(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202291344 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.31

(22) Дата подачи заявки
2012.11.02

(51) Int. Cl. ***C12N 5/0793*** (2006.01)
C12N 5/074 (2006.01)
A61K 35/30 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)

(54) ДОФАМИНИНОВЫЕ (ДА) НЕЙРОНЫ СРЕДНЕГО МОЗГА ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

(31) **61/555,828**
(32) **2011.11.04**
(33) **US**
(62) **201490796; 2012.11.02**

(71) Заявитель:
МЕМОРИАЛ СЛОУН-КЕТТЕРИНГ КЭНСЭ СЕНТР (US)

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

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

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

202291344 A1

202291344 A1

ДОФАМИНОВЫЕ (ДА) НЕЙРОНЫ СРЕДНЕГО МОЗГА ДЛЯ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

ЛИЦЕНЗИОННЫЕ ПРАВА ГОСУДАРСТВА

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

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

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

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Популяции клеток, сохраняющие способность дифференцироваться в многочисленные специализированные типы клеток можно применять для разработки большого числа дифференцированных линиеспецифическим образом популяций клеток. Эти популяции клеток, которые сохраняют способность к дальнейшей дифференцировке в специализированные клетки, содержат плюрипотентные клетки. Плюрипотентные клетки могут происходить из эмбриональных и/или неэмбриональных стволовых клеток.

Предполагается, что эти популяции линиеспецифически дифференцированных клеток найдут применения в заместительной клеточной терапии для пациентов с заболеваниями, причиной которых является потеря функции определенной популяции клеток. Помимо прямого терапевтического значения, линиеспецифически дифференцированные клетки также представляют собой ценные исследовательские инструменты для различных целей, включая скрининговые *in vitro* анализы для идентификации и верификации, а также тесты для исследования функций или для исследования доставки терапевтических молекул для лечения заболеваний, связанных с определенными линиями клеток.

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

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

Набор, содержащий первый ингибитор передачи сигнала, второй ингибитор передачи сигнала и третий ингибитор передачи сигнала, где указанный первый ингибитор способен снижать передачу сигнала трансформирующего фактора роста бета (TGFβ, ТФР-бета)/Нодаль-активина, указанный второй ингибитор способен снижать передачу сигнала SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic), и указанный третий ингибитор способен снижать передачу сигнала киназы гликогенсинтазы 3-бета (GSK3β) для активации Wnt(wingless). В одном варианте реализации указанный первый ингибитор представляет собой LDN-193189. В других вариантах реализации указанный первый ингибитор выбран из группы, состоящей из LDN-193189, его производных и их смесей. В одном варианте

реализации указанный второй ингибитор представляет собой SB431542. В других вариантах реализации указанный второй ингибитор выбран из группы, состоящей из SB431542, его производных и их смесей. В одном варианте реализации указанный третий ингибитор представляет собой CHIR99021. В других вариантах реализации указанный третий ингибитор выбран из группы, состоящей из CHIR99021, его производных и их смесей. В одном варианте реализации указанный набор дополнительно содержит активатор передачи сигнала белка Sonic hedgehog (SHH) и активатор передачи сигнала семейства рецептора фактора роста фибробластов (FGF,ФРФ) 8. В одном варианте реализации указанный набор дополнительно содержит нейротрофический фактор мозга (BDNF), аскорбиновую кислоту (АК), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии, дибутирил-цАМФ и трансформирующий фактор роста типа ß3. В одном варианте реализации указанный набор дополнительно содержит антитела, выбранные из группы, состоящей из антител к тирозингидроксилазе (TH), антитела к белку forkhead box A2 (FOXA2)и антитело к LIM и гомеобокс-содержащемк фактору транскрипции 1, альфа (LMX1A). В одном варианте реализации указанный набор дополнительно содержит клетку, выбранную из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки и модифицированной клетки. В одном варианте реализации указанный набор дополнительно содержит инструкции по обеспечению дифференцировки клеток-предшественников и FOXA2/LMX1A+ дофаминовых (ДА) нейронов среднего мозга. В одном варианте реализации указанный набор дополнительно содержит инструкции по получению клетки от пациента, больного болезнью Паркинсона (БП).

Композиция, содержащая популяцию клеток в контакте с первым ингибитором передачи сигнала и вторым ингибитором передачи сигнала, где больше 40% указанной популяции клеток положительно по белку forkhead box A2 (FOXA2), где указанная популяция клеток была ранее приведена в контакт с первым ингибитором передачи сигнала, третьим ингибитором передачи сигнала и активатором передачи сигнала белка Sonic hedgehog (SHH), причем указанный первый ингибитор способен снижать передачу сигнала трансформирующего фактора роста бета (TGFβ)/Активин-нодаль, указанный второй ингибитор способен снижать передачу сигнала киназы гликогенсинтазы 3-бета (GSK3β) для активации передачи сигнала Wnt(wingless), и указанный третий ингибитор способен снижать

передачу сигнала SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic). В одном варианте реализации указанный первый ингибитор представляет собой низкомолекулярное соединение, выбранное из группы, состоящей из LDN-193189, его производных и их смесей. В одном варианте реализации указанный второй ингибитор выбран из группы, состоящей из CHIR99021 и его производных. В одном варианте реализации указанный третий ингибитор выбран из группы, состоящей из SB431542, его производных и их смесей. В одном варианте реализации указанный активатор передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) выбран из группы, состоящей из Низкомолекулярного агониста рецептора Smoothened (SMO) и Sonic hedgehog (SHH) C25II, причем указанный агонист представляет собой пурморфамин. В некоторых вариантах реализации указанную популяции клеток дополнительно предварительно приводили в контакт с фактором роста фибробластов 8 (FGF8). В одном варианте реализации указанное большинство клеток, составляющих указанную популяцию являются белок forkhead box A2 $(FOXA2)^+$, LIM + гомеобокс-содержащий фактор транскрипции 1, альфа $(LMX1A)^+$, *NGN2*+ и *DDC*+ клетками-предшественниками вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанная популяция клеток выбрана из группы, состоящей из клеток грызуна, клеток приматов и клеток человека. В одном варианте реализации указанные клетки получены из клеток пациента с болезнью Паркинсона (БП). В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 50% положительна по белку forkhead box A2 (FOXA2). В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 60% положительна по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 70% положительна по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 80% положительна по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 90% положительна по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 95% до 100% положительна по белку forkhead box A2.

Композиция, содержащая in vitro популяцию клеток, где большинство клеток, составляющих указанную популяцию клеток, являются тирозингидроксилаза $(TH)^+$, белок forkhead box A2 $(FOXA2)^+$, LIM + гомеобокс-содержащий фактор транскрипции 1, альфа $(LMX1A)^+$ дофаминовыми (ДА) нейронами вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанные более 40% указанных дофаминовых (ДА) нейронов

вентральной пластинки среднего мозга положительны по тирозингидроксилазе (TH+). В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 50% положительна по тирозингидроксилазе. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 60% положительна по тирозингидроксилазе. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 70% положительна по тирозингидроксилазе. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 80% положительна по тирозингидроксилазе. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 90% положительна по тирозингидроксилазе. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 95% до 100% положительна по тирозингидроксилазе. В некоторых вариантах реализации указанная популяция клеток содержит большей частью дофаминовые (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейроны среднего мозга. В одном варианте реализации указанные дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга положительны по маркерам, выбранным из группы, состоящей из: ядерного рецептора NURR1 (NR4A2), Нейрон-специфичного бета-тубулина класса III (Tuj1), фактора 3 семейства трилистника (TTF3), гомеобоксного белка 3, содержащего домен, подобный спаренному и гомеобок белка 3 (PITX3), комплекса achaete-scute(ASCL), раннего фактора 1 B-клеток(EBF-1), раннего факторе 3 B-клеток (EBF-3) и транстиретина (TTR). В одном варианте реализации указанная популяция FOXA2/LMX1A+ дофаминовых (ДА) рецепторов среднего мозга положительна по соединению, выбранному из группы, состоящей из ДА, 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (DOPAC) и гомованилиновой кислоты (HVA). В одном варианте реализации указанный маркер выбран из группы, состоящей из белка и нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации указанная популяция FOXA2/LMX1A+ дофаминовых (ДА) рецепторов среднего мозга способна приживаться *in vivo* у пациента, выбранного из группы, состоящей из пациента с болезнью Паркинсона (БП). В одном варианте реализации указанные дофаминовые (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейроны среднего мозга способны приживаться in vivo и выполнять функцию дофаминовых (ДА) нейронов.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую популяцию клеток в контакте с LDN-193189 и CHIR99021, где больше 40% указанной популяции клеток положительно по белку forkhead box A2 (FOXA2), и где указанная популяция клеток была ранее приведена в контакт с LDN-193189, SB431542,

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

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ индукции направленной дифференцировки клеток в популяцию клеток-предшественником вентральной пластинки среднего мозга, включающий a) обеспечение: i) популяции клеток, причем указанная популяция клеток выбрана из группы, состоящей из неэмбриональной стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, индуцированной неэмбриональной плюрипотентной клетки и модифицированной плюрипотентной клетки; и ii) первого ингибитора передачи сигнала, второго ингибитора передачи сигнала, активатора передачи сигнала белка Sonic hedgehog (SHH) и третьего ингибитора передачи сигнала, где указанный первый ингибитор способен снижать передачу сигнала трансформирующего фактора роста бета (TGFβ)/активин-нодаль, указанный второй ингибитор способен снижать передачу сигнала SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic), и указанный третий ингибитор способен снижать передачу сигнала киназы гликогенсинтазы 3-бета (GSK3β) для активации передачи сигнала Wnt(wingless); b) осуществление контакта указанной популяции клеток с

указанным первым и указанным вторым ингибитором, c) после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным первым и указанным вторым ингибитором далее приведение в контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) в условиях для дифференцировки популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга; и) после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) далее приведение в контакт указанных клеток с указанным третьим ингибитором для дифференцировки указанной популяции клеток в популяцию клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации казанный контакт с указанным первым и указанным вторым ингбитором осуществляют в условиях, допускающих возможность получения указанной дифференцированной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации казанный контакт с указанным первым и указанным вторым ингибитором осуществляют в течение 1 часа после посадки клеток *in vitro*. В одном варианте реализации казанный контакт с указанным первым указанным вторым ингибитором осуществляют в течение 48 часов после посадки клеток *in vitro*. В одном варианте реализации казанный контакт с указанным первым и указанным вторым ингибитором осуществляют в течение 62 часов после высевание клеток *in vitro*. В одном варианте реализации указанный контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) осуществляют в условиях, допускающих возможность получения указанной дифференцированной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанный контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) осуществляют через по меньшей мере 24 часа и до 36 часов после осуществления контакта указанной популяции клеток с указанным первым и указанный вторым ингибитором. В одном варианте реализации указанный контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) составляет до 144 часов. В одном варианте реализации указанный контакт указанных клеток с указанным третьим ингибитором осуществляют в условиях, допускающих возможность получения указанной дифференцированной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга среднего мозга. В одном варианте реализации указанный контакт указанных клеток с указанным третьим ингибитором осуществляют через по меньшей мере 24 часа и до 36 часов

после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH). В одном варианте реализации указанный контакт указанных клеток с указанным третьим ингибитором составляет до 192 часов. В одном варианте реализации указанная популяция клеток дифференцируется в указанные клетки-предшественники вентральной пластинки среднего мозга к по меньшей мере 11 дню после приведения к контакт указанных клеток с указанным первым и указанным указанный вторым ингибитором. В одном варианте реализации указанный первый ингибитор представляет собой SB431542. В одном варианте реализации указанный второй ингибитор представляет собой LDN-193189. В одном варианте реализации указанный третий ингибитор представляет собой CHIR99021. В одном варианте реализации указанный активатор передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) выбран из группы, состоящей из Sonic hedgehog (SHH) C25II и пурморфамина. В одном варианте реализации в указанном способе дополнительно обеспечивают фактор роста фибробластов 8 (FGF8) и приводят в контакт указанную популяцию клеток с указанным FGF8 в условиях, допускающих возможность получения указанной дифференцированной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанный контакт указанных клеток в указанным FGF8 осуществляют через по меньшей мере 24 часа и до 36 часов после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным первым и указанным вторым ингибитором. В одном варианте реализации указанный контакт указанных клеток с указанным FGF8 составляет до 144 часов. В одном варианте реализации указанная популяция клеток-предшественником вентральной пластинки среднего мозга содержит более 40% forkhead box A2 $(FOXA2)^+$ клеток. В одном варианте реализации указанная популяция клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга содержит более 40% клеток, положительных по forkhead box A2 (FOXA2), кодируемому гомеобоксным геном LIM фактору транскрипции 1, альфа (LMX1A). В одном варианте реализации указанный способ дополнительно включает этап e) приведения в контакт указанной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга со средой для созревания нейронов, причем указанная среда содержит среду N2, нейротрофический фактор мозга (BDNF), аскорбиновую кислоту (AA), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии, дибутирил-цАМФ (dbcAMP) и трансформирующий фактор роста типа ß3, для дифференцировки клеток-предшественников вентральной

пластинки среднего мозга в дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанный способ дополнительно включает этап e) приведения в контакт указанной популяции клеток-предшественником вентральной пластинки среднего мозга со средой для созревания нейронов с добавкой B27 для дифференцировки клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга в дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанные клетки, приведенные в контакт с нейробазальной средой с добавкой B27, приводят в контакт с нейротрофическим фактором мозга (BDNF), аскорбиновой кислотой (AA), нейротрофическим фактором глиальной клеточной линии, дибутирил-цАМФ (dbcAMP) и трансформирующим фактором роста типа ß3 для дифференцировки клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга в дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанные дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга положительны по белку forkhead box A2 (FOXA2), кодируемому гомеобоксным геном LIM фактору транскрипции 1, альфа (LMX1A), родственный ядерному рецептору белку 1 (NURR1) и тирозингидроксилазе (TH). В одном варианте реализации более 40% указанных дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга положительны по тирозингидроксилазе $(TH)^{+}$. В одном варианте указанная популяция дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга дифференцируется к по меньшей мере 25 дню после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным первым и указанный вторым ингибитором. В одном варианте реализации указанные дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга положительны по маркерам, идентифицирующим молекулы. В одном варианте реализации указанные маркеры выбраны из группы, состоящей из тирозингидроксилазы (TH), белка forkhead box A2 (FOXA2), кодируемого гомеобоксным геном LIM фактора транскрипции 1, дофамина, 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (DOPAC) и гомованилиновой кислоты (HVA), альфа, ядерного рецептора NURR1 (NR4A2), нейрон-специфичного бета-тубулина класса III (Tuj1), TTF3, гомеобоксного белка 3, содержащего домен, подобный спаренному, 3 (PITX3), комплекс achaete-scute(ASCL), ранний фактор 1 B-клеток(EBF-1), ранний фактор 3 B-клеток (EBF-3), транстиретин(TTR), синапсин, транспортер дофамина (DAT) и сопряженного с G-белком калиевого канала внутреннего выпрямления (Kir3.2/GIRK2). В одном варианте реализации указанная молекула

выбрана из группы, состоящей из белка и нуклеиновой кислоты. В одном варианте реализации указанную молекулу идентифицируют с применением маркера, выбранного из группы, состоящей из антитела, ПЦР-праймера, последовательности нуклеиновой кислоты и тесте с применением фермента. В одном варианте реализации указанные дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга способны приживаться in vivo у пациента с болезнью Паркинсона (БП) и обеспечивать функцию дофаминовых (ДА) нейронов. В одном варианте реализации указанный способ дополнительно включает, обеспечение пациента, нуждающегося в дофамин-продуцирующих нейронах, причем указанный пациент демонстрирует по меньшей мере один неврологический симптом, у этап трансплантации дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга указанному пациенту для обеспечения функции дофаминовых (ДА) нейронов. В одном варианте реализации указанные неврологические симптомы выбраны из группы, состоящей тремора, брадикинезии (сильной замедленности движений), сутулой позы, постуральной неустойчивости и ригидности. В одном варианте реализации у указанного пациента происходит снижение выраженности указанного неврологического симптома. В одном варианте реализации указанная клетка выбрана из клетки грызуна, клетки примете и клетки человека. В одном варианте реализации указанные клетки человека представляют собой клетки от человека с неврологическим симптомом болезни Паркинсона (БП).

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ обеспечения приживления in vivo для терапевтического лечения, включающий a) обеспечение: i) популяции дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга, где больше 40% указанной популяции экспрессируют тирозингидроксилазу (ТН); и ii) субъекта, причем у указанного субъекта наблюдают по меньшей мере один неврологический симптом; и b) трансплантацию указанных дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга указанному субъекту в условиях, обеспечивающих приживление in vivo для обеспечения функции дофаминовых (ДА) нейронов. В одном варианте реализации указанные неврологические симптомы выбраны из группы, состоящей из тремора, брадикинезии (сильной замедленности движений), сутулой позы, постуральной неустойчивости и ригидности. В одном варианте реализации у указанного субъекта происходит снижение выраженности указанного неврологического симптома. В одном варианте реализации указанная популяция дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга

получена из популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга, обработанных в соответствии со способами согласно настоящему изобретению. В одном варианте реализации указанная популяция дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга получена из популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга, обработанных в соответствии со способом, дополнительно включающим этап приведения в контакт указанной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга со средой для созревания нейронов, причем указанная среда содержит среду N2, нейротрофический фактор мозга (BDNF), аскорбиновую кислоту (АА), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии, дибутирил-цАМФ и трансформирующий фактор роста типа ß3 для дифференцировки клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга в дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанная популяция клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга получена из популяции клеток, обработанной в соответствии со способом согласно настоящим изобретениям. В одном варианте реализации указанная популяция клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга получена из популяции клеток, обработанной в соответствии со способом индукции направленной дифференцировки клеток в популяцию клеток-предшественником вентральной пластинки среднего мозга, включающим a) обеспечение: i) популяции клеток, причем указанная популяция клеток выбрана из группы, состоящей из неэмбриональной стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, индуцированной неэмбриональной плюрипотентной клетки и модифицированной плюрипотентной клетки; и ii) первого ингибитора передачи сигнала, второго ингибитора передачи сигнала, активатора передачи сигнала белка Sonic hedgehog (SHH), и третьего ингибитора передачи сигнала, где указанный первый ингибитор способен снижать передачу сигнала трансформирующего фактора роста бета (TGFβ)/активин-Нодаль, указанный второй ингибитор способен снижать передачу сигнала SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic), и указанный третий ингибитор способен снижать передачу сигнала киназы гликогенсинтазы 3-бета (GSK3β) для активации передачи сигнала Wnt(wingless); b) приведение в контакт указанной популяции клеток с указанным первым и указанным вторым ингибитором, c) после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным первым и указанным вторым ингибитором далее приведение в контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic

hedgehog (SHH) в условиях для дифференцировки популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга; и d) после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) далее приведение в контакт указанных клеток с указанным третьим ингибитором для дифференцировки указанной популяции клеток в популяцию клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанная популяция дофаминовых (ДА) нейронов вентральной пластинки среднего мозга получена из популяции клеток, выбранной из группы, состоящей из животных, приматов и людей. В одном варианте реализации указанные клетки человека являются клетками пациента с симптомом болезни Паркинсона (БП).

