

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292301 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.29

(51) Int. Cl. C12N 5/071 (2010.01)
A61K 35/407 (2015.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.03.11

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕЧЕНОЧНЫХ КЛЕТОК

(31) 62/988,349

(32) 2020.03.11

(33) US

(86) PCT/GB2021/050622

(87) WO 2021/181110 2021.09.16

(71) Заявитель:
БИТ БАЙО ЛИМИТЕД (GB)

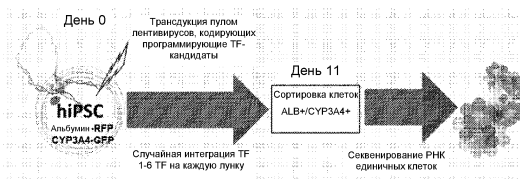
(72) Изобретатель:

Калкан Тюцер, Моро Томас Пьер
Мишель, Вард Карл, Белгард Тильдон
Грант, Бэшингер Фабиан (GB)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к способам получения печеночных клеток путем гиперэкспрессии комбинаций факторов транскрипции, в частности, для применения в способах клеточного перепрограммирования.



A1

202292301

202292301

A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕЧЕНОЧНЫХ КЛЕТОК

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к способам получения печеночных клеток путем гиперэкспрессии комбинаций факторов транскрипции.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Гепатоциты представляют собой основные функциональные клетки печени. Они обеспечивают широкий спектр жизненно важных функций, включая регуляцию метаболизма глюкозы и липидов, детоксикацию различных метаболитов и лекарственных средств, синтез белка и синтез желчи.

При скрининге лекарственных средств чрезвычайно важно определить, может ли потенциальное лекарственное средство-кандидат вызывать гепатотоксичность. В настоящее время для скрининга на гепатотоксичность и подбора дозы лекарственного средства обычно используют ряд иммортализованных линий печеночных клеток и первичные гепатоциты человека. Однако иммортализованные клетки не обладают ключевыми функциями печеночного метаболизма лекарственных средств. Первичные гепатоциты имеют ограничения по их источникам, подвержены стрессу при выделении и криоконсервации и демонстрируют различия между партиями и, таким образом, не являются идеальными объектами для высокопроизводительных скринингов. Более того, функции метаболизма лекарственных средств у первичных гепатоцитов человека могут значительно различаться в зависимости от генетического фона. Доступность стабильного и масштабируемого источника функциональных гепатоцитов человека существенно упростила бы как разработку, так и клиническое применение лекарственных средств для лечения печеночной недостаточности. Получение печеночных клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) уже было исследовано ранее, однако способы, известные из современного уровня техники, не обеспечивают уровень функциональности, стабильности и масштабируемости, необходимый для высокопроизводительных скринингов лекарственных средств. Более того, печеночные клетки, полученные из iPSC с применением современных способов,

остаются метаболически неполноценными и, следовательно, не являются подходящими в качестве прогностической физиологической модели (Williams, 2018).

Печеночные клетки, полученные из iPSC, могут различным образом ускорять поиск новых лекарственных средств и клеточной терапии. Зрелые гепатоциты можно использовать при поиске новых лекарственных средств в качестве заменителей первичных гепатоцитов для проверки действия лекарственных средств на печень (Williams, 2018). Дополнительным преимуществом гепатоцитов, полученных из iPSC, является их способность выступать в качестве модели при изучении заболеваний печени. Таким образом, они обеспечивают уникальные инструменты для проверки эффективности лекарственных средств на клетках, полученных от пациентов. Трансплантация незрелых или зрелых гепатоцитов или печеночных клеток-предшественников может представлять собой альтернативу трансплантации целой печени у пациентов, страдающих от острой печеночной недостаточности или метаболических заболеваний печени, при комбинировании с генной терапией (Iansante *et al.*, 2018).

Таким образом, в данной области техники существует потребность в обеспечении способов получения печеночных клеток, подходящих для применения в качестве инструментов для исследований и в качестве потенциальных терапевтических агентов.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предложен способ получения печеночных клеток, включающий повышение экспрессии по меньшей мере трех или более факторов транскрипции, где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из: FOXA1 или FOXA3; NR1I2 или NR1I3; HNF1A; CREB3L3; GATA4; KLF9; ATF5; MLXIPL; FOXA2; AR; ARID3C; CEBPA; CUX2; EPAS1; HLF; HNF1A; HNF4A; HNF4G; KLF15; NCOA2; NR0B2; NR1H4; NR5A2; ONECUT1; ONECUT2; PPARA; PROX1; RORA; RORC; RXRA; SALL1; SMAD1; SREBF1; STAT3; TSHZ2; XBP1; ZBTB16 и их вариантов, в популяции непеченочных клеток и культивирование указанной популяции клеток с получением печеночных клеток.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ получения печеночных клеток из исходной клетки, включающий стадии:

а) направленного встраивания гена, кодирующего белок-регулятор транскрипции, в первый генетически безопасный сайт-гавань исходной клетки; и

б) направленного встраивания по меньшей мере трех или более факторов транскрипции, где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из: FOXA1 или FOXA3; NR1I2 или NR1I3; HHEX; CREB3L3; GATA4; KLF9; ATF5; MLXIPL; FOXA2; AR; ARID3C; CEBPA; CUX2; EPAS1; HLF; HNF1A; HNF4A; HNF4G; KLF15; NCOA2; NR0B2; NR1H4; NR5A2; ONECUT1; ONECUT2; PPARA; PROX1; RORA; RORC; RXRA; SALL1; SMAD1; SREBF1; STAT3; TSHZ2; XBP1; ZBTB16 и их вариантов, функционально связанных с индуцируемым промотором во втором генетически безопасном сайте-гавани исходной клетки, при этом указанный индуцируемый промотор регулируется белком-регулятором транскрипции; и

в) культивирования исходной(ых) клетки(ок), содержащей(их) вставки, с получением печеночных клеток.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложено применение по меньшей мере трех или более факторов транскрипции, где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из: FOXA1 или FOXA3; NR1I2 или NR1I3; HHEX; CREB3L3; GATA4; KLF9; ATF5; MLXIPL; FOXA2; AR; ARID3C; CEBPA; CUX2; EPAS1; HLF; HNF1A; HNF4A; HNF4G; KLF15; NCOA2; NR0B2; NR1H4; NR5A2; ONECUT1; ONECUT2; PPARA; PROX1; RORA; RORC; RXRA; SALL1; SMAD1; SREBF1; STAT3; TSHZ2; XBP1; ZBTB16 и их вариантов, для получения печеночных клеток.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена клетка, которая может быть получена любым из способов, определенных в настоящем документе.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена клетка, содержащая одну или более экзогенных кассет экспрессии, кодирующих по меньшей мере три или более факторов транскрипции, где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из: FOXA1 или FOXA3; NR1I2 или NR1I3; HHEX; CREB3L3; GATA4; KLF9; ATF5; MLXIPL; FOXA2; AR; ARID3C; CEBPA; CUX2; EPAS1; HLF; HNF1A; HNF4A; HNF4G; KLF15; NCOA2; NR0B2; NR1H4; NR5A2; ONECUT1; ONECUT2; PPARA; PROX1; RORA; RORC; RXRA; SALL1; SMAD1; SREBF1; STAT3; TSHZ2; XBP1; ZBTB16 и их вариантов.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена клетка, определенная в настоящем документе, для применения в терапии.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен набор для дифференцировки клетки в печеночную клетку, содержащий:

(1) исходную клетку и агент, который активирует или повышает экспрессию или количество по меньшей мере трех или более факторов транскрипции; и/или

(2) одну или более кассет экспрессии, кодирующих по меньшей мере три или более факторов транскрипции,

где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из: FOXA1 или FOXA3; NR1I2 или NR1I3; HHEX; CREB3L3; GATA4; KLF9; ATF5; MLXIPL; FOXA2; AR; ARID3C; CEBPA; CUX2; EPAS1; HLF; HNF1A; HNF4A; HNF4G; KLF15; NCOA2; NR0B2; NR1H4; NR5A2; ONECUT1; ONECUT2; PPARA; PROX1; RORA; RORC; RXRA; SALL1; SMAD1; SREBF1; STAT3; TSHZ2; XBP1; ZBTB16 и их вариантов.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложено применение набора, определенного в настоящем документе, для дифференцировки клетки в печеночную клетку.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ скрининга лекарственных средств, включающий приведение печеночной клетки, полученной с применением способа, определенного в настоящем документе, или печеночной клетки, определенной в настоящем документе, в контакт с лекарственным средством и наблюдение изменения в указанных печеночных клетках, вызванного лекарственным средством.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего заболевание или дисфункцию печени, или подверженного риску их развития, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества печеночных клеток, полученных с применением способа, определенного в настоящем документе, или печеночных клеток, определенных в настоящем документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Стратегия скрининга факторов транскрипции (TF), обладающих активностью перепрограммирования в печеночные клетки

iPSC человека, несущие двойные репортеры, представляющие собой ген альбумина, слитый с красным флуоресцентным белком (ALB:RFP), и ген цитохрома P450 3A4, слитый с зеленым флуоресцентным белком (CYP3A4:GFP), были

трансдуцированы пулом лентивирусных векторов, каждый из которых переносил один фактор транскрипции. Дозу лентивирусного вектора подбирали таким образом, чтобы большинство клеток содержали 6 или менее уникальных факторов транскрипции на каждую клетку. На 11 сутки после лентивирусной (LV) трансдукции клетки, экспрессирующие оба репортера, выделяли посредством сортировки клеток с активированной флуоресценцией и подвергали секвенированию РНК единичных клеток.

Фигура 2. Получение клеток ALB+ и CYP3A4+ с применением 39 TF

Изображения в проходящем свете (Trans) и эпифлуоресцентные изображения для клеток на 6 сутки (a-c) и 10 сутки (d-f) после LV трансдукции и для нетрансдуцированных клеток (g-i) на 10 сутки.

Фигура 3. Получение клеток ALB+ и CYP3A4+ с применением 34 TF

Изображения в проходящем свете (Trans) и эпифлуоресцентные изображения для клеток на 7 сутки (a-c) и 11 сутки (d-f) после LV трансдукции и для нетрансдуцированных клеток (g-i) на 11 сутки.

Фигура 4. Секвенирование РНК единичных клеток ALB-RFP+/CYP3A4-GFP+ на 11 сутки

(А) Точечный график проточной цитометрии для клеток, трансдуцированных 34 TF, на 11 сутки. Клетки ALB:RFP+/CYP3A4:GFP+ сортировали и подвергали секвенированию РНК единичных клеток.

(В) Кластеризация клеток на 11 сутки, подвергнутых сортировке, и клеток печени, описанных в публикации MacParland *et al.*, 2018, с использованием алгоритма Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) на основании уровней экспрессии всех генов, экспрессирующихся согласно двум наборам данных. Клетки отличных от гепатоцитов типов, присутствующие в печени человека, такие как холангиоциты, клетки Купфера, звездчатые клетки, эндотелиальные клетки и иммунные клетки, которые включены в набор данных из публикации MacParland *et al.*, 2018, обозначены серыми квадратами.

Фигура 5. Наборы данных по секвенированию РНК единичных клеток (scRNA-seq), используемые для установления комбинаций факторов транскрипции, которые индуцируют перепрограммирование в гепатоциты. (А) Краткое описание эталонных клеток: взрослые гепатоциты (MacParland *et al.*, 2018), фетальные гепатоциты (Popescu *et al.*, 2019), отличные от гепатоцитов клетки печени взрослого и плода (MacParland *et al.*, 2018 и Popescu *et al.*, 2019) и индуцированные

плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). (B) Кримоконсервированные взрослые гепатоциты, используемые в качестве контроля для проверки классификатора клеток. (C) Краткое изложение стратегии для перепрограммирования клеток, разработанной при скринингах факторов транскрипции (TF), в ходе которых TF вводили в iPSC в виде пула из 34 TF (TF, приведенные в **таблице 2**) или 17 TF (TF, приведенные в **таблице 3**, плюс PROX1) с применением лентивирусов, каждый из которых переносил отдельный TF: на 7, 10 и 11 сутки перепрограммирования клетки сортировали посредством проточной цитометрии на основании экспрессии репортеров ALB и/или CYP3A4. При скрининге 34 TF клетки получали на 2, 7 и 11 сутки. При скрининге 17 TF клетки ALB+/CYP3A4+ были получены на 10 сутки.

Фигура 6. Кластеризация перепрограммированных клеток с эталонными клетками. (A) График UMAP, на котором показаны транскриптомы единичных клеток для эталонных клеток. (B) График UMAP, на котором показаны транскриптомы единичных клеток для эталонных клеток (серый цвет) и кримоконсервированных гепатоцитов (черный цвет), используемых в качестве контроля. (C) График UMAP, на котором показана кластеризация эталонных клеток (серый цвет) и перепрограммированных клеток (черный цвет). (D) График UMAP, на котором показаны транскриптомы единичных клеток для перепрограммированных клеток, взятых в различные моменты времени в процессе перепрограммирования и подвергнутых сортировке посредством проточной цитометрии, как описано на **фигуре 5C**. (E) Таблица, в которой представлено процентное содержание перепрограммированных клеток в различных кластерах.

Фигура 7. Экспрессия экзогенных факторов транскрипции (eTF) в единичных клетках из 11-дневной популяции клеток RFP+/GFP+

Гистограмма, на которой показана частота встречаемости клеток, экспрессирующих различное число уникальных экзогенных TF (eTF).

Фигура 8. Экспрессия маркеров зрелых гепатоцитов в клетках, программированных с применением 14 TF

Изображения в проходящем свете (Trans) и эпифлуоресцентные изображения для клеток на 13 сутки после трансдукции пулом лентивирусных векторов, несущим 14 TF, приведенных в **таблице 4**.

(A) Изображения в проходящем свете и эпифлуоресцентные изображения для клеток, окрашенных с применением антитела против белка CYP3A4.

(В) Изображения в проходящем свете и эпифлуоресцентные изображения для клеток, окрашенных с применением антител против белков CYP2C9 и UGT1A. Стрелки указывают на клетки, которые совместно экспрессируют все 4 печеночных маркера.

Фигура 9. Тепловая карта, на которой показана экспрессия генов, специфичных для определенных типов клеток. Клетки сгруппированы в кластеры по типам клеток на основании кластеризации UMAP, представленной на **фигуре 6**. Единичные клетки расположены по горизонтальной оси, и нанесены нормализованные уровни экспрессии генов. Шкала внизу отображает масштабирование нормализованного уровня экспрессии генов. Гены, специфичные для определенных типов клеток, представлены вдоль вертикальной оси. **(А)** Гены, специфичные для взрослых гепатоцитов; **(В)** гены, экспрессируемые как во взрослых, так и в фетальных гепатоцитах; **(С)** гены с повышенной экспрессией в фетальных гепатоцитах; и **(D)** гены в плюрипотентных стволовых клетках.

Фигура 10. Тепловая карта, на которой показана экспрессия генов, ассоциированных со специфичными для гепатоцитов клеточными функциями. Единичные клетки расположены по горизонтальной оси, и нанесены нормализованные уровни экспрессии генов. Гены сгруппированы в соответствии с их ассоциацией с конкретными функциями и представлены вдоль вертикальной оси. Шкала внизу отображает масштабирование нормализованного уровня экспрессии генов. **(А)** Гены, выполняющие функции в метаболизме аминокислот, глюкозы и липидов; **(В)** гены, выполняющие функции в метаболизме лекарственных средств.

Фигура 11. Иерархическая кластеризация на основании нормализованной экспрессии всех генов, детектируемых в используемых наборах данных.

Фигура 12. Содержание факторов транскрипции в перепрограммированных клетках, которые кластеризуются с эталонными типами клеток. **(А)** Столбиковая диаграмма, на которой показано число уникальных TF, обнаруженных в клетках, которые кластеризуются с эталонными взрослыми гепатоцитами. **(В)** Точечный график, на котором показаны профили экспрессии отдельных TF в перепрограммированных клетках, полученных при скрининге 34 TF. Строки (сверху вниз) представляют группы перепрограммированных клеток, которые кластеризуются с фетальными гепатоцитами, взрослыми гепатоцитами, отличными от гепатоцитов клетками (другими клетками печени) и iPSC. **(С)** Точечный график, на котором показаны профили экспрессии отдельных TF в перепрограммированных клетках, полученных при скрининге 17 TF.

Строки (сверху вниз) представляют группы перепрограммированных клеток, которые кластеризуются с фетальными гепатоцитами, взрослыми гепатоцитами, отличными от гепатоцитов клетками (другими клетками печени) и iPSC. (D) В **таблице 5** приведены 4 комбинации TF, содержание которых повышено в кластере взрослых гепатоцитов, полученных при скринингах TF. (E) В **таблице 6** приведены 3 комбинации TF, содержание которых повышено в кластере взрослых гепатоцитов, полученных при обоих скринингах TF.

Фигура 13. Комбинация CREB3L3-FOXA1-NR1H2-HHEX может обеспечивать перепрограммирование iPSC в гепатоцитоподобные клетки. (A) Изображения в режиме реального времени для перепрограммированных клеток, экспрессирующих репортеры ALB-RFP и CYP3A4-GFP, на 7 и 12 сутки перепрограммирования. Нетрансдуцированные (NT) клетки, параллельно культивируемые в той же среде, не экспрессируют указанные репортеры. (B) Изображения, полученные при окрашивании с применением флуоресцентных антител, для белков, участвующих в различных специфичных для гепатоцитов функциональных путях. Окрашивание проводили на 21 сутки перепрограммирования для определения: CYP1A2 (фаза 1 метаболизма лекарственных средств), CYP2C9 (фаза 1 метаболизма лекарственных средств), CYP2D6 (фаза 1 метаболизма лекарственных средств), UGT1A1 (фаза 2 метаболизма лекарственных средств), PCK2 (метаболизм глюкозы), ASGR1 (сывороточный гомеостаз). (C) Функциональный анализ для CYP3A4: анализ CYP3A4-GLO. Эксперимент проводили на 13 и 21 сутки перепрограммирования в 2 технических повторностях. Перепрограммированные клетки, трансдуцированные лентивирусами, экспрессирующие 4 конкретных TF (4LV), и нетрансдуцированные контроли (NT) получали из 3 независимых линий iPSC (iPSC 1-3) и культивировали параллельно. Две различные линии печеночных клеток, полученные из опухолей печени, Huh-7 и HepG2, использовали в качестве контроля. Планки погрешностей показывают стандартное отклонение между повторностями.

Фигура 14. FOXA1 и HHEX необходимы для перепрограммирования в печеночные клетки ALB+, а NR1H2 необходим для прогрессирования клеток ALB+ до гепатоцитоподобных клеток ALB+/CYP3A4+. Изображения в режиме реального времени для перепрограммированных клеток, экспрессирующих репортеры ALB-RFP и CYP3A4-GFP, показаны на (A) 8 сутки и (B) 14 сутки перепрограммирования.

Фигура 15. FOXA3 может заменять FOXA1 при перепрограммировании в гепатоцитоподобные клетки ALB+/CYP3A4+. Показаны изображения в режиме реального времени на 19 сутки для перепрограммированных клеток, экспрессирующих репортеры ALB-RFP и CYP3A4-GFP. Нетрансдуцированные (NT) клетки, параллельно культивируемые в той же среде, не экспрессируют указанные репортеры.

Фигура 16. NR1I3 может заменять NR1I2 при перепрограммировании в гепатоцитоподобные клетки ALB+/CYP3A4+. Показаны изображения в режиме реального времени на 13 сутки для перепрограммированных клеток, экспрессирующих репортеры ALB-RFP и CYP3A4-GFP. Нетрансдуцированные (NT) клетки, параллельно культивируемые в той же среде, не экспрессируют указанные репортеры.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В настоящем изобретении предложены способы получения печеночных клеток из исходных клеток путем повышения экспрессии выбранной группы факторов транскрипции, которые были идентифицированы авторами настоящего изобретения как индуцирующие дифференцировку клеток в печеночные клетки.

Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, общепринятое для специалистов в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. В настоящем документе следующие термины имеют значения, приписываемые им ниже.

В настоящем документе ссылки на «фактор транскрипции» относятся к белкам, которые участвуют в регуляции генов как в прокариотических, так и в эукариотических организмах. В одном из воплощений факторы транскрипции могут иметь положительный эффект в отношении экспрессии генов и, таким образом, могут быть названы «активаторами» или «факторами активации транскрипции». В другом воплощении фактор транскрипции может отрицательно влиять на экспрессию генов и, таким образом, может быть назван «репрессором» или «фактором репрессии транскрипции». Активаторы и репрессоры являются общепринятыми терминами, и их функции могут быть различимы специалистами в данной области техники.

Термин «повышение количества» применительно к повышению количества фактора транскрипции относится к повышению количества фактора транскрипции в целевой клетке (например, исходной клетке). В некоторых воплощениях количество фактора транскрипции в клетке повышено (например, с помощью кассеты экспрессии,

управляющей экспрессией полинуклеотида, кодирующего один или более факторов транскрипции), если количество фактора транскрипции составляет по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с контролем (например, исходной клеткой без указанной(ых) кассет(ы) экспрессии). В некоторых из воплощений повышение экспрессии включает «гиперэкспрессию» фактора транскрипции, то есть повышение экспрессии фактора транскрипции выше эндогенного уровня экспрессии этого фактора транскрипции в клетке.

Способы согласно настоящему изобретению можно применять в «популяции клеток», то есть совокупности клеток, которые могут быть дифференцированы в клетки желаемого типа. Указанная популяция клеток может содержать «исходные клетки», также называемые «начальными клетками», то есть тип клеток до его дифференцировки в желаемый тип клеток.

В настоящем документе ссылки на «плюрипотентные» относятся к клеткам, которые потенциально способны дифференцироваться во все типы клеток, обнаруженные в организме. Одна из форм плюрипотентных стволовых клеток, известная как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, представляет особый интерес для настоящего изобретения. «Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки» (iPSC) представляют собой клетки, которые были перепрограммированы до состояния, подобного эмбриональным стволовым клеткам, посредством принудительной экспрессии генов и факторов, важных для поддержания отличительных свойств эмбриональных стволовых клеток. В 2006 году было показано, что гиперэкспрессия четырех конкретных факторов транскрипции может превращать взрослые клетки в плюрипотентные стволовые клетки. Oct-3/4 и некоторые представители семейства генов Sox были идентифицированы как потенциально ключевые регуляторы транскрипции, участвующие в процессе индукции. Дополнительные гены, включая некоторых представителей семейства Klf, семейства Muc, Nanog и Lin28, могут повышать эффективность индукции. Примеры генов, которые можно применять в качестве факторов перепрограммирования для получения iPSC, включают Oct3/4, Sox2, Sox1, Sox3, Sox15, Sox17, Klf4, Klf2, c-Myc, N-Myc, L-Myc, Nanog, Lin28, Fbx15, ERas, ECAT15-2, Tcl1, бета-катенин, Lin28b, Sall4, Esrrb, Tbx3 и Glis1, GATA3, GATA6, и эти факторы перепрограммирования можно применять по отдельности или в комбинации из двух или более их видов. В частности, факторы перепрограммирования могут включать по меньшей мере факторы Яманаки, то есть Oct3/4, Sox2, Klf4 и c-Myc. Эти факторы

перепрограммирования также можно применять в комбинации с факторами транскрипции, представляющими интерес для настоящего изобретения.

В настоящем документе ссылки на «соматические» относятся к любому типу клеток, составляющих тело организма, за исключением половых клеток. Таким образом, соматические клетки включают, например, клетки кожи, сердца, мышц, костей или крови и их стволовые клетки. В одном из воплощений соматическая клетка может представлять собой взрослую клетку, или клетку, полученную из взрослого организма, которая демонстрирует одну или более детектируемых характеристик взрослой, или неэмбриональной, клетки.

Способы согласно настоящему изобретению (например, клеточное перепрограммирование iPSC) предназначены для применения при получении «печеночных клеток», которые также могут быть названы «гепатоцитами». В настоящем документе термин «печеночный» относится к клеткам, которые подобны паренхимальным клеткам печени. Этот термин включает гепатоцитоподобные клетки, которые демонстрируют некоторые, но не все, характеристики взрослых гепатоцитов, а также зрелые, полностью функциональные и/или метаболически активные взрослые гепатоциты. Этот термин также включает взрослые и фетальные печеночные клетки-предшественники (включая гепатобилиарные бипотенциальные клетки-предшественники) и фетальные гепатоциты. Этот термин также включает клетки, способные имплантироваться в ткань печени при трансплантации *in vivo*. В настоящее время печеночные клетки, полученные этим способом, могут быть по меньшей мере в той же степени функциональными, что и печеночные клетки, полученные путем направленной дифференцировки.

В настоящем документе ссылки на «культивирование» включают добавление клеток (например, популяции клеток, то есть исходных клеток) в среду, содержащую факторы роста и/или незаменимые питательные вещества. Следует понимать, что такие условия культивирования могут быть адаптированы в зависимости от клеток или популяции клеток, которые получают в соответствии со способами согласно настоящему изобретению.

Ссылки на «вариант» применительно к полипептиду могут представлять собой, например, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична полноразмерному полипептиду. Вариант может представлять собой фрагмент полноразмерного полипептида, в частности

функциональный фрагмент полипептида. Длина фрагмента может составлять по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% от длины полноразмерного полипептида дикого типа или его домена, обладающего целевой активностью, такой как способность обеспечивать дифференцировку исходной клетки в печеночную клетку. Предпочтительно следует избегать модификаций, известных в данной области техники, которые приводят к устранению или существенному снижению активности белка. В некоторых воплощениях вариант не содержит N- и/или C-концевого участка полноразмерного полипептида, например, отсутствуют вплоть до 10, 20 или 50 аминокислот с одного из двух концов. В некоторых воплощениях функциональный вариант или фрагмент имеет активность, составляющую по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более от активности полноразмерного полипептида дикого типа. Специалисту в данной области техники будет известно, либо с помощью анализов, известных в данной области техники, он сможет легко установить, является ли функциональным конкретный вариант или фрагмент полипептида. Например, способность варианта фактора транскрипции, такого как приведенные в **таблицах 1-4**, обеспечивать получение печеночных клеток, может быть оценена с применением анализов, описанных в настоящем документе.

«Промотор» представляет собой нуклеотидную последовательность, которая распознается белками, участвующими в инициации и регуляции транскрипции полинуклеотида. «Индукцируемый промотор» представляет собой нуклеотидную последовательность, в случае присутствия которой экспрессия генетической последовательности, функционально связанной с промотором, находится под контролем исследуемого вещества, кофактора, регуляторного белка и т.д. Предполагается, что термин «промотор» или «регуляторный элемент» включает полноразмерные промоторные области и функциональные (например, регулирующие транскрипцию или трансляцию) сегменты этих областей.

Термин «функционально связанный» относится к расположению элементов, при котором описываемые этим термином компоненты имеют конфигурацию, обеспечивающую выполнение их обычной функции. Таким образом, данный промотор, функционально связанный с генетической последовательностью, способен влиять на экспрессию этой последовательности, когда присутствуют регуляторные факторы. Промотор не должен обязательно примыкать к последовательности, если он выполняет функцию управления ее экспрессией. Соответственно, например, между промоторной

последовательностью и генетической последовательностью могут присутствовать нетранслируемые, но транскрибируемые интронные последовательности, и промоторная последовательность все еще может считаться «функционально связанной» с генетической последовательностью. Таким образом, термин «функционально связанный» охватывает любые пространственное расположение или ориентацию промоторного элемента и генетической последовательности в индуцируемой кассете, которые допускают инициацию транскрипции индуцируемой кассеты при распознавании промоторного элемента транскрипционным комплексом.

В настоящем документе термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которую применяют в качестве носителя для переноса генетического материала в клетку. Один из типов векторов представляет собой «плазмиду», которая относится к кольцевой двухцепочечной ДНК в виде петли или окружности, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой инфекционный, но не патогенный вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы с некоторыми из генетических элементов вируса. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, содержащие бактериальную точку начала репликации, и эписомальные векторы для экспрессии в клетках млекопитающих и дрожжей). Другие векторы (например, неэписомальные векторы для экспрессии в клетках млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. В настоящем документе такие векторы называются «рекомбинантными векторами экспрессии» (или просто «векторами экспрессии»). Как правило, векторы экспрессии, используемые в методиках рекомбинантной ДНК, часто имеют форму плазмид. Однако настоящее изобретение включает другие формы векторов экспрессии, как то: вирусные векторы (например, векторы на основе дефектных по репликации ретровирусов, лентивирусные векторы, векторы на основе аденовирусов, вирусов Сендай и аденоассоциированных вирусов), которые выполняют эквивалентные функции, и также системы на основе бактериофагов и фагмид. Другой тип вектора включает молекулы РНК, например, мРНК и стабилизированную РНК, для переноса кодирующей генетической информации в клетки.

Ссылки на «субъекта», «пациента» или «индивидуума» относятся к субъекту, в частности субъекту-млекопитающему, нуждающемуся в лечении. Субъекты-млекопитающие включают людей, отличных от человека приматов, сельскохозяйственных животных (таких как коровы), спортивных животных или домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы или мыши. В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека. В альтернативных воплощениях субъект представляет собой отличное от человека млекопитающее, такое как мышь.

Термин «достаточное количество» означает количество, достаточное для обеспечения желаемого эффекта. Термин «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество, которое эффективно для облегчения симптома заболевания или нарушения. Терапевтически эффективное количество может представлять собой «профилактически эффективное количество», поскольку профилактика может рассматриваться как терапия.

В настоящем документе термин «примерно» включает диапазон от величины на 10% ниже до величины на 10% выше указанного значения включительно, подходящим образом от величины на 5% ниже до величины на 5% выше указанного значения включительно, в частности, указанное значение. Термин «между» включает значения указанных границ.

Следует понимать, что любой способ, описанный в настоящем документе, может включать проведение одной или более, или всех стадий *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*.

Факторы транскрипции

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предложен способ получения печеночных клеток, включающий повышение (или обеспечение повышенной) экспрессии по меньшей мере трех или более факторов транскрипции, где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из: FOXA1 или FOXA3; NR1I2 или NR1I3; HHEX; CREB3L3; GATA4; KLF9; ATF5; MLXIPL; FOXA2; AR; ARID3C; CEBPA; CUX2; EPAS1; HLF; HNF1A; HNF4A; HNF4G; KLF15; NCOA2; NR0B2; NR1H4; NR5A2; ONECUT1; ONECUT2; PPARA; PROX1; RORA; RORC; RXRA; SALL1; SMAD1; SREBF1; STAT3; TSHZ2; XBP1; ZBTB16 и их вариантов, в популяции непеченочных клеток и культивирование (или осуществление культивирования) указанной популяции клеток с получением печеночных клеток.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ получения печеночных клеток, включающий повышение экспрессии белка одного или более факторов транскрипции, выбранных из группы, состоящей из: AR, ARID3C, ATF5, CEBPA, CREB3L3, CUX2, EPAS1, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HLF, HNF1A, HNF4A, HNF4G, KLF15, KLF9, MLXIPL, NCOA2, NR0B2, NR1H4, NR1I2, NR1I3, NR5A2, ONECUT1, ONECUT2, PPARA, PROX1, RORA, RORC, RXRA, SALL1, SMAD1, SREBF1, STAT3, TSHZ2, XBP1, ZBTB16 и их вариантов, в популяции клеток и культивирование указанной популяции клеток с получением печеночных клеток.

Указанный способ может включать повышение экспрессии (в частности, экспрессии белка) достаточного числа факторов транскрипции (например, приведенных в **таблицах 1, 2, 3 и 4** и их вариантов и изоформ), способных вызывать дифференцировку популяции клеток в печеночные клетки, что, как следствие, обеспечивает дифференцировку популяции клеток в печеночные клетки. В контексте настоящего изобретения эти факторы также могут быть названы «факторами перепрограммирования». Как описано в настоящем документе, экспрессия экзогенного или эндогенного (в частности экзогенного) фактора транскрипции может быть повышена.

В одном из воплощений факторы транскрипции (например, по меньшей мере один или более, например, по меньшей мере три или более) выбраны из группы, состоящей из: AR, ARID3C, ATF5, CEBPA, CREB3L3, CUX2, EPAS1, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HLF, HNF1A, HNF4A, HNF4G, KLF15, KLF9, MLXIPL, NCOA2, NR0B2, NR1H4, NR1I2, NR1I3, NR5A2, ONECUT1, ONECUT2, PPARA, PROX1, RORA, RORC, RXRA, SALL1, SMAD1, SREBF1, STAT3, TSHZ2, XBP1, ZBTB16 и их вариантов, при этом экспрессия по меньшей мере одного из AR, ATF5, CEBPA, CREB3L3, EPAS1, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HLF, HNF1A, HNF4A, HNF4G, KLF15, KLF9, MLXIPL, NCOA2, NR1H4, NR1I2, NR1I3, NR5A2, ONECUT1, PPARA, PROX1, RORA, RORC, RXRA, SMAD1, SREBF1, STAT3, TSHZ2, XBP1, ZBTB16 и их вариантов повышена, в частности, экспрессия по меньшей мере одного из ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 и их вариантов повышена.

В одном из воплощений способ включает повышение экспрессии двух или более факторов транскрипции, в частности трех или более, четырех или более, пяти или более и шести или более, выбранных из группы, состоящей из: AR, ARID3C, ATF5, CEBPA,

CREB3L3, CUX2, EPAS1, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HLF, HNF1A, HNF4A, HNF4G, KLF15, KLF9, MLXIPL, NCOA2, NR0B2, NR1H4, NR1I2, NR1I3, NR5A2, ONECUT1, ONECUT2, PPARA, PROX1, RORA, RORC, RXRA, SALL1, SMAD1, SREBF1, STAT3, TSHZ2, XBP1, ZBTB16 и их вариантов.

