F8 (фиг. 1f) подтвердило селективное обогащение маркеров предшественников ДА нейронов среднего мозга в группе LSB/S/F8/CHIR и указывало на идентичность предшественников гипоталамуса в культурах, обработанных LSB/S/F8, на основании дифференциальной экспрессии RAX1, SIX3, и SIX6 (см. также экспрессию POMC, OTP на фиг. 2D). Примеры списков дифференциально экспрессировавшихся транскриптов на 11 день приведены в табл. 1, 2 и на 25 день в табл. 3-5, а онтологический анализ генов - на фиг. 8b (DAVID; <http://david.abcc.ncifcrf.gov>), подтверждая обогащение канонического сигнального пути WNT при обработке CHIR. Первичные данные еще недоступны на GEO [worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov/geo/accession#](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/accession#): [TBD]]. Сравнительный временной анализ экспрессии генов маркеров предшественников ДА среднего мозга (фиг. 1g) с маркерами пути развития передних и вентральных нейронов, не являющихся ДА (фиг. 1h), привел к выявлению трех типов индукции: i) LSB: дорсальный задний мозг; ii) LSB/S/F8: вентральный/гипоталамический и iii) LSB/S/F8/CHIR: идентичный предшественнику ДА среднего мозга.

Пример III.

Дифференцировка ДА нейронов. Для дальнейшей дифференцировки клетки-предшественники содержали в среде для созревания нейронов (BAGCT - см. Материалы и методы). Проводили следующие виды сравнений между популяциями дифференцировавшихся клеток, полученных ранее известными методами и методами согласно настоящему изобретению: А) Иммуноцитохимический анализ на 50 день дифференцировки для TH в комбинации с LMX1A, FOXA2 и NURR1, В) Подсчет клеток TH+, FOXA2+, LMX1+, и NURR1+ среди общего количества клеток, сравнивая культуры, полученные из розеткообразных структур, с культурами, полученными из вентральных пластинок (LSB/S/F8/CHIR), С) Подсчет процентов подтипов нейронов серотонин+ (5-HT), и GABA+ (примесь нейронов, не являющихся ДА) на 50 день в культуре, полученной из вентральных пластинок, и культуре ДА нейронов, полученных из розеткообразных структур, и D) Анализ ВЭЖХ для измерения дофамина и метаболитов: сравнение уровней ДА, DOPAC и HVA между культурой из вентральных пластинок и культурой, полученной из розеткообразных структур. К 25 дню в трех популяциях клеток образовывались Tuj1+ нейроны (фиг. 2A) и клетки, экспрессирующие TH, фермент, ограничивающий скорость синтеза ДА. Однако обработка LSB/S/F8/CHIR привела к образованию TH+ клеток, которые одновременно экспрессировали LMX1A и FOXA2, и у которых наблюдалась сильная индукция ядерного рецептора NURR1 (NR4A2) (фиг. 2A, B). Сравнение экспрессии генов в культурах на 13 день и 25 день подтвердило сильную индукцию других постмитотических маркеров ДА нейронов (фиг. 2C). Характеристика идентичности ДА нейронов на 25 день в сравнении с культурами, обработанными LSB и LSB/S/F8, подтвердило обогащение по известным транскриптам ДА нейронов среднего мозга и выявило множество новых кандидатов в маркеры (фиг. 2D, табл. 3-5, фиг. 8b). Например, наиболее обогащенным транскриптом в LSB/S/F8/CHIR (группа ДА среднего мозга) был TTF3, ген, который ранее не ассоциировался с развитием ДА нейронов среднего мозга, но экспрессирующийся в высокой степени в черном веществе человека (фиг. 8c; Allen Brain Atlas: <http://human.brain-map.org>).

Схожие данные были получены для EBF-1, EBF-3 (фиг. 8c), а также для TTR, известной транскрипционной мишени для FOXA2 в печени. Данные, полученные в ходе разработки настоящего изобретения, указывали на обогащение нескольких генов PITX клетках-предшественниках ДА среднего мозга. PITX3, классический маркер ДА нейронов среднего мозга, также сильно экспрессировался на 25 день дифференцировки (фиг. 2E). Наконец, индукция как вентральных пластинок среднего мозга, так и ДА нейронов может быть легко воспроизведена в независимых линиях hESC и hiPSC (фиг. 9). Данные, приведенные в настоящем описании, продемонстрировали, что протокол LSB/S/F8/CHIR, в противоположность другим протестированным протоколам, позволяет получить клетки, экспрессирующие совокупность маркеров, соответствующую пути развития ДА нейронов среднего мозга.

Свойства ДА нейронов, полученных из вентральных пластинок, *in vitro* и *in vivo* сравнивали с ДА-подобными нейронами, полученными с применением промежуточных розеткообразных нейронных структур (фиг. 10 и 16). Получение розеткообразных нейронных структур в настоящее время является наиболее широко используемой стратегией получения нейронов ДА нейроны из ПСКч. Протоколы, основанные как на вентральных пластинках, так и на розеткообразных структурах были эффективными при получении TH+ нейронов, обладающих длительной жизнеспособностью *in vitro* (50 дней дифференцировки; фиг. 3a). Однако процент клеток TH+ был значительно выше в культурах, полученных на основе вентральных пластинок (фиг. 3b). Хотя у клеток TH+ в обоих протоколах обнаружили одновременную экспрессию NURR1, ДА нейроны, полученные на основе вентральных пластинок одновременно экспрессировали FOXA2 и LMX1A (фиг. 3a, b).

Было обнаружено несколько GABA- и серотонин (5-HT)-положительных ДА нейронов (фиг. 3c), также его метаболиты DOPAC и HVA присутствовали в культурах, полученных как по одному, так и по второму протоколу, но уровни ДА были примерно в 8 раз выше в культурах вентральных пластинок (фиг. 3d, e). ДА нейроны среднего мозга демонстрировали сильное разрастание волокон и сильную экспрессию нейронных маркеров созревания, включая синапсин, транспортер дофамина (DAT), и сопряженный с G-белком калиевый канал входящего выпрямления Kir3.2, также называемый GIRK2, экспрес-

сирующийся в ДА нейронах компактной части черного тела (substantia nigra pars compacta, SNpc) (фиг. 3f, 11). ДА нейроны SNpc *in vivo* проявляют электрофизиологический фенотип, отличает их от большинства других нейронов в мозге. В частности, они с небольшой частотой генерируют спонтанные пики (1-3 Гц). Более того, такая генерировать редкие пики дополняется медленным подпороговым колебательным потенциалом. После 2-3 недель *in vitro*, такие же физиологические признаки демонстрировали ДА нейроны SNpc, выращенные из ранних постнатальных мышей. ДА нейроны, дифференцированные из ЭСКч клеток устойчиво (4/4) демонстрировали этот отличительный физиологический фенотип (фиг. 3g-i).

Поддержание ДА нейронов мыши *in vitro* до 65 дня показало, что TH-положительные нейроны продолжают экспрессировать FoxA2 и имеют протяженные волокна, типичные для ДА нейронов мыши, фиг. 3a. Измерение высвобождения ДА методом ВЭЖХ показало, что TH+ нейроны возрастом 65 дней являются функциональными *in vitro*, фиг. 3b.

Пример IV.

Приживление новых популяций клеток ДА нейронов у грызунов, а именно мышей и крыс с поврежденными нейронами.

Одной из сложных задач в данной области является возможность получения из ПСКч клеток ДА нейронов среднего мозга, которые функционально приживаются *in vivo* без риска избыточного роста нейронов или неприемлемой дифференцировки в нейроны, не являющиеся нейронами среднего мозга, или образования тератом. На основании изучения трансплантации эмбриональных тканей авторы настоящего изобретения предположили, что время окончания клеточного цикла, маркером которого является экспрессия NURR1, может быть подходящей стадией для трансплантации (приблизительно 25 день дифференцировки, фиг. 2). Начальные эксперименты с применением клеток на 25 день на взрослых мышах без повреждений показали высокую выживаемость нейронов FOXA2+/TH+, полученных из ПСКч клеток, через 6 недель после трансплантации (фиг. 12). Проверили долгосрочную выживаемость клеток FOXA2+/TH+ в реципиентах с паркинсонизмом без последующего разрастания нейронов. Для этой цели с помощью 6-гидроксидофамина (6-OHDA) создавали повреждения (Tabar, и др. Nature Med. 14:379-381 (2008), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) в нокаутных по NOD-SCID IL2Rgc мышах, линии, которая эффективно обеспечивает выживаемость ксенотрансплантата с особенной чувствительностью к воздействию редкими онкогенными клетками (Quintana, и др. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. Nature 456:593-598 (2008), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Культуры ДА нейронов, как полученных из вентральных пластинок, так и из розеткообразных структур, трансплантировали (150×10^3 /животное) без предварительной очистки с целью выявления потенциальных загрязняющих клеток с высоким пролиферативным потенциалом. Через четыре с половиной месяца после трансплантации трансплантаты ДА нейронов, полученные из вентральных пластинок, показали хорошо сформированное ядро трансплантата, состоящее из TH+ клеток, одновременно экспрессирующих FOXA2 и специфический маркер hNCAM человека (фиг. 4a-c). Функциональный анализ показал устранение поведения с вращением, индуцированного амфетаминами. В отличие от этого, в трансплантатах ДА нейронов, полученных из розеткообразных структур, обнаружилось только несколько TH+ нейронов, и они не вызвали значительного облегчения поведения с вращением (фиг. 4d), а также было выявлено массивное разрастание нейронов (объем трансплантата $>20 \text{ мм}^3$; фиг. 13). Обширное разрастание нейронов, полученных из розеткообразных структур, использовавшихся при трансплантации, как описано в настоящей заявке, сравнивали с предыдущими работами с трансплантатами ДА, полученными из розеткообразных структур, группы авторов настоящего изобретения (Kim, и др. miR-371-3 Expression Predicts Neural Differentiation Propensity in Human Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell 8:695-706 (2011), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) и others (Hargus, и др. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107:15921-15926 (2010), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Разрастание наблюдалось, вероятно, ввиду более продолжительных периодов выживаемости (4,5 месяца в сравнении с 6 неделями), отсутствием очистки методом FACS перед трансплантацией и выбором нокаутных по NOD-SCID IL2Rgc реципиентов. Количество пролиферирующих Ki67+ клеток было минимальным в трансплантатах, полученных из вентральных пластинок ($<1\%$ от общего количества клеток), в то время как трансплантаты, полученные из розеткообразных структур, содержали очаги пролиферирующих предшественников нейронов. Предположили, что разрастание нейронов было вызвано примитивными нейроэктодермальными клетками-предшественниками в трансплантате (Elkabatz, и др. Genes Dev. 22:152-165 (2008); Aubry, и др. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:16707-16712 (2008), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Эта гипотеза подтверждалась экспрессией маркера FOXG1 переднего мозга в трансплантатах, полученных из розеткообразных структур, а не из вентральных пластинок. Небольшой процент астроглиальных клеток присутствовал как в трансплантатах, полученных из вентральных пластинок, так и в трансплантатах, полученных из розеткообразных структур, хотя большинство клеток GFAP+ не содержало маркеров человека, указывающих на происхождение реципиентов (фиг. 13).

Результаты, полученные на нокаутных по NOD-SCID IL2Rgc мышах, описанные в настоящей заявке, продемонстрировали высокую продолжительную выживаемость FOXA2+/TH+ нейронов, полное об-

ращение поведения с вращением, индуцированного амфетамином, и отсутствие каких-либо признаков разрастания нейронов. Однако некоторые из этих результатов могут быть характерны конкретно для использования нокуатных по NOD-SCID IL2R γ мышей. Для проверки этой гипотезы культуры ДА нейронов, полученных из вентральных пластинок, (250×10^3 клеток) трансплантировали взрослым крысам с повреждениями, вызванными 6-OHDA, подвергнутых фармакологической иммуносупрессии с применением циклоспорина А. Через пять месяцев после трансплантации выживаемость трансплантата была высокой (фиг. 4e-h) со средним значением более 15000 TH+ клеток, одновременно экспрессирующих FOXA2 (фиг. 4g), и ядерный антиген человека (hNA) (фиг. 4e); волокна TH+/hNCAM+ распространялись из ядра трансплантата в окружающий его стриатум реципиента (фиг. 4f). В дополнение к FOXA2, TH+ клетки экспрессировали маркеры PITX3 и NURR1 ДА нейронов среднего мозга (фиг. 4h-j). Исследования поведения показали полное устранение асимметрии вращения, индуцированного амфетамином, в отличие от животных с фиктивной трансплантацией, которые не показали какого-либо улучшения (фиг. 4k). Животные, подвергнутые трансплантации, также продемонстрировали улучшения в тесте на фокальную акинегию (фиг. 4l) с измерением акинезии передних конечностей и в тесте с цилиндром (фиг. 4m), исследованиях, не зависящих от фармакологической стимуляции ДА системы. Позднее начало выздоровления (приблизительно 3-4 месяца после трансплантации) ожидается для ДА нейронов человека, в зависимости от скорости созревания *in vivo*, такой как уровни экспрессии DAT (фиг. 4n). Присутствие TH+ клеток, экспрессирующих каналы Kir3.2 (GIRK2) или кальбиндин, свидетельствовало о том, что в трансплантате присутствовали ДА нейроны, как SNpc (A9), так и вентральной тегментальной области (A10) (фиг. 4o, p).

Также как и у мышей (фиг. 13), в клетках крыс редко встречались серотонинэргические и GABA-эргические клетки встречались (<1% от общего количества клеток), а присутствовали главным образом GFAP+ глиальные клетки, полученные от реципиента (7% от общего количества клеток (фиг. 14). Хотя в трансплантате было обнаружено несколько серотонин-положительных нейронов, были обнаружены hNCAM-отрицательные клетки, которые, вероятно, были серотонинэргическими волокнами, полученными от реципиента (фиг. 14).

Пример V.

Трансплантация популяции новых ДА нейронов приматам с поврежденными нейронами.

Результаты, приведенные в настоящем описании, продемонстрировали превосходные выживаемость трансплантата и результат влияния на поведение в двух независимых моделях на мышах. Однако количество ДА нейронов, потребовавшихся для мозга мышей или крыс, представляют малую часть большого количества клеток, необходимых для трансплантации приматам и людям. Для проверки масштабируемости указанного протокола провели пилотные исследования трансплантации на двух взрослых макаках-резус с повреждениями, вызванными МРТР.

Порции 50×10^6 трансплантируемых предшественников ДА нейронов были получены на 25 день дифференцировки с применением протокола, основанного на использовании вентральных пластинок. Классической дозой для индукции состояний, похожих на паркинсоновские, была доза 3 мг МРТР-HCL, введенная в сонную артерию (в диапазоне 0,5-5 мг). Затем проводили системные инъекции МРТР в концентрации 0,2 мг/кг МРТР внутривенно. Клетки вводили в три участка (задняя часть хвостатого ядра и пре-комиссуральная скорлупа) на каждой стороне мозга (в общей сложности 6 нервных пучков, $1,25 \times 10^6$ клеток/пучок), животных подвергали иммуносупрессии с применением циклоспорина А. На одной стороне в мозг вводил предшественники ДА из субклона Н9, экспрессирующего GFP, а во вторую сторону трансплантировали клетки, полученные из немеченых клеток Н9. Результаты, показывающие трансплантацию макакам-резус нейронов с продолжающейся экспрессией FOXA2 и продукцией TH, приведены на фиг. 4q-t. Через один месяц после трансплантации наблюдалась высокая выживаемость ДА нейронов среднего мозга, согласно оценке по экспрессии GFP (фиг. 15) и специфического для человека цитоплазматического маркера (SC-121) (фиг. 4q). Каждое ядро трансплантата было окружено ореолом TH+ волокон, распространяющихся до 3 мм внутрь реципиента (фиг. 4r). Ядра трансплантатов состояли из TH+ нейронов, одновременно экспрессирующих SC-121 (фиг. 4s) и FOXA2 (фиг. 4t). SC-121- и GFP-отрицательные области в трансплантатах содержали Iba1+микроглию реципиента (фиг. 15), что свидетельствовало о неполной иммуносупрессии.

В итоге, проведена трансплантация популяции клеток новых ДА нейронов приматам, а именно взрослым макакам-резус с повреждениями, вызванными МРТР (3 мг МРТР-HCL (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; в диапазоне концентраций 0,5-5 мг МРТР-HCL), и характеризующимися сильной >95% потерей эндогенных ДА нейронов среднего мозга. Обработка МРТР вызывала наблюдаемые изменения и симптомы, сходные с заболеванием Паркинсона у людей.