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую популяцию клеток в контакте с LDN-193189 и CHIR99021, где больше 40% указанной популяции клеток положительно по белку forkhead box A2 (FOXA2), и где указанная популяция клеток была ранее приведена в контакт с LDN-193189, SB431542, активатором передачи сигнала белка Sonic hedgehog (SHH) и CHIR99021, причем указанный активатор передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) выбран из группы, состоящей из Sonic hedgehog (SHH) C25II и пурморфамина. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 50% положительна по белку forkhead box A2 (FOXA2). В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 60% положительна по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 70% положительна по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 80% положительна по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 90% положительна по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации указанная популяция клеток по меньшей мере на 95% до 100% положительна по белку forkhead box A2. В одном варианте реализации более 10% указанной популяции клеток выбрано из группы, состоящей из клеток, дважды положительных: по белку forkhead box A2 (FOXA2)/кодируемому гомеобоксным геном LIM фактору транскрипции 1, альфа (LMX1A), и дважды положительных: по белку forkhead box A2 (FOXA2)/LIM гомеобокс 2 (OTX2). В одном варианте реализации указанная популяция клеток является положительной по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60% , 70%, 80%, 90%, по меньшей мере на 95% до 100% . В одном

варианте реализации по меньшей мере 20% указанной популяции клеток положительно по маркеру, выбранному из группы, состоящей из Nurr1+, CD142, DCSM1, CD63 и CD99. В некоторых вариантах реализации указанная популяция клеток является положительной по меньшей мере на 30%, 40%, 50%, 60% , 70%, 80%, 90%, по меньшей мере на 95% до 100%. В некоторых вариантах реализации указанная популяция клеток является положительной по меньшей мере на 50%, 60% , 70%, 80%, 90%, по меньшей мере на 95% до 100%. В одном варианте реализации указанная популяция клеток выбрана из группы, состоящей из клеток грызуна, клеток примата, клеток человека и клеток человека от пациента с неврологическим симптомом болезни Паркинсона (БП).

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ индукции направленной дифференцировки клеток в популяцию клеток-предшественником вентральной пластинки среднего мозга, включающий, a) обеспечение: i) популяции клеток, причем указанная популяция клеток выбрана из группы, состоящей из неэмбриональной стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, индуцированной неэмбриональной плюрипотентной клетки и модифицированной плюрипотентной клетки; и ii) первого ингибитора передачи сигнала, второго ингибитора передачи сигнала, активатора передачи сигнала белка Sonic hedgehog (SHH) и третьего ингибитора передачи сигнала, причем указанный первый ингибитор представляет собой SB431542, указанный второй ингибитор представляет собой LDN-193189, указанный активатор передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) выбран из группы, состоящей из Sonic hedgehog (SHH) C25II и пурморфамина, и указанный третий ингибитор представляет собой CHIR99021; b) приведение в контакт указанной популяции клеток с указанным первым и указанный второй ингибитор, причем казанный контакт с указанным первым и указанным вторым ингибитором осуществляют в условиях, допускающих возможность получения указанной дифференцированной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга, таким образом, что указанный контакт с указанным первым и указанным вторым ингибитором осуществляют в течение 48 часов после посадки клеток *in vitro*, c) после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным первым и указанным вторым ингибитором далее приведение в контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) в условиях для дифференцировки популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга; и d) после приведения в контакт указанной популяции клеток с

указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) далее приведение в контакт указанных клеток с указанным третьим ингибитором для дифференцировки указанной популяции клеток в популяцию клеток-предшественником вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) осуществляют в условиях, допускающих возможность получения указанной дифференцированной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки асреднего мозга, таким образом, что указанный контакт указанных клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH) осуществляют по меньшей мере через 24 часа и до 36 часов после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным первым и указанный вторым ингибитором. В одном варианте реализации контакт указанных клеток с указанным третьим ингибитором осуществляют в условиях, допускающих возможность получения указанной дифференцированной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга, таким образом, что указанный контакт указанных клеток с указанный третий ингибитор осуществляют через по меньшей мере 24 часа и до 36 часов после приведения в контакт указанной популяции клеток с указанным активатором передачи сигнала Sonic hedgehog (SHH). В одном варианте реализации популяция клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга содержит более 40% клеток. Положительных по белку forkhead box A2 (FOXA2), LIM + гомеобокс-содержащему фактору транскрипции 1, альфа (LMX1A). В одном варианте реализации способ дополнительно включает этап e) приведения в контакт указанной популяции клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга со средой для созревания нейронов, причем указанная среда содержит среду N2, нейротрофический фактор мозга (BDNF), аскорбиновую кислоту (AA), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии, дибутирил-цАМФ и трансформирующий фактор роста типа ß3 для дифференцировки клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга в дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга. В одном варианте реализации указанные дофаминовые (ДА) нейроны вентральной пластинки среднего мозга положительны по набору маркеров, выбранных из группы, состоящей из: белка forkhead box A2 (FOXA2)/кодируемого гомеобоксным геном LIM фактора транскрипции 1 альфа (LMX1A)/тирозингидроксилазе (TH); белка forkhead box A2/ кодируемого гомеобоксным геном LIM фактора транскрипции 1

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

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

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем тексте термин «моделирование заболевания» относится к процессу применения экспериментального организма или культур клеток *in vitro* для имитации конкретных признаков или симптомов, возникающих у человека в результате заболевания. В

одном варианте реализации плюрипотентные стволовые клетки, полученные из модельного животного с генетической мутацией, приводящей к неврологическому расстройству, такому как болезнь Паркинсона (БП), могут выращиваться и дифференцироваться в нервные клетки для идентификации новых характеристик нейронов, связанных с БП. В одном варианте реализации плюрипотентные клетки человека, взятые у лица с генетической мутацией, приводящей к неврологическому расстройству, такому как болезнь Паркинсона (БП), могут выращиваться и дифференцироваться в нервные клетки, имеющие дефект, аналогичный наблюдаемому в организме указанного лица.

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

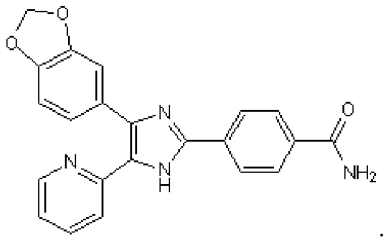
суставов и туловища и постуральную неустойчивость или нарушения равновесия и координации.

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

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

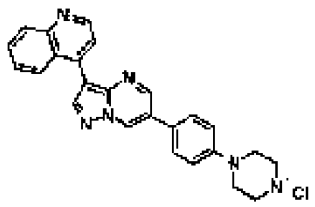
В настоящем тексте термин «дофамин» (дофамин) обозначает химическое соединение, продуцируемое дофаминовыми нейронами, которое переносит сигналы в часть мозга, которая содержит нейроны, управляющие движениями и координацией.

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

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

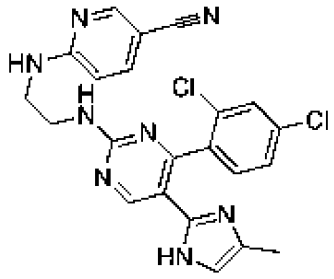
. В одном примере SB431542 представляет собой SB431542 Stemolecule™, Stemgent, Inc. Capmbridge, Massachusetts, США.

В настоящем тексте термин «LDN-193189» обозначает низкомолекулярное соединение DM-3189, название по ИЮПАК 4-(6-(4-(пиперазин-1-ил)фенил)пиразоло[1,5-a]пиримидин-3-ил)хинолин с химической формулой $C_{25}H_{22}N_6$. LDN-193189 может действовать как ингибитор передачи сигнала SMAD. LDN-193189 также является высокоэффективным

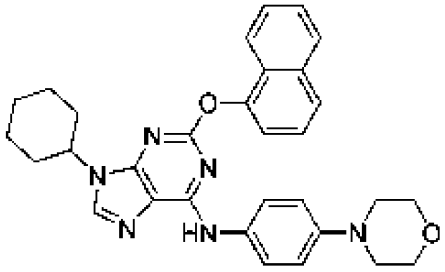
низкомолекулярным ингибитором ALK2, ALK3 и ALK6, протинтирозинкиназ (PTK), ингибируя передачу сигнала семейств ALK1 и ALK3 рецепторов TGFβ I типа, что приводит к ингибированию передачи множества биологических сигналов, включая сигналы белков морфогенеза костей (BMP) BMP2, BMP4, BMP6, BMP7 и цитокина активина и последующему фосфорилированию белков SMAD Smad1, Smad5 Smad8 (Yu *et al.* (2008) Nat Med 14:1363–1369; Cuny *et al.* (2008) Bioorg. Med. Chem. Lett. 18: 4388-4392, указанный источник включен в настоящий текст посредством ссылки).  . В одном примере реализации LDN-193189 представляет собой LDN-193189 Stemolecule™, Stemgent, Inc. Cambridge, Массачусетс, США.

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

В настоящем тексте термин «CHIR99021», или «CHIR», или «аминопиримидин», или «3-[3-(2-карбоксиэтил)-4-метилпиррол-2-метилиденил]-2-индолинон» соответствует названию 6-(2-(4-(2,4-дихлорфенил)-5-(4-метил-1H-имидазол-2-ил)пиримидин-2-иламино)этиламино)никотиннитрил по ИЮПАК. CHIR99021 является одним из примеров низкомолекулярных ингибиторов киназы гликогенсинтазы 3β (GSK3β), который активирует каскад передачи WNT и отличается высокой селективностью, демонстрируя приблизительно тысячекартную селективность в отношении панели родственных и неродственных киназ с IC_{50} = 6,7 нМ в отношении человеческой GSK3β и наномолярные значения IC_{50} в отношении



гомологичных GSK3β грызунов. . В одном примере реализации CHIR99021 представляет собой CHIR99021 Stemolecule™, Stemgent, Inc. Cambridge, Massachusetts, США. В настоящем тексте термин «пурморфамин» обозначает производное пурина, такое как производное, имеющее номер CAS: 483367-10-8. Одним из примеров является соединение, имеющее приведенную ниже структуру, которое активирует каскад Hedgehog, включая направленное воздействие на



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

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

инициируемый активацией рецептора, называется механизмом сигнальной трансдукции (передачи сигнала) или каскадом передачи сигнала.

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

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

В настоящем тексте термин «активировать» обозначает увеличение уровня активности определенного каскада передачи сигнала клетки после обработки соединением (т.е., активатором) по сравнению с активностью указанного каскада передачи сигнала в клетке, которую не обрабатывали таким соединением или подвергли контрольной обработке. Любой уровень ингибирования или активации конкретного каскада передачи сигнала считается вариантом реализации настоящего изобретения, если такое ингибирование или активация приводят к направленной дифференцировки стволовой клетки.

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

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

В настоящем тексте термин «WNT» или «wingless» применительно к каскаду передачи сигнала обозначает путь передачи сигнала, состоящий из лигандов семейства Wnt и

рецепторов семейства Wnt, таких как рецепторы Frizzled и LRPDerailed/RYK, опосредуемый β-катенином или без него. Для описанных здесь целей предпочтительный каскад передачи сигнала WNT включает участие β-катенина, т.е. комплекса WNT /β-катенин.

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

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

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

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

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

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

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

В настоящем тексте термин «ингибитор» или «ингибитор передачи сигнала» относится к ингибированию сигнальной молекулы или сигнального молекулярного каскада, как например, в случае ингибитора передачи сигнала SMAD, ингибитор киназы гликогенсинтазы 3β (GSK3β) обозначает соединение или молекулу (например, малую молекулу, пептид, пептидомиметик, природное соединение, белок, миРНК, антисмысловую нуклеиновую кислоту, аптамер или антитело), которое нарушает (т.е. снижает, или подавляет, или устраняет, или блокирует) сигнальную функцию молекулы или каскада. Другими словами, ингибитор представляет собой любое соединение или молекулу, которая изменяет любой вид активности названного белка (сигнальной молекулы, любой молекулы, взаимодействующей с сигнальной молекулой, названной связанной молекулы, такой как киназа гликогенсинтазы 3β (GSK3β)) (например, включая описанные здесь сигнальные молекулы, но не ограничиваясь ими), в качестве одного из примеров посредством осуществления прямого контакта с передачей сигнала SMAD, осуществления контакта со SMAD мРНК, что приводит к конформационным изменениям SMAD, снижению уровней белка SMAD или нарушению взаимодействия SMAD с партнерами по передаче сигнала (например, включая партнеров, описанных здесь) и ослабление экспрессии целевых генов SMAD (например, таких генов,

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

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

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

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

настоящими изобретениями выдерживали *in vitro* в течение нескольких месяцев при сохранении способности к приживлению.

Согласно настоящему раскрытию, клетки, применяемые для получения клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга и дофаминовых (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейронов среднего мозга получают из различных источников, включая эмбриональные и неэмбриональные источники, например ЭЧКч и неэмбриональные иПСКч, соматические стволовые клетки, стволовые клетки с заболеванием, т.е. изолированные плюрипотентные клетки и модифицированные производные стволовые клетки, взятые у пациентов с болезнью Паркинсона, раковые стволовые клетки, плюрипотентные клетки человека или млекопитающего и т.д.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В настоящем тексте термин «индуцированная плюрипотентная стволовая клетка» или «iPSC» (иПСК) относится к типу плюрипотентных стволовых клеток, близкому к эмбриональным стволовым клеткам, состоящему из соматических (взрослых) клеток, перепрограммированных таким образом, что они переходят в состояние, подобное эмбриональным стволовым клеткам, за счет того, что их заставляют экспрессировать факторы, важные для поддержания «стволовости» эмбриональных стволовых клеток (ESCs, ЭСК). Мышиные иПСК были описаны в 2006 г. (Takahashi and Yamanaka), а человеческие ИПСК были описаны в конце 2007 г. (Takahashi et al. and Yu et al.). Мышиные иПСК демонстрируют важные свойства плюрипотентных стволовых клеток, включая экспрессию маркеров стволовых клеток, образование опухолей из всех трех зародышевых слоёв и принимать участие в образовании многих различных тканей при инъецировании в мышиные эмбрионы на очень ранней стадии развития. Человеческие иПСКч также экспрессируют маркеры стволовых клеток и способны образовывать клетки, характерные для всех четырех зародышевых слоев. В отличие от эмбриональной стволовой клетки иПСК получают искусственно путем введения определенных эмбриональных генов (таких как трансгены OCT4, SOX2 и KLF4) (см., например Takahashi, Yamanaka Cell 126, 663-676 (2006), данный источник включен в настоящий текст посредством ссылки) в соматическую клетку, например, в клеточные линии из индуцированных клеток, C14, C72 и подобных. Другим примером иПСК являются клетки кожи взрослого человека, или фибробласты, трансформированные генами (OCT4, SOX2, NANOG, LIN28 **и** KLF4), клонированными в плазмиду, см. Yu, et al., Science DOI: 10.1126/science.1172482 (этот источник включен в настоящее описание посредством ссылки).

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

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

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

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

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

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

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

В настоящем тексте термин «пролиферация» относится к увеличению числа клеток.

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

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

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

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

В настоящем тексте термин «по умолчанию» или «пассивный» применительно к пути дифференцировки клеток относится к пути, в ходе которого менее специализированная клетка становится клеткой определенного типа дифференцированных клеток в культуре, в отсутствие обработки определенными соединениями, т.е. в нормальных условиях культивирования клеток без контакта по меньшей мере с одним морфогеном. Другими словами, заданная по умолчанию клетка образуется, когда клетку не приводят в контакт с молекулой, способной изменять тип дифференцированных клеток (т.е. с морфогеном), например, культивирование с обработкой отдельно LSB, однако не активатором SHH или активатором Wnt для получения положительной по белку Forkhead A2 (FOXA2)+ клетки в соответствии с настоящими изобретениями, приводит вместо этого к экспрессии маркеров *HES5, PAX6, LHX2* и *EMX2*. И напротив, «не заданный по умолчанию» применительно к клетке относится к типу дифференцированных клеток, дающему в результате тип клеток,

отличный от заданной по умолчанию клетки, т.е. не заданная по умолчанию клетка относится к типу дифференцированных клеток, образующихся в не заданных по умолчанию условиях, например, представляет собой клетку в соответствии с настоящими изобретениями, в том числе положительную по белку Forkhead A2 (FOXA2)+ нейрональную клетку, клетку-предшественник вентральной пластинки среднего мозга и дофаминовый (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейрон пути среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями; и т.д. Заданная по умолчанию клетка может также представлять собой заданную по умолчанию клетку, которая после контакта с морфогеном становится не заданной по умолчанию клеткой, без последующего контакта с морфогенным соединением; например, не заданную по умолчанию клетку-предшественник вентральной пластинки среднего мозга, которая затем становится заданной по умолчанию клеткой, не относящейся к дофаминовым (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейронам пути среднего мозга, ввиду отсутствия контакта с морфогеном, таким как CHIR.

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

В настоящем тексте термин «направленная дифференцировка» относится к манипуляциям с условиями культивирования стволовых клеток для индукции дифференцировки в конкретный (например, требуемый) тип клеток, например, в клетки-предшественники вентральной пластинки среднего мозга и дофаминовые (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейроны линии среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями. В одном варианте реализации термин «направленная дифференцировка» применительно к клетке относится к применению малых молекул, белков – факторов роста и других условий роста, способствующих переходу клетки из плюрипотентного состояния к более зрелому или специализированному направлению дифференцировки клеток (например, в клетку центральной нервной системы, нервную клетку, клетку-предшественник вентральной пластинки среднего мозга и дофаминовый (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейрон линии среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями; и т.д.). В одном предпочтительном варианте реализации начало направленной дифференцировки происходит при приведении клетки в контакт с LDN/SB на 0 день. Прохождение клеткой направленной

дифференцировки согласно описанию в настоящем документе приводит к образованию не заданного по умолчанию типа клеток клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга и дофаминовых (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейроовн линии среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями. В настоящем тексте термин «индукция дифференцировки» применительно к клетке относится к изменению заданного по умолчанию типа клеток (генотипа и/или фенотипа) на не заданный по умолчанию тип клеток (генотип и/или фенотип). Соответственно, «индукция дифференцировки в стволовой клетке» относится к индукции образования при делении клетки дочерних клеток с характеристиками, отличающимися от указанной стволовой клетки, например, характеристиками генотипа (т.е. изменение генной экспрессии по оценке с применением генетического анализа, например, с микрочипом) и/или фенотипа (т.е. изменение экспрессии белка, такого как белок Forkhead A2 (FOXA2), или набора белков, например, клетки, положительные (+) по белку Forkhead A2 (FOXA2) и кодируемому гомеобоксным геном LIM фактору транскрипции 1-альфа (LMX1A), но отрицательные (-) по PAX6).

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

В настоящем тексте термин «разрастание нейритов» или «разрастание нейронов» относится к наблюдаемым удлиненным окруженным мембраной выступам цитоплазмы из клеток.