В одном из воплощений факторы транскрипции (например, по меньшей мере один или более, например, по меньшей мере три или более) выбраны из группы, состоящей из: AR, ATF5, CEBPA, CREB3L3, EPAS1, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HLF, HNF1A, HNF4A, HNF4G, KLF15, KLF9, MLXIPL, NCOA2, NR1H4, NR1I2, NR1I3, NR5A2, ONECUT1, PPARA, PROX1, RORA, RORC, RXRA, SMAD1, SREBF1, STAT3, TSHZ2, XBP1, ZBTB16 и их вариантов.

В одном из воплощений способ включает повышение экспрессии двух или более факторов транскрипции, в частности трех или более, четырех или более, пяти или более, шести или более, выбранных из группы, состоящей из: AR, ATF5, CEBPA, CREB3L3, EPAS1, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HLF, HNF1A, HNF4A, HNF4G, KLF15, KLF9, MLXIPL, NCOA2, NR1H4, NR1I2, NR1I3, NR5A2, ONECUT1, PPARA, PROX1, RORA, RORC, RXRA, SMAD1, SREBF1, STAT3, TSHZ2, XBP1, ZBTB16 и их вариантов.

В одном из воплощений факторы транскрипции (например, по меньшей мере один или более, например, по меньшей мере три или более) выбраны из группы, состоящей из: ATF5, ARID3C, CREB3L3, CUX2, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR0B2, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, ONECUT2, RXRA, SALL1, SREBF1 и их вариантов.

В одном из воплощений способ включает повышение экспрессии двух или более факторов транскрипции, в частности трех или более, четырех или более, пяти или более и шести или более, выбранных из группы, состоящей из: ATF5, ARID3C, CREB3L3, CUX2, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR0B2, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, ONECUT2, RXRA, SALL1, SREBF1 и их вариантов.

В одном из воплощений факторы транскрипции (например, по меньшей мере один или более, например, по меньшей мере три или более) выбраны из группы, состоящей из: ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 и их вариантов.

В одном из воплощений способ включает повышение экспрессии двух или более факторов транскрипции, в частности трех или более, четырех или более, пяти или более и шести или более, выбранных из группы, состоящей из: ATF5, CREB3L3, FOXA1,

FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 и их вариантов.

В одном из воплощений факторы транскрипции (например, по меньшей мере один или более, например, по меньшей мере три или более) выбраны из группы, состоящей из: ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, RXRA, SREBF1 и их вариантов.

В одном из воплощений факторы транскрипции (например, по меньшей мере один или более, например, по меньшей мере три или более) выбраны из группы, состоящей из: ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3 и их вариантов.

В одном из воплощений фактор транскрипции включает FOXA1. FOXA1 можно применять в комбинации с одним или более, например, одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью, факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3** или **4**. В другом воплощении способ включает повышение экспрессии от двух до шести факторов транскрипции, выбранных из FOXA1 в комбинации с ATF5, CREB3L3, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений фактор транскрипции включает CREB3L3. CREB3L3 можно применять в комбинации с одним или более, например, одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью, факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3** или **4**. В другом воплощении способ включает повышение экспрессии от двух до шести факторов транскрипции, выбранных из CREB3L3 в комбинации с ATF5, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений способ включает повышение экспрессии FOXA1 и CREB3L3 в комбинации с одним, двумя, тремя или четырьмя (в частности одним или двумя) факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3** или **4**. В другом воплощении FOXA1 и CREB3L3 применяют в комбинации с одним или двумя факторами транскрипции, выбранными из перечня, состоящего из: ATF5, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 или их вариантов, в частности в комбинации с HHEX, HNF4G, KLF9, MLXIPL, RXRA, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений фактор транскрипции включает HHEX. HHEX можно применять в комбинации с одним или более, например, одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью, факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3** или **4**. В другом воплощении способ включает повышение экспрессии от двух до шести факторов транскрипции, выбранных из HHEX в комбинации с ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений способ включает повышение экспрессии FOXA1 и HHEX в комбинации с одним, двумя, тремя или четырьмя (в частности одним или двумя) факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3** или **4**. В другом воплощении FOXA1 и HHEX применяют в комбинации с одним или двумя факторами транскрипции, выбранными из перечня, состоящего из: ATF5, CREB3L3, FOXA2, FOXA3, GATA4, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 или их вариантов, в частности в комбинации с CREB3L3, HNF4G, KLF9, MLXIPL, RXRA, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений способ включает повышение экспрессии FOXA1, CREB3L3 и HHEX в комбинации с одним, двумя, тремя или четырьмя (в частности одним) факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3** или **4**. В другом воплощении FOXA1, CREB3L3 и HHEX применяют в комбинации с факторами транскрипции, выбранными из перечня, состоящего из: ATF5, FOXA2, FOXA3, GATA4, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 или их вариантов, в частности в комбинации с HNF4G, KLF9, MLXIPL, RXRA, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений фактор транскрипции включает NR1I2. NR1I2 можно применять в комбинации с одним или более, например, одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью, факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3** или **4**. В другом воплощении способ включает повышение экспрессии от двух до шести факторов транскрипции, выбранных из NR1I2 в комбинации с ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений фактор транскрипции включает FOXA3. FOXA3 можно применять в комбинации с одним или более, например, одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью, факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3**

или 4. В другом воплощении способ включает повышение экспрессии от двух до шести факторов транскрипции, выбранных из FOXA3 в комбинации с ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений фактор транскрипции включает NR1I3. NR1I3 можно применять в комбинации с одним или более, например, одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью, факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3** или 4. В другом воплощении способ включает повышение экспрессии от двух до шести факторов транскрипции, выбранных из NR1I3 в комбинации с ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR1I2, ONECUT1, RXRA, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений три или более факторов транскрипции выбраны из: FOXA1, FOXA2, FOXA3, CREB3L3, HHEX, NR1I2, NR1I3 или их вариантов.

В настоящем документе авторами настоящего изобретения было показано, что факторы FOXA (также известные как подсемейство факторов транскрипции HNF3) можно применять взаимозаменяемо. Таким образом, в одном из воплощений три или более факторов транскрипции выбраны из: FOXA1, FOXA2 или FOXA3 в комбинации с двумя или более факторами транскрипции, выбранными из группы, состоящей из: NR1I2; NR1I3; HHEX; CREB3L3; GATA4; KLF9; ATF5; MLXIPL; AR; ARID3C; CEBPA; CUX2; EPAS1; HLF; HNF1A; HNF4A; HNF4G; KLF15; NCOA2; NR0B2; NR1H4; NR5A2; ONECUT1; ONECUT2; PPARA; PROX1; RORA; RORC; RXRA; SALL1; SMAD1; SREBF1; STAT3; TSHZ2; XBP1; ZBTB16 и их вариантов. В другом воплощении три или более факторов транскрипции выбраны из: FOXA1, FOXA2 или FOXA3; CREB3L3; HHEX; NR1I2; NR1I3 или их вариантов.

Кроме того, факторы NR1I2 и NR1I3 (представители группы I подсемейства 1 семейства ядерных рецепторов) также можно применять взаимозаменяемо. Таким образом, в другом воплощении три или более факторов транскрипции выбраны из: NR1I2 или NR1I3 в комбинации с двумя или более факторами транскрипции, выбранными из группы, состоящей из: FOXA1; FOXA2; FOXA3; CREB3L3; HHEX; GATA4; KLF9; ATF5; MLXIPL; AR; ARID3C; CEBPA; CUX2; EPAS1; HLF; HNF1A; HNF4A; HNF4G; KLF15; NCOA2; NR0B2; NR1H4; NR5A2; ONECUT1; ONECUT2; PPARA; PROX1; RORA; RORC; RXRA; SALL1; SMAD1; SREBF1; STAT3; TSHZ2; XBP1; ZBTB16 и их вариантов. В другом воплощении три или более факторов

транскрипции выбраны из: NR1I2 или NR1I3; FOXA1; FOXA2; FOXA3; CREB3L3; HHEX или их вариантов.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ получения печеночных клеток, включающий повышение экспрессии по меньшей мере трех или более факторов транскрипции, где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из:

(a) FOXA1, FOXA2 или FOXA3;

(б) NR1I2 или NR1I3; и

(в) по меньшей мере одного или более чем одного дополнительного фактора транскрипции, выбранного из группы, состоящей из: HHEX; CREB3L3; GATA4; KLF9; ATF5; MLXIPL; FOXA2; AR; ARID3C; CEBPA; CUX2; EPAS1; HLF; HNF1A; HNF4A; HNF4G; KLF15; NCOA2; NR0B2; NR1H4; NR5A2; ONECUT1; ONECUT2; PPARA; PROX1; RORA; RORC; RXRA; SALL1; SMAD1; SREBF1; STAT3; TSHZ2; XBP1; ZBTB16 и их вариантов,

в популяции (непеченочных) клеток и культивирование указанной популяции клеток с получением печеночных клеток.

В одном из воплощений факторы транскрипции включают: (1) FOXA1, FOXA2 или FOXA3, (2) CREB3L3 и (3) NR1I2 или NR1I3. В другом воплощении факторы транскрипции включают FOXA1, CREB3L3 и NR1I2.

В одном из воплощений факторы транскрипции включают: (1) FOXA1, FOXA2 или FOXA3, (2) HHEX и (3) NR1I2 или NR1I3. В другом воплощении факторы транскрипции включают FOXA1, HHEX и NR1I2.

В одном из воплощений факторы транскрипции включают: (1) FOXA1, FOXA2 или FOXA3, (2) CREB3L3, (3) HHEX и (4) NR1I2 или NR1I3. В другом воплощении способ включает повышение экспрессии FOXA1, CREB3L3, NR1I2 и HHEX. Таким образом, в соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ получения печеночных клеток, включающий повышение экспрессии (1) FOXA1, FOXA2 или FOXA3, (2) CREB3L3, (3) HHEX и (4) NR1I2 или NR1I3 в популяции непеченочных клеток и культивирование указанной популяции клеток с получением печеночных клеток. В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ получения печеночных клеток, включающий повышение экспрессии FOXA1, CREB3L3, NR1I2 и HHEX в популяции непеченочных клеток и культивирование указанной популяции клеток с получением печеночных клеток.

В одном из воплощений фактор транскрипции включает GATA4. GATA4 можно применять в комбинации с одним или более, например, одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3** или **4**. В другом воплощении способ включает повышение экспрессии от двух до шести факторов транскрипции, выбранных из GATA4 в комбинации с ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIP, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений фактор транскрипции включает HNF4A. HNF4A можно применять в комбинации с одним или более, например, одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3** или **4**. В другом воплощении способ включает повышение экспрессии от двух до шести факторов транскрипции, выбранных из HNF4A в комбинации с ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4G, KLF9, MLXIP, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений фактор транскрипции включает ATF5. ATF5 можно применять в комбинации с одним или более, например, одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3** или **4**. В другом воплощении способ включает повышение экспрессии от двух до шести факторов транскрипции, выбранных из ATF5 в комбинации с CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIP, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений фактор транскрипции включает MLXIP. MLXIP можно применять в комбинации с одним или более, например, одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3** или **4**. В другом воплощении способ включает повышение экспрессии от двух до шести факторов транскрипции, выбранных из MLXIP в комбинации с ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений фактор транскрипции включает KLF9. KLF9 можно применять в комбинации с одним или более, например, одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3** или **4**. В другом воплощении способ включает повышение экспрессии от двух до шести факторов транскрипции, выбранных из KLF9 в комбинации с ATF5, CREB3L3, FOXA1,

FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений фактор транскрипции включает RXRA. RXRA можно применять в комбинации с одним или более, например, одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3** или **4**. В другом воплощении способ включает повышение экспрессии от двух до шести факторов транскрипции, выбранных из RXRA в комбинации с ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений фактор транскрипции включает FOXA2. FOXA2 можно применять в комбинации с одним или более, например, одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3** или **4**. В другом воплощении способ включает повышение экспрессии от двух до шести факторов транскрипции, выбранных из FOXA2 в комбинации с ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений фактор транскрипции включает SREBF1. SREBF1 можно применять в комбинации с одним или более, например, одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3** или **4**. В другом воплощении способ включает повышение экспрессии от двух до шести факторов транскрипции, выбранных из SREBF1 в комбинации с ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA или их вариантами.

В одном из воплощений фактор транскрипции включает ONECUT1. ONECUT1 можно применять в комбинации с одним или более, например, одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3** или **4**. В другом воплощении способ включает повышение экспрессии от двух до шести факторов транскрипции, выбранных из ONECUT1 в комбинации с ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, HNF4G, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, RXRA, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений фактор транскрипции включает HNF4G. HNF4G можно применять в комбинации с одним или более, например, одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью факторами транскрипции, выбранными из перечисленных в **таблицах 1, 2, 3**

или 4. В другом воплощении способ включает повышение экспрессии от двух до шести факторов транскрипции, выбранных из HNF4G в комбинации с ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, RXRA, SREBF1 или их вариантами.

В одном из воплощений способ включает повышение экспрессии двух или более факторов транскрипции, в частности трех или более, четырех или более, пяти или более и шести или более, выбранных из группы, состоящей из: ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, KLF9, MLXIPL, NR1I2, NR1I3, RXRA, SREBF1 и их вариантов.

В одном из воплощений факторы транскрипции выбраны из группы, состоящей из AR, ARID3C, CUX2, EPAS1, FOXA3, HNF4G, KLF15, KLF9, MLXIPL, NCOA2, ONECUT2, PPARA, RORA, RORC, RXRA, SALL1, SMAD1, SREBF1, STAT3, TSHZ2, XBP1, ZBTB16 и их вариантов. В другом воплощении факторы транскрипции выбраны из группы, состоящей из: AR, ARID3C, CUX2, EPAS1, HNF4G, KLF15, KLF9, MLXIPL, NCOA2, ONECUT2, PPARA, RORA, RORC, RXRA, SALL1, SMAD1, SREBF1, STAT3, TSHZ2, XBP1, ZBTB16 и их вариантов. В еще одном воплощении факторы транскрипции выбраны из группы, состоящей из: AR, ARID3C, CUX2, EPAS1, HNF4G, KLF15, KLF9, MLXIPL, NCOA2, RORA, RORC, RXRA, SALL1, SMAD1, SREBF1, STAT3, TSHZ2, XBP1, ZBTB16 и их вариантов.

В одном из воплощений факторы транскрипции выбраны из группы, состоящей из: AR, EPAS1, FOXA3, HNF4G, KLF15, KLF9, MLXIPL, NCOA2, PPARA, RORA, RORC, RXRA, SMAD1, SREBF1, STAT3, TSHZ2, XBP1, ZBTB16 и их вариантов. В другом воплощении факторы транскрипции выбраны из группы, состоящей из: AR, EPAS1, HNF4G, KLF15, KLF9, MLXIPL, NCOA2, PPARA, RORA, RORC, RXRA, SMAD1, SREBF1, STAT3, TSHZ2, XBP1, ZBTB16 и их вариантов. В еще одном воплощении факторы транскрипции выбраны из группы, состоящей из: AR, EPAS1, HNF4G, KLF15, KLF9, MLXIPL, NCOA2, RORA, RORC, RXRA, SMAD1, SREBF1, STAT3, TSHZ2, XBP1, ZBTB16 и их вариантов.

В одном из воплощений факторы транскрипции выбраны из группы, состоящей из: FOXA3, HNF4G, KLF9, MLXIPL, RXRA, SREBF1 и их вариантов. В другом воплощении факторы транскрипции выбраны из группы, состоящей из: HNF4G, KLF9, MLXIPL, RXRA, SREBF1 и их вариантов.

В одном из воплощений повышена экспрессия по меньшей мере одного из ARID3C, CUX2, HNF4G, KLF9, MLXIPL, RXRA, SALL1 или SREBF1, предпочтительно в комбинации с одним или более факторами транскрипции, выбранными из группы, состоящей из: ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, NR0B2, NR1I2, NR1I3, ONECUT1, ONECUT2 и их вариантов.

В одном из воплощений повышена экспрессия по меньшей мере одного из HNF4G, KLF9, MLXIPL, RXRA или SREBF1, предпочтительно в комбинации с одним или более факторами транскрипции, выбранными из группы, состоящей из: ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, NR1I2, NR1I3, ONECUT1 и их вариантов.

В одном из воплощений повышена экспрессия по меньшей мере одного из KLF9, MLXIPL, RXRA или SREBF1, предпочтительно в комбинации с одним или более факторами транскрипции, выбранными из группы, состоящей из: ATF5, CREB3L3, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HNF4A, NR1I2, NR1I3 и их вариантов.

Данные, представленные в настоящем документе (см., например, **таблицы 5 и 6** на **фигуре 12**), показывают, что в клетках, перепрограммированных как взрослые гепатоциты, присутствовали множественные комбинации, содержащие по меньшей мере три или четыре из приведенных в **таблицах 1, 2, 3 и 4** факторов транскрипции. Таким образом, в одном из воплощений факторы транскрипции, применяемые в способах согласно настоящему изобретению, включают одну из комбинаций, приведенных в **таблицах 5 и 6**.

Способы согласно настоящему изобретению охватывают применение вариантов целевых факторов транскрипции (то есть описанных в **таблицах 1, 2, 3 и 4**). Ссылки на факторы транскрипции также охватывают варианты видов, гомологи, аллельные формы, мутантные формы и их эквиваленты, включая присутствующие в них консервативные замены, добавления и делеции, не оказывающие неблагоприятного влияния на структуру или функцию. Изменения в нуклеотидной последовательности гена фактора транскрипции могут приводить к консервативным изменениям или заменам в аминокислотной последовательности. Таким образом, настоящее изобретение включает полипептиды, имеющие консервативные изменения или замены. Настоящее изобретение включает последовательности, в которых сделаны консервативные замены, не изменяющие активность целевого белка-фактора транскрипции.

Таблица 1. Факторы транскрипции для получения печеночных клеток вместе с номерами доступа (по данным на 11 марта 2020 г.)

Название гена фактора транскрипции	Идентификационный номер гена в базе данных Ensembl
AR	ENSG00000169083
ARID3C	ENSG00000205143
ATF5	ENSG00000169136
CEBPA	ENSG00000245848
CREB3L3	ENSG00000060566
CUX2	ENSG00000111249
EPAS1	ENSG00000116016
FOXA1	ENSG00000129514
FOXA2	ENSG00000125798
FOXA3	ENSG00000170608
GATA4	ENSG00000136574
HHEX	ENSG00000152804
HLF	ENSG00000108924
HNF1A	ENSG00000135100
HNF4A	ENSG00000101076
HNF4G	ENSG00000164749
KLF15	ENSG00000163884
KLF9	ENSG00000119138
MLXIPL	ENSG00000009950
NCOA2	ENSG00000140396
NR0B2	ENSG00000131910
NR1H4	ENSG00000012504
NR1I2	ENSG00000144852
NR1I3	ENSG00000143257
NR5A2	ENSG00000116833
ONECUT1	ENSG00000169856
ONECUT2	ENSG00000119547
PPARA	ENSG00000186951

PROX1	ENSG00000117707
RORA	ENSG00000069667
RORC	ENSG00000143365
RXRA	ENSG00000186350
SALL1	ENSG00000103449
SMAD1	ENSG00000170365
SREBF1	ENSG00000072310
STAT3	ENSG00000168610
TSHZ2	ENSG00000182463
XBP1	ENSG00000100219
ZBTB16	ENSG00000109906

Факторы транскрипции, описанные в **таблице 1**, как показано в примерах, представленных в настоящем документе, индуцируют дифференцировку исходных клеток в печеночные клетки. Можно применять различные комбинации факторов транскрипции. Например, в способах согласно настоящему изобретению можно применять один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более генов, приведенных в **таблице 1** (и их изоформ или вариантов). В другом воплощении применяемые факторы транскрипции могут быть выбраны из приведенных в **таблицах 2, 3** или **4** (и их изоформ или вариантов). Многие из этих генов имеют различные изоформы, которые могут обладать сходными функциями и, соответственно, рассматриваются для применения в настоящем изобретении.

В одном из воплощений способ включает повышение экспрессии двух или более факторов транскрипции, в частности трех, четырех, пяти или шести или более факторов транскрипции. Предпочтительно способ включает повышение экспрессии трех или более факторов транскрипции. Более предпочтительно способ включает повышение экспрессии четырех или более факторов транскрипции.

В одном из воплощений способ включает повышение экспрессии от трех до восьми факторов транскрипции, например, от четырех до семи факторов транскрипции, в частности четырех или пяти факторов транскрипции. В одном из воплощений способ включает повышение экспрессии от двух до восьми факторов транскрипции, в частности от трех до шести или от трех до пяти факторов транскрипции. В одном из воплощений способ включает повышение экспрессии двух факторов транскрипции, трех факторов

транскрипции, четырех факторов транскрипции, пяти факторов транскрипции или шести факторов транскрипции.

Способ может включать введение в исходную клетку препарата нуклеиновой кислоты или белка, который кодирует или обеспечивает комбинацию факторов транскрипции, описанных в настоящем документе, и культивирование клетки в условиях, подходящих для перепрограммирования клетки в печеночную клетку.

В соответствии с одним из аспектов предложен способ получения печеночных клеток из исходных клеток, включающий индукцию повышенной экспрессии гена, кодирующего один или более факторов транскрипции, описанных в настоящем документе (например, приведенных в **таблице 1**), где исходные клетки дифференцируются с образованием печеночных клеток.

В одном из воплощений ген индуцируют для экспрессии гена на уровнях, превышающих эндогенные для исходной клетки уровни экспрессии.

В одном из воплощений способ включает получение печеночных клеток путем клеточного перепрограммирования плюрипотентных стволовых клеток (в частности, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложено применение одного или более факторов транскрипции, выбранных из группы, состоящей из: AR, ARID3C, ATF5, CEBPA, CREB3L3, CUX2, EPAS1, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HLF, HNF1A, HNF4A, HNF4G, KLF15, KLF9, MLXIPL, NCOA2, NR0B2, NR1H4, NR1I2, NR1I3, NR5A2, ONECUT1, ONECUT2, PPARA, PROX1, RORA, RORC, RXRA, SALL1, SMAD1, SREBF1, STAT3, TSHZ2, XBP1, ZBTB16 и их вариантов, для получения печеночных клеток. В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложено применение по меньшей мере трех или более факторов транскрипции, где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из: FOXA1 или FOXA3; NR1I2 или NR1I3; HHEX; CREB3L3; GATA4; KLF9; ATF5; MLXIPL; FOXA2; AR; ARID3C; CEBPA; CUX2; EPAS1; HLF; HNF1A; HNF4A; HNF4G; KLF15; NCOA2; NR0B2; NR1H4; NR5A2; ONECUT1; ONECUT2; PPARA; PROX1; RORA; RORC; RXRA; SALL1; SMAD1; SREBF1; STAT3; TSHZ2; XBP1; ZBTB16 и их вариантов, для получения печеночных клеток. Эти аспекты настоящего изобретения можно применять с любой из комбинаций факторов транскрипции, описанных в настоящем документе.

Типы клеток

Способ согласно настоящему изобретению можно применять на любом типе клеток, включая стволовые клетки. В случае стволовых клеток получение печеночных клеток с применением этого способа может быть названо «клеточным перепрограммированием», «прямым перепрограммированием», «направленным программированием» или «направленной дифференцировкой», то есть плюрипотентная стволовая клетка дифференцируется в печеночную клетку. Кроме того, клеточное перепрограммирование в печеночные клетки может быть использовано в качестве общей терминологии, относящейся к применению факторов транскрипции для дифференцировки исходной клетки в печеночные клетки.

Источники клеток, подходящие для способов согласно настоящему изобретению, могут включать, например, любые стволовые клетки или непеченочные клетки. Например, стволовые клетки могут представлять собой плюрипотентные стволовые клетки, например, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки или плюрипотентные стволовые клетки, полученные путем переноса ядра или слияния клеток. Может быть предпочтительно, чтобы эмбриональная стволовая клетка была получена без разрушения эмбриона, в частности в случае, когда клетки представляют собой клетки человека. В некоторых воплощениях стволовые клетки не получают из эмбрионов человека или животных, то есть настоящее изобретение не распространяется на какие-либо способы, которые включают разрушение эмбрионов человека или животных. Стволовые клетки также могут включать мультипотентные стволовые клетки, олигопотентные стволовые клетки или унипотентные стволовые клетки. Стволовые клетки также могут включать фетальные стволовые клетки или взрослые стволовые клетки, такие как гемопоэтические стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, нейрональные стволовые клетки, эпителиальные стволовые клетки, стволовые клетки кожи. В некоторых аспектах стволовые клетки могут быть выделены из пуповины, плаценты, амниотической жидкости, ворсинок хориона, бластоцист, костного мозга, жировой ткани, головного мозга, периферической крови, пуповинной крови, менструальной крови, кровеносных сосудов, скелетных мышц, кожи и печени.

В одном из воплощений популяция клеток имеет человеческое происхождение. Исходная клетка, например, непеченочная клетка, может иметь человеческое происхождение.

В одном из воплощений популяция клеток содержит стволовые клетки, например, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), эмбриональные стволовые клетки (ECS), гемопоэтические стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки или нейрональные стволовые клетки. В другом воплощении популяция клеток содержит плюрипотентные стволовые клетки, например, iPSC или ECS.

В одном из воплощений исходная клетка представляет собой стволовую клетку, например, iPSC, ECS, гемопоэтическую стволовую клетку, мезенхимальную стволовую клетку или нейрональную стволовую клетку. В другом воплощении исходная клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку, например, iPSC или ECS. В некоторых воплощениях исходная клетка представляет собой iPSC.

Способы получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши также известны в данной области техники. Для индукции iPSC обычно требуются экспрессия или воздействие по меньшей мере одного представителя семейства Sox и по меньшей мере одного представителя семейства Oct. Полагают, что Sox и Oct занимают центральное положение в иерархии регуляции транскрипции, которая определяет идентичность эмбриональных стволовых клеток. Например, Sox может представлять собой Sox-1, Sox-2, Sox-3, Sox-15 или Sox-18; Oct может представлять собой Oct-4. Дополнительные факторы, такие как Nanog, Lin28, Klf4 или c-Мус, могут повышать эффективность перепрограммирования; конкретные наборы факторов перепрограммирования могут представлять собой набор, содержащий Sox-2, Oct-4, Nanog и, необязательно, Lin-28; или содержащий Sox-2, Oct4, Klf и, необязательно, c-Мус. В одном из способов iPSC могут быть получены путем трансфекции клеток факторами транскрипции Oct4, Sox2, c-Мус и Klf4 с применением вирусной трансдукции.

В одном из воплощений печеночные клетки представляют собой печеночные клетки человека.

В одном из воплощений индуцированные плюрипотентные стволовые клетки получают из соматических или половых клеток пациента. Такое применение аутологичных клеток должно устранить необходимость подбора клеток по совместимости с реципиентом. В качестве альтернативы, можно применять коммерчески доступные iPSC, такие как доступные от компании WICELL (WiCell Research Institute, Inc, Висконсин, США). В качестве альтернативы, клетки могут представлять собой

тканеспецифичные стволовые клетки, которые также могут быть аутологичными или взятыми от донора.

Доставка факторов транскрипции

Следует понимать, что способы повышения экспрессии факторов транскрипции в клетках, подлежащих программированию в печеночные клетки, могут включать любой способ, известный в данной области техники, например, индукцию экспрессии одной или более чем одной предварительно введенной в клетки кассеты экспрессии или введение в клетки нуклеиновых кислот (таких как ДНК или РНК), полипептидов или низкомолекулярных соединений. Повышение экспрессии некоторых эндогенных, но транскрипционно репрессированных генов также может устранять эффект выключения или ингибирования экспрессии этих генов путем регуляции экспрессии вышележащего фактора транскрипции или эпигенетической модуляции. Таким образом, способы согласно настоящему изобретению могут включать культивирование популяции клеток в условиях, обеспечивающих искусственное повышение уровня экспрессии одного или более факторов транскрипции, описанных в настоящем документе.

В одном из воплощений экспрессию факторов транскрипции повышают путем приведения популяции клеток в контакт с факторами транскрипции (то есть белками, кодирующими факторы транскрипции). Доставку факторов транскрипции можно осуществлять с использованием прямой электропорации белков факторов транскрипции в клетки.

В альтернативном воплощении экспрессию факторов транскрипции повышают путем приведения популяции клеток в контакт с одним или более агентами, которые активируют или повышают экспрессию или количество факторов транскрипции.

В одном из воплощений агент выбран из группы, состоящей из: нуклеиновой кислоты (то есть полинуклеотида, например, матричной РНК (мРНК), кодирующей последовательности ДНК), белка, аптамера и низкомолекулярного соединения, рибосомы, агента РНК-интерференции (РНКi), направляющей РНК (gРНК) и пептидо-нуклеиновой кислоты (PNA) и их аналогов или вариантов. В одном из воплощений агент представляет собой систему активации транскрипции (например, gРНК для применения в системе активации генов, такой как CRISPR(*clustered regularly interspaced short palindromic repeats* — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами)/Cas9 или TALEN (*transcription activator-like effector nucleases* – эффекторные

нуклеазы, подобные активаторам транскрипции)) для повышения экспрессии одного или более эндогенных факторов транскрипции.

Способ индукции дифференцировки популяции клеток (то есть исходных клеток) может включать доставку в клетки нуклеиновой кислоты, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую один или более факторов транскрипции (например, в кассете экспрессии), белка-фактора транскрипции или активатора транскрипции открытой рамки считывания, кодирующей фактор транскрипции. Это приводит к повышению количества фактора транскрипции в клетках, и клетки дифференцируются с образованием печеночных клеток. Указанная открытая рамка считывания может являться частью рекомбинантной кассеты экспрессии.

В одном из воплощений нуклеиновая кислота содержит рекомбинантную или экзогенную кассету экспрессии, содержащую одну или более последовательностей (или один или более генов) факторов транскрипции в количестве, которое достаточно для того, чтобы вызывать клеточное перепрограммирование исходных клеток в печеночные клетки. Экзогенная кассета экспрессии может содержать индуцируемый воздействием внешних факторов элемент регуляции транскрипции для индуцируемой экспрессии одного или более факторов транскрипции, такой как индуцируемый промотор, например, содержащий элемент ответа на тетрациклин или его вариант.

Если экспрессию факторов транскрипции повышают путем введения экзогенной последовательности, кодирующей фактор транскрипции (например, гена фактора транскрипции), то следует понимать, что можно применять любую подходящую систему для доставки последовательности. Система доставки генов может представлять собой систему на основе транспозонов; систему доставки генов на основе вируса; эписомальную систему доставки генов; или систему гомологичной рекомбинации, такую как использование нуклеазы с «цинковыми пальцами», нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN), или мегануклеазы, или CRISPR/Cas9, и т.п.

В качестве альтернативы, для введения нуклеиновой кислоты, такой как ДНК или РНК, в клетки можно применять любые подходящие способы доставки нуклеиновой кислоты для трансформации клетки, описанные в настоящем документе или известные специалисту в данной области техники. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, прямую доставку ДНК, такую как доставка путем трансфекции *ex vivo*, инъекции (включая микроинъекцию), электропорации, осаждения фосфатом кальция,

использования DEAE-декстрана с последующим добавлением полиэтиленгликоля, прямой обработки ультразвуком, опосредованной липосомами трансфекции, опосредованной рецептором трансфекции, баллистической трансфекции, перемешивания с волокнами карбида кремния, трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, и любой комбинации таких способов. Клетки могут быть стабильно или временно трансформированы с применением этих методик.

Кроме того, кассета экспрессии (например, индуцируемая рекомбинантная кассета экспрессии) может содержать расщепляемые последовательности. Такие последовательности представляют собой последовательности, которые распознаются агентом, способным к специфичному разрезанию ДНК, и содержат сайты рестрикции, представляющие собой последовательности-мишени для рестриктаз или последовательности для распознавания другими расщепляющими ДНК агентами, такими как нуклеазы, рекомбиназы, рибозимы или искусственные конструкции. Может быть включена по меньшей мере одна расщепляемая последовательность, но предпочтительно присутствуют две или более. Эти расщепляемые последовательности могут находиться в любом подходящем сайте кассеты таким образом, что при необходимости выбранный участок кассеты или целая кассета могут быть избирательно удалены. Таким образом, расщепляемые сайты могут фланкировать всю генетическую последовательность/ее часть, которую может быть желательно удалить. Соответственно, способ также может включать удаление кассеты экспрессии и/или генетического материала.

Векторы

В одном из воплощений факторы транскрипции (например, комбинации факторов транскрипции) вводят в популяцию клеток с применением вектора. Специалист в данной области техники должен быть хорошо подготовлен для конструирования вектора с помощью стандартных рекомбинантных методик. Векторы включают, но не ограничиваются ими, плазмиды, космиды, вирусы (бактериофаги, вирусы животных и вирусы растений) и искусственные хромосомы (например, YAC).

