

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292607** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.29

(51) Int. Cl. *C12N 5/071* (2010.01)
A61K 35/407 (2015.01)
A01N 1/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.03.15

(54) ПОДОБНЫЕ СТВОЛОВЫМ КЛЕТКИ ПЕЧЕНИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И/ЛИ ПРОФИЛАКТИКИ ФУЛЬМИНАНТНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ

(31) 20305267.5

(32) 2020.03.13

(33) EP

(86) PCT/EP2021/056574

(87) WO 2021/180984 2021.09.16

(71) Заявитель:
**ГОЛИВЕР ТЕРАПЬЮТИКС;
НАНТ ЮНИВЕРСИТЕ; ИНСЕРМ
(ЭНСТИТУ НАСЬОНАЛЬ ДЕ
ЛЯ САНТЭ Э ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ
МЕДИКАЛЬ) (FR)**

(72) Изобретатель:
**Нгуйэн Туань Хуэй, Фуррье Анжелик,
Риспаль Рафаэль, Делбо Фредерик
(FR)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение касается популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, и их терапевтического применения для лечения и профилактики фульминантного заболевания печени. Подобные стволовым клетки печени по изобретению можно безопасно и воспроизводимо получать из плюрипотентных стволовых клеток. Кроме того, хотя подобные стволовым клетки печени по изобретению и не проявляют фенотипа физиологически зрелых печеночных клеток, так как они лишены экспрессии маркера альбумина (ALB), тем не менее, их можно трансплантировать в больную печень при острой недостаточности, спасти больную печень и способствовать регенерации печени. Кроме того, можно реализовывать различные методики получения подобных стволовым клеткам печени, и все они дают высокое качество и большой выход продуктов. Наконец, подобные стволовым клетки печени по изобретению могут подвергаться криоконсервации, а также их можно получать в виде сфероидных частиц.

A1

202292607

202292607

A1

ПОДОБНЫЕ СТВОЛОВЫМ КЛЕТКИ ПЕЧЕНИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И/ЛИ ПРОФИЛАКТИКИ ФУЛЬМИНАНТНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается популяции клеток, включающей подобные стволовым клетки печени, и их терапевтического применения для лечения и/или профилактики фульминантных заболеваний печени. В частности, подобные стволовым клетки печени, в которых не экспрессируется маркер ALB (ALB^-), но экспрессируется маркер AFP (AFP^+), например, полученные из плюрипотентных стволовых клеток (pSCs), можно вводить в печень при таких фульминантных заболеваниях печени, как острая печеночная недостаточность (ALF) или острая печеночная недостаточность на фоне хронической (ACLF), и они могут способствовать регенерации печени.

Уровень техники

Заболевания печени затрагивают миллионы людей во всем мире. Среди заболеваний печени фульминантные заболевания печени характеризуются быстрой и тяжелой дисфункцией физиологических показателей печени и охватывают такие заболевания, как острая печеночная недостаточность (ALF) и острая печеночная недостаточность на фоне хронической (ACLF). ACLF охватывает такие заболевания печени, которые характеризуются острым эпизодом печеночной недостаточности вследствие прогрессирующей дегенерации печени, связанной с хроническим заболеванием печени, таким, например, как неалкогольный стеатогепатит (NASH), алкогольный гепатит, вирусный гепатит, криптогенные заболевания печени, злокачественные заболевания печени, такие как гепатоцеллюлярная карцинома, холангиокарцинома и карцинома, аутоиммунный гепатит, сосудистые заболевания печени типа синдрома Бадда-Киари, холестатические заболевания печени, наследственные метаболические заболевания печени типа болезни Вильсона и нарушений цикла мочевины. Иными словами, к фульминантным заболеваниям печени относятся такие заболевания, которые приоритетны для трансплантации печени по системе оценки для распределения органов типа Модели терминальной стадии заболеваний печени (MELD) (Martin et al., 2014).

Трансплантация печени в настоящее время считается золотым стандартом лечения пациентов с фульминантными и/или тяжелыми метаболическими заболеваниями печени. В списках ожидания на трансплантацию печени в западных странах стоят десятки тысяч пациентов. С 1968 по 2015 год в Европе было выполнено около 130 000 трансплантаций печени (European Liver Transplant Registry). Однако от 10 до 20% пациентов умирают от

того, что им не сделали трансплантацию, когда они были в очереди на трансплантацию печени из-за нехватки донорских органов.

ALF и ACLF представляют собой быстротекущие опасные для жизни, но редкие заболевания, при которых быстрое ухудшение печени приводит к изменению мышления и коагулопатии у лиц без (ALF) или с известными (ACLF) существовавшими ранее заболеваниями печени. Главными клиническими признаками ALF и ACLF являются быстро развивающаяся желтушность кожи и глазных яблок, боли в животе, тошнота, рвота, слабость и изменения психического статуса, которые могут начинаться с легкой спутанности сознания и прогрессировать до комы и до экстрапеченочной полиорганной недостаточности. Биохимические проявления ALF и ACLF обычно включают аномальные биохимические показатели печени и коагулопатию. В соответствии с клинической практикой, как уже отмечалось выше, в настоящее время лучшим методом терапии при тяжелых формах ALF и ACLF является ортотопическая трансплантация печени (OLT).

Однако OLT сильно лимитируется из-за нехватки доноров. На сегодняшний день в качестве альтернативы OLT стали рассматривать трансплантацию гепатоцитов (HT), которая, как оказалось, улучшает функции печени у пациентов. HT была продемонстрирована и появились публикации об этом по всему миру, свидетельствующие о безопасности и предварительной эффективности метода (Dhawan et al., 2010; Hansel et al., 2014; Dhawan et al., 2019). Однако получение большого количества функциональных гепатоцитов и с воспроизводимым качеством затруднительно. Кроме того, пациенты, получающие HT, также могут получать иммунодепрессанты, чтобы ограничить отторжение трансплантатов.

Таким образом, существует острая необходимость в изучении потенциала новых типов клеток, в том числе стволовых клеток, для амплификации *in vitro* и последующей дифференцировки в гепатоциты. Например, для получения гепатоцитов или подобных гепатоцитам клеток (HCL) использовались стволовые клетки дефинитивной энтодермы, эмбриональные стволовые клетки человека (hESC), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (hiPSC) и мультипотентные стволовые клетки типа мезенхимальных стволовых клеток (Pareja et al., 2017).

Например, в WO 2016/043666 раскрыты способы дифференцировки стволовых клеток дефинитивной энтодермы для получения гепатоцитоподобных клеток (HLC).

Действительно, эмбриональные стволовые клетки человека (hESCs) теоретически представляют неограниченный источник функциональных гепатоцитов для регенерации печени. Эмбриональные стволовые клетки человека (hESCs) могут эффективно дифференцироваться в гепатоцитоподобные клетки (HLCs) *in vitro*, хотя промежуточные

клетки могут проявлять незрелый профиль экспрессии генов (см. Cameron et al., 2015). Эти HLC имеют такие же функции и профили экспрессии генов, как и клетки в печени взрослых (Payne et al., 2011). Исследователи смогли показать на модели индуцированной ацетаминофеном острой печеночной недостаточности у мышей, что неонатальные HLC способны повторно заселять и регенерировать больную печень *in vivo*, не вызывая опухолей. Эти данные являются убедительным доказательством того, что применение HLC, полученных из hESCs, может быть эффективной альтернативой трансплантации печени для лечения заболеваний печени (Tolosa et al., 2015).

Действуя в том же духе, Roelandt et al. (2010) попытались получить гепатоциты из hESCs на современном уровне с помощью культуральных сред для дифференцировки. Для дифференцировки клеток дефинитивной энтодермы в гепатоциты требуется соблюдение протоколов, предполагающих точную последовательность индукции с помощью различных активаторов и/или ингибиторов физиологических сигнальных путей, а также присутствие различных факторов роста. Гепатоцитоподобные клетки образуются в течение 20 дней, причем эти клетки характеризуются способностью к детоксикации, так как в них экспрессируются маркеры, характерные для зрелых гепатоцитов, такие как альбумин и Cyp450. Siller et al. (2015) также представили метод дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в гепатоциты в культуральной среде, лишенной факторов роста.

Кроме того, в WO 2019/055345 описаны способы получения гепатоцитоподобных клеток (HLC) из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (hiPSC) для регенеративной медицины. HLC обладают способностью к метаболизму аммония и к детоксификации, так у них экспрессируется маркер альбумин (ALB^+), и могут применяться для лечения пациентов с фульминантной печеночной недостаточностью.

Кроме того, Такаюма et al. (2013) представили получение гепатобластоподобных клеток (HBC), происходящих из hESC или hiPSC, на современном уровне. Авторы показали, что HBC как из раннего пассажа (P0; клетки ALB^-), так и HBC из позднего пассажа (P10; клетки ALB^+) могут быть трансплантированы в печень. Функциональность полученных из hESC гепатоцитов HBC P0 или HBC P10 после трансплантации определяли по измерению уровня секретируемого ALB человека у мышей-реципиентов. Такаюма et al. отмечали, что уровни экспрессии ALB были выше при трансплантации с HBC P10, чем с HBC P0, которая давала лишь очень слабую экспрессию ALB. В целом, эти результаты предполагают использовать HBC P10 (клетки ALB^+) для трансплантации печени, так как у них сильнее всего проявляются детоксифицирующие свойства, связанные с ALB.

Также широко исследовалась трансплантация фетальных клеток печени для лечения заболеваний печени (например, см. Pietrosi et al., 2015; Rao et al., 2008; Zheng et al., 2006; Jochheim et al., 2004). Аналогично гепатоцитам, описанным в Roelandt et al., фетальные клетки печени, описанные в этих исследованиях, экспрессируют белок альбумин (ALB⁺), который является маркером зрелых гепатоцитов.

В целом из современной практики в данной области следует, что печеночные клетки, полученные по этим методикам, характеризуются такими маркерами, которые обычно отражают зрелое состояние печеночных клеток из здоровой печени, т.е. экспрессией альбумина (ALB⁺), который связан с другими свойствами зрелых гепатоцитов, такими как метаболизм мочевины и детоксифицирующие свойства CYP450 типа активности CYP2E1, CYP3A7 и отчасти CYP3A4 (см. Carpenter et al., 1996; Chinnici et al., 2015; Pietrosi et al., 2015).

Поразительно, хотя теоретически возможна трансплантация незрелых гепатоцитов, однако в научном сообществе установился консенсус в отношении зрелых гепатоцитов для трансплантации, о чем свидетельствует следующее утверждение: “трансплантируемые клетки должны быстро восстанавливать функции печени, поэтому они должны быть полностью созревшими” (Goldman and Gouon-Evans, 2016). Тем не менее, несмотря на высокую воспроизводимость, эти методики включают в себя длительный процесс, который отнимает много времени и подвержен вирусному и/или бактериальному заражению.

Наконец, ключевым фактором в клеточной терапии для экстренной трансплантации у пациентов с ALF и ACLF является криоконсервация гепатоцитов. Однако трудности при криоконсервации обусловлены тем, что клетки подвергаются повреждающим воздействиям как на стадии замораживания, так и на стадии оттаивания, что ведет к снижению жизнеспособности клеток (Terry et al., 2010).

Таким образом, существует необходимость в противодействии нехватке доноров печени для трансплантации и обеспечении средства для легкого получения печеночных клеток, которые можно было бы вводить субъектам, нуждающимся в терапии печени, в частности, в пределах ограниченного периода времени, с высоким выходом и высокого качества. Также существует потребность в получении клеток в большом количестве и высокого качества, пригодных для регенерации и/или восстановления пораженной печени, в частности печени, пораженной фульминантным заболеванием, более конкретно ALF или ACLF. Также существует потребность в получении неограниченного источника печеночных клеток, независимо от того, что имеется нехватка доноров печени, который позволит проводить как аутологическую, так и аллогенную (гетерологическую)

трансплантацию при лечении. Также существует потребность в получении печеночных клеток, устойчивых к условиям хранения, включая криоконсервацию. А также существует потребность в получении таких печеночных клеток, которые можно было бы вводить без одновременного введения иммунодепрессантов, так как они были бы универсально трансплантируемыми. Наконец, существует потребность в новых подходах к получению высоко эффективных терапевтических клеток печени, в частности подходах, соответствующих Надлежащей производственной практике (GMP).

Сущность изобретения

В первом аспекте изобретения предусмотрена популяция клеток, в частности выделенная популяция клеток, содержащая по меньшей мере 5% подобных стволовым клеткам печени, экспрессирующих один маркер – α -фетопротейн (AFP^+) и не экспрессирующих другой маркер – альбумин (ALB^-), либо их экстракты.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени дополнительно экспрессируют еще один маркер – фактор транскрипции T-Box 3 ($TBX3^+$) и/или другой маркер – ядерный фактор гепатоцитов 4 α ($HNF4A^+$), предпочтительно и фактор транскрипции T-Box 3 ($TBX3^+$), и ядерный фактор гепатоцитов 4 α ($HNF4A^+$).

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени подвергаются криоконсервации.

В другом аспекте изобретения предусмотрена частица, в частности сфероидная, содержащая популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт по настоящему изобретению.

В одном аспекте изобретения предусмотрена суспензия, содержащая популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт по настоящему изобретению.

В другом аспекте изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая (i) популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт, и/или по меньшей мере одну частицу и/или суспензию по настоящему изобретению и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

В следующем аспекте изобретения предусмотрено медицинское устройство, содержащее популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт, и/или по меньшей мере одну частицу и/или суспензию и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению.

В одном аспекте изобретения также предусмотрена модель на животных, не относящихся к человеку, содержащая гетерологичную популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт по настоящему изобретению.

В другом аспекте изобретения предусмотрены подобные стволовым клетки печени либо их экстракт, как определено в настоящем изобретении, или популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт, или частица, суспензия либо фармацевтическая композиция по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

В другом аспекте изобретения предусмотрены подобные стволовым клетки печени либо их экстракт, как определено в настоящем изобретении, или популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт, или частица, суспензия, фармацевтическая композиция или медицинское устройство по настоящему изобретению для применения при профилактике и/или лечении фульминантного заболевания печени.

В одном аспекте изобретения предусмотрены подобные стволовым клетки печени либо их экстракт, как определено в настоящем изобретении, или популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт, или частица, суспензия, фармацевтическая композиция или медицинское устройство для применения согласно настоящему изобретению, при этом фульминантным заболеванием печени является острая печеночная недостаточность (ALF) или же острая печеночная недостаточность на фоне хронической (ACLF).

В следующем аспекте изобретения предусмотрены подобные стволовым клетки печени либо их экстракт, как определено в настоящем изобретении, или популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт, или частица, суспензия, фармацевтическая композиция или медицинское устройство для применения согласно настоящему изобретению, при этом ACLF связана с заболеванием печени, выбранным из группы, состоящей из неалкогольного стеатогепатита (NASH); алкогольного гепатита; вирусного гепатита; криптогенных заболеваний печени; злокачественных заболеваний печени, таких как гепатоцеллюлярная карцинома и холангиокарцинома; аутоиммунного гепатита; сосудистых заболеваний печени типа синдрома Бадда-Киари; холестатических заболеваний печени; и наследственных метаболических заболеваний печени типа болезни Вильсона и нарушений цикла мочевины.

В одном аспекте изобретения предусмотрено применение криоконсервированной популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, либо их экстракта по настоящему изобретению для получения частицы, как определено здесь.

В другом аспекте изобретения предусмотрен способ скрининга лекарственного средства *in vitro*, который включает следующие стадии:

а) получение по меньшей мере одной подобной стволовым клетки печени либо ее экстракта, как определено здесь, и/или популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, либо их экстракта, и/или частицы и/или суспензии по настоящему изобретению;

б) контактирование указанных по меньшей мере одной клетки либо ее экстракта и/или популяции клеток либо их экстракта и/или частицы и/или суспензии, полученных на стадии а), с лекарственным средством-кандидатом;

с) измерение одного или нескольких биологических параметров и необязательно сравнение данного одного или нескольких биологических параметров с одним или несколькими контрольными параметрами;

д) определение того, представляет ли лекарственное средство-кандидат терапевтический и/или диагностический интерес.

В одном аспекте изобретения предусмотрен набор для лечения и/или профилактики фульминантного заболевания печени, который включает:

а) подобные стволовым клетки печени либо их экстракты, как определено здесь, или популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт, или частицу, суспензию либо фармацевтическую композицию по настоящему изобретению; и

б) средство для введения указанных клеток либо их экстрактов, популяции или экстракта клеток либо частицы, суспензии или фармацевтической композиции.

Определения

В настоящем изобретении следующие термины имеют следующие значения.

Термин “примерно” (“около”) перед числом означает плюс-минус 10% или меньше от значения данного числа. Следует иметь в виду, что само значение, к которому относится термин “примерно”, тоже конкретно и предпочтительно раскрыто.

Термин “включает” имеет значения “содержать”, “охватывать” и “включать в себя”. В некоторых воплощениях термин “включает” также охватывает термин “состоит из”.

“Фульминантное заболевание печени” означает быстрое и тяжелое ухудшение состояния печени у лица с известным существовавшим ранее или диагностированным заболеванием печени или без него. Следует понимать, что фульминантное заболевание печени само по себе не является хроническим заболеванием, но может возникать при хронических заболеваниях печени. В настоящем изобретении фульминантное заболевание печени означает такое заболевание печени, которое приоритетно для трансплантации печени по системе оценки для распределения органов типа Модели терминальной стадии

заболеваний печени (MELD) (Martin et al., 2014). Примеры заболеваний печени, приоритетных для трансплантации печени, включают острую печеночную недостаточность (ALF) и острую печеночную недостаточность на фоне хронической (ACLF).

“Трансплантация печени” означает такую хирургическую процедуру, которая проводится для удаления больной или поврежденной печени и замены её целой или частью здоровой печени другого человека (то есть донора). Печень – единственный орган в организме, способный к саморегенерации, а пересаженный сегмент печени может вырасти до нормального размера в течение нескольких недель.

“Острая печеночная недостаточность”, иначе “ALF”, означает высокоспецифичный и редкий синдром, характеризующийся острой аномалией при анализе печеночной крови у лиц без основного хронического заболевания печени. ALF в основном характеризуется смертностью 80% в отсутствие трансплантации печени, как признано в публикации Larsen et al. (2016).

“Острая печеночная недостаточность на фоне хронической”, иначе “ACLF”, – высокоспецифичный и редкий синдром, характеризующийся острой аномалией при анализе печеночной крови у лиц с основным хроническим заболеванием печени. В некоторых воплощениях ACLF также может упоминаться как “острая на фоне хронической печеночной недостаточности”, как изложено в Argo et al. (2016).

“Подобные стволовым клетки печени” означают, без ограничения, самовозобновляющиеся стволовые клетки печени, которые способны к пролиферации в подходящих условиях культивирования и способны к дифференцировке в несколько типов клеток, в частности, в клетки печени (то есть гепатоциты) или холангиоциты. “Подобные стволовым клетки печени” по изобретению, в частности, характеризуются экспрессией и/или отсутствием экспрессии ряда специфических маркеров. В настоящем изобретении подобные стволовым клетки печени, также известные как “pStemHeps”, отличаются от зрелых гепатоцитов тем, что они экспрессируют маркер AFP (AFP⁺, маркер незрелых гепатоцитов) и не экспрессируют маркер ALB (ALB⁻). Так, маркер ALB обычно связан с метаболическими и детоксифицирующими свойствами зрелых клеток печени.

“Клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени”, в настоящем изобретении означают такие клетки, которые дифференцируются из подобных стволовым клеток печени в дифференцированный тип клеток. Например, клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, могут включать гепатоцитоподобные клетки (HLC) и холангиоциты, и представлять собой потомство подобных стволовым клеток печени по изобретению.

“Гепатоцитоподобные клетки” или “HLC” в настоящем изобретении означают такие печеночные клетки, которые были получены *in vitro* и содержат основные маркеры зрелых гепатоцитов, обычно встречающиеся в функционально здоровой печени. В частности, HLC содержат (экспрессируют) маркеры, связанные с детоксифицирующими свойствами функционально здоровой печени, как-то маркер ALB и маркер CYP3A4.

Термины “экспрессируется” или “экспрессия” означают синтез представляющего интерес маркера в значительно детектируемом количестве на уровне нуклеиновой кислоты (РНК) и/или на уровне полипептида или белка. В более широком смысле термины “экспрессируется” или “экспрессия” также относятся к самому уровню.

Термины “Не экспрессируется” или “нет экспрессии” означает отсутствие синтеза представляющего интерес маркера в значительно детектируемом количестве на уровне нуклеиновой кислоты (РНК) и/или на уровне полипептида или белка. В более широком смысле термины “не экспрессируется” или “нет экспрессии” также относится к самому уровню.

“Маркер” означает такую молекулу, предпочтительно белка, гликопротеина или липопротеина, которая экспрессируется или не экспрессируется, в частности, дифференцированно экспрессируется или не экспрессируется в данных клетках или в популяции клеток, уровень экспрессии которой можно измерить подходящим методом (например, ОТ-ПЦР, секвенированием РНК, ELISA, FACS, вестерн-блоттингом, методом протеомики, иммунофлуоресцентным окрашиванием, определением активности белка) для характеристики данных клеток или популяции клеток.

“Выделенные” означает такие клетки или популяции клеток, которые извлечены из исходной культуральной среды, которая позволила получить эти клетки или популяции.

“Экстракт” означает такие клеточные фракции, включая цитозольную фракцию, цитоплазматическую фракцию, мембранные фракции, растворимые фракции, нерастворимые фракции, везикулы, экзосомы и их комбинации; или супернатанты, полученные из культуры подобных стволовым клеткам печени; или популяции, в частности выделенные популяции клеток, которые содержат подобные стволовым клеткам печени по изобретению. В некоторых воплощениях экстракты содержат частицы типа внеклеточных везикул (EV), экзосом или экзосомоподобных частиц.

“Экзосомы” означает такие внеклеточные нановезикулы, которые естественным образом секретируются/высвобождаются из клеток при слиянии промежуточного эндоцитарного компартмента – мультивезикулярных телец (MVB) с плазматической мембраной. Иными словами, экзосомы родственны внутрипросветным везикулам, которые секретируются/высвобождаются во внеклеточную среду.

“Суспензия” означает такое состояние, в котором клетки культивируются в трехмерном пространстве и взвешены в культуральной среде.

“Частицы/сфероиды” означает такие трехмерные частицы, в которых клетки агрегированы друг с другом. Термин “сфероиды” также конкретно означает частицы сферической формы, тогда как “частицы” могут иметь овальные или трубчатые формы.

“Экстракорпоральная биоискусственная печень” или “EBAL” означает такое внешнее медицинское устройство, которое содержит клетки с печеночными функциями. Такое устройство может быть подключено к пациенту с заболеванием печени через системное кровообращение и будет выполнять детоксифицирующую функцию, присущую функционально здоровой печени.

Понятия “подлежит лечению” или “лечение” или “облегчение” означают как терапевтическое лечение, так и профилактические или превентивные мероприятия, целью которых является предотвращение или замедление (уменьшение) целевого патологического состояния или заболевания, в частности заболевания печени, более конкретно фульминантного заболевания печени. В лечении нуждаются те, у кого уже есть такое заболевание, а также те, кто подвержен таким заболеваниям, или те, у кого нужно предотвратить такие заболевания. Индивиды успешно “лечатся” от заболевания печени, особенно фульминантного заболевания печени, если после получения терапевтического количества подобных стволовым клеткам печени по настоящему изобретению у них проявляется наблюдаемое и/или измеримое уменьшение либо отсутствие одного или нескольких симптомов, связанных с этим заболеванием печени (в частности, фульминантным заболеванием печени), а также снижение заболеваемости и смертности, улучшение качества жизни. Вышеприведенные параметры для оценки успешности лечения и ослабления заболевания легко измеряются при помощи рутинных процедур, известных врачам или уполномоченному персоналу.

“Профилактика” означает предотвращение возникновения и/или снижение вероятности возникновения или по крайней мере одного нежелательного побочного эффекта или симптома заболевания, нарушения или состояния печени, связанного с недостаточностью или отсутствием функции органа, ткани или клеток, в частности, фульминантного заболевания печени.

“Терапевтически эффективное количество” означает такой уровень или количество действующего вещества, которое должно, не вызывая значительных отрицательных или нежелательных побочных эффектов для мишени, (1) отсрочить или предотвратить возникновение заболевания, нарушения или состояния печени, в частности, фульминантного заболевания печени; (2) замедлить или остановить прогрессирование,

обострение или ухудшение одного или нескольких симптомов заболевания, нарушения или состояния печени, в частности, фульминантного заболевания печени; (3) вызвать ослабление симптомов заболевания, нарушения или состояния печени, в частности, фульминантного заболевания печени; (4) уменьшить тяжесть или частоту возникновения заболевания, нарушения или состояния печени, в частности, фульминантного заболевания печени; или (5) излечить заболевание, нарушение или состояние печени, в частности, фульминантное заболевание печени. Терапевтически эффективное количество может вводиться до возникновения заболевания, нарушения или состояния печени, в частности, фульминантного заболевания печени, для профилактического или превентивного действия. С другой стороны, терапевтически эффективное количество может вводиться и после возникновения заболевания, нарушения или состояния печени, в частности, фульминантного заболевания печени, для терапевтического действия. В одном воплощении терапевтически эффективное количество композиции составляет такое количество, которое эффективно уменьшает по меньшей мере один симптом заболевания, нарушения или состояния печени, в частности, фульминантного заболевания печени.

“Регенерация печени” означает способность печени восстанавливать свои функциональные биологические или функциональные свойства. “Регенерация печени” может включать усиление пролиферации эндогенных “здоровых” гепатоцитов или эндогенных стволовых клеток и их последующую дифференцировку в гепатоциты для компенсации гибели “больных” гепатоцитов, что ведет к увеличению здоровой ткани печени и здоровой массы печени. “Регенерация печени” также может включать уменьшение воспаления печени, связанного с заболеванием печени.

“Фармацевтически приемлемый носитель” означает такой носитель, который не вызывает никаких побочных, аллергических или других нежелательных реакций при введении животным, предпочтительно человеку. К ним относятся всевозможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства и др. Для введения человеку препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности, качества и чистоты в соответствии с требованиями регулирующих органов, таких, например, как Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарствами (FDA) в США или Европейское агентство по лекарственным средствам (EMA) в Европейском Союзе.

Термин “индивидуум” служит для обозначения животных индивидуумов, предпочтительно млекопитающих, более предпочтительно человека. Среди представляющих интерес индивидуумов-млекопитающих можно указать, без

ограничения, домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки; животных, имеющих экономическое значение, таких как крупный рогатый скот, овцы, козы, лошади, обезьяны. В одном воплощении индивидуумом может быть “пациент”, т.е. теплокровное животное, более предпочтительно человек, который ожидает получения или уже получает медицинскую помощь или был/будет объектом медицинских процедур или наблюдается на предмет наличия заболевания, нарушения или состояния, в частности, заболевания печени, в частности фульминантного заболевания печени. В одном воплощении индивидуумом является взрослый (например, человек старше 18 лет). В другом воплощении индивидуумом является ребенок (например, человек моложе 18 лет). В одном воплощении индивидуумом является мужчина. В другом воплощении индивидуумом является женщина.

Детальное раскрытие изобретения

Неожиданно авторы изобретения показали, что подобные стволовым клетки печени по изобретению, у которых профиль маркеров не соответствует профилю маркеров зрелых печеночных клеток, могут иметь терапевтическое применение для лечения фульминантных заболеваний печени, в частности острой печеночной недостаточности (ALF) или острой печеночной недостаточности на фоне хронической (ACLF), при которых требуется очень быстрая регенерация печени, в частности регенерации здоровой ткани печени внутри пораженной ткани печени. Вопреки существующему в данной области предубеждению, популяция клеток, включающая подобные стволовым клетки печени по изобретению, т.е. экспрессирующие маркер AFP, но не экспрессирующие маркер ALB, с которым обычно связаны, вместе с маркером CYP3A4, детоксицирующие функции зрелых гепатоцитов, все-таки способна значительно снижать такие параметры, как концентрация аланинаминотрансферазы (ALAT) в сыворотке крови и некроз печеночных клеток, причем очень быстро, т.е. в пределах 24 ч после введения.

Иными словами, подобные стволовым клетки печени по изобретению, хотя они и не являются зрелыми печеночными клетками, способны обеспечить регенерацию больной печени у лиц с фульминантной печеночной недостаточностью, что требует очень быстрой регенерации здоровой ткани печени.

Не придерживаясь какой-либо теории, авторы изобретения считают, что наличие детоксицирующей функции, обычно присущей зрелым клеткам печени и представленной маркерами ALB и CYP3A4, не является необходимым условием для начала лечения, а клеточная терапия на основе стволовых клеток с упором на популяцию клеток с менее продвинутой степенью дифференцировки является терапевтически удовлетворительной, вопреки предубеждениям в области трансплантации печени.

Кроме того, авторы изобретения показали, что можно получать неограниченное количество подобных стволовым клеткам печени из плюрипотентных стволовых клеток человека (hPSC), в частности, из эмбриональных стволовых клеток человека (hESC), в соответствии с различными протоколами дифференцировки.

Наконец, авторы изобретения показали, что трансплантация подобных стволовым клеткам печени по изобретению может проводиться даже в отсутствие иммунодепрессантов, что свидетельствует об очень низком риске острого отторжения трансплантатов. Таким образом, эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что аллогенная трансплантация подобных стволовым клеткам печени по изобретению может безопасно проводиться у пациентов, нуждающихся в лечении печени, в частности, нуждающихся в трансплантации печени.

В одном аспекте изобретения предусмотрены подобные стволовым клеткам печени, в частности, выделенные подобные стволовым клеткам печени, экспрессирующие один маркер – α -фетопротейн (AFP^+) и не экспрессирующие другой маркер – альбумин (ALB^-), либо их экстракты.

В рамках изобретения α -фетопротейн (AFP) также означает, без ограничения, α_1 -фетопротейн, α -фетоглобулин, HPAFP, AFPD и FETA. В рамках изобретения альбумин также означает, без ограничения, сывороточный альбумин, PRO0883, PRO0903, PRO1341 и HSA.

В некоторых воплощениях клетки, в частности, человеческие клетки, являются клетками, экспрессирующими один маркер – α -фетопротейн человека (AFP^+) и не экспрессирующими другой маркер – альбумин человека (ALB^-), либо экстрактами этих клеток.

Изобретением также предусмотрены клеточные культуры подобных стволовым клеткам печени *in vitro*, экспрессирующих один маркер – α -фетопротейн (AFP^+) и не экспрессирующих другой маркер – альбумин (ALB^-), либо их экстракты.

Изобретением также предусмотрены популяции клеток, включающие подобные стволовым клеткам печени, экспрессирующие один маркер – α -фетопротейн (AFP^+) и не экспрессирующие другой маркер – альбумин (ALB^-), либо их экстракты.

В частности, изобретением предусмотрены популяции клеток, например, выделенные популяции клеток, включающие подобные стволовым клеткам печени, экспрессирующие один маркер – α -фетопротейн (AFP^+) и не экспрессирующие другой маркер – альбумин (ALB^-), либо их экстракты.

В некоторых воплощениях популяции клеток представляют собой популяции клеток человека.

Еще в одном аспекте изобретения предусмотрены популяции клеток, в частности выделенные популяции клеток, включающие по меньшей мере 5% подобных стволовым клеткам печени, экспрессирующих один маркер – α -фетопротейн (AFP^+) и не экспрессирующие другой маркер – альбумин (ALB^-), либо их экстракты.

В настоящем изобретении предусматривается, что популяции клеток, включающие подобные стволовым клетки печени по изобретению, охватывают популяции, в которых по меньшей мере около 5%, или по меньшей мере около 10%, или по меньшей мере около 15%, или по меньшей мере около 20%, или по меньшей мере около 25%, или по меньшей мере около 30%, или по меньшей мере около 35%, или по меньшей мере около 40%, или по меньшей мере около 45%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 55%, или по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 65%, или по меньшей мере около 70%, или по меньшей мере около 75%, или по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95% или 100% клеток составляют подобные стволовым клетки печени по изобретению.

В рамках изобретения выражение “по меньшей мере около 5%” охватывает около 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%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

В одном воплощении по меньшей мере 5% клеток, предпочтительно по меньшей мере около 10% клеток, составляют подобные стволовым клетки печени, экспрессирующие один маркер – α -фетопротейн (AFP^+) и не экспрессирующие другой маркер – альбумин (ALB^-).

В некоторых воплощениях популяции клеток представляют собой популяции клеток *in vitro*, в частности, популяции выделенных клеток *in vitro*.

Изобретением также предусмотрены культуры клеток *in vitro*, включающие популяции клеток, в частности, популяции клеток человека, в которых по меньшей мере около 5% клеток составляют подобные стволовым клетки печени, предпочтительно подобные стволовым клетки печени человека, экспрессирующие один маркер – α -фетопротейн (AFP^+), в частности α -фетопротейн человека (AFP^+), и не экспрессирующие другой маркер – альбумин (ALB^-), в частности альбумин человека (ALB^-), либо их экстракты.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени экспрессируют один маркер – α -фетопротеин человека (AFP^+), и не экспрессируют другой маркер – альбумин человека (ALB^-).

В некоторых воплощениях популяции представляют собой выделенные популяции клеток, включающие подобные стволовым клетки печени, экспрессирующие один маркер – α -фетопротеин (AFP^+), в частности α -фетопротеин человека (AFP^+), и не экспрессирующие другой маркер – альбумин (ALB^-), в частности альбумин человека (ALB^-).

В некоторых воплощениях выделенные популяции содержат по меньшей мере около 50% подобных стволовым клеток печени, предпочтительно по меньшей мере около 70% подобных стволовым клеток печени по настоящему изобретению. В некоторых воплощениях выделенные популяции представляют собой практически чистые популяции подобных стволовым клеток печени по изобретению. В рамках изобретения выражение “практически очищенные” означает такие популяции, в которых подобные стволовым клетки печени составляют по меньшей мере около 50% от общего количества клеток в данной популяции.

В настоящем изобретении выражение “по меньшей мере около 50%” включает около 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

В некоторых воплощениях выделенные популяции по изобретению содержат по меньшей мере около 75%, предпочтительно по меньшей мере около 80%, предпочтительно по меньшей мере около 90% подобных стволовым клеток печени по настоящему изобретению.

На практике популяции или выделенные популяции клеток, включающие подобные стволовым клетки печени по изобретению, содержат подобные стволовым клетки печени и другие типы клеток, такие, например, как модифицированные клетки фибробластов. На практике природа этих других типов клеток может зависеть от природы клеток, используемых для получения подобных стволовым клеток печени.

Экспрессию или отсутствие экспрессии (нет экспрессии) этих маркеров можно отслеживать любым подходящим методом, известным в данной области, на уровне нуклеиновой кислоты (мРНК) или на уровне полипептида или белка. К примеру, эти методы могут включать, на уровне нуклеиновой кислоты: анализ РНК, выделенной из культивируемых клеток, методом количественной PCR (qPCR) в реальном времени (RT-

PCR) со специфичными праймерами и секвенирование РНК (RNASeq). На уровне полипептидов или белков эти методы включают иммунофлуоресцентный анализ с помощью специфичных по отношению к маркерам антител, вестерн-блоттинг, ELISA, проточную цитометрию (также известную как активируемая флуоресценцией сортировка клеток или FACS) или анализ какой-либо функциональной активности белка.

Понятно, что процент подобных стволовым клеткам печени, содержащихся в популяции клеток по изобретению, может варьировать в зависимости от метода, используемого для определения экспрессии выбранных маркеров, таких, в частности, как маркеры AFP и ALB, в данной популяции клеток.

В некоторых воплощениях общую относительную экспрессию в клетках мРНК AFP можно измерить любым подходящим методом, известным в данной области, или соответствующим адаптированным методом. К примеру, общую относительную экспрессию в клетках мРНК AFP можно определить методом qPCR (количественной PCR, также известной как PCR в реальном времени или RT-PCR). На практике общую относительную экспрессию в клетках мРНК AFP определяют по технологии Taqman[®] с соответствующими праймерами. В некоторых воплощениях относительную экспрессию в клетках мРНК AFP можно нормировать по экспрессии гена домашнего хозяйства, такого, например, как GAPDH, и выразить относительно уровня, выявленного в недифференцированных клетках hESCs.

В некоторых воплощениях общий относительный уровень экспрессии мРНК AFP в клетках по меньшей мере примерно в 10^2 раз превышает уровень экспрессии в клетках, не экспрессирующих AFP, при оценке методом qPCR. В настоящем изобретении клетки, не экспрессирующие AFP, означают клетки, в которых не выявляется значительный уровень мРНК AFP при оценке методом qPCR.

В рамках настоящего изобретения термин “по меньшей мере около 10^2 ” включает около 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 или более. В некоторых воплощениях относительный уровень экспрессии мРНК AFP в клетках по меньшей мере примерно в 10^3 раз, предпочтительно по меньшей мере примерно в 10^5 раз превышает уровень экспрессии в клетках, не экспрессирующих AFP, при оценке методом qPCR.