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

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

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

В настоящем тексте термин «нейральная стволовая клетка» относится к стволовой клетке, обнаруживаемой в нейральной ткани во взрослом возрасте, способной давать начало нейронам и глиальным (поддерживающим) клеткам. Примеры глиальных клеток включают астроциты и олигодендроциты.

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

В настоящем тексте термин «пластинка четверохолмия (покрышка)» относится к дорсальным клеткам, расположенным ближе всего к средней линии. Один из маркеров пластинки четверохолмия представлен LMX1A. Во время эмбрионального развития клетки вентральной пластинки и пластинки четверохолмия локализованы в отдельных положениях в

ЦНС (вентрально/дорсально) и отличаются диаметрально противоположными требованиями к паттернам для индукции.

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

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

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

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

В настоящем тексте термин «среда для нейронального созревания», или среда «BAGCT» относится к культуральной среде, содержащей среду N2 с добавлением нейротрофического фактора головного мозга (BDN), аскорбиновой кислоты (АК), нейротрофического фактора глиальной клеточной линии, дибутирил-цАМФ и трансформирующего фактора роста типа ß3 для дофаминовых (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейронов линии среднего мозга.

В настоящем тексте термин «фидерный слой» относится к клетке, используемой при совместном культивировании для поддержания плюрипотентных стволовых клеток. В случае культур эмбриональных стволовых клеток человека типичные фидерные слои включают

эмбриональные фибробласты мыши (МЭФ) или эмбриональные фибробласты человека, которые прошли обработку для предотвращения деления в культуре.

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

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

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

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

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

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

В настоящем тексте термин «прикрепленная клетка» относится к клетке, растущей *in vitro*, отличающейся тем, что указанная клетка прикрепляется ко дну или стенкам культурального сосуда; прикрепленная клетка может вступать в контакт с сосудом за счет

молекул внеклеточного матрикса и т.п., и для отсоединения указанной клетки от культуральной емкости /контейнера требуется применение фермента, т.е. трипсина, диспазы и т.д. «Прикрепленная клетка», в отличие от клетки в суспензионной культуре, не прикрепленной и не требующей применения фермента для извлечения клеток из культурального сосуда.

В настоящем тексте термин «маркер» или «клеточный маркер» относится к гену или белку, указывающему на определенную клетку или тип клеток. Маркер для клетки может не ограничиваться одним маркером, маркеры могут относится к «паттерну» маркеров, т.е. обозначенная группа маркеров может обеспечивать идентификацию клетки или типа клеток, отличая их от других клеток или типов клеток. Например, дофаминовые (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейроны линии среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями экспрессируют один или большее число маркеров, которые отличают клетку-предшественника вентральной пластинки среднего мозга от слабее дифференцированной клетки-предшественника, т.е. положительна по белку Forkhead A2 (FOXA2) и положительна по кодируемому гомеобоксным геном LIM фактору транскрипции 1 альфа (LMX1A), в отличие от HES5+ и PAX6+ клеток, например, как видно из паттернов экспрессии, показанных на фиг. 1e и 1f. В настоящем тексте термин «положительный» применительно к клетке, включая сочетание «положительная клетка», относится к клетке, которая экспрессирует маркер, в качестве одного из примеров, антитело «окрашивает» по этому маркеру при применении системы окрашивания антителами (детекции) или последовательности нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты маркера, по оценке с применением репортерной молекулы, т.е. флуоресцентной молекулы, которая присоединяется к двунитевым последовательностям нуклеиновых кислот, в детектируемом количестве для количественного и/или качественного анализа, превышающем количество для контрольной или сопоставляемой клетки. Например, под клеткой, положительной по такому маркеру, такие как белок Forkhead A2 (FOXA2) и т.д., подразумевается клетка, которая экспрессирует мРНК и/или белок FOXA2, согласно детекции в ходе анализа, например, с применением генного чипа или антитела, соответственно. Такая положительная клетка может быть названа FOXA2+. Если клетка положительна более чем по одному маркеру, например, если используется обозначение

FOXA2/LMX1A+, указанная клетка или бóльшая часть популяции указанных клеток положительна как по FOXA2, так и по LMX1A.

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

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

В настоящем тексте термин «GFP» относится к любой последовательности ДНК зеленого флюоресцентного белка, экспрессия которой в клетке может давать флюоресцентный белок, обычно используемый в качестве маркера экспрессии целевого гена. Примеры GFP включают последовательности GFP, выделениые из кишечнополостных, таких как тихоокеанская метдуза, *Aequoria Victoria,* и производные синтетические последовательности, такие как «eGFP».

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

Термины «очищенный», «очищать», «очистка», «изолированный», «изолировать», «изолирование» и их грамматические эквиваленты в настоящем тексте относятся к снижению количества по меньшей мере одной примеси в образце. Например, целевой тип клеток очищен по меньшей мере на 10%, в предпочтительном варианте, по меньшей мере на 30%, в более предпочтительном варианте, по меньшей мере на 50%, в еще более

предпочтительном варианте, по меньшей мере на 75%, и в наиболее предпочтительном варианте, по меньшей мере на 90%, с соответствующим снижением нецелевых типов клеток, например, направленная дифференцировка в соответствии с настоящими изобретениями приводила к желаемому повышению чистоты дифференцированных клеток-предшественников вентральной пластинки среднего мозга или дофаминовых (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейронов среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями. Другими словами, «очищать» и его эквиваленты относятся к удалению некоторых клеток (например, нежелательных клеток) из образца, либо механически, например путем сортировки в поточном цитометре, либо посредством направленной дифференцировки. Например, для обеспечения дифференцировки очищенной популяции положительных по белку forkhead box A2 (FOXA2) и кодируемому гомеобоксным геном LIM фактору транскрипции 1, альфа (LMX1A) клеток-предшественников в соответствии с настоящими изобретениями, клетки-предшественники очищают путем удаления примеси нервных клеток PAX6 путем сортировки смешанной популяции клеток с получением дважды положительных: по белку forkhead box A2 (FOXA2) и кодируемому гомеобоксным геном LIM фактору транскрипции 1, альфа (LMX1A) клеток методом поточной цитометрии; дофаминовые (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейроны среднего мозга также очищают или «отбирают» от недофаминовых (ДА) (типичных клеток) с применением определенного способа культивирования клеток, включающего композиции и способы в соответствии с настоящими изобретениями. Удаление или отбор клеток, отличных от FOXA2/LMX1A+ дофаминовых (ДА) нервных клеток среднего мозга, приводит повышению процентной доли целевых дофаминовых (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейронов среднего мозга в образце. Соответственно, очистка типа клеток приводит к «обогащению», т.е. повышению количества целевых клеток, т.е. дофаминовых (ДА) FOXA2/LMX1A+ нейронов среднего мозга, в образце.

В настоящим тексте термин «природный» применительно к объекту (такому как клетка, ткань и т.д.) и/или химическому соединению (такому как белок, последовательность аминокислот, кодон и т.д.) обозначает, что указанные объект и/или соединение встречаются/встречались в природе. Например, природная клетка – это клетка, присутствующая в организме, который может быть выделен из природного источника, такая

как эмбриональная клетка, причем указанная клетка не подвергалась целенаправленной модификации человеком в лаборатории.

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

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

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

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

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

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

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

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

Термин «ген» относится к последовательности нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК), которая содержит кодирующую последовательность, необходимую для получения полипептида или предшественника (*например,* проинсулина). Полипептид может кодироваться полноразмерной кодирующей последовательностью или частью кодирующей

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

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

В настоящем тексте термины «молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая», «последовательность ДНК, кодирующая», «ДНК, кодирующая», «последовательность РНК,

кодирующая» и «РНК, кодирующая» относятся порядку или последовательности дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов вдоль нити дезоксирибонуклеиновой или рибонуклеиновой кислоты. Порядок этих дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов определяет порядок аминокислот в цепи полипептида (белка). Таким образом, последовательность ДНК или РНК кодирует последовательность аминокислот.

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

В настоящем тексте термин «набор» относится к любой системе доставки для доставки материалов. В контексте дифференцировки клеток «набор» может относиться к комбинации материалов для приведения в контакт со стволовыми клетками, такие системы доставки включают системы доставки, которые обеспечивают возможность хранения,

транспортировки или доставки реакционных реагентов из одного места в другое в подходящих контейнерах (таких как пробирки и т. д.) и/или со вспомогательными материалами (например, буферами, письменными инструкциями по осуществлению дифференцировки клеток и т.д.) (например, соединениям, белками, детектирующими агентами (таких как антитела, которые связываются с тирозингидроксилазой (TH), белком forkhead box A2 (FOXA2), кодируемым гомеобоксным геном LIM фактором транскрипции 1, альфа (LMX1A), и т.д.) и т.д. Например, набор включает одну или более емкостей (например, коробок, мешков, пробирок, пробирок эппендорф, капиллярных пробирок, многолуночных планшетов и т. п.), содержащих реакционные реагенты для ингибирования каскадов передачи сигнала, например, ингибитор для снижения передачи сигнала трансформирующего фактора роста бета (TGFβ)/активин-Нодаль, такой как SB431542 (или заменитель SB431542) и т.п., ингибитор для снижения передачи сигнала, SMAD, LDN-193189 (или заменитель LDN-193189) и т.п., ингибитор для снижения киназы гликогенсинтазы 3β (GSK3β), в качестве одного из примеров, для активации передачи сигнала wingless (Wnt или Wnts), известного также как активатор передачи сигнала WNT (агонист WNT), такой как CHIR99021 (или заменитель CHIR99021) и т.д.) и т.п., активатор передачи сигнала белка Sonic hedgehog (SHH) (такой как низкомолекулярный агонист рецептора (SMO)), например, молекулы Sonic hedgehog (SHH) C25II, пурморфамин и подобные, молекула, обладающая активностью фактора роста фибробластов 8 (FGF8), такая как фактор роста фибробластов 8 (FGF8) и т.д. и молекулы, связанные с созреванием нейронов, например, (BDNF), аскорбиновая кислота (AA), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии, дибутирил-цАМФ и трансформирующий фактор роста типа ß3, включая молекулы, способные заменять эти компоненты и/или вспомогательные материалы. Реагенты в наборе в одном варианте реализации могут быть в форме раствора, могут быть заморожены или лиофилизированы. Реагенты в наборе в одном варианте реализации могут содержаться в отдельных контейнерах или представлены в форме определенных комбинаций, таких как комбинация LSB (LDN-193189 с SB431542), молекулы Sonic hedgehog (SHH) C25II с пурморфамином, молекулы Sonic hedgehog (SHH) C25II с пурморфамином с CHIR99021 или пурморфамина с CHIR99021, молекулами, связанными с созреванием нейронов и т.п.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На Фиг. 1 в качестве примера продемонстрирована индукция и нейрогенная конверсия предшественников вентральных пластинок среднего мозга, полученных из клеток ES человека, зависящая от добавления CHIR990221. a) Иммуноцитохимический анализ на 11 день дифференцировки для экспрессии FOXA2 (красный), NESTIN (зелёный, верхние панели), LMX1A (зелёный, средние панели) и OTX2 (зелёный, нижние панели). b,c) Обсчёт данных, представленных в (a). Представлены данные трёх независимых экспериментов, каждый из которых осуществлялся в трёх повторах (среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM)). Уровни значимостей для индивидуальных маркеров представлены в сравнении с данными, полученными при обработке только LSB: ANOVA; критерий Даннета: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; $p < 0.05$). d) Схематическое изображение условий культивирования, использовавшихся для трёх условий обработки. e,f) Списки отобранных дифференциально экспрессирующихся генов на 11 день в сравнении с условиями LSB/S/F8/CHIR либо с LSB (e), либо LSB/S/F8 (f). g,h) Анализ временной экспрессии генов отобранных маркеров, характерных для идентификации предшественников DA среднего мозга (g), переднего мозга и идентификации вентральных предшественников, не являющихся DA (h). Отрезки для определения масштаба соответствуют 50 мкм.

На Фиг. 2 в качестве примера продемонстрированы иммуноцитохимический и молекулярный анализы пути развития ДА нейронов среднего мозга при обработке LSB/S/F8/CHIR в сравнении с путями LSB/S/F8 (вентральный/гипоталамический) и LSB (дорсальный передний мозг). a) Иммуноцитохимический анализ на 25 день экспрессии FOXA2 (синий) в комбинации с Tuj1 (красный)/LMX1A (зелёный) (верхние панели) и NURR1 (красный)/TH (зелёный) (нижние панели). b) Количественный анализ одновременной экспрессии в культурах, обработанных LSB/S/F8/CHIR. Представлены данные трёх независимых экспериментов, каждый из которых осуществлялся в трёх повторах (среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM)). c,d) Анализ общей экспрессии генов осуществляли на 25 день (образцы в трёх повторах для всех трёх условий). Отобранные списки наиболее дифференциально экспрессирующихся генов при сравнении данных на 13 и на 25 дни в условиях LSB/S/F8/CHIR (c) и при сравнении обработки LSB/S/F8/CHIR с LSB (d, левая панель) и LSB/S/F8 (d, правая панель). e) Анализ нормализованной дифференциальной экспрессии генов для ключевых маркеров ДА нейронов среднего мозга. Уровни значимости

для индивидуальных маркеров представлены в сравнении с данными обработки только LSB: ANOVA; Критерий Даннета: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; $p < 0.05$). Отрезки для определения масштаба соответствуют 50 мкм.

На Фиг. 3-1 и 3-2 в качестве примера продемонстрировано созревание *in vitro*, характеристика и функциональная оценка ДА нейронов среднего мозга, полученных из вентральных пластинок, в сравнении с ДА нейронами среднего мозга, полученными из розеткообразных структур. На Фиг. 3-1: продемонстрирован типичный: a) иммуноцитохимический анализ на 50 день дифференцировки для TH (красный), в комбинации с LMX1A (зелёный, левые панели), FOXA2 (синий, левые панели) и NURR1 (зелёный, правые панели). b) Подсчёт клеток TH+, FOXA2+, LMX1+ и NURR1+ среди общего количества клеток в культуре, полученной из розеткообразных структур, в сравнении с культурой, полученной из вентральных пластинок (LSB/S/F8/CHIR). c) Подсчёт нейронных подтипов серотонин+ (5-HT), и GABA+ на 50 день в культуре ДА нейронов, полученной из вентральных пластинок, и в культуре ДА нейронов, полученной из розеткообразных структур. d,e) Анализ ВЭЖХ для измерения DA и метаболитов d) Репрезентативная хроматограмма электрохимической детекции DA в образце культур, полученных из вентральных пластинок. e) Сравнение уровней DA, DOPAC и HVA среди культур, полученных из вентральных пластинок и из розеткообразных структур. f) Иммуноцитохимический анализ культур, полученных из вентральных пластинок, (80 день) для TH (красный) и синапсина (зелёный). g-i) Электрофизиологические анализы культур вентральных пластинок на 80 день дифференцировки ДА нейронов. Фазовое контрастное изображение соединённого в цепь нейрона (g) и соответствующие записи показаний (h). i) Анализ энергопотребления, показывающий характеристики осцилляции мембранного потенциала, являющиеся отличительной особенностью ДА нейрона (от 2 до примерно 5 Гц). Уровни значимости для индивидуальных маркеров (панели b, c, e) представлены как сравнение культур, полученных из вентральных пластинок и из розеткообразных структур: критерий Стьюдента: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; $p < 0.05$). Отрезки для определения масштаба соответствуют 50 мкм в (a), 20 мкм в (f, верхняя панель), 5 мкм в (f, нижняя панель) и 20 мкм в (g) j: Созревание ДА нейронов мыши *in vitro* (d65). TH-положительные нейроны всё ещё экспрессируют FoxA2 и распространяют длинные волокна, характерные для ДА нейронов мыши, и k: измерение высвобождения DA с помощью ВЭЖХ: TH+ нейроны возраста 65

дней являются функциональными *in vitro*. На Фиг. 3-2: продемонстрирован типичный краткий обзор клеток, полученных по описанному в настоящей заявке протоколу ДА нейронов среднего мозга на основе вентральных пластинок. a) В противоположность предшествующим стратегиям (например, Perrier, A.L. и др. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embrionic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 12543-8 (2004)), описанный в настоящей заявке новый протокол основан на получении LMX1A/FOXA2-положительных вентральных пластинок среднего мозга (левая панель) с последующей нейронной конверсией (средняя панель) и созреванием ДА нейронов (правая панель). В зрелых клетках ДА нейронов, полученных из вентральных пластинок, сохраняется экспрессия FOXA2/LMX1A.

На Фиг. 4 в качестве примера продемонстрированы выживаемость *in vivo* и функционирование ДА нейронов человека, полученных из вентральных пластинок, в мозгу мышей, крыс и обезьян, использованных в качестве моделей заболевания Паркинсона. a-d) Трансплантация ДА нейронов, полученных из вентральных пластинок, во взрослых мышей с повреждениями, вызванными 6-OHDA (штамм *NOD-SCID IL2Rgc* null). a) Экспрессия TH и морфология трансплантата через 4,5 месяца после трансплантации. b) Экспрессия специфического маркера человека (hNCAM, синий), TH (зелёный), и FOXA2 (красный). c) Подсчёт FOXA2+, TH+ и дважды меченых клеток в трансплантатах, полученных на основе вентральных пластинок (среднее ± SEM, n=4 через 4,5 месяца после трансплантации). d) Индуцированный амфетамином анализ вращения в трансплантатах, полученных из вентральных пластинок, (синий) в сравнении с трансплантатами, полученными из розеткообразных структур (зелёный). Отрезки для определения масштаба соответствуют 500 мкм в (a), 100 мкм в (b) и 40 мкм в (4c). e-p) Трансплантация ДА нейронов, полученных из вентральных пластинок, во взрослых крыс с повреждениями, вызванными 6-OHDA. Иммуногистохимический анализ для одновременной экспрессии TH (зелёный) и специфических маркеров человека (красный) hNA. e) и hNCAM (4f). g) Стереологический подсчёт общего количества клеток (hNA+), клеток TH+ и клеток TH+, одновременно экспрессирующих FOXA2. Средний объём трансплантата составлял 2,6 +/- 0,6 мм^3). h-j) Изображения высокого разрешения, показывающие одновременную экспрессию TH (зелёный) со специфическими факторами транскрипции среднего мозга FOXA2, PITX3 и NURR1 (красный). k-m) Анализ поведения животных, обработанных трансплантатами ДА

нейронов, полученных из вентральных пластинок, в сравнении с фиктивно обработанными животными. k) Асимметрия вращения, вызванная амфетамином. l) шаговый тест: измерение акинезии передних конечностей стороны, подвергнутой обработке, в сравнении со стороной, не подвергнутой обработке. m) тест в цилиндре: измерение предпочтения ипсилатеральной лапы в сравнении с контралатеральной лапой при подъёма не задние конечности. Животные с трансплантатами продемонстрировали существенное улучшение в по меньшей мере трёх тестах ($p < 0.01$ на 4,5 – 5 месяц; n=4-6 в каждом случае). n-p) Иммуногистохимический анализ для TH (зелёный) и одновременной экспрессии (красный) с DAT (n), GIRK2 (o) и кальбиндином (p). Уровни значимости (панели d, k, l, m) следующие: ** $p < 0.01$; $p < 0.05$). Отрезки для определения масштаба соответствуют 200 мкм в (e), 50 мкм в (f), 20 мкм в (h-j) и 40 мкм в (n-p). q-t) Трансплантация ДА нейронов, полученных из вентральных пластинок, во взрослую макаку-резус с повреждениями, вызванными 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (MPTP). q) Обзор репрезентативного участка трансплантата через 1 месяц после трансплантации, маркированный за счёт экспрессии специфического цитоплазматического маркера SC-121 человека (зелёный). r) Экспрессия TH трансплантате, окружённом гало TH+ волокон (стрелки). s) Исследование одновременной экспрессии SC-121 (красный) и TH (зелёный) в ядре трансплантата. t) Анализ одновременной экспрессии FOXA2 (красный) в TH+ нейронах (зелёный). Отрезки для определения масштаба соответствуют 2 мм для (q), 500 мкм для (r), 200 мкм для (s), и 50 мкм для (t). u) разрастание волокон из трансплантата (huNCAM+) в стриатум реципиента. v) Клетки, полученные из трансплантата, не дифференцируются в глиальные клетки. Однако трансплантаты содержали несколько серотонинергических волокон в дополнение к популяции TH+ клеток.