В одном из воплощений вектор представляет собой вирусный вектор. Система доставки генов на основе вируса может представлять собой вирусный вектор на основе РНК или ДНК. Вирусные векторы включают ретровирусные векторы, лентивирусные векторы (например, полученные из HIV-1, HIV-2, SIV, BIV, FIV и т.д.), гамма-ретровирусные векторы, аденовирусные (Ad) векторы (включая их компетентные по

репликации, дефектные по репликации и подвергнутые удалению вирусного генома формы), векторы, полученные из аденоассоциированных вирусов (AAV), векторы на основе вируса обезьян 40 (SV-40), векторы на основе вируса папилломы крупного рогатого скота, векторы на основе вируса Эпштейна-Барр, векторы на основе вируса герпеса, векторы на основе вируса коровьей оспы, векторы на основе вируса саркомы мышей Харви, векторы на основе вируса опухоли молочной железы мышей, векторы на основе вируса саркомы Рауса и векторы на основе вируса Сендай. В другом воплощении вирусный вектор выбран из: лентивирусного вектора, вектора на основе аденоассоциированного вируса или вектора на основе вируса Сендай. В еще одном воплощении вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

Лентивирусные векторы хорошо известны в данной области техники. Лентивирусные векторы представляют собой сложные ретровирусы, способные случайным образом интегрироваться в геном клетки-хозяина и содержащие, помимо обычных ретровирусных генов *gag*, *pol* и *env*, другие гены с регуляторной или структурной функцией (например, вспомогательные гены *Vif*, *Nef*, *Vpu*, *Vpr*). Лентивирусные векторы обладают преимуществом, заключающимся в способности инфицировать неделящиеся клетки, и их можно применять для переноса генов и экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот как *in vivo*, так и *ex vivo*. Например, рекомбинантный лентивирусный вектор способен инфицировать неделящуюся клетку, при этом подходящая клетка-хозяин трансфицирована двумя или более векторами, несущими функции упаковки, а именно *gag*, *pol* и *env*, а также *rev* и *tat*.

В одном из воплощений вирусный вектор применяют при высокой множественности заражения (MOI). Высокая MOI способствует обеспечению введения более чем одного фактора транскрипции в исходную клетку. В одном из воплощений MOI составляет более 0,5, например, 1,0 или выше.

В одном из воплощений нуклеотидную последовательность, кодирующую один или более факторов транскрипции, вводят в клетку с помощью плазмиды. В одном из воплощений по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую факторы транскрипции, вводят в клетку в составе одной плазмиды.

В одном из воплощений плазида является эписомальной. Эписомальные векторы способны вводить большие фрагменты ДНК в клетку, но они сохраняются во внехромосомном состоянии, реплицируются один раз за каждый клеточный цикл, эффективно распределяются между дочерними клетками и по существу не вызывают

иммунного ответа. В альтернативных воплощениях можно применять эписомальный вектор на основе вируса Эпштейна-Барр (EBV), вектор на основе дрожжей, вектор на основе аденовируса, эписомальный вектор на основе вируса обезьян 40 (SV40) или вектор на основе вируса папилломы крупного рогатого скота (BPV).

Сайт-специфическая доставка

Для встраивания последовательности нуклеиновой кислоты в конкретную последовательность можно применять любую подходящую методику, и некоторые из них описаны в данной области техники. Подходящие методики включают любой способ, который обеспечивает введение разрыва в желаемое положение и возможность рекомбинации вектора в место разрыва. Таким образом, первая ключевая стадия для направленной сайт-специфической модификации генома представляет собой создание двухцепочечного разрыва ДНК (DSB) в геномном локусе, подлежащем модификации. Для репарации DSB и введения желаемой последовательности можно использовать определенные механизмы клеточной репарации, представляющие собой репарацию путем негомولوجичного соединения концов (NHEJ), которая более подвержена появлению ошибок; и репарацию путем гомологичной рекомбинации (HR), опосредованную донорной ДНК-матрицей, которую можно использовать для встраивания индуцируемых кассет.

Существуют несколько методик, обеспечивающих регулируемое сайт-специфическое образование DSB. Многие из них включают применение специализированных эндонуклеаз, таких как нуклеазы с «цинковыми пальцами», TALEN или система коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами/CRISPR-ассоциированного белка (CRISPR/Cas9).

Нуклеазы с «цинковыми пальцами» представляют собой искусственные ферменты, которые получают путем слияния ДНК-связывающего домена типа «цинковые пальцы» с нуклеазным доменом рестриктазы FokI. Последняя содержит домен неспецифического расщепления, который должен димеризоваться для расщепления ДНК. Это означает, что для димеризации доменов FokI и для расщепления ДНК необходимы два мономера нуклеазы с «цинковыми пальцами». ДНК-связывающий домен может быть сконструирован для нацеливания на любую интересующую геномную последовательность, и он представляет собой tandemный повтор «цинковых пальцев» Cys2His2, каждый из которых распознает три последовательно расположенных нуклеотида в последовательности-мишени. Два сайта связывания разделены

последовательностью из 5-7 п.н. для обеспечения оптимальной димеризации доменов FokI. Таким образом, фермент способен расщеплять ДНК в конкретном сайте, и специфичность в отношении мишени повышается за счет того, что для получения двухцепочечного разрыва два события связывания ДНК должны произойти вблизи друг от друга.

Нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции, или TALEN, представляют собой димерные факторы транскрипции/нуклеазы. Их получают путем слияния ДНК-связывающего домена эффектора TAL с доменом расщепления ДНК (нуклеазой). Эффекторы, подобные активаторам транскрипции (TALE), могут быть сконструированы для связывания практически любой желаемой последовательности ДНК, так что при сочетании их с нуклеазой ДНК может быть разрезана в конкретных положениях. Эффекторы TAL представляют собой белки, секретируемые бактериями *Xanthomonas*, ДНК-связывающий домен которых содержит повторяющуюся высококонсервативную последовательность из 33–34 аминокислот с дивергирующими аминокислотами 12 и 13. Эти две позиции являются высоковариабельными и демонстрируют сильную корреляцию со специфическим распознаванием нуклеотидов. Эта прямая взаимосвязь между аминокислотной последовательностью и распознаванием ДНК позволила сконструировать специфические ДНК-связывающие домены путем отбора комбинации повторяющихся сегментов, содержащих подходящие остатки в двух вариабельных положениях. Таким образом, TALEN построены из совокупностей модулей из 33-35 аминокислот, каждый из которых нацелен на один нуклеотид. За счет выбора совокупности модулей можно обеспечивать нацеливание на практически любую последовательность. Используемая нуклеаза и в этом случае может представлять собой FokI или ее производное.

Были идентифицированы три типа механизмов CRISPR, среди которых наиболее изучен тип II. Система CRISPR/Cas9 (типа II) использует нуклеазу Cas9 для создания двухцепочечного разрыва ДНК в сайте, определяемом короткой направляющей РНК. Система CRISPR/Cas представляет собой иммунную систему прокариот, обеспечивающую устойчивость к чужеродным генетическим элементам. CRISPR представляет собой сегменты прокариотической ДНК, содержащие короткие повторы последовательностей оснований. За каждым повтором следуют короткие сегменты «протоспейсерной ДНК» от предыдущих воздействий чужеродных генетических элементов. Спейсеры CRISPR распознают и разрезают экзогенные генетические

элементы с участием РНК-интерференции. Иммунный ответ CRISPR происходит в две стадии: биогенеза CRISPR-РНК (сгРНК) и интерференции, направляемой сгРНК. Молекулы сгРНК состоят из варибельной последовательности, транскрибируемой с протоспейсерной ДНК и повтора CRISPR. Затем каждая молекула сгРНК гибридизуется со второй РНК, известной как транскрибирующая CRISPR-РНК (tracгРНК), и вместе эти две РНК в конечном итоге образуют комплекс с нуклеазой Cas9. Участок сгРНК, кодируемый протоспейсерной ДНК, нацеливает Cas9 на расщепление комплементарных последовательностей ДНК-мишеней, если они примыкают к коротким последовательностям, известным как мотивы, смежные с протоспейсерами (PAM). Эта система природного происхождения была сконструирована и использована, наряду со многими другими применениями, для введения разрывов DSB в конкретные сайты геномной ДНК. В частности, можно использовать систему CRISPR типа II из *Streptococcus pyogenes*. В наиболее простом случае система CRISPR/Cas9 содержит два компонента, доставляемые в клетку для редактирования генома: собственно нуклеазу Cas9 и гРНК. гРНК представляет собой продукт слияния специализированной сайт-специфической сгРНК (нацеленной на последовательность-мишень) и стандартизированной tracгРНК.

После создания DSB обеспечивают донорную матрицу, гомологичную локусу-мишени; DSB может быть репарирован путем репарации, направляемой гомологией (HDR), что позволяет создавать точные вставки.

Также возможно существование производных этой системы. Доступны мутантные формы Cas9, такие как Cas9D10A, обладающие только нуклеазной активностью. Это означает, что они расщепляют только одну цепь ДНК и не активируют NHEJ. Вместо этого, при наличии матрицы для гомологичной репарации, процессы репарации ДНК направляются только по высокоточному пути HDR. Cas9D10A можно применять в парных комплексах с Cas9, предназначенных для создания смежных одноцепочечных разрывов ДНК в сочетании с двумя едиными направляющими РНК (sgРНК), комплементарными примыкающей области на противоположных цепях сайта-мишени, что может быть особенно предпочтительно.

Элементы для создания двухцепочечного разрыва ДНК могут быть введены в один или более векторов, таких как плазмиды, для экспрессии в клетке.

Таким образом, в способе согласно настоящему изобретению можно применять любой способ создания специфических нацеленных двухцепочечных разрывов в геноме

для выполнения встраивания гена/индуцируемой кассеты. Может быть предпочтительно, чтобы в способе встраивания гена/индуцируемой кассеты были применены любые одна или более из нуклеаз с «цинковыми пальцами», TALEN и/или систем CRISPR/Cas9 или любых их производных.

После создания DSB любым подходящим способом ген/индуцируемая кассета для встраивания могут быть обеспечены любым подходящим образом, как описано ниже. Ген/индуцируемая кассета и ассоциированный с ними генетический материал составляют донорную ДНК для репарации ДНК в сайтах DSB, и их встраивают с использованием стандартных механизмов/путей клеточной репарации. В зависимости от способа инициации разрыва будет меняться путь, участвующий в репарации повреждения, как указано выше.

Регулируемая экспрессия

В одном из воплощений экспрессия факторов транскрипции находится под контролем транскрипции. В этом аспекте настоящего изобретения транскрипцию и трансляцию (экспрессию) факторов транскрипции можно регулировать внутри клетки. Это обеспечивает гиперэкспрессию фактора(ов) транскрипции при необходимости.

Экзогенная кассета экспрессии, несущая факторы транскрипции, может содержать индуцируемый воздействием внешних факторов элемент регуляции транскрипции (то есть индуцируемый промотор) для индуцируемой экспрессии факторов транскрипции. Указанная индуцируемая кассета экспрессии может подлежать регуляции путем добавления экзогенного вещества. Независимо от условий культивирования экзогенное вещество будет регулировать экспрессию генетической последовательности, содержащейся в индуцируемой кассете экспрессии; и это вещество, в зависимости от способа его действия, можно либо добавлять непрерывно с последующим удалением для индукции транскрипции, либо добавлять по мере потребности в транскрипции.

Экспрессия факторов транскрипции, описанных в настоящем документе, может быть повышена путем применения двойной кассетной системы экспрессии, описанной в публикации WO2018096343, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Эта система нацелена на генетически безопасные сайты-гавани (genetic safe harbour, GSH), что обеспечивает снижение риска эпигенетического выключения экспрессии встроенного генетического материала.

В соответствии с этим, в одном из воплощений последовательность, кодирующую один или более (например, три или более) факторов транскрипции, вводят в популяцию клеток с применением способа, включающего:

- направленное встраивание гена, кодирующего белок-регулятор транскрипции, в первый генетически безопасный сайт-гавань клетки; и
- направленное встраивание индуцируемой кассеты во второй генетически безопасный сайт-гавань клетки, при этом указанная индуцируемая кассета содержит указанную последовательность фактора транскрипции, функционально связанную с индуцируемым промотором, и указанный промотор регулируется белком-регулятором транскрипции.

Это воплощение настоящего изобретения обеспечивает двойную кассетную систему экспрессии. Встраивание гена, кодирующего белок-регулятор транскрипции, в первый GSH-сайт обеспечивает механизм регуляции экспрессии индуцируемой кассеты, которая функционально связана с индуцируемым промотором и встроена во второй GSH-сайт. В одном из воплощений первый и второй GSH-сайты различны.

GSH-сайт представляет собой локус в геноме, в который может быть встроен ген или другой генетический материал без каких-либо вредных эффектов в отношении клетки или встроеного генетического материала. Наиболее предпочтительным является GSH-сайт, в котором экспрессия встроеной последовательности гена не нарушается никакой сквозной экспрессией соседних генов, а влияние экспрессии индуцируемой кассеты на эндогенную программу транскрипции минимально. Были предложены более формальные критерии, помогающие определить, будет ли конкретный локус являться GSH-сайтом (Papapetrou *et al.*, (2011)). Эти критерии включают сайт, который (1) находится на расстоянии 50 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов) или более от 5'-конца любого гена, (2) находится на расстоянии 300 т.п.н. или более от любого гена, связанного с раком, (3) находится на расстоянии 300 т.п.н. или более от любой микроРНК (миРНК), (4) расположен вне единицы транскрипции и (5) расположен вне ультраконсервативных областей (UCR). Возможно, что отсутствует необходимость удовлетворять всем этим предложенным критериям, поскольку уже идентифицированные GSH-сайты не соответствуют всем критериям. Полагают, что подходящий GSH-сайт будет удовлетворять по меньшей мере 2, 3, 4 или всем из этих критериев. В способе согласно настоящему изобретению можно применять любой подходящий GSH-сайт исходя из того, что сайт позволяет встраивать генетический материал без вредного влияния на

клетку и обеспечивает транскрипцию встроенного генетического материала. Специалисты в данной области техники могут пользоваться этими упрощенными критериями для идентификации подходящего GSH-сайта и/или более формальными критериями, изложенными выше.

В одном из воплощений первый и второй генетически безопасные сайты-гавани (GSH) выбраны из (в частности, любых двух) локуса hROSA26, локуса AAVS1, гена *CLYBL*, гена *CCR5* или гена *HPRT*. Вставки в конкретные генетически безопасные сайты-гавани предпочтительны по сравнению со случайной интеграцией в геном, поскольку ожидается, что это будет более безопасной модификацией генома и с меньшей вероятностью приведет к нежелательным побочным эффектам, таким как выключение естественной экспрессии генов или вызывание мутаций, приводящих к раковым типам клеток.

Локус сайта интеграции 1 аденоассоциированного вируса (AAVS1) расположен в гене регуляторной субъединицы 12С протеинфосфатазы 1 (PPP1R12C) на хромосоме 19 человека, и он равномерно и повсеместно экспрессируется в тканях человека. Было показано, что AAVS1 является благоприятным окружением для транскрипции, поскольку он содержит открытую структуру хроматина и природные хромосомные инсуляторы, которые обеспечивают устойчивость индуцируемых кассет к выключению экспрессии. Неблагоприятное влияние на клетку в результате нарушения гена PPP1R12C не известно. Более того, индуцируемая кассета, встроенная в этот сайт, остается транскрипционно активной во многих различных типах клеток.

Сайт hROSA26 был идентифицирован на основе аналогии последовательностей с GSH-сайтом мышей (ROSA26 представляет собой обратно ориентированный акцепторный сайт сплайсинга № 26). Локус hROSA26 расположен на хромосоме 3 (3p25.3) и может быть найден в базе данных Ensembl (GenBank:CR624523). Сайт интеграции находится в пределах открытой рамки считывания (ORF) длинной некодирующей РНК THUMP3 (обратной цепи). Поскольку сайт hROSA26 содержит эндогенный промотор, то этот эндогенный промотор можно использовать для встроенного генетического материала или, в качестве альтернативы, генетический материал может быть встроен как функционально связанный с промотором.

Интрон 2 гена цитрамалил-КоА-лиазы (*CLYBL*) на длинном плече хромосомы 13 был идентифицирован как подходящий GSH-сайт, поскольку он является одной из идентифицированных «горячих точек» интеграции для полученной из фага интегразы

phiC31. В исследованиях было показано, что индуцируемые кассеты, случайным образом встроенные в этот локус, являются стабильными и экспрессируются. Было показано, что встраивание индуцируемых кассет в этот GSH-сайт не нарушает локальную экспрессию генов (Cerbini *et al.*, (2015)). Таким образом, *CLYBL* обеспечивает GSH-сайт, который может быть подходящим для применения в настоящем изобретении.

CCR5, расположенный на хромосоме 3 (положение 3p21.31), представляет собой ген, кодирующий главный корецептор HIV-1. Интерес к использованию этого сайта в качестве GSH-сайта возникает благодаря присутствию нуль-мутации в этом гене, которая, по-видимому, не имеет неблагоприятных эффектов, но предрасполагает к устойчивости к инфекции HIV-1. Были разработаны нуклеазы с «цинковыми пальцами», нацеленные на третий экзон, что позволяет встраивать генетический материал в этот локус.

Ген гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (*HPRT*) кодирует фермент трансферазу, которая играет центральную роль в образовании пуриновых нуклеотидов посредством пути реутилизации пуринов.

GSH-сайт был идентифицирован в других организмах и включает локусы ROSA26, HRPT и Hipp11 (H11) у мышей. Геномы млекопитающих могут содержать GSH-сайты, основу которых составляют сайты псевдо-attP. Для таких сайтов была разработана интеграза hiC31, рекомбиназа, полученная из фага *Streptomyces*, в качестве невирусного инструмента для встраивания, поскольку она обладает способностью к интеграции плазмиды, содержащей индуцируемую кассету и несущей сайт attB, в сайты псевдо-attP.

Технически, встраивания в первый и/или второй GSH-сайты можно осуществлять на одной хромосоме или на обеих хромосомах. GSH-сайт существует в одних и тех же генетических локусах на обеих хромосомах диплоидных организмов. Встраивание в обе хромосомы является предпочтительным, поскольку оно может обеспечивать повышение уровня транскрипции со встроенного генетического материала в индуцируемой кассете, и таким образом достигают особенно высоких уровней транскрипции.

Специфическое встраивание генетического материала в конкретный GSH-сайт может быть обеспечено посредством специализированного сайт-специфического образования двухцепочечных разрывов ДНК в GSH-сайте. Затем генетический материал может быть введен с использованием любого подходящего механизма, такого как гомологичная рекомбинация. Можно применять любой способ создания специфического

DSB в геноме, однако предпочтительные системы включают CRISPR/Cas9 и ее модифицированные версии, нуклеазы с «цинковыми пальцами» и систему TALEN.

Одна или более генетических последовательностей могут быть регулируемо транскрибированы из второго и/или дополнительного GSH-сайта. Действительно, индуцируемая кассета может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 генетических последовательностей (например, последовательностей факторов транскрипции), которые желательно встроить в GSH-сайт, и транскрипция которых должна быть регулируемо индуцируемой. Таким образом, факторы транскрипции, необходимые согласно настоящему изобретению, могут быть включены в одну и ту же кассету, введенную во второй генетически безопасный сайт-гавань. Например, три или более факторов транскрипции могут быть включены в, например, три моноцистронные конструкции, одну моноцистронную и одну бицистронную конструкцию или одну трицистронную конструкцию. Следует понимать, что для достижения более высоких порядков экспрессии фактора транскрипции можно применять сходные комбинации конструкций.

В качестве альтернативы, если применяют комбинацию факторов транскрипции, то отдельные факторы транскрипции могут быть введены в отдельные GSH-сайты и/или под контроль различных индуцируемых промоторов. Таким образом, в одном из воплощений по меньшей мере три или более факторов транскрипции вводят в отдельные GSH-сайты. Это может быть обеспечено путем использования трех или более различных GSH-сайтов для трех или более факторов транскрипции (то есть при этом факторы транскрипции вводят в виде моноцистронных кассет). В качестве альтернативы, это может быть обеспечено путем использования того факта, что GSH-сайт существует в одних и тех же генетических локусах на обеих хромосомах диплоидных организмов, например, путем введения одного фактора транскрипции в GSH-сайт на одной хромосоме и другого фактора транскрипции в тот же GSH-сайт на другой хромосоме. Это воплощение является предпочтительным, если желательны разные уровни экспрессии или разная продолжительность экспрессии факторов транскрипции. В одном из воплощений способ включает направленное встраивание по меньшей мере трех или более факторов транскрипции, каждый из которых функционально связан с индуцируемым промотором, во второй, третий и четвертый генетически безопасные сайты-гавани исходной клетки. Индуцируемый промотор может быть одним и тем же

для каждого фактора транскрипции, и, соответственно, все они регулируются белком-регулятором транскрипции.

Белок-регулятор транскрипции представляет собой белок, который связывается с ДНК, предпочтительно специфично связывается с последовательностью сайта ДНК, расположенного в промоторе или вблизи от него, и либо способствует связыванию транскрипционного комплекса с промотором и, таким образом, транскрипции последовательности ДНК (активатор транскрипции), либо блокирует этот процесс (репрессор транскрипции).

Последовательность ДНК, с которой связывается белок-регулятор транскрипции, называется сайтом связывания фактора транскрипции или элементом ответа, и эти сайты находятся в промоторе регулируемой последовательности ДНК или вблизи от него. Белки-активаторы транскрипции связываются с элементом ответа и стимулируют экспрессию генов. Такие белки предпочтительны в способах согласно настоящему изобретению для регуляции экспрессии индуцируемых кассет. Белки-репрессоры транскрипции связываются с элементом ответа и предупреждают экспрессию гена.

Белки-регуляторы транскрипции могут быть активированы или инактивированы посредством ряда механизмов, включающих связывание вещества, взаимодействие с другими факторами транскрипции (например, гомо- или гетеродимеризацию) или корегуляторными белками, фосфорилирование и/или метилирование. Белок-регулятор транскрипции может подлежать регуляции путем активации или инактивации.

Если белок-регулятор транскрипции представляет собой белок-активатор транскрипции, то предпочтительно требуется активация белка-активатора транскрипции. Эта активация может быть обеспечена любым подходящим способом, но предпочтительно белок-регулятор транскрипции активируют путем добавления к клетке экзогенного вещества. Поступление экзогенного вещества в клетку можно регулировать, и можно таким образом регулировать активацию белка-регулятора транскрипции. В качестве альтернативы, экзогенное вещество может быть добавлено для инактивации белка-регулятора транскрипции, а впоследствии добавленное вещество удаляют для активации белка-регулятора транскрипции.

Если белок-регулятор транскрипции представляет собой белок-репрессор транскрипции, то предпочтительно требуется инактивация белка-репрессора транскрипции. Соответственно, добавляют вещество для предупреждения репрессии

транскрипции под действием белка-репрессора транскрипции, и транскрипция таким образом становится возможной.

Можно применять любой подходящий белок-регулятор транскрипции, предпочтительно такой, который может быть активирован или инактивирован. Предпочтительно, чтобы для контроля белка-регулятора транскрипции можно было добавлять экзогенное вещество. Такие белки-регуляторы транскрипции также называются индуцируемыми белками-регуляторами транскрипции.

Регулируемая тетрациклином активация транскрипции представляет собой способ индукции экспрессии генов, согласно которому транскрипция обратимо включается или выключается в присутствии антибиотика тетрациклина или одного из его производных (например, доксициклина, который более стабилен). В этой системе белок-активатор транскрипции представляет собой восприимчивый к тетрациклину белок-активатор транскрипции (rtTa) или его производное. Белок rtTA способен связываться с ДНК в конкретных последовательностях оператора TetO. Несколько повторов таких последовательностей TetO расположены выше минимального промотора (такого как промотор CMV), и вместе они образуют элемент ответа на тетрациклин (TRE). Эта система имеет две формы, в зависимости от того, вызывает ли добавление тетрациклина или его производного активацию (Tet-On) или инактивацию (Tet-Off) белка rtTA.

В системе Tet-Off тетрациклин или его производное связывают rtTA и инактивируют rtTA, лишая его способности связываться с последовательностями TRE и предупреждая тем самым транскрипцию TRE-регулируемых генов. Эта система была впервые описана в публикации Gossen *et al.*, (1992).

Система Tet-On состоит из двух компонентов; (1) конститутивно экспрессируемого восприимчивого к тетрациклину белка-активатора транскрипции (rtTa) и чувствительного к rtTa индуцируемого промотора (элемента ответа на тетрациклин, TRE). Этот элемент может связываться тетрациклином или его более стабильными производными, включая доксициклин (dox), что приводит к активации rtTa, обеспечивая связывание последнего с последовательностями TRE и индукцию экспрессии TRE-регулируемых генов. Применение этой системы может быть предпочтительно в способе согласно настоящему изобретению.

Таким образом, белок-регулятор транскрипции может представлять собой восприимчивый к тетрациклину белок-активатор транскрипции (rtTa), который может

быть активирован или инактивирован с помощью антибиотика тетрациклина или одного из его производных, обеспечиваемых извне. Если белок-регулятор транскрипции представляет собой rtTA, то индуцируемый промотор, встроенный во второй GSH-сайт, содержит элемент ответа на тетрациклин (TRE). Обеспечиваемое извне вещество представляет собой антибиотик тетрациклин или одно из его производных. Варианты и модифицированные белки rtTa также можно применять в способах согласно настоящему изобретению, они включают трансактиватор Tet-On Advanced (также известный как rtTA2S-M2) и Tet-On 3G (также известный как rtTA-V16, полученный из rtTA2S-S2).

Элемент ответа на тетрациклин (TRE) обычно состоит из 7 повторов бактериальной последовательности TetO размером 19 п.н., разделенных спейсерными последовательностями, вместе с минимальным промотором. Возможны варианты и модификации последовательности TRE, поскольку минимальный промотор может представлять собой любой подходящий промотор. Предпочтительно минимальный промотор характеризуется отсутствием экспрессии или минимальными уровнями экспрессии в отсутствие связывания rtTa. Таким образом, индуцируемый промотор, встроенный во второй GSH-сайт, может содержать TRE.

Модифицированная система, основанная на регуляции тетрациклином, представляет собой систему T-REX (Thermo-Fisher Scientific), в которой белок-регулятор транскрипции представляет собой белок-репрессор транскрипции, TetR. Компоненты этой системы включают (1) индуцируемый промотор, содержащий сильный немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV) человека и два сайта тетрациклинового оператора 2 (TetO2), и репрессор Tet (TetR). В отсутствие тетрациклина репрессор Tet образует гомодимер, который связывается с чрезвычайно высокой аффинностью с каждой последовательностью TetO2 в индуцируемом промоторе и предупреждает транскрипцию с промотора. После добавления тетрациклина последний с высокой аффинностью связывается с каждым гомодимером репрессора Tet, лишая его способности связываться с оператором Tet. Далее комплекс репрессор Tet:тетрациклин диссоциирует от оператора Tet, что обеспечивает индукцию экспрессии. В этом случае белок-регулятор транскрипции представляет собой TetR, а индуцируемый промотор содержит два сайта TetO2. Обеспечиваемое извне вещество представляет собой тетрациклин или его производное.

Известны другие индуцируемые системы экспрессии, которые можно применять в способе согласно настоящему изобретению. Они включают систему Complete Control

Inducible от компании Agilent Technologies. Эта система основана на использовании гормона насекомых экдизона или его аналога понастерона A (PonA), которые могут активировать транскрипцию в клетках млекопитающих, трансфицированных как геном рецептора экдизона *Drosophila melanogaster* (EcR), так и индуцируемым промотором, содержащим сайт связывания для рецептора экдизона. EcR является представителем семейства ретиноид-Х-рецепторов (RXR), относящихся к ядерным рецепторам. У человека EcR образует гетеродимер с RXR, который связывается с элементом ответа на экдизон (EcRE). В отсутствие PonA транскрипция репрессируется гетеродимером.

Таким образом, белок-регулятор транскрипции может представлять собой белок-репрессор, такой как рецептор экдизона или его производное. Примеры последнего включают синтетический рецептор VgEcR от компании Agilent Technologies, который представляет собой продукт слияния EcR, ДНК-связывающего домена глюкокортикоидного рецептора (GR) и домена активации транскрипции вируса простого герпеса VP16. Индуцируемый промотор содержит последовательность EcRE или ее модифицированные версии вместе с минимальным промотором. Модифицированные версии содержат последовательность распознавания E/GRE от компании Agilent Technologies, в которую были внесены мутации. Последовательность распознавания E/GRE содержит инвертированные элементы распознавания половинного сайта для доменов связывания ретиноид-Х-рецепторов (RXR) и GR. Во всех перестановках обеспечиваемое извне вещество представляет собой понастерон A, который устраняет репрессирующий эффект EcR или его производных в отношении индуцируемого промотора и обеспечивает протекание транскрипции.

В качестве альтернативы, индуцируемые системы могут быть на основе синтетического стероида мифепристона в качестве обеспечиваемого извне вещества. В этом варианте встраивают гибридный белок-регулятор транскрипции, основу которого составляют ДНК-связывающий домен из белка GAL4 дрожжей, укороченный лигандсвязывающий домен (LBD) из рецептора прогестерона человека и активационный домен (AD) из NF-κB человека. Этот гибридный белок-регулятор транскрипции доступен от компании Thermo-Fisher Scientific (Gene Switch™). Мифепристон активирует гибридный белок и обеспечивает транскрипцию с индуцируемого промотора, который содержит вышележащие активирующие последовательности (UAS) для GAL4 и ТАТА-бокс аденовируса Elb. Эта система описана в публикации Wang *et al.*, (1994).

Таким образом, белок-регулятор транскрипции может представлять собой любой подходящий регуляторный белок, как то: белок-активатор или белок-репрессор. Подходящими белками-активаторами транскрипции являются восприимчивый к тетрациклину белок-активатор транскрипции или гибридный белок-регулятор транскрипции Gene Switch. Подходящие белки-репрессоры включают версии Tet-Off для rtTA, TetR или EcR. Белки-регуляторы транскрипции могут быть модифицированы или дериватизированы по мере необходимости.

Индукцируемый промотор может содержать элементы, подходящие для связывания или взаимодействия с белком-регулятором транскрипции. Взаимодействие белка-регулятора транскрипции с индуцируемым промотором предпочтительно регулируется обеспечиваемым извне веществом.

Обеспечиваемое извне вещество может представлять собой любое подходящее вещество, которое связывается или взаимодействует с белком-регулятором транскрипции. Подходящие вещества включают тетрациклин (или его производные, такие как доксициклин), понастерон А и мифепристон.

Предпочтительно ген, кодирующий белок-регулятор транскрипции, функционально связан с конститутивным промотором. В качестве альтернативы, первый GSH-сайт может быть выбран таким образом, что он уже содержит конститутивный промотор, который также может управлять экспрессией гена белка-регулятора транскрипции и любого ассоциированного с ним генетического материала. Конститутивные промоторы обеспечивают устойчивую экспрессию генов на высоком уровне. Широко используемые конститутивные промоторы включают промотор β -актина человека (ACTB), цитомегаловируса (CMV), фактора элонгации-1 α (EF1 α), фосфоглицераткиназы (PGK) и убиквитина С (UbC). Промотор CAG представляет собой сильный синтетический промотор, часто используемый для управления высокими уровнями экспрессии генов, который был сконструирован из следующих последовательностей: (C) – элемент раннего энхансера цитомегаловируса (CMV), (A) – промотор, первый экзон и первый интрон гена бета-актина курицы и (G) – акцепторный сайт сплайсинга гена бета-глобина кролика.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ получения печеночных клеток из исходной клетки, включающий стадии:

а) направленного встраивания гена, кодирующего белок-регулятор транскрипции, в первый генетически безопасный сайт-гавань исходной клетки; и

б) направленного встраивания одного или более (например, по меньшей мере трех или более) генов, кодирующих факторы транскрипции, выбранные из группы, состоящей из: AR, ARID3C, ATF5, CEBPA, CREB3L3, CUX2, EPAS1, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HLF, HNF1A, HNF4A, HNF4G, KLF15, KLF9, MLXIPL, NCOA2, NR0B2, NR1H4, NR1I2, NR1I3, NR5A2, ONECUT1, ONECUT2, PPARA, PROX1, RORA, RORC, RXRA, SALL1, SMAD1, SREBF1, STAT3, TSHZ2, XBP1, ZBTB16 и их вариантов, функционально связанных с индуцируемым промотором во втором генетически безопасном сайте-гавани исходной клетки, при этом указанный индуцируемый промотор регулируется белком-регулятором транскрипции; и

в) культивирования исходной(ых) клетки(ок), содержащей(их) вставки, с получением печеночных клеток.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ получения печеночных клеток из исходной клетки, включающий стадии:

а) встраивания гена, кодирующего белок-регулятор транскрипции, в первый генетически безопасный сайт-гавань исходной клетки; и

б) встраивания одного или более (например, по меньшей мере трех или более) генов, кодирующих факторы транскрипции, выбранные из группы, состоящей из: AR, ARID3C, ATF5, CEBPA, CREB3L3, CUX2, EPAS1, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HLF, HNF1A, HNF4A, HNF4G, KLF15, KLF9, MLXIPL, NCOA2, NR0B2, NR1H4, NR1I2, NR1I3, NR5A2, ONECUT1, ONECUT2, PPARA, PROX1, RORA, RORC, RXRA, SALL1, SMAD1, SREBF1, STAT3, TSHZ2, XBP1, ZBTB16 и их вариантов, функционально связанных с индуцируемым промотором во втором генетически безопасном сайте-гавани исходной клетки, при этом указанный индуцируемый промотор регулируется белком-регулятором транскрипции; и

в) культивирования исходной(ых) клетки(ок), содержащей(их) вставки, с получением печеночных клеток.

Следует понимать, что этот аспект настоящего изобретения можно применять с любой из комбинаций факторов транскрипции, описанных в настоящем документе.