В некоторых воплощениях иммунофлуоресцентный анализ для измерения процента клеток, экспрессирующих один маркер – α -фетопротейн (AFP⁺) и не экспрессирующих другой маркер – альбумин (ALB⁻) в популяции клеток по изобретению, может проводиться с помощью подходящих антител против AFP и против ALB. К примеру, подходящими антителами могут быть коммерческие антитела, например, от фирмы Sigma Aldrich[®] (мышинное антитело против AFP, A8452) или от фирмы Cedarlane[®]

(мышинное антитело против ALB, CL2513A). На практике иммунофлуоресцентный анализ проводится по стандартной методике в данной области или по соответствующей адаптированной методике. В некоторых воплощениях популяция клеток по изобретению, в частности выделенная популяция клеток, содержит по меньшей мере около 50% подобных стволовым клеткам печени по настоящему изобретению при определении иммунофлуоресцентным методом.

В некоторых воплощениях анализ методом проточной цитометрии для измерения процента клеток, экспрессирующих один маркер – α -фетопроtein (AFP⁺) и не экспрессирующих другой маркер – альбумин (ALB⁻) в популяции клеток по изобретению, может проводиться по стандартной методике в данной области или по соответствующей адаптированной методике. В некоторых воплощениях популяция клеток по изобретению, в частности выделенная популяция клеток, содержит по меньшей мере около 5% подобных стволовым клеткам печени по настоящему изобретению при определении методом проточной цитометрии.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени по изобретению секретируют экспрессируемый AFP.

В некоторых воплощениях секрецию AFP можно определять любым подходящим методом, известным в данной области, или соответствующим адаптированным методом. К примеру, секрецию AFP можно определять методом ELISA. На практике анализ методом ELISA может проводиться по стандартной методике данной области или по соответствующей адаптированной методике. В некоторых воплощениях анализ методом ELISA проводится с помощью коммерческого набора, такого, например, как набор для определения AFP человека методом ELISA фирмы ABCAM[®]. Оценка отсутствия секреции ALB в культуре клеток может проводиться методом ELISA, в частности, с помощью коммерческого набора, такого, например, как набор для определения альбумина человека методом ELISA фирмы Bethyl[®]. При использовании коммерческих наборов выполняется методика в соответствии с инструкциями производителя, с соответствующими контролями. В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени секретируют по меньшей мере около 25 нг экспрессируемого AFP на 10⁶ клеток за 24 ч.

В рамках настоящего изобретения термин “по меньшей мере около 25 нг экспрессируемого AFP на 10⁶ клеток за 24 ч” включает 25 нг, 50 нг, 100 нг, 200 нг, 300 нг, 400 нг, 500 нг, 600 нг, 700 нг, 800 нг, 900 нг, 1 мкг, 2 мкг, 3 мкг, 4 мкг, 5 мкг/10⁶ клеток/24 ч или больше. В некоторых воплощениях клетки секретируют по меньшей мере 500 нг экспрессируемого AFP на 10⁶ клеток за 24 ч, предпочтительно по меньшей мере 1 мкг экспрессируемого AFP на 10⁶ клеток за 24 ч. В некоторых воплощениях подобные

стволовым клетки печени секретируют от около 0,1 мкг экспрессируемого AFP на 10^6 клеток за 24 ч до около 100 мкг экспрессируемого AFP на 10^6 клеток за 24 ч, предпочтительно от около 1 мкг экспрессируемого AFP на 10^6 клеток за 24 ч до около 70 мкг экспрессируемого AFP на 10^6 клеток за 24 ч.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки по изобретению дополнительно экспрессируют еще один маркер – фактор транскрипции T-Box 3 (TBX3⁺) и/или другой маркер – ядерный фактор гепатоцитов 4α (HNF4A⁺), предпочтительно и фактор транскрипции T-Box 3 (TBX3⁺), и ядерный фактор гепатоцитов 4α (HNF4A⁺).

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки по изобретению дополнительно экспрессируют еще один маркер – фактор транскрипции T-Box 3 (TBX3⁺) человека и/или другой маркер – ядерный фактор гепатоцитов 4α (HNF4A⁺) человека, предпочтительно и фактор транскрипции T-Box 3 (TBX3⁺) человека, и ядерный фактор гепатоцитов 4α (HNF4A⁺) человека.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки по изобретению дополнительно экспрессируют по меньшей мере еще один маркер, предпочтительно по меньшей мере еще два маркера, более предпочтительно еще три маркера, предпочтительно человеческих маркера, выбранных из группы, состоящей из KRT19, EPCAM и TTR. В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки по изобретению дополнительно экспрессируют по меньшей мере еще один маркер, предпочтительно по меньшей мере еще два маркера, более предпочтительно еще три маркера, еще более предпочтительно четыре маркера, предпочтительно человеческих маркера, выбранных из группы, состоящей из KRT19, EPCAM, TTR и HGF.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки по изобретению дополнительно экспрессируют по меньшей мере еще один маркер, предпочтительно по меньшей мере еще два маркера, более предпочтительно еще три маркера, предпочтительно человеческих маркера, выбранных из группы, состоящей из KRT19, EPCAM и TTR; и/или также экспрессируют HGF, предпочтительно HGF человека.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки по изобретению экспрессируют маркер – α-фетопротейн (AFP⁺), предпочтительно α-фетопротейн (AFP⁺) человека, и не экспрессируют другой маркер – альбумин (ALB⁻), предпочтительно альбумин (ALB⁻) человека; а также дополнительно экспрессируют еще один маркер – фактор транскрипции T-Box 3 (TBX3⁺) (предпочтительно TBX3⁺ человека) и/или другой маркер – ядерный фактор гепатоцитов 4α (HNF4A⁺) (предпочтительно HNF4A⁺ человека), и предпочтительно экспрессируют и фактор транскрипции T-Box 3 (TBX3⁺), и ядерный фактор гепатоцитов 4α (HNF4A⁺) (предпочтительно TBX3⁺ и HNF4A⁺ человека); а также

экспрессируют по меньшей мере еще один маркер, предпочтительно по меньшей мере еще два маркера, более предпочтительно еще три маркера, предпочтительно человеческих маркера, выбранных из группы, состоящей из KRT19, EPCAM и TTR; и/или также экспрессируют HGF, предпочтительно HGF человека.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени по изобретению экспрессируют маркеры AFP, TBX3 и HNF4A и не экспрессируют маркер ALB. В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени по изобретению экспрессируют маркеры AFP, TBX3, HNF4A и HGF и не экспрессируют маркер ALB. В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени по изобретению экспрессируют маркеры AFP, TBX3, HNF4A и TTR и не экспрессируют маркер ALB. В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени по изобретению экспрессируют маркеры AFP, TBX3, HNF4A, HGF и TTR и не экспрессируют маркер ALB. В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени по изобретению экспрессируют маркеры AFP, TBX3, HNF4A и EPCAM и не экспрессируют маркер ALB. В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени по изобретению экспрессируют маркеры AFP, TBX3, HNF4A, EPCAM и HGF и не экспрессируют маркер ALB. В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени по изобретению экспрессируют маркеры AFP, TBX3, HNF4A, EPCAM, TTR и KRT19 и не экспрессируют маркер ALB. В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени по изобретению экспрессируют маркеры AFP, TBX3, HNF4A, EPCAM, TTR, KRT19 и HGF и не экспрессируют маркер ALB. Предпочтительно маркерами являются человеческие маркеры.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени по изобретению дополнительно экспрессируют маркер EPCAM (EPCAM⁺) и/или не экспрессируют маркер цитохром CYP3A4 (CYP3A4⁻).

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени по изобретению дополнительно экспрессируют маркер EPCAM (EPCAM⁺) человека и/или не экспрессируют маркер цитохром CYP3A4 (CYP3A4⁻) человека.

В некоторых воплощениях стволоподобные клетки по изобретению дополнительно экспрессируют маркер SOX17 (SOX17⁺), предпочтительно SOX17 человека, и/или маркер APOA1 (APOA1⁺), предпочтительно APOA1 человека.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки по изобретению дополнительно экспрессируют маркер SERPINA1 (SERPINA1⁺), предпочтительно SERPINA1 человека.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки по изобретению экспрессируют маркер – α -фетопротейн (AFP⁺), предпочтительно α -фетопротейн (AFP⁺)

человека, и не экспрессируют другой маркер – альбумин (ALB^-), предпочтительно альбумин (ALB^-) человека; а также дополнительно экспрессируют еще один маркер – фактор транскрипции T-Box 3 ($TBX3^+$) (предпочтительно $TBX3^+$ человека) и/или другой маркер – ядерный фактор гепатоцитов 4 α ($HNF4A^+$) (предпочтительно $HNF4A^+$ человека), и предпочтительно экспрессируют и фактор транскрипции T-Box 3 ($TBX3^+$), и ядерный фактор гепатоцитов 4 α ($HNF4A^+$) (предпочтительно $TBX3^+$ и $HNF4A^+$ человека); а также экспрессируют еще по меньшей мере один маркер, предпочтительно по меньшей мере еще два маркера, более предпочтительно еще три маркера, предпочтительно человеческих маркера, выбранных из группы, состоящей из KRT19, EPCAM и TTR; и/или также экспрессируют HGF, предпочтительно HGF человека; и/или также экспрессируют маркер SOX17 ($SOX17^+$), предпочтительно SOX17 человека, и/или маркер APOA1 ($APOA1^+$), предпочтительно APOA1 человека; и/или также экспрессируют маркер SERPINA1 ($SERPINA1^+$), предпочтительно SERPINA1 человека.

В одном воплощении подобные стволовым клетки печени, предпочтительно в составе популяции клеток, не экспрессируют маркер ALB (ALB^-) и не экспрессируют маркер CYP3A4 ($CYP3A4^-$), но предпочтительно экспрессируют маркер AFP (AFP^+). Как известно, белки ALB и CYP3A4 участвуют в метаболических и детоксифицирующих свойствах здоровой печени взрослого человека. Поэтому, в данном воплощении, подобные стволовым клетки печени в составе популяции клеток не обладают метаболическими и детоксифицирующими свойствами, связанными с маркерами ALB и CYP3A4.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени, предпочтительно в составе популяции клеток, могут дополнительно характеризоваться комбинацией по меньшей мере двух из следующих признаков:

- экспрессия одного или нескольких из следующих маркеров, предпочтительно человеческих маркеров: APOA1, APOA2, APOA4, APOB, APOC3, APOE, BMP2, BMP4, CD164, CD24, CXCR4, DLK1, DPP4, FOXA2, GATA4, GATA6, GJA1, GSTA1, GSTA2, HNF1B, HNF4A, KI67, KRT18, KRT19, KRT8, SEPP1, SMAD7, SOD1, SPARC, TBX3, TTR, VIM, VTN;

- отсутствие экспрессии (нет экспрессии) одного или нескольких из следующих маркеров, предпочтительно человеческих маркеров: ABCB11, ASGR1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2B7P, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A7, F9, NAGS, PDX1, UGT1A1.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени по изобретению, предпочтительно в составе популяции клеток, могут дополнительно характеризоваться комбинацией по меньшей мере двух из следующих признаков:

– экспрессия одного или нескольких маркеров, предпочтительно человеческих маркеров, выбранных из группы, состоящей из APOA1, APOA2, APOA4, APOB, APOC3, APOE, BMP2, BMP4, CD164, CD24, CD99, CXCR4, DCN, DLK1, DPP4, EPCAM, FGF19, FOXA2, GATA4, GATA6, GJA1, GPC3, GSTA1, GSTA2, HGF, HMOX1, HNF1B, HNF4A, IGF1, IGFBP3, IL6ST, ITGA6, KI67, KRT18, KRT19, KRT8, LCP1, MKI67, MYDGF, NO DAL, PITX2, PROX1, SEPP1, SERPINA1, SMAD7, SNAI2, SOD1, SOX17, SPARC, TBX3, TTR, UGT3A1, VIM и VTN; и/или

– отсутствие экспрессии (нет экспрессии) одного или нескольких маркеров, предпочтительно человеческих маркеров, выбранных из группы, состоящей из ABCB11, ASGR1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2B7P, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A7, F9, NAGS, PDX1, UGT1A1.

В рамках изобретения EPCAM также относится без ограничений к молекуле адгезии эпителиальных клеток, ассоциированному с опухолью передатчику кальциевого сигнала 1, основному опухолевому белку желудочно-кишечного тракта GA733-2, поверхностному клеточному антигену 1 трофобластов, ассоциированному с аденокарциномой антигену, поверхностному клеточному гликопротеину Trop-1, эпителиальному гликопротеину 314, TACSTD1, EGP314, MIC18, TROP1, M4S1, KSA, антигену, идентифицируемому моноклональным антителом AUA1, эпителиальному гликопротеину-2 человека, поверхностному антигену эпителиальных клеток, эпителиальному гликопротеину, антигену KS 1/4, антигену CD326, GA733-2, HEGP314, HNPPC8, Ep-CAM, DIAR5, EGP-2, EGP40, KS1/4, MK-1, M1S2, ESA и EGP.

В рамках изобретения CYP3A4 также относится без ограничений к представителю 4 подсемейства А семейства 3 цитохрома P450, полипептиду 4 подсемейства IIIA цитохрома P450, полипептиду 4 подсемейства А семейства 3 цитохрома P450, альбендазол монооксигеназе (сульфоксид-образующей), таурохенодезоксихолат-6-альфа-гидроксилазе, 1,8-цинеол 2-экзомоноксигеназе, холестерин 25-гидроксилазе, альбендазол сульфоксидазе, хинин 3-монооксигеназе, цитохрому P450 NF-25, цитохрому P450-PCN1, цитохрому P450 3A3, цитохрому P450 3A4, цитохрому P450 HLP, нифедипин оксидазе, CYP3A3, CYP3A4, CYP3A3, полипептиду 3 подсемейства IIIA цитохрома P450, индуцируемому глюкокортикоидами P450, P450-III, индуцируемой стероидами альбендазол монооксигеназе, P450PCN1, P450C3, CYP3A, NF-25, CP33, CP34 и HLP.

В рамках изобретения APOA1 также относится без ограничений к аполипопротеину A1, аполипопротеину A-I, Apo-AI, секреторному белку, связывающему сперматозоиды в придатках яичек, Apo(A), ApoA-I; APOA2 также относится без ограничений к аполипопротеину A2, аполипопротеину A-II, Apo-AII, ApoA-II и ApoAII;

АРОА4 также относится без ограничений к аполипопротеину А4, аполипопротеину А-IV, Аро-АIV и АроА-IV; АРОА2 также относится без ограничений к аполипопротеину В, аполипопротеину В-100, аполипопротеину В48, Аро В-100, АроВ-100, АроВ-48, LDLCQ4, FCHL2 и FLDB; АРОС3 также относится без ограничений к аполипопротеину С3, аполипопротеину С-III, Аро-СIII, АроС-III и АРОСIII; АРОЕ также относится без ограничений к аполипопротеину Е, фактору болезни Альцгеймера 2 (связанному с АРОЕ*Е4, позднее начало), аполипопротеину Е3, LDLCQ5, АРО-Е, АроЕ4, Аро-Е, LPG и AD2; BMP2 также относится без ограничений к морфогенетическому белку кости 2, к морфогенетическому белку кости 2А, BMP2А, BMP-2А, SSFSC, BMP-2 и BDA2; BMP4 также относится без ограничений к морфогенетическому белку кости 4, к морфогенетическому белку кости 2В, BMP2В, BMP2В1, MCOPS6, BMP-2В, OFC11, BMP-4, ZYME и DVR4; CD164 также относится без ограничений к молекуле CD164, мультигликозилированному коровому белку 24, сиаломуциновому коровому белку 24, антигену CD164, сиаломуцину, эндолину, MGC-24v, MGC-24, MUC-24, аутосомнодоминантному белку глухоты 66, антигену CD164, DFNA66; CD24 также относится без ограничений к молекуле CD24, антигену CD24, передатчику сигналов CD24, CD24А, антигену мелкоклеточной карциномы легких кластера 4, антигену CD24; CD99 также относится без ограничений к антигену CD99, антигену, идентифицируемому моноклональными антителами 12Е7, F21 и O13, Т-клеточному поверхностному гликопротеину Е2, антигену Е2, MIC2X MIC2Y, MIC2, поверхностному клеточному антигену НВА-71, поверхностному клеточному антигену 12Е7, поверхностному клеточному антигену MIC2, НВА71, MSK5X, 12Е7; CXCR4 также относится без ограничений к рецептору-4 хемокина с мотивом С-Х-С, рецептору с 7 трансмембранными доменами, происходящими из лейкоцитов, ассоциированному с липополисахаридом белку 3, рецептору фактора 1, происходящему из стромальных клеток, ассоциированному с LPS белку 3, рецептору SDF-1, антигену CD184, фузину, LAP-3, LESTR, NPYRL, FB22, HM89, LCR1, рецептору селезенки с 7 трансмембранными сегментами, рецептору с 7 трансмембранными спиралями, рецептору Y3 нейропептида, хемокиновому рецептору, D2S201E, HSY3RR, NPYY3R, CXC-R4, CXCR-4, CD184, NPY3R, WHIMS, LAP3, NPYR, WHIM 3; DCN означает то же, без ограничения, что и декорин, SLRR1B, костный протеогликан II, DSPG2, PG40, дерматансульфатный протеогликан II, небольшой богатый лейцином белок 1В, базовый белок протеогликанов, протеогликан декорин, PG-S2, CSCD, PGII, PGS2, DCN 5; DLK1 означает то же, без ограничения, что и подобный дельта неканонический лиганд Notch 1, гомолог 1 белка дельта, DLK-1, DLK, PG2, подобный дельта-1 гомолог, подобный дельта гомолог, фактор 1 преадипоцитов, подобный дельта-1

гомолог, фетальный антиген 1, секредельтин, Delta1, Pref-1, PREF1, FA1 и ZOG; DPP4 означает то же, без ограничения, что и дипептидилпептидаза 4, комплексообразующий белок 2 аденозиндезаминазы, дипептидилпептидаза IV, комплексообразующий белок 2 аденозиндезаминазы – CD26, активирующий Т-клетки антиген CD26, дипептидилпептидаза IV, EC 3.4.14.5, ADCP-2, DPP IV, ADCP2, ADABP, TP103, CD26, дипептидил-пептидаза 4, дипептидилпептидаза 4, антиген CD26 и DPPIV; FGF19 означает то же, без ограничения, что и фактор роста фибробластов 19; FOXA2 означает то же, без ограничения, что и белок Forkhead Box A2, ядерный фактор гепатоцитов 3 β , белок A2 Forkhead Box, фактор транскрипции 3B, HNF-3-бета, HNF-3B, TCF-3B и печеночный ядерный фактор 3 β ; GATA4 означает то же, без ограничения, что и GATA-связывающий белок 4, фактор транскрипции GATA-4, GATA-связывающий фактор 4, GATA-связывающий белок 4, TACHD, ASD2, VSD1 и TOF; GATA6 означает то же, без ограничения, что и GATA-связывающий белок 6, фактор транскрипции GATA-6, GATA-связывающий фактор 6 и GATA-связывающий белок 6; GJA1 означает то же, без ограничения, что и белок щелевых контактов альфа-1, белок щелевых контактов сердца в 43 кДа, белок α 1 щелевых контактов, коннексин-43, GJAL, белок окулодентодигитальной дисплазии (синдактилии III типа), белок щелевых контактов типа альфа, коннексин 43, AVSD3, EKVP3, HLHS1, PPKCA, CMDR, CX43, EKVP, ODDD, Cx43 и HSS; GPC3 означает то же, без ограничения, что и глипикан 3, кишечный белок OCI-5, протеогликан глипикан 3, глипикан-3, GTR2-2, GTR2-2, OCI-5, SGBS1, DGSX, MXR7, SGBS, SGB, гепарансульфатный протеогликан, секретируемый глипикан-3, SDYS, OCI5; GSTA1 означает то же, без ограничения, что и глутатион-S-трансфераза альфа-1, глутатион-S-трансфераза A1, пероксидаза 13-гидропероксиоктадекадиеноата, андрост-5-ен-3,17-дион-изомеразы, представитель 1 GST класса альфа, субъединица 1 GST HA, GST-эпсилон, EC 2.5.1.18, GSTA1-1, GTH1, субъединица 1 глутатион-S-трансферазы Ha, S-(гидроксиалкил)глутатион-лиаза A1, глутатион-S-алкилтрансфераза A1, глутатион-S-арилтрансфераза A1, белок ткани яичек Li 80, глутатион-S-трансфераза 2, EC 1.11.1, EC 5.3.3 и GST2; GSTA1 означает то же, без ограничения, что и глутатион-S-трансфераза альфа-2, глутатион-S-трансфераза A2, представитель 2 GST класса альфа, субъединица 2 GST HA, EC 2.5.1.18, GST-гамма, GSTA2-2, GST2, GTH2, белок Li 59n, связывающий сперматозоиды в ткани яичек, S-(гидроксиалкил)глутатион-лиаза A2, глутатион-S-аралкилтрансфераза A2, глутатион-S-алкилтрансфераза A2, глутатион-S-арилтрансфераза A2, печеночная GST2 и GTA2; HGF означает то же, без ограничения, что и фактор роста гепатоцитов, HPTA, SF, фактор роста гепатоцитов (гепатопэтин A; фактор рассеяния), цитотоксичный для опухолей фактор из фибробластов, митоген из легочных

фибробластов, гепатопозитин-А, фактор рассеяния, F-TCF, HGFB, DFNB39; HMOX1 означает то же, без ограничения, что и гемооксигеназа 1, HO-1, гемооксигеназа 1 (дециклизирующая), BK286B10, белок теплового шока в 32 кД, HMOX1D, HSP32, HO1, HO; HNF1B означает то же, без ограничения, что и HNF1 гомеобокса В, ядерный фактор гепатоцитов 1β, гомеопротеин LFB3, HNF-1β, HNF-1B, VHNF1, TCF-2, TCF2, печеночный вариант ядерного фактора, печеночный вариант ядерного фактора 1, печеночный фактор транскрипции 2, фактор транскрипции 2, HNF-1β А, HNF1β, HPC11, LF-B3, MODY5, FJHN, HNF2 и LFB3; HNF4A означает то же, без ограничения, что и ядерный фактор гепатоцитов 4α, представитель 1 группы А подсемейства 2 ядерных рецепторов, ядерный фактор гепатоцитов 4-альфа, фактор транскрипции HNF-4, фактор транскрипции 14, TCF-14, TCF14, NR2A1, HNF4, печеночный ядерный фактор 4α, HNF4α10/11/12, HNF-4α, HNF4α, HNF4α7, HNF4α8, HNF4α9, NR2A21, FRTS4, MODY1, MODY и TCF3; IGF1 означает то же, без ограничения, что и инсулиноподобный фактор роста 1, IGF-I, фактор роста Mechano, соматомедин-С, IGFI, IGF, MGF, инсулиноподобный фактор роста IB, IGF 1A, IBP1; IGFBP3 означает то же, без ограничения, что и связывающий инсулиноподобный фактор роста белок 3, IGF-связывающий белок 3, IBP3, кислотоустойчивая субъединица комплекса IGF 140K, связывающий белок, зависимый от гормона роста, связывающий белок 53, связывающий белок 29, IGFBP-3, BP-53, IBP-3; IL6ST означает то же, без ограничения, что и передатчик сигналов интерлейкина-6, β-субъединица рецептора интерлейкина-6, α-субъединица рецептора онкостатина М, рецептор онкостатина Grp130, β-субъединица рецептора IL-6, мембранный гликопротеин 130, β-субъединица IL-6R, антиген CD130, IL-6RB, SGP130, CD130, GP130, растворимая форма Grp130, несущая антигенный пептид ревматоидного артрита, β-цепь рецептора интерлейкина, передатчик сигналов интерлейкина-6, мембранный гликопротеин Grp130, IL-6Rβ, CDW130, HIES4; ITGA6 означает то же, без ограничения, что и субъединица альфа-6 интегрин, представитель F семейства подобных CD49 антигенов, интегрин α6, CD49f, VLA-6, интегрин α6B, антиген CD49f, ITGA6B; KRT18 означает то же, без ограничения, что и кератин 18, белок гена 46, индуцирующего пролиферацию клеток, кератин, цитоскелетный кератин 18 типа I, кератин 18 типа I, СК-18, СУК18, K18, цитокератин 18, цитокератин-18 и кератин-18; KRT19 означает то же, без ограничения, что и кератин 19, цитоскелетный кератин 19 типа I, кератин филаментов в 40 кДа, кератин типа I в 40 кДа, кератин 19 типа I, цитокератин 19, СК-19, K19, цитокератин-19, кератин-19, СК19 и K1CS; KRT8 означает то же, без ограничения, что и кератин 8, цитоскелетный кератин 8 типа II, кератин Kb8 типа II, кератин 8 типа II, цитокератин-8, СК-8, СУК8, K8, кератин-8, CARD2, K2C8, СК8 и КО; LCP1 означает то же, без ограничения, что и

цитозольный белок лимфоцитов 1, LC64P, PLS2, L-пластин, пластин-2, LCP-1, CP64, L-пластин (цитозольный белок лимфоцитов 1) (LCP-1) (LC64P), BA139H14.1 (цитозольный белок лимфоцитов 1 (L-пластин)), цитозольный белок лимфоцитов 1 (L-пластин), цитозольный белок-1 лимфоцитов (плазмин), секреторный белок придатков яичек Li 37, пластин 2, L-пластин, HEL-S-37, LPL 3; MKI67 означает то же, без ограничения, что и маркер пролиферации Ki-67, антиген, идентифицируемый моноклональным антителом Ki-67, регуляторная субъединица 105 протеинфосфатазы 1, белковый маркер пролиферации Ki-67, антиген Ki67, связанный с пролиферацией антиген Ki-67, антиген KI-67, PPP1R105, MIB-1, MIB и KIA; MYDGF означает то же, без ограничения, что и фактор роста из миелоидов, рабочее обозначение интерлейкина 27, C19orf10, R33729_1, IL25, SF20, фактор роста SF20 из стромальных клеток, открытая рамка считывания 10 хромосомы 19, белок UPF0556 из C19orf10, EuroImage 1875335, интерлейкин-25, IL27w и IL27; NODAL означает то же, без ограничения, что и фактор роста и дифференцировки Nodal, гомолог Nodal, мышинный гомолог Nodal, HTX5; PITX2 означает то же, без ограничения, что и гомеодомен 2 типа Paired, фактор транскрипции 2 с гомеодоменом типа Paired, ARP1, чувствительный к ALL1 белок ARP1, гомеобоксный белок PITX2, гомеобоксный белок гипофиза 2, Solurshin, Otlx2, RIEG1, Brx1, IGDS, RIEG, RGS, RS, родственный бикоидам Rieg гомеобоксный фактор транскрипции 1, родственный бикоидам RIEG гомеобоксный фактор транскрипции, чувствительный к ALL1 ген 1, ASGD4, IGDS2, IRID2, IDG2, IHG2; PROX1 означает то же, без ограничения, что и гомеобоксный белок 1 Prospero, гомеобоксный белок PROX1 типа Prospero, родственный Prospero гомеобоксный белок 1; SEPP1 означает то же, без ограничения, что и селенопротеин P, селенопротеин P в плазме 1, SELP, SeP и SEPP; SERPINA1 означает то же, без ограничения, что и представитель 1 семейства серпинов A, α_1 -антитрипсин, AAT, представитель 1 клады A ингибиторов пептидаз серпинов (антипротеиназа альфа-1, α_1 -антитрипсин), ингибитор-1 протеаз (антиэластаза) α_1 -антитрипсин, ингибитор протеаз альфа-1, антипротеиназа альфа-1, серпин A1, α_1 -AT, A1AT, A1A, PI1, PI, представитель 1 клады A ингибиторов сериновых (или цистеиновых) протеиназ (антипротеиназа альфа-1, α_1 -антитрипсин), представитель 1 клады A ингибиторов пептидаз серпинов (антипротеиназа альфа-1, α_1 -антитрипсин), короткий вариант 1C4 транскрипта α_1 -антитрипсина, короткий вариант 1C5 транскрипта α_1 -антитрипсина, представитель 1 клады A ингибиторов пептидаз серпинов, секреторный белок, связывающий сперматозоиды в придатках яичек, α_1 -антитрипсин Null, антитрипсин альфа-1, PRO2275, NNIF; SMAD7 означает то же, без ограничения, что и представитель 7 семейства SMAD, гомолог 7 “матери против гена *decapentaplegic*”, гомолог 8 “матери против гена *DPP*”,

гомолог 8 MAD, HSMAD7, MADH7, MADH8, MAD, гомолог 7 “матери против гена *DPP*”, гомолог 7 MAD, SMAD 7, CRCS3 и Smad7; SNAI2 означает то же, без ограничения, что и репрессор транскрипции 2 семейства Snail, SLUGH, белок цинкового пальца 2 семейства Snail, белок цинкового пальца SNAI2, гомолог 2 белка Snail, SLUGH1, SNAIL2, SLUG, гомолог белка цинкового пальца Slug (куриный), белок цинкового пальца Slug (куриный гомолог), фактор транскрипции нервного гребня SLUG, фактор транскрипции нервного гребня Slug, гомолог 2 белка Snail (*Drosophila*), гомолог белка Snail, WS2D 3; SOD1 означает то же, без ограничения, что и супероксиддисмутаза 1, растворимая супероксиддисмутаза 1, супероксиддисмутаза [Cu-Zn], EC 1.15.1.1, HSod1, белок бокового амиотрофического склероза 1 (у взрослых), секреторный белок придатков яичек Li 44, цитозольная супероксиддисмутаза, супероксиддисмутаза Cu/Zn, индофенолоксидаза A, растворимая SOD, гомодимер, HEL-S-44, IPOA, ALS1, SOD и ALS; SOX17 означает то же, без ограничения, что и фактор транскрипции 17 SRY-Box, белок SRY (определяющая пол область Y)-Box 17, фактор транскрипции SOX-17, белок SRY-Box 17, родственный SRY HMG-Box фактор транскрипции SOX17 и VUR3; SPARC означает то же, без ограничения, что и кислый и богатый цистеином секреторируемый белок, секреторируемый белок, кислый и богатый цистеином, белок базальной мембраны 40, остеонектин, BM-40, ON, кислый богатый цистеином секреторируемый белок, богатый цистеином белок и OI17; TBX3 означает то же, без ограничения, что и фактор транскрипции T-Box 3, T-Box 3, фактор транскрипции T-Box TBX3, белок T-Box 3, белок XHL, связанный с раком мочевого пузыря, ульнарно-маммарным синдромом, TBX3-ISO, XHL и UMS; TTR означает то же, без ограничения, что и транстиретин, преальбумин при амилоидозе типа I, PALB, ATTR, ТВРА, белок 111 просвета придатков яичек, тироксин-связывающий преальбумин, белок 1 кистевого туннельного синдрома, преальбумин, HsT2651, HEL111, CTS1 и CTS; UGT3A1 означает то же, без ограничения, что и представитель A1 семейства 3 УДФ-гликозилтрансфераз, полипептид A1 семейства 3 УДФ-гликозилтрансфераз, УДФ-глюкуронозилтрансфераза 3A1, UDPGT 3A1, FLJ34658; VIM означает то же, без ограничения, что и виментин и связывающий сперматозоиды секреторный белок придатков яичек; VTN означает то же, без ограничения, что и витронектин, сывороточный фактор распространения, S-белок комплемента, соматомедин B, S-белок, V75, VN, сывороточный фактор распространения, эпиболин и VNT.

В рамках изобретения ABCB11 означает то же, без ограничения, что и представитель 11 подсемейства B АТФ-связывающих кассет, насос для выведения желчных солей, представитель 11 подсемейства B (MDR/TAP) АТФ-связывающих кассет, белок 2 прогрессирующего семейного внутрипеченочного холестаза, представитель 11

АТФ-связывающих кассет подсемейства В, представитель 16 ABC подсемейства MDR/TAP, BSEP, родственник Р-гликопротеина, ЕС 3.6.3.44, ЕС 7.6.2, ЕС 3.6.3, PFIC-2, ABC16, BRIC2, PFIC2, PGY4 и SPGP; ASGR1 означает то же, без ограничения, что и рецептор-1 асиалогликопротеинов, представитель H1 семейства 4 лектинов с доменом С-типа, печеночный лектин H1, CLEC4H1, HL-1, ASGP-R 1, ASGPR-1, ASGPR1 и ASGPR; CYP1A2 означает то же, без ограничения, что и представитель 2 подсемейства А семейства 1 цитохрома P450, полипептид 2 подсемейства I (индуцируемого ароматическими соединениями) цитохрома P450, полипептид 2 подсемейства А семейства 1 цитохрома P450, дегидратаза гидропероксиикозатетраеноата, холестерин-25-гидроксилаза, цитохром P450 1A2, цитохром P(3)450, цитохром P450-P3, цитохром P450-4, CYP1A2, связанная с флавопротеином монооксигеназа, арилгидроксилаза углеводов, микросомальная монооксигеназа, монооксигеназа ксенобиотиков, индуцируемый диоксином P3-450, ЕС 1.14.14.1, ЕС 1.14.14, ЕС 4.2.1.152, форма 4 P450, P450(PA), P3-450 и CP12; CYP2A6 означает то же, без ограничения, что и представитель 6 подсемейства А семейства 2 цитохрома P450, полипептид 6 подсемейства IIA (индуцируемого фенобарбиталом) цитохрома P450, полипептид 6 подсемейства А семейства 2 цитохрома P450, 2-экзомонооксигеназа 1,8-цинеола, 7-гидроксилаза кумарина, цитохром P450 IIA3, цитохром P450 2A6, цитохром P450(I), CYP2A6, CYP2A3, связанная с флавопротеином монооксигеназа, монооксигеназа ксенобиотиков, ЕС 1.14.14.1, ЕС 1.14.13, P450C2A, P450PB, CYP2A и CPA6; CYP2B6 означает то же, без ограничения, что и представитель 6 подсемейства В семейства 2 цитохрома P450, полипептид 6 подсемейства IIB (индуцируемого фенобарбиталом) цитохрома P450, полипептид 6 подсемейства В семейства 2 цитохрома P450, 2-экзомонооксигеназа 1,8-цинеола, цитохром P450 IIB1, цитохром P450 2B6, CYP2B6, цитохром P450 подсемейства IIB (индуцируемого фенобарбиталом), цитохром P450 семейства 2 подсемейства В, ЕС 1.14.14.1, ЕС 1.14.13, CYP2B7P, CYP2B7, CYP2B, CPB6, EFVM, IIB1 и P450; CYP2B7P означает то же, без ограничения, что и псевдоген представителя 7 подсемейства В семейства 2 цитохрома P450, псевдоген 1 полипептида 7 подсемейства В семейства 2 цитохрома P450, псевдоген полипептида 7 подсемейства В семейства 2 цитохрома P450, полипептид 7 подсемейства IIB (индуцируемого фенобарбиталом) цитохрома P450, короткая изоформа 2B7 цитохрома P450, изоформа 2B7 цитохрома P450, CYP2B7P1, CYP2B7 и CYP2B; CYP2C9 означает то же, без ограничения, что и представитель 9 подсемейства С семейства 2 цитохрома P450, полипептид 9 подсемейства С семейства 2 цитохрома P450, цитохром P450 PB-1, цитохром P450 2C9, цитохром P-450MP, CYP2C10, CYP2C9, полипептид 9 подсемейства IIC (мефенитоин-4-гидроксилазы) цитохрома P450, цитохром P450 – мефенитоин-4-

гидроксилаза, связанная с флавопротеином монооксигеназа, (R)-лимонен-6-монооксигеназа, (S)-лимонен-6-монооксигеназа, (S)-лимонен-7-монооксигеназа, S-мефенитоин-4-гидроксилаза, холестерин-25-гидроксилаза, микросомальная монооксигеназа, монооксигеназа ксенобиотиков, цитохром P450 MP-4, цитохром P450 MP-8, EC 1.14.14.53, EC 1.14.14.51, EC 1.14.14.52, EC 1.14.14.1, EC 1.14.14, P450PC9, CYP2C и CPC9; CYP2E1 означает то же, без ограничения, что и представитель 1 подсемейства E семейства 2 цитохрома P450, полипептид 1 подсемейства ПЕ (индуцируемого этанолом) цитохрома P450, полипептид 1 подсемейства E семейства 2 цитохрома P450, 4-нитрофенол-2-гидроксилаза, цитохром P450 2E1, цитохром P450-J, CYP ПЕ1, CYP2E, связанная с флавопротеином монооксигеназа, микросомальная монооксигеназа, монооксигеназа ксенобиотиков, EC 1.14.13.n7, EC 1.14.14.1, EC 1.14.14, P450C2E, P450-J и CPE1; CYP3A7 означает то же, без ограничения, что и представитель 7 подсемейства A семейства 3 цитохрома P450, полипептид 7 подсемейства A семейства 3 цитохрома P450, полипептид 7 подсемейства IIIA цитохрома P450, цитохром P450-HFLA, цитохром P450 3A7, CYP3A7, P450HLP2, связанная с флавопротеином монооксигеназа, арилгидроксилаза углеводов, микросомальная монооксигеназа, монооксигеназа ксенобиотиков, P-450(HFL33), EC 1.14.14.1, EC 1.14.14, P-450111A7, P450-HFLA и CP37; F9 означает то же, без ограничения, что и фактор свертывания крови IX, тромбопластиновый компонент плазмы, тромбопластический компонент плазмы, фактор Christmas, EC 3.4.21.22, PTC, фактор IX F9, фактор гемофилии В, фактор IX, EC 3.4.21, фактор 9, F9 P22, THPN8, HEMB, FIX и P19; NAGS означает то же, без ограничения, что и N-ацетилглутаматсинтаза, митохондриальная N-ацетилглутаматсинтаза, аминокислотная ацетилтрансфераза, EC 2.3.1.1, AGAS и ARGAS; PDX1 означает то же, без ограничения, что и панкреатическо-дуоденальный гомеобокс 1, фактор транскрипции с гомеодоменом фактора 1 промотора инсулина, фактор 1 трансактизации соматостатина, панкреатический/дуоденальный гомеобоксный белок 1, фактор 1 транскрипции соматостатина, вышележащий фактор 1 инсулина, островковый/дуоденальный гомеобокс-1, чувствительный к глюкозе фактор, IDX-1, IPF-1, IUF-1, PDX-1, STF-1, IPF1, GSF, панкреатическо-дуоденальный гомеобоксный фактор 1, фактор 1 промотора инсулина, PAGEN1, MODY4, IUF1 и STF1; UGT1A1 означает то же, без ограничения, что и представитель A1 семейства 1 УДФ-глюкуронозилтрансфераз, полипептид A1 семейства 1 УДФ-глюкозилтрансфераз, билирубин-специфичный изофермент 1 UDPGT, УДФ-глюкуронозилтрансфераза 1-1, УДФ-глюкуронозилтрансфераза 1-A, УДФ-глюкуронозилтрансфераза 1A1, EC 2.4.1.17, UDPGT 1-1, HUG-BR1, UGT1-01, UGT-1A, UGT1*1, UGT1.1, UGT1A, GNT1, UGT1, полипептид A1 семейства 1 УДФ-

глюкуронозилтрансфераз, изофермент 1 билирубин-УДФ-глюкуронозилтрансферазы, билирубин-УДФ-глюкуронозилтрансфераза 1-1, билирубин-УДФ-глюкуронозилтрансфераза, BILIGTL1 и UDPGT.