Пример VI.

Сравнительный потенциал дифференцировки по пути образования ДА нейронов среднего мозга у клеток БП-иПСК, мутантных по PINK1, и у ЭСКЧ (или иПСК) дикого типа.

В настоящем примере описано, что большие популяции ДА нейронов среднего мозга, у которых развились свойства нейронов пациентов с болезнью Паркинсона (БП), когда линия клеток таких пациентов, а именно клеток БП-иПСК, мутантных по PINK1, полученная способом, не вызывающим разруше-

ние эмбриона, была использована в качестве популяции клеток для получения FOXA2/LMX1A/TH+ ДА нейронов согласно настоящему изобретению.

Линию БП-иПСК Q456X, мутантную по PINK1, дифференцировали с применением нового протокола получения ДА нейронов среднего мозга на основе вентральных пластинок (способа) согласно настоящему изобретению, который приводит к профилям дифференцировки среднего мозга, сравнимым с профилями, полученных для линии иПСК Н9. (фиг. 20). А-С) Иммуноцитохимический анализ линии БП-иПСК, мутантной по PINK1, на 11 день дифференцировки (стадия предшественника среднего мозга) для FOXA2 (красный), LMX1A (зеленый) и DAPI (синий) (А), 25 день дифференцировки (ранняя постмитотическая стадия ДА нейронов) для FOXA2 (красный) и TH (зеленый) (В), и для NURR1 (красный) и TH (зеленый) (С). D-F) Тот же набор иммуноцитохимических анализов, выполненный с применением клеток, полученных из Н9 на 11 день дифференцировки для FOXA2 (красный), LMX1A (зеленый) и DAPI (синий) (D), на 25 день дифференцировки для FOXA2 (красный) и TH (зеленый) (E), и для NURR1 (красный) и TH (зеленый) (F).

У линии БП-иПСК, мутантной по PINK1, был обнаружен БП-подобный фенотип агрегации белков, с последующей продолжительной дифференцировкой и созреванием *in vitro*. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что у БП-иПСК, мутантной по PINK1, обнаружены свидетельства экспрессии α -синуклеина (главного компонента телец Леви у пациентов с болезнью Паркинсона) в цитозоле TH+ ДА нейронов на 55 день дифференцировки при использовании нового протокола индукции ДА нейронов среднего мозга на основе вентральных пластинок, (фиг. 21А-В). А, В) Иммуноцитохимический анализ линии БП-иПСК, мутантной по PINK1, на 55 день дифференцировки для α -синуклеина (LB509, красный), TH (зеленый) и совмещенное изображение (А) и α -синуклеина (красный) и убиквитина (зеленый) (В). Эти α -синуклеин-положительные клетки также продемонстрировали высокую экспрессию убиквитина (классического маркера телец Леви). В противоположность этому, ДА нейроны, полученные из контрольной линии iPSC, продемонстрировали экспрессию нормального синаптического (в противоположность цитозольному) α -синуклеина и очень низкие уровни убиквитина (фиг. 21С-Д). С, D) Иммуноцитохимический анализ контрольной линии iPSC line на 55 день дифференцировки для α -синуклеина (красный) и TH (зеленый) (С) и α -синуклеина (красный) и убиквитина (зеленый) (D).

Экспрессия агрегированной формы α -синуклеина. В мозгу пациентов с болезнью Паркинсона димеризованные нерастворимые формы α -синуклеина приводят к агрегации в виде телец Леви. У димеризованной формы α -синуклеина наблюдается фосфорилирование серина-129 в α -синуклеине.

В тот же день дифференцировки клетки, полученные из БП-иПСК, мутантных по PINK1, продемонстрировали сильную экспрессию фосфорилированного по Ser129 α -синуклеина в отличие от клеток, полученных из контрольных клеток iPSC, которые продемонстрировали очень низкие уровни экспрессии (фиг. 22). Клетки, полученные из БП-иПСК, мутантных по PINK1, продемонстрировали сильную экспрессию фосфорилированного по Ser129 α -синуклеина в отличие от клеток, полученных из контрольных клеток iPSC, которые продемонстрировали очень низкие уровни экспрессии. А, В) Иммуноцитохимический анализ фосфорилированного по Ser129 α -синуклеина (зеленый) и DAPI (синий) в клетках, полученных из БП-иПСК, мутантных по PINK1, на 55 день дифференцировки (А) и подходящих контрольных клетках, полученных из iPSC (В).

Разница в паттернах экспрессии α -синуклеина наблюдалась в зависимости от протокола дифференцировки. Авторы настоящего изобретения наблюдали, что "аутентичные" ДА нейроны среднего мозга, полученные на основе вентральных пластинок, демонстрировали специфическую для болезни Паркинсона уязвимость и соответствующие, специфические, фенотипы *in vitro*. Использование ДА нейронов, полученных с применением классического протокола дифференцировки, основанного на стромальных фидерных клетках MS5 (Pertier и др., PNAS 2004, цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки), приводят к образованию большого количества TH+ нейронов. Однако основываясь на данных, полученных в ходе разработки настоящего изобретения, авторы настоящего изобретения показали, что TH+ клетки, полученные на основе MS5, не были аутентичными ДА нейронами среднего мозга, полученным на основе вентральных пластинок. В культурах, дифференцировавших с применением протокола MS5, было много α -синуклеин-положительных клеток. Однако эти клетки не демонстрировали одновременной экспрессии TH. Более того, не было разницы в паттернах экспрессии между БП-иПСК и контрольными iPSC при использовании стратегии дифференцировки MS5 (фиг. 23А-В). Эти данные указывают на то, что α -синуклеин также экспрессируется в других типах клеток, не являющихся ДА, и что такой α -синуклеин из клеток, не являющихся ДА, не изменяется при болезни, при сравнении с клетками, полученными из контрольных иПСК, в частности при использовании стандартного протокола дифференцировки MS5. ДА-подобные нейроны, полученные из розеткообразных структур, описаны в публикациях (например, Pertier PNAS 2004). Такие TH+ клетки на основе MS5 (=ДА-подобные) использовали для сравнения на фиг. 3, 10, 13 и 16. Эти данные указывают на то, что α -синуклеин также экспрессируется в других типах клеток, не являющихся ДА, и что такой α -синуклеин из клеток, не являющихся ДА, не изменяется при болезни в сравнении с клетками, полученными из контрольных клеток иПСК, в частно-

сти при использовании стандартного протокола дифференцировки MS5. Наконец, использование нового протокола дифференцировки на основе вентральных пластинок, описанного в настоящей заявке, приводит к образованию большого количества TH+ клеток, одновременно экспрессирующих α -синуклеин. Такие TH+ клетки экспрессируют α -синуклеин в паттерне цитозольной экспрессии. Фиг. 24А, В) Иммуноцитохимический анализ α -синуклеина (LB509, красный), TH (зеленый) линии БП-иПСК, мутантной по PINK1, на 60 день дифференцировки на основе MS5 (А) и контрольной линии иПСК (В). С) Иммуноцитохимический анализ линии БП-иПСК, мутантной по PINK1, на 55 день дифференцировки на основе вентральных пластинок в отношении α -синуклеина (красный), TH (зеленый).

Типичные ДА нейроны, полученные из клеток БП-иПСК, мутантных по PINK1, чувствительны к стимуляции токсинами. Полученные из БП-иПСК TH+ ДА нейроны, полученные с применением протокола на основе вентральных пластинок были более чувствительными к токсической обработке (валиномицин: митохондриальный ионофор, 5 мкМ (в диапазоне концентраций 1-10 мкМ), 48 ч), чем контрольные клетки, полученные на основе иПСК. В отличие от этого, TH+ нейроны, полученные с применением классического протокола MS5, не показали дифференциальной чувствительности для клеток БП в сравнении с контрольными клетками (фиг. 24). А-Ф) Репрезентативный иммуноцитохимический анализ TH на 60 день дифференцировки: Нормальные условия (без токсической обработки) как для клеток БП, так и для контрольных клеток, полученных из иПСК с применением протокола на основе вентральных пластинок (А, показаны клетки, полученные из БП-иПСК), практически полное вырождение TH+ ДА нейронов при последующей токсической обработке БП-иПСК (В), частично вырожденные TH+ ДА нейроны из контрольных иПСК (С). Тест на общую выживаемость клеток с красителем "alamar-blue" после 48 ч обработки валиномицином также показал различную выживаемость клеток в специфическом диапазоне дозирования при токсической обработке (5 и 10 мкМ) при сравнении БП-иПСК и контрольных иПСК (фиг. 25).

Нормальные условия как для культур БП, так и для культур на основе контрольных иПСК, полученных с применением протокола на основе MS5 (D, показаны клетки, полученные из БП-иПСК), TH+ нейроны после токсической обработки, полученные из культуры БП-иПСК (E) и контрольной культуры иПСК (F), полученные по протоколу MS5. G-H) изображения иммуноцитохимических исследований малой мощности для Tuj1 (красный) и TH (зеленый) по протоколу на основе вентральных пластинок на 60 день дифференцировки: БП-иПСК при нормальных условиях (G) и условиях токсической обработки (H) и контрольная иПСК в нормальных условиях (I) и условиях токсической обработки (J). K-N) изображения иммуноцитохимических исследований малой мощности для Tuj1 (красный) и TH (зеленый) по протоколу на основе MS5 на 60 день дифференцировки: БП-иПСК при нормальных условиях (K) и условиях токсической обработки (L) и контрольная иПСК в нормальных условиях (M) и условиях токсической обработки (N).

Пример подсчета в тесте на выживаемость клеток в зависимости от дозы при токсической обработке. Тест на выживаемость клеток с alamar-blue после 48 ч обработки валиномицином показал различную выживаемость клеток в характерном диапазоне дозирования при токсической обработке (5 и 10 мкМ) при сравнении БП-иПСК и контрольной иПСК (60 день дифференцировки на основе вентральных пластинок). Замечание: эти тесты изучают общую гибель клеток, хотя особенно заметные эффекты наблюдались на ДА нейронах (см. фиг. 14).

Поэтому, подсчет на основе alamar blue с большой вероятностью будет преуменьшать степень различных эффектов, наблюдаемых в линиях ДА нейронов. Документы, включенные в настоящее описание посредством ссылки:

23, 215-221 (2005); Perrier, u òp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12543-8 (2004); Perrier, u òp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12543-8 (2004); Tabar, u òp. *Nature Med.* 14, 379-381 (2008); Perrier, u òp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12543-8 (2004); Wernig, u òp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 5856-5861 (2008); Lindvall, u òp. *J. Clin. Invest* 120, 29-40 (2010); Roy, u òp. *Nature Med.* 12, 1259-1268 (2006); Elkabetz, u òp. *Genes Dev.* 22, 152-165 (2008); Kittappa, u òp. *PLoS. Biol.* 5, e325 (2007); Ferri, u òp. *Development* 134, 2761-2769 (2007); Roelink, u òp. *Cell* 76, 761-775 (1994); Liem, u òp. *Cell* 82, 969-979 (1995); Fasano, u òp. *Cell Stem Cell* 6, 336-347 (2010); Chambers, u òp. *Nat. Biotechnol.* 27, 275-280 (2009); Muroyama, u òp. *Genes Dev.* 16, 548-553 (2002); Joksimovic u òp. *Nat Neurosci* 12, 125-131 (2009); Lyashenko, u òp. *Nat. Cell Biol.* 13, 753-761 (2011); VanDunk, u òp. *J. Neurosci.* 31, 6457-6467 (2011); Huang, u òp. *Nat. Protoc.* 4, 44-57 (2009); Costa, u òp. *Mol. Cell Biol.* 9, 1415-1425 (1989); Elkabetz, u òp. *Genes Dev.* 22, 152-165 (2008); Soldner, u òp. *Cell* 136, 964-977 (2009); Guzman, u òp. *J. Neurosci.* 29, 11011-11019 (2009); Nedergaard, u òp. *J. Physiol* 466, 727-747 (1993); Ferrari, u òp. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1885-1896 (2006); Olanow, u òp. *Trends Neurosci.* 19, 102-109 (1996); Zetterström, u òp. *Science* 276, 248-250 (1997); Quintana, u òp. *Nature* 456, 593-598 (2008); Kim, u òp. dicts Neural Differentiation Propensity in Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 8, 695-706 (2011); Hargu, u òp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15921-15926 (2010); Aubry, u òp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 16707-16712 (2008); Blume, и др., *Exp. Neurol.* 219, 208-211 (2009); Ban, и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (2011); Studer, и др., *Nature Neurosci.* 1, 290-295 (1998); Kordower, и др., *Science* 290, 767-773 (2000); Paxinos, и др., *The Rhesus Monkey Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press, 2000); Crawley, *What's Wrong With My Mouse: Behavioral Phenotyping of Transgenic u Knockout Mice* (Wiley-Liss, 2000); Studer, и др., *Brain Res. Bull.* 41, 143-150 (1996); Tabar, и др., *Nat. Biotechnol.* 23, 601-606 (2005); и Placantonakis, и др., *Stem Cells* 27, 521-532 (2009).

Пример VII.

Были установлены характерные условия для записи *in vivo* ДА нейронов, полученных из плюрипотентных стволовых клеток человека, в тонкослойных препаратах; см. характерные результаты на фиг. 26.

Электрофизиологические измерения рассматриваются для использования в тонкослойных препаратах, а именно из биопсии областей трансплантата. В одном варианте осуществления, ДА нейроны типа A9 в отличие от A10, полученные из трансплантата могут быть идентифицированы *in vivo* на основании тестирования автономной активности в создании ритма, которая является характерной для дофаминовых нейронов типа A9, которым наносится наибольший вред в случае болезни Паркинсона. Другими словами, нейроны типа A10 не обладают активностью в создании ритма.

Были установлены характерные условия для записи *in vivo* ДА нейронов, полученных из плюрипотентных стволовых клеток человека, в тонкослойных препаратах; см. фиг. 26. В частности, были произведены измерения в отношении трансплантированных ДА нейронов человека, полученных из плюрипотентных стволовых клеток человека, и обнаружено, что они обладают электрофизиологическими признаками, типичными для признаков, обнаруженных в части компактов черного тела (*substantia nigra pars compacta*, SNpc) мышей, фиг. 26А, где на виде сверху показана реконструкция нейрона - создателя ритма (нейрона-ритмоводителя) в участке трансплантата. На виде снизу показана типичная фотомикрография полученного из крысы среза мозга, в который 9-тью месяцами ранее были введены нейроны, полученные из hES; трансплантат очерчен; изображение с большим увеличением приведено внизу в виде вставки. Срез был обработан тирозингидроксилазой, которая показана белым, фиг. 26В. Далее, на виде сверху показана типичная присоединенная накладка, производящая запись с предполагаемого в трансплантате; на виде снизу типичная запись с целой клетки той же самой клетки. Запись осуществляли в присутствии антагонистов рецепторов глутамата и GABA (50 мкМ AP5, 10 мкМ CNQX и 10 мкМ GABazine) для того, чтобы элиминировать синаптический входной сигнал. Эти записи продемонстрировали, что указанные нейроны, полученные из PS, были нейронами-ритмоводителями с нормальными интрасоматическими траекториями напряжения. Другие нейроны, записанные в образце трансплантата, имели схожие свойства, фиг. 26С. Для сравнения приведены записи с присоединением к клетке и записи целой клетки дофаминергических нейронов в SNpc взрослой мыши. Сокращения (CTx=кортекс, STg=стриатум, SNpc=часть компактов черного тела, ДА=дофаминергический). Эти данные показывают функциональные исследования *in vivo* в полосатом теле крысы с трансплантатом через месяц после трансплантации.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, функциональные исследования *in vivo* в тканях, подвергнутых трансплантации, демонстрируют восстановление части компактов черного тела (*substantia nigra pars compacta*, SNpc).

Пример VIII.

Методы, приведенные в качестве примера, для идентификации маркеров на поверхности клеток для использования в способах согласно настоящему изобретению. В частности, CD142 был идентифицирован с применением этих методов.