На Фиг. 5 в качестве примера продемонстрирован хронометраж индукции предшественников вентральных пластинок среднего мозга FOXA2/LMX1A, опосредованный воздействием CHIR99021. a) Иммуноцитохимический анализ FOXA2 (красный)/LMX1A (зелёный) на 11 день дифференцировки с последующей обработкой отдельно LSB/S/F8 treatment или в комбинации с CHIR, начинающейся в различные отмеченные промежутки времени. b) Подсчёт процентного содержания FOXA2+, LMX1A+ и дважды меченых клеток на 11 день дифференцировки с последующим началом дифференцировки под действием CHIR, как описано в (a). Уровни значимости для индивидуальных маркеров представлены в

сравнении с условиями без обработки CHIR: ANOVA; Критерий Даннета: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; $p < 0.05$). Отрезки для определения масштаба соответствуют 50 мкм.

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

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

На Фиг. 8 в качестве примера продемонстрирован анализ генов, дифференциально экспрессирующихся в культурах, обработанных LSB/S/F8/CHIR в сравнении с культурами, обработанными LSB и LSB/S/F8, на 11 и 25 день дифференцировки. a) Иерархическая кластеризация данных общей экспрессии генов, полученных для трёх условий в дни 0, 1, 3, 5, 7, 11 и 13 (образцы оценивали в тройных повторах для каждого условия и в каждый день). b) Анализ генного обогащения в соответствии с классами GO с применением DAVID; http://david.abcc.ncifcrf.gov. Сравнение в 11 день выявило обогащение для сигнальных путей SHH и WNT в условиях обработки LSB/S/F8/CHIR, что согласуется с активацией канонического сигнального пути WNT при обработке CHIR99021. Альтернативные пути развития, такие как «развитие переднего мозга» и «промежуточный мозг», а также «гомеобокс», являются другими элементами GO, которые являются высоко обогащёнными на 11 и 25 дни. c) Проверка данных в режиме реального времени с применением базы данных экспрессии генов человека Allen (http://human.brain-map.org) для кандидатов в маркеры, обогащённые в условиях для получения ДА нейронов среднего мозга (LSB/S/F8/CHIR). TTF3, EBF1, EBF3 и TTR экспрессировали на основании доступных данных на микрочипах, специфических для участка мозга человека. TTR, классическая транскрипционная мишень

FOXA2, слабо экспрессировался только во *substantia nigra* взрослой особи, что позволяет предположить, что он может играть основную роль в развитии или что обработка SHH может приводить к искусственно высоким уровням экспрессии TTR в ходе дифференцировки *in vitro*.

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

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

На Фиг. 11 в качестве примера продемонстрировано созревание *in vitro* культур ДА нейронов, полученных из вентральных пластинок. a) Иммуноцитохимический анализ TH нейронов, полученных из вентральных пластинок, (зелёный) на экспрессию DAT (красный; день 80). b) Обширные участки с Tuj1+ волокнами (красный), простирающиеся на расстояние > 2 мм, наблюдали на 60 день дифференцировки. c) На 80 день

дифференцировки, одновременная экспрессия GIRK2 (красный) в TH+ нейронах (зелёный). Отрезки для определения масштаба соответствуют 20 мкм в (a), 100 мкм в (b) и 20 мкм в (c).

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

На Фиг. 13 в качестве примера продемонстрировано гистологическое долгосрочное (4,5 месяца) исследование мышей с трансплантатами, у которых внесены повреждения с помощью 6-OHDA (штамм *NOD-SCID IL2Rgc* null strain), путём сравнения поведения у мышей с трансплантатами, полученными из вентральных пластинок, трансплантатами, полученными из розеткообразных структур. Исследование трансплантатов, полученных из вентральных пластинок. a) Пример одного из самых больших трансплантатов, полученных из вентральных пластинок. Указанный трансплантат сохраняет хорошо описанную hNCAM+ (красный) цитоархитектуру. b) На периферии трансплантата наблюдалось сильное разрастание hNCAM+ волокон. c) Серотонинергическиие (5-HT+) волокна (зелёный) в трансплантате в значительной степени являются негативными по hNCAM (красный), что позволяет предположить их происхождение из реципиента. d) GABA-ергические нейроны и волокна (зелёный) в трансплантате. Исследование трансплантатов, полученных из розеткообразных структур: e) Разрастание нейронов с компрессией ткани мозга реципиента. Большинство клеток были позитивными как в отношении NCAM (красный), так и в

отношении DCX (зелёный), что позволяет предположить их нейронное происхождение. f) NCAM+/DCX+ волокна распространились в нетрансплантированную контралатеральную область мозга. g) Внутри ядра трансплантата обнаружены множественные DCX+ кластеры. h) Несколько TH+ клеток (зелёный) и волокон были обнаружены на периферии трансплантата, а практически все TH+ клетки, полученные из розеткообразных структур, *in vivo* были негативными в отношении FOXA2 (синий). Иммуногистохимическое исследование трансплантатов возраста 4,5 месяца, полученных из вентральных пластинок, в сравнении трансплантатами, полученными из розеткообразных структур. Представлены репрезентативные изображения экспрессии маркера пролиферации Ki67 (красный) и маркера предшественника нейронов PAX6 (зелёный) (i), экспрессии FOXA2/DCX (j), FOXG1/hNCAM (j, врезка), маркера астроцитов GFAP (зелёный) (k). Отрезки для определения масштаба соответствуют 500 мкм в (a), 50 мкм в (b-d), 500 мкм в (e), 50 мкм в (g-h), 50 мкм в (i), 40 мкм в (j) и 20 мкм в (k).

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

На Фиг. 15 в качестве примера продемонстрировано гистологическое исследование трансплантатов, полученных из вентральных пластинок, в мозгу приматов. Полученные из вентральных пластинок ДА нейроны, полученные из H9 hESCs и из H9-GFP hESCs, (культуры на 25 день; 1.25 x 10^6 клеток/тракт, 3 тракта/полусфера, в общем 6 трактов) трансплантировали в стриатум взрослых макак-резус, у которых были получены повреждения с помощью MPTP (=2). a) Верхние левая и правая панели: Реконструкция

изображения высокого разрешения репрезентативных участков трансплантата (1 месяц после трансплантации). Цитоархитектура трансплантата проиллюстрирована иммуногистохимическим методом с применением специфического маркера человека SC-121 (отсутствие кросс-реактивности с тканями примата, не являющегося человеком). Нижняя левая панель: SC-121+ волокна, распространяющиеся из ядра трансплантата. Нижняя правая панель: Изображение более высокого разрешения SC-121+ клеток, демонстрирующее морфологии нейронных предшественников. b) Исследование экспрессии GFP в ядрах трансплантата, дополнительно подтвердило человеческую идентичность клеток, дополняя данные по SC-121. Замечание: У каждого животного в каждую полусферу трансплантировали немеченые клетки - производные H9, в то время как в другую полусферу клетки, полученные из клеток H9-GFP (экспрессия GFP под контролем промотора EF1a). c) Изображение более высокого разрешения GFP+ трансплантата с применением детекции DAB, демонстрирующее множество GFP+ клеток на периферии трансплантата, показывающие нейробластную морфологию. d) Иммуногистохимические исследования областей в ядре трансплантата, негативных в отношении GFP и SC-121. Эти области содержали большое количество микроглий реципиента, что основывается на данных об экспрессии Iba1 (красный), а также на нескольких ED1+ макрофагах (синий), что позволяет предположить длительное воспаление несмотря на иммуносупрессию циклоспорином. Отрезки для определения масштаба соответствуют 500 мкм в (a, верхняя панель), 50 мкм в (a, нижняя левая панель), 20 мкм в (a, нижняя правая панель), 2 мм в (b), 500 мкм в (c, левая панель), 50 мкм (c, верхняя правая панель), 100 мкм (c, нижняя правая панель), 100 мкм (d).

На Фиг. 16 в качестве примера продемонстрировано образование TH+ клеток из hESCs на основе способа с применением предшествующих питающих клеток MS5, в котором клетки дифференцировались в клетки, подобные нейронам DA через (посредством) интермедиаты розеткообразных клеток. Верх) на стадии P0 клетки hESCs вводили в контакт с молекулами для начала индукции нейронов из Oct4+ клеток в розеткообразные клетки с применением питающих клеток MS5 (Perrier et al., 2004). На стадии P1 розеткообразные клетки развивали путём введения клеток в контакт с дополнительными молекулами для дифференцировки клеток в клетки на стадии P2 со специфическими конфигурациями экспрессии, включая Pax2+/En1+ клетки - предшественники DA в дальнейшем дифференцирующие в TH+/En1+ ДА нейроны. Эти клетки использовали для трансплантации

в крыс, содержащих повреждения, вызванные 6OHDA, и подверженных иммуносупрессии посредством обработки циклоспорином А. Эти исследования по трансплантации продемонстрировали очень низкую выживаемость *in vivo* нейронов, подобных DA, включая потерю TH+ фенотипа, и выявили проблемы, касающиеся дальнейшего роста нежелательных, вероятно летальных, клеток у трансплантированных животных, например тератом, а также вырастание клеток неподходящего нейронного типа, что может приводить к дополнительным медицинским проблемам у пациентов. А: Наблюдалось очень малое количество выживших TH+ нейронов после 4,5 месяцев после трансплантации (< 50 TH+ клеток / животное) в трансплантатах из предшественников ДА нейронов, полученных из розеткообразных структур. Однако, в противоположность TH+ клеткам, клетки, меченые GFP, (GFP находился под контролем убиквитарного промотора) выживали достаточно хорошо после трансплантации. Это позволяет предположить, что большинство выживших после трансплантации клеток были нервными клетками, не являющимися ДА нейронами (16B). Fig16C: несколько клеток, полученных трансплантата (hNA+ (зелёный) одновременно экспрессировали TH (красный), что позволяет предположить, что большинство трансплантированных клеток человека обладают фенотипом нейронов, не являющихся DA. Панели 16 D-E демонстрируют, что D-E, несмотря на очень плохую выживаемость *in vivo*, наблюдалось некоторое (хотя и очень ограниченное и очень изменчивое) улучшение в нескольких исследованиях поведения, таких как вращения, индуцированные амфетамином, (D), тест в цилиндре и спонтанные вращения (E).

На Фиг. 17 в качестве примера продемонстрирован протокол для получения небольшого количества клеток вентральных пластинок. Модифицированный протокол с двойным ингибированием SMAD позволяет получать клетки вентральных пластинок (fp). Высокие концентрации SHH были необходимы для индукции FoxA2+ клеток вентральных пластинок, а такая добавка стимуляторов, вызывающих образование конфигурации каудализации, таких как FGF8, Wnt1 или RA не приводило к снижению экспрессии FOXA2, но вызывало изменение региональных характерных черт. А) Левая панель: Клетки на 11 день дифференцировки после обработки NSB (Noggin/ SB431542); левая центральная панель: обработка NSB+SHH (Sonic C25II); центральная панель: NSB+SHH+RA; центральная правая панель: NSB+SHH+Wnt1; NSB+SHH+FGF8; Замечание: только обработка NSB не приводит к индукции экспрессии FoxA2. Только FoxA2+ клетки вентральных пластинок

индуцировались в присутствии высокой дозы SHH. Добавление RA, Wnt1 и FGF8 не приводит к ингибированию индукции FoxA2. B) Количественный анализ ОТ-ПЦР экспрессии генов FOXA2 и SIX6 демонстрирует сохранение уровня (или даже его увеличение) экспрессии FOXA2 после обработки RA или FGF с сопутствующим уменьшением экспрессии SIX6 с получением самых ранних предшествующих клеток, подобных вентральным пластинкам. C) Индукция экспрессии генов - маркеров предшественников среднего мозга и вентральных пластинок среднего мозга в присутствии FGF8 и Wnt1.

На Фиг. 18 в качестве примера продемонстрирован протокол получения клеток вентральных пластинок, демонстрирующий высокие уровни характеристик среднего мозга в сравнении с низкими или отсутствующими уровнями в клетках, полученными в ходе процедур, использовавшихся на Фиг. 16 и 17. A: Индукция вентральных пластинок среднего мозга в популяции клеток, контактировавших с высокими уровнями SHH, FGF8 и CHIR, приводящая к одновременной экспрессии FoxA2 и маркеров среднего мозга LMX1A и Otx2 на 11-1 день дифференцировки в сравнении с клетками, контактировавшими с молекулами, описанными в двух других процедурах, показанных на Фиг. 16 и 17 (N/SB и SHH/FGF8, соответственно). B: Исследование общей экспрессии генов на 11 день, сравнивающее три группы клеток, контактировавших с молекулами из каждой из трёх процедур, включая третью процедуру согласно настоящему изобретению (LDN/SB, SHH/FGF8, LSB/SHH/FGF8/CHIR). На графике B специфически продемонстрированы гены, которые являются общими для всех трёх условий обработки в сравнении с генами, которые являются уникальными для каждых индивидуальных условий. График B является предварительным анализом, использовавшимся для результатов на микрочипах, представленных на Фиг. 1. C: Уровни мРНК маркеров среднего мозга FoxA2, LMX1A являются высоко обогащёнными в группе, обработанной LSB/SHH/FGF8/CHIR, в сравнении с группой, обработанной SHH/FGF.

На Фиг. 19 в качестве примера продемонстрирована характеристика *in vitro* дофаминовых нейронов, полученных из вентральных пластинок участка среднего мозга. A: Одновременное мечение FoxA2+ нейронов маркерами ДА нейронов мыши TH, Nurr1 и LMX1A на 25 день дифференцировки. B: уровни экспрессии мРНК, определённые

количественной ОТ-ПЦР, маркеров ДА нейронов мыши, а также других типов клеток среднего мозга в группах, обработанных LDN/SB + SHH/FGF8 + SHH/FGF8+CHIR.

На Фиг. 20 в качестве примера продемонстрирован потенциал сравнения дифференцировки по пути ДА нейронов среднего мозга в клетках PD-iPS с мутацией PINK1 и клетках дикого типа hES (или iPS). Линия БП-иПСК, мутантная по PINK1 Q456X, была дифференцирована в соответствии с новыми способами получения ДА нейронов среднего мозга на основе вентральных пластинок согласно настоящему изобретению с получением профилей дифференцировки среднего мозга, сравнимых с профилями, полученными на линии H9. A-C) Иммуноцитохимический анализ линии БП-иПСК, мутантной по PINK1, на 11 день дифференцировки (стадия предшественников клеток среднего мозга) для FOXA2 (красный), LMX1A (зелёный) и DAPI (синий) (A), на 25 день дифференцировки (ранняя постмитотическая стадия ДА нейронов) для FOXA2 (красный) и TH (зелёный) (B) и для NURR1 (красный) и TH (зелёный) (C). D-F) Некоторый набор иммуноцитохимических исследований, осуществлённых с применением клеток, полученных из H9, на 11 день дифференцировки для FOXA2 (красный), LMX1A (зелёный) и DAPI (синий) (D), на 25 день дифференцировки для FOXA2 (красный) и TH (зелёный) (E) и для NURR1 (красный) и TH (зелёный) (F).

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

α-синуклеина (красный) и TH (зелёный) (C) и α-синуклеина (красный) и убиквитина (зелёный) (D).

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

На Фиг. 23 в качестве примера продемонстрированы различия в профилях экспрессии α-синуклеина, которые наблюдаются в зависимости от протокола дифференцировки. Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что «аутентичные» ДА нейроны среднего мозга обладают уязвимостью, специфичной для заболеваний Паркинсона, и соответствующими, специфическими фенотипами *in vitro*. ДА нейроны, полученные с применением классического протокола дифференцировки, основанного на стромальных питающих клетках MS5, (Perrier et al., PNAS 2004, включён в настоящее описание посредством ссылки) могут приводить к большому количеству TH+ нейронов. Однако, основываясь на данных согласно настоящему изобретения, указанные TH+ клетки, получающиеся в результате дифференцировки в ходе классического протокола на стромальных питающих клетках MS5, не являются аутентичными ДА нейронами среднего мозга. В культурах, дифференцированных посредством протокола MS5, было большое количество α-синуклеин положительных клеток. Однако, эти клетки одновременно не экспрессировали TH. Более того, не было различий в профилях экспрессии между БП-иПСК и контрольными iPSC при использовании стратегии дифференцировки MS5. Эти данные указывают на то, что α-синуклеин также экспрессировался в других типах клеток, не являющихся клетками DA, и что такой α-синуклеин в клетках, не являющихся клетками DA, не отличается в клетках заболевания в сравнении с контрольными клетками, полученными из iPSC, – в частности, при использовании стандартного протокола дифференцировка MS5.

Наконец, новый протокол дифференцировки согласно настоящему изобретению на основе вентральных пластинок приводит к получению большого количества TH+ клеток, одновременно экспрессирующих α-синуклеин. Такие TH+ клетки экспрессируют α-синуклеин в виде профиля экспрессии в цитозоле. A, B) Иммуноцитохимический анализ для α-синуклеина (LB509, красный), TH (зелёный) линии БП-иПСК, мутантной по PINK1, на 60 день дифференцировки на основе MS5 (A) и контроль PSC (B). C) Иммуноцитохимический анализ линии БП-иПСК, мутантной по PINK1, на 55-1 день дифференцировки на основе вентральных пластинок для α-синуклеина (красный), TH (зелёный).

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

иммуноцитохимические изображения низкого разрешения для Tuj1 (красный) и TH (зелёный) при использовании протокола на основе MS5 на 60 день дифференцировки: БП-иПСК в нормальных условиях (K) в сравнении с условиями воздействия токсина (L) и контрольные iPSC в нормальных условиях (M) в сравнении с условиями воздействия токсина (N).