Например, маркер UGT1A1 обычно связан с детоксификацией аммиака и конъюгированием билирубина. В одном воплощении стволовые клетки печени, в частности, в составе популяции клеток, характеризуются отсутствием экспрессии маркера UGT1A1 (UGT1A1⁻), предпочтительно отсутствием экспрессии UGT1A1 человека. На практике у таких подобных стволовым клеткам печени нарушена способность к детоксификации аммиака и конъюгированию билирубина.

Как известно, метаболизм аммиака через цикл мочевины является важной функцией гепатоцитов на поздней стадии созревания. В некоторых воплощениях метаболизм аммиака можно оценивать по отсутствию экспрессии генов цикла мочевины (типа NAGS) или по изменению концентрации аммония в супернатантах клеточных культур в течение 24 часов после добавления хлорида аммония в известной концентрации. На практике в клеточные культуры можно добавить 1 мМ стандарта хлорида аммония, собрать супернатанты через 24 ч после добавления хлорида аммония и измерить концентрацию аммония, например, с помощью набора для колориметрического анализа аммиака (BioVision[®]).

В некоторых воплощениях подобные стволовым клеткам печени по изобретению экспрессируют по меньшей мере один маркер из числа факторов роста, в частности, фактор роста гепатоцитов (HGF⁺), и/или по меньшей мере один цитокин и/или по меньшей мере одну молекулу с противовоспалительными свойствами, иммунодепрессивными свойствами, противofiброзными свойствами, противостеатозными свойствами и/или антиоксидантными свойствами и т.п. В некоторых воплощениях такие подобные стволовым клеткам печени происходят из предшественников, выбранных из группы, состоящей из плюрипотентных стволовых клеток (pSC), индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ipSC), мультипотентных стволовых клеток, дифференцированных печеночных клеток и трансдифференцированных непеченочных клеток.

В настоящем изобретении термин “плюрипотентные клетки” означает клетки, обладающие способностью генерировать клеточное потомство, которое может подвергаться дифференцировке в соответствующих условиях в типы клеток, которые в совокупности проявляют характеристики, связанные с линиями клеток из трех зародышевых слоев (энтодермы, мезодермы и эктодермы). Плюрипотентные стволовые клетки могут вносить свой вклад в ткани пренатального, постнатального или взрослого

организма. Для установления плюрипотентности популяции клеток можно использовать стандартный тест, принятый в данной области, например, основанный на способности образовывать тератомы у 8-12-недельных мышей SCID. Однако для идентификации плюрипотентных клеток также может применяться идентификация различных характеристик плюрипотентных стволовых клеток.

В некоторых воплощениях изобретения плюрипотентные стволовые клетки представляют собой плюрипотентные стволовые клетки животных, более предпочтительно плюрипотентные стволовые клетки человека.

В некоторых воплощениях плюрипотентные стволовые клетки человека могут экспрессировать по меньшей мере два, и необязательно все из 13 маркеров, выбранных из группы, состоящей из SSEA-3, SSEA-4, TRA-I-60, TRA-I-81, TRA-2-49/6E, ALP, SOX2, Е-кадгерина, UTF-I, OCT4, LIN28, REX1 и NANOG. В настоящем изобретении выражение “по меньшей мере два” включает 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13.

В настоящем изобретении “индуцированные плюрипотентные стволовые клетки” (iPSC) означает такие плюрипотентные стволовые клетки, которые получены искусственно из неплюрипотентных клеток. Неплюрипотентные клетки могут обладать меньшей способностью (или активностью) к самообновлению и дифференцировке по сравнению с плюрипотентными стволовыми клетками. Клетками с меньшей способностью могут быть, без ограничения, соматические стволовые клетки, тканеспецифичные клетки-предшественники, первичные или вторичные клетки. iPSCs воспроизводимо получали путем перепрограммирования различных типов клеток при форсированной, индуцированной экспрессии и/или гиперэкспрессии факторов, важных для эмбрионального развития, пролиферации и контроля клеточного цикла, в частности, набора факторов транскрипции OCT4, SOX2, c-MYC и KLF4, или альтернативной комбинации факторов с заменой KLF4 и c-MYC на NANOG и LIN28 или с добавлением NANOG и LIN28, или же любыми методами, известными специалистам, для улучшения процесса перепрограммирования (с использованием небольших молекул типа ингибиторов ДНК-метилтрансферазы (DNMT), кнРНК, витаминов, гипоксии и др.).

В настоящем изобретении термин “перепрограммирование” обозначает процесс превращения данных клеток в клетки другого типа посредством форсированной экспрессии набора факторов (или факторов перепрограммирования) в данных клетках. В данной области описаны методы получения iPSC на основе экспрессирующих векторов, кодирующих факторы перепрограммирования, например, в WO 2007/69666, EP 2096169 и WO 2010/042490. На практике перепрограммирование может осуществляться при помощи экспрессирующих векторов, обеспечивающих эктопическую экспрессию

перепрограммирующих факторов, в частности, векторов типа бактериальных искусственных хромосом (BAC), космидных векторов, плазмидных векторов, векторов на основе транспозонов (типа PiggyBac), вирусных векторов, РНК, белков, небольших молекул и т.п. Подходящие экспрессирующие векторы описаны, например, в González et al. (2011).

В некоторых воплощениях iPSCs представляют собой iPSCs от животных, более предпочтительно iPSCs человека (hiPSCs). В некоторых воплощениях такие iPSCs, предпочтительно hiPSCs, происходят из клеток, полученных либо от здорового субъекта, либо от субъекта с заболеванием печени. В некоторых воплощениях такие iPSCs, предпочтительно hiPSCs, происходят из клеток, полученных от индивида без заболеваний печени, в частности без хронических заболеваний печени. В некоторых альтернативных воплощениях такие iPSCs, предпочтительно hiPSCs, происходят из клеток, полученных от индивида с заболеванием печени, в частности с хроническим заболеванием печени, при условии, что такие iPSCs, предпочтительно hiPSCs, не происходят из клеток печени. На практике выбор iPSCs, в частности hiPSCs, может оказаться успешным для проведения аутологичной трансплантации. Неограничивающие примеры источников iPSCs: моноклеарные клетки периферической крови (PBMC), фибробласты, мезенхимальные стволовые клетки, клетки мочевыводящих путей и т.п.

На практике iPSCs могут быть коммерчески доступны, например, из ATCC®. Неограничивающие примеры iPSCs включают: iPSCs из фибробластов крайней плоти (ATCC® ACS-7030); hiPSCs из перепрограммированных вирусом Sendai клеток костного мозга CD34⁺ (ATCC® ACS-1027; ATCC® ACS-1028; ATCC® ACS-1029; ATCC® ACS-1030; ATCC® ACS-1031); hiPSCs из перепрограммированных ретровирусом Yamanaka кожных фибробластов (ATCC® ACS-1023); iPSCs из мезенхимальных стволовых клеток (ATCC® ACS-7010); hiPSCs из перепрограммированных вирусом Sendai печеночных фибробластов (ATCC® ACS-1020); hiPSCs из перепрограммированных вирусом Sendai сердечных фибробластов (ATCC® ACS-1021).

В некоторых воплощениях популяции клеток, включающие подобные стволовым клетки печени по изобретению, могут быть получены при дифференцировке мультипотентных клеток типа мезенхимальных стволовых клеток, необязательно на твердой подложке.

В настоящем изобретении термин “мультипотентные” обозначает клетки, обладающие способностью к дифференцировке по меньшей мере в два терминально дифференцированных типа клеток. В некоторых воплощениях мультипотентные клетки представляют собой мультипотентные клетки животных, более предпочтительно

мультипотентные клетки человека.

В настоящем изобретении “мезенхимальные стволовые клетки” (MSCs) обычно означает стромальные клетки из специализированной ткани (то есть дифференцированной ткани), способные к самообновлению (т.е. к созданию идентичных копий самих себя) на протяжении всей жизни организма и обладающие мультипотентным потенциалом дифференцировки. В некоторых воплощениях MSCs по изобретению представляют собой MSCs от животных, более предпочтительно MSCs человека (hMSCs).

Так, на практике hMSC, подходящие для осуществления настоящего изобретения, включают любые подходящие мультипотентные стволовые клетки человека, полученные из любой подходящей ткани с использованием любого подходящего метода выделения.

Например, hMSCs включают, без ограничения, взрослые многолинейные индуцируемые (MIAMI) клетки (D'Ippolito et al., 2004), стволовые клетки из пуповинной крови (Kögler et al., 2004), мезангиобласты (Sampaolesi et al., 2006; Dellavalle et al., 2007) и амниотические стволовые клетки (De Coppi et al., 2007). Кроме того, банки пуповинной крови (например, Etablissement Français du Sang, Франция) являются безопасными и легкодоступными источниками таких клеток для трансплантации. hMSCs можно получать коммерческим путем, например, из Creative Bioarray®. Неограничивающие примеры hMSCs: HMSC.BM-100; HMSC.AD-100; мезенхимальные стволовые клетки взрослых людей (HMSC-Ad); мезенхимальные стволовые клетки человека из Вартонова студня (HMSC-WJ); мезенхимальные стволовые клетки человека из матрикса пуповины (hMSC-UC); мезенхимальные стволовые клетки человека из жировой ткани (HMSC-ad); мезенхимальные стволовые клетки человека из костного мозга (HMSC-bm); мезенхимальные стволовые клетки человека из печени (HMSC-he).

В некоторых воплощениях популяции клеток, содержащие подобные стволовым клетки печени по изобретению, могут быть получены из дифференцированных печеночных клеток, т.е. при дифференцировке клеток, выделенных из печени взрослых (например, из клеток-предшественников гепатоцитов). В некоторых воплощениях дифференцированные печеночные клетки представляют собой дифференцированные печеночные клетки животных, более предпочтительно дифференцированные печеночные клетки человека.

В некоторых воплощениях популяции клеток, содержащие подобные стволовым клетки печени по изобретению, могут быть получены из трансдифференцированных непеченочных клеток, т.е. при преобразовании соматических клеток типа фибробластов. В некоторых воплощениях трансдифференцированные печеночные клетки представляют собой трансдифференцированные печеночные клетки животных, более предпочтительно

трансдифференцированные печеночные клетки человека.

В некоторых воплощениях плюрипотентные стволовые клетки (pSCs) получают из эмбриональных стволовых клеток (ESC), предпочтительно из эмбриональных стволовых клеток человека (hESC).

В настоящем изобретении “эмбриональные стволовые клетки” означают такие эмбриональные клетки, которые способны к дифференцировке в клетки любого из трех эмбриональных зародышевых листков, а именно энтодермы, эктодермы или мезодермы, или оставаться в недифференцированном состоянии. Такие клетки могут включать клетки, полученные из эмбриональной ткани, сформировавшейся после беременности (например, бластоцисты) до имплантации эмбриона (т.е. предимплантационные бластоцисты), наращенные клетки бластоцистов (EBCs), полученные из бластоцистов на стадии после имплантации/перед гастрულიей (см. WO 2006/040763), эмбриональные зародышевые (EG) клетки, полученные из половых тканей плода в любой момент во время беременности, предпочтительно при беременности до 10 недель, а также полученные другими методами с неоплодотворенными яйцеклетками, такими как метод партеногенеза или переноса ядер.

На практике подходящие эмбриональные стволовые клетки могут быть получены хорошо известными методами культивирования клеток. Например, hESC могут быть выделены из бластоцистов человека. Бластоцисты человека обычно получают из предимплантационных эмбрионов человека *in vivo* либо из эмбрионов, оплодотворенных *in vitro* (IVF). С другой стороны, можно наращивать одиночные клетки эмбриона человека до стадии бластоцистов. Более подробные методы получения hESC приведены в U.S. Pat. No. 5,843,780.

На практике hESC преимущественно можно получать без разрушения эмбриона, как описано в Chung et al. (2008), или при партеногенетической активации неоплодотворенных ооцитов, как описано в Sagi et al. (2016).

В некоторых аспектах изобретения также предусмотрены клетки, производные от подобных стволовым клеткам печени по настоящему изобретению. В некоторых воплощениях клетки, производные от подобных стволовым клеткам печени по настоящему изобретению, включают гепатоцитоподобные клетки (HLC) и холангиоциты. В настоящем изобретении термин “холангиоциты” служит для обозначения эпителиальных клеток желчных протоков. В настоящем изобретении клетки, производные от подобных стволовым клеткам печени по настоящему изобретению, также относятся к потомству таких подобных стволовым клеткам печени.

В настоящем изобретении термин “экстракты” означает экстракты подобных

стволовым клеток печени либо популяций клеток, в частности, выделенных популяций, содержащих подобные стволовым клетки печени по изобретению. Термин “экстракты” означает любые клеточные фракции или супернатанты культур, полученные из культивируемых подобных стволовым клеток печени или популяций клеток, в частности выделенных популяций, содержащих подобные стволовым клетки печени по изобретению, при условии, что такие экстракты сохраняют свойства подобных стволовым клеток печени, в частности, их терапевтические свойства.

Клеточные фракции могут быть получены любым подходящим методом, известным в данной области соответствующим адаптированным методом. Получение клеточных фракций может включать механический, химический и/или ферментативный лизис клеток, центрифугирование, ультрацентрифугирование, аффинную хроматографию. Клеточные фракции включают цитозольную фракцию, цитоплазматическую фракцию, мембранные фракции, растворимые фракции, нерастворимые фракции, везикулы, экзосомы и их комбинации.

В некоторых воплощениях экстракты подобных стволовым клеток печени или популяций клеток, в частности выделенных популяций, содержащих подобные стволовым клетки печени по изобретению, содержат экзосомы или экзосомоподобные везикулы.

В настоящем изобретении термин “экзосомы” может означать нановезикулы эндочитарного происхождения, которые естественным образом секретируются почти из всех типов клеток организма. Экзосомы представляют собой липидные везикулы, содержащие белки, нуклеиновые кислоты и липиды. На практике экзосомы можно собирать, выделять и/или очищать любым подходящим методом, известным в данной области, или адаптированным из него.

К примеру, экзосомальная фракция может быть выделена методом дифференциального центрифугирования из культуральной среды, осаждением с помощью полимеров или методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Неограничивающий пример метода дифференциального центрифугирования из культуральной среды может включать следующие стадии:

- 1) центрифугирование в течение 10-20 мин при скорости от $300\times g$ до $500\times g$ для удаления клеток;
- 2) центрифугирование в течение 10-20 мин при скорости от $1500\times g$ до $3000\times g$ для удаления мертвых клеток;
- 3) центрифугирование в течение 20-45 мин при скорости от $7500\times g$ до $15000\times g$ для удаления обломков клеток;
- 4) одно или несколько ультрацентрифугирований в течение 30-120 мин при ско-

рости от $100000\times g$ до $200000\times g$ для осаждения экзосом.

С другой стороны, выделение экзосом или экзосомоподобных везикул может проводиться с помощью коммерческого набора, такого, например, как набор ExoEasy Maxi Kit (Qiagen®) или набор Total Exosome Isolation Kit (ThermoFisher Scientific®).

В некоторых воплощениях экзосомы или экзосомоподобные везикулы имеют средний диаметр в пределах от около 1 нм до около 250 нм, предпочтительно от около 20 нм до около 200 нм, более предпочтительно от около 90 нм до около 150 нм. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 1 нм до около 250 нм” охватывает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 и 250 нм.

В некоторых воплощениях экстракты, полученные из подобных стволовым клеткам печени по изобретению, содержат один маркер – α -фетопропротеин (AFP^+) и не экспрессируют другой маркер – альбумин (ALB^-).

В некоторых воплощениях экстракты, полученные из подобных стволовым клеткам печени по изобретению, дополнительно содержат еще один маркер – фактор транскрипции T-Box 3 ($TBX3^+$) и/или другой маркер – ядерный фактор гепатоцитов 4 α ($HNF4A^+$), предпочтительно и фактор транскрипции T-Box 3 ($TBX3^+$), и ядерный фактор гепатоцитов 4 α ($HNF4A^+$).

В некоторых воплощениях экстракты, полученные из подобных стволовым клеткам печени по изобретению, дополнительно содержат еще по меньшей мере один маркер, предпочтительно по меньшей мере два маркера, более предпочтительно три маркера, предпочтительно человеческих маркера, выбранных из группы, состоящей из KRT19, EPCAM и TTR. В некоторых воплощениях экстракты, полученные из подобных стволовым клеткам печени по изобретению, дополнительно содержат еще по меньшей мере один маркер, предпочтительно по меньшей мере два маркера, более предпочтительно три маркера, еще более предпочтительно четыре маркера, предпочтительно человеческих маркера, выбранных из группы, состоящей из KRT19, EPCAM, TTR и HGF. В некоторых воплощениях экстракты, полученные из подобных стволовым клеткам печени по изобретению, дополнительно содержат еще по меньшей мере один маркер, предпочтительно по меньшей мере два маркера, более предпочтительно три маркера, предпочтительно человеческих маркера, выбранных из группы, состоящей из KRT19, EPCAM и TTR; и/или также экспрессируют HGF, предпочтительно HGF человека.

В некоторых воплощениях экстракты, полученные из подобных стволовым клеткам печени по изобретению, дополнительно содержат маркеры AFP , $TBX3$ и $HNF4A$ и не содержат маркера ALB . В некоторых воплощениях экстракты, полученные из подобных

стволовым клеток печени по изобретению, дополнительно содержат маркеры AFP, TBX3, HNF4A и HGF и не содержат маркера ALB. В некоторых воплощениях экстракты, полученные из подобных стволовым клеток печени по изобретению, дополнительно содержат маркеры AFP, TBX3, HNF4A и TTR и не содержат маркера ALB. В некоторых воплощениях экстракты, полученные из подобных стволовым клеток печени по изобретению, дополнительно содержат маркеры AFP, TBX3, HNF4A, HGF и TTR и не содержат маркера ALB. В некоторых воплощениях экстракты, полученные из подобных стволовым клеток печени по изобретению, дополнительно содержат маркеры AFP, TBX3, HNF4A и EPCAM и не содержат маркера ALB. В некоторых воплощениях экстракты, полученные из подобных стволовым клеток печени по изобретению, дополнительно содержат маркеры AFP, TBX3, HNF4A, EPCAM и HGF и не содержат маркера ALB. В некоторых воплощениях экстракты, полученные из подобных стволовым клеток печени по изобретению, дополнительно содержат маркеры AFP, TBX3, HNF4A, EPCAM, TTR и KRT19 и не содержат маркера ALB. В некоторых воплощениях экстракты, полученные из подобных стволовым клеток печени по изобретению, дополнительно содержат маркеры AFP, TBX3, HNF4A, EPCAM, TTR, KRT19 и HGF и не содержат маркера ALB.

В некоторых воплощениях экстракты, полученные из подобных стволовым клеток печени по изобретению, могут содержать один или несколько маркеров, выбранных из группы, состоящей из ACTB, ATG1, AFP, ANXA2, ANXA5, ANXA6, APOA1, APOA2, APOA4, APOB, APOC3, APOE, BMP2, BMP4, CD164, CD24, CD63, CD81, CD9, CD99, CLTC, CXCR4, DCN, DLK1, DPP4, EEF1A1, EEF2, ENO1, EPCAM, FGF19, FOXA2, GAPDH, GATA4, GATA6, GJA1, GPC3, GSTA1, GSTA2, HGF, HMOX1, HNF1B, HNF4A, HSP90AA1, HSP90AB, HSPA8, HSPG2, IGF1, IGFBP3, IL6ST, ITGA6, KRT18, KRT19, KRT8, LCP1, MKI67, MYDGF, NODAL, PKM, PITX2, PROX1, SEPP1, SERPINA1, SMAD7, SNAI2, SOD1, SOX17, SPARC, TBX3, TFRC, TUBA1A, TUBB, TUBB3, TUBB6, TUBB4A, TUBB4B, TUBA1B, TUBB2A, TUBB2B, TTR, UGT3A1, VIM и VTN; и/или могут не содержать один или несколько маркеров, выбранных из группы, состоящей из ALB, ABCB11, ASGR1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2B7P, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A7, F9, NAGS, PDX1, UGT1A1.

Изобретением также предусмотрен способ получения подобных стволовым клеток печени, описанных здесь, включающий следующие стадии:

- a) культивирование клеток дефинитивной эндодермы в индукционной культуральной среде для получения подобных стволовым клеток печени, экспрессирующих маркер AFP (AFP⁺) и не экспрессирующих маркер ALB (ALB⁻);
- b) выделение подобных стволовым клеток печени, полученных на стадии a).

В некоторых воплощениях выделенные подобные стволовым клетки печени составляют популяцию клеток.

В настоящем изобретении термин “клетки дефинитивной эндодермы” означает клетки, экспрессирующие фенотипические маркеры, характерные для фазы дифференцировки дефинитивной эндодермы, в том числе, без ограничения, маркеры SOX17 и FOXA2. Кроме того, клетки дефинитивной эндодермы не экспрессируют маркер ALB (ALB⁻).

В настоящем изобретении понятие “индукционная культуральная среда” означает такую культуральную среду, которая способна индуцировать дифференцировку клеток дефинитивной эндодермы в подобные стволовым клетки печени, как определено в настоящем изобретении.

На практике термин “культуральная среда” – это общепринятое определение в области клеточной биологии, т.е. это любая среда, пригодная для стимуляции роста представляющих интерес клеток. В некоторых воплощениях подходящая культуральная среда может включать среду определенного химического состава, то есть питательную среду, содержащую только специфические компоненты, предпочтительно компоненты с известной химической структурой.

В некоторых воплощениях среда определенного химического состава может быть средой без сыворотки и/или без фидерных клеток. В настоящем изобретении “свободная от сыворотки среда” означает такую культуральную среду, которая не содержит добавленной сыворотки. В настоящем изобретении “среда без фидерных клеток” означает такую культуральную среду, которая не содержит добавленных фидерных клеток.

Подходящей культуральной средой для применения по изобретению может быть водная среда, которая содержит комбинацию веществ, таких как одна или несколько солей, источники углерода, аминокислоты, витамины, минералы, восстановители, буферные вещества, липиды, нуклеозиды, антибиотики, цитокины и факторы роста. Примеры подходящих культуральных сред включают, без ограничения, среду RPMI, среду Е Уильяма, базальную среду Игла (BME), минимальную основную среду Игла (EMEM), минимальную основную среду (MEM), модифицированную Дульбекко среду Игла (DMEM), среду F-10 Хэма, среду F-12 Хэма, модифицированную Кейгном среду F-12 Хэма, среду DMEM/F-12 и среду 5A МакКоя, которые также могут быть с добавлением любых из вышеприведенных веществ. В некоторых воплощениях подходящей культуральной средой по изобретению может быть синтетическая культуральная среда, например RPMI (среда Roswell Park Memorial Institute) или CMRL-1066 (Connaught Medical Research Laboratory).

На практике среды могут содержать дополнительные компоненты. Например, подходящей добавкой может быть коммерческая добавка B-27 фирмы Invitrogen®, так как она содержит инсулин, альбумин, супероксиддисмутазу (SOD), каталазу и другие антиоксиданты (GSH), а также уникальные жирные кислоты, такие как линолевая кислота, линоленовая кислота и липоевая кислота.

В некоторых воплощениях стадия (а) проводится в течение 5-8 дней в индукционной культуральной среде, содержащей морфогенетический белок кости, предпочтительно BMP4, и/или содержащей фактор роста фибробластов, предпочтительно FGF10, и необязательно содержащей фактор роста гепатоцитов HGF и/или ингибитор GSK3, предпочтительно CHIR-99021.

В некоторых воплощениях морфогенетический белок кости (BMP) выбирают из группы факторов роста – представителей суперсемейства TGF-бета, включающей молекулы, активирующие AR Smads, такие, например, как активин А, активин В, активин С, активин Е, GDF-8/миостатин, Nodal, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3; и молекулы, активирующие BR Smads, такие, например, как BMP2, BMP4, BMP6, BMP8a, BMP8b, GDF5, GDF6, GDF7, AMH. Подходящими BMP по изобретению являются, например, раскрытые в Miyazono et al. (2019).

В некоторых воплощениях фактор роста фибробластов (FGF) выбран из группы, включающей FGF из подсемейства FGF1, включая FGF1 (также известен как aFGF), FGF2 (также известен как bFGF); FGF из подсемейства FGF4, включая FG4, FGF5, FGF6; FGF из подсемейства FGF7, включая FGF3, FGF7, FGF10, FGF22; FGF из подсемейства FGF8, включая FGF8, FGF17, FGF18; FGF из подсемейства FGF9, включая FGF9, FGF16, FGF20; FGF из подсемейства FGF11, включая FGF11, FGF12, FGF13, FGF14; и FGF из подсемейства FGF19, включая FGF15/19, FGF21, FGF23. В некоторых воплощениях фактор роста фибробластов (FGF) выбирают из группы, состоящей из FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF15/19, FGF20, FGF21, FGF22 и FGF23.

На практике морфогенетический белок кости (BMP) и/или фактор роста фибробластов (FGF) присутствуют в индукционной среде в концентрации от около 0,01 нг/мл до около 500 нг/мл, предпочтительно от около 0,5 нг/мл до около 250 нг/мл, более предпочтительно от около 1 нг/мл до около 50 нг/мл. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 0,01 нг/мл до около 500 нг/мл” охватывает 0,01 нг/мл, 0,05 нг/мл, 0,1 нг/мл, 0,5 нг/мл, 1,0 нг/мл, 1,5 нг/мл, 2,0 нг/мл, 2,5 нг/мл, 5,0 нг/мл, 7,5 нг/мл, 10,0 нг/мл, 12,5 нг/мл, 15,0 нг/мл, 17,5 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 30 нг/мл, 35 нг/мл, 40 нг/мл, 45 нг/мл, 50 нг/мл, 55 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл, 150 нг/мл, 200 нг/мл,

250 нг/мл, 300 нг/мл, 350 нг/мл, 400 нг/мл, 450 нг/мл и 500 нг/мл.

В некоторых воплощениях BMP4 содержится в индукционной среде в концентрации от около 0,1 нг/мл до около 100 нг/мл, предпочтительно от около 0,5 нг/мл до около 50 нг/мл, более предпочтительно от около 1 нг/мл до около 25 нг/мл.

В некоторых воплощениях FGF10 содержится в индукционной среде в концентрации от около 0,1 нг/мл до около 100 нг/мл, предпочтительно от около 0,5 нг/мл до около 50 нг/мл, более предпочтительно от около 1 нг/мл до около 25 нг/мл.

В рамках настоящего изобретения выражение “от около 0,1 нг/мл до около 100 нг/мл” охватывает 0,1 нг/мл, 0,5 нг/мл, 1,0 нг/мл, 1,5 нг/мл, 2,0 нг/мл, 2,5 нг/мл, 5,0 нг/мл, 7,5 нг/мл, 10,0 нг/мл, 12,5 нг/мл, 15,0 нг/мл, 17,5 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 30 нг/мл, 35 нг/мл, 40 нг/мл, 45 нг/мл, 50 нг/мл, 55 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл и 100 нг/мл.

Фактор роста гепатоцитов HGF, когда он присутствует в индукционной среде, содержится в концентрации от около 0,5 нг/мл до около 150 нг/мл, предпочтительно от около 1 нг/мл до около 100 нг/мл, более предпочтительно от около 5 нг/мл до около 50 нг/мл. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 0,5 нг/мл до около 150 нг/мл” включает 0,5 нг/мл, 1,0 нг/мл, 1,5 нг/мл, 2,0 нг/мл, 2,5 нг/мл, 5,0 нг/мл, 7,5 нг/мл, 10,0 нг/мл, 12,5 нг/мл, 15,0 нг/мл, 17,5 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 30 нг/мл, 35 нг/мл, 40 нг/мл, 45 нг/мл, 50 нг/мл, 55 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл, 110 нг/мл, 120 нг/мл, 130 нг/мл, 140 нг/мл и 150 нг/мл.

В рамках изобретения в течение 5-8 дней включает 5, 6, 7 и 8 дней.

В некоторых воплощениях стадии (a) может предшествовать стадия (a1), включающая культивирование плюрипотентных стволовых клеток (PSCs), индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs) или мультипотентных стволовых клеток в культуральной среде для получения клеток дефинитивной энтодермы, экспрессирующих маркеры FOXA2 и SOX17. Отметим, что клетки дефинитивной энтодермы не экспрессируют маркер ALB (ALB⁻).

В некоторых воплощениях стадия (a1) может выполняться в течение 3-6 дней в культуральной среде, содержащей ингибитор GSK3, предпочтительно CHIR-99021, и необязательно содержащей трансформирующий фактор роста β , предпочтительно АСТ-А, и/или активатор сигнального пути Wnt, предпочтительно Wnt3A.

В рамках изобретения в течение 3-6 дней включает 3, 4, 5 и 6 дней.

В некоторых воплощениях ингибитор GSK3 выбран из группы, включающей 3F8 (CAS No. 159109-11-2), альстерпауллон (CAS No. 237430-03-4), CHIR-98014 (CAS No. 252935-94-7), CHIR-99021 (CAS No. 1797989-42-4), индирубин-3'-оксим (CAS No. 160807-

49-8), кенпауллон (CAS No. 142273-20-9), SB216763 (CAS No. 280744-09-4), TC-G 24 (CAS No. 1257256-44-2), TCS 2002 (CAS No. 1005201-24-0) и TWS119 (CAS No. 601514-19-6), литий, медь, ртуть, вольфрам, куркумин цинка, бериллий, 6-BIO, дибромкантареллин, гимениальдезин, индирубин, меридианин, CT98014, CT98023, CT99021, SB-41528, AR-A014418, AZD-1080, казпауллон, манзамин А, палинурин, трикантин, TDZD-8, NP00111, NP031115, тидеглусиб, НМК-32, L803-mts, вальпроевую кислоту, куркумин, алоизины, IM-12, LY2090314. На практике ингибиторы GSK3 могут быть коммерчески доступны, например, от Santa Cruz Biotechnology[®], SelleckChem[®] и Tocris[®].

В некоторых воплощениях ингибитор GSK3 присутствует в культуральной среде в концентрации от около 0,01 мкМ до около 50 мкМ. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 0,01 мкМ до около 50 мкМ” охватывает 0,01 мкМ, 0,02 мкМ, 0,03 мкМ, 0,04 мкМ, 0,05 мкМ, 0,06 мкМ, 0,07 мкМ, 0,08 мкМ, 0,09 мкМ, 0,1 мкМ, 0,2 мкМ, 0,3 мкМ, 0,4 мкМ, 0,5 мкМ, 0,6 мкМ, 0,7 мкМ, 0,8 мкМ, 0,9 мкМ, 1,0 мкМ, 1,5 мкМ, 2,0 мкМ, 2,5 мкМ, 3,0 мкМ, 3,5 мкМ, 4,0 мкМ, 4,5 мкМ, 5,0 мкМ, 5,5 мкМ, 6,0 мкМ, 6,5 мкМ, 7,0 мкМ, 7,5 мкМ, 8 мкМ, 9 мкМ, 10 мкМ, 11 мкМ, 12 мкМ, 13 мкМ, 14 мкМ, 15 мкМ, 20 мкМ, 25 мкМ, 30 мкМ, 35 мкМ, 40 мкМ, 45 мкМ и 50 мкМ.

В некоторых воплощениях ингибитором GSK3 является CHIR-99021. В некоторых воплощениях CHIR-99021 содержится в культуральной среде в концентрации от около 0,1 мкМ до около 15 мкМ, предпочтительно от около 0,5 мкМ до около 10 мкМ, более предпочтительно от 1 мкМ до 5 мкМ. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 0,1 мкМ до около 15 мкМ” охватывает 0,1 мкМ, 0,2 мкМ, 0,3 мкМ, 0,4 мкМ, 0,5 мкМ, 0,6 мкМ, 0,7 мкМ, 0,8 мкМ, 0,9 мкМ, 1,0 мкМ, 1,5 мкМ, 2,0 мкМ, 2,5 мкМ, 3,0 мкМ, 3,5 мкМ, 4,0 мкМ, 4,5 мкМ, 5,0 мкМ, 5,5 мкМ, 6,0 мкМ, 6,5 мкМ, 7,0 мкМ, 7,5 мкМ, 8,0 мкМ, 9,1 мкМ, 10,0 мкМ, 12,0 мкМ, 13,0 мкМ, 14,0 мкМ и 15 мкМ.

В некоторых воплощениях трансформирующий фактор роста β выбран из группы, включающей активин А, активин В, активин С, активин Е, АМН, BMP2, BMP4, BMP6, BMP8a, BMP8b, GDF5, GDF6, GDF7, GDF-8/миостатин, Nodal, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3.

На практике трансформирующий фактор роста β содержится в культуральной среде в концентрации от около 0,01 нг/мл до около 1000 нг/мл, предпочтительно от около 0,5 нг/мл до около 500 нг/мл, более предпочтительно от около 1 нг/мл до около 250 нг/мл. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 0,01 нг/мл до около 1000 нг/мл” охватывает 0,01 нг/мл, 0,05 нг/мл, 0,1 нг/мл, 0,5 нг/мл, 1,0 нг/мл, 1,5 нг/мл, 2,0 нг/мл, 2,5 нг/мл, 5,0 нг/мл, 7,5 нг/мл, 10,0 нг/мл, 12,5 нг/мл, 15,0 нг/мл, 17,5 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 30 нг/мл, 35 нг/мл, 40 нг/мл, 45 нг/мл, 50 нг/мл, 55 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл, 150 нг/мл, 200 нг/мл, 250 нг/мл, 300 нг/мл, 350 нг/мл, 400 нг/мл, 450

нг/мл, 500 нг/мл, 600 нг/мл, 700 нг/мл, 800 нг/мл, 900 нг/мл и 1000 нг/мл.

В некоторых воплощениях трансформирующим фактором роста β является активин А (АСТ-А). Когда АСТ-А присутствует в культуральной среде, то он содержится в концентрации от около 1 нг/мл до около 500 нг/мл, предпочтительно от около 25 нг/мл до около 250 нг/мл, более предпочтительно от около 50 нг/мл до около 150 нг/мл. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 1 нг/мл до около 500 нг/мл” охватывает 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 50 нг/мл, 75 нг/мл, 100 нг/мл, 150 нг/мл, 200 нг/мл, 250 нг/мл, 300 нг/мл, 350 нг/мл, 400 нг/мл, 450 нг/мл и 500 нг/мл.

В некоторых воплощениях активатор сигнального пути Wnt выбран из группы семейства Wnt, состоящей из Wnt-1 (также известен как Int-1), Wnt-2 (также известен как Irf, т.е. родственный Int-1-белок), Wnt-2b (также известен как Wnt-13), Wnt-3 (также известен как Int-4), Wnt-3a, Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-5b, Wnt-6, Wnt-7a, Wnt-7b, Wnt-8a (также известен как Wnt-8d), Wnt-8b, Wnt-9a (также известен как Wnt-14), Wnt-9b (также известен как Wnt-14b или Wnt-15), Wnt-10a, Wnt-10b (также известен как Wnt-12), Wnt-11, Wnt-12 (также известен как Wnt-10b), Wnt-13 (также известен как Wnt-2b), Wnt-14 (также известен как Wnt-9a), Wnt-14b (также известен как Wnt-9ab), Wnt-15 (также известен как Wnt-9b) и Wnt-16.