Две основные стратегии для идентификации кандидатов в поверхностные маркеры: Беспристрастная проверка экспрессии генов в линиях генетических репортеров (фиг. 27a), в ходе которой найдены несколько кандидатов в маркеры, включая маркер, названный DCSM1, который селективно экспрессировался в ДА нейронах среднего мозга и представляющий в особенности маркеры ДА нейронов типа A9 (фиг. 27b). Вторая стратегия заключается в использовании проверки поверхностных маркеров клеток CD в ДА нейронах, полученных из hESC, тестирующего 242 коммерчески доступных антитела в 96-луночном формате (фиг. 27c, d). Результатом такой проверки (фиг. 27e) стала идентификация по меньшей мере 5 подтвержденных маркеров, обогащенных в ДА нейронах среднего мозга, включая CD142, маркер, селективно указывает на стадию нейронов *Nurr1*⁺ ДА (фиг. 27f). При использовании клеточной процедуры ДА нейронов, описанной в настоящей заявке, CD142 обычно маркировал приблизительно 30% общей популяции клеток на 25 день дифференцировки (фиг. 28a). Селективность CD142 к стадии нейронов *Nurr1*⁺ ДА была подтверждена в множестве независимых линий hESC и hiPSC 1 (фиг. 28b). В дополнение к обогащению ДА нейронов, обогащение CD142-положительными клетками приводило к селективному истощению нежелательных подтипов нейронов, таких как GABA- и серотонинэргические нейроны. (фиг. 28c-f). Исследования *in vivo* подтвердили способность популяции CD142-положительных клеток давать начало трансплантатам с высокой чистотой ДА нейронов, что позволяет преодолеть проблемы контаминации GABA- и серотонинэргическими нейронами. Хотя процедура трансплантации, в которых используются неочищенные клетки, уже привела к получению незначительного количества серотонинэргических нейронов, использование селекции клеток-предшественников на основе CD142 предполагается для дальнейшего снижения риска введения серотонинэргических нейронов, типа контаминирующих клеток, которое имело следствием неудачную трансплантацию в человека тканей эмбриона как потенциальный источник нежелательных дискинезий, индуцированных трансплантацией в человека тканей эмбриона.

Пример IX.

В настоящем Примере описаны методы трансформации клеток генами PST человека для усиления экспрессии PSA на поверхности клеток. В настоящем Примере также показаны типичные методы использования клеток, имеющих повышенную экспрессию PSA на поверхности клеток.

В частности, в настоящем Примере показаны встроенные в hESCs гены PST для усиления экспрессии PSA в ДА нейронах. Ген, кодирующий полисиалилтрансферазу человека (hPST), ввели в линию hESC line (WA01) с применением лентивирусного вектора (pLenty, Invitrogen). Двадцать отобранных клонов подрастили и проанализировали на предмет экспрессии PST. Клоны hESC, экспрессирующие PST, дифференцировали для того, чтобы убедиться, что экспрессия PST не подавлена в ДА нейронах. Подсчет PSA-NCAM на различных стадиях дифференцировки (дни 0, 11, 25 и 50) был произведен с применением анализа FACS и иммунофлюоресценции (Operetta). Положительным клоном было необходимо соответствовать параметрам QC ДА нейронов, приведенным в табл. 7. По меньшей мере 3 клон, которые сохраняли высокие, неизменные уровни PSA-NCAM в ходе дифференцировки и хорошо соответствовали параметрам QC (табл. 7), будут способствовать установлению разрастания аксонов в ДА нейронах, экспрессирующих PST и полученных из hESC. Подобранный контроль и экспрессирующие PST клоны hESC дифференцировали в ДА нейроны с применением стандартного протокола, описанного в настоящей заявке, с последующей фиксацией клеток и анализом на 25 и 50 дни. Количество и длину TH-положительных волокон в этих культурах оценивали с помощью высоко контрастного микроскопа Operetta. Модуль анализа аксонов в программном обеспечении Harmony 3.0 подсчитывал количество аксонов и длину, с PST или без него, а данные были статистически проанализированы с применением двухфакторного анализа ANOVA. Клоны, экспрессирующие PST, и контрольные клоны hESC, которые были выбраны на основании исследований *in vitro*, описанных выше, снова дифференцировали в ДА нейроны и трансплантировали в модельных крыс с заболеванием Паркинсона. Были сделаны краткосрочные трансплантаты (4-6 недель) для определения выживаемости, экспрессии PSA-NCAM и разрастания аксонов. Каждый клон, который удовлетворял краткосрочным параметрам *in vivo*, подвергали долгосрочным исследованиям в трансплантате. В этих исследованиях животные получали половину или четверть стандартной (200×10^3) дозировки клеток. Эти исследования были направлены на выяснение, приводит ли повышенный PSA к повышению долгосрочной выживаемости после трансплантации (5 месяцев), и способно ли меньшее количество ДА нейронов конкурировать или превосходить функциональную способность трансплантатов без PST, трансплантированных в стандартной дозировке клеток (фиг. 27).

В дополнение, комплексный тест поведения, чувствительный к стриарной реиннервации, был проведен для того, чтобы далее охарактеризовать функциональный потенциал трансплантатов ДА нейронов

с PST в сравнении с контрольными. Животных умерщвляли после завершения тестов поведения, и разрастание волокон обсчитывали с применением специфических антител NCAM и SC121 человека и антител против TH (см. также фиг. 29). Интенсивность и распространение трансплантата hNCAM+, SC121+ и TH+ были измерены, также как процент клеток человека одновременно экспрессирующих маркеры ДА нейронов (TH, FOXA2) и PSA. Плотности NCAM/TH+ гало аксонов, распространяющихся из трансплантата, были посчитаны на различных расстояниях. Данные между группами сравнивали с применением двухфакторного анализа ANOVA в post-hoc тесте Бонферрони. В дополнение, изучали качественные изменения срезов (например, разветвление, толщина, распределение трансплантата и форма). В дополнение, некоторые трансплантаты подвергали электрофизиологической оценке тонкого слоя с точки зрения фенотипа A9, образования синапсов с полосатым телом реципиента, а также иннервации эндогенными афферентными нервами.

Пример X.

В следующем примере продемонстрировано усиление экспрессии полисиаловой кислоты, которое улучшает функционирование трансплантатов дофаминовых нейронов, полученных из ES, в паркинсоновских мышах.

Клетки ES, экспрессирующие GFP под контролем промотора *Nurr1*, (*Nurr1::GFP* клетки ES) стабильно трансдуцировали с применением лентивирусного вектора, убиквитарно экспрессирующего полисиалилтрансферазу (PST). Трансдуцированные клетки продемонстрировали существенное увеличение количества мРНК PST в сравнении с контролями (фиг. 30A). Было обнаружено, что экспрессия PST является существенной для синтеза PSA в NCAM. Соответственно, экспрессия PSA-NCAM была существенно усилена в PST-модифицированных клетках на 14 день дифференцировки ДА нейронов (фиг. 30B-E). Как эндогенный поверхностный PSA, так и поверхностный PSA в индуцированных клетках ДА нейронов, полученных из ES, могут быть удалены (фиг. 30E) с применением фаговой эндонейраминидазы (*endoN*), которая специфически расщепляет уникальные для PSA альфа-2,8-связанные полимеры сиаловой кислоты. Неожиданно было обнаружено, что трансдукция PST не оказывает влияния на экспрессию нейронных маркеров или маркеров среднего мозга в ДА нейронах, очищенных от GFP (фиг. 30F).

Другие исследования гемипаркинсоновских мышей с повреждениями, вызванными 6OHDA, показали, что требуется трансплантация приблизительно 100000 предшественников ДА нейронов, полученных из ES, для получения сильного функционального восстановления, измеряемого в тесте на вращение, индуцированное амфетамином. В настоящих исследованиях, стремились трансплантировать субоптимальное количество клеток для того, чтобы достичь прироста путем усиления экспрессии PSA. Для того, чтобы трансплантировать популяции, сильно обогащенные ДА нейронами, в которых уменьшено количество контаминирующих плюрипотентных клеток, культуры, очищенные на FACS, на 14 день дифференцировки проверяли на экспрессию GFP под контролем *Nurr1* и на отсутствие экспрессии SSEA-1 (фиг. 31). Без суперэкспрессии PST снижение минимально эффективного размера трансплантата в половину (55000 клеток *Nurr1*+ ДА) не приводило к детектируемому восстановлению поведения. В противоположность этому, при усилении экспрессии PSA такое же количество *Nurr1*/PST ДА нейронов приводило к существенной коррекции ухудшения поведения при болезни Паркинсона ($p < 0,01$; двухфакторный анализ ANOVA) с полным восстановлением примерно через 5 недель после хирургического вмешательства (фиг. 32A). Удаление PSA перед трансплантацией посредством индукции *endoN* показывало специфичность увеличения количества PSA, поскольку обработка *endoN* частично инвертировала функциональное восстановление, полученное с помощью *Nurr1*/PST (фиг. 32A).

Для проверки характеристик трансплантированных клеток животных подвергали иммуногистохимическим исследованиям через два месяца после трансплантации. Было обнаружено различие в количестве выживших *Nurr1*+ нейронов, поскольку животные, в которых трансплантировали PST-трансдуцированные линии, имели в среднем вдвое больше GFP+ клеток, чем животные, в которых трансплантировали контрольные клетки (9,300+/-1,400 против 4,230+/-1010 GFP+ клеток в трансплантате в образцах PST в сравнении с контрольными образцами, соответственно; фиг. 32B, $p < 0,05$, t-тест Стьюдента). Более того, трансплантаты *Nurr1*/PST g также продемонстрировали более высокие уровни экспрессии PSA *in vivo* (фиг. 32C, D). Однако пропорции клеток, экспрессирующих маркеры ДА нейронов среднего мозга TH и FoxA2 в ядре трансплантата, были сравнимыми для клеток *Nurr1* и *Nurr1*/PST (TH: 62,0%+/-8,0 против 51,3%+/-7,0 $p = 0,33$; FoxA2: 63,2%+/-8,6 vs. 55,4%+/-2,0, $p = 0,3$, соответственно; фиг. 32E).

Нейронные процессы, которые проистекают из клеток *Nurr1* и *Nurr1*/PST, показали сравнимые уровни TH, Girk2 (связанный с G-белком калиевый канал входящего выпрямления) и синапсина (фиг. 33A). В отличие от других исследований с трансплантированными шванновскими клетками (Ghosh, M., и др. Extensive cell migration, axon regeneration, and improved cells after spinal cord injury. *Glia* 60, 979-992 (2012)), усиленная экспрессия PSA имела незначительное влияние на миграцию клеток ДА из места трансплантата. Однако были явные изменения в разрастании аксонов. Как показано на фиг. 33B, происходило больше нейронных процессов ДА проистекающих из клеток *Nurr1*/PST в сравнении с *Nurr1*+ контролями. Когда интенсивность иммунофлуоресценции GFP и TH был посчитана в пяти последовательных зонах размером 100 мкм при удалении от трансплантата, трансплантаты *Nurr1*/PST продемонстриро-

вали гораздо более высокую плотность процессов (фиг. 33C, D; $p < 0,01$ для GFP и TH, двухфакторный анализ ANOVA). При количественной оценке этого явления нормализовали относительную плотность процессов к плотности, наблюдаемой в зоне, наиболее приближенной, соседней с ядром трансплантата. Такая нормализация требовалась для того, чтобы компенсировать большое количество выживших клеток в трансплантатах Nurr1/PST и подтвердить специфическое влияние PSA на разрастание аксонов. Специфичность также была продемонстрирована, когда PSA был удален с поверхности клетки в ходе обработки с помощью endoN перед трансплантацией. Эта предварительная обработка с помощью endoN приводила к снижению разрастания дистальных волокон обратно к контрольным уровням (фиг. 33E).

Эти открытия продемонстрировали, что, по меньшей мере, некоторые из результатов действия PSA на функционирование трансплантата являются результатом улучшенной иннервации полосатого тела волокнами. Соответственно, наблюдалась сильная корреляция между функционированием трансплантата и относительной степенью разрастания GFP-положительных волокон, например в зоне IV (фиг. 33F; $p < 0,001$, $r^2 = 0,65$, $n = 17$). Неожиданно оказалось, что соотношение разрастание волокон/поведение было постоянным для экспериментальных групп (контрольные, с увеличенным содержанием PSA, и обработанные с помощью endoN), указывая на то, что иннервация трансплантат-реципиент был параметром, определяющим восстановление поведения в модели с паркинсоновскими мышами. Несколько факторов вносили механический вклад в усиленное разрастание волокон, таких как улучшенная проницаемость реактивной глии, окружающей ядро трансплантата, улучшенная способность к прорастанию, усиленное разрастание в окружающие ткани реципиента (например, коническая транслокация более легкого роста), и предохранение от преждевременных связей с тканями реципиента в непосредственной близости от ядра трансплантата. Характерные механизмы соотносятся с ролью PSA в процессах содействия разрастанию в ходе нормального развития и в зрелой нервной системе.

Эксперименты, описанные в настоящей заявке, продемонстрировали использование генно-инженерного PSA в трансплантации ДА нейронов прививки, которое обеспечило превосходные результаты по сравнению с трансплантатами из других типов клеток. Данные четко показали, что увеличение количества PSA обеспечило значительное увеличение способности трансплантированных ДА нейронов обеспечивать иннервацию полосатого тела трансплантата и ослаблять функциональный дефицит при болезни Паркинсона. Поэтому предполагается перевод метода в клиническое использование, включающее использование ДА нейронов согласно настоящему изобретению, для обеспечения клеток перед трансплантацией. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, над клетками будут проведены генетические манипуляции для экспрессии PSA. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения PST может быть доставлен непосредственно клетки посредством обработки очищенным ферментом и субстратом, *in vitro*, перед трансплантацией. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предполагается использование стратегии PSA для трансплантации у человека в случае трансплантации при болезни Паркинсона для минимизации необходимости множественных инъекций и, вследствие этого, снижения рисков от хирургических вмешательств, обусловленных такими множественными инъекциями.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предполагается использование этой технологии для других типов клеток и видов, например, увеличение миграции трансплантированных шванновских клеток при создании межклеточного мостика (например, межклеточного взаимодействия) для возобновления роста аксонов в месте повреждения спинного мозга.

Далее следуют типичные материалы и методы, использованные в настоящем Примере.

Животные: Мышей 129S3/SvImJ (Jackson Laboratory) возрастом 6 недель содержали при контролируемой температуре со свободным доступом к пище и воде. Эксперименты осуществляли в соответствии с инструкциями Национального института здравоохранения (NIH) и руководством по использованию животных института, они были одобрены местным институтским комитетом охраны и использования животных (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC), комитетом биобезопасности института (the Institutional Biosafety Committee, IBC).

Инъекция 6OHDA и тест с введением амфетамина: животных подвергали анестезии пентобарбиталом натрия (10 мг/кг) и в правое стриатум вводили 2 мкл 6OHDA (4 мкг/мкл солевом растворе, 0,5% аскорбиновой кислоты). Инъекции осуществляли шприцом Hamilton в координаты: 0,5 мм сзади, 1,8 мм вбок по отношению к брегме и 2,5 мм внутрь по отношению к поверхности мозга. Перед хирургическим вмешательством животные получали одну внутривенную инъекцию дезипрамина (25 мг/кг, Sigma). Через две недели после хирургического вмешательства животных оценивали в тесте на вращение, индуцированное амфетамином. Их помещали в прозрачные пластиковые цилиндры диаметром 30 см на полчаса, после чего они получали одну внутривенную инъекцию амфетамина (10 мг/кг, Sigma). Через 20 мин подсчитывали количество ипсилатеральных/контралатеральных вращений в течение следующих 20 мин. Животных оценивали еженедельно в течение семи недель, затем подвергали глубокой анестезии и осуществляли перфузию через сердце PBS и 4% параформальдегида в 0,1 М фосфатном буфере (PB, pH 7,4). Мозги извлекали и дополнительно фиксировали в течение ночи при 4°C в 4% параформальдегиде, затем с применением вибратора (Pelco-101, Ted Pella) получали срезы толщиной 40 мкм сагитальных сечений.