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

На Фиг. 26 в качестве примера продемонстрировано, что трансплантированные ДА нейроны человека, полученные из плюрипотентных стволовых клеток, обладают электрофизиологическими характеристиками, типичными для характеристик, обнаруженных в части компактов чёрного тела (substantia nigra pars compacta, SNpc) мышей. A) Сверху - реконструкция нейрона - создателя ритма (нейрона-ритмоводителя) в участке трансплантата. Снизу - типичная фотомикрография полученного из крысы среза мозга, в который 9-тью месяцами ранее были введены нейроны, полученные из hES; трансплантат очерчен; изображение с большим увеличением приведено внизу в виде вставки. Срез был обработан тирозингидроксилазой, которая показана белым. B). Сверху - типичная присоединённая накладка, производящая запись с предполагаемого ДА нейрона в трансплантате; снизу - типичная запись с целой клетки той же самой клетки. Записи осуществляли в присутствии антагонистов рецепторов глютамата и GABA (50 мкМ AP5, 10 мкМ CNQX и 10 мкМ GABAzine) для того, чтобы элиминировать синаптический входной сигнал. Эти записи продемонстрировали, что указанные нейроны, полученные из PS, были нейронами-ритмоводителями с нормальными интрасоматическими траекториями напряжения. Другие

нейроны, записанные в образце трансплантата, имели схожие свойства. C) Для сравнения приведены записи с присоединением к клетке и записи целой клетки дофаминергических нейронов в SNpc взрослой мыши. Сокращения (CTx= кортекс, STr= стриатум, SNpc= часть компактов чёрного тела, DA= дофаминергический).

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

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

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

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

На Фиг. 31 в качестве примера продемонстрировано исследование ДА нейронов, полученных из ES, с применением FACS. Выделение GFP+ и SSEA-1- клеток с применением проточной цитометрии. В качестве двойного отрицательного контроля и GFP-

отрицательного контроля использовали клетки ES мышей J1. Примерно от 5 до 10% клеток было отсортировано как положительные.

На Фиг. 32 в качестве примера продемонстрировано, что трансплантаты Nurr1/PST были более эффективными в индукции восстановления поведения на модели с мышами с повреждениями, вызванными 6OHDA. Клетки Nurr1::GFP дифференцировали и сортировали на 14 день для получения GFP+/SSEA-1- популяции. Клетки, обработанные 20 единицами endoN, выращивали в течение 12 часов перед сортировкой. 55,000 клеток трансплантировали в 1 мл среды N2 с BDNF и AA. (A) Животных оценивали по вращению, вызванному амфетамином, (вращения/мин в течение 20 минут) в течение 3 недель перед трансплантацией, а затем через 7 недель после трансплантации. Клетки Nurr1/PST существенно улучшили результат в сравнении с контрольными клетками Nurr1 (2-факторный тест ANOVA: $p<0.01$, с критерием Боферрони после исследования: $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$; 6 животных в каждой группе). Удаление PSA ферментом endoN отменяло эффект от PST ($p = 0.26$). (B) В конце исследования в трансплантате PST было больше GFP+ клеток, чем в контроле ($p < 0.05$, критерий Стьюдента). (C) Соотношение иммунофлюоресценции PSA/GFP в ядре. $**p<0.01$. Критерий Стьюдента (n=5/тип трансплантата). (D) Иммунофлюоресценция GFP, TH и PSA. Отрезок для определения масштаба: 200 мкм. (E) Трансплантированные клетки экспрессируют маркеры DA. Приведены отдельные z-уровни конфокальных микрофотографий. Отрезок для определения масштаба: 20 мкм. Значения приведены в виде среднее +/- SEM.

На Фиг. 33 продемонстрирована аугментация PSA, которая усиливала иннервацию полосатого тела реципиента ДА нейронами, полученными из ES. Повышенная экспрессия PSA-NCAM усиливала процесс разрастания. (A) Репрезентативные фотомикрографии GFP/TH+, GFP/Girk2+ и GFP/синапсин+ процессов в контролях. Окрашивание образцов Nurr1/PST было похожим. Отрезок для определения масштаба: 20 мкм. (B) Репрезентативные проекции z-стопок, демонстрирующие GFP+ процесс распространения из обоих трансплантатов, Nurr1 и Nurr1/PST. В трансплантате Nurr1/PST было больше GFP+ процессов распространения из трансплантата(Отрезок для определения масштаба: 50 мкм). Вставки демонстрируют GFP+/TH+ процессы в тех же сечениях. Стрелка: направление роста. (C-E) Подсчёт интенсивности GFP+ (C, E) и TH+ (D) процессов на различных расстояниях от места трансплантата, нормализованный по интенсивности вблизи от места

инъекции (участки были разделены на 5 зон на расстоянии ~100 мкм в стороне. Нормализацию проводили по отношению к зоне I; двухфакторный тест ANOVA, $p < 0.01$ для данных как GFP, так и TH, n=5/тип клеток; значения представлены в виде среднее +/-SEM). Трансплантаты Nurr1/PST прорастили в стриатум реципиента больше аксонов, при этом рост был частично подавлен (E) при обработке endoN. (F) Восстановление животных коррелировало со степенью процессов прорастания. В указанном трансплантате продемонстрирована корреляция (анализ линейной регрессии) между интенсивностью прорастания GFP+ аксонов в зоне IV и восстановлением у необработанных животных и животных с трансплантатами Nurr1, обработанными endoN, и Nurr1/PST. Каждое значение представляет данные по одному животному (r^2 =0.65, $p<0.001$, n=17).

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

На Фиг. 35 в качестве примера продемонстрировано использование фермента PSTnm. (A) PSA, полученный с помощью PSTnm, ингибирует адгезию шванновских в суспензии к монослою шванновских клеток даже более эффективно (красная линия - самая нижняя линия), чем PSA, полученный в результате усиленной экспрессии PST (зелёная линия - средняя линия). (B) Иммуноблоттинг PSA в мотонейронах HB9, полученных из ESC, продемонстрировал, что у контрольных образцов, обработанных PSTnm, были недетектируемые уровни PSA. Выращивание с PSTnm + субстрат (CMP - сиаловая кислота)

приводило к появлению большой полосы PSA, которая исчезала после обработки endoN. (C, D) Подобно эффектам, полученным с геном PST, полисиалилирование этих клеток с помощью PSTnm и субстрата в ходе дифференцировки усиливало разрастание аксонов и миграцию клеток (острия стрелок). (E) Иммуноокрашивание PSA ДА нейронов возрастом 30 дней, полученных из hESC. (F) Это окрашивание существенно усилилось после обработки PSTnm и субстратом. (G) Инъекция *in vivo* PSTnm отдельно не имела эффекта, в то время как его одновременное добавление с субстратом (H) приводило к сильной экспрессии PSA в полосатом теле мыши.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

Настоящее изобретение относится к характеристикам болезни Паркинсона (БП), включая выборочную дегенерацию дофаминовых нейронов среднего мозга (mDA, смДА) в

мозге пациента. Поскольку основной причиной симптомов БП является селелктивная потера ДА нейронов в черной субстанции вентральной части среднего мозга, БП считается одним из заболеваний, наиболее подходящих для применения клеточно-заместительных терапевтических стратегий лечения. Соответственно, были предприняты многочисленные попытки трансплантации клеток в мозг пациента для возмещения утранченной функции дофаминовых нейронов среднего мозга (mDA). Однако эти эксперименты были нейдачиными, а степень успешности современнынх симптоматических видов лечения, применяемых для пациентов, сильно варьирует. Соответственно, существует потребность в новых видах лечения для пациентов с БП, которые обесепечили бы замедление потери функции нейронов.

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

относительно исходной популяции, а также они сохраняют способность к приживлению в течение нескольких месяцев культивирования.

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

Другим возможным источником клеток для трансплантации являются ДА нейроны, полученные из человеческих ЭСК. Предшествующие попытки применения этих клеток в качестве исходной популяции клеток для получения дифференцированных клеток, которые считались Да-подобными нейронам среднего мозга, полученными из эмбриональных стволовых клеток человек (hESC, ЭСКч), которые трансплантировали грызуна в модели БП, характеризовались низкой *in vivo* выживаемость. трансплантатов после трансплантации. Эта неудача скорее всего связана с неполной дифференцировкой ДА нейронов среднего мозга *in vitro,* в результате который образовывались клетки, которые казались ДА нейронами среднего мозга, но не обладали способностью приживаться и восполнять потерю функции нейронов. Фактически, авторы настоящего изобретения показали, что ДА-подобные нейроны, которые ранее производились в из лабораториях и описывались в публикациях, не относились к тому же типу клеток, что и ДА нейроны вентральной пластинки среднего мозга согласно настоящим изобретениям, и не обладают сходными с ними функциями или способностью к способностью к приживлению, см., например, Фигуры 16 и 17. Соответственно, авторы также обнаружили, что для обеспечения направленной

дифференцировки клеток в лаборатории и получения популяций клеток, содержащих большое количество адекватно функционирующих нейронов, клетки должны пройти через конкретные стадии развития, чтобы образовать подходящую популяцию клеток для применения в заместительной терапии. Авторы также обнаружили, что по меньшей мере для получения приживляемых ДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями, должны иметь место определенные стадии развития, такие как FOX2A/LIM1A+ промежуточная стадия 11 дня. Авторы обнаружили, что если клетки не проходят такие стадии развития, образующиеся в результате ДА-подобные нейроны не обладают теми же функциональными способностями, что и ДА нейроны среднего мозга в соответствии с настоящими изобретениями, которые получают из промежуточных FOX2A/LIM1A+ клеток 11 дня.

В отличие от того, что наблюдали ранее, в настоящем документе описаны новые методики культивирования, относящиеся к основанным на индукции клеток вентральной пластинки стратегиям получения человеческих ДА нейронов, которые эффективно приживаются *in vivo*. Соответственно, предполагается, что то, что раньше не удавалось получить популяции клеток, состоящие в основном из комиттированных ДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями (т.е. FOXA2+ и LMX1A + ДЯ нейронов, способных к эффективному приживлению), является причиной неудач трансплантации ДА-подобных нейронов, т.е. вследствие незавершенной специализации ДА-подобных клеток. Ранее предполагали, что причиной неудач трансплантации является особая уязвимость клеток, т.е. ДА-подобные нейроны из культуры были неспособны пережить стресс при трансплантации. Как описано здесь, FOXA2+/LMX1A+ предшественники вентральной пластинки среднего мозга получали из ПСКч через 11 дней после обработки низкомолекулярными активаторами белка sonic hedgehog (SHH) и канонической передачи сигнала WNT. Эти клетки 11 дня, являющиеся дважды положительными: по FOXA2+ и LMX1A +, приводят в контакт с дополнительными малыми молекулами для индукции дальнейшей дифференцировки в приживающиеся ДА нейроны среднего мозга, положительные по TH+, FOXA2+ и LMX1A +, к 25 дню. Эти зрелые ДА нейроны вентральной пластинки среднего мозга можно поддерживать *in vitro* в течение нескольких месяцев. Масштабное молекулярное *in vitro* исследование, биохимические и электрофизиологические данные показали развитие и подтвердили идентичность

полученных из ЭСКч ДА нейронов среднего мозга. Выживание и функционирование *In vivo* было продемонстрировано в моделях БП на животных, в трех видах-хозяевах. Долгосрочная приживаемость у мышей и крыс с индуцированными 6-OHDA повреждениями продемонстрировала устойчивую выживаемость ДА нейронов среднего мозга, полное восстановление вызванного амфетамином поведения с вращением и улучшения в тестах на использование передних конечностей и акинезию. Наконец, масштабируемость была продемонстрирована путем трансплантации обезьянам с паркинсонизмом. Прекрасные выживаемость и функционирование нейронов и отсутствие избыточного роста нейронов в трех моделях с применением животных указывает на перспективы для разработки клеточных терапевтических средств для применения при БП на основе композиций и способов в соответствии с настоящими изобретениями.

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

ранее *in vitro* ДА нейронов, показало хорошую *in vivo* выживаемость привитых клеток и функциональное восстановление нарушений поведения.

Преимущества применения способов в соответствии с настоящими изобретениями для получения ДА нейронов перед другими способами станут частично ясны из приведенной ниже информации. Применение соматических стволовых клеток и нейрональных стволовых клеток в других способах с целью получения аутентичных ДА нейронов среднего мозга, эффективно приживающихсяin vivo, не было успешным (обзор можно найти в публикации Kriks & Studer, Protocols for generating ES cell-derived dopamine neurons in Development and engineering of dopamine neurons (под ред. Pasterkamp, et al.) (Landes Biosciences, 2008, цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Плюрипотентные стволовые клетки, такие как ЭС клетки затем применяли в качестве источников приживающихся клеток. Ранние исследования 1990х с применением ЭС клеток мышей продемонстрировали пригодность производных специфических линий из плюрипотентных клеток in vitro, включающих нейроны (Okabe, et al., Mech. Dev. 59:89-102 (1996); Bain, et al., Dev. Biol. 168v342-357 (1995), все источники включены в настоящее описание посредством ссылки). Фактически ДА нейроны среднего мозга получали с применением стратегии направленной дифференцировки (Lee, et al., Nat. Biotechnol. 18v675-679 (2000), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки) на основании информации о развитии, полученной в ранних исследованиях с трансплантатами (Ye, et al., Cell 93:755-766 (1998), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Другие стратегии направленной дифференцировки использовали для получения других типов нейронов, таких как соматические мотонейроны (Wichterle, et al., Cell 110, 385-397 (2002), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Однако эти усилия не принесли результата в случае популяций клеток, содержащих высокую долю ДА нейронов среднего мозга или клеток, способных восстанавливать функцию нейронов in vivo. Фактически, получаемая популяция содержала смесь типов клеток в дополнение к ДА нейронам среднего мозга. Далее авторы изобретения разработали другие способы получения ДА нейронов среднего мозга, частично описанные ниже, однако эти популяции клеток также представляли собой смеси типов клеток и не восстанавливали нейрональную функцию. В частности, человеческие ЭС клетки дифференцировались в ранние нейроэпителиальные клетки, называемые нервными розетками, с последующей индукцией клеток стадии розетки

в клетки, экспрессирующие предшественник ДА нейронов среднего мозга и дифференцированные маркеры. Эти клетки продолжали демонстрировать функциональные свойства нейронов в электрорфизиологических исследованиях, высвобождение ДА *in vitro* и образование положительных по ТН в «иммунозолотом» анализе синаптических контактов (Perrier, et al. From the Cover: Derivation of midbrain dopamine neurons from Human Eьbryonic Stem Cells. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 12543-8 (2004), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Однако, несмотря на многообещающие результаты in vitro, трансплантация клеток мышам с 6OHDA-индуцированными поражениями давала очень небольшое число выживших дофаминергических нейронов. Такой отрицательный результат был неожиданным, учитывая убедительные свидетельства функциональности полученных из мышиных ЭС клеток ДА нейронов in vivo (Barberi, et al., Nat. Biotechnol. 21:1200-1207 (2003); Tabar, et al. Nature Med. 14:379-381 (2008); Bjorklund, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A. 99:2344-2349 (2002); Kim, et al. Nature 418:50-56 (2002), все источники включены в настоящее описание посредством ссылки), устойчивые функциональные свойства in vitro ДА нейронов, полученных из ЭС клеток человека (Perrier, et al., From the Cover: Derivation of midbrain dopamine neurons Human Eьbryonic Stem Cells. Proc Natl Acad Sci U S A 101:12543-8 (2004), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки) и явные свидетельства того, что фетальные ДА нейроны человека могут выживать в форме ксенографта в полосатом теле (Brundin, et al. Exp. Brain Res. 70:192-208 (1988); Björklund, et al., Neuronal replacement by intracerebral neural implants in animal models of neurodegenerative disease. Raven. Press., New. York. 455-492 (1988), все источники включены в настоящее описание посредством ссылки). В течение почти 8 лет после первых неудачных попыток трансплантации ДА нейронов, полученных из ЭС клеток человека, в этой области почти не наблюдалось прогресса. Некоторые ограниченные улучшения наблюдали при применении источников плюрипотентных стволовых клеток приматов (Sanchez-Pernaute, et al. Long-term survival of dopamine neurons derived from parthenogenetic primate embryonic stem cells (Cyno1) in rat and primate striatum. Стволовые клетки 23:914-922 (2005), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки), клетки, предварительно обработанные FGF20 или Wnt5A, или ЭС клетки человека, дифференцировались в присутствии факторов, секретируемых иммортализованными астроцитами среднего мозга (Roy, et al., Nature Med. 12:1259-1268 (2006), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством

ссылки). Однако ни одна из предыдущих стратегий не обеспечивала получения обогащенной популяции ДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями для применения в процедурах приживления для восстановления функции нейронов in vivo.

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

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

Двойное ингшибирование SMAD ранее использовалось в качестве быстрого и эффективного способа индукции одного типа клеток нейрональной линии из ПСКч (Chambers, et al., *Nat Biotechnol* 27, (2009), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Эти нейрональные линии, индуцированные молекулами, включая Noggin, обычно (в отсутствие воздействия) дифференцируются по пути, который обеспечивает дифференцировку в клетки центральной нервной системы, что соответствует судьбе нервных клеток. В последующих исследованиях было выявлено, что применение низкомолекулярного дорсоморфина (DM) вместо Noggin, по меньшей мере частично близкие, но не идентичные дифференцированные клетки, причем основные различия проявлялись в культурах (Kim, et al., Robust enhancement of neural differentiation from human ES and iPS cells regardless of their innate difference in differentiation propensity. *Stem Cell Rev* 6, 270-281, (2010); Zhou, et al., High-Efficiency Induction of Neural Conversion in hESCs and hiPSCs with a Single Chemical Inhibitor of TGF-beta Superfamily Receptors. *Stem Cells*, 504, (2010), цитируемые источники включены в настоящий текст посредством ссылки). Авторы изобретения наблюдали, что клетки, полученные с применением Noggin, хотя и находятся на той же стадии развития, что и клетки, обработанные LDN, экспрессируют в основном те же маркеры и обладают близкими способностями к развитию в различные нейрональные линии, также имеют некоторые отличия, например находятся в более «переднем» положении на передне-задней оси (т.е. ближе к переднему мозгу, больше клеток экспрессируют FOXG1 и т.п.) от нервных клеток, индуцированных с применением LDN. Соответственно, хотя LDN использовался вместо Noggin для ингибирования BMP, среди других сигнальных путей,

Noggin и LDN возможно обладают другими типами активности, помимо ингибирования BMP.

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

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

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

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

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

Наблюдалось очень маленькое количество выживших TH+ нейронов через 4,5 месяца после трансплантации (< 50 TH+ клеток / животное) в трансплантатах из предшественников ДА нейронов, полученных из розеток, Фиг. 16A. Однако, в противоположность TH+ клеткам, клетки, маркированные GFP (GFP находился под контролем убиквитарного промотора),

показали довольно хорошую выживаемость после трансплантации. Это говорило о том, что клетками с наиболее хорошей выживаемостью после трансплантации были нейронные клетки, не относящиеся к ДА нейронам (16B). Несколько клеток, полученных из трансплантата (hNA+, зелёные), одновременно экспрессировали TH (красные), что также говорило о том, что большинство трансплантированных клеток человека относятся к фенотипам нейронов, не являющихся ДА нейронами, Фиг. 16C. Секции Фиг.16 D-E показывают, что, несмотря на очень плохую выживаемость in vivo, наблюдалось некоторое улучшение (варьируемое в низкой и высокой степени) в нескольких поведенческих тестах, таких как тест на вращение, индуцированное амфетамином, (D), тест с цилиндром и спонтанные вращения (E).