На практике активатор сигнального пути Wnt содержится в культуральной среде в концентрации от около 0,01 нг/мл до около 1000 нг/мл, предпочтительно от около 0,5 нг/мл до около 500 нг/мл, более предпочтительно от около 1 нг/мл до около 250 нг/мл.

В некоторых воплощениях активатором сигнального пути Wnt является Wnt-3a. Когда Wnt-3a присутствует в культуральной среде, то он содержится в концентрации от около 1 нг/мл до около 250 нг/мл, предпочтительно от около 5 нг/мл до около 150 нг/мл, более предпочтительно от около 25 нг/мл до около 100 нг/мл. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 1 нг/мл до около 250 нг/мл” охватывает 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 15 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 50 нг/мл, 75 нг/мл, 100 нг/мл, 125 нг/мл, 150 нг/мл, 175 нг/мл, 200 нг/мл, 225 нг/мл и 250 нг/мл.

На практике стадия (b) может выполняться любым подходящим способом, известным в данной области, например, методом FACS, необязательно с одной или несколькими промывками клеток в соответствующей среде (культуральной среде или подходящем для клеток буфере) для удаления нежелательных ингредиентов из культуральной среды.

В некоторых воплощениях стадии (b) может предшествовать стадия (b1), следующая за стадией (a), включающая отделение клеток от сосуда для культивирования, используемого для выполнения стадии (a). На практике отделение клеток может

проводиться путем химического и/или ферментативного отщепления, включающего обработку клеток EDTA и/или трипсином; и/или путем механического отщепления, включающего соскабливание подходящим инструментом (например, шпателем), или путем взбалтывания.

Авторы изобретения отмечали, что подобные стволовым клетки печени по изобретению легко поддаются манипуляциям по сравнению с гепатоцитоподобными клетками (HLC), которые обладают характеристиками зрелых печеночных клеток функционально здоровой печени. Так, полученные *in vitro* HLC сильно прилипают друг к другу и к сосуду для культивирования. Поэтому отделение HLC требует жестких условий химической и/или ферментативной и/или механической обработки. В промышленных масштабах механическое отделение зачастую невозможно реализовать, что отрицательно сказывается на выходе. В отличие от HLC, подобные стволовым клетки печени по изобретению легче отделяются от сосуда для культивирования, используемого для их получения, поэтому для отделения подобных стволовым клеток печени с выходом более 90% достаточны легкие или умеренные условия, например, химического отделения.

В настоящем изобретении легкие или умеренные условия химического и/или ферментативного отделения включают обработку трипсином в конечной концентрации не более около 0,5% (об/об) и/или не более около 1 mM EDTA.

В некоторых воплощениях ферментативное отделение подобных стволовым клеток печени по изобретению от сосуда для культивирования включает обработку данных клеток раствором трипсина с концентрацией от около 0,0125% до около 0,5%. В рамках настоящего изобретения выражение “раствор трипсина с концентрацией от около 0,0125% до около 0,5%” охватывает 0,0125%, 0,015%, 0,0175%, 0,02%, 0,0225%, 0,025%, 0,0275%, 0,03%, 0,0325%, 0,035%, 0,0375%, 0,04%, 0,0425%, 0,045%, 0,0475%, 0,05%, 0,0525%, 0,055%, 0,0575%, 0,06%, 0,0625%, 0,0650%, 0,0675%, 0,07%, 0,0725%, 0,0775%, 0,08%, 0,0825%, 0,085%, 0,0875%, 0,09%, 0,0925%, 0,095%, 0,0975%, 0,1%, 0,125%, 0,15%, 0,175%, 0,2%, 0,225%, 0,25%, 0,25%, 0,25%, 0,3%, 0,325%, 0,35%, 0,375%, 0,4%, 0,425%, 0,45%, 0,475% и 0,5%. В некоторых воплощениях трипсин может быть коммерчески доступен, например, от фирмы ThermoFischer Scientific®, в виде TrypLE™ Express или TrypLE™ Select.

В некоторых воплощениях химическое отделение подобных стволовым клеток печени по изобретению от сосуда для культивирования включает обработку данных клеток от около 0,01 mM до около 1 mM EDTA. В рамках настоящего изобретения термин “от около 0,01 mM до около 1 mM EDTA” охватывает 0,01 mM, 0,02 mM, 0,03 mM, 0,04 mM, 0,05 mM, 0,06 mM, 0,07 mM, 0,08 mM, 0,09 mM, 0,1 mM, 0,15 mM, 0,2 mM, 0,25 mM, 0,3 mM,

0,35 mM, 0,4 mM, 0,45 mM, 0,5 mM, 0,55 mM, 0,6 mM, 0,65 mM, 0,7 mM, 0,75 mM, 0,8 mM, 0,85 mM, 0,9 mM, 0,95 mM и 1 mM EDTA.

В некоторых воплощениях плюрипотентные стволовые клетки (PSCs) представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs) или эмбриональные стволовые клетки (ESCs), предпочтительно эмбриональные стволовые клетки (ESCs), более предпочтительно эмбриональные стволовые клетки человека (hESCs).

На практике параметры культивирования, такие как температура, pH, соленость и уровни O₂ и CO₂, регулируются в соответствии со стандартами, установленными в данной области.

В некоторых воплощениях уровень CO₂ в ходе культивирования поддерживается постоянным и составляет от около 1% до около 10%, предпочтительно от около 2,5% до около 7,5%. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 1% до около 10%” охватывает 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5% и 10%.

К примеру, температура при культивировании клеток по изобретению может составлять от около 30°C до около 42°C, предпочтительно от около 35°C до около 40°C и более предпочтительно от около 36°C до около 38°C. В рамках изобретения выражение “от около 30°C до около 42°C” охватывает 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C и 42°C.

В некоторых воплощениях культуральную среду меняют по меньшей мере через день, предпочтительно каждый день в ходе культивирования. На практике культуральную среду удаляют, клетки один или два раза промывают свежей культуральной средой и подают клеткам свежую культуральную среду.

В некоторых воплощениях культивирование клеток в подходящей культуральной среде для получения подобных стволовым клеткам печени может проводиться в присутствии матрикса, например, внеклеточного матрикса.

В настоящем изобретении термин “матрикс” означает такие компоненты/материалы, природные, синтетические либо их комбинации, которые образуют полимерную сеть, обеспечивающую культивируемым *in vitro* клеткам (например, в сосудах для культивирования типа плоских планшетов) морфологию, свойственную клеткам *in vivo*, и физиологически релевантное окружение. Иными словами, матрикс, в частности внеклеточный матрикс, обеспечивает культивируемым клеткам более подходящую среду, предназначенную для усиления межклеточных взаимодействий, облегчения прикрепления клеток и улучшения роста и дифференцировки

клеток.

В некоторых воплощениях матрикс, в частности внеклеточный матрикс, может содержать по меньшей мере один ингредиент, выбранный из группы, состоящей из ламинина, коллагена, фибронектина, желатина и их смесей.

В некоторых воплощениях матрикс, в частности внеклеточный матрикс, содержит по меньшей мере один ламинин, причем предпочтительно данный по меньшей мере один ламинин выбран из группы, состоящей из ламинина-111 (LN-111), ламинина-211 (LN-211), ламинина-332 (LN-332), ламинина-411 (LN-411), ламинина-421 (LN-421), ламинина-511 (LN-511), ламинина-521 (LN-521) и их функциональных фрагментов. В настоящем изобретении термин “функциональные фрагменты” означает такие фрагменты ламинина, которые воспроизводят биологические функции полноразмерного белка ламинина.

В некоторых воплощениях указанный ламинин представляет собой ламинин животных, предпочтительно ламинин человека, более предпочтительно рекомбинантный ламинин человека. В настоящем изобретении термин “рекомбинантный” означает такой ламинин, который синтезируется в результате экспрессии соответствующей кодирующей его нуклеиновой кислоты. Системы для клонирования и экспрессии полипептидов в различных клетках-хозяевах хорошо известны в данной области. На практике рекомбинантный ламинин человека, такой, например, как рекомбинантный LN-111 или LN-521 человека, можно получить коммерческим путем от фирмы Biolamina®.

В некоторых воплощениях изобретения ламинин может быть нанесен на твердую подложку (сосуд для культивирования), например, чашку (такую, как чашка Петри) или флакон в концентрации от около 0,02 мкг/мл до около 50 мкг/мл, предпочтительно от около 0,1 мкг/мл до около 10 мкг/мл, более предпочтительно примерно около 5 мкг/мл. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 0,02 мкг/мл до около 50 мкг/мл” охватывает 0,02 мкг/мл, 0,05 мкг/мл, 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1,0 мкг/мл, 1,5 мкг/мл, 2,0 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 5,0 мкг/мл, 7,5 мкг/мл, 10,0 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 15,0 мкг/мл, 17,5 мкг/мл, 20 мкг/мл, 25 мкг/мл, 30 мкг/мл, 35 мкг/мл, 40 мкг/мл, 45 мкг/мл и 50 мкг/мл.

В некоторых воплощениях изобретения функциональный фрагмент ламинина может быть нанесен на твердую подложку (сосуд для культивирования), например, чашку (такую как чашка Петри) или флакон в концентрации от около 0,02 мкг/мл до около 100 мкг/мл, предпочтительно от около 0,1 мкг/мл до около 50 мкг/мл, более предпочтительно примерно около 25 мкг/мл. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 0,02 мкг/мл до около 100 мкг/мл” охватывает 0,02 мкг/мл, 0,05 мкг/мл, 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1,0 мкг/мл, 1,5 мкг/мл, 2,0 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 5,0 мкг/мл, 7,5 мкг/мл, 10,0 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 15,0 мкг/мл, 17,5 мкг/мл, 20 мкг/мл, 25 мкг/мл, 30 мкг/мл, 35 мкг/мл, 40 мкг/мл, 45

мкг/мл, 50 мкг/мл, 60 мкг/мл, 70 мкг/мл, 80 мкг/мл, 90 мкг/мл и 100 мкг/мл.

В некоторых воплощениях матрикс, в частности внеклеточный матрикс, может содержать смесь LN-521 и LN-111, в частности, соответственно, в соотношении около 5%/95%; 10%/90%; 20%/80%; 25%/75%; 30%/70%; 40%/60%; 50%/50%; 60%/40%; 70%/30%; 75%/25%; 80%/20%; 90%/10%; 95%/5%.

В некоторых воплощениях по меньшей мере один коллаген, входящий в состав внеклеточного матрикса, представляет собой фибриллярный коллаген. В некоторых воплощениях указанный фибриллярный коллаген выбран из группы, состоящей из коллагена типа I, коллагена типа II, коллагена типа III, коллагена типа V, коллагена типа VI, коллагена типа XI, коллагена типа XXIV, коллагена типа XXVII и их смесей. В некоторых воплощениях коллаген, предпочтительно фибриллярный коллаген, присутствует в культуральной среде в концентрации от около 0,25 мг/мл до около 3,00 мг/мл. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 0,25 мг/мл до около 3,00 мг/мл” охватывает около 0,25 мг/мл, 0,50 мг/мл, 0,75 мг/мл, 1,00 мг/мл, 1,25 мг/мл, 1,50 мг/мл, 1,75 мг/мл, 2,00 мг/мл, 2,25 мг/мл, 2,50 мг/мл, 2,75 мг/мл и 3,00 мг/мл.

В одном воплощении фибронектин, когда он присутствует, находится в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 10 мг/мл. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 0,01 мг/мл до около 10 мг/мл” охватывает около 0,01 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,50 мг/мл, 0,75 мг/мл, 1 мг/мл, 1,25 мг/мл, 1,50 мг/мл, 1,75 мг/мл, 2 мг/мл, 2,25 мг/мл, 2,50 мг/мл, 2,75 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 мг/мл и 10 мг/мл.

В одном воплощении желатин, когда он присутствует, находится в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 10 мг/мл. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 0,01 мг/мл до около 10 мг/мл” охватывает около 0,01 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,50 мг/мл, 0,75 мг/мл, 1 мг/мл, 1,25 мг/мл, 1,50 мг/мл, 1,75 мг/мл, 2 мг/мл, 2,25 мг/мл, 2,50 мг/мл, 2,75 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 мг/мл и 10 мг/мл.

В некоторых воплощениях способ включает стадию (с) замораживания подобных стволовым клеткам печени по изобретению, выделенных на стадии (b).

На практике подобные стволовым клетки печени, полученные описанными здесь способами, можно собрать, промыть, необязательно фракционировать для получения их экстракта и ресуспендировать в консервирующей среде, предпочтительно содержащей DMSO в концентрации от около 0,1% (об/об) до около 20% (об/об), более предпочтительно примерно 10% (об/об). С другой стороны, консервирующая среда может не содержать DMSO, например, Prime-XV® MSC FreezIS DMSO-Free (Irvine Scientific®),

Stem-CellBanker[®] DMSO free (AMSBIO[®]), среда для замораживания Ibidi без DMSO (IBIDI[®]), среда для криоконсервации CryoSOfree[™] без DMSO (Sigma Aldrich[®]), содержащие трегалозу растворы (например, см. Ntai et al., 2018). К примеру, консервирующие среды могут быть коммерчески доступны (CryoStor[®]) и их можно приобрести, например, у фирмы Merck[®].

В рамках настоящего изобретения выражение “от около 0,1% до около 20%” охватывает 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% и 20%.

Подобные стволовым клетки печени либо их экстракты после помещения в подходящую консервирующую среду могут подвергаться процессу замораживания, при котором конечная температура составляет от около -80°C до около -196°C.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени, входящие в популяцию клеток, подвергаются криоконсервации.

В настоящем изобретении термины “криоконсервация” и “замораживание” могут заменять друг друга.

В другом аспекте изобретения также предусмотрены криоконсервированные подобные стволовым клетки печени либо их экстракты, которые могут быть получены способом по настоящему изобретению.

В одном аспекте изобретения предусмотрены криоконсервированная популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт по изобретению, в частности популяция, которая может быть получена способом по изобретению.

Изобретением также предусмотрены криоконсервированная культура подобных стволовым клеток печени *in vitro*, либо их экстракт, которые могут быть получены способом по изобретению.

В другом аспекте изобретения предусмотрены частица, в частности сфероидная, содержащие подобные стволовым клетки печени либо их экстракты, и/или популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт, и/или клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракт по настоящему изобретению.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени, популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт по изобретению находятся в форме частиц или сфероидов.

В некоторых воплощениях частица имеет форму сфероида, предпочтительно сфероида со средним диаметром частиц от около 50 мкм до около 250 мкм.

В рамках настоящего изобретения термин “от около 50 мкм до около 250 мкм” охватывает 50 мкм, 60 мкм, 70 мкм, 80 мкм, 90 мкм, 100 мкм, 110 мкм, 120 мкм, 130 мкм, 140 мкм, 150 мкм, 160 мкм, 170 мкм, 180 мкм, 190 мкм, 200 мкм, 210 мкм, 220 мкм, 230 мкм, 240 мкм и 250 мкм.

В некоторых воплощениях частица содержат от около 2 подобных стволовым клеткам печени на 1 частицу до около 2500 подобных стволовым клеткам печени на 1 частицу. В некоторых воплощениях частица содержат от около 250 подобных стволовым клеткам печени на 1 частицу до около 1500 подобных стволовым клеткам печени на 1 частицу. В рамках настоящего изобретения термин “от около 2 до около 2500 клеток на 1 частицу” охватывает 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1750, 1800, 1850, 1900, 1950, 2000, 2050, 2100, 2150, 2200, 2250, 2300, 2350, 2400, 2450 и 2500 клеток на 1 частицу.

На практике частицы или сфероиды могут быть получены путем культивирования подобных стволовым клеткам печени или популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени по изобретению, в культуральной среде, необязательно с добавлением HGF и/или одного или нескольких цитокинов и/или одного или нескольких ингредиентов, обладающих противовоспалительными и/или иммунодепрессивными свойствами.

В одном воплощении HGF, когда он присутствует в культуральной среде, содержится в концентрации от около 0,1 нг/мл до около 1000 нг/мл, предпочтительно от около 1 нг/мл до около 500 нг/мл, более предпочтительно от около 10 нг/мл до около 30 нг/мл. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 0,1 нг/мл до около 1000 нг/мл” охватывает около 0,1 нг/мл, 0,25 нг/мл, 0,5 нг/мл, 0,75 нг/мл, 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 15 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 50 нг/мл, 75 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 300 нг/мл, 400 нг/мл, 500 нг/мл, 600 нг/мл, 700 нг/мл, 800 нг/мл, 900 нг/мл и 1000 нг/мл.

В одном воплощении цитокин, когда он присутствует в культуральной среде, содержится в концентрации от около 0,1 нг/мл до около 100 нг/мл, предпочтительно от около 1 нг/мл до около 50 нг/мл, более предпочтительно от около 10 нг/мл до около 30 нг/мл. В одном воплощении цитокином является онкостатин М (OSM). В рамках настоящего изобретения выражение “от около 0,1 нг/мл до около 100 нг/мл” охватывает 0,1 нг/мл, 0,25 нг/мл, 0,5 нг/мл, 0,75 нг/мл, 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 15 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 50 нг/мл, 75 нг/мл и 100 нг/мл.

В некоторых воплощениях культуральная среда также содержит ингредиент,

обладающий противовоспалительными и/или иммунодепрессивными свойствами, предпочтительно кортикостероид. Когда кортикостероид присутствует в культуральной среде, то он содержится в концентрации от около 0,01 мкМ до около 10 мкМ, предпочтительно от около 0,1 мкМ до около 5 мкМ. В одном воплощении кортикостероидом является дексаметазон. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 0,01 мкМ до около 10 мкМ” охватывает 0,01 мкМ, 0,025 мкМ, 0,05 мкМ, 0,075 мкМ, 0,1 мкМ, 0,25 мкМ, 0,5 мкМ, 0,75 мкМ, 1 мкМ, 1,5 мкМ, 2 мкМ, 2,5 мкМ, 5 мкМ, 7,5 мкМ и 10 мкМ.

В некоторых воплощениях частицы могут быть получены через 1 день, 2 дня или 3 дня в подходящих условиях. На практике подобные стволовые клетки печени можно культивировать на твердой подложке (в сосуде для культивирования), что способствует их агрегации. К примеру, подходящие подложки могут быть получены коммерческим путем от Stem Cells Technologies[®], такие, как, например, планшеты Aggrewell[®].

В некоторых воплощениях частицы или сфероиды получают из криоконсервированных подобных стволовым клеткам печени, криоконсервированной выделенной популяции клеток, содержащей подобные стволовым клеткам печени, либо их экстракта по изобретению.

Не придерживаясь какой-либо теории, авторы изобретения считают, что клеточные суспензии, содержащие подобные стволовым клеткам печени, собранные в трехмерные структуры (3D) типа сфероидов, могут лучше, чем суспензии отдельных клеток, подходить для некоторых мест введения, например, для внутрибрюшинной трансплантации клеток. В некоторых воплощениях частицы или сфероиды по изобретению могут представлять собой биоискусственную печень (BAL), пригодную для введения лицам, нуждающимся в лечении печени.

В другом аспекте изобретения предусмотрены частицы, содержащие клетки, прошедшие дифференцировку из подобных стволовым клеткам печени по изобретению либо их популяцию.

В другом аспекте изобретения предусмотрена суспензия, содержащая подобные стволовым клеткам печени либо их экстракт, и/или популяция клеток, содержащая подобные стволовым клеткам печени, либо их экстракт, и/или клетки, происходящие из подобных стволовым клеткам печени, либо их экстракт по настоящему изобретению.

В некоторых воплощениях выделенная популяция клеток, содержащая подобные стволовым клеткам печени, либо их экстракт по изобретению находится в форме суспензии. В настоящем изобретении термин “суспензия” означает такие композиции, в которых клетки или материалы представляют собой взвешенные клетки или материалы.

В некоторых воплощениях суспензия может содержать от около 10^1 до около 10^{12} подобных стволовым клеткам печени на 1 мл. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 10^1 до около 10^{12} подобных стволовым клеткам печени на 1 мл” охватывает 10^1 , 5×10^1 , 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 10^9 , 5×10^9 , 10^{10} , 5×10^{10} , 10^{11} , 5×10^{11} и 10^{12} подобных стволовым клеткам печени на 1 мл.

В некоторых аспектах изобретения предусмотрена суспензия, содержащая клетки, прошедшие дифференцировку из подобных стволовым клеткам печени по изобретению, либо их популяцию.

Изобретением также предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая (i) подобные стволовым клеткам печени либо их экстракт и/или популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клеткам печени, либо их экстракт, и/или клетки, происходящие из подобных стволовым клеткам печени, либо их экстракт, и/или по меньшей мере одну частицу и/или суспензию по изобретению и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящем изобретении термин “фармацевтически приемлемый носитель” означает любые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие всасывание средства и др.

На практике фармацевтически приемлемый носитель может содержать один или несколько ингредиентов, выбранных из группы полипептидных добавок; аминокислот; липидов и углеводов. Среди углеводов можно назвать сахара, в том числе моносахариды, ди-, три-, тетра- и олигосахариды; производные сахаров, такие как альдитолы, альдоновые кислоты, сложные эфиры сахаров и т.п.; и полисахариды или полимерные сахара.

Примеры полипептидных фармацевтически приемлемых носителей могут включать желатин, казеин и др.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция может содержать от около 10^1 до около 10^{12} подобных стволовым клеткам печени на 1 мл. В рамках настоящего изобретения выражение “от около 10^1 до около 10^{12} подобных стволовым клеткам печени на 1 мл” охватывает 10^1 , 5×10^1 , 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 10^9 , 5×10^9 , 10^{10} , 5×10^{10} , 10^{11} , 5×10^{11} и 10^{12} подобных стволовым клеткам печени на 1 мл.

В одном аспекте изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция, состоящая в основном из (i) подобных стволовым клеткам печени либо их экстракта, и/или популяции клеток, содержащей подобные стволовым клеткам печени, либо их экстракта, и/или клеток, происходящих из подобных стволовым клеткам печени, либо их экстракта,

и/или по меньшей мере из одной частицы и/или суспензии по изобретению и (ii) фармацевтически приемлемого носителя. В настоящем изобретении термин “в основном состоит из” означает то, что подобные стволовым клетки печени либо их экстракт и/или популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт, и/или клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракт, и/или по меньшей мере одна частица и/или суспензия по изобретению является/являются единственным активным ингредиентом композиции.

В некоторых аспектах изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая клетки, прошедшие дифференцировку из подобных стволовым клеток печени по изобретению, либо популяцию таких клеток, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте изобретения предусмотрено медицинское устройство, содержащее подобные стволовым клетки печени либо их экстракт, и/или популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт, и/или клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракт, и/или по меньшей мере одну частицу и/или суспензию и/или фармацевтическую композицию по изобретению.

В некоторых воплощениях медицинское устройство содержит один или несколько элементов, выбранных из группы, состоящей из насосов/помп, фильтров, трубок, катетеров и т.п.

В некоторых воплощениях медицинское устройство находится в форме внешней биоискусственной печени (EBAL). В некоторых воплощениях медицинское устройство, в частности внешняя биоискусственная печень, содержит биореактор, содержащий подобные стволовым клетки печени и/или популяцию клеток по настоящему изобретению и/или клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени. В некоторых воплощениях медицинское устройство, в частности внешняя биоискусственная печень, также может содержать по меньшей мере один гепариновый насос, по меньшей мере один фильтр для плазмы, по меньшей мере один роликовый насос.

На практике медицинское устройство, в частности внешняя биоискусственная печень, может содержать блок, подобный аппарату искусственного кровообращения. На практике медицинское устройство, в частности внешняя биоискусственная печень, сделано так, чтобы плазма крови пациента проходила обработку, а затем возвращалась пациенту.

Неограничивающие примеры подходящих медицинских устройств для реализации изобретения описаны в Struecker et al. (2014); Glorioso et al. (2015); Chen et al. (2019).

В некоторых воплощениях медицинское устройство по изобретению применяется для экстракорпоральной терапии печени.

В другом аспекте изобретения предусмотрена модель на животных, содержащих гетерологичные подобные стволовым клетки печени либо их экстракты и/или гетерологичную популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт, и/или гетерологичные клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракт.

В настоящем изобретении термин “гетерологичные” служит для обозначения того, что животные, не относящиеся к человеку, и клетки происходят из другого вида.

В некоторых воплощениях модель на животных, не относящихся к человеку, представляет собой гуманизованную модель на животных, не относящихся к человеку. В настоящем изобретении термин “гуманизованная” служит для обозначения того, что модельные животные, не относящиеся к человеку, содержат подобные стволовым клетки печени человека, клетки человека, происходящие из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракты по настоящему изобретению.

В некоторых воплощениях животные представляют собой млекопитающих, не относящихся к человеку, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из собак, кошек, морских свинок, крыс, мышей, кроликов, крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей, лам, обезьян. В некоторых воплощениях животными, не относящимися к человеку, являются мыши или крысы.

На практике модельным животным, не относящимся к человеку, вводятся подобные стволовым клетки печени и/или популяция клеток и/или клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, и/или их экстракт с тем, чтобы в печени животных содержались гетерологичные подобные стволовым клетки печени и/или гетерологичные клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, и/или их экстракт. В некоторых воплощениях модели на животных могут использоваться для оценки токсичности лекарственного препарата-кандидата для печени. В настоящем изобретении термин “токсичность для печени” служит для обозначения степени ядовитости для печени. В более широком смысле термин “токсичность лекарственного препарата-кандидата для печени” служит для обозначения степени, в которой такой препарат-кандидат ограничивает, сдерживает, ингибирует, препятствует или предотвращает выполнение печенью ее естественной и физиологической детоксифицирующей функции по сравнению со здоровой функциональной печенью.

Оценка препарата-кандидата может проводиться по его влиянию на проверяемые биологические параметры, такие, например, как температура, прибавка или потеря веса,

дыхательная способность, энцефалограмма, кардиограмма, когнитивные способности, двигательная активность, уровень сывороточных маркеров, подсчет клеток крови и т.п.

В некоторых воплощениях модельные животные, не относящиеся к человеку, могут получать соединение, способное вызвать заболевание печени. В таких воплощениях модель на животных, не относящихся к человеку, с заболеванием печени может использоваться для оценки эффективности препаратов-кандидатов, предназначенных для лечения или профилактики данного заболевания печени, в частности, для усиления апоптоза больных клеток и/или для превращения больных клеток в здоровые, предпочтительно в нормальные клетки, и/или для стимуляции пролиферации здоровых клеток. Неограничивающие примеры соединений, способных вызвать заболевания печени, включают ацетаминофен (АРАР), алкоголь, аспирин, ибупрофен, напроксен натрия и тиацетамид. В некоторых воплощениях модельные животные, не относящиеся к человеку, могут быть заражены возбудителями инфекций типа патогенных бактерий и/или вирусов.

В другом аспекте изобретения предусмотрены подобные стволовым клетки печени либо их экстракт, популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт, клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракт, или частица, суспензия или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

Изобретением также предусмотрено применение подобных стволовым клеток печени или популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, или клеток, происходящих из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракта, или частицы, суспензии или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для получения или изготовления лекарственного средства.

В другом аспекте изобретения предусмотрены подобные стволовым клетки печени либо их экстракт, популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт, клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракт, или частица, суспензия, фармацевтическая композиция или медицинское устройство по настоящему изобретению для применения при лечении и/или профилактике заболевания печени.

В следующем аспекте изобретения предусмотрено применение подобных стволовым клеток печени клеток либо их экстракта, популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт, или клеток, происходящих из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракта, или частицы, суспензии, фармацевтической композиции или медицинского устройства по настоящему

изобретению для лечения и/или профилактики заболевания печени.

Изобретением также предусмотрен способ лечения и/или профилактики заболевания печени у нуждающегося в этом индивидуума, включающий введение терапевтически эффективного количества подобных стволовым клеткам печени и/или популяции или клеток, происходящих из подобных стволовым клеткам печени, либо их экстракта, или частицы, суспензии или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Изобретением также предусмотрен способ лечения и/или профилактики заболевания печени у нуждающегося в этом индивидуума, включающий стадию применения медицинского устройства по настоящему изобретению. Изобретением также предусмотрен способ лечения и/или профилактики заболевания печени у нуждающегося в этом индивидуума, включающий стадии:

- а) подключения индивидуума к медицинскому устройству по настоящему изобретению посредством экстракорпорального кровообращения;
- б) подачи в медицинское устройство плазмы данного индивидуума с тем, чтобы происходила детоксификация плазмы с помощью медицинского устройства, и
- с) подачи данному индивидууму детоксифицированной плазмы, полученной на стадии б).

В другом аспекте изобретения предусмотрено применение медицинского устройства по изобретению в способе лечения и/или профилактики заболевания печени у нуждающегося в этом индивидуума.

В некоторых воплощениях заболевание печени выбрано из группы, включающей синдром Алажилля; алкогольные заболевания печени; недостаточность α_1 -антитрипсина; аутоиммунный гепатит; доброкачественные опухоли печени; билиарную атрезию; цирроз печени; гемохроматоз; печеночную энцефалопатию; гепатит А; гепатит В; гепатит С; гепаторенальный синдром; внутрипеченочный холестаз беременных (ICP); недостаточность лизосомальной кислой липазы (LAL-D); кисты в печени; рак печени; желтуху новорожденных; неалкогольную жировую болезнь печени; неалкогольный стеатогепатит; первичный билиарный холангит (PBC); первичный склерозирующий холангит (PSC); прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз (PFIC); синдром Рея; болезнь накопления гликогена I типа; острую печеночную недостаточность (ALF); острую печеночную недостаточность на фоне хронической (ACLF); неалкогольный стеатогепатит (NASH); алкогольный гепатит; вирусный гепатит; криптогенные заболевания печени; злокачественные заболевания печени, такие, например, как гепатоцеллюлярная карцинома и холангиокарцинома; аутоиммунный гепатит; сосудистые

заболевания печени, такие, например, как синдром Бадда-Киари; холестатические заболевания печени; наследственные метаболические заболевания печени, такие, например, как болезнь Вильсона и нарушения цикла мочевины.

В некоторых воплощениях заболевание печени представляет собой фульминантное заболевание печени.

Как указано выше, фульминантное заболевание печени означает такое заболевание, которое приоритетно для трансплантации печени по системе оценки для распределения органов типа Модели терминальной стадии заболеваний печени (MELD).

В другом аспекте изобретения предусмотрены подобные стволовым клетки печени либо их экстракт, популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт, клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракт, или частица, суспензия, фармацевтическая композиция или медицинское устройство по настоящему изобретению для применения при лечении и/или профилактике фульминантного заболевания печени.

В следующем аспекте изобретения предусмотрено применение подобных стволовым клеток печени либо их экстракта, популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, либо их экстракта, или клеток, происходящих из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракта, или частицы, суспензии, фармацевтической композиции или медицинского устройства по настоящему изобретению для лечения и/или профилактики фульминантного заболевания печени.

Изобретением также предусмотрен способ лечения и/или профилактики фульминантного заболевания печени у нуждающегося в этом индивидуума, включающий введение терапевтически эффективного количества подобных стволовым клеток печени и/или популяции или клеток, происходящих из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракта, или частицы, суспензии или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В некоторых воплощениях фульминантное заболевание печени выбрано из группы, состоящей из острой печеночной недостаточности (ALF) и острой печеночной недостаточности на фоне хронической (ACLF).

В некоторых воплощениях острая печеночная недостаточность на фоне хронической (ACLF) может быть связана с заболеванием печени, в частности с хроническим заболеванием печени, выбранным из группы, состоящей из неалкогольного стеатогепатита (NASH); алкогольного гепатита; вирусного гепатита; криптогенных заболеваний печени; злокачественных заболеваний печени типа гепатоцеллюлярной карциномы и холангиокарциномы; аутоиммунного гепатита, сосудистых заболеваний

печени типа синдрома Бадда-Киари; холестатических заболеваний печени; и наследственных метаболических заболеваний печени типа болезни Вильсона и нарушений цикла мочевины. Иными словами, ACLF – это высокоспецифичный и редкий синдром, характеризующийся острой аномалией при анализе печеночной крови у лиц с основным хроническим заболеванием печени, в частности, выбранным из группы, состоящей из неалкогольного стеатогепатита (NASH); алкогольного гепатита; вирусного гепатита; криптогенных заболеваний печени; злокачественных заболеваний печени типа гепатоцеллюлярной карциномы и холангиокарциномы; аутоиммунного гепатита, сосудистых заболеваний печени типа синдрома Бадда-Киари; холестатических заболеваний печени и наследственных метаболических заболеваний печени типа болезни Вильсона и нарушений цикла мочевины.

В некоторых воплощениях фульминантным заболеванием печени является острая печеночная недостаточность (ALF) или острая печеночная недостаточность на фоне хронической (ACLF).

В некоторых воплощениях острая печеночная недостаточность на фоне хронической (ACLF) связана с заболеванием печени, выбранным из группы, состоящей из неалкогольного стеатогепатита (NASH); алкогольного гепатита; вирусного гепатита; криптогенных заболеваний печени; злокачественных заболеваний печени типа гепатоцеллюлярной карциномы и холангиокарциномы; аутоиммунного гепатита, сосудистых заболеваний печени типа синдрома Бадда-Киари; холестатических заболеваний печени и наследственных метаболических заболеваний печени типа болезни Вильсона и нарушений цикла мочевины.

В некоторых воплощениях фульминантным заболеванием печени является острая печеночная недостаточность (ALF).

В некоторых воплощениях фульминантным заболеванием печени является острая печеночная недостаточность на фоне хронической (ACLF).

Не придерживаясь какой-либо теории, авторы изобретения полагают, что способность к регенерации печени у подобных стволовым клеток печени по изобретению при ALF и ACLF обусловлена действием этих клеток на здоровые клетки печени в больной печени, способствующим их пролиферации. Иными словами, способность к регенерации печени опосредована, прежде всего, усилением регенерации здоровой печеночной ткани в больной печени, а не замещением больных клеток.

Изобретением также предусмотрен способ регенерации печени у индивидуума с заболеванием печени, в частности, с фульминантным заболеванием печени, включающий стадию введения указанному индивидууму терапевтически эффективного количества

подобных стволовым клеткам печени либо их экстракта, популяции клеток либо их экстракта или клеток, происходящих из подобных стволовым клеткам печени, либо их экстракта, или частицы, суспензии или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В следующем аспекте изобретения также предусмотрен способ снижения уровней аланинаминотрансферазы (ALAT) в сыворотке индивидуума с заболеванием печени, в частности, с фульминантным заболеванием печени, включающий стадию введения указанному индивидууму терапевтически эффективного количества подобных стволовым клеткам печени либо их экстракта, популяции клеток либо их экстракта или клеток, происходящих из подобных стволовым клеткам печени, либо их экстракта, или частицы, суспензии или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В другом аспекте изобретения также предусмотрен способ снижения некроза печени у индивидуума с заболеванием печени, в частности, с фульминантным заболеванием печени, включающий стадию введения указанному индивидууму терапевтически эффективного количества подобных стволовым клеткам печени либо их экстракта, популяции клеток либо их экстракта или клеток, происходящих из подобных стволовым клеткам печени, либо их экстракта, или частицы, суспензии или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

На практике индивидууму с заболеванием печени, в частности, с фульминантным заболеванием печени, может быть поставлен диагноз при клиническом осмотре и/или по анализам крови и/или биопсии печени в соответствии с надлежащей практикой и стандартами в данной области.

В одном аспекте изобретения предусмотрено применение криоконсервированной популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, либо их экстракта по изобретению для получения частицы, как определено в настоящем описании.

В некоторых воплощениях частица имеет форму сфероида.

В некоторых воплощениях терапевтически эффективное количество подобных стволовым клеткам печени и/или популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, и/или клеток, происходящих из подобных стволовым клеткам печени, и/или их экстракта и/или частицы и/или суспензии и/или фармацевтической композиции по изобретению для введения может легко определить квалифицированный и/или уполномоченный персонал.

На практике терапевтически эффективное количество может зависеть от различных параметров, в том числе от материала, выбранного для введения, от того, будет ли введение осуществляться в виде однократных или многократных доз, а также от

индивидуальных параметров, включающих возраст, физическое состояние, размер, вес, пол пациента и тяжесть фульминантного заболевания печени, подлежащего лечению.

В некоторых воплощениях терапевтически эффективное количество составляет от 10^1 до 10^{12} подобных стволовым клеткам печени на 1 мл. На практике терапевтически эффективное количество включает 10^1 , 5×10^1 , 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 10^9 , 5×10^9 , 10^{10} , 5×10^{10} , 10^{11} , 5×10^{11} и 10^{12} подобных стволовым клеткам печени на 1 мл. В некоторых воплощениях терапевтически эффективное количество составляет от 10^1 до 10^{12} подобных стволовым клеткам печени на 1 см^3 . В некоторых воплощениях терапевтически эффективное количество составляет от 10^1 до 10^{12} подобных стволовым клеткам печени на 1 дозу, что включает 10^1 , 5×10^1 , 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 10^9 , 5×10^9 , 10^{10} , 5×10^{10} , 10^{11} , 5×10^{11} и 10^{12} подобных стволовым клеткам печени на 1 дозу.