Получение печеночных клеток

В одном из воплощений способ дополнительно включает мониторинг популяции клеток в отношении по меньшей мере одной характеристики печеночной клетки. Мониторинг клеток можно проводить в течение всего процесса культивирования для идентификации экспрессии ключевых маркеров клеточных линий.

Например, мониторинг можно проводить с применением специальных репортерных линий или посредством иммуноокрашивания с использованием флуоресцентной микроскопии или проточной цитометрии. Такой материал включает гены маркеров или репортерных молекул, например, гены, опосредующие появление визуально идентифицируемых свойств, в том числе флуоресцентных и люминесцентных белков. Примеры включают ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (GFP) медузы, который вызывает зеленое свечение экспрессирующих его клеток в синем/ультрафиолетовом свете, люциферазу, которая катализирует реакцию с люциферинном, сопровождающуюся световым излучением, и красный флуоресцентный белок, представляющий собой продукт гена dsRed.

Клетка может дополнительно содержать подходящую для скрининга и/или селекции репортерную кассету экспрессии, например, содержащую специфичный для печени промотор, функционально связанный с репортерным геном.

Селектируемые маркеры могут включать гены устойчивости к антибиотикам или другим лекарственным средствам. Примеры генов устойчивости к лекарственным средствам могут включать: ген устойчивости к пурамицину, ген устойчивости к ампициллину, ген устойчивости к неомицину, ген устойчивости к тетрациклину, ген устойчивости к канамицину или ген устойчивости к хлорамфениколу. Клетки можно культивировать на среде, содержащей соответствующее лекарственное средство (то есть на селективной среде), и выживать будут только те клетки, которые содержат и экспрессируют ген устойчивости к лекарственному средству. Следовательно, можно легко отбирать клетки, содержащие и экспрессирующие ген устойчивости к лекарственному средству, путем культивирования клеток с использованием селективной среды.

Примеры генов флуоресцентных белков, которые можно применять в качестве маркеров, включают: ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), ген желтого флуоресцентного белка (YFP), ген красного флуоресцентного белка (RFP) или ген экворина. Клетки, экспрессирующие ген флуоресцентного белка, можно детектировать с помощью флуоресцентного микроскопа и отбирать с помощью устройства для сортировки клеток, такого как проточный цитометр. Сортировка клеток с активированной флуоресценцией (FACS) представляет собой специализированный тип проточной цитометрии, который можно применять для отбора клеток, экспрессирующих флуоресцентный белок.

Примеры генов хромогенных ферментов, которые можно применять в качестве маркеров, включают, но не ограничиваются ими: ген β -галактозидазы, ген β -глюкуронидазы, ген щелочной фосфатазы или ген секретируемой щелочной фосфатазы (SEAP). Клетки, экспрессирующие гены этих хромогенных ферментов, можно детектировать путем применения соответствующего хромогенного субстрата (например, X-gal для β -галактозидазы), так что клетки, экспрессирующие маркерный ген, будут обеспечивать детектируемый цвет (например, синий цвет в скрининговом анализе с синим и белым окрашиванием).

Таким образом, способ может включать стадию селекции или обогащения для печеночных клеток, полученных способами, описанными в настоящем документе. В одном из воплощений способ включает стадию сортировки печеночных клеток с использованием методов сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) или методов иммуномагнитной сортировки, основанных на экспрессии печеночных маркеров и/или отсутствии непеченочных маркеров. В другом воплощении печеночные клетки обогащают путем отбора на устойчивость к лекарственным средствам из генетически сконструированных исходных клеток, экспрессирующих ген устойчивости к антибиотику под контролем специфичного для печени промотора (например, промотора альбумина или CYP3A4).

Способ может обеспечивать получение клеток (а именно дифференцированных клеток), демонстрирующих по меньшей мере одну характеристику печеночной клетки. Для отбора печеночных клеток, полученных способами согласно настоящему изобретению, можно применять одну или более характеристик.

Эти характеристики включают, но не ограничиваются ими, детекцию или количественное определение экспрессируемых клеточных маркеров, ферментативной активности и характеризацию морфологических признаков и межклеточной передачи сигналов. Также можно оценивать биологическую функцию печеночной клетки, например, с помощью анализов накопления гликогена, секреции альбумина и желчи, синтеза липидов или выработки мочевины.

В одном из воплощений характеристика (а именно печеночной клетки, в частности печеночной клетки человека) выбрана из одного или более из:

(1) экспрессии одного или более маркеров печеночных клеток, таких как глюкозо-6-фосфатаза, альбумин, α 1-антитрипсин (AAT), фумарилацетоацетаза (FAH), цитокератин 8 (CK8), цитокератин 18 (CK18), асиалогликопротеиновый рецептор

(ASGR), алкогольдегидрогеназа 1, аргиназа типа I, цитохром p450 3A4 (CYP3A4), цитохром p450 2C9 (CYP2C9), семейство UDP-глюкуронозилтрансферазы 1, полипептид A1 (UGT1A1), специфичный для печени транспортер органических анионов (LST-1) или их комбинация;

(2) активности глюкозо-6-фосфатазы, CYP3A4, CYP2C9, синтеза и секреции альбумина, выработки или секреции желчи, выработки мочевины или детоксикации ксенобиотиков; или

(3) морфологических признаков печеночных клеток.

В одном из воплощений клетки сортируют на основании появления экспрессии маркера печеночных клеток, такого как альбумин или CYP3A4, для которых была установлена связь с печеночными клетками и зрелыми взрослыми печеночными клетками.

Таким образом, в другом воплощении характеристика включает маркер печеночных клеток, выбранный из альбумина и CYP3A4.

Маркеры печеночных клеток могут представлять собой маркеры, обнаруженные посредством транскриптомного анализа. Например, для определения подробных профилей транскрипции клеток печени человека, полученных от доноров, применяли секвенирование РНК единичных клеток. Эта информация может быть использована для идентификации печеночных клеток, полученных способами, описанными в настоящем документе. Данные по секвенированию РНК единичных клеток приведены в публикациях Aizarani *et al.*, (2019); MacParland *et al.*, (2018) и Segal *et al.*, (2019), которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Способ может включать анализ дифференцированных клеток, полученных способом, описанным в настоящем документе, и определение набора транскрибируемых генов; сравнение набора транскрибируемых генов дифференцированных клеток с одним или более эталонными наборами транскрибируемых генов из одной или более эталонных печеночных клеток; и идентификацию совпадения между дифференцированными клетками и эталонной печеночной клеткой.

В одном из воплощений способ включает стадию идентификации дифференцированных клеток как типа печеночных клеток с помощью анализа морфологических признаков дифференцированных клеток и сопоставления этих морфологических признаков с морфологическими признаками эталонной ткани или клетки.

В одном из воплощений способ включает стадию идентификации дифференцированных клеток как типа печеночных клеток с помощью анализа экспрессии белковых маркеров дифференцированных клеток и сопоставления экспрессии этих белковых маркеров с экспрессией белковых маркеров эталонной печеночной клетки.

В одном из воплощений способ включает стадию идентификации дифференцированных клеток как типа печеночных клеток с помощью анализа функции и сопоставления этой функции с функцией эталонной печеночной клетки.

В одном из воплощений клетки, полученные способами согласно настоящему изобретению, экспрессируют фенотип клетки, коммитированной к развитию в эндодермальную клетку печени. В одном из воплощений клетки, полученные способами согласно настоящему изобретению, экспрессируют фенотип гепатобластов. В одном из воплощений клетки, полученные способами согласно настоящему изобретению, экспрессируют фенотип гепатоцитов.

В качестве альтернативы, некоторые дифференцированные клетки могут быть отсортированы от других дифференцированных клеток и от клеток на основании экспрессии ими антигенов клеточной поверхности, специфичных для клеточных линий. Еще один способ представляет собой оценку экспрессии на уровне РНК, например, методами количественной ПЦР с обратной транскрипцией (RT-qPCR) или посредством секвенирования РНК единичных клеток без какой-либо стадии сортировки или предварительной селекции. Такие методики известны в данной области техники.

Культивирование клеток

В одном из воплощений способ включает культивирование популяции клеток в течение достаточного периода времени и в условиях, обеспечивающих дифференцировку в печеночную клетку. Как правило, клетки согласно настоящему изобретению культивируют в культуральной среде, которая представляет собой богатый питательными веществами буферный раствор, способный поддерживать рост клеток.

Среда для культивирования клеток может содержать любое из следующего в подходящей комбинации: соль(и), буфер(ы), аминокислоты, глюкозу или другой(ие) сахар(а), антибиотики, сыворотку или заменитель сыворотки и другие компоненты, такие как пептидные факторы роста и т.д. Среда для культивирования клеток, обычно используемые для конкретных типов клеток, известны специалистам в данной области

техники. Типичные среды для культивирования клеток для применения в способах согласно настоящему изобретению описаны в публикации Ang *et al.*, (2018).

Печеночные клетки могут быть получены с применением способов согласно настоящему изобретению через по меньшей мере примерно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 суток после культивирования. В одном из воплощений способ включает культивирование в подходящих условиях в течение по меньшей мере 4 суток, например, по меньшей мере 6 суток или по меньшей мере 11 суток. В других воплощениях способ включает культивирование клеток в течение периода времени (например, по меньшей мере 4 суток, по меньшей мере 5 суток, по меньшей мере 6 суток, по меньшей мере 7 суток, по меньшей мере 8 суток, по меньшей мере 9 суток, по меньшей мере 10 суток, по меньшей мере 11 суток, по меньшей мере 12 суток, по меньшей мере 13 суток, по меньшей мере 14 суток, по меньшей мере 21 сутки, по меньшей мере 28 суток или более, например, от 5 суток до 40 суток, от 7 суток до 35 суток, от 14 суток до 28 суток или примерно 21 сутки), который является достаточным для получения печеночных клеток. В некоторых воплощениях клетки культивируют в течение периода от нескольких часов (например, примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18 или 21 часа) до примерно 35 суток (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 суток). В одном из воплощений способ включает культивирование клеток в течение по меньшей мере примерно 5, 10, 15 или 20 суток для получения печеночных клеток. В одном из воплощений клетки культивируют в течение периода от 4 до 25 суток, например, от 14 до 21 суток.

После культивирования популяция клеток может содержать два типа клеток. Например, такая популяция клеток может содержать два типа клеток, включая стволовые клетки и печеночные клетки. В одном из воплощений популяция клеток содержит вплоть до 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 99,5% (или любые промежуточные диапазоны) печеночных клеток в полученной популяции клеток.

Культивирование клеток может либо способствовать коммитированию клеток к приобретению более зрелого фенотипа, предпочтительно стимулировать выживание зрелых клеток, либо вызывать комбинацию обоих этих эффектов.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена клетка, которая может быть получена любым из способов, определенных в настоящем документе.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена клетка, содержащая одну или более экзогенных кассет экспрессии, кодирующих один или более (например, по меньшей мере три или более) факторов транскрипции, выбранных из группы, состоящей из: AR, ARID3C, ATF5, CEBPA, CREB3L3, CUX2, EPAS1, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HLF, HNF1A, HNF4A, HNF4G, KLF15, KLF9, MLXIPL, NCOA2, NR0B2, NR1H4, NR1I2, NR1I3, NR5A2, ONECUT1, ONECUT2, PPARA, PROX1, RORA, RORC, RXRA, SALL1, SMAD1, SREBF1, STAT3, TSHZ2, XBP1, ZBTB16 и их вариантов. Следует понимать, что этот аспект настоящего изобретения можно применять с любой из комбинаций факторов транскрипции, описанных в настоящем документе.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена клетка, содержащая одну или более экзогенных кассет экспрессии, кодирующих по меньшей мере три или более факторов транскрипции, где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из: FOXA1 или FOXA3; NR1I2 или NR1I3; HHEX; CREB3L3; GATA4; KLF9; ATF5; MLXIPL; FOXA2; AR; ARID3C; CEBPA; CUX2; EPAS1; HLF; HNF1A; HNF4A; HNF4G; KLF15; NCOA2; NR0B2; NR1H4; NR5A2; ONECUT1; ONECUT2; PPARA; PROX1; RORA; RORC; RXRA; SALL1; SMAD1; SREBF1; STAT3; TSHZ2; XBP1; ZBTB16 и их вариантов.

В одном из воплощений клетка представляет собой печеночную клетку, в частности сконструированную печеночную клетку.

Как описано в настоящем документе, экзогенные кассеты экспрессии, кодирующие три или более факторов транскрипции, могут быть интегрированы в геном клетки. В другом воплощении экзогенные кассеты экспрессии, кодирующие три или более факторов транскрипции, интегрированы в (специфический) сайт-мишень в геноме клетки. В качестве альтернативы, экзогенные кассеты экспрессии, кодирующие три или более факторов транскрипции, интегрированы в неспецифический сайт-мишень в геноме клетки.

Композиции клеток

В соответствии с другим аспектом предложена фармацевтическая композиция, содержащая печеночные клетки, полученные способом, описанным в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтические композиции могут содержать печеночные клетки, описанные в настоящем документе, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный солевой буферный раствор, фосфатно-солевой буферный раствор и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как EDTA или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Растворы для криоконсервации, которые можно применять в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению, содержат, например, DMSO.

Для целей изготовления, распространения и применения печеночные клетки, описанные в настоящем документе, могут быть обеспечены в форме клеточной культуры или суспензии в изотоническом эксципиенте или культуральной среде, необязательно в замороженном виде, для упрощения транспортировки или хранения.

Применения печеночных клеток

Клетки, полученные в соответствии с любым из способов согласно настоящему изобретению, имеют применения в фундаментальных и медицинских исследованиях, диагностических и терапевтических методах. Клетки можно применять *in vitro* для изучения клеточного развития, обеспечения тест-систем для новых лекарственных средств, обеспечения разработки способов скрининга, тщательного изучения схем лечения, обеспечения диагностических тестов и т.п. Эти применения составляют часть настоящего изобретения. В качестве альтернативы, клетки могут быть трансплантированы пациенту-человеку или животному в диагностических или терапевтических целях. Применение клеток в терапии также включено в настоящее изобретение.

Печеночные клетки, полученные способами согласно настоящему изобретению, находят особое применение в скрининге лекарственных средств. Таким образом, в одном из воплощений способ дополнительно включает приведение печеночных клеток в контакт с исследуемым веществом и наблюдение изменения (например, эффекта) в печеночных клетках, вызванного исследуемым веществом. Изменение или эффект можно наблюдать с применением способов, известных в данной области техники, например, с применением фармакологических или токсикологических анализов. В одном из аспектов клетки можно применять в способе оценки исследуемого вещества

(например, лекарственного средства, такого как соединение), включающем анализ фармакологического или токсикологического свойства исследуемого вещества на печеночных клетках, полученных способами, описанными в настоящем документе. Способ может включать: а) приведение печеночной клетки, описанной в настоящем документе, в контакт с исследуемым веществом; и б) анализ влияния исследуемого вещества на печеночную клетку.

Оценка активности молекулы-кандидата может включать комбинирование печеночных клеток, описанных в настоящем документе, с молекулой-кандидатом, определение любого изменения в морфологии, фенотипе или метаболической активности печеночных клеток, которое можно отнести к действию молекулы (то есть по сравнению с контролем, таким как необработанные клетки или клетки, обработанные инертным соединением), и затем корреляцию действия молекулы с наблюдаемым изменением. Скрининг может быть обусловлен либо тем, что молекула-кандидат разработана как обладающая фармакологическим эффектом в отношении печеночных клеток, либо тем, что молекула разработана для воздействия на другую мишень, но необходимо определить, обладает ли она нежелательным побочным действием на печень.

Цитотоксичность можно определить в первую очередь по влиянию на жизнеспособность, выживаемость и морфологию клеток и утечку ферментов в культуральную среду. Может быть проведен более подробный анализ для определения того, влияет ли исследуемое вещество на функцию клеток (например, глюконеогенез, образование мочевины и синтез белков плазмы) не вызывая токсичности.

В качестве альтернативы, клетки можно применять для оценки изменений в профилях экспрессии генов, вызванных потенциальным лекарственным средством-кандидатом. В этом воплощении изменения в профиле экспрессии генов в результате добавления лекарственного средства-кандидата можно сравнивать с профилем экспрессии генов, обусловленным контрольным лекарственным средством с известным действием на печень.

Таким образом, в соответствии с другим аспектом предложен способ скрининга лекарственных средств (например, оценки активности лекарственных средств), включающий стадию применения печеночных клеток, полученных способом, описанным в настоящем документе. В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ скрининга лекарственных средств, включающий

приведение печеночной клетки, полученной с применением способа, определенного в настоящем документе, или печеночной клетки, определенной в настоящем документе, в контакт с лекарственным средством и наблюдение изменения в указанных печеночных клетках, вызванного лекарственным средством.

Печеночные клетки согласно настоящему изобретению также можно применять в скринингах для оценки метаболизма лекарственного средства в печени, например, за счет образования каких-либо побочных продуктов лекарственного средства. Таким образом, в соответствии с другим аспектом предложен способ скрининга лекарственных средств, включающий приведение печеночной клетки, полученной с применением способа, определенного в настоящем документе, или печеночной клетки, определенной в настоящем документе, в контакт с лекарственным средством и наблюдение изменения метаболизма лекарственного средства.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ идентификации мишени для лекарственного средства в печеночных клетках, например, с применением скрининга генетических нарушений в сочетании с зависимостью от лекарственных средств.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена печеночная клетка, определенная в настоящем документе, для применения в терапии. В одном из воплощений терапия включает регенерацию тканей. В настоящем документе ссылки на «регенерацию тканей» относятся к видам терапии, которые восстанавливают функцию пораженных и поврежденных органов и тканей путем восстановления утраченных или поврежденных тканей.

Таким образом, печеночные клетки согласно настоящему изобретению также можно применять для восстановления степени функции печени у субъекта, нуждающегося в такой терапии. В соответствии с этим, в одном из воплощений способ дополнительно включает трансплантацию печеночных клеток пациенту. В этом аспекте настоящего изобретения клетки, применяемые для получения печеночных клеток, могут быть аутологичными (то есть представлять собой зрелые клетки, которые были удалены, модифицированы и возвращены тому же индивидууму) или полученными от донора (то есть аллогенными, включая линию стволовых клеток).

В соответствии с другим аспектом предложен способ трансплантации клеток в печень, включающий стадию трансплантации печеночных клеток, полученных способом, описанным в настоящем документе.

В одном из воплощений печеночные клетки являются капсулированными, например, капсулированными альгинатом. Например, печеночные клетки могут быть капсулированы с применением коммерчески доступных альгинатных гранул и методик, известных в данной области техники. Преимущество этого воплощения состоит в том, что оно позволяет избежать имплантации в печень или развития иммунного отторжения, и, следовательно, HLA-совместимость печеночных клеток между донором и пациентом не является необходимой. Лечение путем введения капсулированных печеночных клеток можно применять у пациентов, страдающих от острой (например, при передозировке ацетаминофена) или хронической (например, при циррозе) печеночной недостаточности.

В еще одном аспекте также может быть предложен способ лечения субъекта, имеющего дисфункцию печени или подверженного риску ее развития, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества печеночных клеток или содержащей печеночные клетки популяции клеток, предложенных в настоящем документе.

В соответствии с другим аспектом предложен способ лечения заболевания, включающий стадию применения печеночных клеток, полученных способом, описанным в настоящем документе. Указанное заболевание может представлять собой заболевание, которое включает острую или хроническую дисфункцию печени. Заболевания, подходящие для терапии с применением печеночных клеток, описанных в настоящем документе, включают заболевания, которые ассоциированы с острой или хронической дисфункцией печени, такие как аутоиммунное заболевание печени (такое как аутоиммунный хронический гепатит или первичный билиарный цирроз), цирроз, острое лекарственное поражение печени (например, передозировка ацетаминофена), фульминантная печеночная недостаточность, гепатобилиарная карцинома, наследственная печеночная недостаточность (например, болезнь Вильсона, синдром Жильбера или дефицит α 1-антитрипсина), вирусный гепатит и любое другое состояние, которое приводит к нарушению функции печени.

Печеночные клетки можно вводить в любую область, обеспечивающую достаточный доступ к кровотоку, обычно в брюшную полость. Для некоторых метаболических и детоксикационных функций предпочтительно, чтобы печеночные клетки имели доступ к желчевыводящим путям. Соответственно, печеночные клетки можно вводить рядом с печенью (например, при лечении хронического заболевания печени) или селезенкой (например, при лечении фульминантной печеночной

недостаточности). Согласно одному из способов печеночные клетки вводят в печеночный кровоток либо через печеночную артерию, либо через воротную вену. Как описано выше в настоящем документе, печеночные клетки могут быть капсулированы, например, капсулированы альгинатом.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена биоискусственная печень, содержащая печеночные клетки, определенные в настоящем документе. Разработка биоискусственных печеней широко описана в данной области техники, например, см. публикацию Selden *et al.* (2017) *Scientific Reports* 7: 14518 и примеры в патентах США №№ US5837234, US6582955, US7824912 и US9402944. Биоискусственные печени можно применять для временной замены функций печени, дающей возможность для восстановления и регенерации печени пациента. Их также можно применять для имитации специфических функций печени, анализа влияния генетических изменений на функционирование тканей и получения высокодифференцированной ткани, которую можно применять в качестве модели для скрининга лекарственных средств или способов лечения. В основе биоискусственных печеней находится применение печеночных клеток для осуществления детоксикации и секреции синтезируемых в печени факторов. Биоискусственные печени могут содержать печеночные клетки, суспендированные в пластинчатых диализаторах, микрокапсулированные в подходящем субстрате или прикрепленные к гранулам микроносителя, покрытым внеклеточным матриксом. В качестве альтернативы, печеночные клетки могут быть помещены на твердую подложку в уплотненном слое, в многопластинчатом плоском слое, на микроканальное сито или вокруг капилляров из полых волокон. Биоискусственная печень может являться частью устройства, имеющего вход и выход, через которые пропускают кровь субъекта, необязательно с дополнительными отверстиями для доставки питательных веществ к клеткам.

Наборы для дифференцировки

В соответствии с другим аспектом предложен набор для дифференцировки клетки в печеночную клетку, содержащий:

(1) исходную клетку и агент, который активирует или повышает экспрессию или количество одного или более (например, по меньшей мере трех или более) факторов транскрипции; или

(2) одну или более кассет экспрессии, кодирующих один или более (например, по меньшей мере три или более) факторов транскрипции;

где один или более (например, три или более) факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из: AR, ARID3C, ATF5, CEBPA, CREB3L3, CUX2, EPAS1, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, HHEX, HLF, HNF1A, HNF4A, HNF4G, KLF15, KLF9, MLXIPL, NCOA2, NR0B2, NR1H4, NR1I2, NR1I3, NR5A2, ONECUT1, ONECUT2, PPARA, PROX1, RORA, RORC, RXRA, SALL1, SMAD1, SREBF1, STAT3, TSHZ2, XBP1, ZBTB16 и их вариантов.

В соответствии с другим аспектом предложен набор для дифференцировки клетки в печеночную клетку, содержащий:

(1) исходную клетку и агент, который активирует или повышает экспрессию или количество по меньшей мере трех или более факторов транскрипции; или

(2) одну или более кассет экспрессии, кодирующих по меньшей мере три или более факторов транскрипции,

где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из: FOXA1 или FOXA3; NR1I2 или NR1I3; HHEX; CREB3L3; GATA4; KLF9; ATF5; MLXIPL; FOXA2; AR; ARID3C; CEBPA; CUX2; EPAS1; HLF; HNF1A; HNF4A; HNF4G; KLF15; NCOA2; NR0B2; NR1H4; NR5A2; ONECUT1; ONECUT2; PPARA; PROX1; RORA; RORC; RXRA; SALL1; SMAD1; SREBF1; STAT3; TSHZ2; XBP1; ZBTB16 и их вариантов.

В одном из воплощений кассета экспрессии содержит индуцируемую экспрессионную конструкцию, содержащую последовательность, кодирующую один или более факторов транскрипции.

Как описано в настоящем документе, комбинации факторов транскрипции, описанных в настоящем документе, находят особое применение в настоящем изобретении. Если требуется комбинация факторов транскрипции, то они могут быть закодированы в одной и той же или в разных кассетах экспрессии. Таким образом, в одном из воплощений набор содержит кассету экспрессии (предпочтительно индуцируемую кассету экспрессии), кодирующую два или более факторов транскрипции, например, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь факторов транскрипции. Предпочтительно набор содержит кассету экспрессии, кодирующую три или более, более предпочтительно четыре или более, факторов транскрипции.

В соответствии с другим аспектом предложено применение набора, определенного в настоящем документе, для дифференцировки клетки в печеночную клетку.

Набор может содержать одно или более изделий один или более и/или реагентов для воплощения способа. Например, один или более генов факторов транскрипции, их производных, вариантов или фрагментов для применения в способах, описанных в настоящем документе, могут быть обеспечены в выделенной форме и могут быть частью набора, например, в подходящей емкости, такой как флакон, где содержимое защищено от внешней среды.

В одном из воплощений набор дополнительно содержит по меньшей мере одну исходную клетку, такую как плюрипотентная стволовая клетка (такая как индуцированная плюрипотентная стволовая клетка) или неплюрипотентная непеченочная клетка.

В одном из воплощений набор дополнительно содержит среду для культивирования клеток и инструкции по получению клеток с повышенной активностью или перепрограммированных плюрипотентных клеток в соответствии со способом, определенным в настоящем документе.

Следует понимать, что все воплощения, описанные в настоящем документе, можно применять ко всем аспектам настоящего изобретения.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из описания, приведенного в настоящем документе. Однако следует понимать, что настоящее описание и конкретные примеры, обозначающие предпочтительные воплощения настоящего изобретения, представлены только в качестве иллюстрации, поскольку специалистам в данной области техники будут очевидны различные изменения и модификации. Настоящее изобретение далее будет описано с помощью следующих неограничивающих примеров:

ПРИМЕРЫ

Введение

Для идентификации факторов транскрипции (TF), участвующих в перепрограммировании индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) в печеночные клетки, использовали метод скрининга.

TF, приведенные в **таблице 1**, вводили в iPSC посредством трансдукции пулом лентивирусных векторов (LV), каждый из которых переносил отдельный TF, с целью стабильной интеграции в геном случайным образом нескольких последовательностей, кодирующих уникальные TF, и их гиперэкспрессии (**фигура 1**). Множественность заражения (MOI) была подобрана таким образом, чтобы обеспечить интеграцию в

среднем 1-6 различных TF на каждую клетку в большинстве исходных популяций iPSC. Трансдуцированные iPSC и нетрансдуцированные контроли параллельно культивировали в идентичных условиях. Исходные iPSC содержали репортеры, представляющие собой красный и зеленый флуоресцентные белки, RFP и GFP, для альбумина и CYP3A4, соответственно, которые были введены в соответствующие локусы эндогенных генов. Альбумин (ALB) является основным белком плазмы, секретируемым печенью. Он экспрессируется в фетальных и взрослых гепатоцитах и гепатобилиарных бипотенциальных клетках-предшественниках. CYP3A4 является представителем семейства окислительных ферментов CYP450, которые участвуют в выведении ксенобиотиков, и его экспрессия ограничена зрелыми взрослыми гепатоцитами (Aizarani *et al.*, 2019; MacParland *et al.*, 2018; Segal *et al.*, 2019). Таким образом, после LV трансдукции печеночные клетки различных типов и на различных стадиях развития можно отслеживать только с помощью ALB:RFP. В отличие от этого, совместная экспрессия ALB:RFP и CYP3A4:GFP является маркером потенциально зрелых печеночных клеток. Ежедневно после LV трансдукции получали изображения клеток с использованием флуоресцентного микроскопа для мониторинга экспрессии двух флуоресцентных репортеров. На 11 сутки клетки RFP+/GFP+ сортировали и подвергали секвенированию РНК единичных клеток. Транскриптомы единичных клеток подвергали анализу для идентификации экзогенных перепрограммирующих TF, которые гиперэкспрессировались в каждой клетке. Транскриптомы единичных клеток также сравнивали с транскриптомами первичных гепатоцитов для определения степени сходства транскриптомов на уровне единичных клеток. Эта общая стратегия представлена на **фигуре 1**.

Результаты

Клетки ALB+/CYP3A4+ могут быть получены в течение 11 суток при гиперэкспрессии пула из 39 или 34 программирующих TF

При трансдукции пулом лентивирусных векторов, несущим все 39 TF (**таблица 1**) или 34 TF, отобранных для первичного скрининга (**таблица 2**), ALB:RFP экспрессировался в субпопуляции клеток к 7 дню (**фигуры 2 и 3**, панели a-c). В отличие от этого, экспрессия CYP3A4:GFP была обнаружена только к 10 дню в меньшей фракции клеток ALB:RFP+ (**фигуры 2 и 3**, панели d-f, стрелки), что согласуется с профилем экспрессии CYP3A4 *in vivo*. Важно отметить, что ни экспрессия RFP, ни экспрессия GFP не были обнаружены в нетрансдуцированных клетках, культивируемых в идентичных

условиях, что демонстрирует, что только культуральной среды недостаточно для индукции печеночных маркеров (**фигуры 2 и 3**, панели g-i). Эти результаты показывают, что комбинации TF, состоящие из 39 или 34 кандидатов, необходимы для перепрограммирования iPSC в печеночные клетки.

Таблица 2. Факторы транскрипции для получения печеночных клеток вместе с номерами доступа (по данным на 11 марта 2020 г.)

Название гена фактора транскрипции	Идентификационный номер гена в базе данных Ensembl
AR	ENSG00000169083
ATF5	ENSG00000169136
CEBPA	ENSG00000245848
CREB3L3	ENSG00000060566
EPAS1	ENSG00000116016
FOXA1	ENSG00000129514
FOXA2	ENSG00000125798
FOXA3	ENSG00000170608
GATA4	ENSG00000136574
HHEX	ENSG00000152804
HLF	ENSG00000108924
HNF1A	ENSG00000135100
HNF4A	ENSG00000101076
HNF4G	ENSG00000164749
KLF15	ENSG00000163884
KLF9	ENSG00000119138
MLXIPL	ENSG00000009950
NCOA2	ENSG00000140396
NR1H4	ENSG00000012504
NR1I2	ENSG00000144852
NR1I3	ENSG00000143257
NR5A2	ENSG00000116833
ONECUT1	ENSG00000169856

PPARA	ENSG000000186951
PROX1	ENSG000000117707
RORA	ENSG000000069667
RORC	ENSG000000143365
RXRA	ENSG000000186350
SMAD1	ENSG000000170365
SREBF1	ENSG000000072310
STAT3	ENSG000000168610
TSHZ2	ENSG000000182463
XBP1	ENSG000000100219
ZBTB16	ENSG000000109906

Клетки ALB+/CYP3A4+ на 11 сутки транскрипционно сходны с первичными гепатоцитами

На 11 сутки после LV трансдукции пулом из 34 TF (**таблица 2**) культуры подвергали диссоциации и подвергали проточной цитометрии (**фигура 4А**). Клетки ALB:RFP+ и ALB:RFP+/CYP3A4:GFP+ составляли 5,7 и 0,08% от популяции, соответственно (**фигура 4А**). Клетки ALB:RFP+/CYP3A4:GFP+ сортировали и выполняли секвенирование РНК единичных клеток. Для оценки сходства сортированных клеток с гепатоцитами, присутствующими в печени человека, наборы данных по секвенированию РНК единичных клеток на 11 сутки сравнивали с опубликованными наборами данных по секвенированию РНК единичных клеток для клеток печени человека из публикации MacParland *et al.*, 2018. Помимо гепатоцитов печень человека содержит клетки отличных от гепатоцитов типов, такие как холангиоциты, клетки Купфера, звездчатые клетки, эндотелиальные клетки и иммунные клетки, которые включены в наборы данных из публикации MacParland *et al.*, 2018. Авторы настоящего изобретения использовали алгоритм Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) для группировки клеток на основании дифференциальной экспрессии всех генов, экспрессирующихся в сортированных клетках на 11 сутки и присутствующих в наборе данных, полученных автором MacParland (**фигура 4В**). Авторы настоящего изобретения обнаружили, что подмножество клеток RFP+/GFP+ на 11 сутки кластеризовалось вместе с гепатоцитами,

выделенными из печени человека, и это показывало, что перепрограммированные клетки на 11 сутки приобретали транскриптомы, которые были сходны с транскриптомами их эквивалентов *in vivo*. Этот результат подтверждает способность 34 TF к перепрограммированию в печеночные клетки. Несмотря на наличие экспрессии репортеров альбумина и CYP3A4, фракция клеток на 11 сутки не кластеризовалась с гепатоцитами, что позволяет предположить, что эти клетки претерпели неполное программирование в отношении глобальной экспрессии генов.

Идентификация взрослых и фетальных гепатоцитоподобных клеток в перепрограммированных популяциях

Был вновь проведен анализ, аналогичный представленному на **фигуре 4**, с использованием большего набора данных по эталонным клеткам для определения идентичности популяций, возникающих в процессе перепрограммирования в печеночные клетки, определенным типам клеток. Сначала авторы настоящего изобретения создали эталонную панель набора данных по секвенированию РНК единичных клеток (scRNA-seq), состоящую из основной линии iPSC от компании Bit Bio и общедоступных данных по печени взрослого (MacParland et al, 2018) и печени плода (Popescu et al, 2019) (**фигура 5A**).