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

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

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

В приведенных ниже примерах описано применение примеров клеток из Раздела I для скрининга низкомолекулярных соединений и определения, приведет ли их применение к

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

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

A. CHIR99021 (CHIR) индуцировал высокие уровни предшественников ДА нейронов среднего мозга к 11 дню культивирования. Как описано в настоящем документе, обработка соединением CHIR99021 (CHIR), эффективным ингибитором GSK3β, который, как известно, существенно активирует передачу сигнала WNT, индуцировала LMX1A в FOXA2+ предшественники вентральной пластинки (Фигура 1a). CHIR был более эффективен, чем рекомбинантный Wnt3A или Wnt1, в индукции экспрессии LMX1A. Эффективность индукции LMX1A зависела от времени обработки CHIR, максимальный эффект достигался на 3-11 день (Фигура 5). CHIR индуцировал совместную экспрессию FOXA2/LMX1A, а другие факторы, такие FGF8, обладали только незначительными эффектами (Фигура 6). Индукция совместной экспрессии FOXA2/LMX1A требовала значительной активации передачи сигнала SHH с использованием пурморфамина,

низкомолекулярного агониста, самостоятельно или в комбинации с рекомбинантным SHH (Фигруа 7).

Обработка агонистами SHH (пурморфамин + SHH) и FGF8 (S/F8) в отсутствие CHIR99021 демонстрировала гораздо более низкую экспрессию FOXA2 к 11 дню и полное отсутствие экспрессии LMX1A (Фигура 1a,b). Двойное ингибирование SMAD (обработка LDN-193189 + SB431542 = "LSB") не приводила к образованию экспрессирующих FOXA2 клеток, но не давала подгруппы LMX1A+ клеток (Фигура 1a,b). Маркер передней области OTX2 был устойчиво индуцирован в культурах, обработанных LSB и LSB/S/F8/CHIR, но не в условиях LSB/S/F8 (Фигура 1a,c). Проводились систематические сравнения этиз трех условий культивирования (Фигура 1d) с использованием глобального временного профайлинга экспрессии генов. Иерархическое выделение кластеров дифференциально экспрессировавшихся генов позволило различать эти три набора условий обработки на 11 день дифференцировки (Фиг. 8a). FOXA1, FOXA2 и несколько других мишеней SHH ниже по каскаду, включая PTCH1, были среди наиболее дифференциально регулировавшихся транскриптов в LSB/S/F8/CHIR в сравнении с наборами обработки LSB (Фиг. 1e). Экспрессия LMX1A, NGN2, и DDC указывала на предопределённость пути развития в предшественника ДА нейрона среднего мозга уже на 11 день (Фиг. 1e,f). В отличие от этого, культуры LSB на 11 день были обогащены маркерами предшественников дорсального заднего мозга, такими как HES5, PAX6, LHX2, и EMX2. Прямое сравнение LSB/S/F8/CHIR с обработкой LSB/S/F8 (Фиг. 1f) подтвердило селективное обогащение маркеров предшественников ДА нейронов среднего мозга в группе LSB/S/F8/CHIR и указывало на идентичность предшественников гипоталамуса в культурах, обработанных LSB/S/F8, на основании дифференциальной экспрессии RAX1, SIX3, и SIX6 (см. также экспрессию POMC, OTP на Фиг. 2d ниже). Полный список дифференциально экспрессировавшихся транскриптов в Таблицах 1, 2 и онтологический анализ генов на Фиг. 8b (DAVID; http://david.abcc.ncifcrf.gov), подтвердили обогащение канонического сигнального пути WNT при обработке CHIR. Первичные данные ещё недоступны на GEO worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ accession#: [TBD]). Сравнительный временной анализ экспрессии генов маркеров предшественников ДА среднего мозга (Фиг. 1g) с маркерами пути развития передних и вентральных нейронов, не являющихся ДА (Фиг. 1h), привел к выявлению трех типов индукции: i) LSB: дорсальный задний мозг; ii) LSB/S/F8:

вентральный/гипоталамический и iii) LSB/S/F8/CHIR: соответствующий предшественнику ДА среднего мозга.

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

Материалы и методы в целом описаны в настоящем документе: Линии человеческих ЭСК ESC (H9, H1) и иПСК (2C6 и SeV6) обрабатывали в соответствии с модифицированным протоколом индукции вентральных пластинок (Fasano, и др., Cell Stem Cell 6:336-347 (2010), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки), основанном на двойном ингибировании SMAD (Dual SMAD-inhibition) (Chambers, и др. Nat. Biotechnol. 27:275-280 (2009), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Время воздействия реагентов SHH C25II, пурморфамина, FGF8 и CHIR99021 на вентральные пластинки среднего мозга оптимизировали для получения новых популяций ДА нейронов (см. Фиг. 1d). После индукции вентральных пластинок последующее созревание (11-25 дней или дольше 25 дней в культуре до по меньшей мере 100 дней в культуре) осуществляли в среде для дифференцировки на основе Neurobasal/B27 в присутствии факторов выживаемости и созревания ДА нейронов (Perrier, и др. Proc Natl Acad Sci U S A 101:12543-8 (2004), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки), таких как AA, BDNF, GDNF, TGFβ3 и dbcAMP (подробности приведены в полном описании метода). Фенотип полученной популяции ДА нейронов тщательно исследовали иммуноцитохимическими методами, методом количественной ОТ-ПЦР, определения глобального профиля экспрессии генов, ВЭЖХ-анализа для определения дофамина и регистрации электрофизиологических характеристик in vitro. Исследования in vivo

осуществляли на грызунах с гемипаркинсонизмом (мыши или крысы, которым токсин 6OHDA был введён в одно полушарие мозга). Указанные исследования проводили на невзрослых мышах NOD-SCID IL2Rgc (Jackson labs) и взрослых крысах Sprague Dawley из Taconic Farms, у которых вызывали повреждения 6-гидроксидопамном посредством стереотактических инъекций указанного токсина как описано ранее, а также на двух взрослых макаках-резус, получавших односторонние инъекции MPTP в сонную артерию.

ДА нейроны вводили путем стереотактической инъекции в полосатое тело животных (150 x 103 клеток мышам, 250 x 103 клеток крысам) и суммарно 7.5 x 106 клеток (распределённых в 6 участков; по 3 с каждой стороны мозга) макакам. Поведенческие тесты проводили ежемесячно после трансплантации, включая тест на вращение, индуцированное амфетамином, а также тест на фокальную акинезию ("stepping test", шаговый тест) и тест на использование конечностей (тест в цилиндре). Крыс и мышей умерщвляли на 18-20 неделе, а приматов - через 1 месяц после трансплантации. Изучение характеристик трансплантатов осуществляли посредством стереологического анализа количества клеток и объёма трансплантата, а также посредством тщательного исследования фенотипа с использованием иммуногистохимических методов.

Культура недифференцированных ЭС клеток человека. Линии клеток hESC H9 (WA-09, XX, 27-55 пассажей после 10/2009), H1 (WA-01, XY, 30-40 пассажей после 6/2010) и линии клеток iPS 2C6 (Kim, *и др. Cell Stem Cell* 8:695-706 (2011), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) (XY, 20-30 пассажей) и SeV6 (XY, 20-30 пассажей; получены из эмбриональных фибробластов MRC-5 с применением неинтегрирующей 4-х факторной векторной системы Sendai (Ban, и др. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A (2011) 108(34):14234-14239:10,1073/pnas.1103509108, цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) поддерживали на эмбриональных фибробластах мыши при расчётных концентрациях посева в диапазоне от 0,5 x10^3 на $см^2$ до 100 x10^3 на $см^2$ на по ЭС клеткам человека, при которых клетки склонны к образованию кластеров (MEF, Global Stem, Rockville, MD) в оптимальной среде для ЭС клеток человека, содержащей 20% заменителя сыворотки Knockout serum replacement (KSR, Invitrogen, Carlsbad, California) (как описано ранее (Kim, *и др. Cell Stem Cell* 8:695-706 (2011), цитируемый источник включен в настоящее

описание посредством ссылки). Используемое количество заменителя сыворотки Knockout может варьировать в диапазоне от 0% до 40%.

Индукция нейронов. Для индукции дофаминовых нейронов вентральной пластинки среднего мозга использовали модифицированную версию двойного ингибирования SMAD (Chambers, *и др. Nat. Biotechnol.* 27:275-280 (2009), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) и протокол индукции вентральных пластинок (Fasano, *и др. Cell Stem Cell* 6:336-347 (2010), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки), основанного на воздействии в течение определённого времени реагентами LDN-193189 (100 нМ (в диапазоне концентраций 0,5-50 мкМ, Stemgent, Cambridge, Massachusetts), SB431542 (10мкМ (в диапазоне концентраций 0,5-50 мкМ, Tocris, Ellisville, MI), SHH C25II (100 нг/мл (в диапазоне концентраций 10-2000 нг/мл, R&D, Minneapolis, MN), пурморфинамином (2мкМ (в диапазоне концентраций 10-500 нг/мл, Stemgent), FGF8 (100 нг/мл (в диапазоне концентраций 10-500 нг/мл, R&D) и CHIR99021 (CHIR; 3мкМ (в диапазоне концентраций 0,1-10 мкМ, Stemgent). Замечание: в протоколе индукции вентральных пластинок обработка «SHH» относится к обработке, т.е. приведение клеток в контакт с комбинацией SHH C25II 100 нг/мл + пурморфамин (2 мкМ). Клетки высевали (35-40 x 10^3 клеток/$см^2$) и выращивали в течение 11 дней на геле «matrigel» или «geltrex» (использовались в том виде, в котором приобретены) (BD, Franklin Lakes, New Jersey, США) в среде с заменителем сыворотки Knockout (KSR), содержащей DMEM, 15% KSR, 2 мМ L-глютамин и 10 мкМ (в диапазоне концентраций 1 - 25 мкМ) β-меркаптоэтанол. Среду KSR последовательно замещали средой N2, начиная с 5 дня дифференцировки, смешивая их в соотношениях 75%(KSR):25%(N2) на 5-6 день, 50% (KSR):50%(N2) на 7-8 день и 25% (KSR):75% (N2) на 9-10 день, как описано ранее (Chambers, *и др. Nat. Biotechnol.* 27:275-280 (2009), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). На 11 день среду заменяли на среду Neurobasal/B27 (разведение 1:50) /L-Glut-содержащую (эффективный диапазон 0,2-2 мМ) среду (NB/B27; Invitrogen), дополненную CHIR (до 13 дня) и BDNF (полученный из мозга нейротрофный фактор, 20 нг/мл в диапазоне от 5 до 100; R&D), аскорбиновой кислотой (AA; 0,2 мМ (в диапазоне концентраций 0,01 - 1 мМ), Sigma, St Louis, MI), GDNF (нейтрофный фактор глиальных клеток, 20 нг/мл (в диапазоне концентраций 1 - 200 нг/мл); R&D), TGFβ3 (трансформирующий фактор роста типа β3, 1 нг/мл (в диапазоне концентраций 0,1 - 25 нг/мл); R&D), дибутирил цАМФ (0,5 мМ

(в диапазоне концентраций 0,05 - 2 мМ); Sigma), и DAPT (10 мМ (в диапазоне концентраций 0,5 - 50 нМ); Tocris,) в течение 9 дней. На 20 день клетки подвергали диссоциации с применением Accutase® (Innovative Cell Technology, San Diego, California) и пересевали в условиях повышенной плотности клеток (например, 300-400 тыс. клеток/см^2) на чашки, предварительно покрытые полиорнитином (PO); 15 мкг/мл (в диапазоне концентраций 1 - 50 мкг/мл) / ламинином (1 мкг/мл) (в диапазоне концентраций 0,1- 10 мкг/мл) / фибронектином (2 мкг/мл (в диапазоне концентраций 0,1- 20 мкг/мл) в среде для дифференцировки (NB/B27 + BDNF, AA, GDNF, dbcAMP (в диапазоне концентраций, указанных в настоящем описании), TGFβ3 и DAPT (в диапазоне концентраций, указанных в настоящем описании) до достижения желаемой стадии созревания для конкретного эксперимента.

Для индукции ДА нейронов, основанной на розеточных структурах, частично использовали ранее описанные протоколы (Perrier, и др. Proc Natl Acad Sci U S A 101:12543-8 (2004), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) с по меньшей мере одним исключением, когда двойное ингибирование SMAD использовали для ускорения начальной стадии индукции нейронов. Вкратце, ЭСКч индуцировали для нейронного пути развития совместным культивированием с облучёнными клетками MS5 в среде KSR с добавлением SB431542 и Noggin (250 нг/мл (в диапазоне концентраций 10-1000 нг/мл); R&D), с 2-8 дней и SHH+FGF8 с 6-11 дней дифференцировки. После 11 дней в среде KSR нейронные розетки собирали вручную и выращивали (стадия P1) в среде N2 с добавлением SHH, FGF8, BDNF и AA как описано ранее (Perrier, *и др. Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12543-8 (2004), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). После 5-7 дней на стадии P1 розетки снова собирали вручную и измельчали в порошок с последующей инкубацией в не содержащем Ca^2/Mg^2 сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) в течение 1 часа и пересевали на чашки, покрытые полиорнитином (PO) / ламинином / фибронектином. Составление паттерна с SHH/FGF8 продолжали в течение 7 дней на стадии P2 с последующей окончательной дифференцировкой в присутствии BDNF, AA, GDNF, TGFb3 и dbcAMP как описано выше до достижения желаемой стадии созревания для конкретного эксперимента (обычно 5-7 дней для экспериментов по трансплантации или 32 дня для функциональных экспериментов *in vitro*).

Анализ экспрессии генов. Тотальную РНК выделяли в ходе дифференцировки в следующие дни: 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 и 25 для каждого эксперимента с условиями: контроль

LSB, LSB/SHH/FGF8 и LSB/SHH/FGF8/CHIR с применением набора RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Для анализа на биочипах тотальную РНК обрабатывали на аппарате MSKCC Genomic core и гибридизовали на биочипах в виде бусин Illumina Human ref-12 в соответствии с инструкцией производителя. Сравнения осуществляли каждый день и для каждого набора условий с применением пакета LIMMA от Bioconductor (worldwideweb.bioconductor.org). Гены, у которых скорректированное значение P было меньше 0,05, а кратность изменения экспрессии была выше двух, считали статистически значимыми. Некоторые из описательных анализов данных на биочипах и представление выполняли с применением коммерчески доступного программного пакета (Partek Genomics Suite (версия 6.10,0915)). Для анализа количественной ОТ-ПЦР тотальную РНК на 25 день для каждого набора условий подвергали обратной транскрипции (Quantitech, Qiagen) и амплифицированный материал анализировали с применением коммерчески доступной тест-системы «Taqman gene expression assays» (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) с нормировкой данных по HPRT. Каждая точка представляет 9 технических повторов из 3 независимых биологических образцов. Первичные данные экспериментов на биочипах ещё не доступны на GEO worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov/geo).

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

Мыши. Мышей, нокаутных по *NOD-SCID IL2Rgc* (весом 20–35 г; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, США) подвергали анестезии кетамином (90 мг/кг; Akorn, Decatur, IL) и ксилазином (4 мг/кг; Fort Dodge, IA). 6-гидроксидофамин (10 мкг (в диапазоне концентраций 0,1- 20 мкг), 6-OHDA (Sigma-Aldrich) вводили стереотактически в полосатое тело (стриатум) со следующими координатами (в миллиметрах): AP, 0,5 (от брегмы; в качестве точки отсчёта для стереотактического хирургического вмешательства использовали шов черепа); ML, -2,0; DV, -3,0 (от твёрдой мозговой оболочки, мембраны покрывающей мозг, использовавшейся в в качестве точки отсчёта). Мыши с успешными поражениями (в среднем > 6 вращений в

минуту) были выбраны для трансплантации. Общее количество 150 x 10^3 клеток вводили в объёме 1,5 мкл в стриатум по следующим координатам (в мм): AP, 0,5; ML, -1,8; DV, 3,2. Мышей умерщвляли через 18 недель после трансплантации.

Крысы. Взрослых самок крыс Sprague-Dawley (Taconic, Hudson, NY, США) массой 180-230 г в ходе хирургических процедур анестезировали кетамином (90мг/кг) и ксилазином (4мг/кг). На одной стороне наносили повреждения медиального пучка переднего мозга нигростриального пути при помощи стереотакстических инъекций 6-OHDA (3.6 мг/мл в 0.2% аскорбиновой кислоте и 0.9% физрастворе, Sigmав два участка (Studer, *et al. Nature Neurosci.* 1:290-295 (1998), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Крыс отбирали для трансплантации, если вызванное амфетамином вращение превышало 6 поворотов в минуту через 6-8 недель после инъекции. 250 x 103 клеток трансплантировали в стриатум каждого животного (Координаты: AP +1.0мм, ML -2.5мм и V-4.7мм; гребёнка установлена на -2,5). Контрольные животные получали вместо этого ФБР. Хирургические процедуры описаны ранее (Studer, *и др. Nature Neurosci.* 1:290-295 (1998), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Ежедневные внутрибрюшинные инъекции циклоспорина 15 мг/кг (Bedford Labs, Bedford, OH) были начаты за 24 часа перед трансплантацией клеток и продолжались до умерщвления, через 20 недель после трансплантации клеток.

Приматы. Двух взрослых (17-18 лет; 10-12 кг; самки) макак-резус приводили в гемипаркинсоновское состяние посредством введения MPTP в сонную артерию с последующим еженедельным внутривенным введением MPTP для создания двустороннего паркинсоновского синдрома (Kordower, *и др. Science* 290:767-773 (2000), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). У обоих животных наблюдались паркинсоновские симптомы, соответствующие повреждениям от умеренной до тяжелой степеней, основанным на анализе поведения, включая сгорбленную позу, подволакивание ноги и симптомы мышечной ригидности (непластичность движений), игнорирование (моторное восприятие латерального стимула) и брадикинезию (замедленная инициация движения). Эти параметры могут быть оценены на обезьянах с применением модифицированной клинической шкалы оценки паркинсонизма (CRS). В день операции по тренсплантации животным вводили тренквилизатор кетамин (3,0 мг/кг внутримышечно) и дексдомитора (0,02-0,04 мг/кг внутримышечно), интубировали, чтобы поддерживать

стабильную вентиляцию дыхательных путей и подвергали анестезии изофлураном. Затем их помещали в стереотактическую рамку для хирургического вмешательства. Обеих макак-резус подвергали операции однократно, с тремя внутричерепными инъекциями культур ДА, полученны из вентральных пластинок человека, основываясь на стереотаксических координатах (Paxinos, *и др. The Rhesus Monkey Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press, 2000), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Двусторонние инъекции клеток (10 мкл на инъекцию; 125000 клеток/мкл) осуществляли в три положения (1 - задний хвостовой придаток, 2-пре-комиссуральную скорлупу и вышележащее белое вещество) общим объёмом 30 мкл на полушарие. Использовали инфузионный насос, присоединённый к стереотаксическому микроманипулятору, для доставки клеток при скорости 1 мкл/мин с применением шприца Hamilton объёмом 50 мкл с иглой 28 G. После завершения инъекций иглу оставляли на месте на 2-5 минут, чтобы инфузат смог диффундировать из наконечника шприца, а затем медленно извлекали шприц. Немедленно после операции животные получали анальгетик (бупренекс, 0,01 мг/кг внутримышечно, два раза в день в течение 72 часов после хирургического вмешательсва; мелоксикам, 0,1 мг/кг подкожно, один раз в день в течение 72 часов после хирургического вмешательсва), а также антибиотик (цефазолин, 25 мг/кг внутримышечно, два раза в день) в течение 72 часов после хирургического вмешательства. Животные получали циклоспорин А (Neoral, Sandimmune) перорально (30 мг/кг со снижением до 15 мг/кг) ежедневно, начиная за 48 часов до хирургического вмешательства и до момента умерщвления, в течение одного месяца после трансплантации.