Дифференцировка клеток и трансплантация: линию клеток с репортером ES Nurr1::GFP BAC из трансгенных мышей BAC (а именно, экспрессия GFP осуществлялась под контролем промотора Nurr1) трансдуцировали лентивирусом (pLenti, Invitrogen), содержащим ген PST мыши под контролем промотора CMV. Клетки ES размножали на обработанных митомицином C фибробластах эмбриона мыши (MEF) (StemCell Technologies) в среде DMEM (Invitrogen), 10% FBS (HyClone) с добавлением 1,400 единиц/мл LIF (ESGRO; Invitrogen), 2 mM L-глутамина, 1 mM β -меркаптоэтанол, 100 U/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen). Дифференцировку DA индуцировали в соответствии с Barberi и др., Nat Biotechnol 21, 1200-1207 (2003) с модификациями. Вкратце, клетки дифференцировали на питающих клетках MS5 в лотках, покрытых желатином (10,000 клеток/ лоток 10 см) и выращивали в течение 4-х дней в среде заменителя сыворотки (SRM). На 4 день добавляли Sonic hedgehog (SHH, 200 нг/мл) и FGF8 (100 нг/мл). На 7 день дифференцировки среду заменяли на N2 с добавлением SHH, FGF8 и bFGF (10 нг/мл). На 11 день, окончательную дифференцировку индуцировали путем удаления SHH, FGF8 и bFGF, и добавлением аскорбиновой кислоты (AA, 200 мкМ) и BDNF (20 нг/мл).

Клетки собирали на 14-15 день с обработкой Accutase® в течение 45 мин, один раз промывали средой N2 и инкубировали с антителом против SSEA-1, конъюгированным с AlexaFluor-647 (BD Pharmingen) в течение 25 мин. Клетки один раз промывали средой N2, ресуспендировали в буфере HEPES с 0,1% BSA. Для оценки выживаемости добавляли DAPI. Осуществляли FACS с применением сортировщика клеток MoFlo и интересующую популяцию сортировали по флюоресценции GFP (Nurr1). Популяции с позитивным сигналом от AlexaFluor-647 (SSEA-1) отбраковывали. В качестве контроля без GFP использовали необработанные клетки ES мышей J1 на той же стадии дифференцировки.

Клетки, отсортированные по Nurr1::GFP, исследовали на выживаемость и ресуспендировали в N2 с BDNF и AA до конечной концентрации 55,000 клеток/мкл. Один мкл вводили в поврежденное стриатум мыши с применением стеклянного капилляра с заостренным наконечником объемом 50 мкм в координаты: 0,3 мм сзади, 1,5 мм вбок от брегмы и 2,2 мм внутрь от поверхности мозга. Аликвоту суспензии клеток переносили в 6 мм лотки, покрытые гелем matrigel, для дальнейшей их характеристики.

Для иммунофлуоресцентного анализа клетки фиксировали параформальдегидом в течение 10 мин при 4°C, дважды промывали PBS, блокировали с помощью 5% BSA (0,1% Triton X-100 в PBS) и инкубировали с первичными антителами в течение 2 ч при комнатной температуре: антитела кролика против GFP (1:1000, Invitrogen), IgM мыши против PSA (1:2000, 5A5), антитела мыши против NeuN (1:800, Chemicon), антитела мыши против TH (1:1000, Sigma), антитела козы против FoxA2 (1:800, Santa Cruz), антитела козы против Engrailed (1:800, Santa Cruz). Затем клетки инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с Cy3 (1:1000, Jackson).

Обработка EndoN: Для удаления PSA с NCAM, за сутки перед сбором клетки обрабатывали 20 единицами endoN, фаговым ферментом, специфически отщепляющим PSA 7-9. Затем клетки собирали и вводили как описано выше, за исключением того, что их ресуспендировали в N2 с BDNF и AA и 5 единицами endoN. Авторы настоящего изобретения определили, что инъекция такого же количества endoN в одиночку в мышей с повреждениями не улучшало поведение животных.

Анализ мПНК PST и PSA-NCAM in vitro: Для анализа вестерн-блот клеток обрабатывали буфером WB (PBS с 1% NP40, 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, и 1x ингибиторы протеаз/фосфатаз, добавленные непосредственно перед экстракцией, при pH 7,4) и ультразвуком дважды в течение 5 сек, центрифугировали и ресуспендировали в буфере Лэмбли (LB). Аликвоты без LB сохраняли для определения белков. Равные количества белков загружали в полиакриламидный гель для электрофореза с 6% додецилсульфатом натрия (BioRad). Белки переносили электрофорезом на мембраны из поливинилидена (Millipore). Мембраны блокировали в течение 1-6 ч в 0,1% Тритон X-100 TBS (TBS-T) с 5% обезжиренным сухим молоком и инкубировали в течение ночи с антителами против NCAM (1:10,000, Santa Cruz) в TBS-T с 5% молоком. Затем мембраны инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой (1:10,000, Jackson) и детектировали с применением метода детекции ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Уровни белков подсчитывали с применением программного обеспечения ImageJ.

Для количественного анализа ОТ-ПЦР суммарную РНК экстрагировали с помощью Trizol (Sigma), проводили обратную транскрипцию (Qiagen) и амплифицировали с 10 мкл реакционной смеси 2x SYBR и 0,2 мкМ прямых и обратных праймеров с окончательным объемом 20 мкл. Для анализа PSA-NCAM с помощью FACS клетки собирали с обработкой Accutase® в течение 45 мин, один раз промывали и инкубировали с IgM мыши против PSA (1:250, 5A5) в течение 25 мин на льду, один раз промывали средой N2 и инкубировали с антителами против IgM мыши, конъюгированными с Cy3, (1:250, Jackson) в течение следующих 25 мин на льду. Клетки один раз промывали средой N2 и ресуспендировали в 0,1% BSA с 7AAD и анализировали в сортировщике клеток FACS Calibur. В качестве контроля первичные антитела не добавляли.

Иммуногистологические и стереологические процедуры: Свободно плавающие корональные срезы блокировали 0,1% Тритон X-100, 5% сывороткой осла в PBS в течение 30 мин при комнатной температуре и инкубировали 48 ч при 4°C с различными антителами: антитела кролика против GFP (1:300), антитела цыплят против GFP (1:200, Chemicon), антитела мыши против TH (1:200), IgM мыши против PSA

(1:1000), антитела мыши против NeuN (1:400), антитела козы против FoxA2 (1:300), антитела кролика против Girk2 (1:300, Alomone Labs), антитела мыши против синапсина (1:200, BD Transduction Laboratories). Затем срезы промывали и инкубировали с вторичными антителами: антителами осли, конъюгированными с Cy2, Cy3 и Cy5 (1:400, Jackson). Для PSA использовали антитела осли против IgM, конъюгированные с Cy5 (1:500 Jackson). Осуществляли инкубирование в течение 2 ч при комнатной температуре. Срезы дважды промывали с помощью PBS и устанавливали в Mowiol (Calbiochem). Каждый из трех корональных срезов мозга анализировали для каждого окрашивания антителами.

Цифровые изображения получали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 с тремя лазерами (Argon 488, HeNe 543 и HeNe 633) с с-апохроматическим 40х объективом (водноиммерсионный). Количество клеток GFP+ и TH+ подсчитывали в каждом третьем срезе, охватив весь мозг через 40х объектив, и оценивали общее количество клеток в трансплантате. Дважды меченые клетки анализировали в одной оптической плоскости вдоль всей оси z.

Для оценки процента меченых клеток GFP/TH+ и GFP/FoxA2+ в отношении каждого маркера анализировали 100 GFP+ клеток. Для анализа процессов разрастания конфокальные сканы по оси z осуществляли с интервалом 0,8 мкм вдоль всей оси z (20–40 мкм) с диафрагмой 1 мкм через 40х объектив. Срезы сканировали, начиная с места инъекции вбок до места, где процесс разрастания не наблюдался. Проекции 3-D, охватывающие всю сканированную область, были последовательно составлены. Для анализа интенсивности GFP и TH вся сканированная область была поделена на пять последовательных, отходящих от трансплантата зон размером 100 мкм и интенсивности измеряли с помощью программного обеспечения ImageJ. Данные нормализовали по интенсивности в зоне, ближайшей к трансплантату (зона I) для контроля за любыми потенциальными различиями в размере трансплантата.

Статистический анализ: Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$ (SEM). Сравнения проводили с применением t-теста Стьюдента или двухфакторного анализа дисперсии (ANOVA) с последующим post-hoc тестом Бонферрони. Анализ линейной регрессии проводили и рассчитывали с применением корреляции Пирсона.

Пример XI.

В следующем примере продемонстрировано ферментативное конструирование PSA в ДА нейронах, полученных из hESC, с применением очищенной бактериальной полисиалилтрансферазы, PSTnm, для улучшения эффективности трансплантации.

Несмотря на эффективность, трансфекция гена PST вынуждала произвести модификации hESCs с ограниченным контролем в ходе полисиалилирования. В настоящем примере описано обнаружение того, что внешний PSTnm индуцировал PSA, вместо доставки гена, (см., фиг. 35). На фиг. 35А, шванновские клетки (SC), обработанные PST, (зеленая линия - средняя линия) обладали повышенным временем адгезии, в то время как PSA, полученный из PSTnm, ингибировал адгезию. В частности, А) PSA, полученный из PSTnm, ингибирует адгезию шванновских клеток в суспензии в монослой шванновских клеток даже более эффективно (красная линия -самая нижняя линия), чем PSA, полученный в ходе усиленной экспрессии PST ((зеленая линия - средняя линия). В) Иммуноблоттинг PSA в мотонейронах HB9, полученных из ESC, демонстрирует, что контрольные образцы, обработанные только PSTnm, имели недетектируемые уровни PSA. Инкубирование с PSTnm + субстрат СМР-сиаловая кислота приводит к получению большой полосы PSA, которая исчезает при обработке endoN. С, D) Аналогично эффектам, полученным с геном PST, полисиалилирование этих клеток посредством PSTnm и субстрата в ходе дифференцировки усиливает разрастание аксонов и миграцию клеток (острия стрелок). Е) Иммуноокрашивание PSA на 30 день ДА нейронов, полученных из hESC. F) Это окрашивание существенно усиливается после обработки PSTnm и субстратом. G) Инъекция in vivo только PSTnm не имело эффекта, хотя его одновременное введение с субстратом H) приводило к большому уровню экспрессии PSA в полосатом теле мышей.

Таким образом, зрелые ДА нейроны, обработанные снаружи PSTnm, рассматриваются для использования при получении клеток для трансплантата. Как PST, так и PSTnm млекопитающих продуцируют химически идентичные цепи PSA. Повышенный уровень PSA в ДА нейронах, полученных из hESC, (фиг. 35F) должен сохраняться в течение нескольких недель, достаточных для выхода волокон ДА из ядра трансплантата. Ввиду того, что PSTnm удаляется перед трансплантацией, иммуногенность этого фермента, контаминирующего трансплантируемые клетки, не должна учитываться.

PSTnm был получен из сконструированного фрагмента с улучшенными характеристиками растворимости и активности (Willis и др., Characterization of the alpha-2,8-polysialyltransferase from *Neisseria meningitidis* with synthetic acceptors, и the development of a self-priming polysialyltransferase fusion enzyme. *Glycobiology* 18, 177-186 (2008)). Культуры hESC индуцировали для дифференцировки в ДА нейроны перед обработкой PSTnm, обработкой субстратом или перед обеими обработками. Культуры исследовали в различные моменты времени в ходе обработки (от 10 мин до 6 ч) методами количественной иммунофлуоресценции (Operetta) и вестерн-блоттинга для определения скорости и уровней полисиалилирования. Так, на 25 день дифференцированные ДА нейроны, полученные из hESC, будут инкубироваться с оптимальными концентрациями PSTnm и субстрата в условиях, описанных в настоящей заявке. PSA+ ДА нейроны будут трансплантироваться в ходе краткосрочных и долгосрочных анализов, как описано в настоящей заявке и на фиг. 29.

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящем описании выше, включены в настоящее описание посредством ссылки. Различные модификации и варианты описанных способов и систем настоящего изобретения будут очевидны специалисту в данной области техники, которые не выходят за рамки настоящего изобретения и не изменяют его сущность. Хотя настоящее изобретение описано в связи с конкретными предпочтительными вариантами его осуществления, следует понимать, что заявленное настоящее изобретение не следует неоправданно ограничивать этими конкретными вариантами его осуществления. Действительно, различные модификации описанных методов для осуществления настоящего изобретения, которые очевидны специалисту в области клеточной биологии, нейробиологии, биологии клеток рака, молекулярной биологии, биохимии, химии, органического синтеза, или смежных областях, входят в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ индукции дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток *in vitro*, включающий осуществление контакта плюрипотентных стволовых клеток с ингибитором передачи сигнала SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic), и осуществление контакта указанных клеток с активатором передачи сигнала SHN (Sonic hedgehog) и активатором передачи сигнала wingless (Wnt), причем контакт указанных клеток с активатором передачи сигнала Wnt осуществляют в промежуток времени с третьего (3) по одиннадцатый (11) день после первичного контакта клеток с ингибитором передачи сигнала SMAD с получением популяции клеток, причем более 10% указанной популяции клеток экспрессирует как белок fork-head box A2 (FOXA2), так и LIM гомеобокс-содержащий фактор транскрипции 1 альфа (LMX1A).

2. Способ по п.1, в котором указанная передача сигнала SMAD включает передачу сигнала ТФР-β/активин-нодаль.

3. Способ по п.1 или 2, в котором указанная передача сигнала SMAD включает передачу сигнала белка морфогенеза костей (BMP).

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором по меньшей мере 20% указанной популяции клеток экспрессирует как белок FOXA2, так и LMX1A.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что клетки приводят в контакт с активатором передачи сигнала белка SHN по меньшей мере между 24 и 36 ч от первичного контакта клеток с ингибитором SMAD.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что клетки приводят в контакт с активатором передачи сигнала wingless (Wnt) по меньшей мере между 24 и 36 ч от первичного контакта клеток с активатором передачи сигнала белка SHN.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что по меньшей мере 40% указанной популяции клеток экспрессирует белок FOXA2 и LMX1A.

8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанные плюрипотентные стволовые клетки выбирают из группы, состоящей из неэмбриональных стволовых клеток, эмбриональных стволовых клеток, индуцированных неэмбриональных плюрипотентных стволовых клеток и модифицированных плюрипотентных стволовых клеток человека, примата, отличного от человека, или грызуна.

9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что указанная популяция клеток, экспрессирующая FOXA2 и LMX1A, дополнительно экспрессирует по меньшей мере один маркер, выбранный из группы, состоящей из тирозингидроксилазы (TH), ортодентикл гомеобокс 2 (OTX2), родственного ядерному рецептору белка 1 (NURR1), нейрон-специфичного бета-тубулина класса III (Tuj1), фактора 3 семейства трилистника (TTF3), гомеобоксного белка 3, содержащего домен, подобный спаренному 3 (PITX3), комплекса achaete-scute (ASCL), раннего фактора 1 В-клеток (EBF-1), раннего фактора 3 В-клеток (EBF-3), транстиретина (TTR), синапсина, транспортера дофамина (DAT), сопряженного с G-белком калиевого канала внутреннего выпрямления (Kir3.2/GIRK2), CD142, DCSM1, CD63 и CD99.

10. Способ по любому из пп.1-9, в котором указанные плюрипотентные стволовые клетки дифференцируются в указанную популяцию клеток в течение 11 дней от первичного контакта указанных клеток с по меньшей мере одним ингибитором передачи сигнала SMAD.

11. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что плюрипотентные стволовые клетки дифференцируются в дофаминовые нейроны не позднее 25 дней после первичного контакта указанных клеток с ингибитором передачи сигнала SMAD.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что по меньшей мере 20% указанных дофаминовых нейронов экспрессирует FOXA2 и LMX1A и дополнительно экспрессирует по меньшей мере еще один маркер дофаминовых нейронов среднего мозга человека подтипа A9, выбранный из группы, состоящей из Girk2, CD142 и DCSM1.

13. Способ по п.11 или 12, дополнительно включающий отбор популяции дофаминовых нейронов, экспрессирующей CD142 или DCSM1, или оба маркера.

14. Способ по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что указанная популяция клеток характеризуется существенно низким уровнем экспрессии по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из PAX6, EMX2 и LHX2.

15. Способ по любому из пп.1-14, дополнительно включающий осуществление контакта указанной популяции клеток с мозговым нейротрофным фактором (BDNF), аскорбиновой кислотой (AA), нейротрофным фактором глиальных клеток (GDNF), дибутирил цАМФ (dbcAMP) и трансформирующим фактором роста типа $\beta 3$ (TGF $\beta 3$) с получением дофаминовых нейронов.