Затем авторы настоящего изобретения отобрали несколько перепрограммированных популяций в различные моменты времени процесса перепрограммирования после трансдукции iPSC пулом лентивирусов (LV) для 34 TF (из **таблицы 2**) или для 17 TF (TF, приведенных в **таблице 3**, плюс PROX1). Авторы настоящего изобретения сортировали перепрограммированные клетки на основании экспрессии репортеров ALB-RFP и CYP3A4-GFP, включая положительные по двум репортерам, положительные по одному репортеру и отрицательные по двум репортерам популяции (**фигура 5C**). Используя эталонную библиотеку, авторы настоящего изобретения провели обучение классификатора по кластеризации различных типов клеток на основании их транскриптома (полногеномной экспрессии генов). Далее авторы настоящего изобретения использовали UMAP, метод нелинейного уменьшения размерности (Becht et al. 2019), для визуализации различных типов клеток. Графики UMAP демонстрируют явные различия между четырьмя разными типами клеток в образцах эталонных клеток (**фигура 6A**): (1) iPSC (2), взрослые гепатоциты (3), фетальные гепатоциты (4) и клетки отличных от гепатоцитов типов. Кластер отличных от гепатоцитов клеток включает другие типы клеток, обнаруженные в печени, такие как

клетки крови, иммунные клетки, эндотелиальные клетки, холангиоциты, клетки Купфера и звездчатые клетки. Для проверки того, способен ли классификатор корректно идентифицировать типы клеток из нового набора данных, авторы настоящего изобретения использовали контрольный набор данных scRNA-seq, который они создали с применением криоконсервированных взрослых гепатоцитов, полученных из коммерческого источника (**фигура 5B**). Эти гепатоциты кластеризовались вместе с эталонными взрослыми гепатоцитами (**фигура 6B**), что подтверждало способность классификатора корректно идентифицировать типы клеток. Затем авторы настоящего изобретения использовали классификатор для перепрограммированных популяций. Проецирование перепрограммированных клеток на эталонные клетки показало ожидаемую гетерогенность с разнородным распределением по пространству типов клеток (**фигура 6C**). Авторы настоящего изобретения обнаружили субпопуляцию перепрограммированных клеток, которые кластеризовались с эталонными взрослыми гепатоцитами (**фигура 6C и D**). Процентное содержание перепрограммированных клеток, идентифицированных как взрослые гепатоциты, возрастало с увеличением продолжительности периода перепрограммирования и положительно коррелировало с экспрессией репортеров ALB и CYP3A4 (**фигура 6E**). Среди клеток, полученных при скрининге 34 TF, клетки ALB+/CYP3A+ на 11 сутки (D11) демонстрировали самое высокое процентное содержание клеток, кластеризующихся со взрослыми гепатоцитами. Это процентное содержание было дополнительно повышено в популяции ALB+/CYP3A4+ на 10 сутки (D10), полученной при скрининге 17 TF, что согласуется с повышенной способностью этого набора TF к перепрограммированию, как и было предсказано с помощью биоинформатического анализа, проведенного авторами настоящего изобретения. В отличие от этого, клетки на 2 сутки (D2) и отрицательные по репортерам популяции из клеток на 7 сутки (D7) и 11 сутки (D11) вносили наименьший вклад в популяцию взрослых или фетальных гепатоцитов, и большинство этих клеток выравнивались с iPSC.

Подмножество программирующих TF, имеющих повышенную экспрессию в клетках RFP+/GFP+ на 11 сутки

Последовательности трансдуцированных экзогенных TF (eTF), экспрессирующиеся в каждой клетке, выборочно идентифицировали из прочтений секвенирования. 55% клеток RFP+/GFP+ на 11 сутки экспрессировали 6 или менее уникальных TF на каждую клетку (**фигура 7**). Уровень экспрессии каждого TF в

единичных клетках наносили на график. Этот анализ показал, что экспрессия набора из 16 TF (**таблица 3**) была повышена во фракции клеток RFP+/GFP+ на 11 сутки, которые демонстрировали высокое сходство с гепатоцитами *in vivo*.

Таблица 3. Факторы транскрипции для получения печеночных клеток вместе с номерами доступа (по данным на 11 марта 2020 г.)

Название гена фактора транскрипции	Идентификационный номер гена в базе данных Ensembl
ATF5	ENSG00000169136
CREB3L3	ENSG00000060566
FOXA1	ENSG00000129514
FOXA2	ENSG00000125798
FOXA3	ENSG00000170608
GATA4	ENSG00000136574
HHEX	ENSG00000152804
HNF4A	ENSG00000101076
HNF4G	ENSG00000164749
KLF9	ENSG00000119138
MLXIPL	ENSG00000009950
NR1I2	ENSG00000144852
NR1I3	ENSG00000143257
ONECUT1	ENSG00000169856
RXRA	ENSG00000186350
SREBF1	ENSG00000072310

Печеночные клетки, экспрессирующие маркеры зрелых гепатоцитов, получены путем гиперэкспрессии пула из 14 TF

14 TF были выбраны из 16 TF, приведенных в **таблице 3**, на основании высокой частоты экспрессии в клетках RFP+/GFP+ на 11 сутки. Эти 14 TF (**таблица 4**) трансдуцировали в iPSC в виде пула. На 13 сутки после LV трансдукции авторы настоящего изобретения проводили иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием антитела против CYP3A4. Сигнал GFP от репортера CYP3A4:GFP был

колокализован с эндогенным белком CYP3A4, что подтверждало функциональность репортера (**фигура 8А**). Авторы настоящего изобретения также окрашивали клетки на присутствие других маркеров зрелых гепатоцитов, включая CYP2C9, еще одного представителя семейства окислительных ферментов CYP450, и UGT1A1, UDP-глюкуронозилтрансферазу, участвующую в выведении лекарственных средств, стероидных гормонов и билирубина. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что субпопуляция клеток совместно экспрессировала как CYP2C9, так и UGT1A1 в дополнение к CYP3A4:GFP и ALB:RFP (**фигура 8В**), и это указывало на то, что 14 TF были способны обеспечить получение печеночных клеток, которые синтезировали ключевые ферменты гепатоцитов, участвующие в метаболизме и выведении лекарственных средств.

Таблица 4. Факторы транскрипции для получения печеночных клеток вместе с номерами доступа (по данным на 11 марта 2020 г.)

Название гена фактора транскрипции	Идентификационный номер гена в базе данных Ensembl
ATF5	ENSG00000169136
CREB3L3	ENSG00000060566
FOXA1	ENSG00000129514
FOXA2	ENSG00000125798
FOXA3	ENSG00000170608
GATA4	ENSG00000136574
HHEX	ENSG00000152804
HNF4A	ENSG00000101076
KLF9	ENSG00000119138
MLXIPL	ENSG00000009950
NR1I2	ENSG00000144852
NR1I3	ENSG00000143257
RXRA	ENSG00000186350
SREBF1	ENSG00000072310

Сравнение экспрессии генов, специфичных для гепатоцитов, между перепрограммированными клетками и эталонными первичными гепатоцитами

Авторы настоящего изобретения, используя базу данных PanglaoDB (<https://panglaoDB.se/>) и опубликованную литературу (Segal et al. 2019), выбрали набор генов, экспрессия которых была уникальна для взрослых и/или фетальных гепатоцитов и плюрипотентных стволовых клеток и которые устойчиво экспрессировались в эталонных клетках (кратко представлено на **фигуре 5**). Этот набор состоял из маркерных генов, специфически ассоциированных со взрослыми гепатоцитами (28 генов), фетальными гепатоцитами (8 генов), и генов, экспрессируемых как во взрослых, так и в фетальных гепатоцитах (41 ген) и iPSC (6 генов). Авторы настоящего изобретения нанесли на график уровень экспрессии каждого гена в единичных клетках эталонных клеток и перепрограммированных клеток (**фигура 9A-D**) и сгруппировали гены в соответствии с их ассоциацией с кластерами различных типов клеток, как показано на **фигуре 6C и D**. Следует отметить, что как эталонные, так и криоконсервированные контрольные гепатоциты демонстрировали значительную гетерогенность в отношении экспрессии многих генов из панели генов, специфичных для типов клеток. Это, вероятно, является отражением гетерогенности гепатоцитов в печени человека, обусловленной присутствием различных подтипов гепатоцитов с разными функциями в разных зонах печени (Kietzmann, 2017). В качестве альтернативы, наблюдаемая гетерогенность могла быть результатом вариабельности детектирования транскриптов, известной как «выпадение» (Haque et al., 2017). Авторы настоящего изобретения провели исследование, до какой степени перепрограммированные клетки воспроизводили профили экспрессии генов эталонных типов клеток. В целом авторы настоящего изобретения наблюдали высокий уровень соответствия между кластерами совпадающих типов клеток, идентифицированными в эталонных и перепрограммированных клетках (**фигура 9A-D**). Гены, которые устойчиво экспрессировались в эталонных взрослых гепатоцитах или криоконсервированных гепатоцитах, используемых в качестве внутреннего контроля, экспрессировались на сходных уровнях в кластере взрослых гепатоцитов из перепрограммированных клеток.

Гепатоциты в печени могут выполнять множество функций, включая метаболизм лекарственных средств и токсинов, регуляцию синтеза, расщепления, хранения и высвобождения глюкозы и липидов, синтез и хранение аминокислот и витаминов. Авторы настоящего изобретения сравнили экспрессию генов, отвечающих за

специфические функции гепатоцитов, в эталонных и перепрограммированных клетках (**фигура 10**). Перепрограммированные клетки из кластера взрослых гепатоцитов демонстрировали сходный профиль экспрессии генов с эталонными и контрольными гепатоцитами как по уровням экспрессии, так и по гетерогенности.

С целью беспристрастной и количественной оценки сходства взрослых гепатоцитоподобных клеток из перепрограммированных популяций с эталонными гепатоцитами, авторы настоящего изобретения использовали корреляционный анализ Пирсона для оценки различных классов клеток после иерархической кластеризации на основании полногеномной экспрессии генов. Эти результаты были нанесены на тепловую карту для демонстрации того, насколько хорошо разные кластеры коррелировали друг с другом (**фигура 11**). В поддержку результатов классификатора, была обнаружена почти идеальная корреляция между эталонными и контрольными криоконсервированными гепатоцитами. Перепрограммированные клетки, которые были классифицированы как взрослые гепатоциты, кластеризовались с двумя популяциями взрослых клеток на основании корреляционной матрицы, и это свидетельствовало о том, что их транскриптом был очень приближен к транскриптому взрослых гепатоцитов.

В целом, анализы scRNA-seq показывают, что перепрограммированные культуры содержали клетки, которые были идентичны первичным взрослым гепатоцитам в отношении профилей полногеномной экспрессии генов единичных клеток и демонстрировали некоторые характерные особенности экспрессии ключевых генов, включая гены, ассоциированные с метаболическими путями, специфичными для гепатоцитов. Неодинаковая экспрессия, наблюдаемая для меньшинства генов, может отражать выборку различных подтипов гепатоцитов, выделенных из печени и полученных *in vitro*. В качестве альтернативы, она может указывать на отсутствие оптимальной паракринной передачи сигналов или условия культивирования *in vitro*, которые могут быть усовершенствованы в дальнейшем. Профили экспрессии генов могут быть улучшены путем культивирования перепрограммированных клеток в оптимизированных условиях, разработанных для культивирования первичных гепатоцитов (Swift et al., 2010; Xiang et al., 2019).

Идентификация комбинаций TF, необходимых для перепрограммирования в гепатоциты

Перепрограммированные клетки, которые выравнивались со взрослыми гепатоцитами, экспрессировали различное число уникальных экзогенных

перепрограммирующих TF (eTF) на каждую клетку, находящееся в диапазоне от 1 до 16 (**фигура 12A**). Отдельные TF демонстрировали дифференциальную экспрессию в перепрограммированных популяциях (**фигура 12B и C**). На основании этого факта и литературных данных по клеточному перепрограммированию авторы настоящего изобретения изучили, будет ли достаточно 4 факторов транскрипции для перепрограммирования клеток в гепатоцитоподобные клетки. Для идентификации конкретных комбинаций 4 TF, которые могли приводить к перепрограммированию, авторы настоящего изобретения провели исследование, какие уникальные комбинации 4 TF из всех возможных комбинаций 4 TF, которые могли быть получены из набора 34 или 17 TF, были обнаружены в клетках, которые выравнивались с каждым типом эталонных клеток. Авторы настоящего изобретения определяли положение каждой комбинации TF на основании процентного содержания клеток, экспрессирующих ее, в кластере каждого типа клеток, и отбирали комбинации, которые экспрессировались в 20% или более клеток в данном кластере. Комбинации, обнаруженные в перепрограммированных клетках, которые кластеризовались со взрослыми гепатоцитами при скринингах 34 TF и 17 TF, были сопоставимыми, и они кратко приведены в **таблице 5 (фигура 12D)**. Аналогичным образом был проведен анализ для комбинаций TF, содержащих 3 TF, и полученные комбинации приведены в **таблице 6 (фигура 12E)**. Авторы настоящего изобретения предполагают, что конкретные комбинации TF, представленные в **таблицах 5 и 6**, отдельно или с добавлением других TF как, например, показано в настоящем документе, могут перепрограммировать iPSC в гепатоциты.

Валидация способа идентификации комбинаций TF путем демонстрации перепрограммирования с применением комбинации CREB3L3-FOXA1-NR1I2-HHEX

Для проверки того, может ли способ согласно настоящему изобретению, описанный выше, обеспечивать корректную идентификацию комбинаций TF, способных перепрограммировать клетки в гепатоцитоподобные клетки, авторы настоящего изобретения исследовали одну из наилучших идентифицированных комбинаций 4 TF – CREB3L3-FOXA1-NR1I2-HHEX – которая содержит 4 наиболее сильно экспрессируемых отдельных TF, обнаруженных в кластере взрослых гепатоцитов из перепрограммированных клеток.

На 8 сутки после трансдукции пулом лентивирусных частиц, несущим эти 4 TF (4TF-LV), появились клетки, экспрессирующие репортер ALB-RFP (**фигура 13A**), что

указывало на приобретение клетками идентичности печеночных клеток. К 14 дню колонии ALB⁺ становились больше, и их подмножество также экспрессировало репортер CYP3A4-GFP, что указывало на прогрессирование этих клеток до состояния, подобного взрослым гепатоцитам (**фигура 13A**). Важно отметить, что необработанные iPSC не индуцировали ни один из печеночных репортеров. Некоторые негативные по репортерам клетки также были обнаружены в культурах 4TF-LV, однако это, вероятно, обусловлено тем, что не все 4 TF были введены в каждую единичную клетку в культуре при применении пула лентивирусных частиц, которые переносили отдельные факторы независимо. Авторы настоящего изобретения также наблюдали некоторую гетерогенную экспрессию репортера CYP3A4 в кластерах клеток ALB⁺, что могло происходить по одной или более из следующих причин: (1) присутствие в колониях CYP3A4-гепатоцитоподобных клеток, как и в печени взрослого, (2) в некоторых клетках ALB⁺ могли отсутствовать один или более из eTF, необходимых для экспрессии CYP3A4⁺, из-за отсутствия интеграции в геном или (3) выключения экспрессии лентивирусного трансгена в течение периода культивирования.

Авторы настоящего изобретения исследовали экспрессию специфических белков, ассоциированных с функциями гепатоцитов, включая CYP3A4, CYP1A2, CYP2D6 и CYP2C9 (фаза I метаболизма лекарственных средств), UGT1A1 (фаза II метаболизма), ASGR1 (сывороточный гомеостаз) и PCK2 (гомеостаз глюкозы), с использованием специфических антител (**фигура 13B**). Все белки экспрессировались в культурах 4TF-LV и обнаруживали высокий уровень перекрытия с экспрессией ALB и CYP3A4, демонстрируя, что комбинация CREB3L3-FOXA1-NR1I2-HHEX могла приводить клетки в гепатоцитоподобное состояние с экспрессией множества белков, участвующих в функционально независимых путях, функционирующих в гепатоцитах печени взрослого.

Для оценки того, могут ли гепатоцитоподобные клетки, полученные путем перепрограммирования, выполнять функции взрослых гепатоцитов, авторы настоящего изобретения подвергли клетки анализу CYP3A4-зависимого метаболизма лекарственных средств, известному как анализ CYP3A4-GLO (Promega). Для этого клетки обрабатывали люминогенным субстратом, который превращается в продукт люциферин под действием CYP3A4, и измеряли люминесценцию в качестве считываемых данных (**фигура 13C**). Клетки гепатокарциномы Huh7 и HepG2 использовали в качестве положительного контроля, поскольку эти клетки приняты в

моделях *in vitro* для изучения метаболизма лекарственных средств, и их обычно применяют для исследования активности цитохрома P450 (Bulutoglu et al., 2020). Клетки, перепрограммированные с помощью CREB3L3-FOXA1-NR1I2-HHEX из 3 независимых линий iPSC (4TF-LV), демонстрировали функциональные уровни, которые на несколько порядков превышали таковые для контрольных клеток Huh7 и HepG2. Эти результаты показывают, что перепрограммированные клетки сформировали функциональный путь метаболизма лекарственных средств, который включает поглощение субстрата/лекарственного средства, окисление за счет активности цитохрома P450 и экспорт побочных продуктов за пределы клеток.

Взаимодополняющие активности FOXA1, HHEX и NR1I2 используются для перепрограммирования с применением CREB3L3-FOXA1-NR1I2-HHEX

Авторы настоящего изобретения стремились определить, может ли предложенный ими способ идентификации комбинаций TF обеспечивать идентификацию конкретных комбинаций TF для успешного перепрограммирования. С этой целью авторы настоящего изобретения проверили, происходит ли еще перепрограммирование, если отдельный TF исключен из комбинации CREB3L3-FOXA1-NR1I2-HHEX (**фигура 14**). Авторы настоящего изобретения обнаружили, что исключение FOXA1 устраняло прогрессирование iPSC в печеночные клетки ALB+ на 8 сутки и в клетки ALB+/CYP3A4+ на 14 сутки перепрограммирования, и это свидетельствует о том, что FOXA1 задействован в начальной фазе перепрограммирования, когда клетки приобретают раннюю печеночную идентичность, что отражается наличием экспрессии ALB. После исключения HHEX клетки ALB+ не были обнаружены на 8 сутки, однако колонии ALB+ и ALB+/CYP3A4+ появлялись к 14 суткам, хотя и в меньших количествах по сравнению с комбинацией 4TF. Интересно, что исключение NR1I2 не влияло на прогрессирование iPSC в клетки ALB+, однако устраняло образование клеток ALB+/CYP3A4+ на 14 сутки. Тем не менее, удаление CREB3L3 не приводило к каким-либо заметным изменениям в перепрограммировании, исходя из экспрессии репортеров ALB и CYP3A4. В целом эти результаты демонстрируют, что каждый из FOXA1, HHEX и NR1I2 выполняет уникальные функции в процессе перепрограммирования и каждый из них используется в контексте перепрограммирования с комбинацией CREB3L3-FOXA1-NR1I2-HHEX. Более того, FOXA1-NR1I2-HHEX достаточно для перепрограммирования и прогрессирования в состояние ALB+/CYP3A4+, без необходимости в CREB3L3. Однако следует отметить,

что, поскольку данные, полученные авторами настоящего изобретения, ограничивались экспрессией репортеров ALB и CYP3A4, то в настоящее время авторы не могут исключить влияние удаления CREB3L3 на другие характеристики перепрограммированных клеток, такие как активность функциональных путей, так как было показано, что CREB3L3 участвует в некоторых метаболических процессах в печени взрослого (Khan & Margulies, 2019).

FOXA3 может заменять FOXA1 при перепрограммировании в гепатоцитоподобные клетки

FOXA1 является представителем подсемейства FOXA (также известного как подсемейство HNF3) факторов транскрипции FOX. Подсемейство FOXA включает структурно родственные белки FOXA1, FOXA2 и FOXA3 (Golson and Kaestner, 2016). Все 3 белка экспрессируются в процессе развития печени, и их экспрессия сохраняется в печени во взрослом возрасте. В нескольких исследованиях на мышах было показано, что эти 3 фактора FOXA могут компенсировать друг друга, в том числе в печени во время эмбрионального развития и взрослой жизни (Iwafuchi-Doi et al., 2016; Kaestner et al., 1999; Lee et al., 2005; Shen et al., 2001). FOXA3 сильно экспрессируется в перепрограммированных клетках, которые кластеризуются со взрослыми гепатоцитами (**фигура 12В и С**) и легко детектируется в комбинациях TF с высокой частотой экспрессии (**таблица 5 и 6**). Авторы настоящего изобретения провели исследование, может ли FOXA3 в комбинации с CREB3L3, NR1I2 и HHEX перепрограммировать iPSC в гепатоцитоподобные клетки ALB+/CYP3A4+. Для этого авторы настоящего изобретения параллельно подвергали iPSC перепрограммированию путем гиперэкспрессии CREB3L3-FOXA1-NR1I2-HHEX или CREB3L3-FOXA3-NR1I2-HHEX (**фигура 15**). Обе культуры давали сходное число клеток ALB+/CYP3A4+, и это демонстрировало, что FOXA3 может быть взаимозаменяемым с FOXA1 в процессе перепрограммирования в гепатоцитоподобные клетки, что согласуется с наблюдением FOXA3 в комбинациях TF, обнаруженных в перепрограммированных клетках, которые кластеризуются со взрослыми гепатоцитами (**таблица 5 и 6**).

NR1I3 может заменять NR1I2 при перепрограммировании в гепатоцитоподобные клетки

NR1I2 и NR1I3 являются функционально и структурно родственными TF из семейства ядерных рецепторов (Banerjee et al., 2015). Авторы настоящего изобретения провели исследование, возможно ли обеспечить перепрограммирование при

комбинировании NR1I3 с CREB3L3, FOXA1 и HHEX (**фигура 16**). В культурах, параллельно подвергнутых перепрограммированию с применением CREB3L3-FOXA1-NR1I2-HHEX или CREB3L3-FOXA1-NR1I3-HHEX, клетки ALB+/CYP3A4+ были детектируемыми на 13 сутки на сходных уровнях, и это демонстрировало, что может существовать потенциальное функциональное сходство между NR1I2 и NR1I3 в контексте перепрограммирования гепатоцитов.

Способы

Получение лентивирусных векторов, кодирующих перепрограммирующие TF, и трансдукция

Последовательность, кодирующую отдельный TF, клонировали в лентивирусный вектор (LV). Лентивирусные векторы получали и титровали с применением стандартных способов.

Получение линий iPSC, несущих репортеры альбумин и CYP3A4

Репортерные линии клеток были созданы с применением стандартных способов редактирования генов. Вкратце, были сконструированы две донорные плазмиды для встраивания с помощью репарации, направляемой гомологией (HDR), по одной плазмиде для альбумина и CYP3A4, которые обеспечивали встраивание перед стоп-кодоном природных генов пептида P2A, за которым следовала последовательность, кодирующая красный или зеленый флуоресцентный белок (для альбумина или CYP3A4, соответственно). Эти донорные плазмиды вводили в линии iPSC по сайтам соответствующих генетических локусов с использованием HDR. Были выделены клональные линии iPSC, и с помощью ПЦР-генотипирования было показано, что они содержали целевую вставку.

Культивирование клеток и трансдукция лентивирусным вектором

Линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) обычно культивировали в среде Essential 8 (E8) (ThermoFisher Scientific) на стандартных планшетах для тканевых культур, покрытых реагентом Vitronectin (Life Technologies). Клетки пересеивали группами каждые 3-6 суток с использованием 0,5 mM EDTA/Tris (Life Technologies). За сутки до трансдукции (сутки -1) iPSC однократно промывали PBS и подвергали диссоциации до единичных клеток путем обработки TrypLE (Life Technologies). Клетки подсчитывали и высевали при плотности 12500 клеток на см² в E8 (Supp) с добавлением 10 мкМ ингибитора ROCK, Y-27632. На следующие сутки (сутки 0) пул лентивирусных векторов (LV), состоящий из всех или подмножества из 39 TF,

ресуспендировали в культуральной среде, применяемой Ангом и соавторами (Ang *et al.*, 2018), с модификациями, и добавляли 10 мкг/мл протамина сульфата (PS). Среду E8 заменяли на среду, содержащую LV. На следующие сутки (сутки 1) среду заменяли на свежую культуральную среду и обновляли ее через сутки.

Флуоресцентная микроскопия и иммунофлуоресцентное окрашивание

Для детекции альбумин-2A-RFP и CYP3A4-2A-GFP получали изображения клеток с использованием микроскопа Revolve4 (Echo Labs). Для иммунофлуоресцентного окрашивания использовали следующие антитела: CYP2C9 (Abcam, ab4236), CYP3A4 (Santa Cruz Biotechnology, sc53850), UGT1A1 (R&D Systems).

Сортировка клеток и секвенирование РНК единичных клеток (SC RNA-seq)

Для проведения FACS культуры подвергали диссоциации до единичных клеток на 11 сутки после LV трансдукции и ресуспендировали в культуральной среде. Подвергнутые сортировке популяции клеток обрабатывали в соответствии со стандартным протоколом, рекомендованным 10x Genomics.

ССЫЛКИ

Aizarani *et al.* (2019). A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors. *Nature* 572(7768):199-204

Ang *et al.* (2018). A Roadmap for Human Liver Differentiation from Pluripotent Stem Cells. *Cell Reports* 22(8):2190-2205

Banerjee *et al.* (2015). Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR in human diseases. In *Drug Discovery Today* (Vol. 20, Issue 5, pp. 618–628). Elsevier Ltd.

Becht *et al.* (2019). Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nature Biotechnology*, 37(1), 38–47.

Bulutoglu *et al.* (2020). A comparison of hepato-cellular in vitro platforms to study CYP3A4 induction. *PLOS ONE*, 15(2), e0229106.

Cerbini *et al.* (2015) *PLOS One*, 10(1): e0116032

Golson and Kaestner, (2016) Fox transcription factors: From development to disease. *Development* (Cambridge), 143(24), 4558–4570

Gossen *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (12): 5547–51#

Haque *et al.* (2017). A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications. In *Genome Medicine* (Vol. 9, Issue 1). BioMed Central Ltd.

Iwafuchi-Doi *et al.* (2016). The Pioneer Transcription Factor FoxA Maintains an Accessible Nucleosome Configuration at Enhancers for Tissue-Specific Gene Activation. *Molecular Cell*, 62(1), 79–91.

Iansante *et al.* (2018). Human hepatocyte transplantation for liver disease: current status and future perspectives. *Pediatric Research* 2018 83(1-2):232-240

Kaestner *et al.* (1999). Inactivation of the winged helix transcription factor HNF3 α affects glucose homeostasis and islet glucagon gene expression in vivo. *Genes and Development*, 13(4), 495–504.

Khan & Margulies (2019). The role of mammalian Creb3-like transcription factors in response to nutrients. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 10, Issue JUN, p. 591). Frontiers Media S.A.

Kietzmann, T. (2017). Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. In *Redox Biology* (Vol. 11, pp. 622–630). Elsevier B.V.

Lee *et al.* (2005). Foxa2 is required for the differentiation of pancreatic α -cells. *Developmental Biology*, 278(2), 484–495. MacParland *et al.* (2018). Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nature Communications* 9(1):4383

Nishikawa *et al.* (2015). Resetting the transcription factor network reverses terminal chronic hepatic failure. *Journal of Clinical Investigation* 125(4):1533-44

Papapetrou *et al.* (2011) *Nature Biotechnology*, 29(1): 73–8

Popescu *et al.* (2019). Decoding human fetal liver haematopoiesis. *Nature*, 574(7778), 365–371. Qian *et al.* (2012). In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*. 485(7400):593-8

Segal *et al.* (2019). Single cell analysis of human fetal liver captures the transcriptional profile of hepatobiliary hybrid progenitors. *Nature Communications* 10(1):3350

Selden *et al.* (2017) *Scientific Reports* 7: 14518

Shen *et al.* (2001). Foxa3 (Hepatocyte Nuclear Factor 3 γ) is Required for the Regulation of Hepatic GLUT2 Expression and the Maintenance of Glucose Homeostasis during a Prolonged Fast. *Journal of Biological Chemistry*, 276(46), 42812–42817.

Swift *et al.* (2010). Sandwich-cultured hepatocytes: An in vitro model to evaluate hepatobiliary transporter-based drug interactions and hepatotoxicity. In *Drug Metabolism Reviews* (Vol. 42, Issue 3, pp. 446–471). Informa Healthcare.

Wang et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8180-8184

Williams DP. (2018). Application of hepatocyte-like cells to enhance hepatic safety risk assessment in drug discovery. *Philosophical Transactions. The Royal Society B Biological Sciences* 373(1750)

Xiang *et al.* (2019). Long-term functional maintenance of primary human hepatocytes in vitro. *Science*, 364(6438), 399–402.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения печеночных клеток, включающий повышение экспрессии по меньшей мере трех или более факторов транскрипции, где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из: FOXA1 или FOXA3; NR1I2 или NR1I3; HHEX; CREB3L3; GATA4; KLF9; ATF5; MLXIPL; FOXA2; AR; ARID3C; CEBPA; CUX2; EPAS1; HLF; HNF1A; HNF4A; HNF4G; KLF15; NCOA2; NR0B2; NR1H4; NR5A2; ONECUT1; ONECUT2; PPARA; PROX1; RORA; RORC; RXRA; SALL1; SMAD1; SREBF1; STAT3; TSHZ2; XBP1; ZBTB16 и их вариантов, в популяции непеченочных клеток и культивирование указанной популяции клеток с получением печеночных клеток.

2. Способ по п. 1, где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из: (1) FOXA1, FOXA2 или FOXA3, (2) NR1I2 или NR1I3 и (3) одного или более из: HHEX, CREB3L3, GATA4, KLF9, ATF5, MLXIPL, ARID3C, CUX2, HNF4A, HNF4G, NR0B2, ONECUT1, ONECUT2, RXRA, SALL1, SREBF1 и их вариантов.

3. Способ по п. 2, где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из: (1) FOXA1, FOXA2 или FOXA3; (2) NR1I2 или NR1I3 и (3) одного или более из: HHEX, CREB3L3, GATA4, KLF9, ATF5, MLXIPL, HNF4A, HNF4G, ONECUT1, RXRA, SREBF1 и их вариантов.

4. Способ по п. 3, где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из: (1) FOXA1, FOXA2 или FOXA3; (2) NR1I2 или NR1I3 и (3) одного или более из: HHEX, CREB3L3, GATA4, KLF9, ATF5, MLXIPL, HNF4A, RXRA, SREBF1 и их вариантов.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где указанные три фактора транскрипции включают FOXA1, CREB3L3, NR1I2 или их варианты.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где указанные три фактора транскрипции включают FOXA1, HHEX, NR1I2 или их варианты.

7. Способ по любому из пп. 1-6, включающий повышение экспрессии FOXA1, CREB3L3, NR1I2, HHEX или их вариантов.

8. Способ по любому из пп. 1-7, включающий повышение экспрессии по меньшей мере четырех или более факторов транскрипции, в частности пяти, шести или семи, или более факторов транскрипции.

9. Способ по любому из пп. 1-8, включающий повышение экспрессии от трех до семи факторов транскрипции.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где указанная популяция непеченочных клеток содержит исходные клетки.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где указанная популяция непеченочных клеток содержит плюрипотентные стволовые клетки, в частности индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

12. Способ по любому из пп. 1-11, включающий получение печеночных клеток путем клеточного перепрограммирования плюрипотентных стволовых клеток или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где указанные печеночные клетки представляют собой печеночные клетки человека.

14. Способ по любому из пп. 1-13, дополнительно включающий мониторинг популяции клеток в отношении по меньшей мере одной характеристики печеночной клетки.

15. Способ по п. 14, где указанная характеристика выбрана из одного или более из:

(1) экспрессии одного или более маркеров печеночных клеток, таких как глюкозо-6-фосфатаза, альбумин, α 1-антитрипсин (AAT), фумарилацетоацетаза (FAH), цитокератин 8 (CK8), цитокератин 18 (CK18), асиалогликопротеиновый рецептор (ASGR), алкогольдегидрогеназа 1, аргиназа типа I, цитохром p450 3A4 (CYP3A4), цитохром p450 2C9 (CYP2C9), семейство UDP(уридин-5-дифосфат)-глюкуронозилтрансферазы 1, полипептид A1 (UGT1A1), специфичный для печени транспортер органических анионов (LST-1) или их комбинация;

(2) активности глюкозо-6-фосфатазы, CYP3A4, CYP2C9, синтеза и секреции альбумина, выработки или секреции желчи, выработки мочевины или детоксикации ксенобиотиков; или

(3) морфологических признаков печеночных клеток.

16. Способ по п. 14 или п. 15, где указанная характеристика включает маркер печеночных клеток, выбранный из альбумина и CYP3A4.

17. Способ по любому из пп. 1-16, в котором экспрессию указанных факторов транскрипции повышают путем приведения популяции клеток в контакт с факторами

транскрипции или одним или более чем одним агентом, который активирует или повышает экспрессию или количество факторов транскрипции.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где экспрессия указанных факторов транскрипции находится под контролем транскрипции.

19. Способ по любому из пп. 1-18, в котором последовательность, кодирующую один или более указанных факторов транскрипции, вводят в популяцию клеток с применением способа, включающего:

- направленное встраивание кодирующей последовательности для белка-регулятора транскрипции в первый генетически безопасный сайт-гавань клетки; и
- направленное встраивание индуцируемой кассеты во второй генетически безопасный сайт-гавань клетки, где указанная индуцируемая кассета содержит указанную последовательность фактора транскрипции, функционально связанную с индуцируемым промотором, и указанный промотор регулируется белком-регулятором транскрипции.

20. Способ по любому из пп. 1-19, включающий культивирование в подходящих условиях в течение по меньшей мере 4 суток.