Поведенческие тесты. Тест с вызванным амфетаминами вращением (мыши и крысы) и тест с шаганием (крысы) проводили перед трнасплантацией и через 4, 8, 12, 18 недель после трансплантации. Вращательное поведение у мышей регистрировали через 10 минут после внутривенного введения d-амфетамина (10 мг/кг, Sigma) и регистрировали в течение 30 минут. Вращательное поведение у крыс регистрировали через 40 минут после внутривенного введения d-амфетамина (5 мг/кг) автоматически оценивали с применением системы VideoMot2 (TSE, Германия). Данные представляли в форме среднего числа вращений в минуту. Использовали модифицированный шаговый тест с Blume, *et al. Exp. Neurol.* 219:208-211 (2009) and Crawley, *et al. What's Wrong With My Mouse: Behavioral*

Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice (Wiley-Liss, 2000), все источники включены в настоящее описание посредством ссылки. Вкратце, каждую крысу помещали на плоскую поверхность, задние наги поднимали, аккуратно держа за хвост таким образом, что стола касались только передние лапы. Экспериментатор оттаскивал крысу назад на 1 метр с равномерной скоростью. Подсчитывал число компенсирающих шагов контралатеральной и ипсилатеральной лапами. Данные представляли в форме процентного отношения шагов контралатеральной лапой / количество компенсирующих шагов контралатеральной лапой + ипсилатеральной лапой. Тест с цилиндром проводили, помещая крысу с стеклянный цилиндр и подсчитывая число касаний ипсилатеральной лапой по сравнению с контралатеральной (из 20 касаний) стенки цилиндра, как описано ранее (Tabar, *et al. Nature Med.* 14:379-381 (2008), цитируемый источник включен в настоящий текст посредством ссылки). Ниже описана обработка тканей для грызунов и приматов.

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

Приметы: Животных умерщвляли под глубокой анестезией кетамином (10 мг/кг, внутримышечно (В.М.)) и фенобарбиталом (25 мг/кг, внутривенно (ВВ)) путем перфузирования сердца гепаринизированным 0.9% физраствором, а затем свежим холодным 4% фиксирующим ПФА (pH7.4). Непосредственно после первичной фиксации мозг извлекали из черепа и фиксировали в 4% ПФА, где он свободно плавал в течение 24-36 часов. Затем мозги промывали и ресуспендировали в 10% сахарозе при медленном встряхивании 4°С и оставляли «вымачиваться». Затем это процесс повторяли в 20% сахарозе, а затем в 30% сахарозе. Цельные мозги нарезали по фронтальной плоскости (венечному шву) на серийные срезы толщиной 40 мкм на охлаждаемом санном микротоме и хранили плавающим в криопротективной среде при -20° Цельсия.

Иммуногистохимия: Клетки фиксировали в 4% PFA и блокировали 1% бычьим сывороточным альбумином (БСА) с 0.3% буфером Triton. Срезу ткани мозга промывали в холодном ФБР и обрабатывали аналогичным образом. Первичные антитела разбавляли в 1-5% БСА или нормальной сыворотке козы и инкубировали в соответствии с инструкциями

производителя. подробный список антител и источников приведен в Таблице 6. Соответствующие Alexa488, Alexa555 и Alexa647-конъюгированные вторичные антитела (Molecular Probes, Carlsbad, California, США) с веществом для контрастного окрашивания ядер 4′,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (Thermo Fisher, Rockford, Illinois, США). Для некоторых анализов использовали биотинилированные вторичные антитела с последующей визуализацией хромогеном DAB (3,3'-диаминобензидин).

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

Регистрация электрофизиологических параметров: Культуры переносили в регистрирующую камеру на прямой микроскоп, оборудованный 40X водоиммерсионным объективом (Eclipse E600FN; Nikon); культуры перфузировали физраствором, содержащим, в мМ: 125 NaCl, 2.5 KCl, 25 $NaHCO_3$, 1.25 NaH_2PO_4, 2 CaCl, 1 $MgCl_2$ и25 глюкозы (34 °C; насыщенным 95% O_2-5% CO_2; pH 7.4; 298 мОсм/л). Скорость потока физраствора составляла 2-3 мл/мин при пропускании через встроенный нагреватель (SH-27B с контроллером TC-324B; Warner Instruments). Нейроны визуализировали методом видео-микроскопии с охлажаемоей цифровой ПЗС-камерой (CoolSNAP ES^2, Photometrics, Roper Scientific, Tucson, Arizona, США). Для регистрации электрофизиологических параметров отбирали клетки, похожие по форме на нейроны, с хорошим ветвлением дендритов. Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp) на целых соматических клетках в текущей конфигурации фиксации осуществляли с применением усилителя MultiClamp 700B (Molecular Devices). Сигналы фильтровли ф диапазоне 1-4 кГц и оцифровывали на 5-20 к ГЦ с применением Digidata 1440A (Molecular Devices). Регистрирующие контактные электроды были выполнены из волокна из боросиликатного волокна (Sutter Instruments), вытянутого на

пуллере Flaming-Brown (P-97, Sutter Instruments) имели сопротивление 4-6 МОм в ванне. Электроды заполняли внутренним раствором, содержащим в мМ: 135 K-$MeSO_4$, 5 KCl, 5 HEPES, 0.25 EGTA, 10 фосфокреатина-ди(трис), 2 АТФ-Mg и 0.5 ГТФ-Na (pH 7.3, осмолярность доводили до 290-300 мосм/л). Мостиковый усилитель настраивали таким образом, чтобы компенсировать сопротивление электродов, и следили за ним. Емкость электродов компенсировали. Если последовательное соединение возрастало >20% в ходе фиксации потенциала даннные отбрасывали, поскольку повышение сопротивление указывает на частичные технические неполадки в ходе измерения.

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

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

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

Среда N2 для дифференцировки ЭСКч (1 литр): 985 мл дистиллированной H_2O с порошком DMEM/F12, 1.55 г глюкозы (Sigma, № по катологу G7021), 2.00 г бикарбоната натрия (Sigma, № по катологу S5761), путресцин (аликвота объемом 100 мкл из раствора 1.61 грамм в 100 мл дистиллированной воды; Sigma, № по каталогу P5780), прогестерон (аликвота 20 мкл раствора 0.032 грамм в 100 мл 100% этанола; Sigma, № по катологу P8783), селенит натрия (аликвоты объемом 60 0.5 мМ раствора в дистиллированной воде; Bioshop Canada, № по каталогу SEL888), и 100 мг трансферрина (Celliance/Millipore, № по катологу 4452-01), и 25 мг инсулина (Sigma, № по катологу I6634) в 10 мл 5 мМ NaOH.

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

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

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

В целом, ниже приведен краткий обзор примеров методов мониторинга продукции зрелых ДА нейронов для использования для трансплантации (см. также условия, показанные в Таблице 7. День 13 – это стадия вентральной пластинки среднего мозга, характеризующаяся одновременной экспрессией FOXA2/LMX1A. В дополнение к экспрессии FOXA2 и LMX1A наблюдаются потеря экспрессии OCT4 и отсутствие индукции маркеров переднего мозга PAX6 и FOXG1. День 25 – это стадия предшественников ДА нейронов среднего мозга, характеризуюшаяся продолжающейся экспрессией FOXA2/LMX1A и экспрессией нейрональных (TUJ1) и ДА маркеров (NURR1, TH). В ходе пролиферации Ki67+ клеток наблюдают число предшественников нейронов среднего мозга

PAX6 и FOXG1, где эти маркеры нежелательны. Для несмещенного и быстрого получения количественных данных иммунофлюоресценции использовали микроскоп Operetta High Content Microscope (Perkin Elmer). Для каждого маркера также осуществляли анализ методом кПЦР в реальном времени для подтверждения результатов иммунофлюоресцентного аналтиза. В некоторых вариантах реализации линии клеток (культуры), прошедшие эти предварительные *in vitro* тесты, используют для трансплантации, см. Таблицу 7. В некоторых вариантах реализации зрелые ДА нейроны на 25 день подвергали криоконсервации без сыворотки (в диапазоне от 20 дня до 25 дня) в культуральной среде + 7% ДМСО (в диапазоне 3%-12%) до размораживания для применени в трансплантации. В некоторых вариантах реализации образцы клеток хранят в жидком азоте. В некоторых вариантах реализации клетки хранят в холодильниках с низкой температурой. В других вариантах реализации предусмотрено применение криопротекторов, таких как миоинозитол, поливиниловые спирт, заменитель сыворотки, ингибиторы каспазы, в дополнение к ДМСО. После размораживания исследовали клетки перед трансплантацией исследовали на жизнеспособность, экспрессию маркеров и т.д. В некоторых вариантах реализации размороженные клетки исследовали на сохранение функции в продолжительных *in vitro* и *in vivo* тестах для мониторинга условий замораживания и хранения.

B. Исследования, направленные на выявление дополнительны факторов для получения функциональных ДА нейронов. Предусмотрены дополнительные эксперименты по «исключению» и «включению» для компонентов тканевой культуры для применения в получении клеток в соответствии с настоящими изобретениями. Например, было показано, что хотя применение FGF8 приводило к получению клеток в соответствии с настоящими изобретениями, он не был обязательным компонентом для получения этих клеток. Эти эксперименты будут продолжены с дополнительным реагентами, например, с теми, которые приведены в Таблице 8, которые могут служить добавками к культурам клеток в дополнение к четырем «основным» молекулам, которые обеспечивали получение ДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями, т.е. i) ингибитору Alk4/5/7 ("TGFβ-) (SB431542), ii) ингибитору Alk2/3 ("BMP") (LDN-193189), iii) агонисту Smoothened ("SHH") (Пурморфамин) и iv) ингибитору GSK3β- (CHIR99021).

Как описано здесь, применение SB431542 и LDN193189 продемонстрировало эффективное превращение плюрипотентных стволовых клеток, а добавление пурморфамина

и CHIR99021 к этим клеткам продемонстрировало индукцию вентральной пластинки среднего мозга. Другие химические соединения и белки использовались или могут использоваться для обеспечения долговременной трофической поддержки и/или ускоренной дифференцировки. Некоторые из этих соединений будут использоваться в дальнейших тестах для определения их роли в описанной здесь дифференцировки клеток.

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

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

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

Ниже приведен пример стандартизированного выбора в тестах для улучшения стратегий валидации. В случае ЭСКс, заранее определенная смесь недифференцированных (Oct4+/Nanog+) клеток с полученными из ЭСч ДА нейронами будет применяться для отслеживания клинических симптомов, указывающих на масс-эффект и/или гибель животного, в экспериментах с животными. Будут выполняться измерения ответа на дозу для

одной ЭС клетки человека на 10000 полученных из ЭСКч ДА нейроны, 1/5000, 1/1000 и 1/100. Клетки будут вводить в стриатум и животных будут подвергать иммуноподавляющей обработке. За крысами будут тщательно следить и умертвят после проявления неврологических симптомов или не позднее, чем через 6 месяцев. Мозги будут исследовать на объем и состав трансплантата, как описано в настоящем текста. Соотношения клеток будут корректировать пока не будет установлен явный порог для образования тератом in vivo. Для определения мешающих уровней примитивных нейроэктодертальных предшественников будет использоваться аналогичная стратегия. Присутствие ранних нейрональных предшественников связано со значительным потенциалом для пролиферации и широким спектром дифференцировки по пути центральной нервной системы, а также по пути периферической нервной системы (ПНС). Исследование трансплантата будет заключаться ИГХ анализа клеток розеткоподобных структур (экспрессия PLZF), их потомства в ЦНС (нейрональных предшественников, экспрессирующих Nestin/Sox2 или предшественников переднего мозга, экспрессирующих FoxG1), а также объемов трансплантатов и коэффициентов пролиферации (% Ki67+ от общего числа выживших клеток).

IV. Болезнь Паркинсона.

Болезнь Паркинсона (БП) является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием; согласно оценкам им страдают 4,1-4,6 миллиона пациентов в мире, и согласно предсказанием эта цифра удвоится к 2030. Это заболевание является вторым по распространенности после болезни Альцгеймера, им страдает приблизительно 1 миллион пациентов в США, и этот диагноз ставят еще 60 000 пациентам каждый год. Данное заболевание несет серьезную социоэкономическую нагрузку и связано с высокой смертностью и опасностью для пациентов, объединенные прямые и непрямые затраты, связанные с БП, включая затраты на здравоохранение и потерю дохода оцениваются приблизительно в $25 миллиардов в год только в США. С настоящее время не существует средства лечения болезни Паркинсона (БП), являющейся возрастным, прогрессирующим заболеванием, приводящим к потери трудоспособности. Патогенез болезни Паркинсона характеризуется выборочной потерей ДА нейронов в черной субстанции. Соответственно, основной характеристикой БП является прогрессивная, тяжелая и необратимая потеря дофаминовых (ДА) нейронов, приводящая в итоге двигательной дисфункции, в конечном

итоге ведущей к утрате трудоспособности. Несмотря на то, что были разработаны фармакологические, основанные на упражнениях и хирургические средства лечения БП, ни один из этих подходов не обеспечивает адекватное восстановление функции ДА нейронов. Долгосрочное управление двигательными симптомами у пациентов часто остается субоптимальным, и, несмотря на понимание важности прогрессирующих не реагирующих на дофамин двигательных и недвигательных симптомов, фундаментальная проблема долгосрочного управления реагирующими на дофамин симптомами по-прежнему представляет собой область настоятельной терапевтической потребности. При БП обнаруживаются многочисленные патологии, поражающие как центральную, так и периферическую нервную систему, основные признаки БП (брадикинезия, ригидность и частично тремор) глубоко связаны с потерей ДА нейрональных клеток и реагируют на дофамин. Соответственно, предусмотрено лечение БП с применением замещения нейрональных клеток ввиду достаточно селективной потери ДА нейронов среднего мозга, отвечающей за большинство двигательных симптомов указанного заболевания. В головном мозге здорового человека содержится приблизительно 1 млн ДА нейронов. Соответственно, в одном варианте реализации предусмотрено, что для замещения ДА нейронов требуется относительно незначительное число выживших клеток по сравнению с большинством других расстройств в ЦНС.

Одна из проблем при разработке клеточной терапии БП заключалась в идентификации подходящего источника клеток для применения при замещении нейронов. Указанный поиск продолжался более 30 лет, и были предложены многие потенциальные источники для замещения ДА нейронов (Kriks, Protocols for generating ES cell-derived dopamine neurons in Development and engineering of dopamine neurons (eds. Pasterkamp,R.J., Smidt, & Burbach) (Landes Biosciences, 2008; Fitzpatrick, et al., Antioxid. Redox. Signal. 11:2189-2208 (2009)). В прошлом некоторые из указанных источников были доведены до ранних стадий клинических испытаний, в том числе катехоламинергические клетки мозгового вещества надпочечников, Madrazo, et al., N. Engl. J. Med. 316, 831-834 (1987), трансплантаты каротидного тельца (Arjona, et al., Neurosurgery 53: 321-328 (2003)) или инкапсулированные клетки пигментного эпителия сетчатки (исследование сферамина, Bakay, et al., Front Biosci. 9, 592-602 (2004). Однако указанные испытания в большинстве своем не показывали клинической эффективности и приводили к неудовлетворительному долгосрочному выживанию и низким

уровням высвобождения ДА из привитых клеток. Другой подход заключался в трансплантации ДА нейронов фетального среднего мозга, проведенной более чем у 300 пациентов в мире (Brundin, et al., Prog. Brain Res. 184, 265-294 (2010); Lindvall, & Kokaia, J. Clin. Invest 120:29-40 (2010). При терапии с применением фетальной ткани человека у указанных пациентов наблюдались признаки, свидетельствующие о выживании ДА нейронов, и высвобождение ДА in vivo в течение до 10 или 20 лет после трансплантации у некоторых пациентов. Однако у многих пациентов трансплантация фетальной ткани не обеспечивала замещении функции ДА нейронов. Кроме того, при трансплантации фетальной ткани возникает ряд проблем, в том числе малое количество и низкое качество донорной ткани, этические и практические сложности, связанные с получением ткани, и недостаточно охарактеризованная гетерогенная природа трансплантируемых клеток; указанные проблемы относятся к факторам, вносящим вклад в вариабельность клинических исходов. Примеры фетальной трансплантации описаны в источниках: Mendez, et al. Nature Med.(2008)); Kordower, et al. N. Engl. J. Med. 332:1118-1124 (1995); Piccini, et al. Nature Neuroscience 2:1137-1140 (1999). Однако к указанным клиническим результатам прибавились определенные позитивные результаты ранних открытых исследований (Lindvall, et al. Science 247:574-577 (1990); Widner, et al. N. Engl. J. Med. 327:1556-1563 (1992); Brundin, et al. Brain 123:1380-1390 (2000); Freed, et al. N. Engl. J. Med. 327:1549-1555 (1992); Freeman, et al. Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. Ann Neurol 38:379-388 (1995). Однако в ходе двух более крупных спонсированных NIH (Национальными институтами здравоохранения) плацебо-контролируемых клинических испытаний в США были получены скромные результаты (Freed, et al. N. Engl. J. Med. 344, 710-719 (2001); Olanow, et al. Ann. Neurol. 54:403-414 (2003)). Существует множество гипотез относительно ограниченной эффективности, наблюдаемой в ходе испытаний фетальной пересадки у человека, в том числе гипотеза о том, что фетальная пересадка может не обеспечивать достаточного количества клеток, находящихся на надлежащей стадии развития для оптимального благоприятного терапевтического эффекта. Кроме того, фетальная ткань довольно плохо характеризуется в отношении клеточных типов и отличается вариабельностью стадий и качества для каждого из образцов ткани Bjorklund, et al. Lancet Neurol. 2, 437-445 (2003). Другим вносящим вклад фактором может быть вялотекущий

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

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

Предусмотрены дополнительные варианты реализации, включающие стратегии «усовершенствования» для контроля чистоты клеток, содействия разрастанию аксональных волокон, а также включающие новые характеристики безопасности/регуляторные функции стратегий пересадки. Например, в некоторых вариантах реализации продемонстрирован способ очищения клеток, начиная от простого скрининга на поверхностный маркер представляющего интерес типа клеток (такой как CD142) до целенаправленной стратегии обогащения по специфическому типу нейронов. В некоторых вариантах реализации предусмотрено применение указанного способа при получении клеток для применения у человека. Кроме того, в других вариантах реализации предусмотрена сконструированная экспрессия PSA-NCAM для усиления аксонального разрастания для применения при восстановлении нервной ткани in vivo. Такое применение включает стимуляцию