Для терапии подобные стволовым клетки печени, популяции клеток, содержащие подобные стволовым клетки печени, частицы, суспензии и фармацевтические композиции по изобретению можно вводить различными способами. Дозы и количество введений могут быть оптимизированы специалистами в данной области известным способом.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени, популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, клетки, происходящие из подобных стволовым клеткам печени, их экстракт, частицы, суспензии или фармацевтические композиции по изобретению следует вводить местно или системно.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени, популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, клетки, происходящие из подобных стволовым клеткам печени, их экстракт, частицы, суспензии или фармацевтические композиции по изобретению следует вводить местно, что включает, без ограничения, инъекции, вливания или имплантации популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, частиц, суспензии или фармацевтической композиции по изобретению в печень, вокруг печени или вблизи нее, в паренхиму печени, под глиссонову капсулу печени, под капсулы почек, в селезенку, в поджелудочную железу, в брюшину или сальниковый мешок. Предпочтительно местное введение представляет собой инъекцию или вливание или имплантацию через кровеносные сосуды, орошающие печень (воротную вену, артерию, вену, мезентериальные вены).

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени, популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, клетки, происходящие из подобных стволовым клеткам печени, их экстракт, частицы, суспензию или фармацевтическую композицию по изобретению следует вводить внутрибрюшинно, внутривенно,

интрапортально или внутриселезеночно, в частности посредством внутрибрюшинной, внутривенной, интрапортальной или внутриселезеночной инъекции.

В другом воплощении подобные стволовым клетки печени, популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, их экстракт, частицы, суспензию или фармацевтическую композицию по изобретению следует вводить в окружение, способствующее дифференцировке популяции подобных стволовым клеток печени человека по изобретению.

Такой способ введения может осуществляться хирургическим путем, при лапароскопической хирургии, через систему катетеров или посредством имплантации в брюшную полость.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени, популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, их экстракт, частицу, суспензию или фармацевтическую композицию по изобретению следует вводить системно, что включает, без ограничения, внутрибрюшинное, подкожное, энтеральное или парентеральное введение.

Примеры лекарственных форм, адаптированных для инъекции, инфузии или имплантации, включают, без ограничения, жидкие растворы или суспензии, твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией. Примеры инъекций включают, без ограничения, интрапортальные, внутриселезеночные, внутривенные, внутриаортальные, внутрибрюшинные, подкожные, внутримышечные, внутрикожные и внутрибрюшинные инъекции или инфузии. В некоторых воплощениях при введении подобные стволовым клетки печени, популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, их экстракт, частицы, суспензия или фармацевтическая композиция по изобретению должны быть стерильными. Способы получения стерильных фармацевтических композиций включают, без ограничения, синтез в соответствии с GMP (GMP означает “Надлежащая производственная практика”).

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени, популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, их экстракт, частицы, суспензия или фармацевтическая композиция по изобретению заключены в капсулы. Примеры капсул включают, без ограничения, матригель® и биосовместимые гидрогели. Способы инкапсуляции биологически активных веществ в гидрогели известны специалистам в данной области. Например, см. Pérez-Luna et al. (2018).

В настоящем изобретении “гидрогель” обозначает гидрофильные трехмерные сети, которые способны поглощать большое количество воды или биологической жидкости и в которые заключены клетки. На практике сети состоят из гомополимеров или сополимеров и являются нерастворимыми. Подходящими полимерами для образования сети являются, без ограничения, альгинат натрия, акриловая кислота, сульфат целлюлозы, этиленгликоль, этиленгликоль-диметакрилат (EGDMA), гиалуроновая кислота, гидроксиэтилметакрилат (HEMA), гидроксиэтоксигидроксиэтилметакрилат (HEEMA), гидроксиэтоксигидроксиэтилметакрилат (HDEEMA), метоксиэтилметакрилат (MEMA), N-винил-2-пирролидон (NVP), ПЭГ-акрилат (PEGA), ПЭГ-метакрилат (PEGMA), ПЭГ-диакрилат (PEGDA), ПЭГ-диметакрилат (PEGDMA), силанизированная гидроксипропилметилцеллюлоза (si-HPMC) и др.

Гидрогели, в частности, описаны в Peppas et al. (2000); Narayanaswamy and Torchilin (2019).

В некоторых воплощениях инкапсулированные подобные стволовым клетки печени, популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, их экстракт, частицы, суспензию или фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить любым способом, в том числе внутривенно, внутривенно, интрапортально, внутрь ткани или любым другим подходящим способом введения.

На практике гидрогель может служить для концентрирования подобных стволовым клеток печени, популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, клеток, происходящих из подобных стволовым клеток печени, их экстракта, частиц, суспензии или фармацевтической композиции по изобретению. В некоторых воплощениях гидрогель может быть инкорпорирован в пластырь, в частности, в пластырь для пролонгированного высвобождения и/или обеспечения функциональности подобных стволовым клеток печени, популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, клеток, происходящих из подобных стволовым клеток печени, их экстракта, частиц, суспензии или фармацевтической композиции по изобретению.

В одном аспекте изобретения предусмотрены пластыри, содержащие подобные стволовым клетки печени, популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, их экстракт, частицы, суспензию или фармацевтическую композицию по изобретению, а также необязательно гидрогель.

На практике пластыри можно наносить локально на печень или на любой другой орган.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени, популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, их экстракт, частицы, суспензию или фармацевтическую композицию по изобретению следует вводить в формах для пролонгированного высвобождения. В другом воплощении подобные стволовым клетки печени, популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, их экстракт, частицы, суспензию или фармацевтическую композицию по изобретению включают в систему доставки, контролирующую высвобождение действующего вещества.

В некоторых воплощениях терапевтически эффективное количество подобных стволовым клеток печени, популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, клеток, происходящих из подобных стволовым клеток печени, их экстракта, частиц, суспензии или фармацевтической композиции по изобретению следует вводить хотя бы один раз в жизни субъекта или несколько раз, чтобы получить и/или поддерживать терапевтический эффект у субъекта.

На практике введение подобных стволовым клеток печени, популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, либо их экстракта, частиц, суспензии или фармацевтической композиции по изобретению можно рассматривать как пересадку или трансплантацию.

К примеру, введение подобных стволовым клеток печени, популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, или их экстракта, частиц, суспензии или фармацевтической композиции по изобретению можно называть пересадкой или трансплантацией.

В некоторых воплощениях трансплантация является аутологичной. В этом особом воплощении клетки, используемые для получения подобных стволовым клеток печени, популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, или клеток, происходящих из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракта по изобретению, происходят от того же индивидуума, что и индивидуум, получающий трансплантацию.

В альтернативных воплощениях трансплантация является аллогенной. В этом конкретном воплощении клетки, используемые для получения подобных стволовым клеток печени, популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, или клеток, происходящих из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракта по изобретению, происходят от индивидуума того же биологического вида, но отличного от индивидуума, получающего трансплантацию.

В некоторых воплощениях индивидуум с заболеванием печени, в частности, с

фульминантным заболеванием печени, может подвергаться хирургическому вмешательству перед введением подобных стволовым клеткам печени, популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, клеток, происходящих из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракта, частиц, суспензии или фармацевтической композиции по изобретению для удаления по меньшей мере части пораженной ткани печени, в частности, подвергшейся некрозу ткани печени.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени, популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракт, частицы, суспензия или фармацевтическая композиция по изобретению могут вводиться совместно, т.е. вместе с одним или несколькими другими активными средствами, назначаемыми для содействия или ускорения регенерации печени. В настоящем изобретении термин “совместное введение” включает одновременное введение и последовательное введение.

Изобретением также предусмотрены комбинированный продукт, содержащий:

- по меньшей мере одну подобную стволовым клетку печени, популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, и/или их экстракт и/или частицы и/или суспензию и/или фармацевтическую композицию по изобретению; и
- по меньшей мере один дополнительный активный ингредиент, в частности, предназначенный для усиления регенерации печени;

для одновременного, раздельного или последовательного введения.

В настоящем изобретении понятие “содействовать регенерации печени” означает прекращение или уменьшение деградации ткани печени и охватывает частичное или полное восстановление физиологических функций здоровой ткани печени. Неограничивающие примеры подходящих дополнительных активных средств включают противовоспалительные средства, иммунодепрессанты, антибиотики, антиоксиданты, антифибротические средства, детоксифицирующие средства.

Неограничивающие примеры противовоспалительных средств включают аспирин, целекоксиб, диклофенак, эторикоксиб, ибупрофен, индометацин, мефенамовую кислоту и напроксен.

Неограничивающие примеры иммунодепрессантов включают ингибиторы кальци-нейрина, такие, например, как циклоспорин, такролимус; ингибиторы интерлейкина, такие, например, как базиликсимаб, бенрализумаб, бродалумаб, даклизумаб, дупилумаб, иксекизумаб, меполизумаб, сарилумаб, тоцилизумаб; ингибиторы TNF-альфа, такие, например, как адалимумаб, этанерцепт, голимумаб и инфликсимаб.

Неограничивающие примеры антибиотиков включают пенициллины, такие,

например, как ампициллин, амоксициллин и диклоксациллин; тетрациклины, такие, например, как демеклоциклин, доксициклин, эравациклин, миноциклин, омадациклин и тетрациклин; цефалоспорины, такие, например, как цефаклор, цефдинир, цефотаксим, цефтазидим, цефтриаксон и цефуроксим; хинолоны, такие, например, как ципрофлоксацин, левофлоксацин и моксифлоксацин; линкомицины, такие, например, как клиндамицин и линкомицин; макролиды, такие, например, как азитромицин, кларитромицин и эритромицин; сульфаниламиды, такие, например, как сульфасалазин, сульфаметоксазол и триметоприм; гликопептиды, такие, например, как далбаванцин, оритаванцин, телаванцин и ванкомицин; аминогликозиды, такие, например, как амикацин, гентамицин и тобрамицин; карбапенемы, такие, например, как дорипенем, эртапенем и меропенем.

Неограничивающие примеры антиоксидантов включают каротиноиды, такие как, например, бета-каротин, ликопин, лютеин и зеаксантин; селен; витамин С и витамин Е.

Неограничивающие примеры антифибротических средств включают нинтеданиб и пирфенидон.

Неограничивающие примеры детоксифицирующих средств включают N-ацетил-цистеин.

В некоторых воплощениях дополнительный активный ингредиент может вводиться до, во время или после введения подобных стволовым клеткам печени, популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, клеток, происходящих из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракта, частиц, суспензии или фармацевтической композиции по изобретению.

В некоторых воплощениях подобные стволовым клетки печени, популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, клетки, происходящие из подобных стволовым клеток печени, либо их экстракт, частицы, суспензия или фармацевтическая композиция по изобретению не вводятся вместе с иммунодепрессантами. Как показано в приведенном ниже разделе примеров, выживание мышей с ALF после введения подобных стволовым клеткам печени по изобретению наблюдалось независимо от того, вводился ли вместе с ними иммунодепрессант или нет. Преимущественно введение подобных стволовым клеткам печени по изобретению может рассматриваться как основа для терапии с аллогенной (гетерологичной) трансплантацией.

В другом аспекте изобретения предусмотрен способ скрининга лекарственных средств-кандидатов *in vitro*, который включает стадии:

а) получение по меньшей мере одной подобной стволовым клеткам печени либо ее экстракта и/или популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, либо

их экстракта, и/или клеток, происходящих из подобных стволовым клеткам печени, либо их экстракта, и/или частицы и/или суспензии по изобретению;

b) контактирование указанной по меньшей мере одной клетки либо ее экстракта и/или указанной популяции клеток либо их экстракта и/или клеток, происходящих из подобных стволовым клеткам печени либо их экстракта, и/или указанной частицы и/или указанной суспензии со стадии а), с лекарственным средством-кандидатом;

с) измерение одного или нескольких биологических параметров и необязательно сравнение данного одного или нескольких биологических параметров с одним или несколькими контрольными параметрами;

d) определение того, представляет ли лекарственное средство-кандидат терапевтический и/или диагностический интерес.

В настоящем изобретении термин “лекарственное средство-кандидат” означает соединение с потенциальными терапевтическими свойствами и/или представляющее коммерческий интерес. В рамках настоящего изобретения лекарственное средство-кандидат может обладать обезболивающими свойствами, антибиотическими свойствами, противораковыми свойствами, антикоагулянтными свойствами, антидиуретическими свойствами, противовоспалительными свойствами, противовирусными свойствами, гемостатическими свойствами, нейролептическими свойствами, пролиферативным действием, антифибротическим и действием против стеатоза, антиоксидантными свойствами и т.п. В некоторых воплощениях препарат-кандидат обладает способностью к регенерации печени.

В некоторых воплощениях клетки, происходящие из подобных стволовым клеткам печени, в частности, гепатоцитоподобные клетки или популяция клеток, содержащая гепатоцитоподобные клетки (HLC), происходящие из популяции клеток, содержащей подобные стволовым клеткам печени по изобретению, экспрессируют маркер ALB (ALB⁺) и/или маркер CYP3A4 (CYP3A4⁺), а предпочтительно экспрессируют и маркер ALB (ALB⁺), и маркер CYP3A4 (CYP3A4⁺). В некоторых воплощениях гепатоцитоподобные клетки (HLCs), происходящие из популяции клеток, содержащей подобные стволовым клеткам печени по изобретению, не экспрессируют маркер AFP (AFP⁻). В некоторых воплощениях HLC представляют собой HLC человека, происходящие из подобных стволовым клеткам печени по изобретению.

В некоторых воплощениях стадия (а) может выполняться путем инкубации подобных стволовым клеткам печени или популяции клеток, содержащей подобные стволовым клеткам печени по изобретению, в культуральной среде для дифференцировки HLC. Подходящие культуральные среды аналогичны культуральным средам, описанным

для получения подобных стволовым клеткам печени, таким, например, как среда RPMI. В некоторых воплощениях культуральная среда для дифференцировки HLC может содержать соединение, выбранное из группы, состоящей из дексаметазона, FGF (фактора роста фибробластов), FSK (также известного как 6-[(1Z)-3-фтор-2-(гидроксиметил)проп-1-ен-1-ил]-1,5-диметилпиримидин-2,4-(1H,3H)-дион), HGF (фактора роста гепатоцитов), KGF (фактора роста кератина), ингибиторов GSK3 (таких, например, как CHIR-99021), онкостатина М, ингибиторов TGF/Smad (таких, например, как SB431542), ингибиторов Notch.

В некоторых воплощениях биологические параметры выбирают из группы, состоящей из степени пролиферации клеток, степени апоптоза клеток, степени некроза клеток, уровня фермента (такого, например, как ALAT, ASAT) или представляющего интерес соединения (такого, например, как интерлейкин, цитокин) в сыворотке, уровня представляющего интерес биомаркера и т.п. На практике биологические параметры можно измерять на уровне нуклеиновой кислоты, в частности, на уровне мРНК, например, методом ОТ-ПЦР; или же на уровне полипептида или белка, например, иммунофлуоресцентным методом, методом FACS, ELISA, ферментативного анализа и др.

В некоторых воплощениях контрольные параметры могут являться параметрами здорового человека, в частности, это среднее значение данного параметра. В некоторых воплощениях контрольные параметры могут исходить из плацебо при анализе в условиях, идентичных для лекарственных средств-кандидатов.

В некоторых воплощениях способ скрининга *in vitro* лекарственных средств-кандидатов по изобретению может применяться для оценки токсичности данных средств для печени и/или для скрининга лекарственных средств. В некоторых воплощениях способ скрининга *in vitro* лекарственных средств-кандидатов по изобретению может применяться для оценки способности данных средств воздействовать на печень, в частности излечивать или регенерировать больную печень.

Изобретением также предусмотрен набор для лечения и/или профилактики фульминантного заболевания печени, который включает:

а) по меньшей мере одну подобную стволовым клеткам печени либо ее экстракт, популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, либо их экстракт, или клетки, происходящие из подобных стволовым клеткам печени, либо их экстракт, или частицу, суспензию либо фармацевтическую композицию; и

б) средство для введения данных клеток, популяции или клеток, происходящих из подобных стволовым клеткам печени, их экстракта, частицы, суспензии или фармацевтической композиции.

В некоторых воплощениях заболевание печени представляет собой фульминантное заболевание печени.

В некоторых воплощениях фульминантное заболевание печени выбирают из группы, состоящей из острой печеночной недостаточности (ALF) и острой печеночной недостаточности на фоне хронической (ACLF); причем ACLF ACLF связана с заболеванием печени, выбранным из группы, состоящей из неалкогольного стеатогепатита (NASH); алкогольного гепатита; вирусного гепатита; криптогенных заболеваний печени; злокачественных заболеваний печени, таких как гепатоцеллюлярная карцинома и холангиокарцинома; аутоиммунного гепатита; сосудистых заболеваний печени типа синдрома Бадда-Киари; холестатических заболеваний печени; и наследственных метаболических заболеваний печени типа болезни Вильсона и нарушений цикла мочевины.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция содержит от около 10^1 до около 10^{12} подобных стволовым клеткам печени на 1 мл.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция содержит от около 10^1 до около 10^{12} подобных стволовым клеткам печени на 1 см^3 . В некоторых воплощениях средством для введения указанных клеток или популяции клеток является шприц или катетер. В некоторых воплощениях набор дополнительно содержит один или несколько других активных агентов, в частности, выбранных из группы, включающей противовоспалительные средства, иммунодепрессанты, антибиотики и их смеси. Предполагается, что дополнительный активный агент должно способствовать регенерации печени.

В некоторых воплощениях набор может применяться для проведения имплантации клеток (интракорпоральной терапии) или же для проведения экстракорпоральной терапии печени. В некоторых воплощениях набор по изобретению может применяться для создания медицинского устройства, в частности внешней биоискусственной печени (EBAL), как описано здесь.

Краткое описание фигур

На фиг. **1A-D** представлены гистограммы, показывающие относительные уровни мРНК, при определении методом ОТ-кПЦР, маркеров, кодирующих плюрипотентность (OCT4) (панель **A**), дефинитивную эндодерму (SOX17) (панель **B**), гены печеночных предшественников (HNF4A) (панель **C**) и AFP (панель **D**) на 11-й день (pStemHeps). Относительную экспрессию генов рассчитывали методом определения значений $2^{-\Delta\Delta Ct}$ после нормирования по значениям GAPDH и выражали в единицах, кратных уровням,

отмеченным в недифференцированных клетках hESC (D0). Относительные уровни экспрессии генов приводятся по шкале $\log 10$ для SOX17 (панель **B**), HNF4A (панель **C**) и AFP (панель **D**). * $p < 0,05$.

На фиг. **2A-D** представлены фотографии и графики, показывающие экспрессию или отсутствие экспрессии различных ключевых маркеров при печеночной дифференцировке hESCs в день 0 (D0), на 5-й день (D5) и 11-й день (D11) по данным иммунофлуоресцентного анализа (OCT4, FOXA2, AFP и ALB) (панель **A**), проточной цитометрии для SOX17/HNF4A (панель **B**) и для CXCR4 (панель **C**), а также по измерению секреции AFP методом ELISA в клеточных супернатантах (панель **D**). HPH: первичные гепатоциты человека, * $p < 0,05$.

На фиг. **3A-C** представлены фотографии и графики, показывающие экспрессию ALB, AFP и HNF4A по данным иммунофлуоресцентного анализа (панель **A**) в день D21 после печеночной дифференцировки hESC в HLC, морфологию клеток pStemHeps и HLC по данным фазово-контрастной микроскопии (панель **B**) и секрецию ALB в супернатантах клеток HLC по данным метода ELISA (панель **C**). * и ** $p < 0,05$.

На фиг. **4** представлены графики, показывающие выживаемость мышей, не получавших (график 1, контрольные животные без APAP, $n=10$) или получавших (графики 2 и 3) ацетаминофен (APAP) по 400 мг/кг массы тела, а также получавших (график 2, APAP + pStemHeps, $n=10$) (график 3, контрольные животные с ALF, получавшие только APAP, $n=10$) трансплантацию 1×10^6 замороженных pStemHeps, полученных по методике А, как описано в примере 1.

На фиг. **5** представлены графики, показывающие уровни аланинаминотрансферазы (ALAT) (выраженные в ед./л) в крови мышей, не получавших APAP (только без APAP, $n=5$), получавших только APAP (только APAP, $n=6$) или получавших APAP и 1×10^6 замороженных pStemHeps (APAP + pStemHeps, $n=8$), при такой же обработке, как на фиг. 4. Измеряли ALAT в сыворотке через 24 часа после инъекции клеток. * и ** $p < 0,05$.

На фиг. **6** представлены графики, показывающие процент здоровой ткани в трех группах мышей при такой же обработке, как на фиг. 4 (APAP + pStemHeps, $n=10$; только APAP, $n=8$; без APAP, $n=5$), через 24 часа после инъекции клеток. Каждая точка соответствует одному животному. * и ** $p < 0,05$.

На фиг. **7** представлены графики, показывающие уровни продукции AFP человека в сыворотке животных при измерении методом ELISA у животных, получавших только APAP (только APAP, $n=3$) или получавших APAP и pStemHeps (APAP + pStemHeps, $n=9$), при такой же обработке, как на фиг. 4. Уровни AFP человека определяли через 24 часа после трансплантации 1×10^6 замороженных pStemHeps. Каждая точка соответствует

одному животному. * $p < 0,05$.

На фиг. 8 представлены графики, показывающие присутствие последовательностей Alu человека в биоптатах печени, собранных у трех групп мышей при такой же обработке, как на фиг. 4, через 24 часа после трансплантации 1×10^6 замороженных pStemHeps, при измерении методом ПЦР и выявлении ПЦР-ампликонов методом капиллярного электрофореза. Стрелки соответствуют ПЦР-ампликонам Alu. Дорожки 1-4: APAP + pStemHeps; дорожки 5-6: только APAP; дорожки 7-8: без APAP, без клеток; дорожка 9: CTL+ (печень мыши с трансплантацией клеток человека); дорожка 10: холостая проба; дорожка 11: лессенка.

На фиг. 9 представлена гистограмма, показывающая относительные уровни мРНК характерных маркеров клеток при определении методом ОТ-кПЦР в клетках pStemHeps, полученных по методике А, В или С, как описано в примере 2. Относительные уровни экспрессии генов выражали в единицах, кратных уровням, отмеченным в недифференцированных клетках hESC. Они существенно отличаются от hESCs. Относительные уровни экспрессии генов приводятся по шкале $\log 10$.

На фиг. 10 представлена гистограмма, показывающая экспрессию или отсутствие экспрессии мРНК некоторых характерных для клеток маркеров при определении методом DGE-Seq в клетках pStemHeps, полученных по методике А ($n=11$; темно-серые столбики) или по методике В ($n=3$; светло-серые столбики), как описано в примере 2. Гены, которые экспрессируются, определяются как гены, у которых количество мРНК превышает 200 молекул на 1 миллион всех молекул мРНК (высокая экспрессия, комплект 1), и гены, у которых количество мРНК составляет от 5 до 200 молекул на 1 миллион всех молекул мРНК, а степень индукции в сравнении с недифференцированными hESCs ($n = 14$) выше 5 (более низкая экспрессия генов по сравнению с комплектом 1). Гены, которые не экспрессируются, определяются как гены, у которых количество мРНК равно нулю или меньше 5 молекул на 1 миллион всех молекул мРНК.

На фиг. 11А-В представлен график и фотографии, показывающие экспрессию AFP и отсутствие экспрессии ALB в клетках pStemHeps, полученных по методике А, В или С, по данным метода ELISA (панель А), и экспрессию AFP, CK19, EPCAM, FOXA2, HNF4A, KI67, SOX17 и отсутствие экспрессии ALB по данным иммунофлуоресцентного анализа (панель В) в клетках pStemHeps, полученных по методике С, как описано в примере 2.

На фиг. 12 представлены графики, показывающие выживаемость мышей ($n=10$ в каждой группе), как на фиг. 4, за исключением того, что замороженные pStemHeps получали по методике В, как описано в табл. 2 из примера 2. График 1: контроль без APAP, график 2: APAP+ pStemHeps, график 3: только APAP.

На фиг. **13А-В** представлены графики, показывающие выживаемость мышей, как на фиг. 12, за исключением того, что мышам хирургическим путем удаляли 1/3 печени прямо перед трансплантацией pStemHeps, полученных по методике В (панель **А**) или по методике С (панель **В**), как описано в табл. 2 из примера 2. Панель **А**, график 1: АРАР + pStemHeps (n=5); график 2: только АРАР (n=10); панель **В**, график 1: АРАР+ pStemHeps (n=5); график 2: только АРАР (n=5).

На фиг. **14А-С** представлен комплект графиков и фотографий, показывающих (панель **А**) выживаемость мышей, как на фиг. 4, за исключением того, что замороженные pStemHeps получали по методике С, как описано в табл. 2 из примера 2. График 1: АРАР + pStemHeps (n =4), график 2: только АРАР (n=5). Панели **В-С**: количество пролиферирующих клеток на срезах печени по данным иммуногистохимии с помощью антител против KI67 (MKI67) через 24 часа после инъекции 1×10^6 клеток pStemHeps у животных, получавших ацетаминофен по 700 мг/кг массы тела (АРАР + клетки; панель **В**) или у животных без обработки, получавших только АРАР (контроль на АРАР; панель **В**). Ядра положительных по KI67 (MKI67) клеток видны как темные точки. Исходное увеличение $\times 10$.

На фиг. **15А-В** представлены графики, показывающие выживаемость мышей, получавших тиацетамид (ТАА) по 1500 мг/кг массы тела, а также получавших (график 1, ТАА + pStemHeps, n=9 для панели А и n=5 для панели В) или нет (график 2: только ТАА, n=10) трансплантацию 1×10^6 замороженных pStemHeps, полученных по методике С, как описано в табл. 2 из примера 2. Обработанные мыши дополнительно получали (панель А) или не получали (панель В) такролимус по 1 мг/кг (ежедневно в течение 5 дней, начиная за 24 часа до введения клеток).

На фиг. **16** представлены графики, показывающие уровни продукции АФР человека при измерении методом ELISA у интоксигированных ТАА мышей C57BL/6, не получавших (контроль) или получавших 1×10^6 замороженных pStemHeps, полученных по методике С, как описано в табл. 2 из примера 2. Уровни АФР человека у мышей определяли через 24 часа после трансплантации. Каждая точка соответствует одному животному. * $p < 0,05$.

На фиг. **17А-С** представлены фотографии, показывающие образование сфероидов, полученных из свежеприготовленных (панель **А**) и криоконсервированных клеток pStemHeps (панель **В**) после посева и культивирования в течение 2 дней на чашках Aggrewell, как описано в примере 3. На панели **С** представлена фотография, показывающая жизнеспособность сфероидов при измерении иммунофлуоресцентным методом типа Live/Dead. LIVE: активность эстеразы, DEAD: окрашивание мертвых клеток гомодимером-1 этидия, ЯДРА: окрашивание ядер в клетках с помощью Hoechst 33342,

LIGHT: фазово-контрастная микроскопия.

На фиг. 18 представлена гистограмма, показывающая относительные уровни мРНК маркеров SOX17, HNF4A и AFP при определении методом ОТ-кПЦР в свежеприготовленных (pStemHeps FRESH) или криоконсервированных (pStemHeps FROZEN) клетках pStemHeps при культивировании так, как указано в примере 2, и в сфероидах, полученных из свежеприготовленных (Spher FRESH) или криоконсервированных (Spher FROZEN) клеток pStemHeps при культивировании в течение 2 дней, как указано в примере 3. Относительные уровни экспрессии генов приводятся по шкале $\log 10$. Все относительные уровни экспрессии генов значительно отличались от таковых в недифференцированных hESCs.

На фиг. 19 представлена фотография, показывающая экспрессию AFP, CK19, FOX A2, HNF4A и SOX17 и отсутствие экспрессии ALB при двухдневном культивировании сфероидов, полученных из pStemHeps, по данным иммунофлуоресцентного анализа.

На фиг. 20A-B представлены графики, показывающие экспрессию AFP и отсутствие экспрессии ALB в сфероидах (Spher), полученных из pStemHeps и культивируемых в течение 2 дней в Aggrewell 400™, по данным метода ELISA. В качестве положительных контролей на секрецию AFP человека (панель A) и ALB человека (панель B) использовали pStemHeps и HLCs (полученные, как указано в примере 1), соответственно. * $p < 0,05$.

На фиг. 21 представлены графики, показывающие выживаемость мышей ($n=5$ в каждой группе), как на фиг. 4, за исключением того, что замороженные pStemHeps получали по методике C, как описано в табл. 2 из примера 2, а мыши C57BL/6 получали ацетаминофен по 700 мг/кг массы тела, а также трансплантацию 2×10^7 клеток pStemHeps в брюшную полость (график 1) или нет (график 2).

На фиг. 22 представлены графики, показывающие уровни продукции AFP человека *in vivo* при измерении методом ELISA в 3 группах мышей C57BL/6, не получавших (контроль, $n=3$) или получавших бесклеточный/преформированный альгинатный гидрогель, трансплантированный в брюшную полость (Альгинат, $n = 5$), или преформированный альгинатный гидрогель, содержащий 2-дневные культивированные сфероиды, полученные из 1×10^7 pStemHeps, трансплантированный в брюшную полость (Spher-Альгинат, $n=3$). Уровни AFP человека у мышей определяли через 24 часа после трансплантации. Каждая точка соответствует одному животному. * $p < 0,05$.

На фиг. 23 представлены фотографии, показывающие высокую жизнеспособность сфероидов, трансплантированных и собранных у животных, представленных на фиг. 21, на 8-й день после трансплантации, при измерении иммунофлуоресцентным методом типа Live/Dead. После 8 дней пребывания в брюшной полости мышей большинство клеток в

Spher обладают высокой эстеразной активностью (ЖИВЫЕ) и лишь немногие клетки положительны по гомодимеру-1 этидия (МЕРТВЫЕ). Ядра в клетках окрашивали с помощью Hoechst 33342 (ЯДРА).

На фиг. **24А-В** представлены гистограммы, показывающие относительные уровни мРНК ключевых маркеров печеночной дифференцировки, т.е. AFP (панель **А**) и HNF4A (панель **В**), в сфероиде, полученных из pStemHeps, культивируемых *in vitro* в течение 8 дней (Spher *in vitro* D8), и в сфероиде, заключенных в альгинатный гидрогель, которые были трансплантированы и собраны у животных, представленных на фиг. 21, на 8-й день после трансплантации (Spher-Альгинат D8), при определении методом ОТ-кПЦР в реальном времени. Относительные уровни экспрессии генов приводятся по шкале $\log 10$. * $p < 0,05$.

На фиг. **25** представлен график, показывающий распределение по размерам частиц, секретируемых клетками pStemHeps, в супернатантах клеток по данным метода отслеживания наночастиц (NTA) на приборе ParticleMetrix® ZetaView.

На фиг. **26А-С** представлен комплект схем и графиков, показывающих выявление тетраспанинов на внеклеточных везикулах (EVs), секретируемых клетками pStemHeps, на установке ExoView. Сначала эти EVs захватываются на местах антителами против тетраспанинов, а затем наносится комбинация флуоресцентно-меченых антител против тех же тетраспанинов и проводится считывание (панель **А**). Результаты свидетельствуют о наличии частиц по флуоресценции в четырех разных местах (частицы нормировали по площади считывания, MlgG: изотипный контроль) (панель **В**). Наконец, представлено распределение количества экспрессируемых тетраспанинов во всех пятнах (панель **С**). Три маркера – это CD63, CD81 и CD9.

На фиг. **27** представлена схема, показывающая протеомный анализ клеточных лизатов, клеточных супернатантов и очищенных везикул с диаграммой Венна на основе обнаруженных белков (порог > 1 PSM) из трех образцов.

На фиг. **28** представлен график, показывающий экспрессию HGF в супернатантах культур pStemHeps, полученных по методике С, при измерении методом ELISA.

ПРИМЕРЫ

Далее настоящее описание и изобретение раскрывается на следующих примерах. Если не указано иначе, термин “pStemHeps” при этом относится к подобным стволовым клеткам печени по изобретению.

Пример 1

Материалы и методы

Культивирование клеток

Получали линии эмбриональных стволовых клеток человека (hESCs) в соответствии с действующей Надлежащей производственной практикой (GMP) на питающих слоях фибробластов человека, и они доступны в форматах исследовательского и клинического уровня. hESCs (ESI-BIO) культивировали в отсутствие фидера на культуральных чашках, покрытых 5 мкг/мл ламинина LN521 (BioLamina®), в среде mTeSR1™ (Stem Cell Technologies®) при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ с ежедневной заменой среды и пересеивали с помощью TrypLE™ (ThermoFisher Scientific®), а затем культивировали в течение 24 часов в присутствии 10 мкМ ингибитора Rock Y-27632 (Stem Cell Technologies®).

Дифференцировка в печеночные клетки in vitro (получение популяции подобных стволовым клеткам печени)

Высевали клетки (75 000 клеток/см²) на ламинин LN521 (BioLamina®) при 5 мкг/мл в среде mTeSR1™ (Stem Cell Technologies®), содержащей 10 мкМ ингибитора Rock Y-27632 (Stem Cell Technologies®). Через 24 часа для запуска дифференцировки (в день 0) заменяли поддерживающую среду для hESCs на RPMI с добавлением бессывороточной добавки B27 (Life Technologies®), после чего меняли среду каждый день. В течение первого дня индукции дифференцировки в дефинитивную энтодерму клетки культивировали в присутствии 100 нг/мл активина А (Miltenyi Biotec®), 50 нг/мл Wnt3a (R&D Systems®) и 3 мкМ CHIR-99021 (Stem Cell Technologies®). Затем клетки культивировали еще 1 день в присутствии 100 нг/мл активина А (Miltenyi Biotec®) и 50 нг/мл Wnt3a (R&D Systems®), а затем еще 3 дня в присутствии 100 нг/мл активина А (Miltenyi Biotec®). Чтобы индуцировать печеночные характеристики после образования энтодермы, использовали 10 нг/мл фактора роста фибробластов 10 (FGF-10) (Miltenyi Biotec®) и 10 нг/мл костного морфогенетического белка 4 (BMP-4) (R&D Systems®) в течение 5 дней. После выполнения этой методики А для печеночной дифференцировки клетки pStemHeps замораживали в среде CryoStor™ CS10 (Stem Cell Technologies®). Для получения гепатоцитоподобных клеток (HLCs) путем созревания печеночных клеток культивировали клетки в культуральной среде для гепатоцитов (HCM) (Lonza®) с добавлением 20 нг/мл фактора роста гепатоцитов (HGF) и 20 нг/мл онкостатина М (OSM) (Miltenyi Biotec®), меняя среды каждые 2 дня.

Выделение РНК и количественная ПЦР в реальном времени

Выделяли тотальную мРНК из культур с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen®) согласно рекомендациям производителя. Проводили обратную транскрипцию в реальном времени, исходя из 5 нг РНК, с помощью набора для ОТ-ПЦР в одну стадию по технологии Taqman® (AgPath-ID™ One-Step RT-PCR, Life Technologies®) на установке Vii

A7 Real-Time PCR System фирмы Applied Biosystems, используя соответствующие праймеры для метода Taqman (Life Technologies®): OCT4 (Hs00999632_g1), SOX17 (Hs00751752_s1), HNF4A (Hs00604435-m1), AFP (Hs00173490_m1) и GAPDH (Hs99999905_m1). Относительную экспрессию генов рассчитывали методом определения 2-ΔΔCt после нормирования по значениям GAPDH и выражали в единицах, кратных уровням, отмеченным в недифференцированных клетках hESCs.

Проточная цитометрия

Собирали клетки и инкубировали на льду с красителем на жизнеспособность Fixable Viability Dye eFluor™ 450 (eBioscience™ 65-0863-14) в течение 20 мин. Проводили внутриклеточное окрашивание в соответствии с инструкциями производителя с помощью набора Fixation/Permeabilization kit (eBioscience™ 00-5123-43 и 00-5223-56) в присутствии или в отсутствие первичных антител против SOX17 (козье антитело против SOX17 с аллофикоцианином, R&D Systems®, #IC1924A) и HNF4A (мышинное антитело против HNF4A с Alexa Fluor 488, Santa Cruz®, #SC-374229). Выявление CXCR4 проводили без пермеабилзации клеток с помощью моноклонального мышинного антитела IgG2b против CXCR4 (R&D Systems®, #Mab173) и антитела против IgG2b мыши с Alexa Fluor 568. Анализ проводили на установке FACS Canto II (BD Biosciences®) с помощью программного обеспечения Flow Jo (Tree Star®, Ashland, OR, США). Первичные гепатоциты человека получали от фирмы Biopredic International.

Иммунофлуоресцентный метод окрашивания клеток

Культивируемые клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 15 мин при комнатной температуре, пермеабилizировали 0,5% Triton X-100 в PBS в течение 15 мин и блокировали 1% BSA с 0,1% Triton в PBS в течение 30 мин. Первичные антитела разводили в 11% BSA с 0,1% Triton в PBS и инкубировали 1 час при комнатной температуре (мышинное антитело против AFP, Sigma Aldrich®, #A8452, 1/50; мышинное антитело против ALB, Cedarlane®, #CL2513A, 1/300; кроличье антитело против FOXA2, Abcam®, #ab108422, 1/100; мышинное антитело против HNF4A, Santa Cruz®, #SC-374229, 1/100; кроличье антитело против OCT4, Santa Cruz®, #SC-9081, 1/50). Вторые антитела разводили в 1% BSA с 0,1% Triton в PBS и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре (ослиное антитело против IgG мыши с Alexa Fluor 488, Invitrogen®, #A21202, 1/200; козье антитело против IgG кролика с Alexa Fluor 488, Invitrogen®, #A21206, 1/200). Клетки монтировали с помощью покровных стекол и заливочной среды ProLong Gold Antifade Mountant (Life Technologies®). Все снимки рассматривали под флуоресцентным микроскопом Zeiss.