21. Способ получения печеночных клеток из исходной клетки, включающий стадии:

а) направленного встраивания гена, кодирующего белок-регулятор транскрипции, в первый генетически безопасный сайт-гавань исходной клетки; и

б) направленного встраивания по меньшей мере трех или более факторов транскрипции, где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из: FOXA1 или FOXA3; NR1I2 или NR1I3; HHEX; CREB3L3; GATA4; KLF9; ATF5; MLXIPL; FOXA2; AR; ARID3C; CEBPA; CUX2; EPAS1; HLF; HNF1A; HNF4A; HNF4G; KLF15; NCOA2; NR0B2; NR1H4; NR5A2; ONECUT1; ONECUT2; PPARA; PROX1; RORA; RORC; RXRA; SALL1; SMAD1; SREBF1; STAT3; TSHZ2; XBP1; ZBTB16 и их вариантов, функционально связанных с индуцируемым промотором во втором генетически безопасном сайте-гавани исходной клетки, при этом указанный индуцируемый промотор регулируется белком-регулятором транскрипции; и

в) культивирования исходной(ых) клетки(ок), содержащей(их) вставки, с получением печеночных клеток.

22. Применение по меньшей мере трех или более факторов транскрипции, где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из:

FOXA1 или FOXA3; NR1I2 или NR1I3; HHEX; CREB3L3; GATA4; KLF9; ATF5; MLXIPL; FOXA2; AR; ARID3C; CEBPA; CUX2; EPAS1; HLF; HNF1A; HNF4A; HNF4G; KLF15; NCOA2; NR0B2; NR1H4; NR5A2; ONECUT1; ONECUT2; PPARA; PROX1; RORA; RORC; RXRA; SALL1; SMAD1; SREBF1; STAT3; TSHZ2; XBP1; ZBTB16 и их вариантов, для получения печеночных клеток.

23. Клетка, получаемая любым из способов по пп. 1-21.

24. Клетка, содержащая одну или более экзогенных кассет экспрессии, кодирующих по меньшей мере три или более факторов транскрипции, где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из: FOXA1 или FOXA3; NR1I2 или NR1I3; HHEX; CREB3L3; GATA4; KLF9; ATF5; MLXIPL; FOXA2; AR; ARID3C; CEBPA; CUX2; EPAS1; HLF; HNF1A; HNF4A; HNF4G; KLF15; NCOA2; NR0B2; NR1H4; NR5A2; ONECUT1; ONECUT2; PPARA; PROX1; RORA; RORC; RXRA; SALL1; SMAD1; SREBF1; STAT3; TSHZ2; XBP1; ZBTB16 и их вариантов.

25. Клетка по п. 23 или п. 24, которая представляет собой сконструированную печеночную клетку.

26. Клетка по любому из пп. 23-25, где указанные три или более факторов транскрипции интегрированы в геном клетки.

27. Клетка по п. 26, где указанные три или более факторов транскрипции интегрированы в сайт-мишень клетки.

28. Клетка по любому из пп. 23-27 для применения в терапии.

29. Набор для дифференцировки клетки в печеночную клетку, содержащий:

(1) исходную клетку и агент, который активирует или повышает экспрессию или количество по меньшей мере трех или более факторов транскрипции; и/или

(2) одну или более кассет экспрессии, кодирующих по меньшей мере три или более факторов транскрипции,

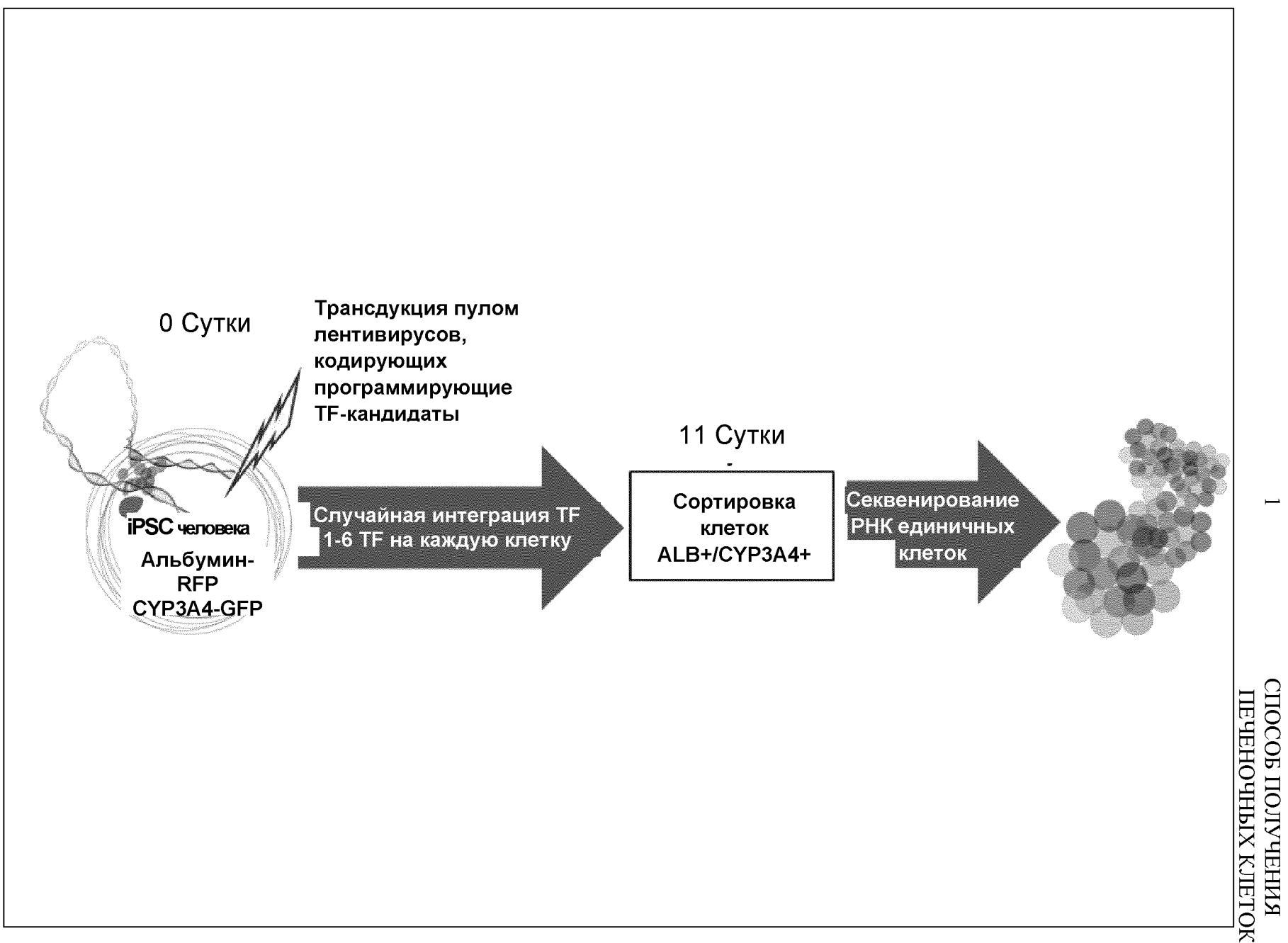
где указанные три или более факторов транскрипции выбраны из группы, состоящей из: FOXA1 или FOXA3; NR1I2 или NR1I3; HHEX; CREB3L3; GATA4; KLF9; ATF5; MLXIPL; FOXA2; AR; ARID3C; CEBPA; CUX2; EPAS1; HLF; HNF1A; HNF4A; HNF4G; KLF15; NCOA2; NR0B2; NR1H4; NR5A2; ONECUT1; ONECUT2; PPARA; PROX1; RORA; RORC; RXRA; SALL1; SMAD1; SREBF1; STAT3; TSHZ2; XBP1; ZBTB16 и их вариантов.

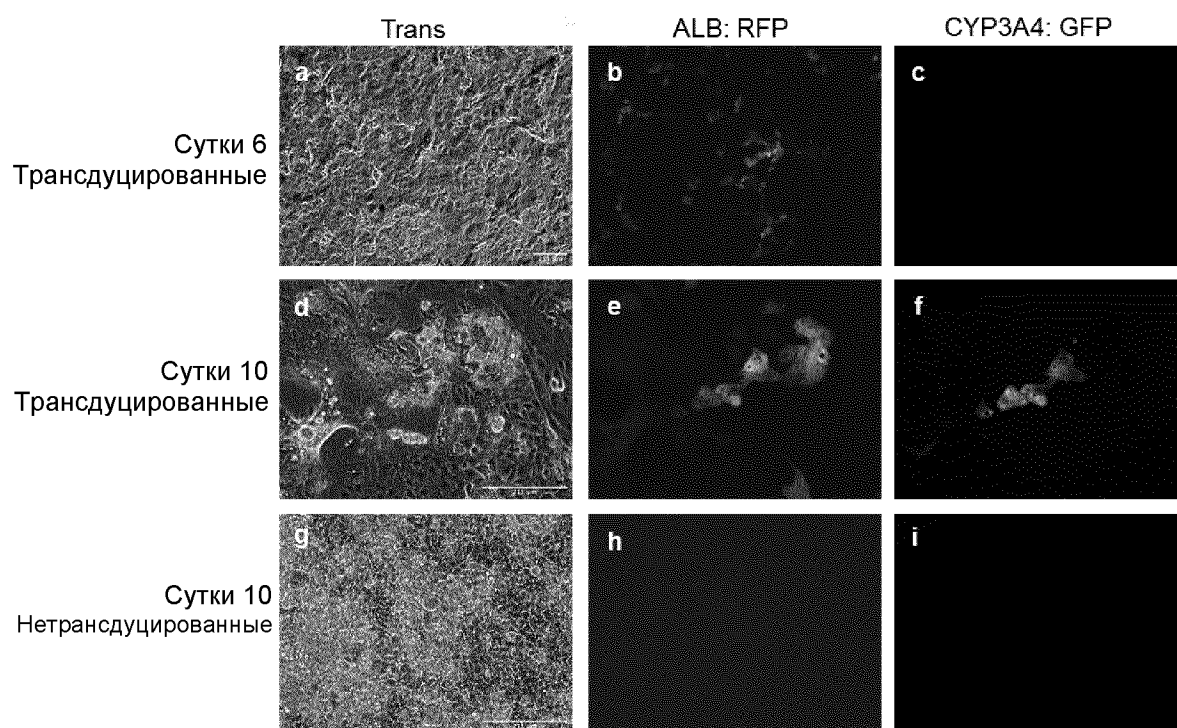
30. Применение набора по п. 29 для дифференцировки клетки в печеночную клетку.

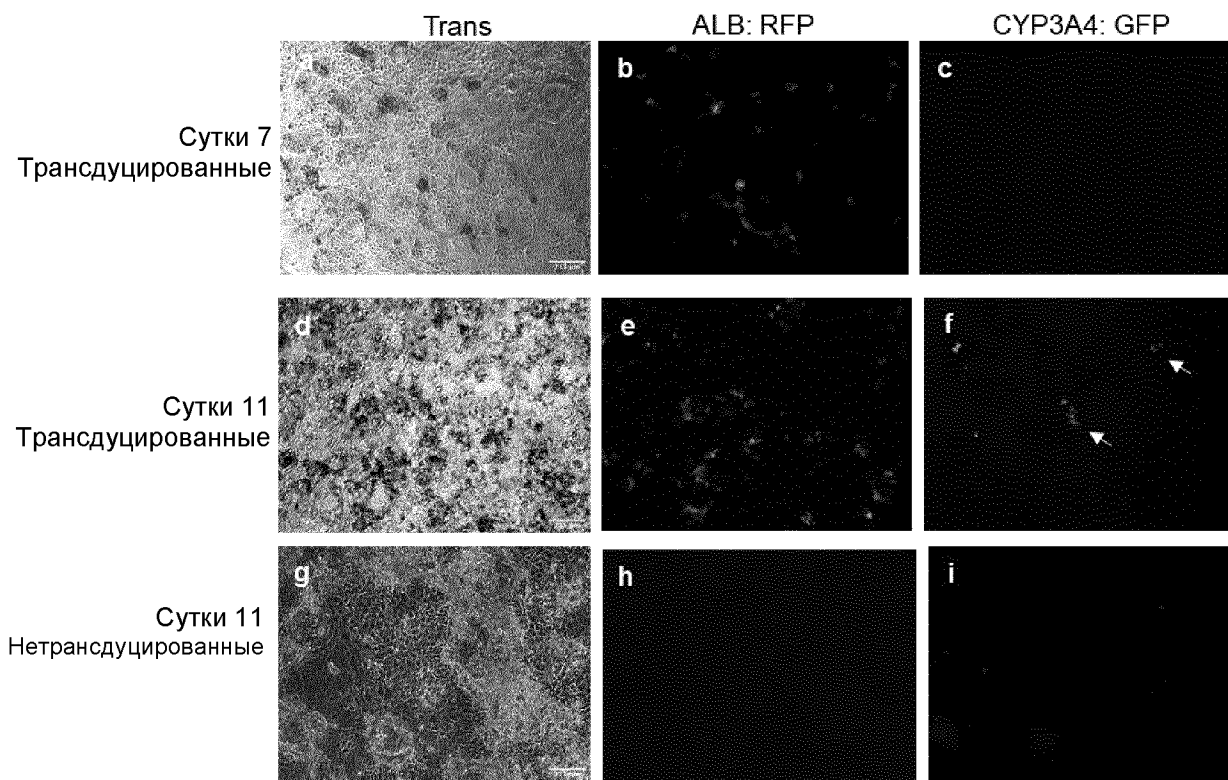
31. Способ скрининга лекарственных средств, включающий приведение печеночной клетки, полученной с применением способа по любому из пп. 1-21, или печеночной клетки по любому из пп. 23-28 в контакт с лекарственным средством и наблюдение изменения в указанных печеночных клетках, вызванного лекарственным средством, или изменения метаболизма лекарственного средства.

32. Способ лечения субъекта, имеющего заболевание или дисфункцию печени или подверженного риску их развития, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества печеночных клеток, полученных с применением способа по любому из пп. 1-21, или печеночных клеток по любому из пп. 23-28.

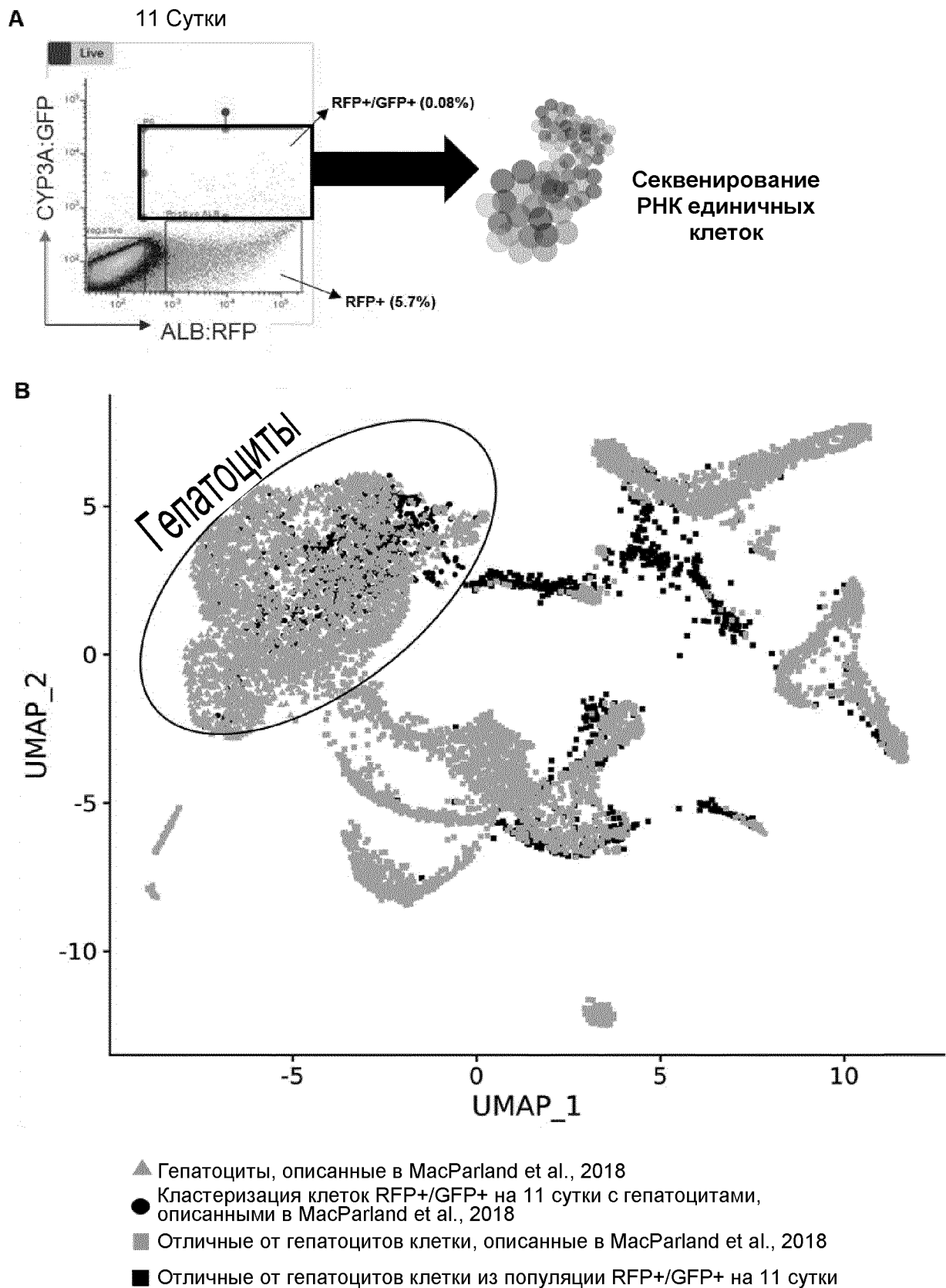
ФИГУРА 1



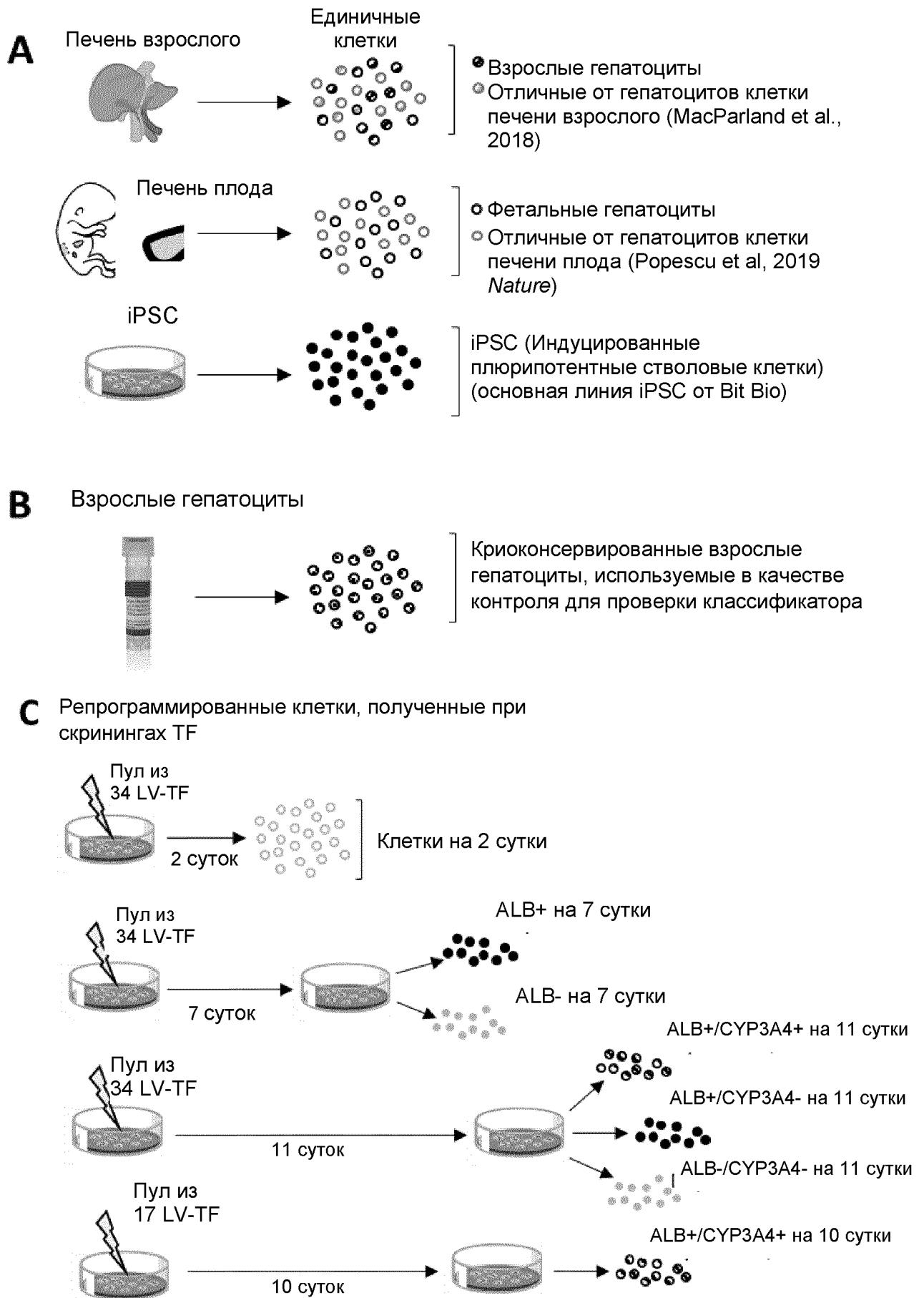
**ФИГУРА 2**



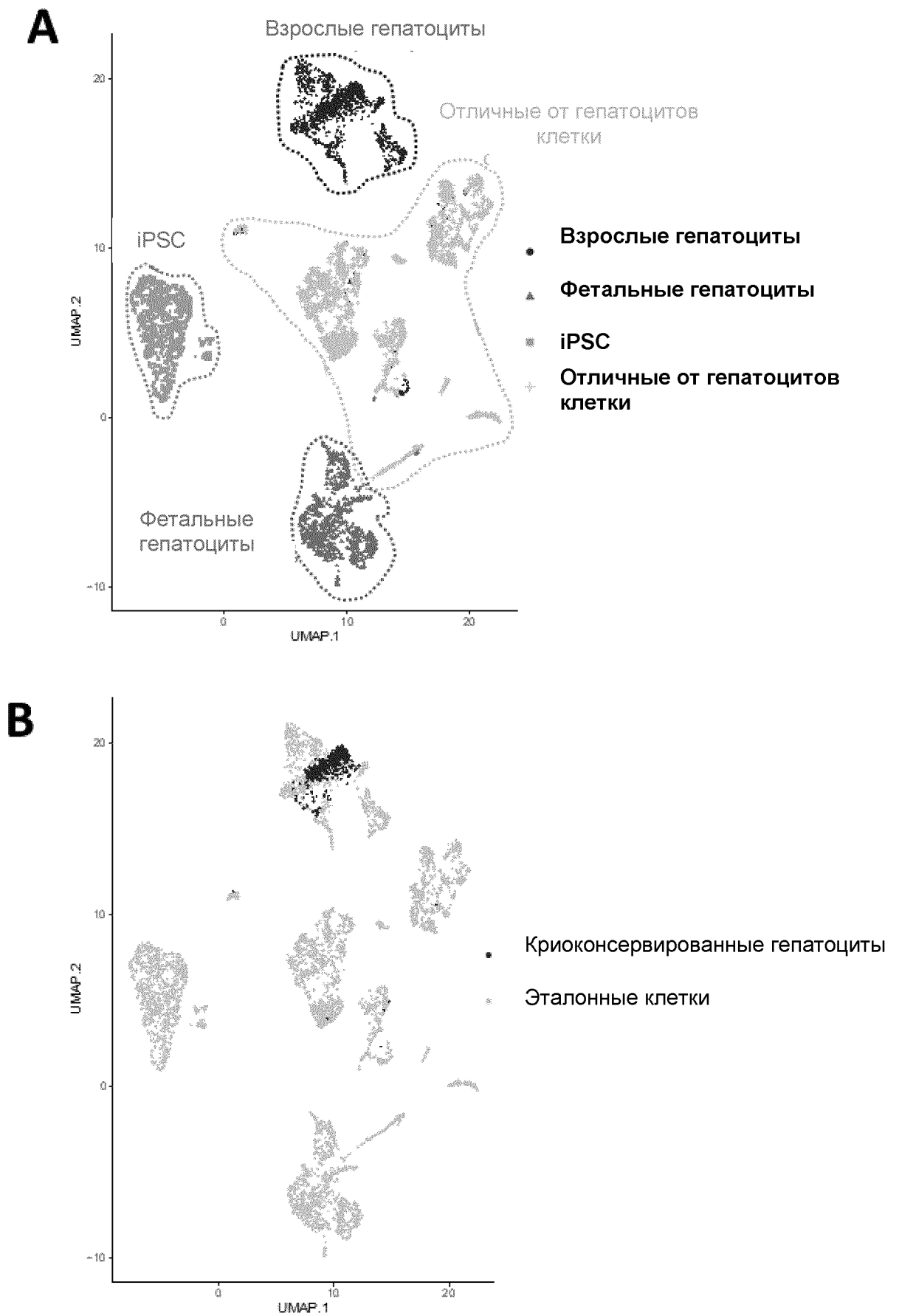
ФИГУРА 3



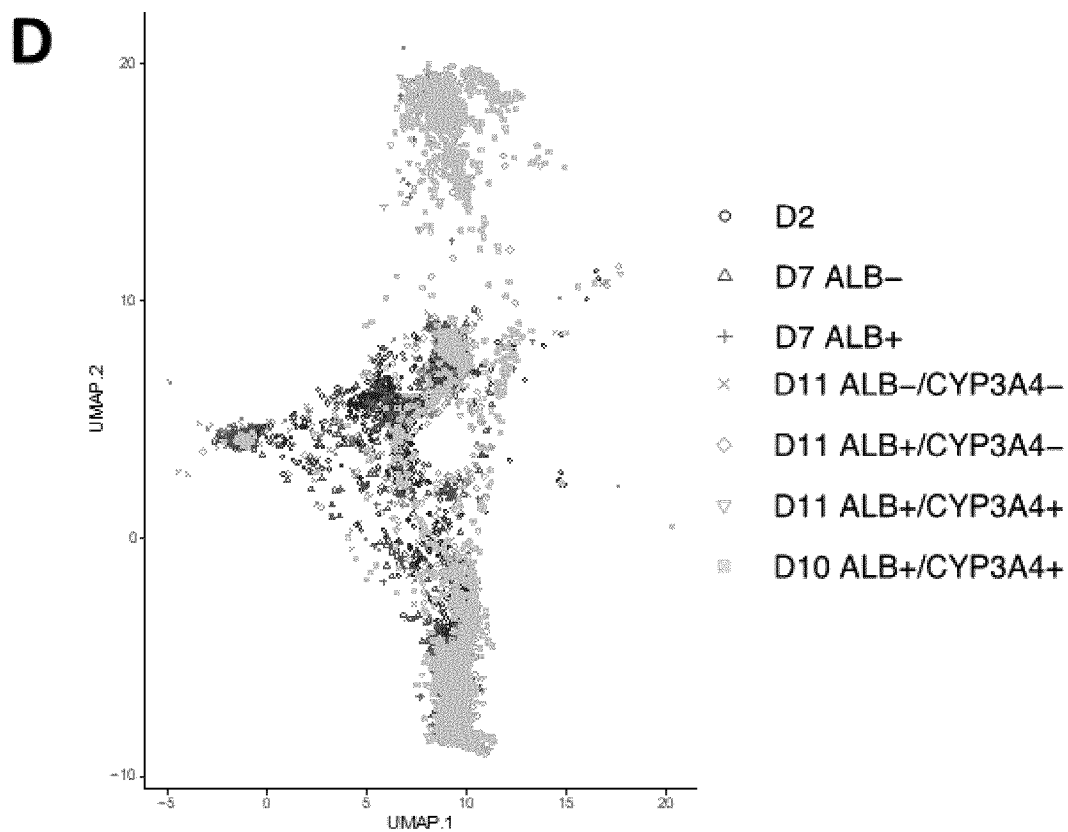
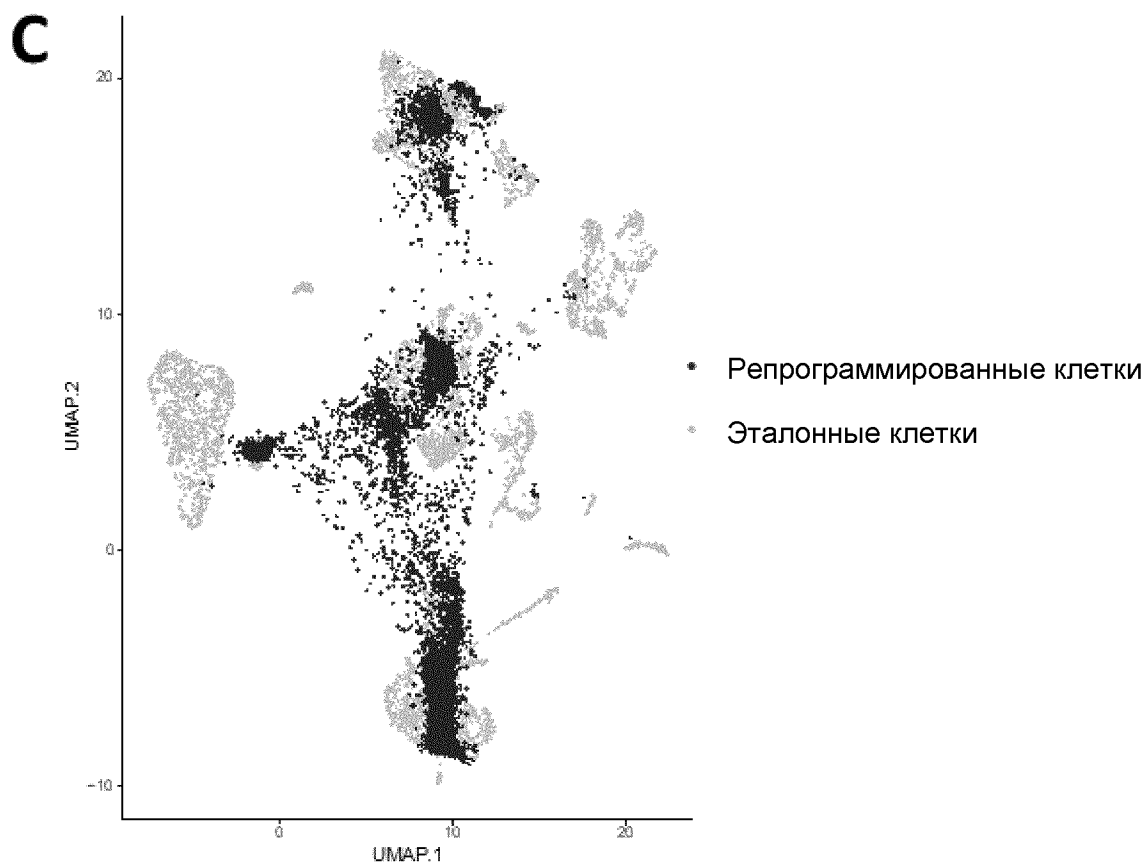
ФИГУРА 4