16. Способ по любому из пп.1-15, дополнительно включающий осуществление контакта указанной популяции клеток с активатором передачи сигнала FGF.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что указанный активатор сигнала FGF представляет собой FGF8.

18. Способ по п.16 или 17, отличающийся тем, что контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала FGF осуществляют в течение до 144 ч с первичного контакта указанных клеток с ингибитором передачи сигнала SMAD.

19. Способ по любому из пп.1-18, отличающийся тем, что указанный ингибитор сигнала SMAD выбран из группы, состоящей из LDN-193189, SB431542, Noggin, дорсоморфина и комбинаций перечисленного выше.

20. Способ по любому из пп.1-19, отличающийся тем, что указанный ингибитор сигнала SMAD представляет собой 4-[4-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-5-(2-пиридинил)-1H-имидазол-2-ил]бензамид (SB431542).

21. Способ по любому из пп.1-20, отличающийся тем, что активатор передачи сигнала SHH выбран из группы, состоящей из SHHs, агонистов Smoothened (SAGs) и комбинаций перечисленного выше.

22. Способ по любому из пп.1-21, отличающийся тем, что активатор передачи сигнала SHH представляет собой агонисты Smoothened (SAG).

23. Способ по п.21 или 22, отличающийся тем, что указанный SAG представляет собой пурморфамин.

24. Способ по п.21, отличающийся тем, что указанный SHH представляет собой рекомбинантный белок SHH.

25. Способ по п.24, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный белок SHH по меньшей мере на 95% идентичен N-концевому фрагменту мышинного SHH.

26. Способ по п.24 или 25, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный белок SHH представляет собой SHH C25II.

27. Способ по любому из пп.1-26, отличающийся тем, что указанный активатор передачи сигнала wingless (Wnt) представляет собой соединение, способное снижать передачу сигнала гликогенсинтазы 3-бета 3β (GSK3 β).

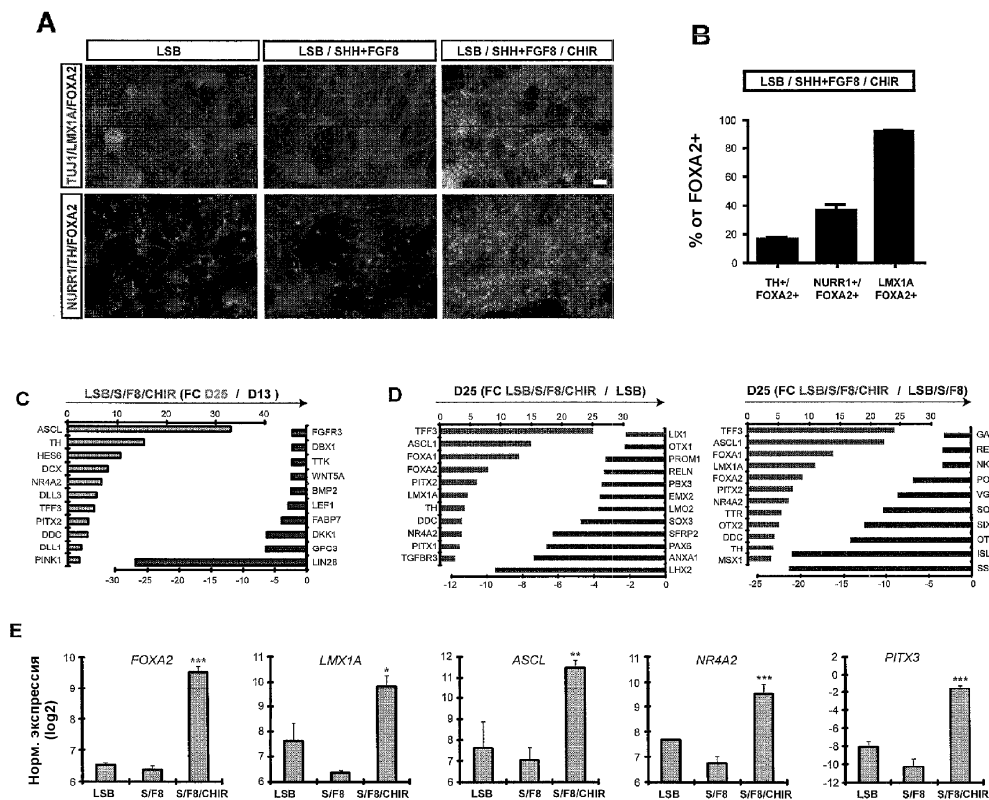
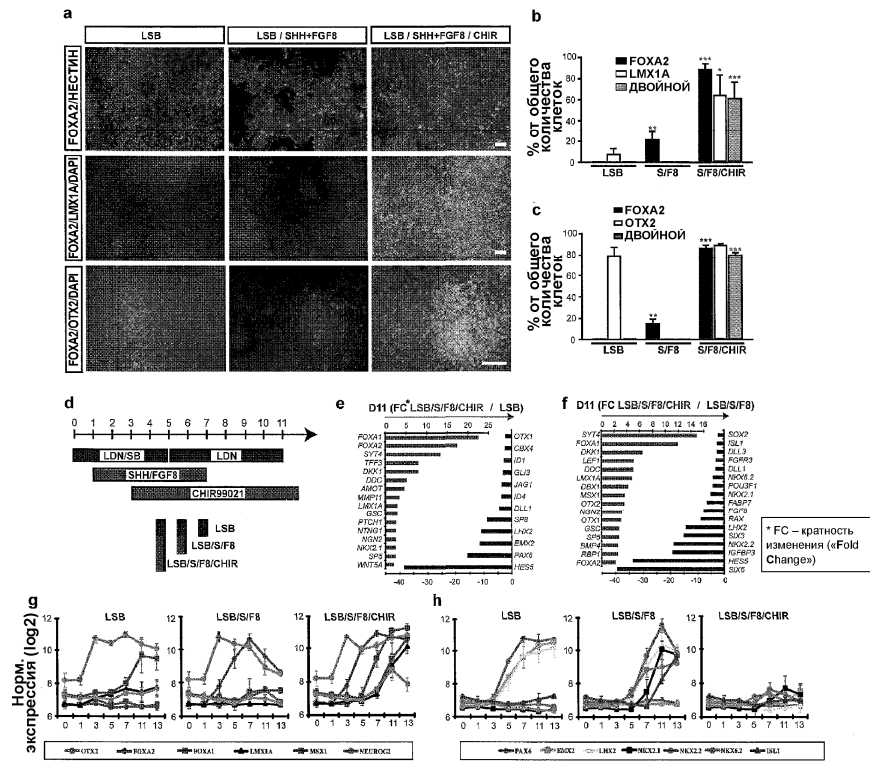
28. Способ по любому из пп.1-26, отличающийся тем, что указанный активатор передачи сигнала Wnt выбран из группы, состоящей из CHIR99021, Wnt3A, Wnt1 и комбинации перечисленного выше.

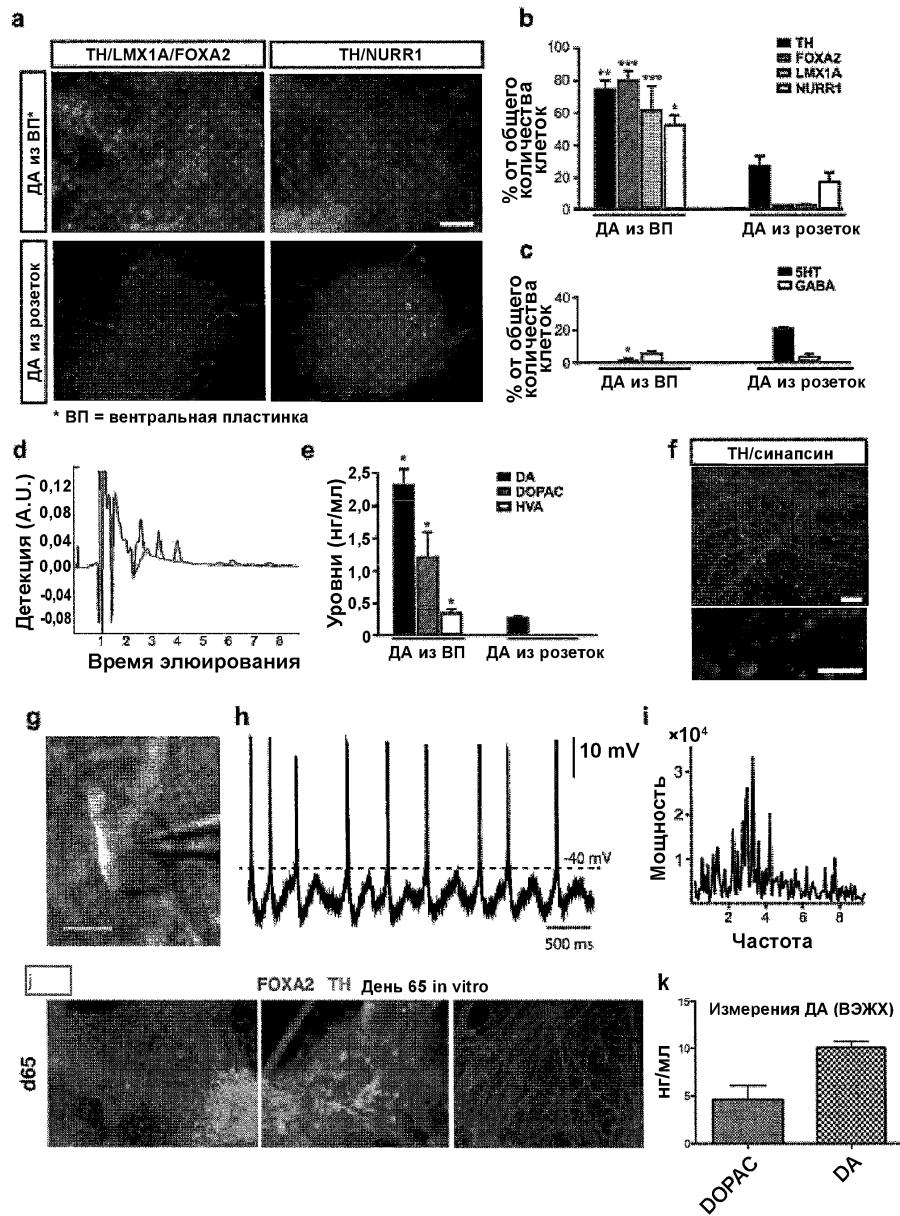
29. Способ по любому из пп.1-28, отличающийся тем, что указанный активатор передачи сигнала Wnt представляет собой CHIR99021.

30. Способ по любому из пп.1-29, отличающийся тем, что указанные клетки приводят в контакт с двумя ингибиторами передачи сигнала SMAD, которые представляют собой SB431542 и LDN-193189, и активатор сигнала wingless (Wnt) представляет собой CHIR99021.

31. Способ по любому из пп.1-30, дополнительно включающий трансфекцию указанных плюрипотентных стволовых клеток полисиалилтрансферазой (PST) перед приведением указанных плюрипотентных стволовых клеток в контакт с ингибитором передачи сигнала SMAD.

32. Способ по любому из пп.1-30, дополнительно включающий обработку указанной популяции клеток экзогенной PST.

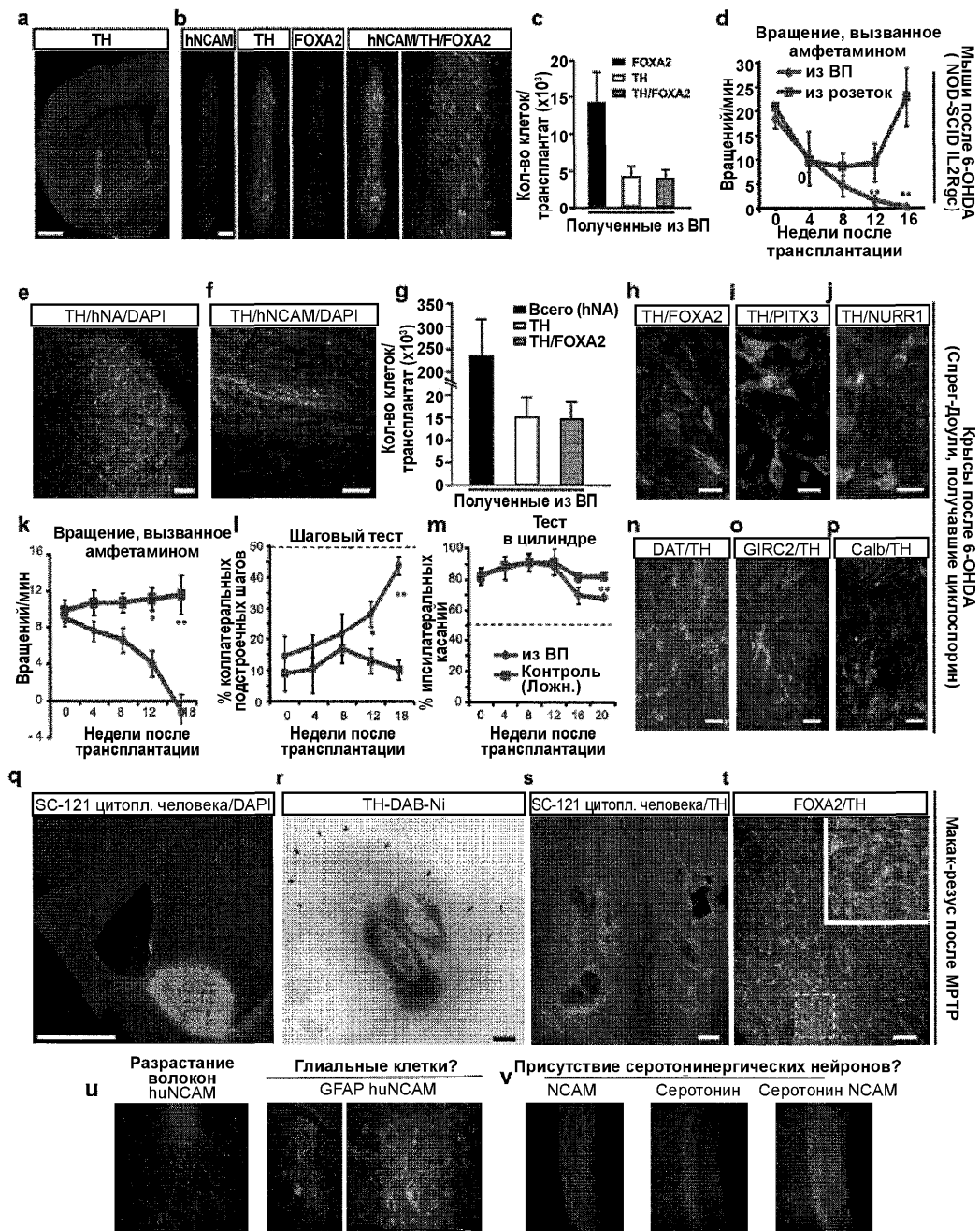




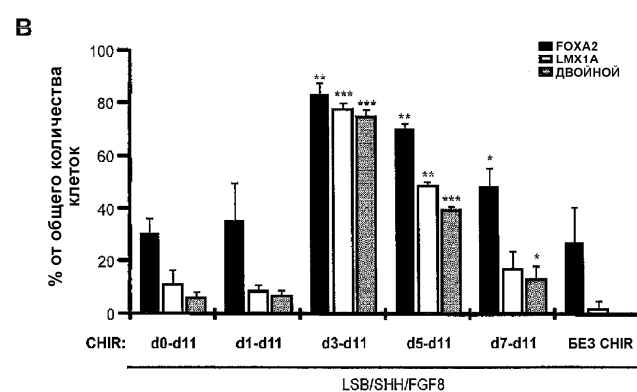
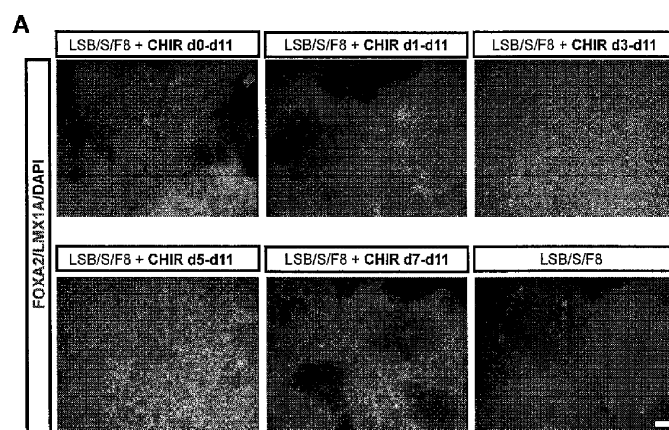
Фиг. 3(1)