Иммуноферментный твердофазный анализ (ELISA)

Определение AFP и ALB человека, секретируемых в культуральную среду, проводили с помощью набора для определения AFP человека по ELISA (Abcam®) и набора для определения альбумина человека по ELISA (Bethyl; <http://www.bethyl.com>) согласно инструкциям производителя.

Определение AFP человека, секретируемого в сыворотку животных с трансплантацией, проводили с помощью набора для специфического определения AFP человека по ELISA (EHAFF, ThermoFisher Scientific®) согласно инструкциям производителя.

Животные и индуцирование острой печеночной недостаточности (ALF)

Самцам мышей NOD/SCID (6-недельным) вводили ацетаминофен (APAP) по 400 мг/кг за 3 часа до трансплантации клеток, чтобы вызвать острую печеночную недостаточность (ALF). ALF определяли с помощью гистологического окрашивания и определения трансаминаз в сыворотке обработанных животных. Через три часа после инъекции APAP животным вводили в селезенку по 1×10^6 замороженных pStemHeps в 50 мкл среды RPMI/B27 (Life Technologies®). При всех анализах использовались клетки pStemHeps, которые были криоконсервированы и разморожены. Контрольные мыши получали интоксикацию APAP без лечения. Через 24 часа мышей забивали под наркозом (изофлюрановым). Собирали кровь, сыворотку и печень и хранили при -80°C до проведения анализа. Для гистологического анализа фиксированную формалином печень обезвоживали, заливали в парафиновые блоки и нарезали на срезы в 5 мкм. Срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином (H&E), сканировали с помощью цифрового сканера препаратов (Nanozoomer S360, Hamamatsu Photonics) при увеличении $\times 20$. Цифровые изображения преобразовывали по 8-битной шкале серого, а серые значения измеряли с помощью программного обеспечения ImageJ для количественной оценки нормальных и некротических участков ткани. Для определения серых значений в нормальной печени использовали печень мышей, не подвергавшихся интоксикации APAP.

ПЦР на Alu

Выделяли геномную ДНК из тканей с помощью набора “Геномная ДНК из органов и клеток” (Macherey-Nagel®) согласно рекомендациям производителя. ПЦР на Alu проводили с помощью двух праймеров, hAluR: 5'-TTT TTT GAG ACG GAG TCT CGC TC-3' (SEQ ID NO: 1) и hAluF: 5'-GGC GCG GTG GCT CAC G-3' (SEQ ID NO: 2). ПЦР проводили с помощью набора Herculanase (Agilent®) в общем объеме 25 мкл с 10 нг геномной ДНК. Условия проведения ПЦР соответствовали рекомендациям производителя.

Статистический анализ

Данные выражали в виде средних значений $\pm$ SEM. Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism[®] 7 (GraphPad Software, San Diego, Калифорния). Статистическую значимость определяли по t-критерию Стьюдента для сравнения между группами. Данные по выживаемости анализировали по критерию Каплана-Мейера. Статистическую значимость по выживаемости определяли с помощью лог-рангового критерия. Для всех критериев значения $p < 0,05$ считались значимыми (*).

Результаты

Дифференцировка hESCs в подобные стволовые клетки печени (pStemHeps)

В день 0 по методике дифференцировки культуры hESCs по GMP были положительными по маркеру плюрипотентности, октамер-связывающему фактору транскрипции 4 (OCT4) (фиг. 1 и 2A). Клетки hESCs подвергали дифференцировке по методике из трех стадий. Клетки индуцировали в дефинитивную энтодерму (DE), после чего следовала 5-дневная печеночная специализация, при которой клетки проходили дифференцировку в подобные стволовые клетки печени (pStemHeps). На фиг. 2A представлена кинетика экспрессии ключевых маркеров – плюрипотентности (OCT4), DE (FOXA2), печеночных предшественников (AFP) и зрелых гепатоцитов (ALB): исчезает экспрессия OCT4, экспрессируется FOXA2 после индукции DE (день 5), экспрессируется AFP после печеночной индукции (день 11) и не экспрессируется альбумин (ALB). На 11-й день pStemHeps экспрессируют AFP, CXCR4 (маркер DE), FOXA2, HNF4A и SOX17 (маркер DE) по данным анализа РНК, иммунофлуоресценции и/или цитофлуориметрии (фиг. 1B-D и 2A-C). Соответственно, pStemHeps секретируют AFP (фиг. 2D), но не ALB (фиг. 3C).

Сообщалось, что процедуры криоконсервации и размораживания оказывают пагубное влияние на жизнеспособность и функции первичных гепатоцитов человека в сравнении со свежевыделенными клетками. При успешной криоконсервации pStemHeps благополучно сохраняют высокую жизнеспособность на протяжении от двух до девяти месяцев (табл. 1).

Таблица 1. Криоконсервация и оттаивание pStemHeps

№ препарата	Жизнеспособность клеток до замораживания (%)	Средняя жизнеспособность клеток до замораживания (%)	Жизнеспособность клеток после замораживания (%)	Средняя жизнеспособность клеток после замораживания (%)	Продолжительность заморозки (мес)
1	94	93	92	91	3
2	91		90		2

3	97		96		9
4	90		85		4

Способность hESCs к дифференцировке в HLCs

После печеночного созревания pStemHeps в HLCs морфология дифференцированных клеток имеет много общих характеристик со взрослыми первичными гепатоцитами, включая многоугольную форму, отчетливые круглые ядра или двойные ядра и многочисленные вакуоли или везикулы (фиг. **3B**). HLCs секретируют ALB, а это важная функция зрелых гепатоцитов (фиг. **3C**). Иммуноокрашивание клеток показало, что HLC положительны по ALB, AFP и HNF4A (фиг. **3A**).

pStemHeps спасают от APAP-индуцированной ALF

Для оценки терапевтического потенциала pStemHeps in vivo использовали модель токсичности ацетаминофена (APAP) у мышей с ослабленным иммунитетом, которая имитирует ALF. Эта модель была сначала выбрана потому, что на мышинных моделях была показана стойкая гепатотоксичность и повреждение гепатоцитов в печени человека. В западных странах интоксикация парацетамолом является главной причиной ALF.

Доза ацетаминофена в 400 мг/кг массы тела приводила к быстрой гибели контрольных животных уже через 24 часа после введения APAP. Трансплантация pStemHeps значительно повышала выживаемость животных (выживаемость >90%) по сравнению с контрольными животными с ALF (фиг. **4**).

Соответственно, индуцирование ALF сопровождалось быстрым выбросом аланинаминотрансферазы (ALAT, основного маркера повреждения печени) в кровь. Трансплантация pStemHeps приводила к снижению значений ALAT уже через 24 часа после клеточной терапии по сравнению с контрольными животными с ALF (фиг. **5**).

Кроме того, гистологический анализ показал большую степень некроза печени в контрольной группе животных, получавших только APAP, по сравнению с группой животных, получавших APAP и pStemHeps в пределах 24 часов после трансплантации клеток (фиг. **6**), что свидетельствует о быстром терапевтическом действии терапии pStemHeps.

В сыворотке мышей с трансплантацией обнаруживался AFP человека, которого не было в сыворотке контрольных мышей без трансплантации через 24 часа после инъекции клеток (фиг. **7**), что свидетельствует о быстром восстановлении и функциональности клеток после оттаивания pStemHeps.

Для того, чтобы выяснить, приживались ли трансплантированные клетки в печени мышей-реципиентов, выявляли присутствие человеческих pStemHeps методом ПЦР на Alu человека (специфическая последовательность, которая часто повторяется). Человеческие

клетки обнаруживались в печени всего через 24 часа после трансплантации (фиг. 8).

Выводы

Сообщалось, что процедуры криоконсервации и размораживания оказывают пагубное влияние на жизнеспособность и функции первичных гепатоцитов человека в сравнении со свежевыделенными клетками (Terry et al., 2010). Успешная криоконсервация печеночных предшественников у человека, сохраняющих высокую жизнеспособность, а также способность к культивированию и дальнейшей дифференцировке, позволила бы создавать долгосрочные банки клеток, необходимых для последующих исследований и клинического применения. Подобные стволовые клетки печени оказались способными к пролиферации и экспрессии специфичных для печени маркеров типа HNF4A и AFP. При дальнейшем созревании клетки проявляли специфичные для печени функции типа секреции альбумина.

После введения клетки pStemHeps быстро восстанавливались из криоконсервированного состояния, приживались и были способны защитить мышей от летальной острой печеночной недостаточности. Клетки обнаруживались в печени мышей с трансплантацией через 24 часа. Также отмечалось значительное и быстрое снижение ALAT в сыворотке и некроза тканей печени по сравнению с контрольными мышами APAP-ALF.

При этом оказалось, что замороженные незрелые гепатоциты, полученные из плюрипотентных стволовых клеток человека, способны спасти мышей от APAP-ALF за счет ускорения регенерации здоровой ткани печени. pStemHeps быстро восстанавливаются и становятся функциональными в пределах 24 ч после трансплантации. В целом эти результаты показывают, что усиление регенерации здоровой ткани печени при трансплантации pStemHeps тем самым может способствовать лечению фульминантной печеночной недостаточности типа ALF, а также способствовать лечению фульминантной печеночной недостаточности при уже существующих хронических заболеваниях печени типа ACLF. Так, подобно ALF, ACLF выигрывает от регенерации здоровой ткани печени в больной печени при лечении фульминантной печеночной недостаточности.

Пример 2

Материалы и методы

Культивирование клеток

Получали линии эмбриональных стволовых клеток человека (hESCs) в соответствии с действующей Надлежащей производственной практикой (GMP) на питающих слоях фибробластов человека, и они доступны в форматах исследовательского

и клинического уровня. hESCs (ESI-BIO) культивировали в отсутствие фидера на культуральных чашках, покрытых 5 мкг/мл ламинина LN521 (BioLamina®), в среде mTeSR1™ (Stem Cell Technologies®) при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ с ежедневной заменой среды и пересевали с помощью TrypLE™ (ThermoFisher Scientific®), а затем культивировали в течение 24 часов в присутствии 10 мкМ ингибитора Rock Y-27632 (Stem Cell Technologies®).

Дифференцировка в печеночные клетки in vitro и характеристика подобных стволовым клеткам печени

Высеивали клетки (от 20 000 до 50 000 клеток/см²) на ламинин LN521 (BioLamina®) при 5 мкг/мл (методики А и В) или на LN511 (iMatrix 511, Amsbio®) при 0,0625 мкг/мл (методика С) и культивировали в среде mTeSR1™ (Stem Cell Technologies®) с ежедневной заменой среды и пересевали с помощью TrypLE™ (ThermoFisher Scientific®), а затем культивировали в течение 24 часов в присутствии 10 мкМ ингибитора Rock Y-27632 (Stem Cell Technologies®).

Через 48 часов запускали дифференцировку hESCs в печеночные клетки, как изложено в примере 1, получая pStemHeps в соответствии с табл. 2, в которой представлены методики для культур.

Таблица 2. Методики получения подобных стволовым клеткам печени из hESCs

Методика	Индукция энтодермы*	Дифференцировка в печеночные клетки*
А	d0-d1: ACTA + Wnt3A + CHIR-99021 d1-d2: ACTA + Wnt3A d2-d5: ACTA (матрикс: LN521)	d5-d11: BMP4 + FGF10 (матрикс: LN521)
В	d0-d2: CHIR-99021 (матрикс: LN521)	d3-d8: BMP4 + FGF10 d8-d10: HGF + CHIR-99021 (матрикс: LN521)
С	d0-d2: CHIR-99021 (матрикс: iMatrix 511)	d3-d8: BMP4 + FGF10 d8-d10: HGF + CHIR-99021 (матрикс: iMatrix 511)

* Продолжительность стадий с ACT-A (100 нг/мл), Wnt3A (50 нг/мл), CHIR-99021 (3 мкМ), BMP4 (10 нг/мл), FGF10 (10 нг/мл), HGF (20 нг/мл).

Популяция подобных стволовым клеткам печени, полученных по приведенным выше методикам, характеризовали in vitro и in vivo.

Для характеристики in vitro определяли такие параметры, как плотность собранных клеток, выход, жизнеспособность клеток, уровни маркеров для характеристики DE – FOXA2 и SOX17, для характеристики подобных стволовым клеткам печени – AFP, APOA1, APOB, HNF1B, HNF4A, TBX3, KRT19 и TTR, для характеристики зрелых

гепатоцитов – ALB, ASGR1, CYPs F9, NAGS и UGT1A1.

Уровни маркеров определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени, ELISA, FACS, иммунофлуоресцентного окрашивания клеток, как указано выше. Информация касательно праймеров для кПЦР по методу Taqman приведена в примере 1, это праймеры для кПЦР фирмы Life Technologies® для FOXA2 (Hs00232764_m1), праймеры для HNF1B (Hs01001602-m1), для TBX3 (Hs00195612_m1), для TTR (Hs00174914-m1). Информация касательно антител для иммунофлуоресцентного окрашивания клеток приведена в примере 1, это антитела против EPCAM (R&D Systems®, #AF960), против CK19/KRT19 (Dako®, #M0888), против SOX17 (R&D Systems®, #AF1924), против KI67 (Abcam®, #Ab15580) и ослиное антитело против IgG козы с Alexa Fluor 568 (Invitrogen®, #A11057).

С другой стороны, уровни маркеров определяли по профилю экспрессии мРНК методом 3'-DGE (DGE-Seq). При этом секвенирование РНК проводили при 10 нг тотальной РНК, определяя количество молекул данной мРНК на 1 миллион всех молекул мРНК, как описано в Kilens et al. (2018).

Животные и индуцирование острой печеночной недостаточности (ALF)

Для характеристики *in vivo* определяли способность подобных стволовым клеткам печени к спасению мышей NOD/SCID при ALF, индуцированной APAP в дозе 400 мг/кг или 720 мг/кг (см. приведенный выше пример 1).

В качестве альтернативы мышам NOD/SCID с ALF, индуцированной APAP, хирургическим путем удаляли примерно 1/3 печени перед трансплантацией 1×10^6 криоконсервированных pStemHeps, как указано.

В качестве альтернативы самцам мышей C57BL/6 (6-недельным) вводили тиацетамид (ТАА) по 1500 мг/кг для индукции ALF за 24 часа до трансплантации 1×10^6 криоконсервированных pStemHeps, которую проводили, как описано в примере 1.

После забоя собирали кровь, аликвоты сыворотки предохраняли от света и хранили при -80°C до проведения анализов по измерению AFP человека методом ELISA, как описано в примере 1.

Присутствие положительных по KI67 (MKI67) клеток определяли иммуногистохимически на фиксированных формалином/залитых парафином срезах печени (3 мкм) через 24 часа после введения 1×10^6 pStemHeps (полученных по методике C; см. табл. 2) животным, получавшим APAP по 700 мг/кг массы тела, или контрольным животным без обработки, получавшим только APAP. После извлечения парафина из срезов блокировали эндогенные сайты связывания авидина/биотина с помощью набора Avidin/biotin blocking kit (ThermoFisher Scientific®, #00-4303) и ингибировали активность эндогенной пероксидазы путем инкубации в течение 10 минут в 3% растворе H_2O_2 в PBS.

После инкубации в блокаторе Animal Free Blocker (Vector Laboratories®, #SP-5030-250) в течение 1 часа наносили кроличьи поликлональные первичные антитела против KI67 (Abcam®, #ab15580), разведенные 1:1000 в Animal Free Blocker, на всю ночь при 4°C. Положительные по KI67 клетки выявляли с помощью биотинилированного козьего антитела против иммуноглобулина кролика и стрептавидина с пероксидазой (Abcam®, #ab64261), используя диаминобензидин в качестве хромогенного субстрата. Препараты подвергали контрастному окрашиванию с помощью гематоксилина и ксилола.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили, как указано в примере 1.

Результаты

Дифференцировка hESCs в pStemHeps по 3 различным методикам

Проводили дифференцировку hESCs по GMP в pStemHeps по одной из 3 методик (различные матрицы и коктейли для дифференцировки в печеночные клетки), как показано в табл. 2.

Все pStemHeps, полученные по разным методикам, экспрессировали AFP, а также FOXA2, HNF1b, HNF4A, TBX3 и TTR, судя по данным ОТ-ПЦР (фиг. 9). Кроме того, анализ pStemHeps (методики А и В) методом RNAseq показал высокий уровень экспрессии следующих генов: AFP, APOA1, APOA2, APOB, APOE, CD164, CD24, DPP4, EPCAM, GJA1, GSTA2, KRT18, KRT19, SEPP1, SOD1, SPARC, TTR, VIM, VTN (фиг. 10). Они также экспрессировали следующие гены, но на сравнительно меньшем уровне: APOA4, BMP2, BMP4, DLK1, GATA4, GATA6, GSTA1, HNF1B, HNF4A, SMAD7, TBX3. При этом они не экспрессировали гены, характерные для зрелых гепатоцитов: ABCB11, ASGR1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2B7P, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A7, F9, NAGS, UGT1A1 и не экспрессировали PDX1.

Соответственно, pStemHeps, полученные по методике А, В или С, действительно продуцировали и секретируют белок AFP, но не белок ALB (фиг. 11А и 11В). Из фиг. 11В также видно, что pStemHeps были положительны по белкам HNF4A, SOX17, EPCAM, CK19 (KRT19), FOXA2. pStemHeps также были положительны по белку KI67, маркеру пролиферирующих клеток (фиг. 11В).

pStemHeps спасают от АРАР-индуцированной ALF

Криоконсервированные pStemHeps, полученные по методике А, В или С, проверяли на их способность к спасению от АРАР-индуцированной ALF на мышах NOD/SCID.

Из фиг. 4, 12, 13А-В и 14А, соответственно, видно, что все pStemHeps, полученные по этим методикам, вызывают значительное повышение выживаемости мышей NOD/SCID

с индуцированной ацетаминофеном ALF (фиг. 4: методика А, фиг. 12: методика В, фиг. 13А-В: методики В и С, соответственно, фиг. 14А: методика С).

pStemHeps, полученные по методикам В и С, спасали от индуцированной ацетаминофеном ALF мышей NOD/SCID, перенесших хирургическое удаление 1/3 печени перед трансплантацией этих клеток (см. фиг. 13А-В, соответственно).

pStemHeps спасали от ALF мышей NOD/SCID, интоксцированных высокой дозой ацетаминофена, приводящей к 100%-й гибели мышей в пределах 2 дней в контрольной группе мышей без обработки (фиг. 14А).

Как видно из фиг. 14В-С, pStemHeps вызывают значительное увеличение числа пролиферирующих клеток в печени мышей NOD/SCID с индуцированной ацетаминофеном ALF (фиг. 14В) через 24 часа после инъекции клеток по сравнению с контрольными мышками без обработки с индуцированной ацетаминофеном ALF, не получавшими pStemHeps (фиг. 14С). Эти результаты свидетельствуют о более быстрой регенерации печени после терапии клетками pStemHeps у мышей с APAP-индуцированной ALF.

pStemHeps спасают от ALF, не индуцированной APAP

Полученные криоконсервированные pStemHeps проверяли на их способность к спасению от ALF, индуцированной у мышей с помощью гепатотоксина тиаоацетамида (ТАА) в качестве модели на животных ALF человека, индуцированной не ацетаминофеном.

Из фиг. 15А-В видно, что pStemHeps, полученные по методике, спасают иммунокомпетентных мышей от ТАА-индуцированной ALF в присутствии или в отсутствие такролимуса (иммуносупрессивного средства). В целом эти результаты свидетельствуют о низкой иммуногенности этих клеток.

Из фиг. 16 видно, что через 24 часа после инъекции клеток обнаруживался АФР человека в сыворотке мышей с трансплантацией, но не в сыворотке контрольных мышей без трансплантации, что свидетельствует о быстром восстановлении и функциональности клеток после оттаивания pStemHeps при ALF, индуцированной не APAP у мышей.

Выводы

Здесь было показано, что получение препаратов подобных стволовым клеткам печени (pStemHeps) из hESCs не является лимитирующим этапом, так как можно реализовать несколько методик с практически эквивалентными терапевтическими результатами для лечения острой печеночной недостаточности на модели у мышей. Кроме того, pStemHeps могут спасти от ALF, индуцированной APAP и не индуцированной APAP. pStemHeps становятся терапевтически активными достаточно быстро (в пределах

24 часов) после оттаивания клеток и трансплантации клеток, спасая мышей от ALF (первая смерть случилась в пределах 24 часов) и/или в отсутствие иммуносупрессии. В целом эти результаты свидетельствуют, что трансплантация pStemHeps обеспечивает большую степень регенерации печени из здоровой ткани в условиях фульминантной печеночной недостаточности типа ALF, а также в условиях фульминантной печеночной недостаточности с уже существующими хроническими заболеваниями печени, как-то при ACLF. Опять же, как и при ALF, ACLF выигрывает от регенерации здоровой ткани печени в больной печени при лечении фульминантной печеночной недостаточности.

Пример 3

Материалы и методы

Создание сфероидов из pStemHeps

По окончании стадии дифференцировки именно в pStemHeps (см. методики, описанные в примере 2) клетки pStemHeps промывали PBS, лишенным Ca/Mg (Gibco®), и инкубировали с TrypLE™ (Life Technologies®) в течение 10 минут при 37°C. В суспензию диссоциированных клеток добавляли RPMI/B27 (Life Technologies®) и осторожно взбалтывали клетки до полной диссоциации. Затем клетки высевали на чашки Aggrewell 400™ (Stem Cell Technologies®) для достижения конечной плотности в 1000 клеток/сфероид в полной среде HCM (Lonza®) с добавлением 10 мкМ Y27632 (Stem Cell Technologies®), 20 нг/мл HGF (Miltenyi®), 20 нг/мл OSM (Miltenyi®) и 1 мкМ дексаметазона (Sigma Aldrich®) (D0 Spher). Клетки инкубировали 48 часов при 37°C, 5% CO₂ без замены среды.

Анализ экспрессии генов

Уровни маркеров определяли методами ОТ-кПЦР и ELISA, как указано выше.

Для иммунофлуоресцентного окрашивания клеток сфероиды промывали PBS с добавлением Ca/Mg, фиксировали в течение 30 минут с помощью 4% PFA и пермеабелизировали 0,5% Triton в PBS в течение 15 минут. Иммуноокрашивание клеток проводили путем инкубации сфероидов в PBS, содержащем 0,1% Triton и 1% BSA (блокирующий буфер), в течение 1 часа с первичными антителами и 1 часа с соответствующими вторичными антителами при комнатной температуре (табл. 3).

Таблица 3. Антитела, используемые для иммунофлуоресцентного окрашивания сфероидов

<u>Первичные антитела</u>		
Мишень и вид	Поставщик и номер	Разведение
ALB, мышь	Cedarlane® #CL2513A	1/300
CK19, мышь	Dako® #M0888	1/100
AFP, мышь	Sigma Aldrich® #A8452	1/50

HNF4A, мышь	Santa Cruz® #SC-374229	1/100
FOXA2, кролик	Abcam® # AB108422	1/100
SOX17, коза	R&D Systems® #AF1924	1/40
Вторичные антитела		
Ослиное против мыши с AF488	Invitrogen® #A21202	1/200
Козье против кролика с AF568	Invitrogen® #A11036	1/200
Ослиное против козы с AF568	Invitrogen® #A11057	1/200

Жизнеспособность клеток

Для оценки жизнеспособности клеток *in vitro* в культуральную среду добавляли 0,4 мкМ кальцеина-АМ и 4 мкМ гомодимера-1 этидия (набор для жизнеспособности/цитотоксичности Live/Dead, Life Technologies®) и 10 мкг/мл Hoechst 33342 (Life Technologies®) на 30 минут перед визуализацией.

Трансплантация сфероидов и их функциональность *in vivo*

Перед трансплантацией сфероиды заключали в альгинатный гидрогель. Для этого получали двухдневные культивированные сфероиды, как описано выше, собирали их из Aggrewell, центрифугировали при 100×g в течение 5 мин и ресуспендировали в лишенном кальция/магния PBS (Life Technologies®). Сфероиды смешивали с 8,9% ультрачистого альгината натрия с низкой вязкостью и высоким содержанием глюкуроновой кислоты (Pronova SLG20, NovaMatrix®), а затем осторожно смешивали с 0,0225 М CaCO₃ (Sigma Aldrich®) и 0,045 М глюконо-d-лактоном (Sigma Aldrich®) до конечной концентрации клеток в 20×10⁶/мл (примерно 2×10⁴ сфероидов). Гелеобразование гидрогелей по 250 мкл происходило при комнатной температуре в течение 3 мин. По два преформированных алгинатных гидрогеля в 250 мкл, содержащих или не содержащих сфероиды, трансплантировали внутрибрюшинно при лапаротомии иммунокомпетентным мышам C57BL/6.

Для оценки жизнеспособности сфероидов извлекали гидрогели из подвергавшихся трансплантации животных на 8-й день после трансплантации и диссоциировали их с помощью раствора PBS без кальция и магния (Life Technologies®), содержащего 0,1 М EDTA (Life Technologies®) и 0,2 М трехзамещенного цитрата натрия (Sigma Aldrich®). После полной диссоциации гидрогелей сфероиды центрифугировали при 100×g в течение 5 мин и инкубировали в свежей среде RPMI/B27, содержащей 0,4 мкМ кальцеина-АМ и 4 мкМ гомодимера-1 этидия (набор для жизнеспособности/цитотоксичности Live/Dead, Life Technologies®) и 10 мкг/мл Hoechst 33342 (Life Technologies®), в течение 90 минут перед визуализацией.

Через 8 дней после трансплантации определяли уровни экспрессии генов в сфероидов методом ОТ-ПЦР в реальном времени после извлечения и диссоциации альгинатных гидрогелей, как описано выше. В сыворотке подвергавшихся трансплантации животных определяли AFP с помощью набора для специфического определения AFP человека методом ELISA (EHAFF, ThermoFisher Scientific®) согласно инструкциям производителя.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили, как указано в примере 1.

Результаты

Как видно из фиг. 17А-С, и свежеприготовленные, и криоконсервированные pStemHeps агрегировали и образовывали сфероиды через 48 часов после посева на чашки AggreWell. На время сбора сфероиды обладали высокой эстеразной активностью и не были положительными при окрашивании гомодимером-1 этидия. Только неагрегированные клетки были положительными по гомодимеру-1 этидия и не проявляли эстеразной активности. Эти результаты свидетельствуют о высокой жизнеспособности всех сфероидов. Кроме того, сфероиды, полученные из свежеприготовленных или криоконсервированных pStemHeps, проявляли высокие уровни мРНК AFP, HNF4A и SOX17, близкие к уровням в pStemHeps, из которых они были получены (фиг. 18).

Затем на сфероидов проводили иммуофлуоресцентный анализ для оценки уровней экспрессии некоторых ключевых маркеров печеночной дифференцировки. Результаты показали, что сфероиды экспрессируют белки AFP, CK19 (KRT19), FOXA2, HNF4A и SOX17, но не экспрессируют белок ALB (фиг. 19).

Наконец, проводили ELISA на AFP в образцах супернатантов клеток и подтвердили, что сфероиды секретируют AFP, уровень которого был близок к уровню в pStemHeps (фиг. 20А). Кроме того, не выявлялась секреция ALB у 2-дневных сфероидов, в отличие от HLCs (фиг. 20В).

Для проверки функциональности сфероидов *in vivo* мышам CB57BL/6 трансплантировали внутрибрюшинно по два преформированных альгинатных гидрогеля, содержащих в общей сложности 10×10^6 pStemHeps. Кроме того, мышам CB57BL/6 с ALF трансплантировали внутрибрюшинно по 2×10^7 pStemHeps, что обеспечило их выживаемость (фиг. 21).

Из фиг. 22 видно, что в сыворотке мышей C57BL/6 через 2 дня после трансплантации преформированных альгинатных гидрогелей, содержащих сфероиды, обнаруживался AFP человека в среднем на уровне 320 нг/мл.

Через 8 дней после трансплантации сфероиды, заключенные в альгинатные

гидрогели, проявляли высокую жизнеспособность (фиг. 23) и экспрессировали AFP и HNF4A на таком же уровне, что и сфероиды (не заключенные в альгинатный гидрогель), культивируемые *in vitro* в течение 8 дней (фиг. 24А-В).

Выводы

Здесь было показано, что можно быстро и эффективно получать сфероиды как из свежеприготовленных, так и криоконсервированных выделенных клеток pStemHeps. Сфероиды проявляют высокую жизнеспособность *in vitro* и сохраняют свой статус предшественников, подобно клеткам pStemHeps, в частности, с экспрессией маркера AFP и отсутствием экспрессии маркера ALB. Такие сфероиды, заключенные в альгинатные гидрогели, обладают способностью секретировать AFP *in vivo* и выживают не менее 8 дней в брюшной полости иммунокомпетентных животных, то есть достаточно времени для спасения мышей от острой печеночной недостаточности (гибель происходит в пределах 5 дней, см. пример 1 и пример 2). Кроме того, pStemHeps, трансплантированные в брюшную полость, спасают мышей от ALF. В целом эти результаты подтверждают, что pStemHeps, заключенные в гидрогели, могут тем самым приносить пользу при лечении фульминантной печеночной недостаточности типа ALF, а также при лечении фульминантной печеночной недостаточности с уже существующими хроническими заболеваниями печени типа ACLF.

Пример 4

Материалы и методы

Выделение и распределение по размерам внеклеточных везикул (EV), секретируемых из pStemHeps в клеточные супернатанты

Клеточные супернатанты освещали при 2000×g в течение 10 мин, удаляя обломки клеток. Затем их разливали в пробирки на 40 мл и замораживали при -80°C. Оттаивали 3 пробирки и определяли распределение частиц по размерам и концентрацию методом отслеживания наночастиц (NTA) на приборе ZetaView (ParticleMetrix®, Германия) с лазером на 405 нм. Перед измерениями EVs разбавляли в 100 раз стерильным PBS (проверенным на отсутствие частиц по данным NTA). Для каждого образца устанавливали чувствительность на 80 и выдержку на 100.

Дальнейшая характеристика EVs

EVs из клеточных супернатантов концентрировали и очищали путем ультрацентрифугирования за два последовательных цикла при 150000×g в течение 90 мин на ультрацентрифуге Optima MAX-XP (Beckman Coulter®, UK). Концентрированные EVs анализировали на установке ExoView (NanoView Biosciences®, США). Образцы разбавляли до 1×10⁸ EV/мл реагентом А из набора. Образцы инкубировали на чипах

ExoView Tetraspanin для EVs человека, помещенных в 24-луночный планшет, 16 часов при комнатной температуре. Чипы промывали 3 раза реагентом А. Чипы инкубировали с антителами ExoView Tetraspanin Labeling, которые включают антитела против CD81 с Alexa-555, против CD63 с Alexa-488 и против CD9 с Alexa-647. Антитела разводили 1:600 в блокирующем иммунофлуоресценцию растворе. Чипы инкубировали с 250 мкл раствора для маркировки в течение 1 ч, промывали раствором А (PBS с 0,05% Tween-20), а затем раствором В (только PBS) 3 раза и высушивали. Чипы визуализировали на считывающем устройстве ExoView R100 с помощью программы для сбора данных NScan. Данные анализировали с помощью ExoViewer.

Определение HGF человека проводили с помощью набора для специфического определения HGF человека по ELISA (ThermoFisher Scientific®) согласно инструкциям производителя.

Идентификация и количественная оценка белков методом NanoLC-MS/MS

Проводили расщепление на центрифужных микроколонках S-Trap™ (Protifi®, Huntington, США) по 40 мкг клеточных лизатов, супернатантов и внеклеточных везикул в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, белки алкилировали 50 мМ йодацетамидом в 5% SDS и 1,2% водной фосфорной кислоте. Коллоидные частицы белка образовывались при добавлении 6-кратного объема от объема образца буфера для связывания S-Trap (90% водный метанол, 100 мМ TEAB, pH 7,1). Белковые смеси переносили в микроколонки S-Trap, центрифугировали при 4000×g в течение 30 секунд и промывали 150 мкл буфера для связывания S-Trap. Затем образцы расщепляли с помощью 4 мкг трипсина (Promega®) при 47°C в течение 1 часа. Пептиды элюировали по методике производителя и сушили в Speed Vacuum.

Их ресуспендировали в 10% ACN, 0,1% TFA в воде для HPLC для анализа методом LC-MS+MS на установке NanoRSLC-Q Exactive Plus (RSLC Ultimate 3000, ThermoFisher Scientific®, Waltham, MA, США). Пептиды (1-2 мкг) наносили на предколону (Acclaim PepMap 100 C18, картридж, 300 мкм×5 мм, 5 мкм, ThermoFisher Scientific®) и проводили разделение на колонке для обратнофазовой жидкостной хроматографии в 50 см (0,075 мм, Acclaim PepMap 100, C18, 2 мкм, ThermoFisher Scientific®), используя подвижную фазу А (H₂O с 0,1% муравьиной кислоты) и подвижную фазу В (80% ацетонитрила, 0,08% муравьиной кислоты). Пептиды элюировали из колонки с помощью градиента от 5% до 40% в течение 120 мин, от 40% до 80% в течение 1 мин, а затем градиент оставался на уровне 80% в течение 5 мин, после чего возвращался к 5% для повторного уравнивания колонки в течение 20 мин перед следующим введением.

Элюированные пептиды анализировали зависящим от данных методом MS/MS, ис-

пользуя метод получения топ-10, и фрагментировали их методом высокоэнергетической коллизионной диссоциации (HCD). Сканирование при MS и при MS/MS проводили с разрешением в 70 000 и 17 500, соответственно. Целевое значение AGC для MS и MS/MS устанавливали на 3×10^6 и 1×10^5 отсчетов с максимальным временем введения в 200 мс и 120 мс, соответственно. Диапазон сканирования при MS составлял от 400 до 2000 m/z. Динамическое исключение устанавливали на 30 секунд.

Файлы по MS обрабатывали с помощью программы Proteome Discoverer версии 2.4.0.305 и проводили поиск с помощью поисковой системы Mascot по базе данных UniProtKB/Swiss-Prot Homo sapiens (выпуск 15-04-2019, 20415 записей). Для поиска по исходной массе и фрагментам ионов отклонение массы устанавливали на 3 ppm и 20 ppm, соответственно. Другие параметры поиска включали: минимальная длина пептидов в 7 аминокислот со строгой специфичностью к расщеплению трипсином, карбамидометилирование (Cys) в качестве фиксированной модификации, а окисление (Met) и N-концевое ацетилирование в качестве переменных модификаций.

Результаты

Очистка и распределение по размерам EVs, секретируемых из pStemHeps в клеточные супернатанты

Исследовали клеточные супернатанты методом NTA. Зарегистрировано большое число частиц: $4,2 \pm 0,4 \times 10^9$ частиц/мл, что соответствует общему количеству частиц в $2,0 \pm 0,2 \times 10^{12}$ на 2×10^9 засеянных клеток, то есть примерно 10^3 частиц на 1 клетку. Их размер около 100 нм хорошо соответствует распределению EVs (фиг. 25 и табл. 4).

Таблица 4. Распределение размеров EVs

	Среднее значение ¹
Мода диаметра (нм)	$98,0 \pm 5,5$
Средний диаметр (нм)	$103,9 \pm 10,9$
Концентрация (частиц/мл)	$4,2 \pm 0,4 \times 10^9$

¹ Средний диаметр, мода и концентрация частиц в образцах супернатантов представлены в виде средних значений $\pm$ SD из трех независимых измерений методом NTA

Дальнейшая характеристика EVs

Полученные данные показали, что EVs могут иммунологически захватываться тремя исследованными антителами против тетраспанинов (антитела к CD63/CD81/CD9; см. фиг. 26A) с обнаружением от 150 до 300 частиц на 1 пятно. Большая часть сигнала была связана с маркером CD63 (40-70%) и в меньшей степени с маркером CD81 (35-70%) (фиг. 26B). Соответственно, 2 и 16% захваченных EVs экспрессируют 3 или 2 из 3

тетраспаниновых маркеров (фиг. 26С). Это подтверждает наличие EVs (тетраспанин-положительных) среди выделенных частиц.

Идентификация и количественная оценка белков методом NanoLC-MS/MS

При протеомном анализе очищенных везикул проводили сравнение с белками из клеточных лизатов и целых супернатантов. При анализе 0,5 мкг белков образец везикул проявлял наибольшее разнообразие экспрессируемых белков, причем большинство из них были общими с клеточным лизатом (фиг. 27). Многие цитозольные и мембранные белки, классически присутствующие в EVs, встречались в образце везикул в высокой концентрации. При протеомном анализе было подтверждено, что в супернатанте культивируемых клеток было значительное количество EV и экзосом и их можно было очистить. Отметим, что в EVs содержатся те же представляющие интерес белки, что и в клетках, такие как AFP, HGF, аполипопротеины (табл. 5 и 6, фиг. 28), а также белки, которые обычно встречаются в EVs (табл. 7).