ФИГУРА 5



ФИГУРА 6

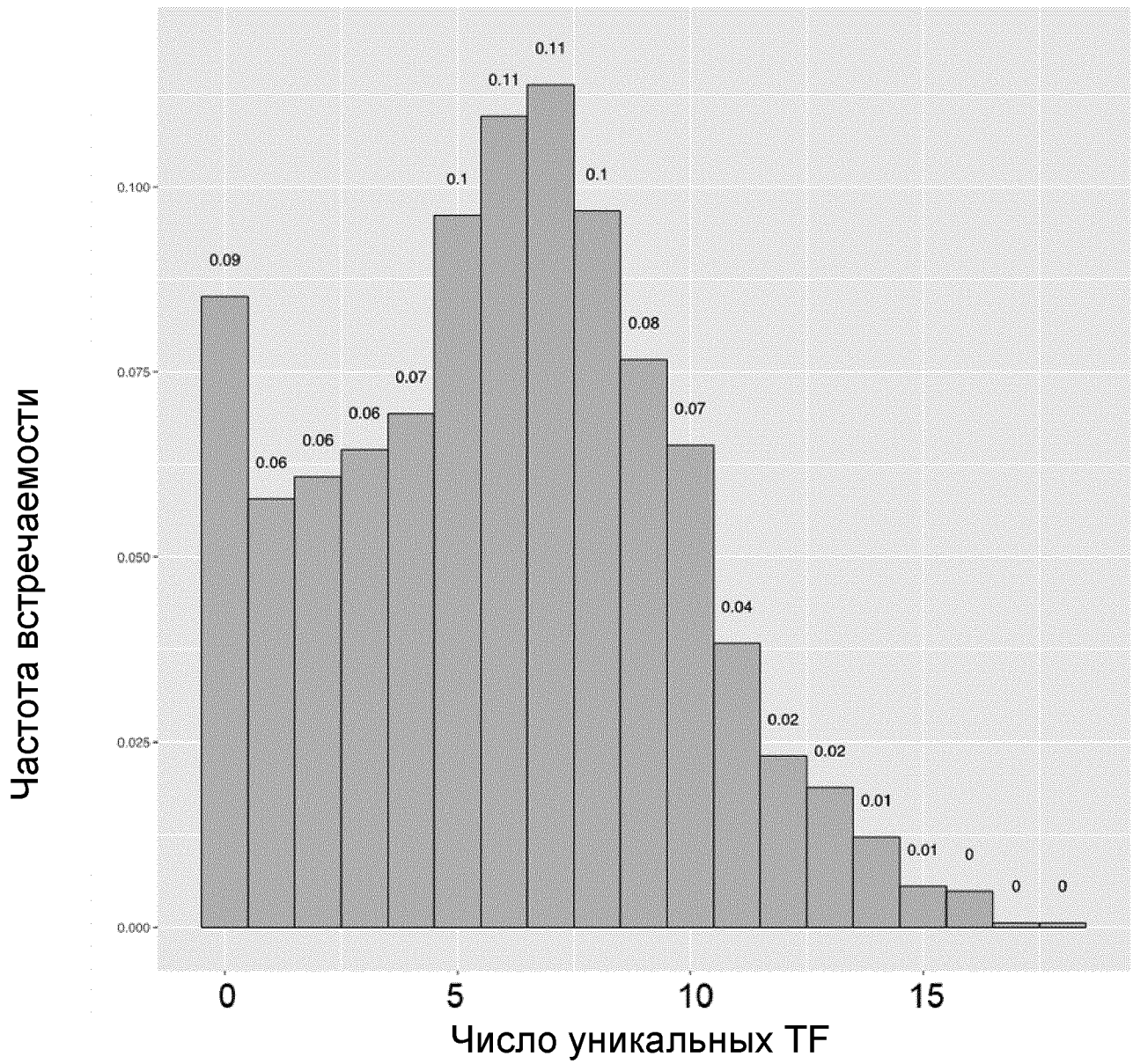


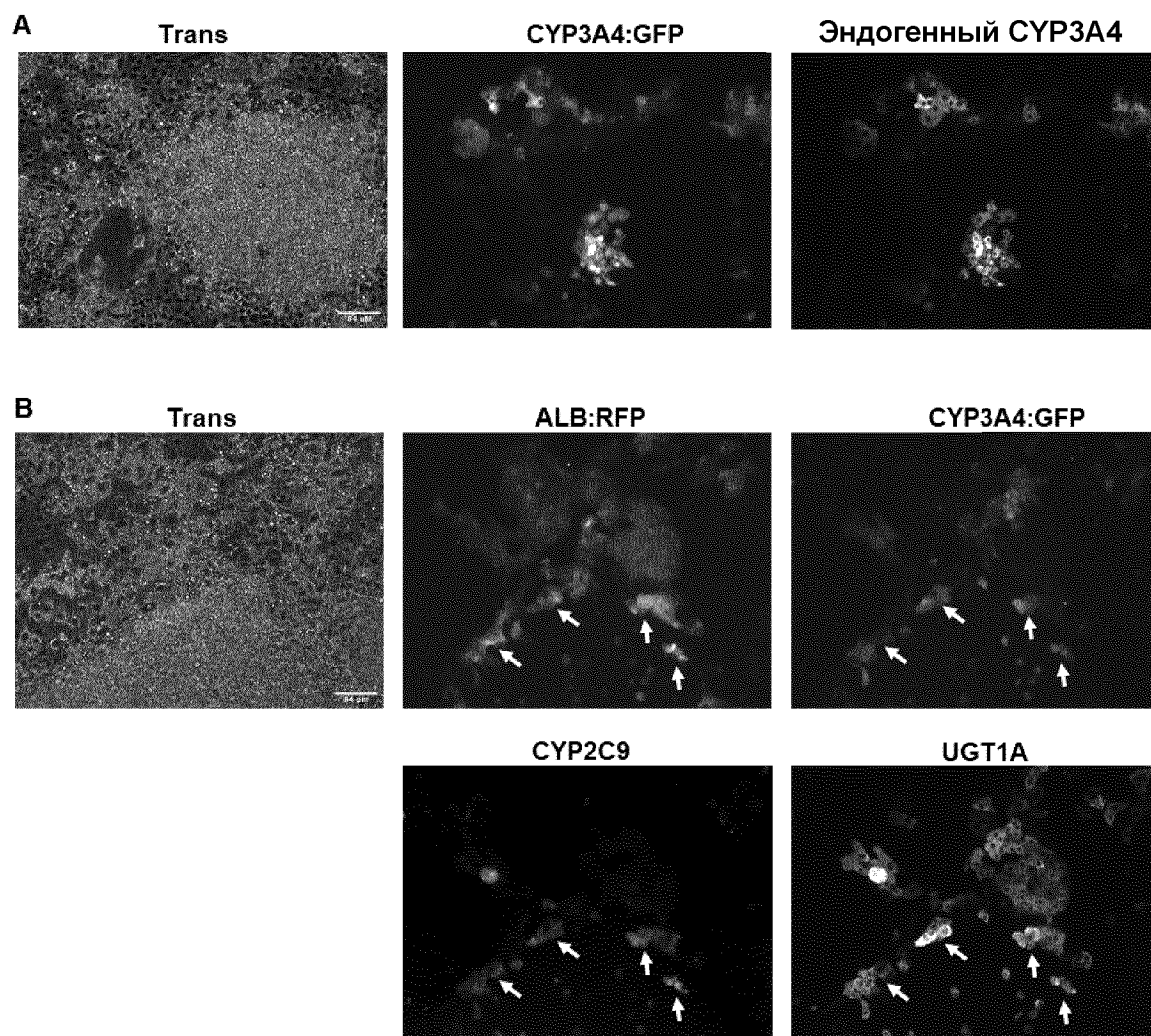
ФИГУРА 6 (продолжение)

Е

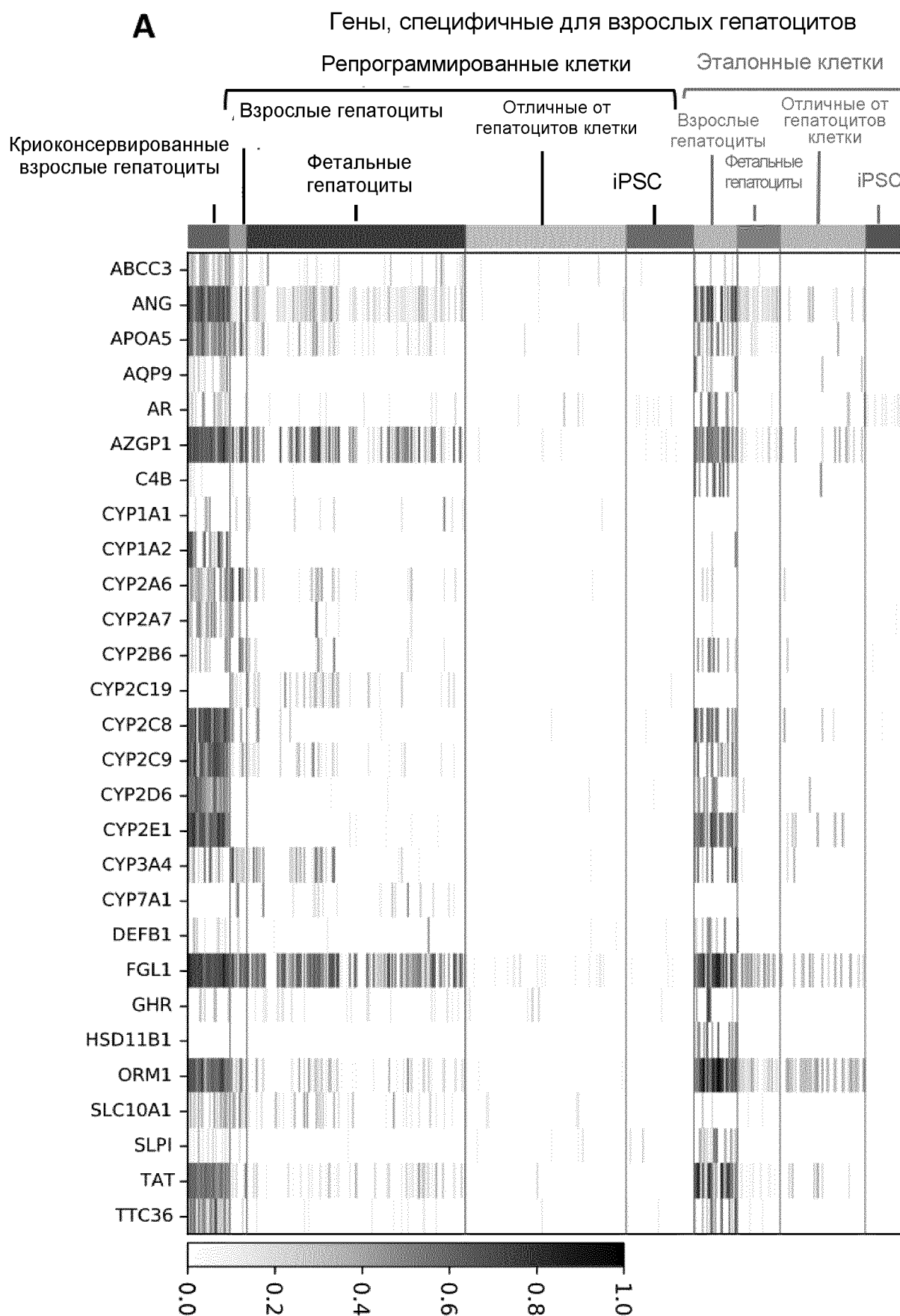
Репрограммированные клетки от Bit Bio	iPSC	Отличные от гепатоцитов клетки	Фетальные гепатоциты	Взрослые гепатоциты
2 день	18.42	73.58	7.23	0.76
ALB- на 7 день	32.25	22.63	23.30	0.02
ALB+ на 7 день	1.95	1.69	72.50	1.77
ALB-/CYP3A4- на 11 день	31.77	62.23	5.89	0.14
ALB+/CYP3A4- на 11 день	4.48	50.28	40.71	4.52
ALB+/CYP3A4+ на 11 день	1.07	9.93	75.59	13.41
ALB+/CYP3A4+ на 10 день	0.85	7.67	69.41	22.08

ФИГУРА 6 (продолжение)

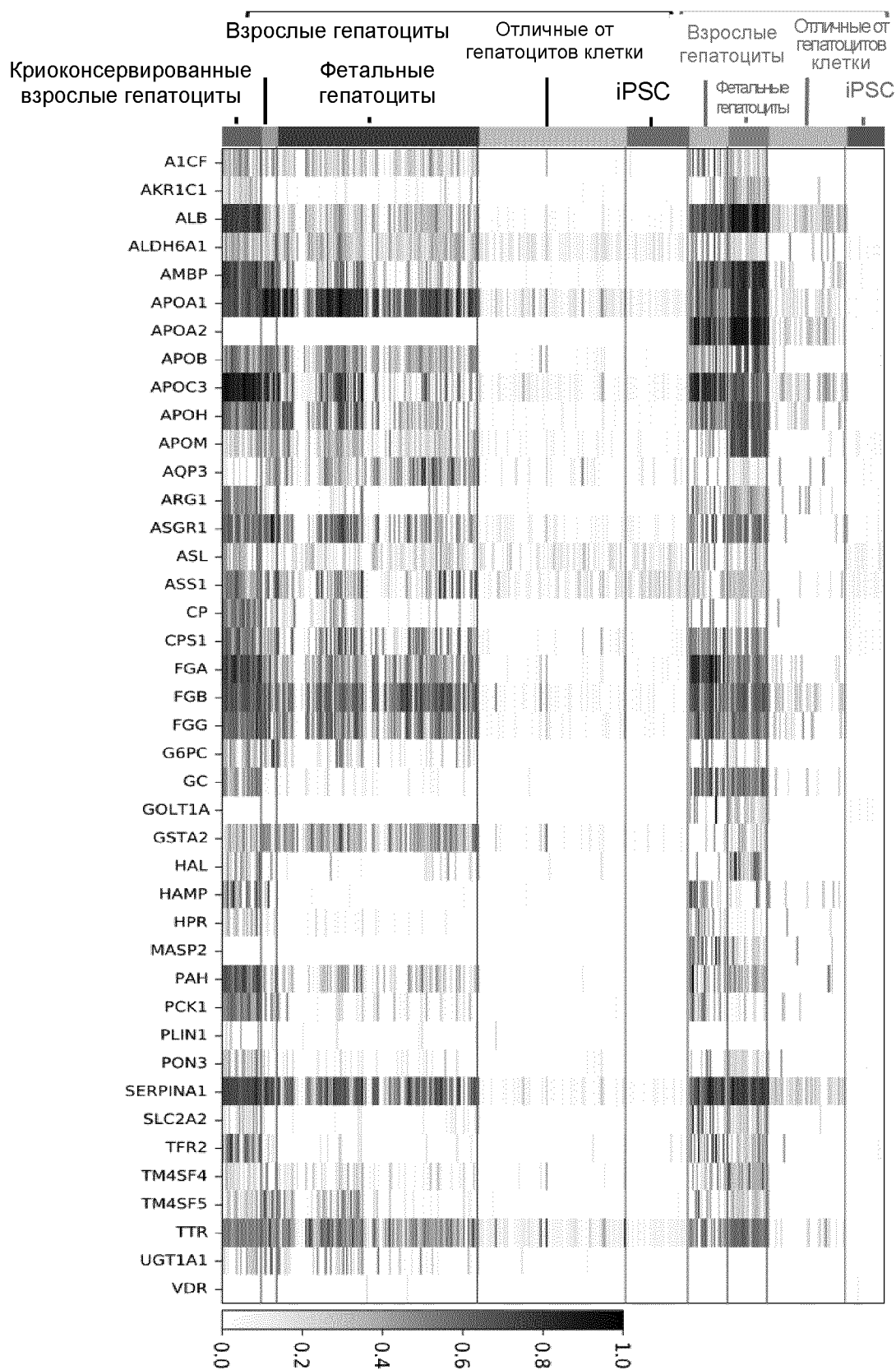
**ФИГУРА 7**

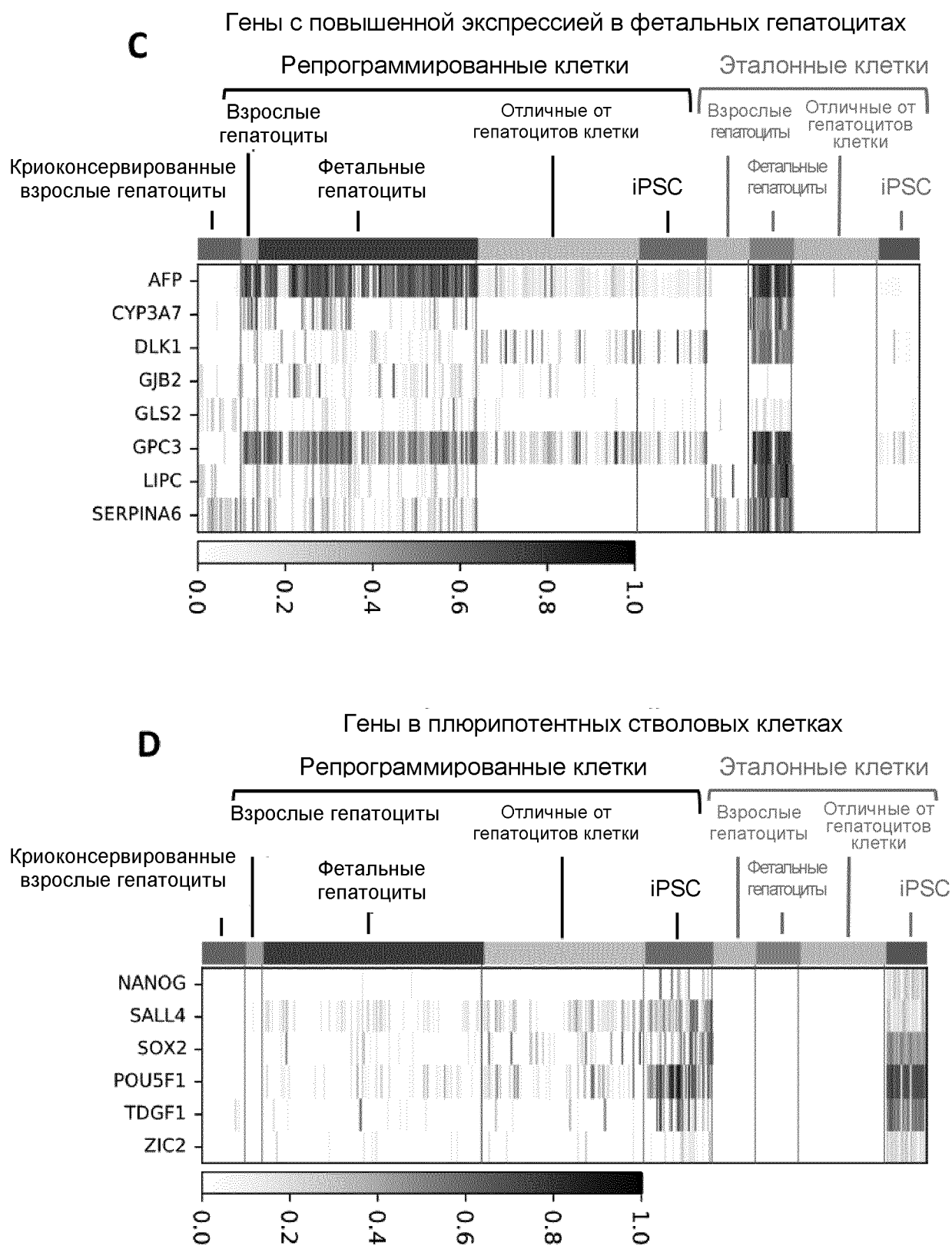


ФИГУРА 8

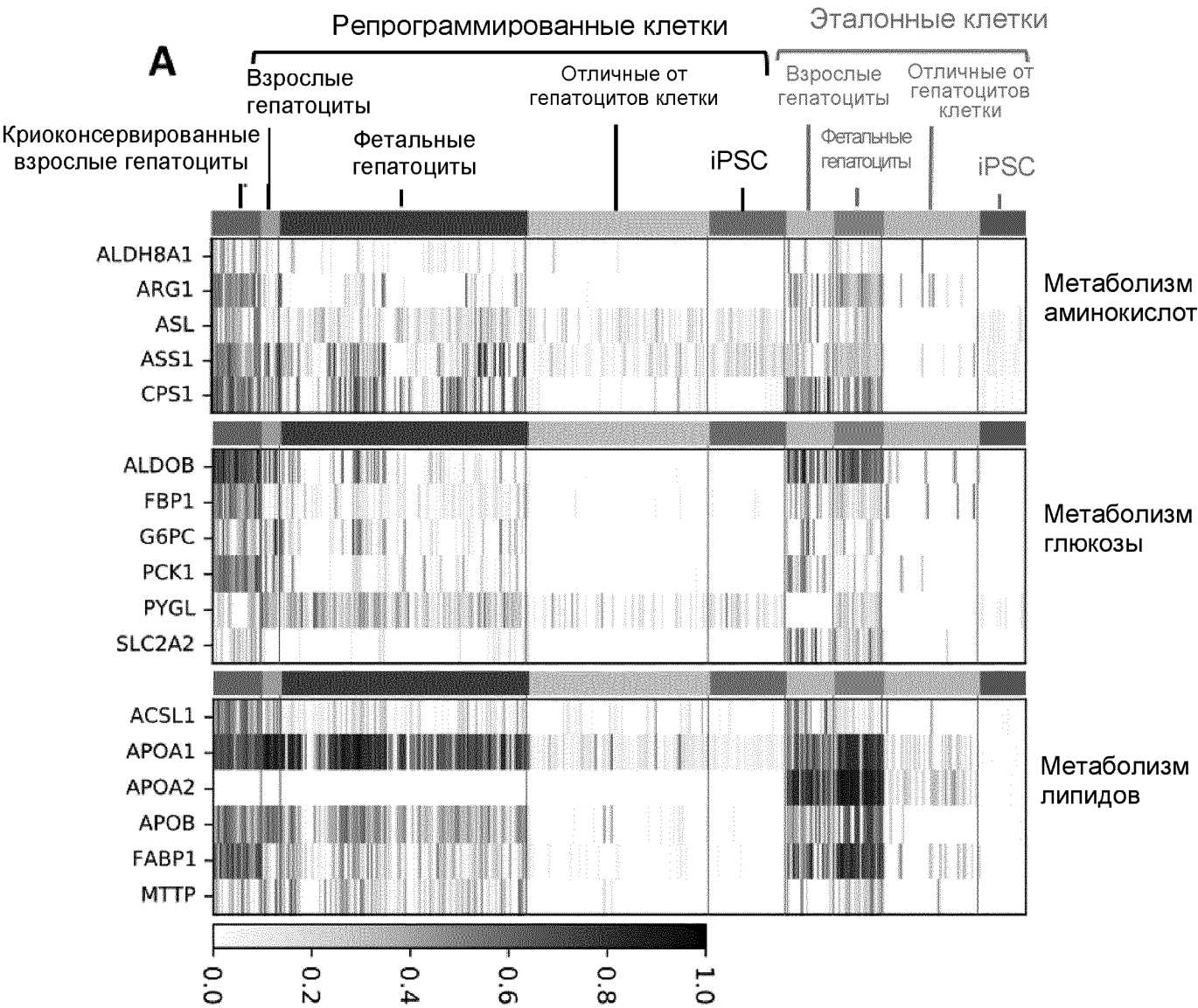


ФИГУРА 9

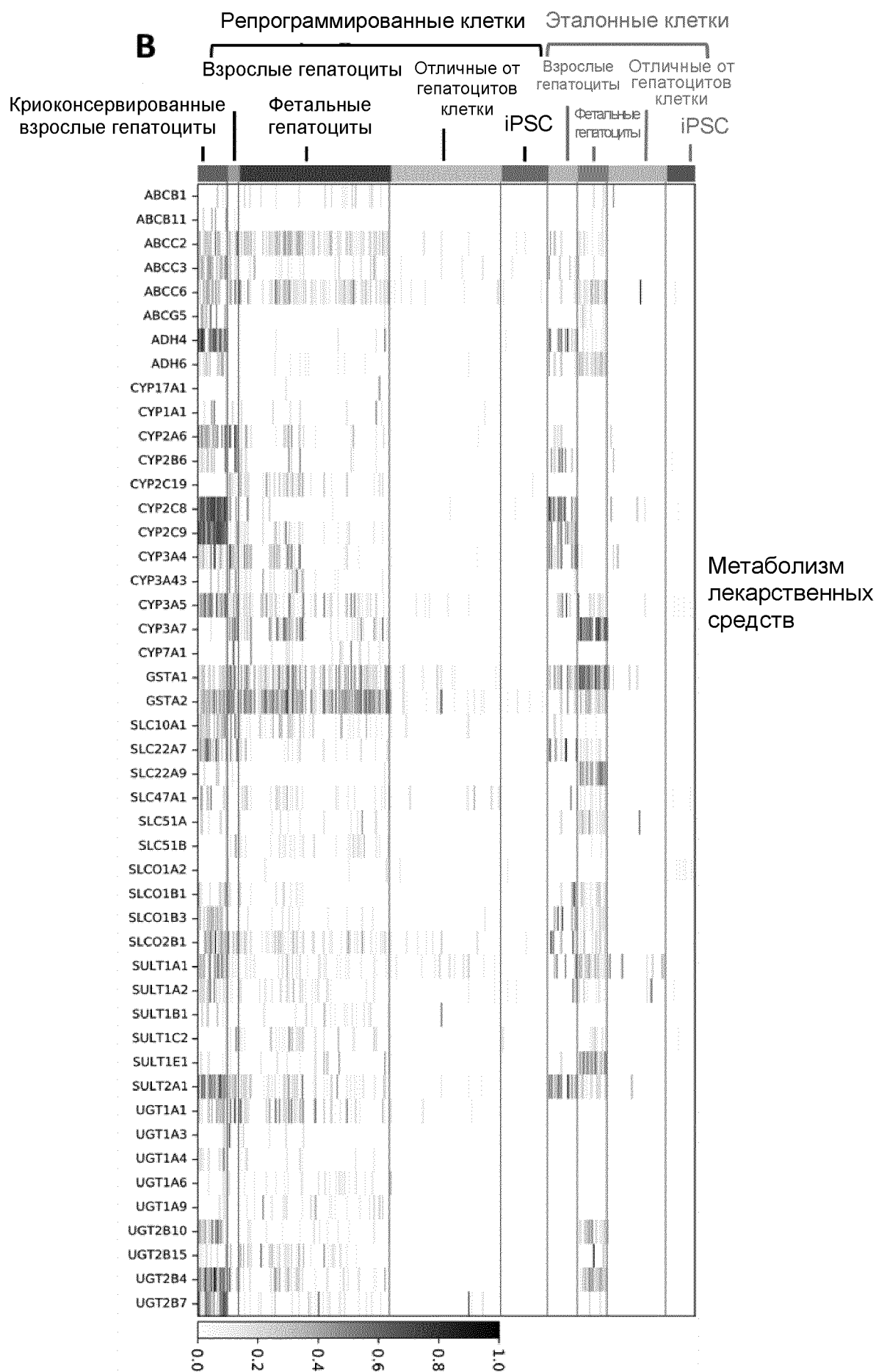
В Гены, специфичные для гепатоцитов (как взрослых, так и фетальных)**ФИГУРА 9 (продолжение)**



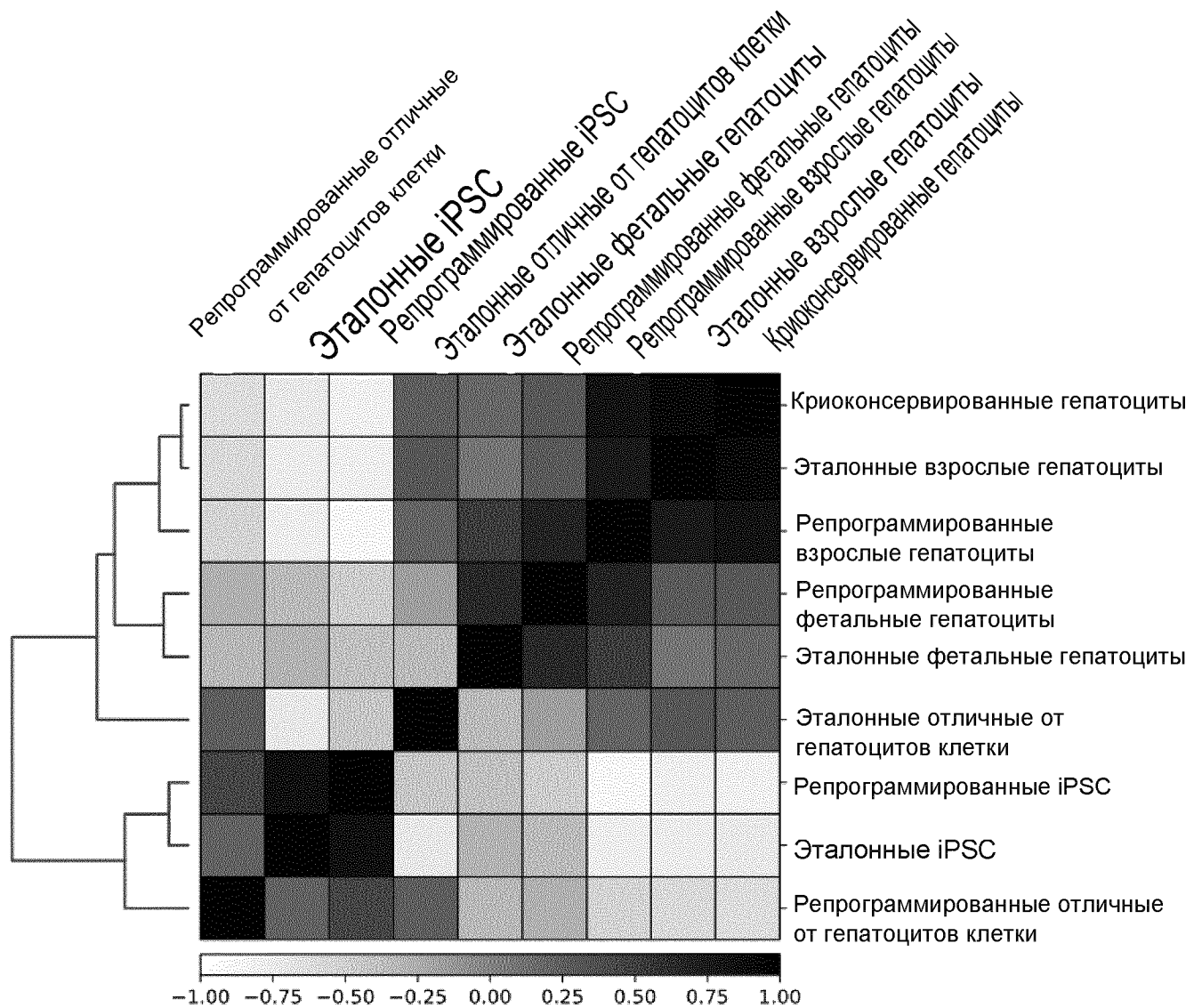
ФИГУРА 9 (продолжение)



ФИГУРА 10

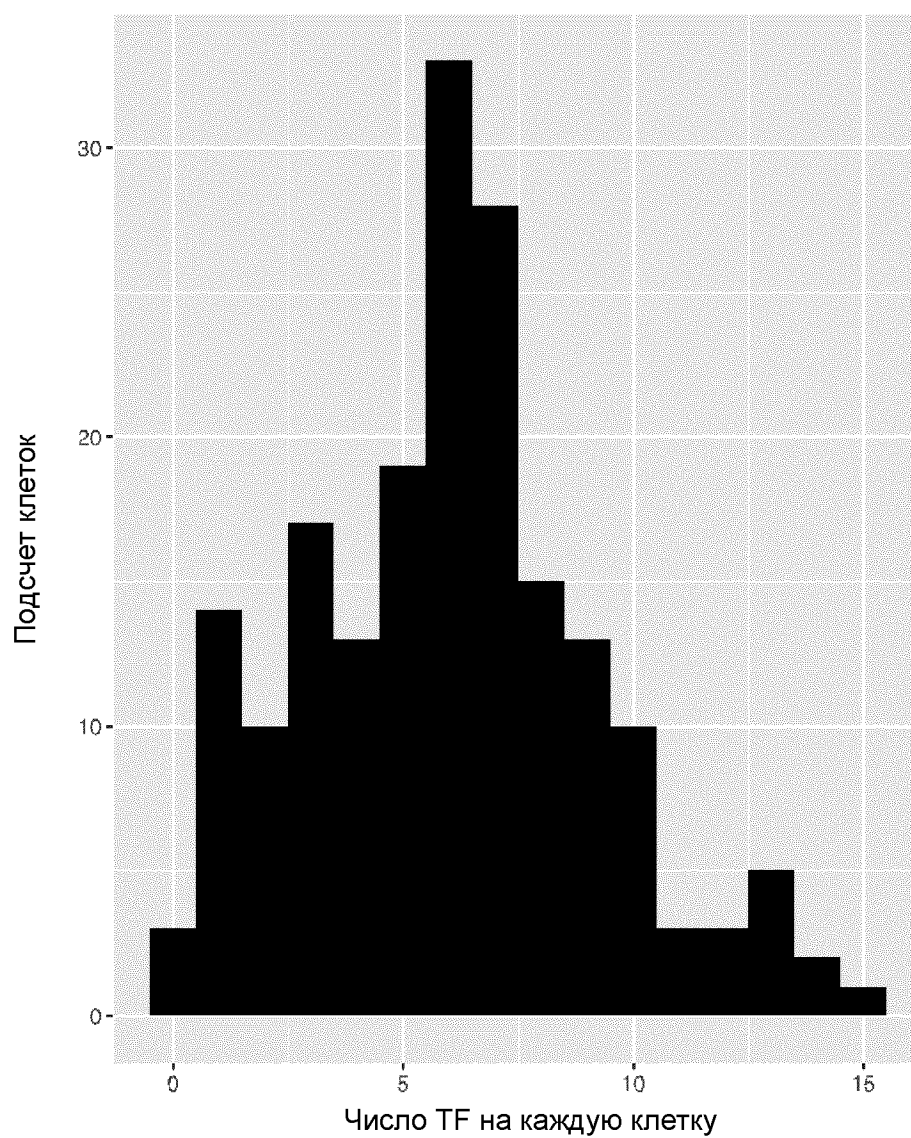


ФИГУРА 10 (продолжение)