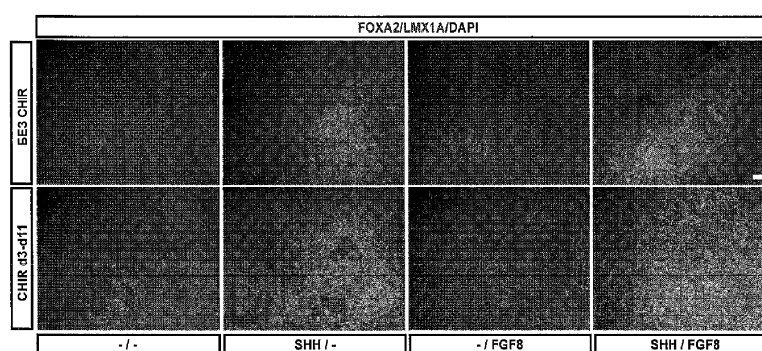
Фиг. 3(2)



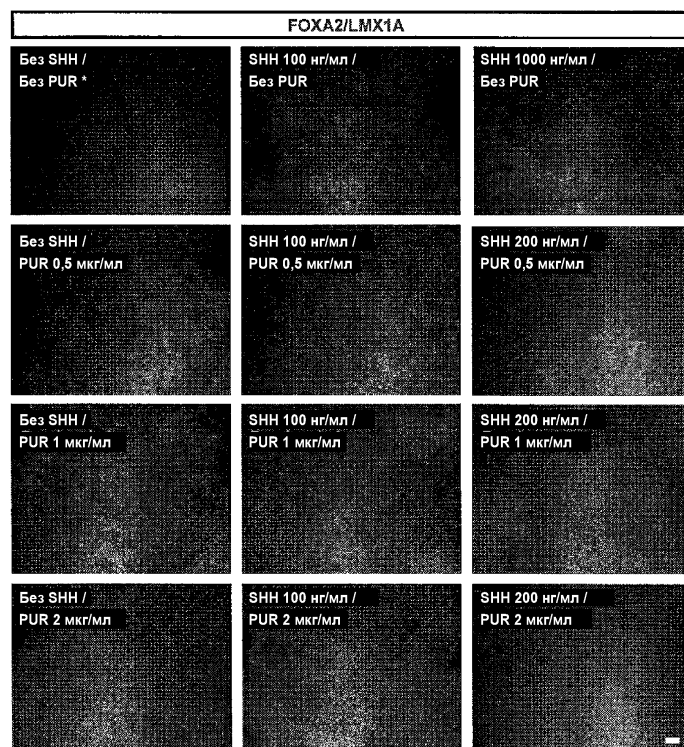
Фиг. 4



Фиг. 5

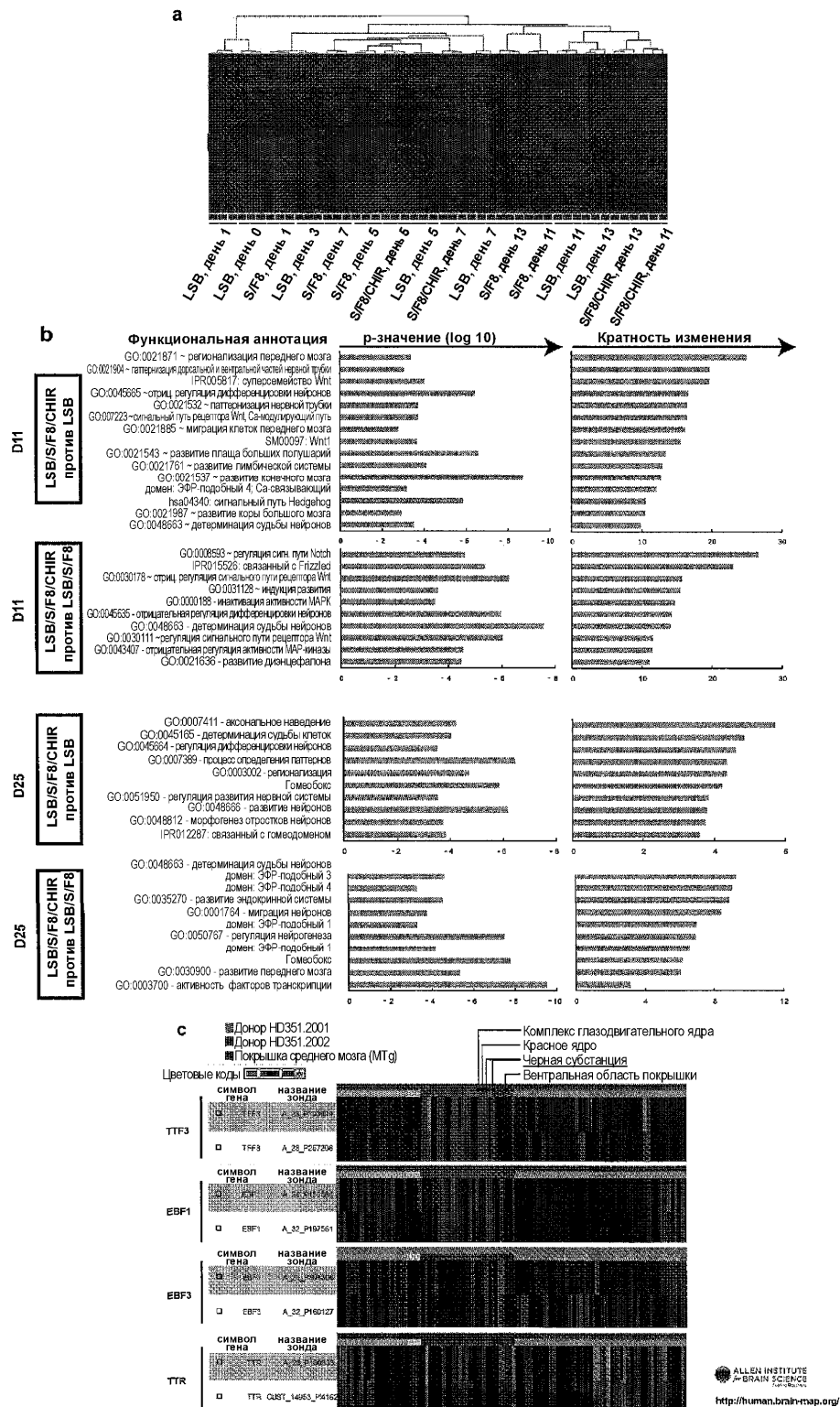


Фиг. 6

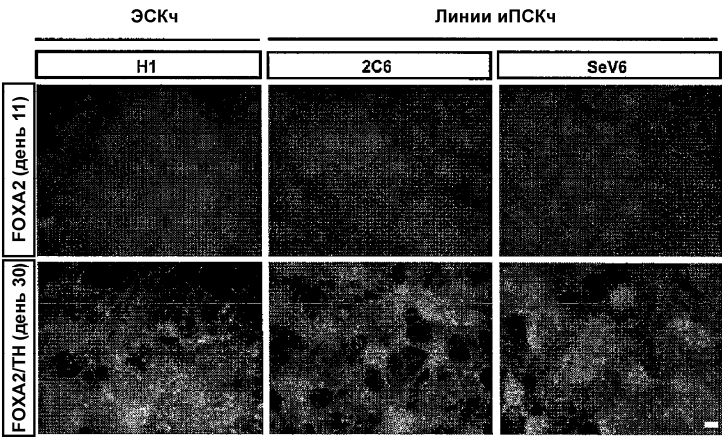


* PUR = пурформамин

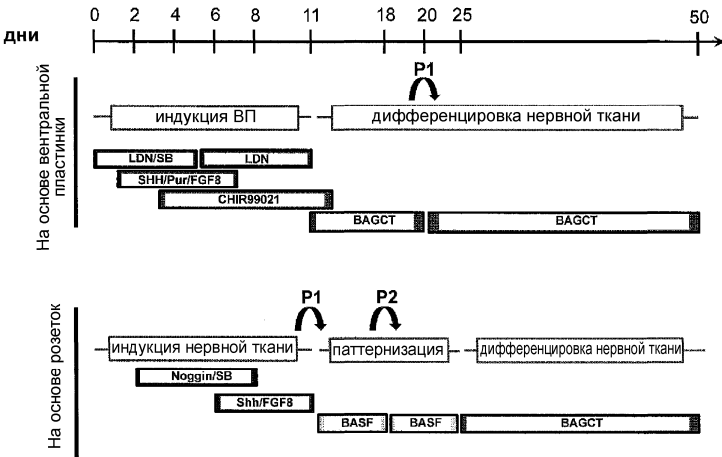
Фиг. 7



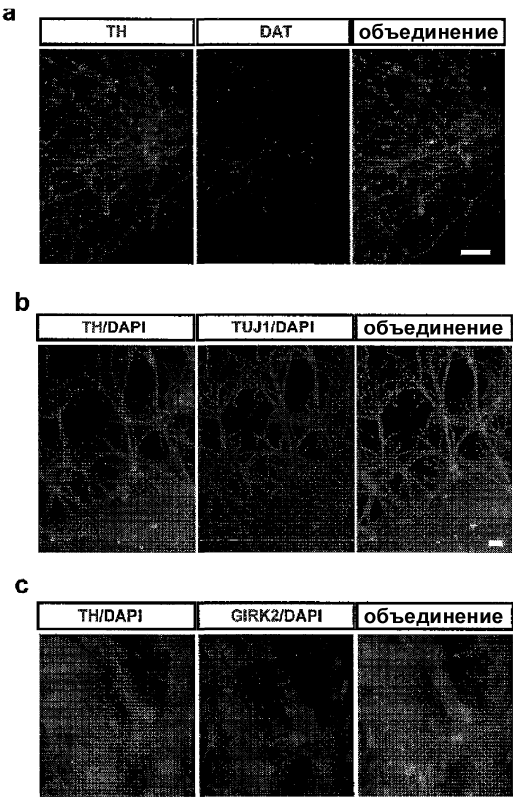
Фиг. 8



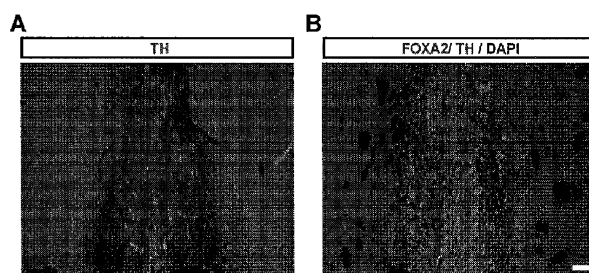
Фиг. 9



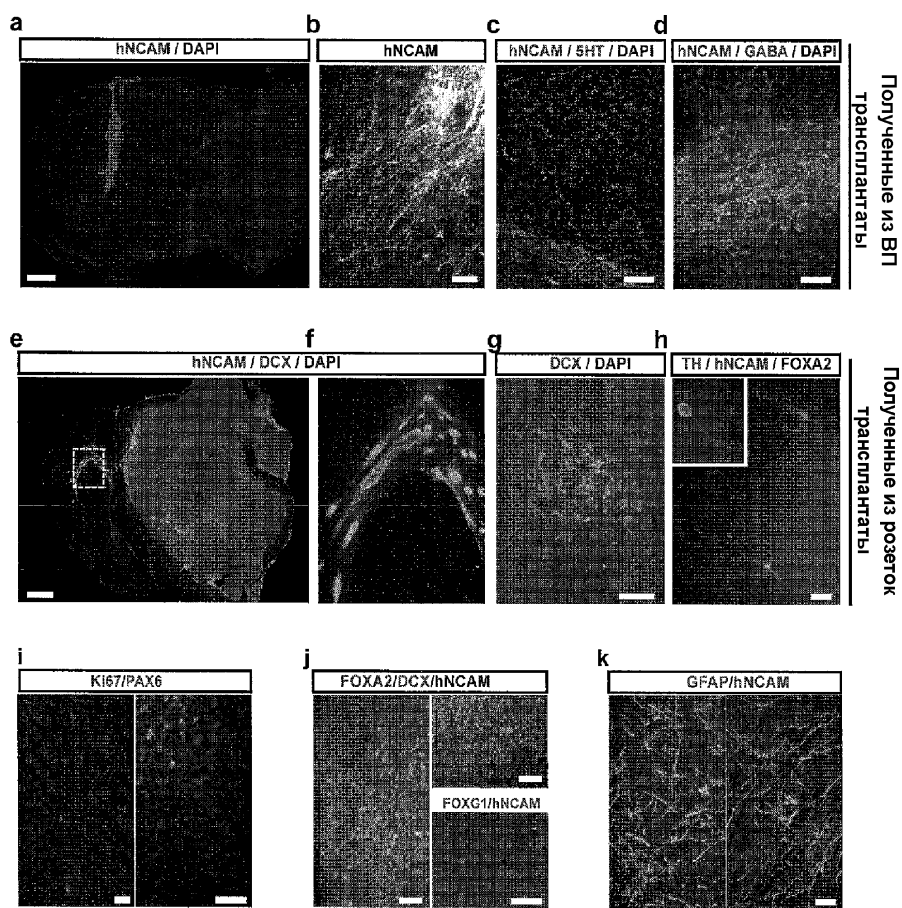
Фиг. 10



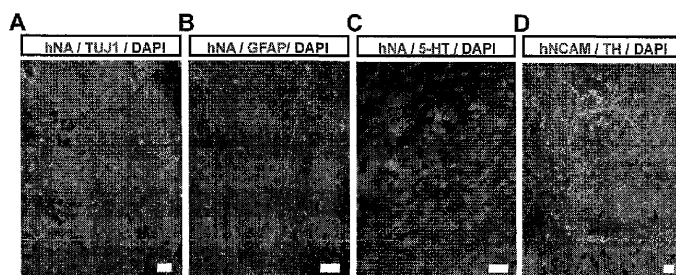
Фиг. 11



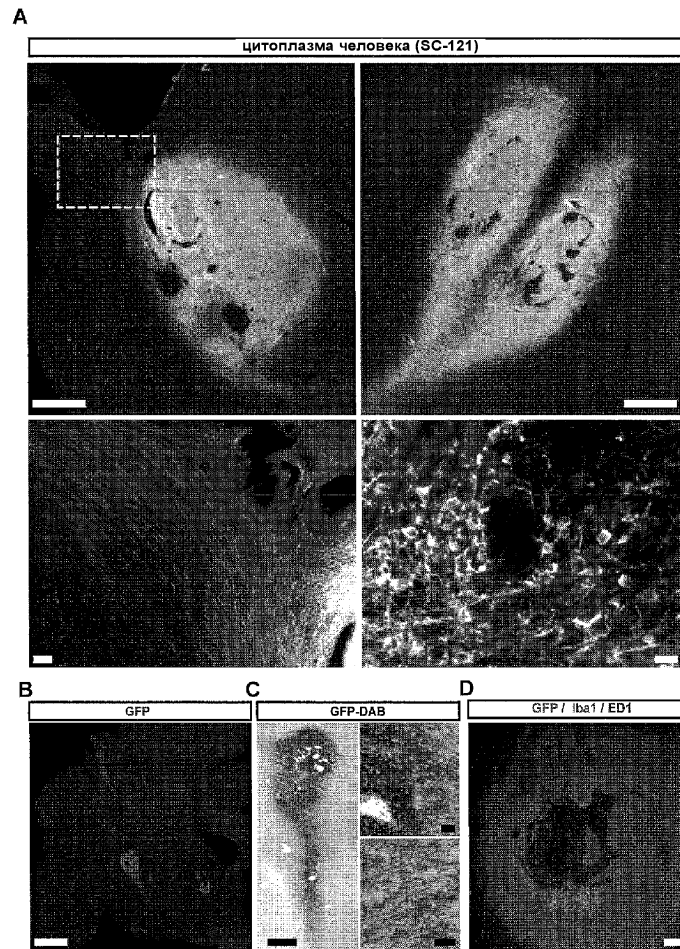
Фиг. 12



Фиг. 13

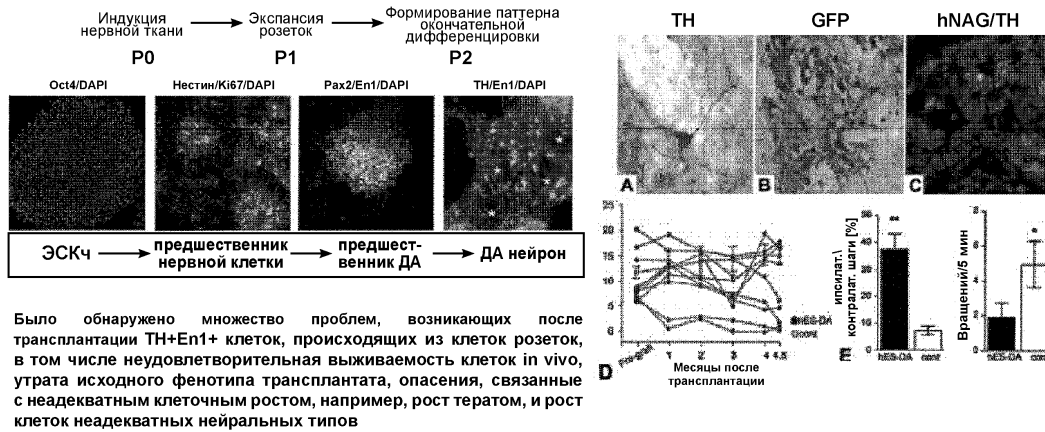


Фиг. 14

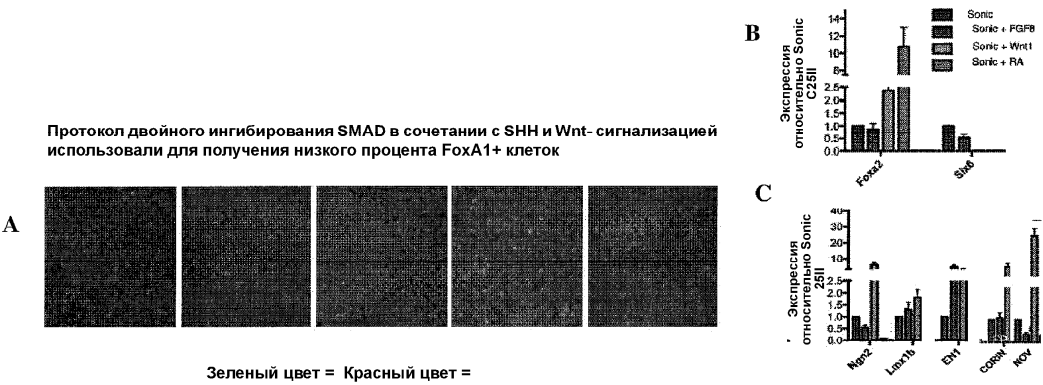


Фиг. 15

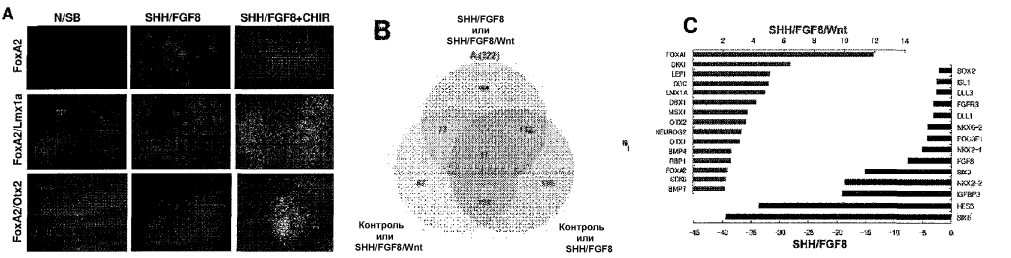