Таблица 5. Представляющие интерес белки, обнаруженные в EVs

№ доступа в Uniprot	Описание белка (название гена)	Очищенные везикулы
P02771	α -фетопротеин О (AFP)	3
P02647	аполипопротеин А-I (APOA1)	20
P04114	аполипопротеин В-100 (APOB)	11
P02649	аполипопротеин Е (APOЕ)	45
P27487	дипептидилпептидаза 4 (DPP4)	49
P17302	белок щелевых контактов α_1 (GJA1)	2
P14210	фактор роста гепатоцитов (HGF)	2
P05783	кератин I типа, цитоскелетный 18 (KRT18)	23
P08727	кератин I типа, цитоскелетный 19 (KRT19)	24
P09486	SPARC	2
P08670	виментин О (VIM)	42

Таблица 6. Другие интересные белки, обнаруженные в EVs

№ доступа в Uniprot	Описание белка (название гена)	Очищенные везикулы
P07585	декорин (DCN)	14
P51654	глипикан-3 (GPC3)	6
P17936	связывающий инсулиноподобный фактор роста белок 3 (IGFBP3)	11
P23229	интегрин альфа-6 (ITGA6)	14
P40189	β -субъединица рецептора интерлейкина-6 (IL6ST)	5
P13796	пластин-2 (LCP1)	11

Таблица 7. Белки, которые обычно встречаются в EVs

№ доступа в Uniprot	Описание белка (название гена)	Очищенные везикулы
P60709	актин, цитоплазматический 1 (ACTB) ^{(1) (2)}	99
P63261	актин, цитоплазматический 2 (ACTG1) ^{(1) (2)}	98
P06733	α -енолаза (ENO1) ⁽¹⁾	56
P07355	аннексин A2 (ANXA2) ^{(1) (2)}	53
P08758	аннексин A5 (ANXA5) ^{(1) (2)}	41
P08133	аннексин A6 (ANXA6) ⁽²⁾	75
P98160	основной белок гепарансульфатного протеогликана, специфичный для базальной мембраны (HSPG2) ⁽³⁾	52
Q00610	тяжелая цепь клатрина 1 (CLTC) ⁽²⁾	99
P68104	фактор элонгации 1-альфа 1 (EEF1A1) ⁽¹⁾	40
P13639	фактор элонгации 2 (EEF2) ⁽¹⁾	22
P04406	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) ⁽¹⁾	68
P11142	родственный белку теплового шока белок 71 кДа (HSPA8) ^{(1) (2)}	47
P07900	белок теплового шока HSP 90 α (HSP90AA1) ^{(1) (2)}	43
P08238	белок теплового шока HSP 90 β (HSP90AB1) ^{(1) (2)}	54
P14618	пируваткиназа PKM (PKM) ⁽¹⁾	35
P02786	белок 1 рецептора трансферрина (TFRC) ⁽³⁾	21
Q71U36	α_{1A} -цепь тубулина (TUBA1A) ⁽²⁾	46
P68363	α_{1B} -цепь тубулина (TUBA1B) ⁽²⁾	49
P07437	β -цепь тубулина (TUBB) ⁽²⁾	48
Q13885	β_{2A} -цепь тубулина (TUBB2A) ⁽²⁾	47
Q9BVA1	β_{2B} -цепь тубулина (TUBB2B) ⁽²⁾	47
Q13509	β_{3} -цепь тубулина (TUBB3) ⁽²⁾	27
P04350	β_{4A} -цепь тубулина (TUBB4A) ⁽²⁾	36
P68371	β_{4B} -цепь тубулина (TUBB4B) ⁽²⁾	45
Q9BUF5	β_{6} -цепь тубулина (TUBB6) ⁽²⁾	27

⁽¹⁾ Белки из числа 20 чаще всего встречающихся белков, обнаруженных в исследованиях EVs (база данных ExoCarta), ⁽²⁾ цитозольные белки, обнаруженные в EVs (по классификации MISEC 2018);

⁽³⁾ трансмембранные или заякоренные GPI белки, связанные с плазматической мембраной и/или эндосомами.

БИБЛИОГРАФИЯ

Arroyo V, Moreau R, Kamath PS, Jalan R, Ginès P, Nevens F, Fernández J, To U, García-Tsao G, Schnabl B. Acute-on-chronic liver failure in cirrhosis. Nat Rev Dis Primers. 2016 Jun 9, (2):16041.

Cameron K, Tan R, Schmidt-Heck W, Campos G, Lyall MJ, Wang Y, Lucendo-Villarin B, Szkolnicka D, Bates N, Kimber SJ, Hengstler JG, Godoy P, Forbes SJ, Hay DC. Recombinant Laminins Drive the Differentiation and Self-Organization of hESC-Derived Hepatocytes. Stem

Cell Reports. 2015 Dec 8, 5(6):1250-1262.

Carpenter SP, Lasker JM, Raucy JL. Expression, induction, and catalytic activity of the ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) in human fetal liver and hepatocytes. *Mol Pharmacol*. 1996, 49(2):260–268.

Chen S, Wang J, Ren H, Liu Y, Xiang C, Li C, Lu S, Shi Y, Deng H, Shi X. Hepatic spheroids derived from human induced pluripotent stem cells in bio-artificial liver rescue porcine acute liver failure. *Cell Research* (2019) 0:1-3; <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0261-5>.

Chinnici CM, Timoneri F, Amico G, Pietrosi G, Vizzini G, Spada M, Pagano D, Gridelli B, Conaldi PG. Characterization of Liver-Specific Functions of Human Fetal Hepatocytes in Culture. *Cell Transplant*. 2015, 24(6):1139–1153.

Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Li T, Maserati M, Lu SJ, Zdravkovic T, Ilic D, Genbacev O, Fisher S, Krtolica A, Lanza R. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell*. 2008 Feb 7, 2(2):113-7.

De Coppi P1, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*. 2007 Jan, 25(1):100-6.

Dellavalle A1, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, Innocenzi A, Galvez BG, Messina G, Morosetti R, Li S, Belicchi M, Peretti G, Chamberlain JS, Wright WE, Torrente Y, Ferrari S, Bianco P, Cossu G. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Mar, 9(3):255-67.

Dhawan A, Strom SC, Sokal E, Fox IJ. Human hepatocyte transplantation. *Methods Mol Biol*. 2010, 640:525-34.

Dhawan A, Chaijitraruch N, Fitzpatrick E, Bansal S, Filippi C, Lehec SC, Heaton ND, Kane P, Verma A, Hughes RD, Mitry RR. Alginate microencapsulated human hepatocytes for the treatment of acute liver failure in children. *J Hepatol*. 2020 May, 72(5):877-884.

D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci*. 2004 Jun 15, 117 (Pt 14):2971-81.

Glorioso JM, Mao SA, Rodysill B, Mounajjed T, Kremers WK, Elgilani F, Hickey RD, Haugaa H, Rose CF, Amiot B, Nyberg SL. Pivotal preclinical trial of the spheroid reservoir bioartificial liver. *J Hepatol*. 2015 Aug, 63(2):388-398.

González F, Boué S, Izpisua Belmonte JC. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nat Rev Genet*. 2011 Apr, 12(4):231-42.

Hansel MC, Gramignoli R, Skvorak KJ, Dorko K, Marongiu F, Blake W, Davila J, Strom

SC. The history and use of human hepatocytes for the treatment of liver diseases: the first 100 patients. *Curr Protoc Toxicol.* 2014 Nov 6, 62:14.12.1-23. Parallel derivation of isogenic human primed and naive induced pluripotent stem cells.

Jochheim A, Hillemann T, Kania G, Scharf J, Attaran M, Manns MP, Wobus AM, Ott M. Quantitative gene expression profiling reveals a fetal hepatic phenotype of murine ES-derived hepatocytes. *Int J Dev Biol.* 2004 Feb, 48(1):23-9.

Kilens S, Meistermann D, Moreno D, Chariou C, Gaignerie A, Reignier A, Lelièvre Y, Casanova M, Vallot C, Nedellec S, Flippe L, Firmin J, Song J, Charpentier E, Lammers J, Donnart A, Marec N, Deb W, Bihouée A, Le Caignec C, Pecqueur C, Redon R, Barrière P, Bourdon J, Pasque V, Soumillon M, Mikkelsen TS, Rougeulle C, Fréour T, David L; Milieu Intérieur Consortium. *Nat Commun.* 2018 Jan 24, 9(1):360. doi: 10.1038/s41467-017-02107-w.).

Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Müller HW, Zanjani E, Wernet P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med.* 2004 Jul 19, 200(2):123-35.

Larsen FS, Schmidt LE, Bernsmeier C, Rasmussen A, Isoniemi H, Patel VC, Triantafyllou E, Bernal W, Auzinger G, Shawcross D, Eefsen M, Bjerring PN, Clemmesen JO, Hockerstedt K, Frederiksen HJ, Hansen BA, Antoniadis CG, Wendon J. High-volume plasma exchange in patients with acute liver failure: An open randomised controlled trial. *J Hepatol.* 2016, 64(1):69-78.

Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol.* 2001 Jun, 187(3):265-76.

Narayanaswamy R. and Torchilin VP. Hydrogels and their applications in targeted drug delivery. *Molecules* 2019, 24, 603.

Ntai A, La Spada A, De Blasio P, Biunno I. Trehalose to cryopreserve human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 2018, 31:102-112.

Pareja E, Gómez-Lechón MJ, Tolosa L. Alternative Cell Sources to Adult Hepatocytes for Hepatic Cell Therapy. *Methods Mol Biol.* 2017, 1506:17-42.

Payne CM, Samuel K, Pryde A, King J, Brownstein D, Schrader J, Medine CN, Forbes SJ, Iredale JP, Newsome PN, Hay DC. Persistence of functional hepatocyte-like cells in immune-compromised mice. *Liver Int.* 2011 Feb, 31(2):254-62.

Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000 Jul, 50(1):27-46.

Pérez-Luna VH, González-Reynoso O. Encapsulation of Biological Agents in Hydrogels

for Therapeutic Applications. *Gels*. 2018 Jul 11, 4(3). pii: E61. doi: 10.3390/gels4030061.

Pietroli G, Vizzini G, Gerlach J, Chinnici C, Luca A, Amico G, D'Amato M, Conaldi PG, Li Petri S, Spada M, Tuzzolino F, Alio L, Schmelzer E, Gridelli B. Phases I-II matched case-control study of human fetal liver cell transplantation for treatment of chronic liver disease. *Cell Transplant*. 2015, 24(8):1627-38.

Rao MS, Khan AA, Parveen N, Habeeb MA, Habibullah CM, Pande G. Characterization of hepatic progenitors from human fetal liver during second trimester. *World J Gastroenterol*. 2008 Oct 7, 14(37):5730-7.

Roelandt P, Pauwelyn KA, Sancho-Bru P, Subramanian K, Bose B, Ordoas L, Vanuytsel K, Geraerts M, Firpo M, De Vos R, Fevery J, Nevens F, Hu W-S, Verfaillie CM. Human embryonic and rat adult stem cells with primitive endoderm-like phenotype can be fated to definitive endoderm, and finally hepatocyte-like cells. *PLoS One*. 2010, 5(8): e12101.

Sagi I, Chia G, Golan-Lev T, Peretz M, Weissbein U, Sui L, Sauer MV, Yanuka O, Egli D, Benvenisty N. Derivation and differentiation of haploid human embryonic stem cells. *Nature*. 2016 Apr 7, 532(7597):107-11.

Sampaioles M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, Mognol P, Thibaud JL, Galvez BG, Barthélémy I, Perani L, Mantero S, Guttinger M, Pansarasa O, Rinaldi C, Cusella De Angelis MG, Torrente Y, Bordignon C, Bottinelli R, Cossu G. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 2006 Nov 30, 444(7119):574-9.

Siller R, Greenhough S, Naumovska E, Sullivan GJ. Small-molecule-driven hepatocyte differentiation of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2015 May 12, 4(5):939-52.

Struecker B, Raschzok N, Sauer IM. Liver support strategies: cutting-edge technologies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Mar, 11(3):166-76.

Takayama K, Nagamoto Y, Mimura N, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, Hayakawa T, Kawabata K, Mizuguchi H. Long-term self-renewal of human ES/iPS-derived hepatoblast-like cells on human laminin 111-coated dishes. *Stem Cell Reports*. 2013 Oct 3, 1(4):322-35.

Takayama K, Akita N, Mimura N, Akahira R, Taniguchi Y, Ikeda M, Sakurai F, Ohara O, Morio T, Sekiguchi K, Mizuguchi H. Generation of safe and therapeutically effective human induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells for regenerative medicine. *Hepatol Commun*. 2017 Oct 12, 1(10):1058-1069.

Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Lehec SC, Hughes RD. Optimization of the cryopreservation and thawing protocol for human hepatocytes for use in cell transplantation. *Liver Transpl*. 2010 Feb, 16(2):229-37.

Tolosa L, Caron J, Hannoun Z, Antoni M, López S, Burks D, Castell JV, Weber A, Gomez-Lechon MJ, Dubart-Kupperschmitt A. Transplantation of hESC-derived hepatocytes

protects mice from liver injury. *Stem Cell Res Ther.* 2015 Dec 12, 6:246.

Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell.* 2010 Nov 5, 7(5):618-30.

Zheng JF, Liang LJ, Wu CX, Chen JS, Zhang ZS. Transplantation of fetal liver epithelial progenitor cells ameliorates experimental liver fibrosis in mice. *World J Gastroenterol.* 2006 Dec 7, 12(45):7292-8.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Популяция клеток, в частности выделенная популяция клеток, содержащая по меньшей мере 5% подобных стволовым клеткам печени, экспрессирующих маркер α -фетопrotein (AFP⁺) и не экспрессирующих маркер альбумин (ALB⁻), либо ее экстракт.

2. Популяция клеток по п. 1, в которой подобные стволовым клетки печени дополнительно экспрессируют маркер – фактор транскрипции T-Box 3 (TBX3⁺) и/или маркер – ядерный фактор гепатоцитов 4 α (HNF4A⁺), предпочтительно и фактор транскрипции T-Box 3 (TBX3⁺), и ядерный фактор гепатоцитов 4 α (HNF4A⁺).

3. Популяция клеток по п. 1 или 2, в которой подобные стволовым клетки печени являются криоконсервированными.

4. Частица, в частности сфероидная, содержащая популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, либо ее экстракт по любому из пп. 1-3.

5. Суспензия, содержащая популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, либо ее экстракт по любому из пп. 1-3.

6. Фармацевтическая композиция, содержащая (i) популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, либо ее экстракт по любому из пп. 1-3, и/или по меньшей мере одну частицу по п. 4 и/или суспензию по п. 5, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

7. Медицинское устройство, содержащее (i) популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, либо ее экстракт по любому из пп. 1-3, и/или по меньшей мере одну частицу по п. 4 и/или суспензию по п. 5 и/или фармацевтическую композицию по п. 6.

8. Модель на животных, содержащих гетерологичную популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, либо ее экстракт по любому из пп. 1-3.

9. Подобные стволовым клетки печени либо их экстракт, как определено в любом из пп. 1-3, или популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, либо ее экстракт по любому из пп. 1-3, или частица по п. 4 или суспензия по п. 5 или фармацевтическая композиция по п. 6 для применения в качестве лекарственного средства.

10. Подобные стволовым клетки печени либо их экстракт, как определено в любом из пп. 1-3, или популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, либо ее экстракт по любому из пп. 1-3, или частица по п. 4 или суспензия по п. 5 или фармацевтическая композиция по п. 6 или медицинское устройство по п. 7 для применения при профилактике и/или лечении фульминантного заболевания печени.

11. Подобные стволовым клетки печени либо их экстракт, как определено в любом

из пп. 1-3, или популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, либо ее экстракт по любому из пп. 1-3, или частица по п. 4 или суспензия по п. 5 или фармацевтическая композиция по п. 6 или медицинское устройство по п.7 для применения по п. 10, при этом фульминантным заболеванием печени является острая печеночная недостаточность (ALF) либо острая печеночная недостаточность на фоне хронической (ACLF).

12. Подобные стволовым клетки печени либо их экстракт, как определено в любом из пп. 1-3, или популяция клеток, содержащая подобные стволовым клетки печени, либо ее экстракт по любому из пп. 1-3, или частица по п. 4 или суспензия по п. 5 или фармацевтическая композиция по п. 6 или медицинское устройство по п.7 для применения по п. 11, при этом ACLF ассоциирована с заболеванием печени, выбранным из группы, состоящей из неалкогольного стеатогепатита (NASH); алкогольного гепатита; вирусного гепатита; криптогенных заболеваний печени; злокачественных заболеваний печени, таких как гепатоцеллюлярная карцинома и холангиокарцинома; аутоиммунного гепатита; сосудистых заболеваний печени типа синдрома Бадда-Киари; холестатических заболеваний печени; и наследственных метаболических заболеваний печени типа болезни Вильсона и нарушений цикла мочевины.

13. Применение криоконсервированной популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, либо ее экстракта по любому из пп. 1-3 для получения частицы по п. 1.

14. Способ скрининга лекарственного средства *in vitro*, который включает стадии:

а) получение по меньшей мере одной подобной стволовым клетки печени либо ее экстракта, как определено в любом из пп. 1-3, и/или популяции клеток, содержащей подобные стволовым клетки печени, либо ее экстракта по любому из пп. 1-3, и/или частицы по п. 4 и/или суспензии по п. 5;

б) контактирование указанной по меньшей мере одной клетки либо ее экстракта и/или указанной популяции клеток либо ее экстракта и/или указанной частицы и/или указанной суспензии со стадии а) с лекарственным средством-кандидатом;

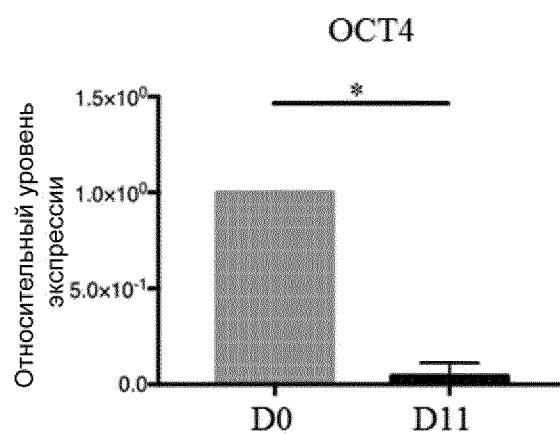
с) измерение одного или нескольких биологических параметров и необязательно сравнение данного одного или нескольких биологических параметров с одним или несколькими контрольными параметрами;

д) определение того, представляет ли лекарственное средство-кандидат терапевтический и/или диагностический интерес.

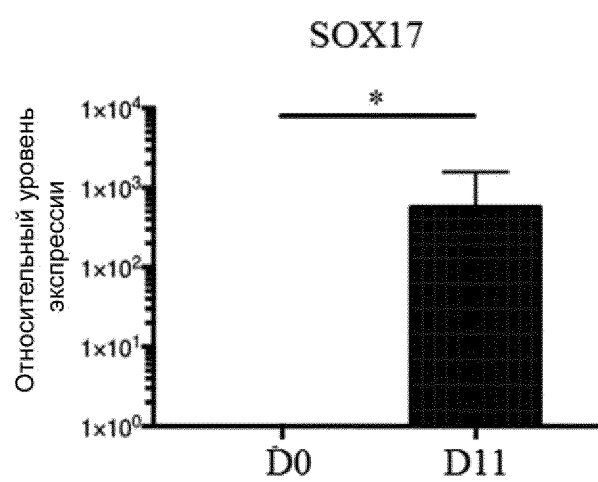
15. Набор для лечения и/или профилактики фульминантного заболевания печени, который включает:

а) подобные стволовым клетки печени либо их экстракт, как определено в любом из пп. 1-3, или популяцию клеток, содержащую подобные стволовым клетки печени, либо ее экстракт по любому из пп. 1-3, или частицу по п. 4 или суспензию по п. 5 или фармацевтическую композицию по п. 7; и

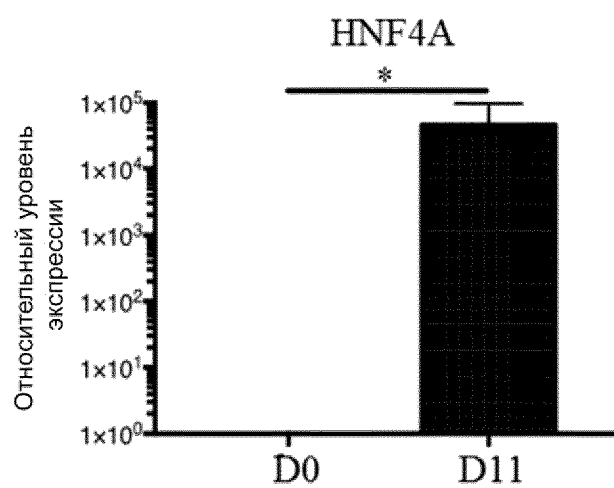
б) средство для введения указанных клеток либо их экстракта, популяции или ее экстракта либо частицы, суспензии или фармацевтической композиции.