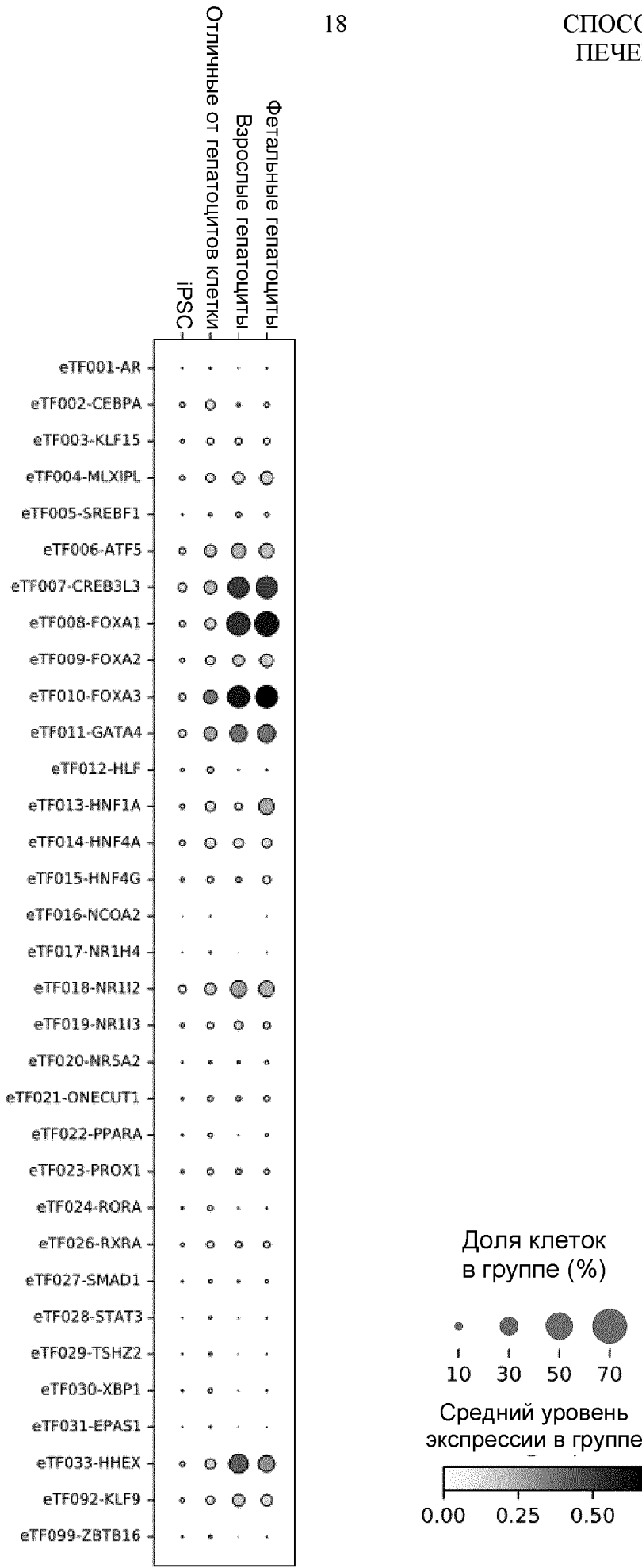
ФИГУРА 11

(A)



ФИГУРА 12

(B)



ФИГУРА 12 (продолжение)

(C)



ФИГУРА 12 (продолжение)

(D) Таблица 5

	Комбинация	% клеток, содержащих комбинацию
0	('eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4')	36
1	('eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4', 'eTF092-KLF9')	34
2	('eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4', 'eTF033-HHEX')	33
3	('eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF011-GATA4', 'eTF092-KLF9')	31
4	('eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3', 'eTF092-KLF9')	31
5	('eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3', 'eTF033-HHEX')	31
6	('eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4', 'eTF018-NR1I2')	31
7	('eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF011-GATA4', 'eTF033-HHEX')	30
8	('eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3', 'eTF018-NR1I2')	29
9	('eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3', 'eTF033-HHEX', 'eTF092-KLF9')	29
10	('eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF011-GATA4', 'eTF018-NR1I2')	29
11	('eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF033-HHEX', 'eTF092-KLF9')	28
12	('eTF007-CREB3L3', 'eTF011-GATA4', 'eTF033-HHEX', 'eTF092-KLF9')	28
13	('eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4', 'eTF092-KLF9')	27
14	('eTF006-ATF5', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4')	27
15	('eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4', 'eTF033-HHEX')	27
16	('eTF007-CREB3L3', 'eTF011-GATA4', 'eTF018-NR1I2', 'eTF092-KLF9')	26
17	('eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3', 'eTF018-NR1I2', 'eTF092-KLF9')	26
18	('eTF007-CREB3L3', 'eTF011-GATA4', 'eTF018-NR1I2', 'eTF033-HHEX')	26
19	('eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4', 'eTF033-HHEX', 'eTF092-KLF9')	26
20	('eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4', 'eTF018-NR1I2')	26
21	('eTF004-MLXIPL', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4')	26
22	('eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF018-NR1I2', 'eTF092-KLF9')	25
23	('eTF006-ATF5', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF011-GATA4', 'eTF092-KLF9')	25
24	('eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4', 'eTF018-NR1I2', 'eTF092-KLF9')	25
25	('eTF006-ATF5', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF011-GATA4')	25
26	('eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3', 'eTF018-NR1I2', 'eTF033-HHEX')	25
27	('eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4', 'eTF018-NR1I2', 'eTF033-HHEX')	25
28	('eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF018-NR1I2', 'eTF033-HHEX')	25
29	('eTF008-FOXA1', 'eTF011-GATA4', 'eTF033-HHEX', 'eTF092-KLF9')	25
30	('eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3', 'eTF033-HHEX', 'eTF092-KLF9')	24
31	('eTF006-ATF5', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3')	24
32	('eTF006-ATF5', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3', 'eTF092-KLF9')	24
33	('eTF006-ATF5', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF092-KLF9')	23
34	('eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3', 'eTF018-NR1I2', 'eTF092-KLF9')	23
35	('eTF008-FOXA1', 'eTF011-GATA4', 'eTF018-NR1I2', 'eTF092-KLF9')	23
36	('eTF004-MLXIPL', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3')	23
37	('eTF004-MLXIPL', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF011-GATA4')	23
38	('eTF006-ATF5', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4', 'eTF092-KLF9')	23

ФИГУРА 12 (продолжение)

(D) Таблица 5 (продолжение)

	Комбинация	% клеток, содержащих комбинацию
39	('eTF007-CREB3L3', 'eTF018-NR1I2', 'eTF033-HHEX', 'eTF092-KLF9')	23
40	('eTF008-FOXA1', 'eTF011-GATA4', 'eTF018-NR1I2', 'eTF033-HHEX')	23
41	('eTF004-MLXIPL', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3', 'eTF092-KLF9')	22
42	('eTF004-MLXIPL', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF011-GATA4', 'eTF092-KLF9')	22
43	('eTF006-ATF5', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF011-GATA4', 'eTF033-HHEX')	22
44	('eTF011-GATA4', 'eTF018-NR1I2', 'eTF033-HHEX', 'eTF092-KLF9')	22
45	('eTF006-ATF5', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3', 'eTF033-HHEX')	22
46	('eTF006-ATF5', 'eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4')	22
47	('eTF004-MLXIPL', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4', 'eTF092-KLF9')	22
48	('eTF006-ATF5', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF033-HHEX')	21
49	('eTF004-MLXIPL', 'eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4')	21
50	('eTF006-ATF5', 'eTF008-FOXA1', 'eTF011-GATA4', 'eTF092-KLF9')	21
51	('eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3', 'eTF018-NR1I2', 'eTF033-HHEX')	21
52	('eTF004-MLXIPL', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3', 'eTF018-NR1I2')	21
53	('eTF004-MLXIPL', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3', 'eTF033-HHEX')	21
54	('eTF006-ATF5', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF033-HHEX', 'eTF092-KLF9')	21
55	('eTF006-ATF5', 'eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3', 'eTF092-KLF9')	21
56	('eTF008-FOXA1', 'eTF018-NR1I2', 'eTF033-HHEX', 'eTF092-KLF9')	21
57	('eTF004-MLXIPL', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF092-KLF9')	20
58	('eTF006-ATF5', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4', 'eTF033-HHEX')	20
59	('eTF010-FOXA3', 'eTF018-NR1I2', 'eTF033-HHEX', 'eTF092-KLF9')	20
60	('eTF007-CREB3L3', 'eTF009-FOXA2', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4')	20

ФИГУРА 12 (продолжение)

(Е) Таблица 6

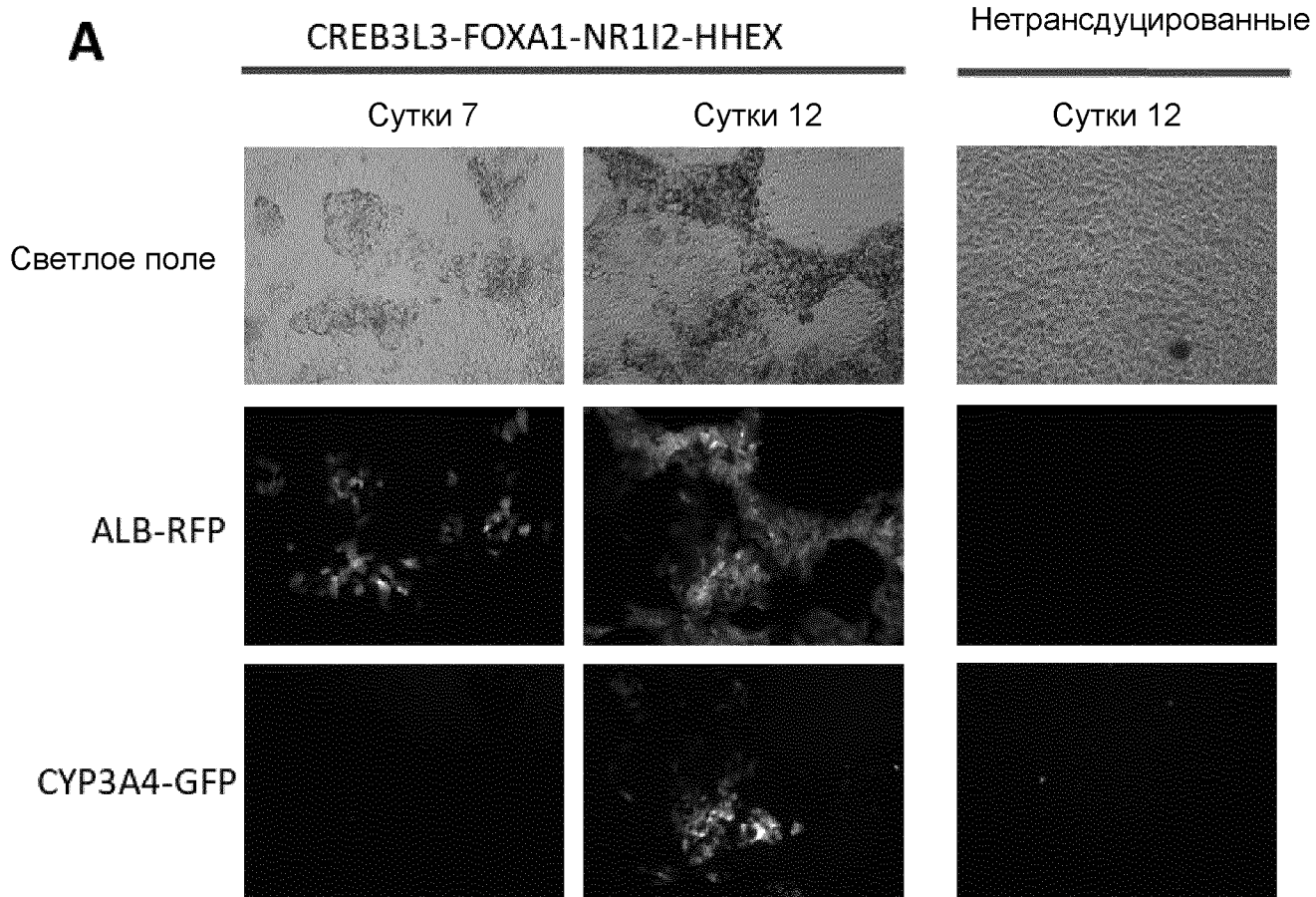
	Комбинация	% клеток, содержащих комбинацию
0	('eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4')	42
1	('eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3')	38
2	('eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF011-GATA4')	38
3	('eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3', 'eTF033-HHEX')	35
4	('eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3', 'eTF092-KLF9')	34
5	('eTF007-CREB3L3', 'eTF011-GATA4', 'eTF092-KLF9')	33
6	('eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4')	33
7	('eTF007-CREB3L3', 'eTF011-GATA4', 'eTF033-HHEX')	32
8	('eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF092-KLF9')	32
9	('eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3', 'eTF018-NR1I2')	32
10	('eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF033-HHEX')	31
11	('eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4', 'eTF092-KLF9')	31
12	('eTF007-CREB3L3', 'eTF011-GATA4', 'eTF018-NR1I2')	31
13	('eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4', 'eTF033-HHEX')	31
14	('eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF018-NR1I2')	30
15	('eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4', 'eTF018-NR1I2')	30
16	('eTF007-CREB3L3', 'eTF033-HHEX', 'eTF092-KLF9')	29
17	('eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3', 'eTF092-KLF9')	28
18	('eTF008-FOXA1', 'eTF011-GATA4', 'eTF092-KLF9')	28
19	('eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3', 'eTF018-NR1I2')	27
20	('eTF006-ATF5', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF011-GATA4')	27
21	('eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3', 'eTF033-HHEX')	27
22	('eTF008-FOXA1', 'eTF011-GATA4', 'eTF033-HHEX')	27
23	('eTF006-ATF5', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3')	27
24	('eTF008-FOXA1', 'eTF011-GATA4', 'eTF018-NR1I2')	27
25	('eTF010-FOXA3', 'eTF033-HHEX', 'eTF092-KLF9')	27
26	('eTF007-CREB3L3', 'eTF018-NR1I2', 'eTF092-KLF9')	26
27	('eTF011-GATA4', 'eTF033-HHEX', 'eTF092-KLF9')	26
28	('eTF004-MLXIPL', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF010-FOXA3')	26
29	('eTF007-CREB3L3', 'eTF018-NR1I2', 'eTF033-HHEX')	25
30	('eTF010-FOXA3', 'eTF018-NR1I2', 'eTF092-KLF9')	25
31	('eTF008-FOXA1', 'eTF033-HHEX', 'eTF092-KLF9')	25
32	('eTF011-GATA4', 'eTF018-NR1I2', 'eTF033-HHEX')	25
33	('eTF006-ATF5', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4')	25
34	('eTF011-GATA4', 'eTF018-NR1I2', 'eTF092-KLF9')	25
35	('eTF006-ATF5', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1')	25
36	('eTF004-MLXIPL', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF011-GATA4')	24
37	('eTF004-MLXIPL', 'eTF010-FOXA3', 'eTF011-GATA4')	24
38	('eTF006-ATF5', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF092-KLF9')	24

ФИГУРА 12 (продолжение)

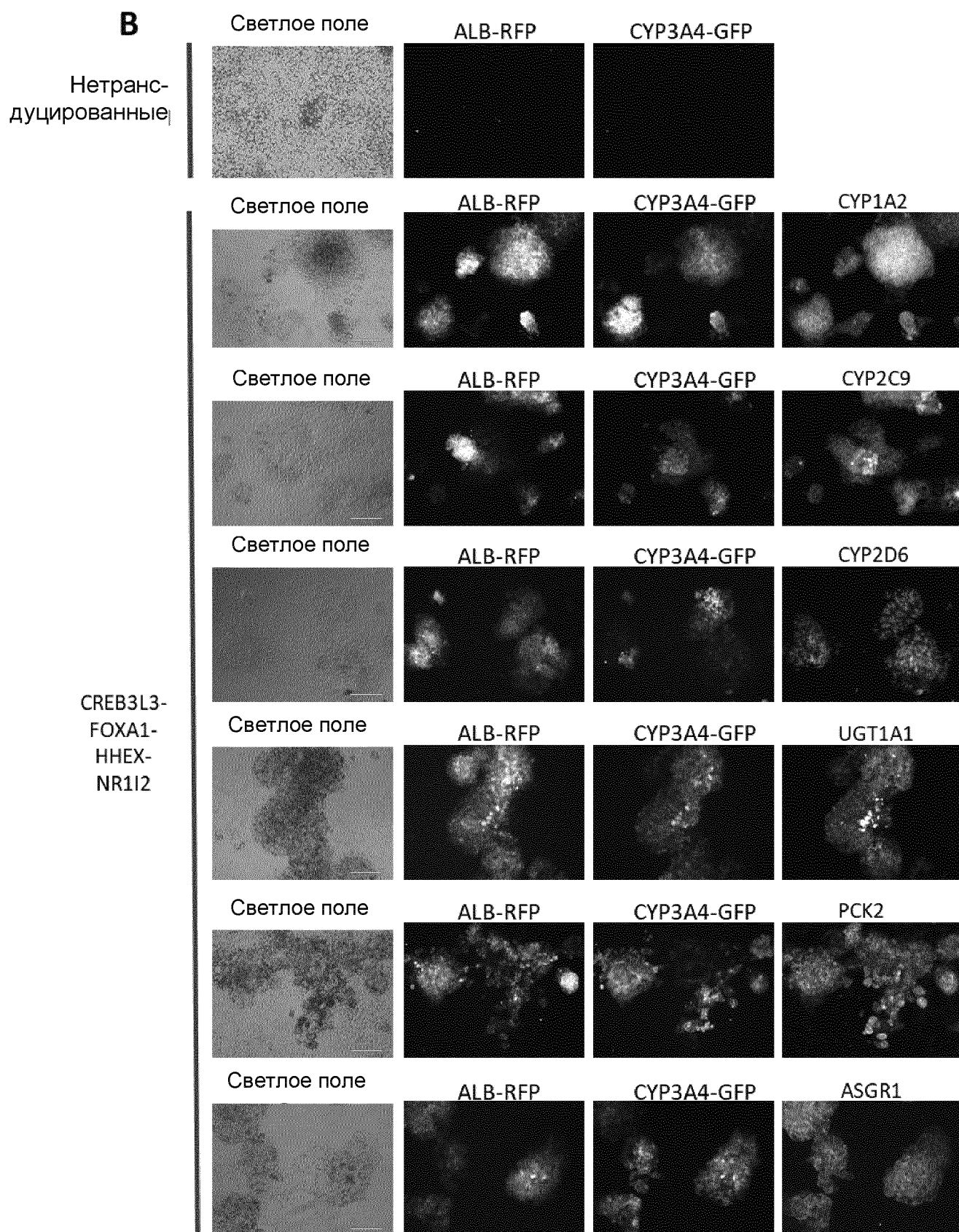
(Е) Таблица 6 (продолжение)

	Комбинация	% клеток, содержащих комбинацию
39	('eTF008-FOXA1', 'eTF018-NR1I2', 'eTF092-KLF9')	24
40	('eTF010-FOXA3', 'eTF018-NR1I2', 'eTF033-HHEX')	23
41	('eTF004-MLXIPL', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1')	23
42	('eTF006-ATF5', 'eTF011-GATA4', 'eTF092-KLF9')	23
43	('eTF006-ATF5', 'eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3')	22
44	('eTF006-ATF5', 'eTF008-FOXA1', 'eTF011-GATA4')	22
45	('eTF006-ATF5', 'eTF010-FOXA3', 'eTF092-KLF9')	22
46	('eTF008-FOXA1', 'eTF018-NR1I2', 'eTF033-HHEX')	22
47	('eTF006-ATF5', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF033-HHEX')	21
48	('eTF004-MLXIPL', 'eTF008-FOXA1', 'eTF010-FOXA3')	21
49	('eTF004-MLXIPL', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF092-KLF9')	21
50	('eTF018-NR1I2', 'eTF033-HHEX', 'eTF092-KLF9')	21
51	('eTF006-ATF5', 'eTF008-FOXA1', 'eTF092-KLF9')	21
52	('eTF004-MLXIPL', 'eTF008-FOXA1', 'eTF011-GATA4')	20
53	('eTF004-MLXIPL', 'eTF010-FOXA3', 'eTF092-KLF9')	20
54	('eTF007-CREB3L3', 'eTF009-FOXA2', 'eTF010-FOXA3')	20
55	('eTF004-MLXIPL', 'eTF007-CREB3L3', 'eTF018-NR1I2')	20
56	('eTF007-CREB3L3', 'eTF008-FOXA1', 'eTF009-FOXA2')	20

ФИГУРА 12 (продолжение)

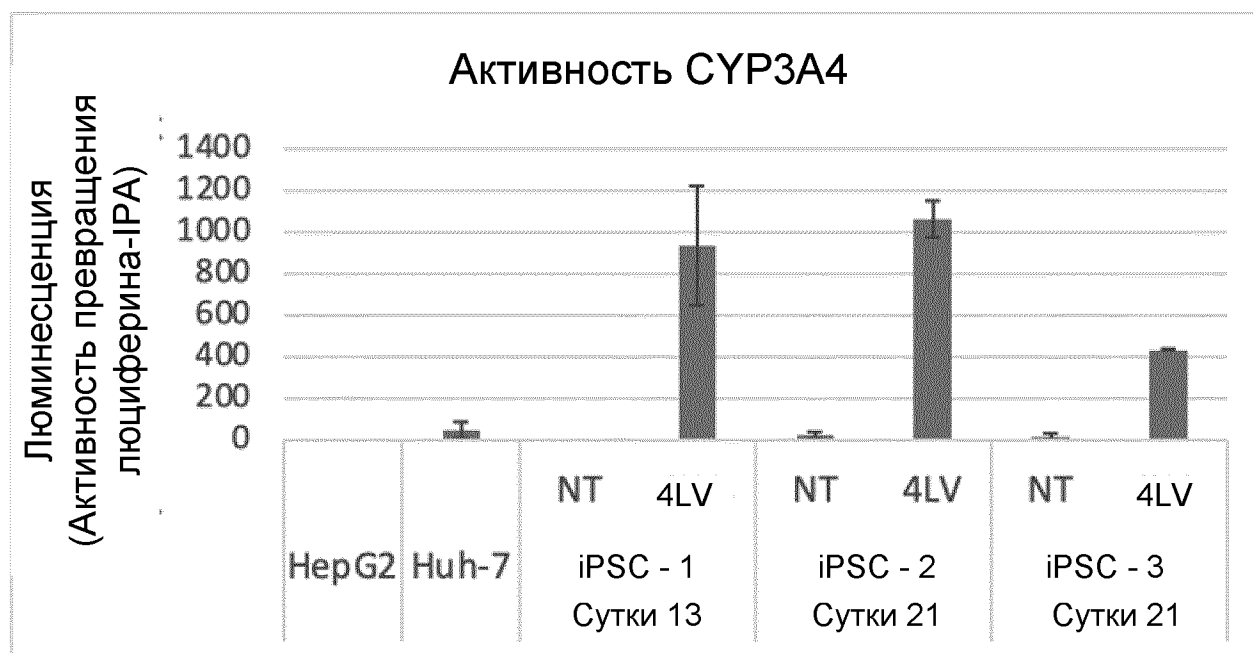


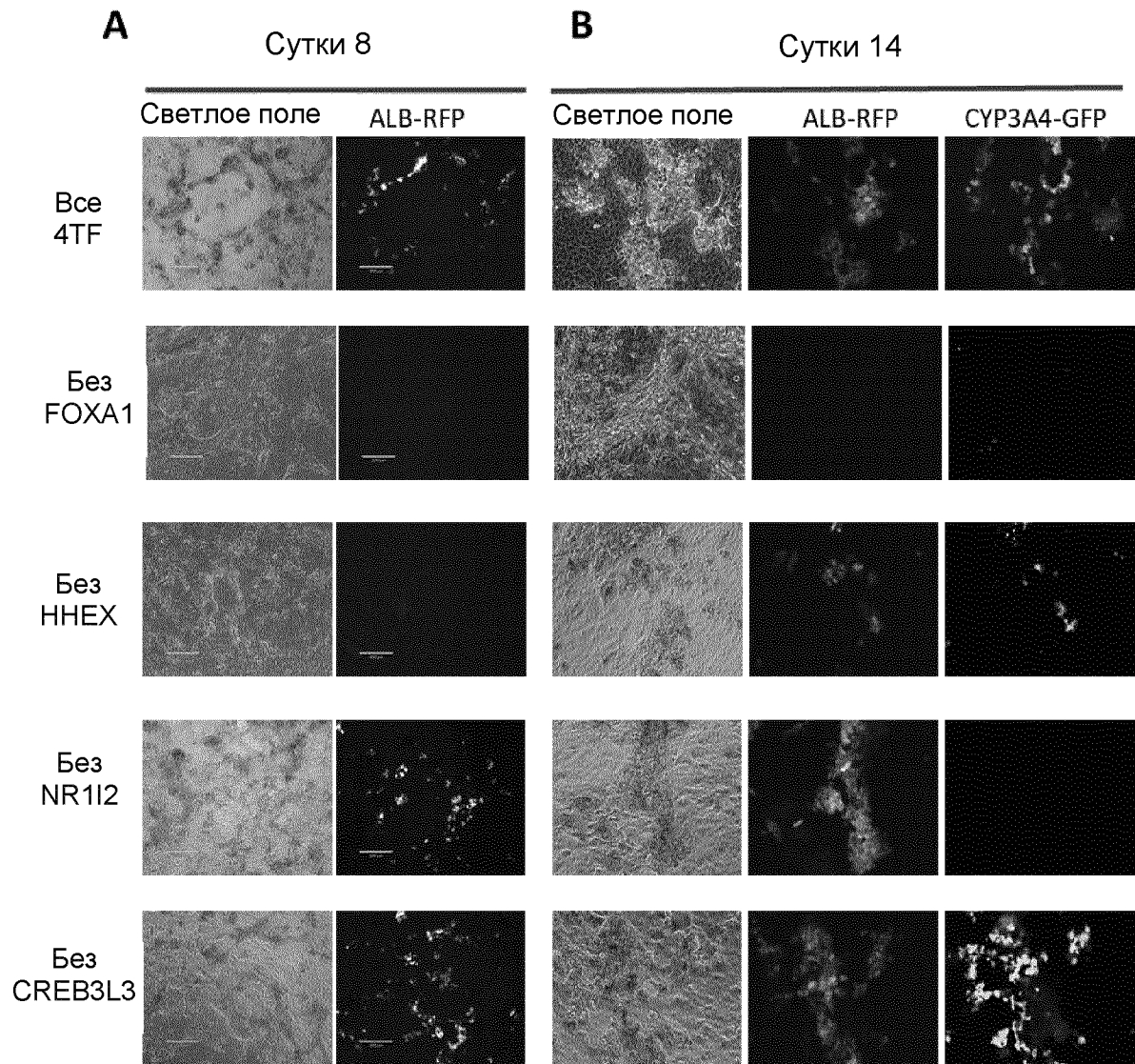
ФИГУРА 13



ФИГУРА 13 (продолжение)

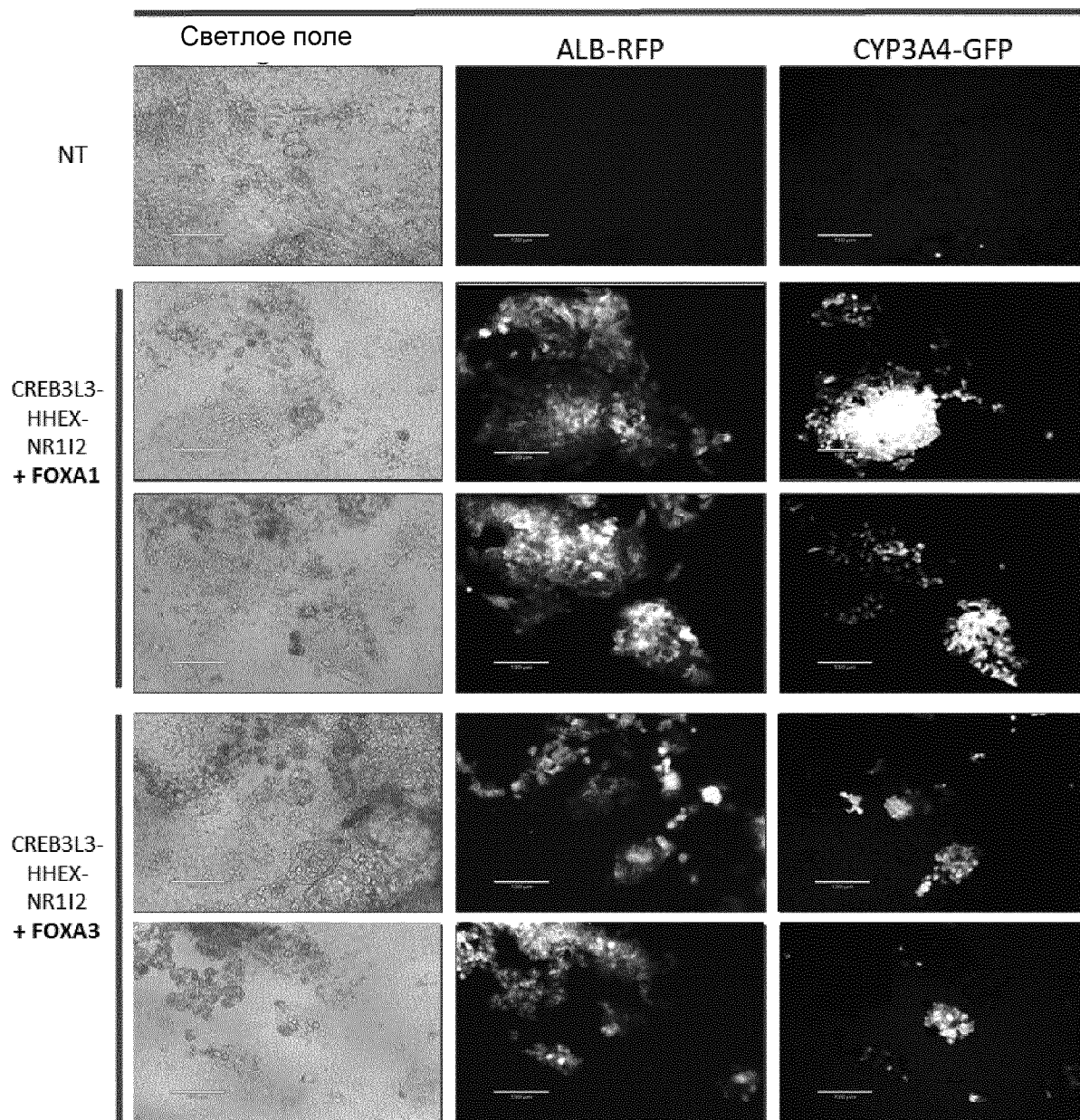
С

**ФИГУРА 13** (продолжение)



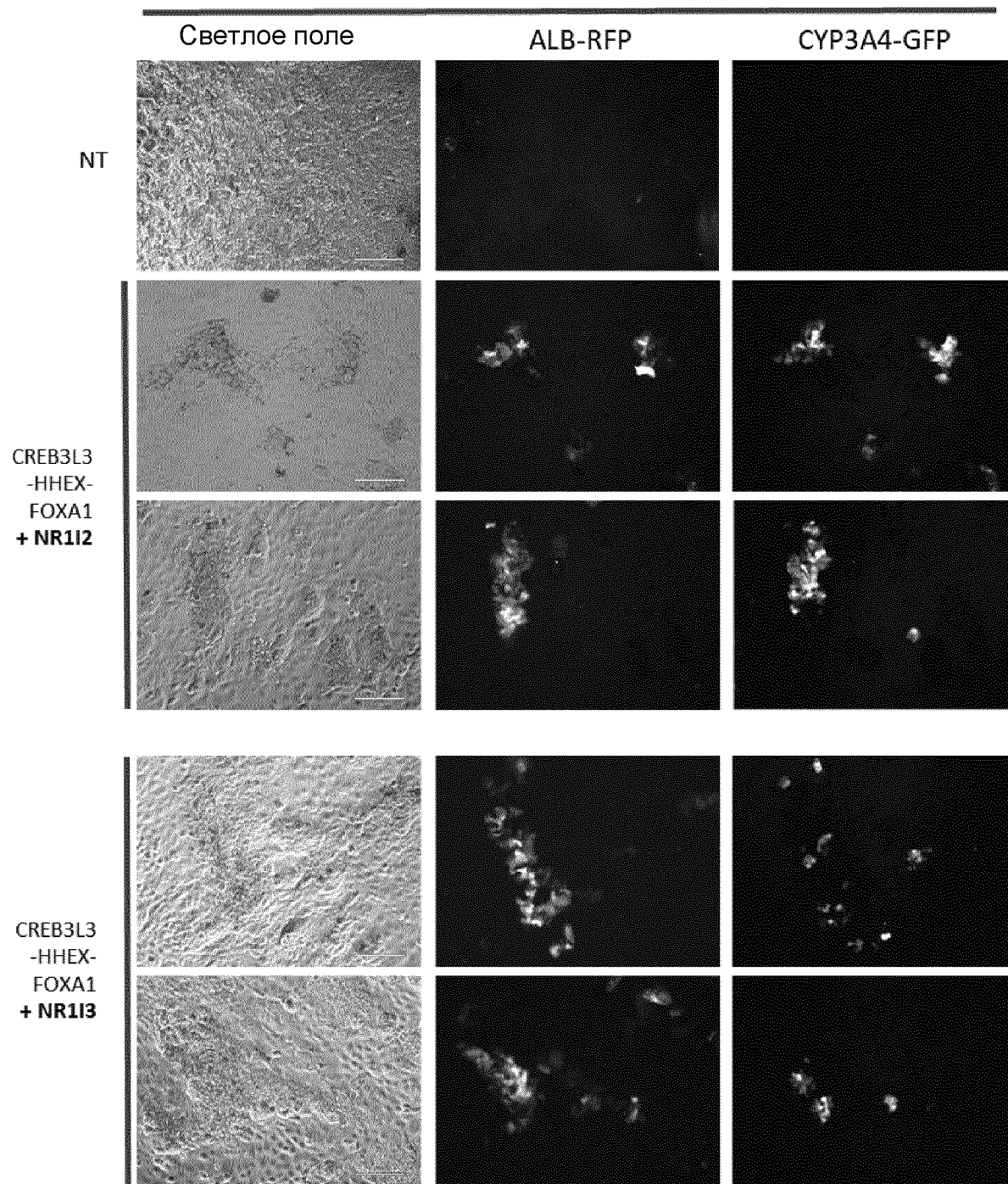
ФИГУРА 14

Сутки 19



ФИГУРА 15

Сутки 12



ФИГУРА 16