Получение TH+En1+ клеток из ЭСКч с использованием питающих клеток MS5 и промежуточных клеток розеток



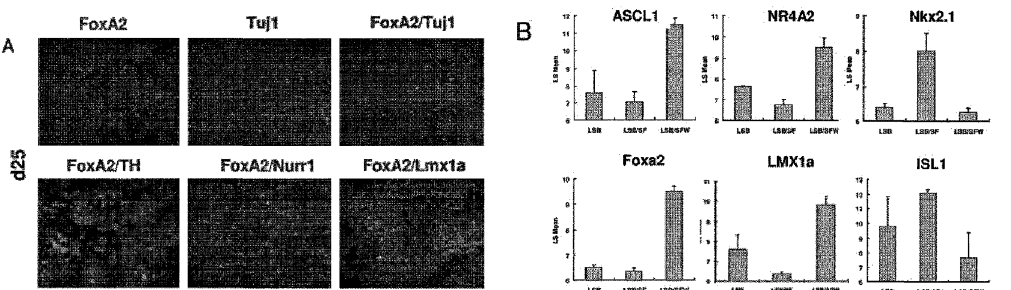
Фиг. 16



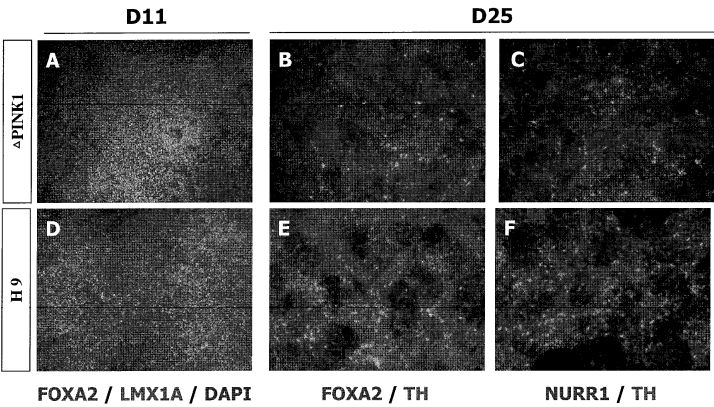
Фиг. 17



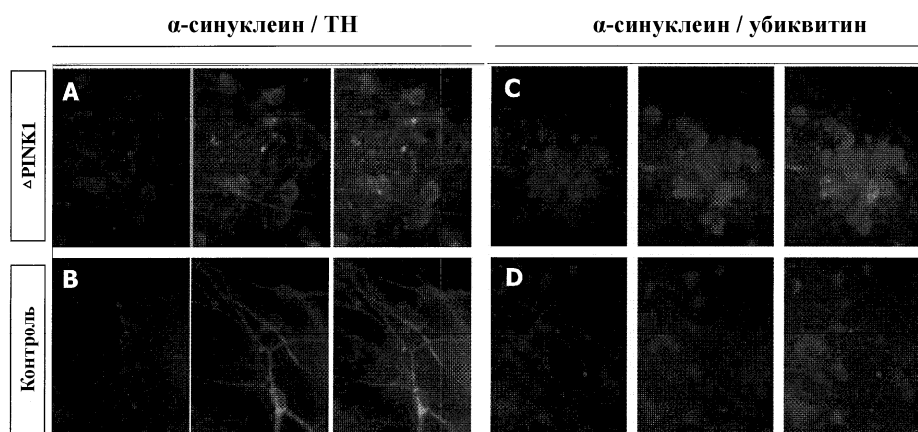
Фиг. 18



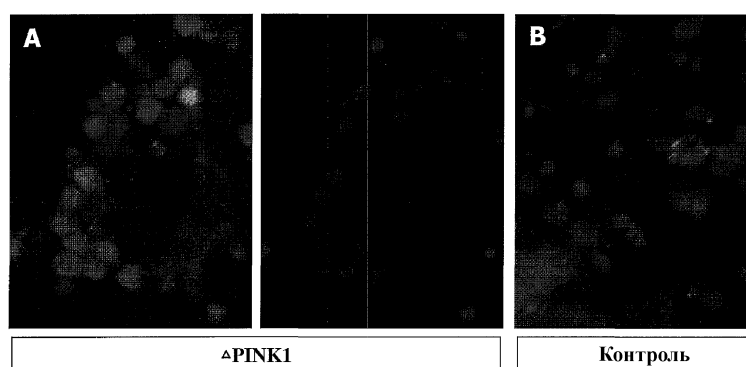
Фиг. 19



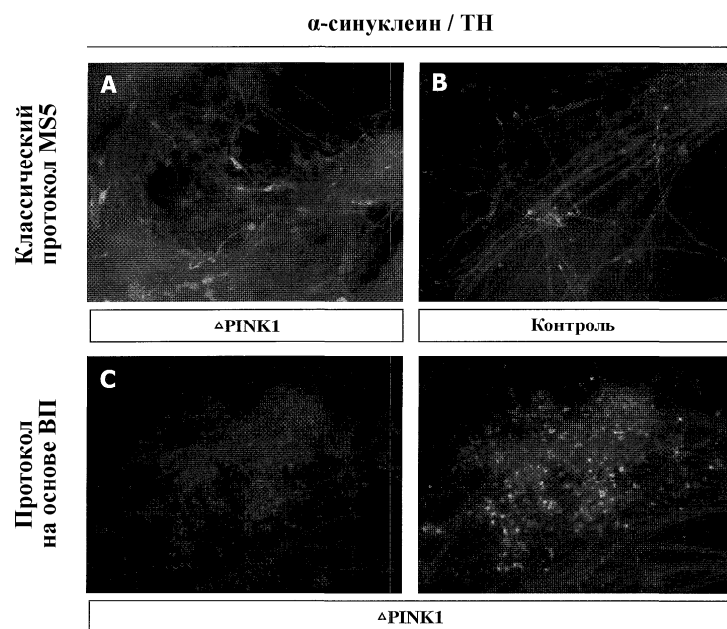
Фиг. 20



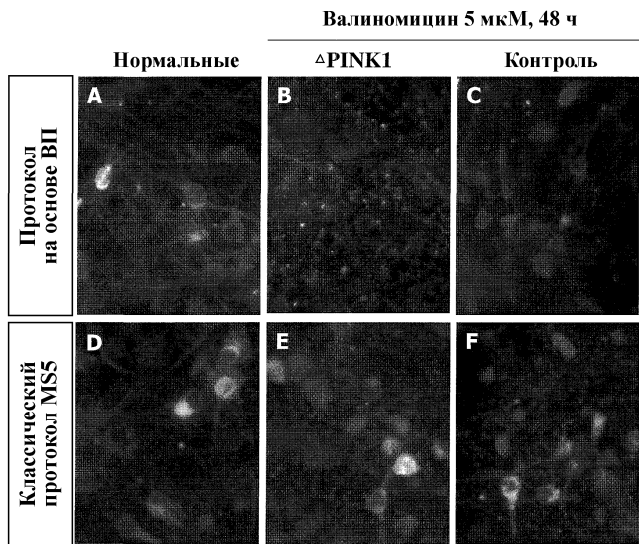
Фиг. 21

фосфорилированный по Ser129 α -синуклеин / DAPI

Фиг. 22

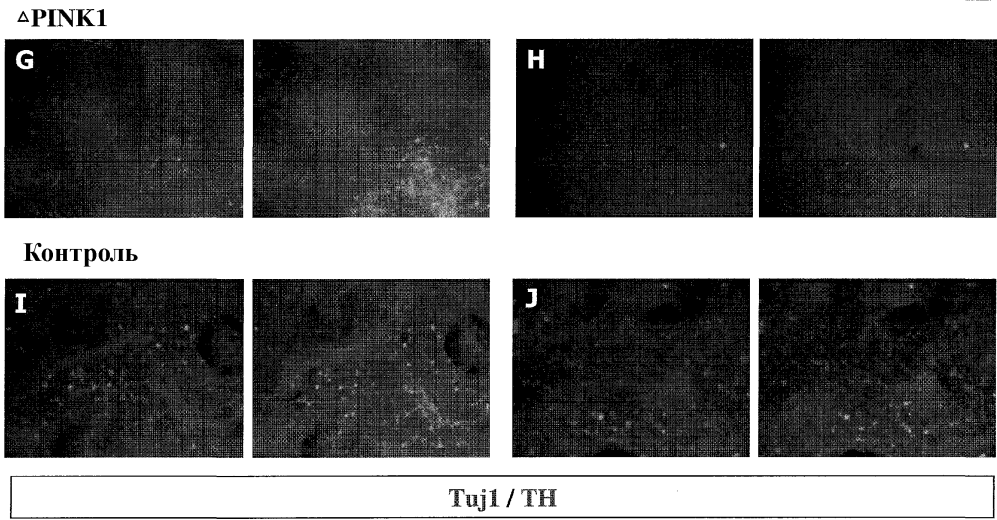


Фиг. 23



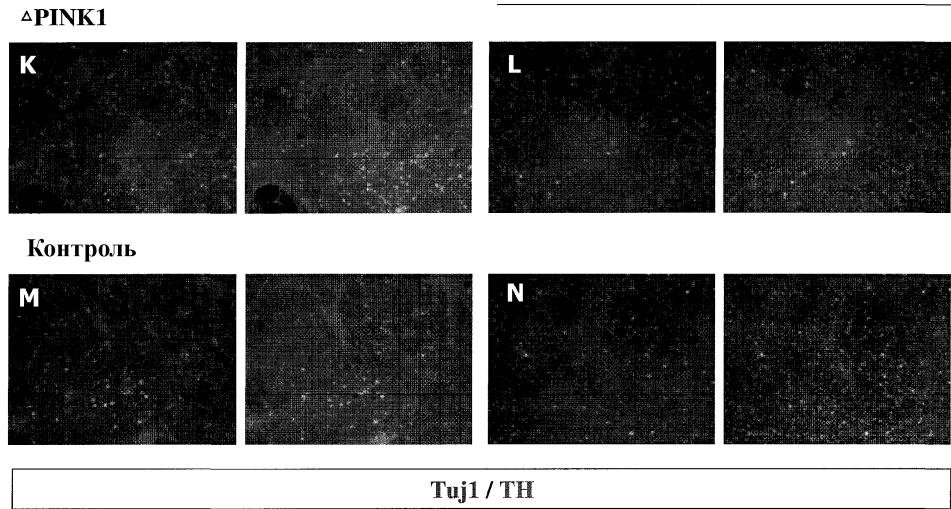
Протокол на основе ВП:

Валиномицин 5 мкМ, 48 ч

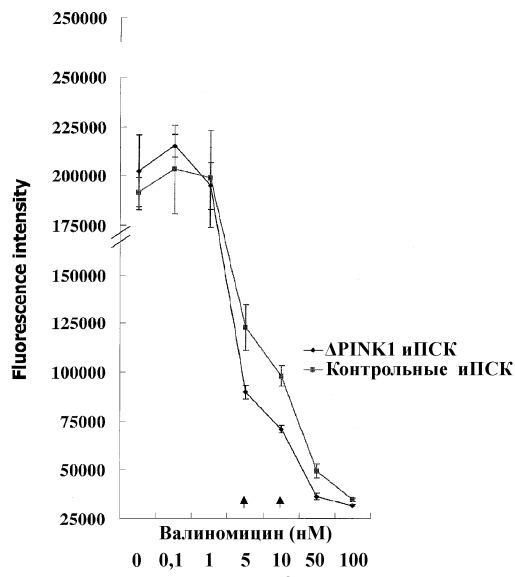


Классический протокол MS5:

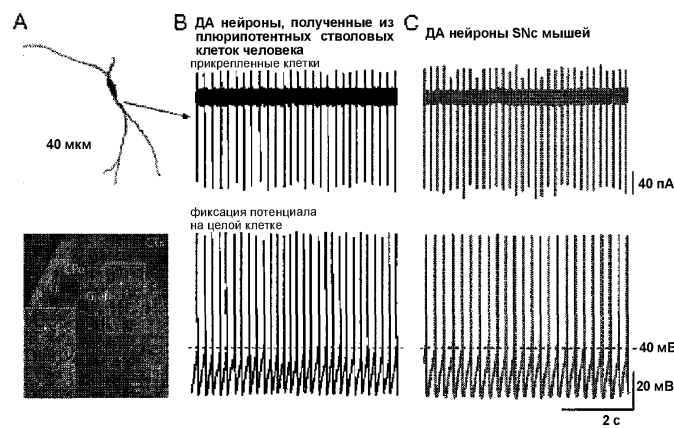
Валиномицин 5 мкМ, 48 ч



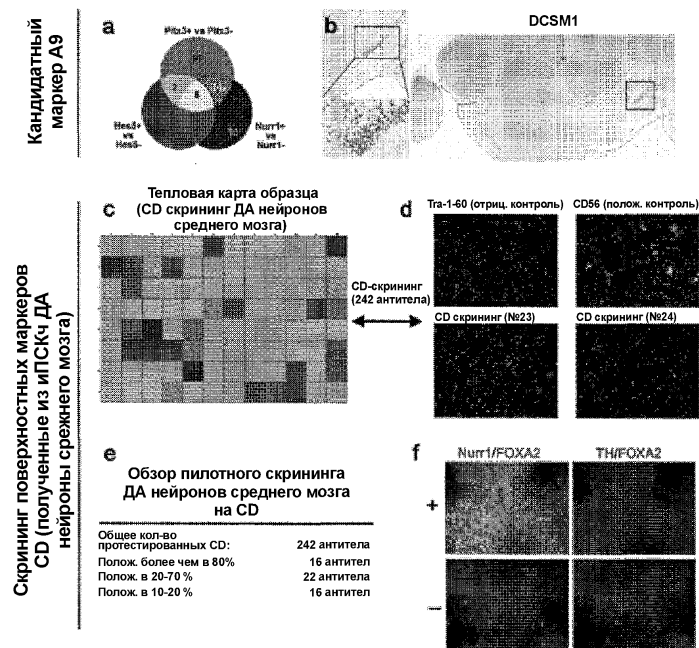
Фиг. 24



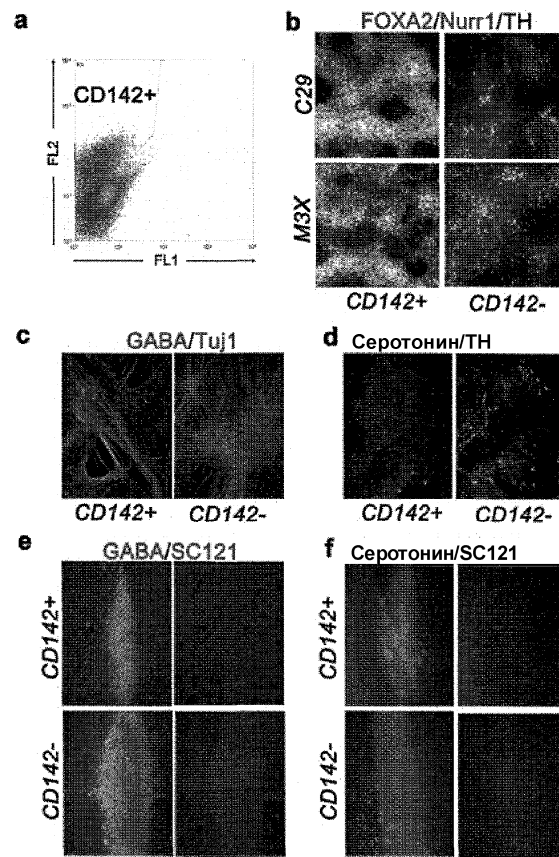
Фиг. 25



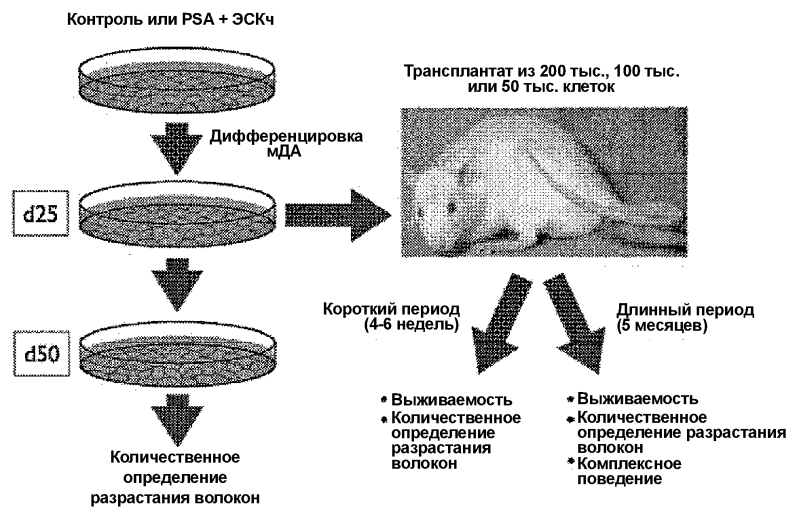
Фиг. 26



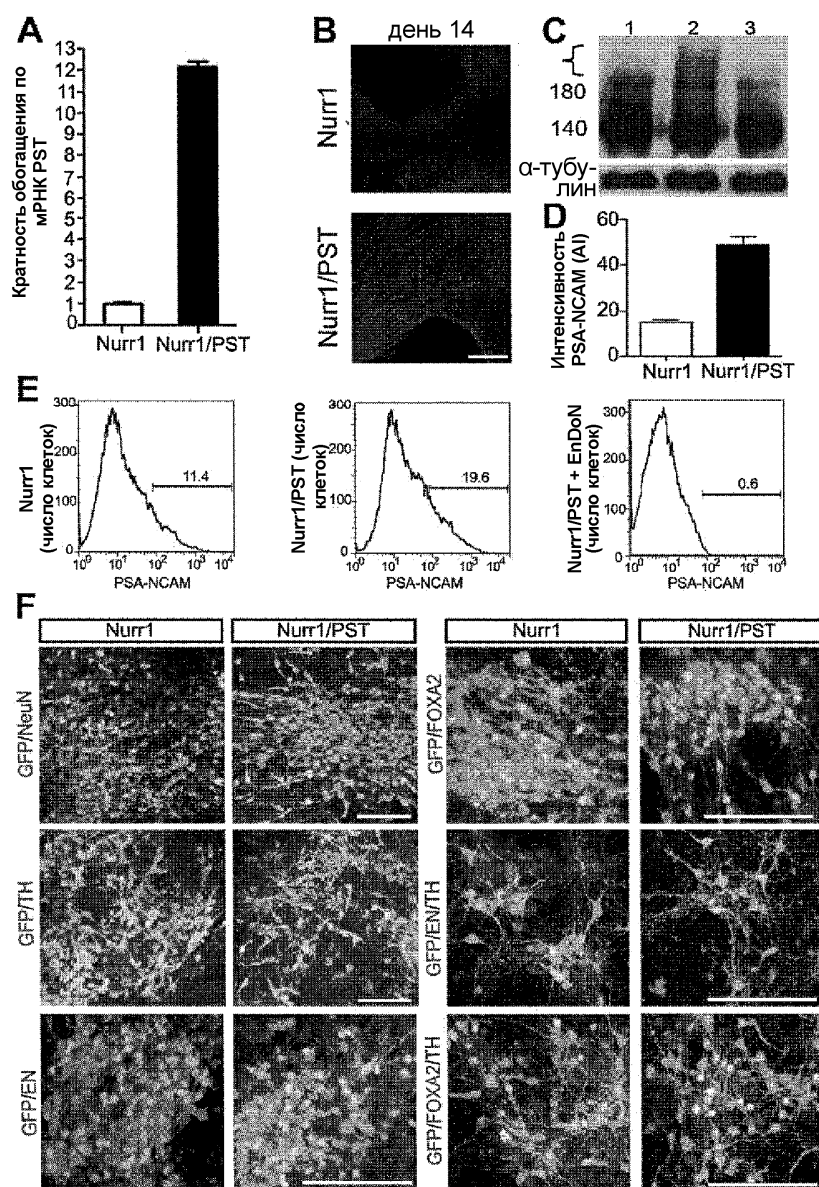
Фиг. 27



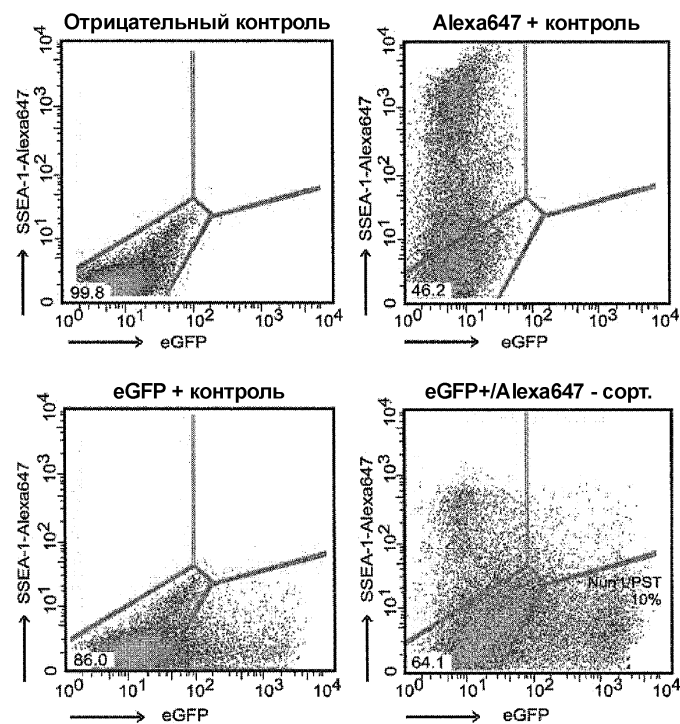
Фиг. 28



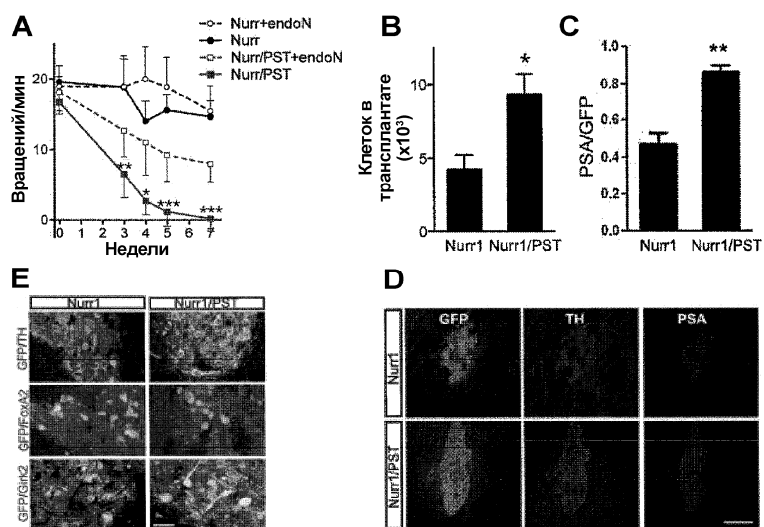
Фиг. 29



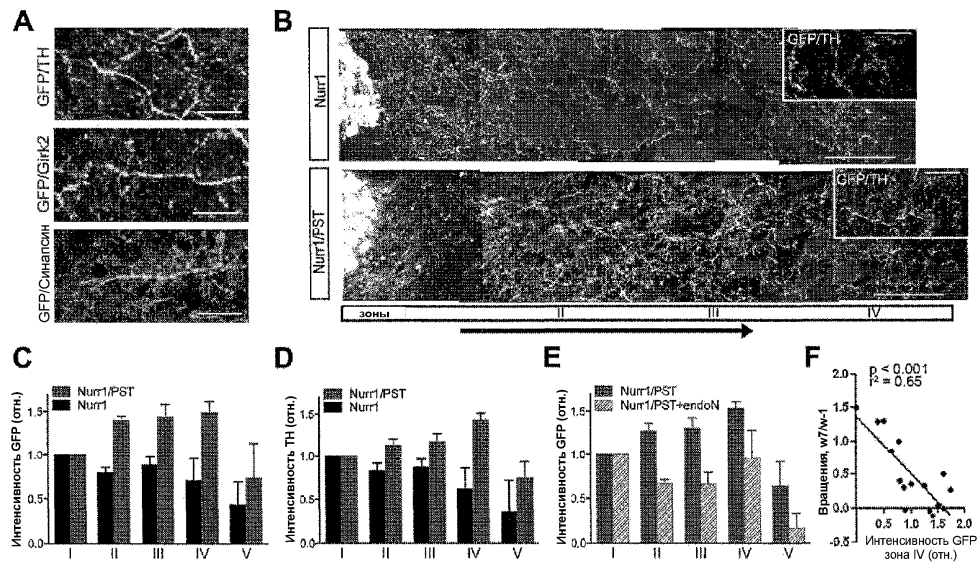
Фиг. 30



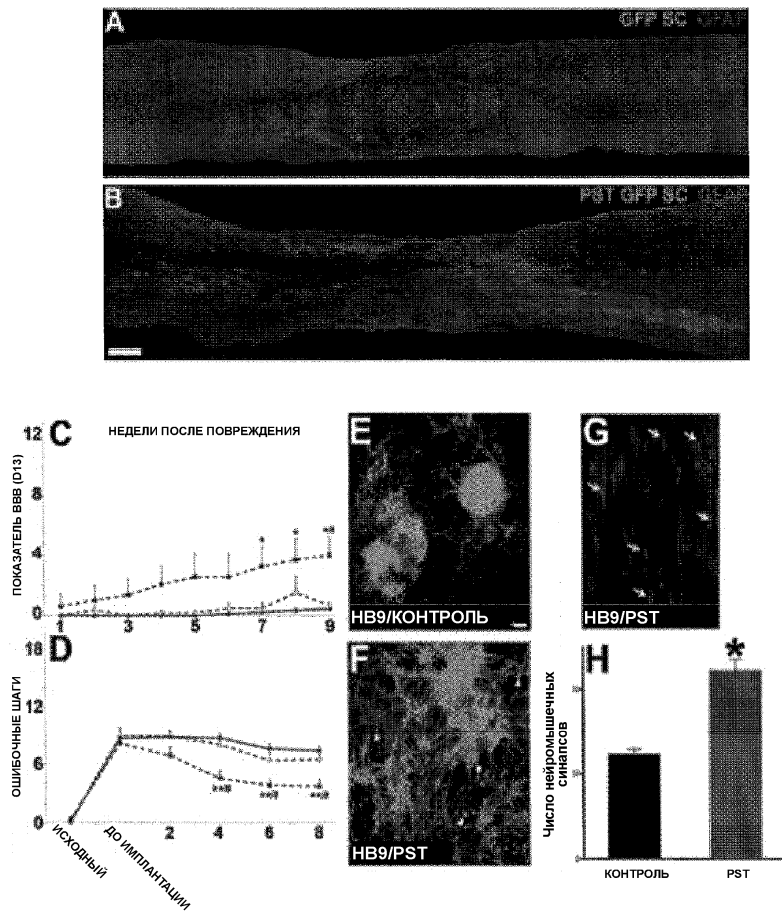
Фиг. 31



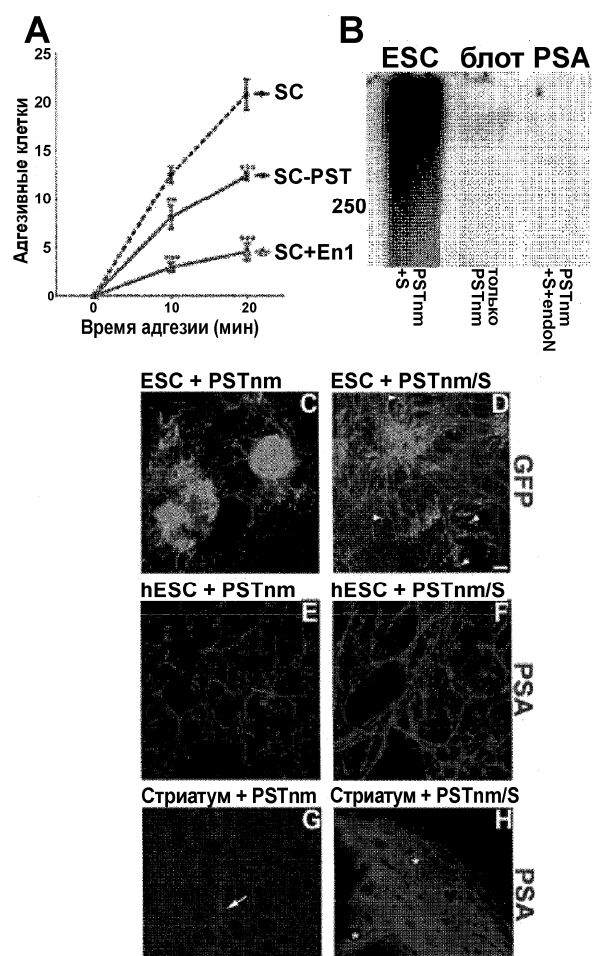
Фиг. 32



Фиг. 33



Фиг. 34



Фиг. 35



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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