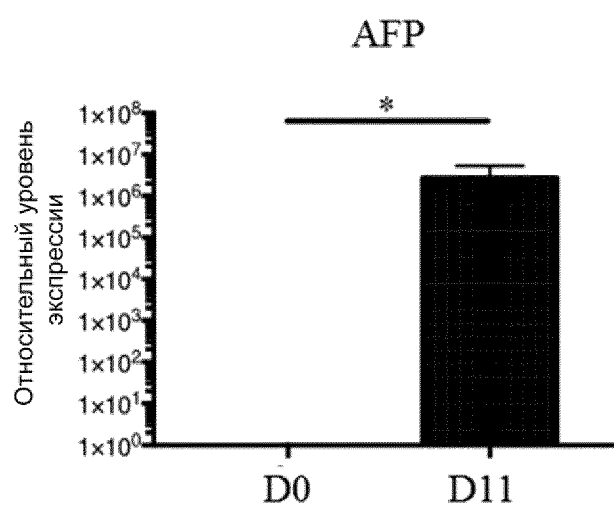
Фиг. 1А



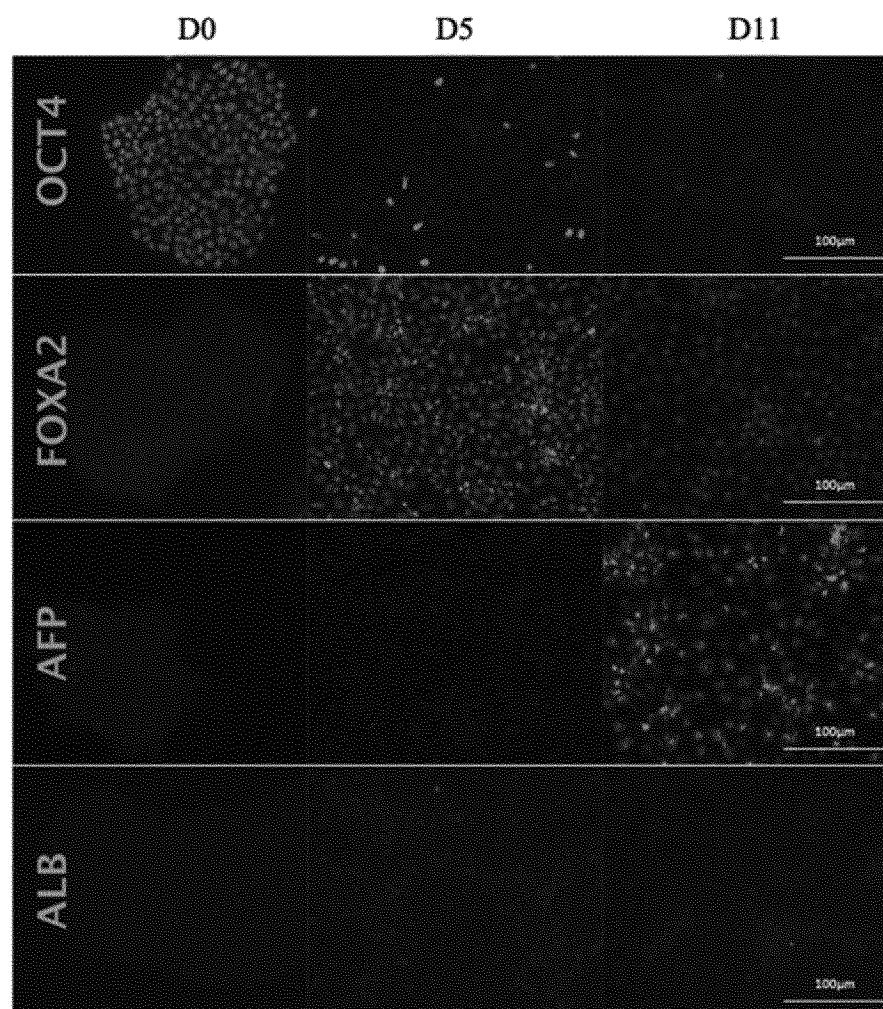
Фиг. 1В



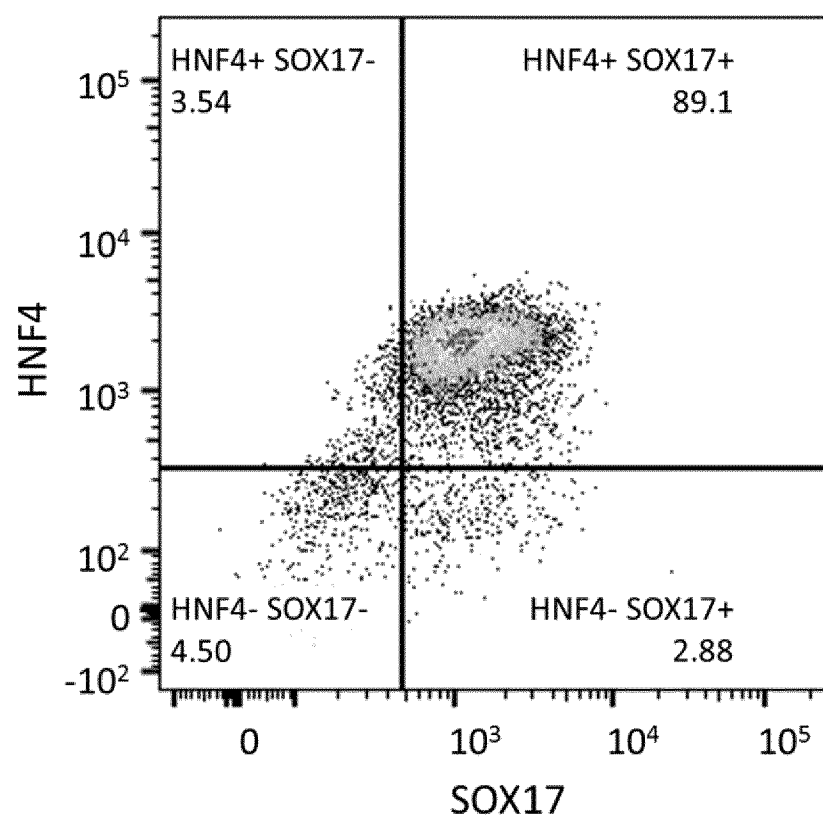
Фиг. 1С



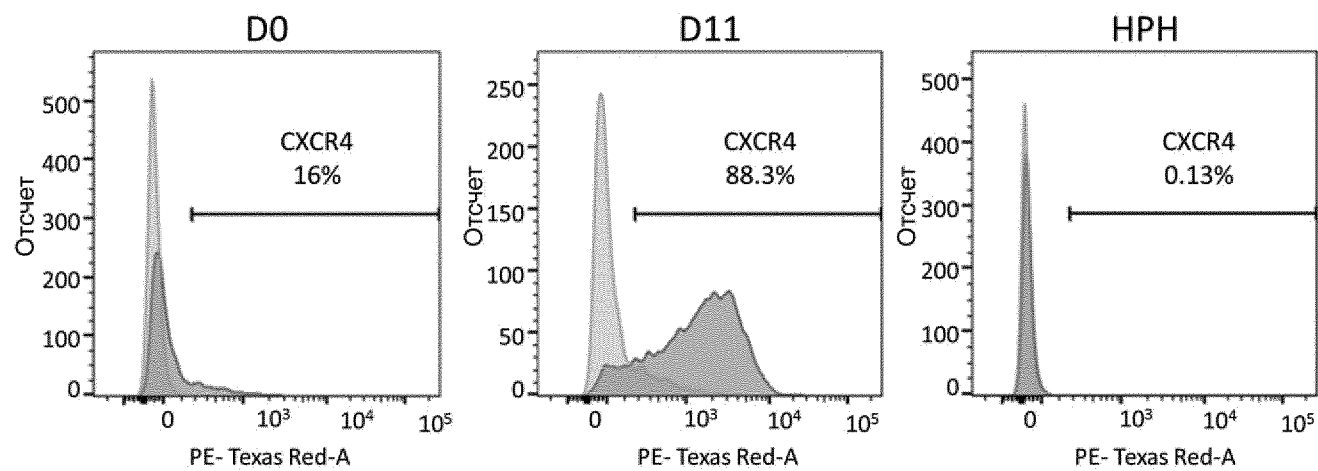
Фиг. 1D



Фиг. 2А

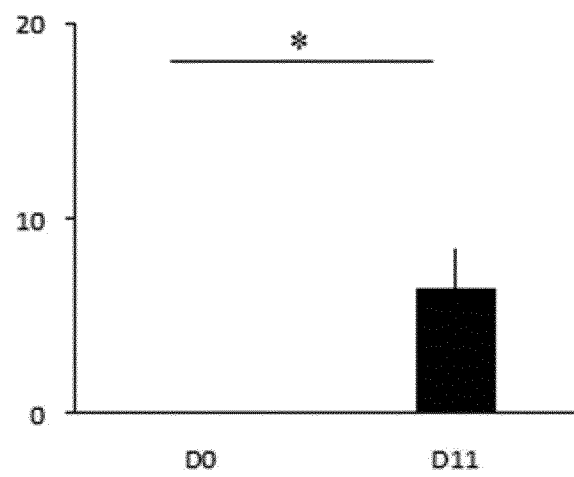


Фиг. 2В

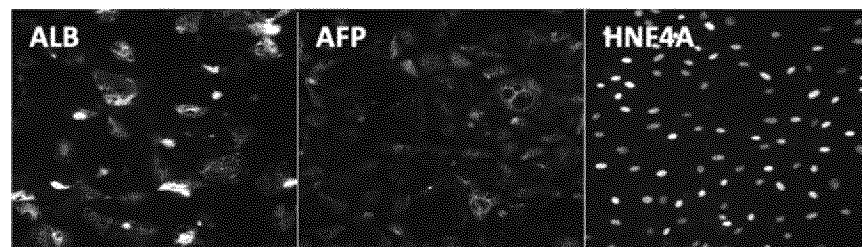


Фиг. 2С

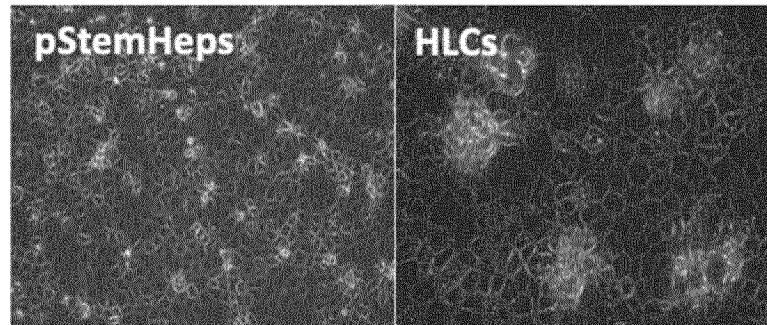
AFP в мкг на 1 миллион клеток в день



Фиг. 2D



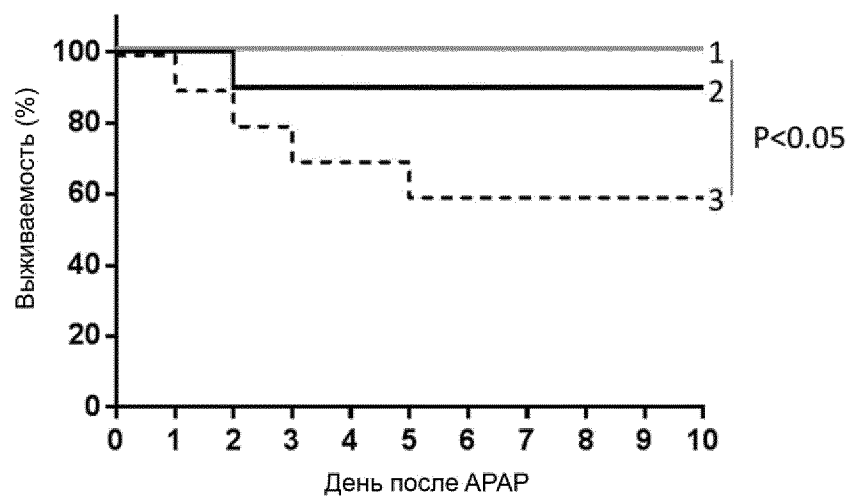
Фиг. 3A



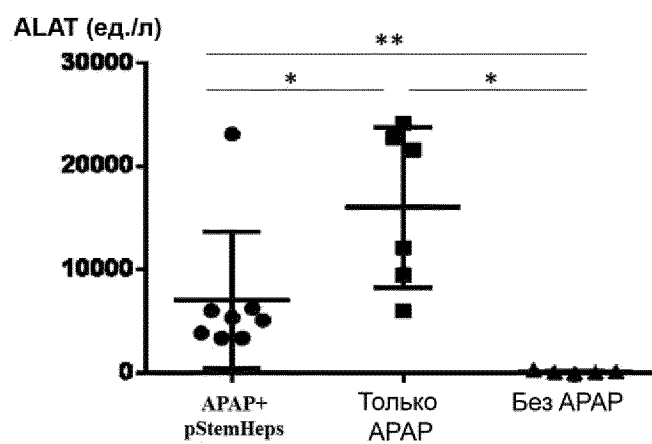
Фиг. 3В



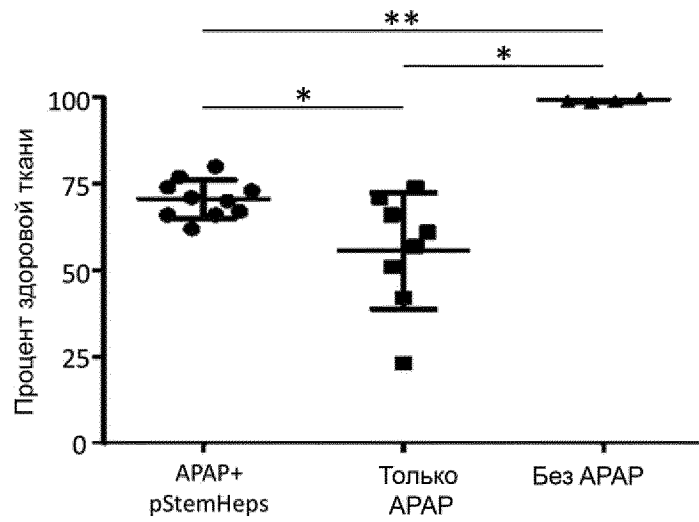
Фиг. 3С



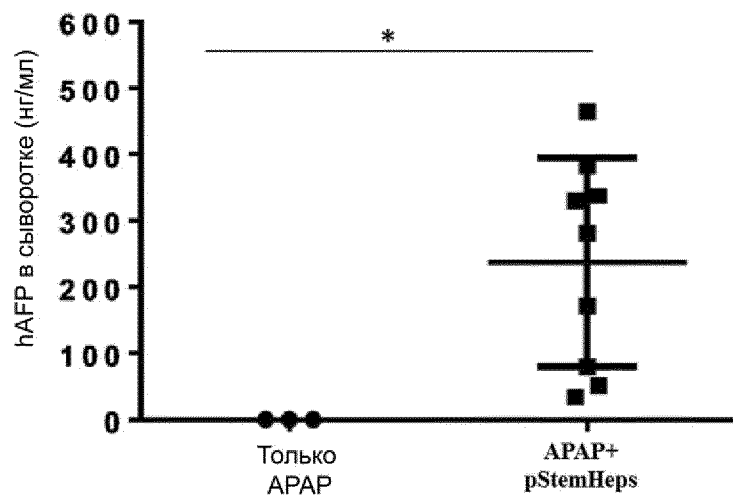
Фиг. 4



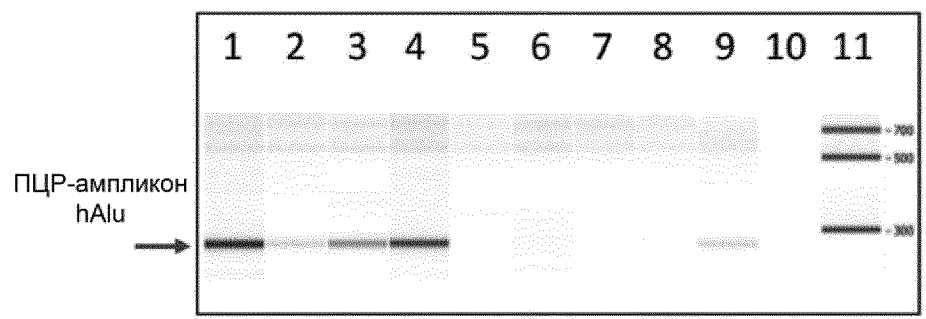
Фиг. 5



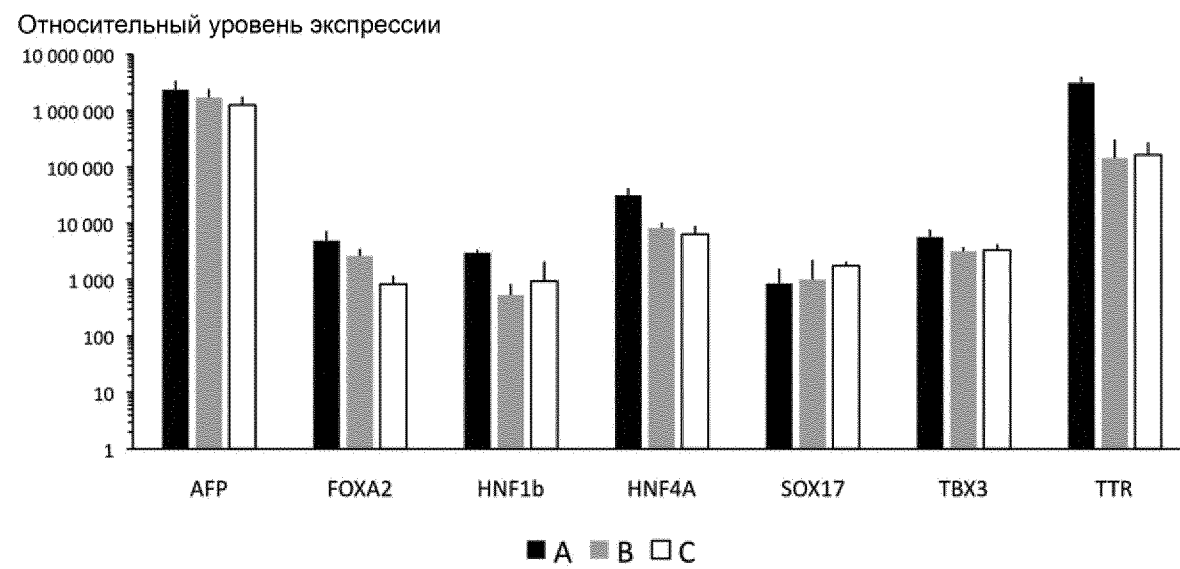
Фиг. 6



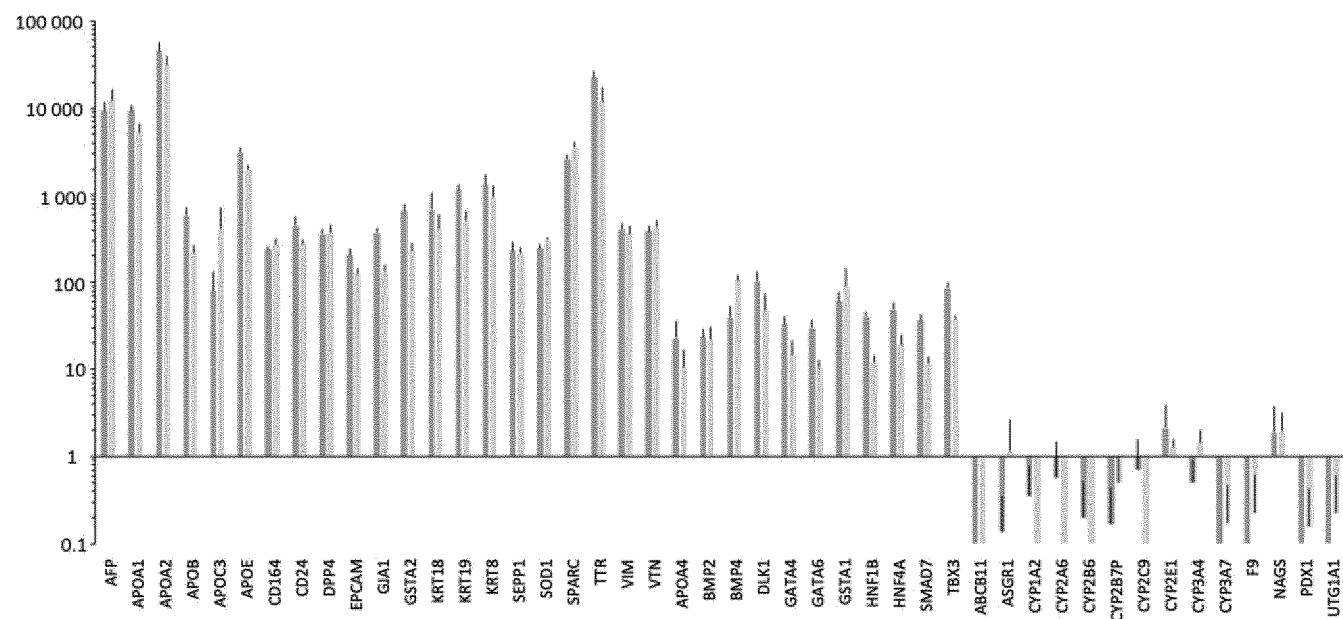
Фиг. 7



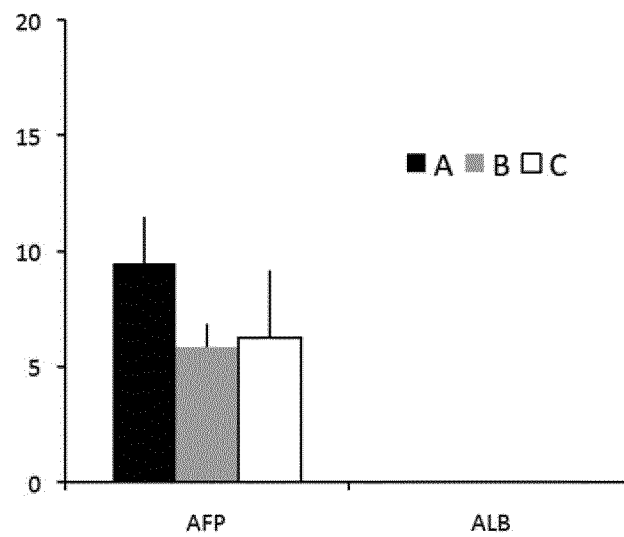
Фиг. 8



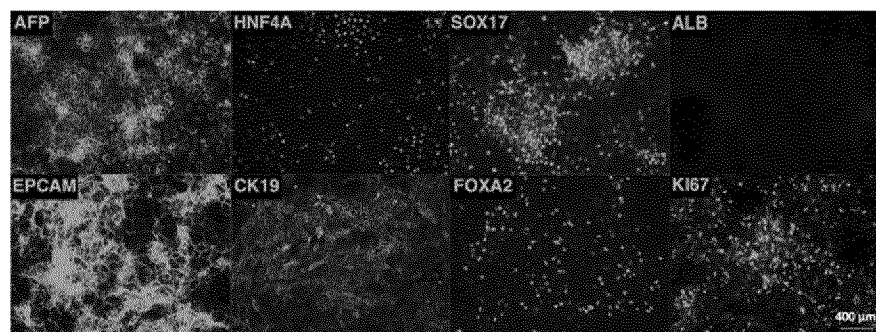
Фиг. 9



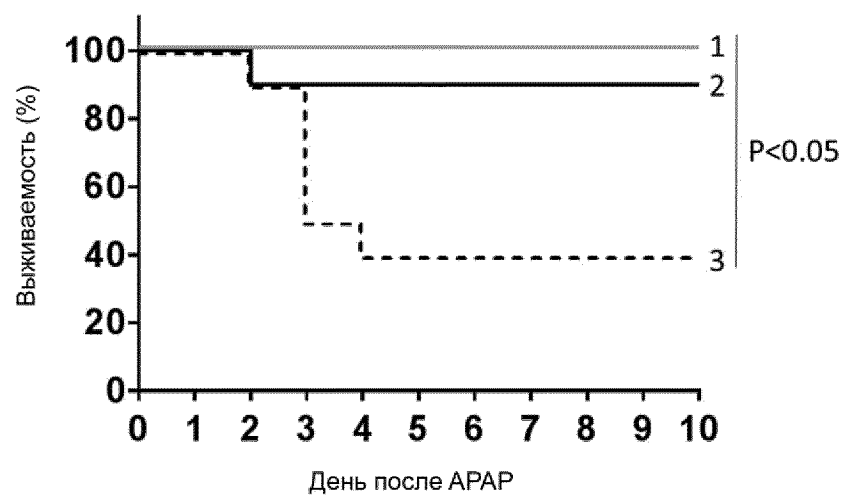
Фиг. 10



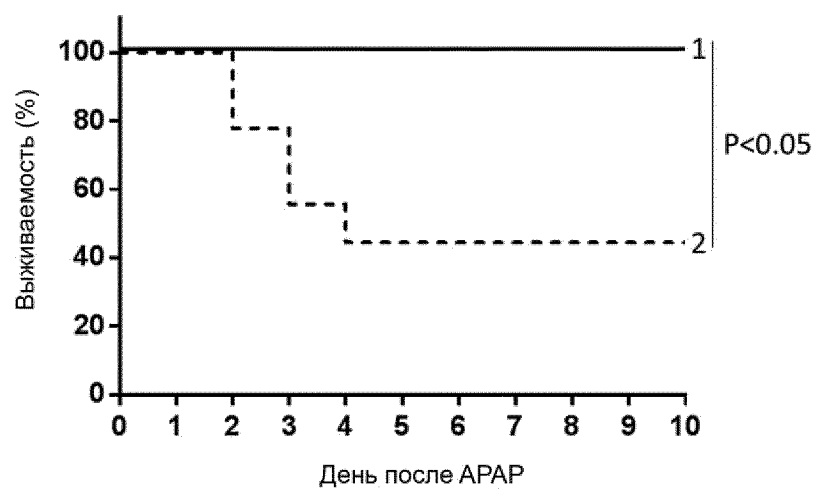
Фиг. 11А



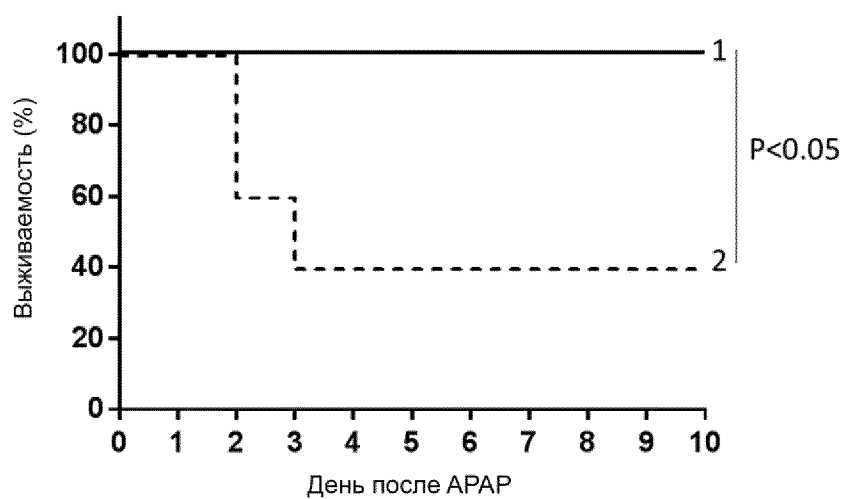
Фиг. 11В



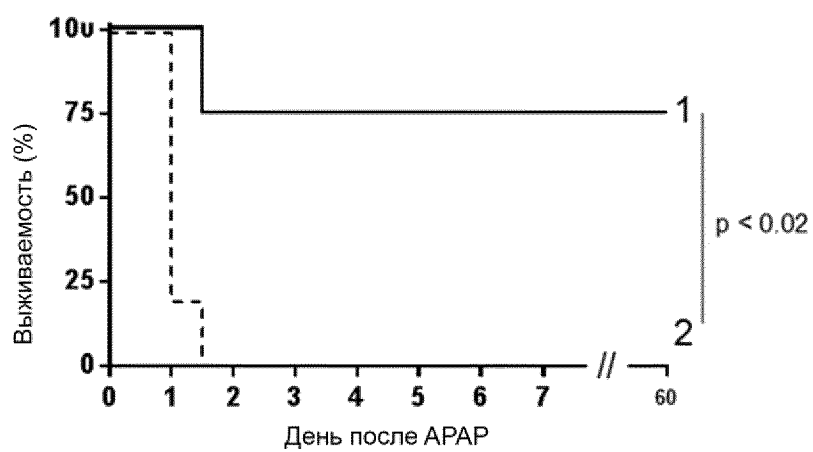
Фиг. 12



Фиг. 13А

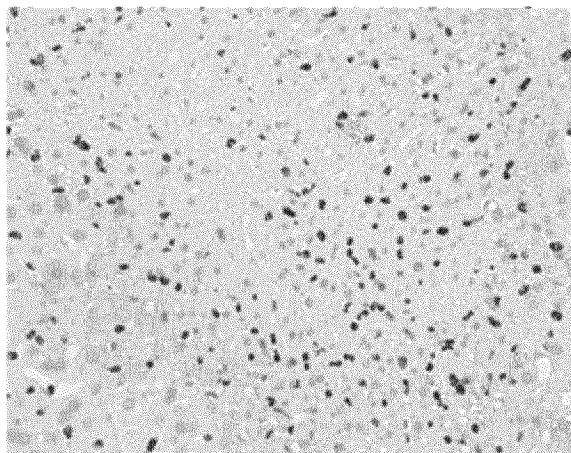


Фиг. 13В



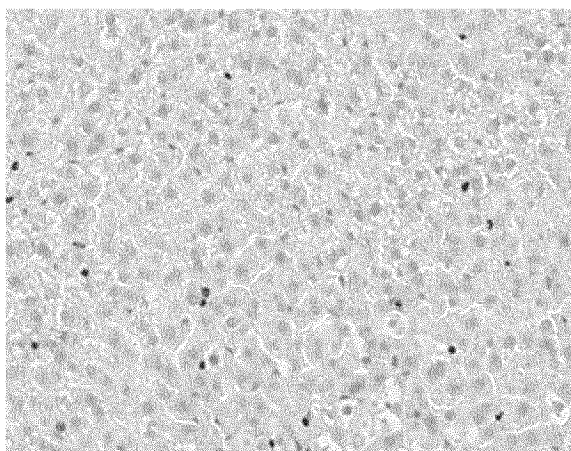
Фиг. 14А

АРАР + клетки

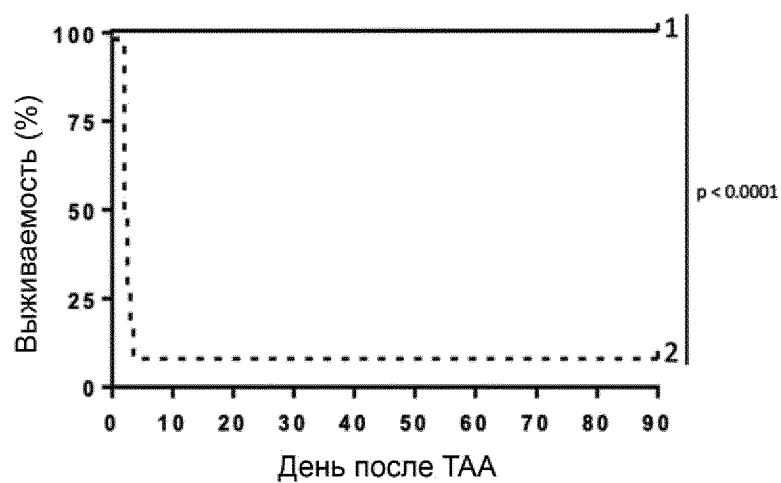


Фиг. 14В

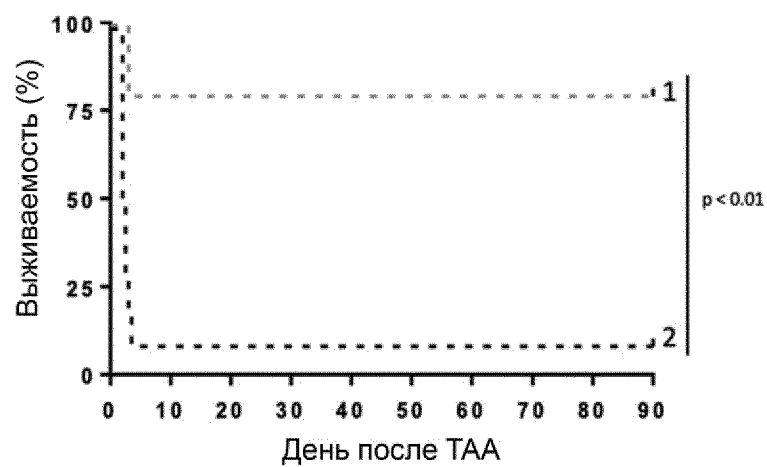
Контроль АРАР



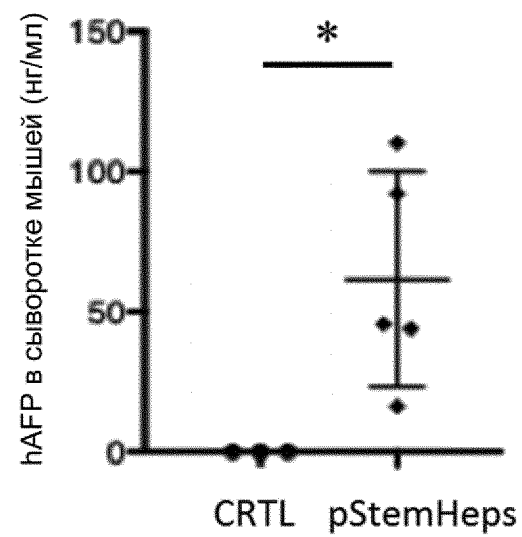
Фиг. 14С



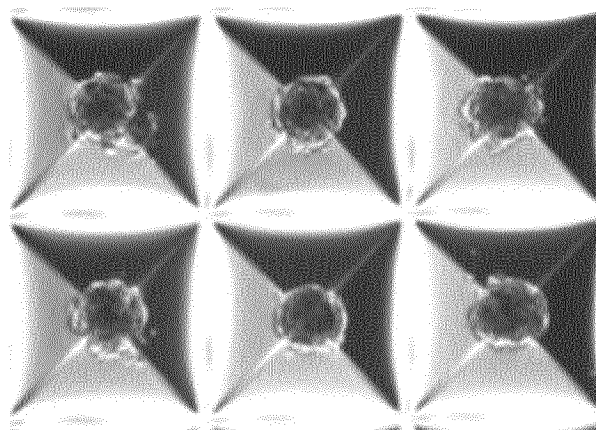
Фиг. 15А



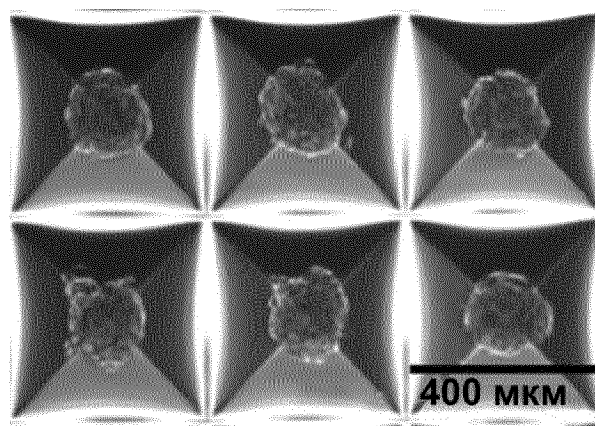
Фиг. 15В



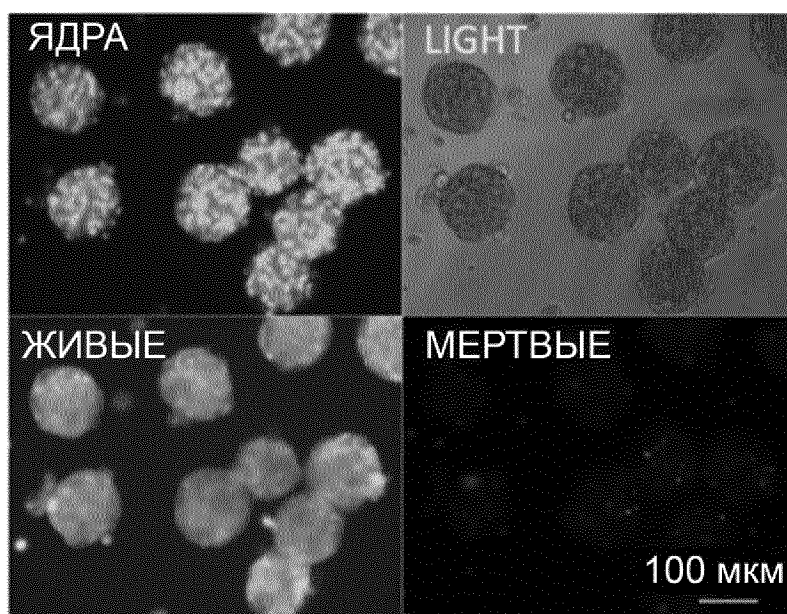
Фиг. 16



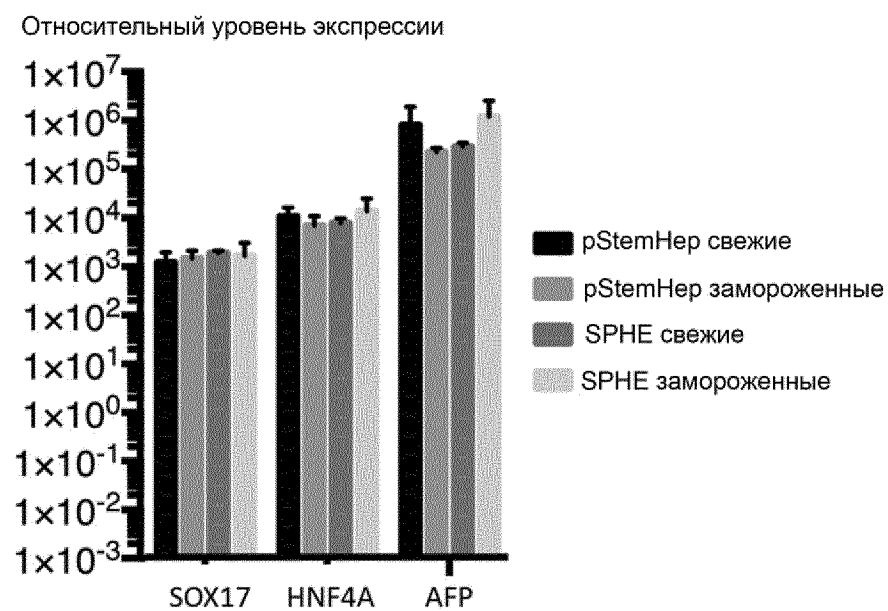
Фиг. 17А



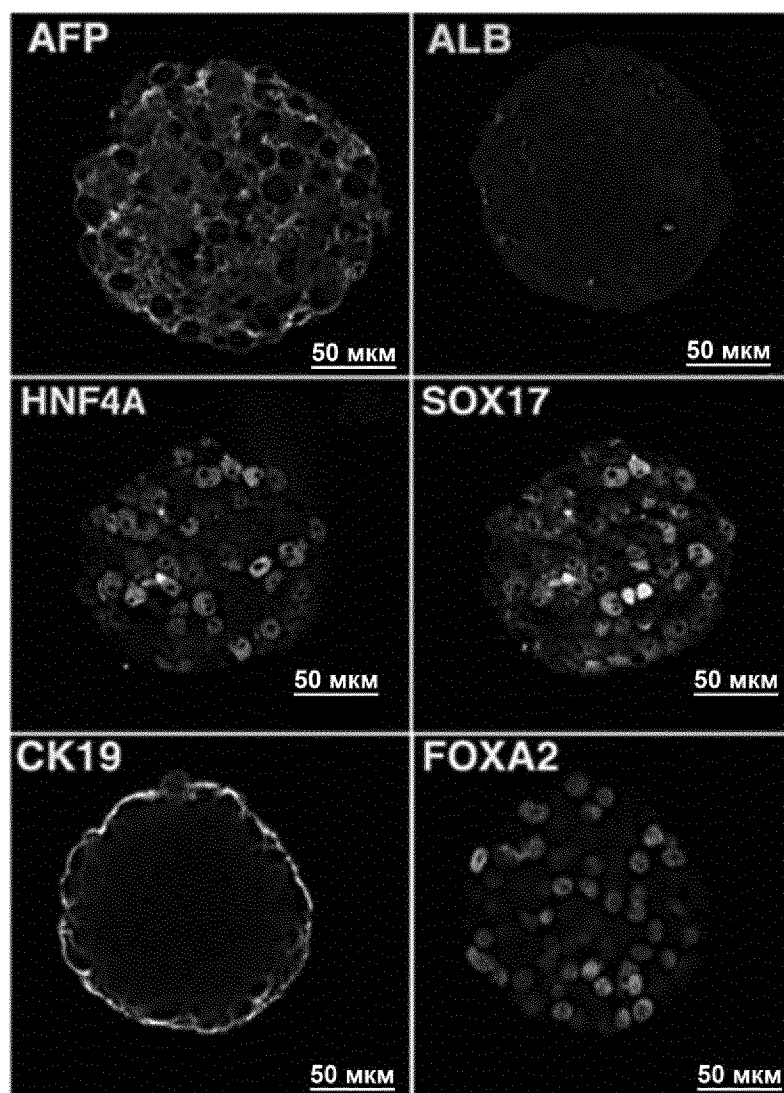
Фиг. 17В



Фиг. 17С

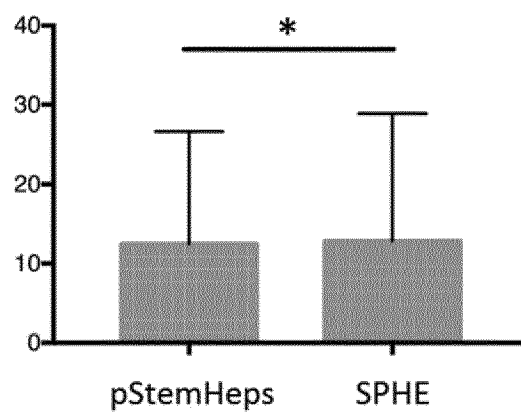


Фиг. 18



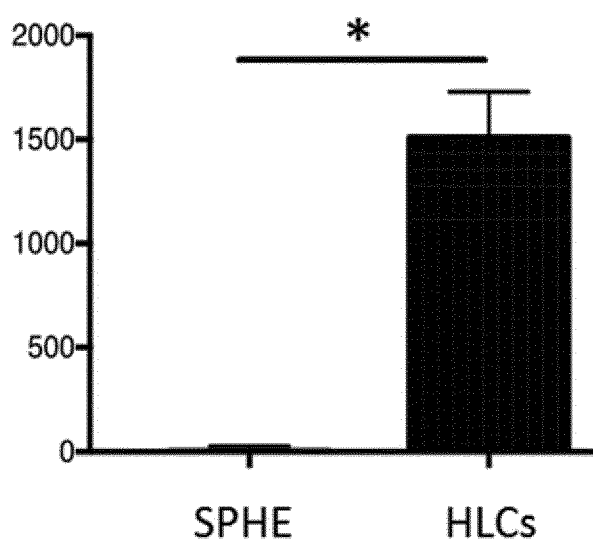
Фиг. 19

hAFP в мкг на 1 миллион клеток в день

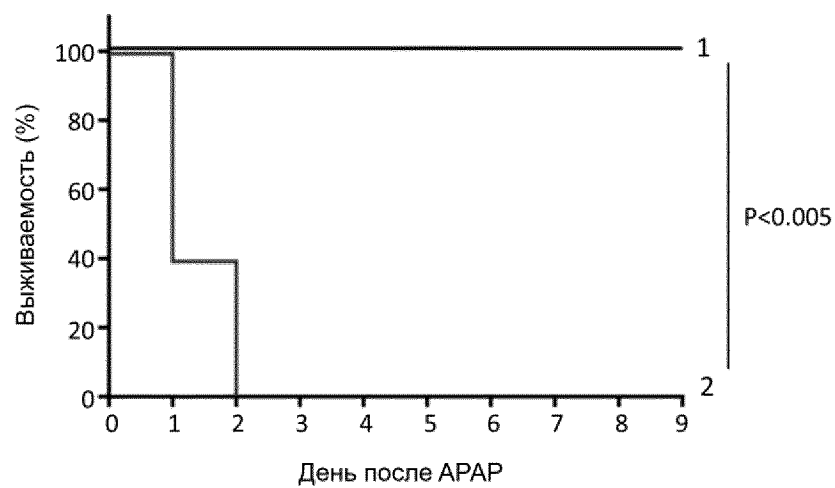


Фиг. 20А

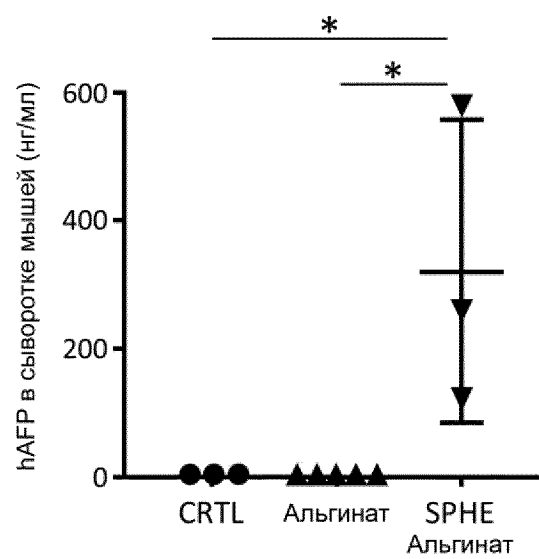
hALB в мкг на 1 миллион клеток в день



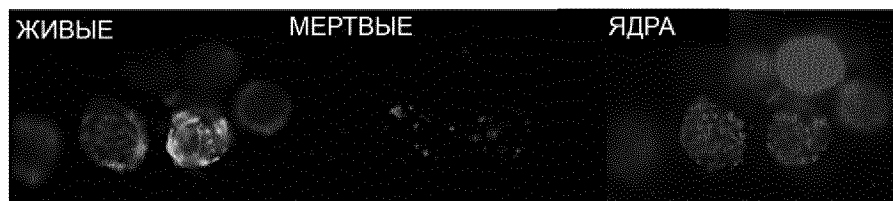
Фиг. 20В



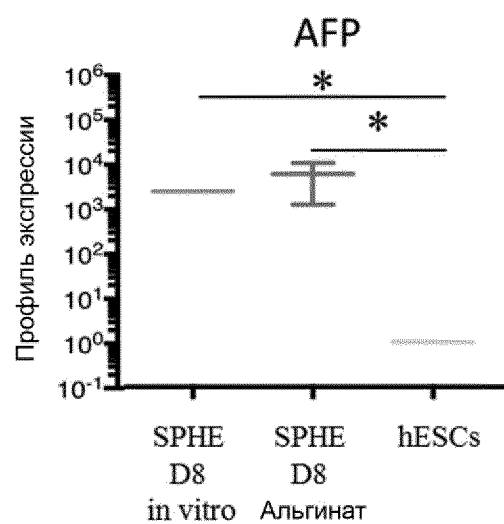
Фиг. 21



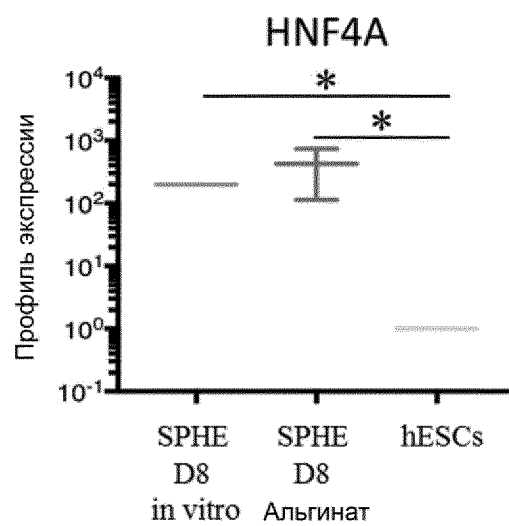
Фиг. 22



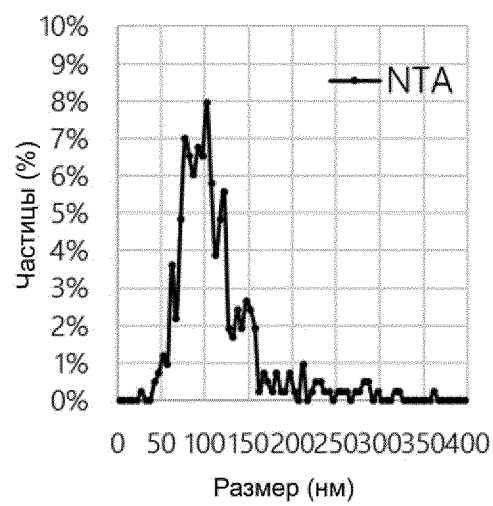
Фиг. 23



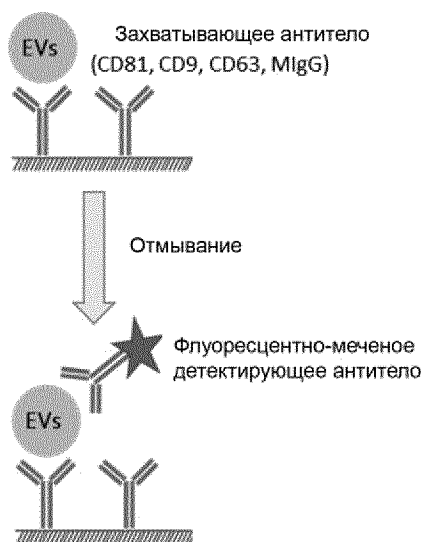
Фиг. 24А



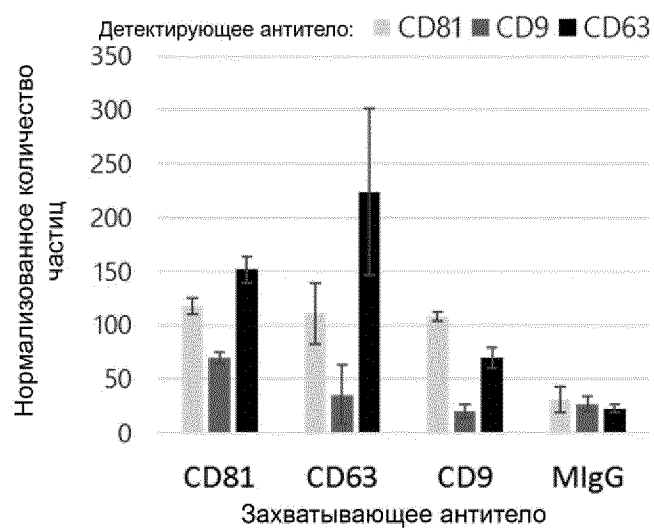
Фиг. 24В



Фиг. 25

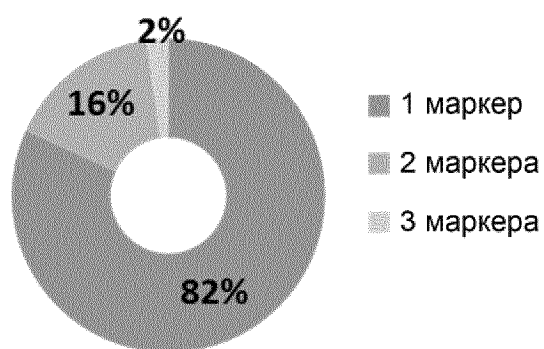


Фиг. 26А

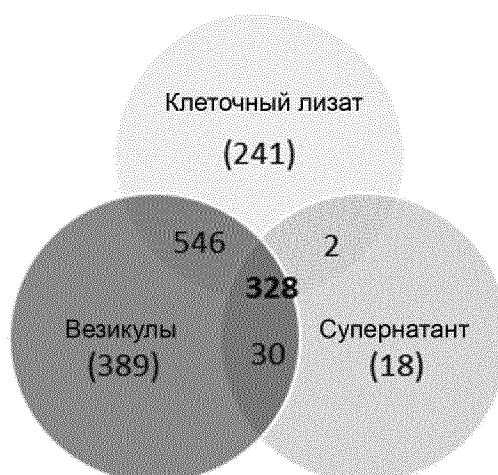


Фиг. 26В

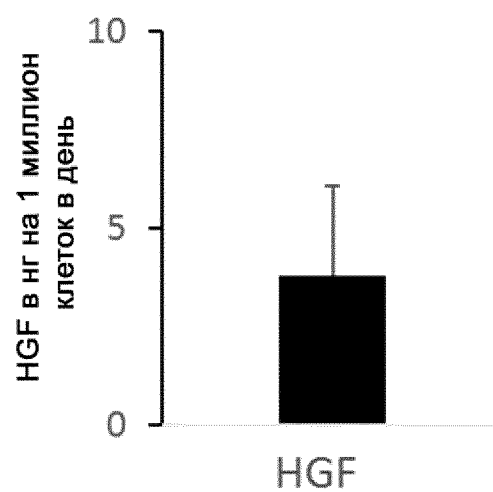
Глобальное распределение



Фиг. 26С



Фиг. 27



Фиг. 28