дистанционного аксонального роста для лечения болезни двигательных нейронов, болезни Гентингтона или других расстройств, в первую очередь влияющих на проекционные нейроны. Предусмотрены дополнительные варианты реализации соответствующего стандартам надлежащей производственной практики (GMP) источника плюрипотентных клеток, и т.п. Поскольку для трансплантации с применением способов, описанных в настоящем документе, требуется небольшое число ДА нейронов, и они основаны на относительно простых, экономически эффективных способах с использованием малых молекул, разработанных для индукции ДА нейронов, подразумевается, что стоимость заместительной терапии ДА нейронами в пересчете на пациента будет разумной. Одно из потенциальных биологических ограничений подхода с трансплантацией при БП заключается в том факте, что дегенерация нейронов при БП распространяется на многие типы клеток помимо дофаминовых нейронов среднего мозга, в частности, на поздних стадиях указанного заболевания. Фактически, при долгосрочном исследовании на поздних стадиях БП преобладают не реагирующие на ДА симптомы, приводящие к дисфагии, падениям, деменции и другим значимым патологическим проявлениям. Однако при восстановлении дофаминергической функции предположительно могут улучшаться некоторые недвигательные симптомы. Кроме того, предполагается, что применение происходящих из чЭСК ДА нейронов на ранних стадиях указанного заболевания может предотвращать некоторые из вторичных симптомов БП, в том числе дегенерацию восприимчивых к дофамину популяций стриатума. Однако даже в отсутствие влияния не реагирующих на ДА симптомов указанного заболевания долгосрочное функциональное дофаминергическое восстановление стриатума может представлять собой значительное достижение в рамках лечения указанного, в настоящее время неизлечимого, расстройства. В случае болезни Паркинсона существует несколько альтернативных доступных вариантов терапии, в том числе стратегии на основе применения лекарственных средств и хирургические подходы, такие как глубокая стимуляция головного мозга. Предполагается, что в некоторых вариантах реализации эффективность восстановления будет сопоставима с уровнями, достигаемыми при применении альтернативных вариантов терапии, или будет выше указанных уровней. Предполагается, что в других вариантах реализации применение терапии с трансплантацией указанных зрелых ДА нейрональных клеток будет, в частности, благоприятным для конкретной подгруппы пациентов. В других вариантах реализации предполагается

применение указанной терапии с трансплантацией зрелых ДА нейрональных клеток в дополнение к существующим подходам с использованием лекарственных средств и хирургии. Одно значимое преимущество применения терапии с трансплантацией зрелых ДА нейрональных клеток в соответствии с настоящими изобретениями состоит в уникальной нейровосстановительной природе посттрансплантационного периода, а именно, долгосрочном восстановлении нейрональной функции, что предполагается использовать у пациентов при постепенном снятии лекарственной терапии. Трансплантация клеток предположительно влияет на спектр связанных с ДА симптомов, отличающийся от отвечающего на лекарственные средства или другую терапию. Соответственно, в одном варианте реализации предусмотрено применение трансплантации зрелых ДА нейронов с глубокой стимуляцией головного мозга (DBS). Согласно другому варианту реализации предусмотрено применение трансплантации зрелых ДА нейронов с терапией.

A) **Болезнь Паркинсона и современные варианты терапии**. Значительный прогресс был достигнут в идентификации редких генетических изменений, вносящих вклад в семейные формы БП. Однако в большинстве случаев БП вклад какой-либо потенциальной генетической предрасположенности остается неясным. Традиционные терапевтические стратегии при БП ограничены тем фактом, что к началу клинических симптомов 30–70% всех ДА нейронов черной субстанции необратимо деградируют. Одна из терапевтических опций заключается в фармакологическом замещение дефицита ДА нейронов с применением предшественника ДА L-ДОФА. Однако, несмотря на ярко выраженный начальный ответ на терапию L-ДОФА у некоторых БП-пациентов, долгосрочный клинический исход остается неудовлетворительным, и на поздних стадиях заболевания часто наблюдаются серьезные побочные эффекты терапии L-ДОФА, в том числе двигательные флуктуации и дискинезии. Пульсирующая доставка L-ДОФА играет основную роль в развитии указанных двигательных осложнений на поздних стадиях, соответственно, более «плавная» и более физиологическая доставка дофамина, т.е. например, из трансплантированных клеток в соответствии с настоящими изобретениями, соответственно, была бы очень желательной. Помимо фармакологических стратегий, существует несколько хирургических вариантов лечения. Указанные варианты включают абляцию или функциональную инактивацию клеток в базальных ганглиях посредством паллидотомии, или глубокой стимуляции головного мозга путем нацеленного воздействия на субталамическое ядро или внутреннюю часть бледного

шара. Хотя указанные хирургические опции являются альтернативой для некоторых пациентов, они обеспечивают облегчение симптомов заболевания, но не восстанавливают нормальную ДА-функцию. Кроме того, сообщалось о побочных эффектах хирургического и нехирургического лечения, в том числе неправильное функционирование, инфекции, инсульт, кровотечение и т.п. Другие варианты лечения включают доставку факторов роста, таких как ГНТФ или нейротурин, с применением прямой внутрипаренхимной инфузии или вирусной экспрессии путем генной терапии. Хотя начальные открытые исследования при БП продемонстрировали многообещающие результаты для ГНТФ, последующие контролируемые испытания на большей группе пациентов не подтвердили какого-либо преимущества и указали на потенциальную угрозу безопасности из-за продуцирования антител против ГНТФ у подгруппы пациентов. При доставке нейротурина, молекулы, связанной с ГНТФ, на основе AAV (аденоассоциированного вируса) также не показала какого-либо значимого клинического преимущества в масштабном плацебо-контролируемом многоцентровом исследовании. Недавно появились предварительные результаты исследования фазы 2 инъекций происходящей из AAV декарбоксилазы глутаминовой кислоты (GAD) в субталамическое ядро (Lancet Neurology, апрель 2011 г.) однако клинические преимущества в указанном исследовании были в лучшем случае умеренными. Хотя попытки использования стратегий на основе нейротрофических факторов или альтернативных нейропротекторных стратегий могут приносить пациентам временное облегчение, ни одна из указанных стратегий не способна вернуть /заместить ДА нейроны, уже утраченные в результате заболевания, что является главной целью клеточной заместительной терапии.

B) **Клеточная терапия при БП**. Клинические симптомы при БП становятся очевидными после потери 70–80% дофаминовых нейронов стриатума и приблизительно 50% дофаминовых нейронов черной субстанции. Однако дофаминовые нейроны среднего мозга развиваются к 8,5 неделям после зачатия, при этом убедительные данные о замещении дофаминовых нейронов на протяжении жизни отсутствуют. Соответственно, возраст дофаминовых нейронов к моменту начала заболевания составляет несколько десятилетий, и естественный механизм замещения указанных клеток отсутствует, соответственно, для замещения указанных клеток в головном мозге БП-пациентов может быть необходима трансплантация клеток. Замещение ДА нейронов при БП проводили в 1980-х годах,

используя происходящие из мозгового вещества надпочечников хромаффинные клетки. Указанные гормонпродуцирующие клетки, как было показано, переключают нейротрансмиттерный фенотип с адреналина на ДА при эктопическом введении в ЦНС. Пересадка с применением указанного подхода была проведена у нескольких сотен БП-пациентов по всему миру, однако со временем выяснилось, что выживаемость пересаженных клеток была крайне неудовлетворительной, и они обеспечивали в лучшем случае временный эффект. Соответственно, от клинического применения указанного подхода в скором времени отказались. Напротив, применение пересадки фетальной ткани среднего мозга было основано на более интенсивных доклинических исследованиях в моделях на грызунах, продемонстрировавших устойчивое долгосрочное приживление трансплантатов и функциональное улучшение в панели связанных с ДА поведенческих анализов. Указанные доклинические данные послужили стимулом для продолжения проведения фетальной пересадки в нескольких центрах в конце 1980-х – начале 1990-х гг. Указанные исследования ясно показали, что функциональное долгосрочное приживление трансплантата с увеличенным высвобождением ДА в области пересадки по оценке с применением ПЭТ с флюородопа и последующих гистологических исследований для некоторых пациентов, смерть которых наступила по независимым причинам. Однако при применении фетальных трансплантатов возникают две потенциальные проблемы, связанные с методами клеточной терапии. Первая неожиданная проблема при применении фетальных трансплантатов заключалась в индукции индуцированных трансплантатом дискинезий (GID) у приблизительно 15% пациентов. Хотя механизм GID остается спорным, недавно полученные данные свидетельствуют о том, что серотонинергические нейроны способны к неадекватному накоплению и высвобождению ДА. Другой потенциальный механизм, предложенный для объяснения GID, заключается в неравномерности распределения ДА нейронов, приводящей, соответственно, к образованию «горячих точек» высвобождения ДА. Однако при разработке настоящих изобретений были открыты способы детекции и уменьшения количества серотонинергических нейронов, которые могут обеспечить снижение частоты GID. Кроме того, инъецирование зрелых ДА нейронов может обеспечить равномерное распределение зрелых нейронов, в том числе распространение окончаний дофаминергических волокон в стриатуме хозяина. Другая проблема при лечении с применением фетальной пересадки заключалась (и заключается) в ограниченной

доступности фетальной ткани среднего мозга на подходящей стадии развития. В клинике была опробована альтернативная стратегия для решения проблемы ограниченности ресурсов путем применения фетальных ДА нейронов свиньи. Однако выживание ДА нейронов в указанных ксенотрансплантатах было неудовлетворительным и от указанного подхода отказались полностью. Недавнее исследование с применением пигментного эпителия сетчатки также не показало каких-либо преимуществ. Напротив, применение ЭС-клеток человека в качестве источников трансплантируемых клеток предположительно обеспечит неограниченный источник клеток для получения дофаминовых нейронов для применения при трансплантации.

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

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

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

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

периода клетки дополнительно приводили в контакт со свежим пурморфамином, SHH и FGF8 до 7 дня, и дополнительно приводили в контакт со свежим CHIR, начиная с 3 дня культивирования и до 11 дня, с несколько варьирующими указанными первичными условиями для определения оптимального выхода типов клеток. B. Определение сравнительных характеристик in vitro FOXA2+/LMX1A+ клеток, происходящих из области вентральной пластинки среднего мозга и предшественников ДА клеток, полученных с применением других техник. Систематическое сравнение трех вариантов условий культивирования (фиг. 1d) выполняли с применением глобального временного профилирования генной экспрессии. При иерархической кластеризации дифференциально экспрессируемых генов три варианта обработки разделялись к 11 дню дифференцировки (фиг. 8a). FOXA1, FOXA2 и ряд других нижерасположенных мишеней SHH, в том числе, PTCH1 входили в число большинства дифференциально регулируемых транскриптов в наборах данных для обработки LSB/S/F8/CHIR либо LSB (фиг. 1e). Экспрессия LMX1A, NGN2 и DDC указывала на определение направления дифференцировки предшественников ДА нейронов среднего мозга уже к 11 дню (фиг. 1e,f). Напротив, культуры с LSB были обогащены маркерами предшественников дорсальной части переднего мозга, такими как HES5, PAX6, LHX2 и EMX2. Прямое сравнение обработки LSB/S/F8/CHIR с обработкой LSB/S/F8 (фиг. 1f) подтверждает селективное обогащение по маркерам предшественников ДА нейронов среднего мозга в группе LSB/S/F8/CHIR и свидетельствует о наличии гипоталамических предшественников в обработанных LSB/S/F8 культурах на основании дифференциальной экспрессии RAX1, SIX3 и SIX6 (см. также фиг. 2d, ниже: экспрессия POMC, OTP). Приведен иллюстративный перечень дифференциально экспрессируемых транскриптов, см. таблицы 1, 2; онтологический анализ генов для 11 дня, фиг. 8b (DAVID; http://david.abcc.ncifcrf.gov), подтвердил обогащение по компонентам канонической WNT-сигнализации при обработке CHIR. Исходные данные пока недоступны (GEO, worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov/geo/, № доступа подлежит уточнению). Сравнительный временной анализ генной экспрессии маркеров предшественников ДА нейронов среднего мозга (фиг. 1g) и маркеров направления дифференцировки в антериальные и вентральные клетки, не являющиеся ДА нейронами (фиг. 1h), позволяет разделить три варианта условий индукции следующим образом: i) LSB: характеристики дорсальной части переднего мозга; ii)

LSB/S/F8: характеристики вентральной / гипоталамической части и iii) LSB/S/F8/CHIR: характеристики предшественников ДА нейронов среднего мозга.

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

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

развитием ДА нейронов среднего мозга, однако высокоэкспрессируемого в черной субстанции у человека (фиг. 8c; атлас головного мозга Allen Brain Atlas: http://human.brain-map.org).

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

In vitro и in vivo свойства происходящих из вентральной пластинки ДА нейронов сравнивали со свойствами ДА-подобных нейронов, полученных из промежуточных клеток нейрональных розеток (фиг. 10 и 16). Формирование из нейрональных розеток представляет собой наиболее широко используемую в настоящее время стратегию получения ДА нейронов из чПСК. Оба протокола, на основе вентральных пластинок и на основе розеток, были эффективными для получения TH+ нейронов, способных к долгосрочному выживанию in vitro (50 день дифференцировки; фиг. 3–1a). Однако процент TH+ клеток был значимо выше в происходящих из вентральной пластинки культурах (фиг. 3–1b). Хотя в TH+ клетках при использовании обоих протоколов наблюдалась коэкспрессия NURR1, происходящие из вентральной пластинки ДА нейроны коэкспрессировали FOXA2 и LMX1A (фиг. 3–1a,b и 3–2).

Наблюдались немногочисленные ГАМК и положительные по серотонину (5-HT) нейроны (фиг. 3–1c). ДА и его метаболиты DOPAC и HVA, присутствовали в культурах, полученных с применением любого из протоколов, однако уровни ДА были приблизительно в 8 раз выше в культурах из вентральной пластинки (фиг. 3–1d,e). ДА нейроны среднего мозга демонстрировали экстенсивное разрастание волокон и устойчивую экспрессию зрелых

нейрональных маркеров, в том числе синапсина, транспортера дофамина (DAT), и сопряженного с G-белком калиевого канала внутреннего выпрямления (Kir3.2, также называемый GIRK2, экспрессируется в ДА нейронах компактной части черного вещества (SNpc)) (фиг. 3–1f, фиг. 11). ДА нейроны SNpc in vivo демонстрируют электрофизиологический фенотип, отличающий их от большинства других нейронов в головном мозге. В частности, они спонтанно генерируют спайки на низкой частоте (1–3 Гц). Кроме того, указанные медленные спайки сопровождаются медленным подпороговым осциллирующим потенциалом. Через 2–3 недели in vitro те же указанные физиологические признаки демонстрируют культивированные ДА нейроны SNpc мышей в раннем постнатальном периоде. ДА нейроны, дифференцированные из чЭСК, стабильно (4/4 тестов) демонстрировали указанный отдельный физиологический фенотип (фиг. 3–1g-i).

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

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

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

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

обеспечивали значимого уменьшения вращательного поведения (фиг. 4d), а также наблюдалось массивное избыточное разрастание нейронов (объем трансплантата > 20 мм^3; фиг. 13). Интенсивное избыточное разрастание происходящих из розеток нейрональных клеток, использованных для пересадки, согласно описанию в настоящем документе, было сопоставимо с предыдущей работой группы изобретателей с происходящими из розеток ДА-трансплантатами (Kim, et al. miR-371-3 Expression Predicts Neural Differentiation Propensity in Human Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell 8:695-706 (2011), цитируемый источник включен в настоящий текст путем ссылки) и др. (Hargus, et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107:15921-15926 (2010), цитируемый источник включен в настоящий текст путем ссылки). Указанное избыточное разрастание было предположительно обусловлено более длительными периодами выживания (4,5 месяцев против 6 недель), отсутствия очищения с применением FACS перед трансплантацией и выбором в качестве хозяев мышей NOD-SCID с молчащим IL2Rgc. Число пролиферирующих Ki67+ клеток в полученных из вентральной пластинки трансплантатах было минимальным (< 1% от общего количества клеток), тогда как в происходящих из розеток трансплантатах сохранились включения пролиферирующих предшественников нейронов. Избыточное разрастание нейронов, как полагают, вызвано наличием примитивных антериальных нейроэктодермальных клеток в составе трансплантата (Elkabetz, et al. Genes Dev. 22:152-165 (2008); Aubry, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A 105:16707-16712 (2008), цитируемый источник включен в настоящий текст путем ссылки). Указанную гипотезу подтверждает экспрессия маркера переднего мозга FOXG1 в происходящих из розеток, но не в происходящих из вентральной пластинки трансплантатах. Незначительный процент астроглиальных клеток присутствовал как в происходящих из вентральной пластинки, так и в происходящих из розеток трансплантатах, хотя большинство GFAP+ клеток были отрицательными по маркерам человека, что указывает на происхождение от хозяина (фиг. 13).

Результаты для мышей NOD-SCID с молчащим IL2Rgc, описанные в настоящем документе, продемонстрировали устойчивое долгосрочное выживание FOXA2+/TH+ нейронов, полное обращение индуцированного амфетамином вращательного поведения и отсутствие каких-либо признаков избыточного разрастания нейронов. Однако некоторые из указанных исходов могут быть объяснены специфическим использованием мышей NOD-

SCID с молчащим IL2Rgc. Для тестирования указанной гипотезы культуры полученных из вентральной пластинки ДА нейронов (250×103 клеток) трансплантировали взрослым крысам с очаговыми поражениями6-OHDA и фармакологически индуцированным циклоспорином А иммунодефицитом. Через пять месяцев после трансплантации выживание трансплантатов было устойчивым (фиг. 4e-h), в среднем более чем с 15 000 TH+ клеток, коэкспрессирующих FOXA2 (фиг. 4g) и ядерный антиген человека (hNA) (фиг. 4e); волокна TH+/hNCAM+ выходили из центральной части трансплантата в окружающий стриатум хозяина (фиг. 4f). Помимо FOXA2, TH+ клетки экспрессировали маркеры ДА нейронов среднего мозга PITX3 и NURR1 (фиг. 4h-j). Поведенческие анализы показали полное устранение индуцированной амфетамином вращательной асимметрии, в отличие от подвергшихся ложной трансплантации животных, у которых не наблюдалось улучшений (фиг. 4k). У подвергшихся трансплантации животных также наблюдались улучшения в тесте с шаганием (фиг. 4l) для измерения акинезии передних конечностей, и в тесте с цилиндром (фиг. 4m) – в анализах, независимых от фармакологической стимуляции ДА-системы. Для ДА нейронов человека позднее начало восстановления (приблизительно через 3–4 месяца после трансплантации) является ожидаемым и зависит от скорости созревания in vivo, например, уровней экспрессии DAT (фиг. 4n). Присутствие TH+ клеток, экспрессирующих каналы Kir3.2 (GIRK2) или кальбиндин показывает, что в трансплантате присутствуют ДА нейроны как SNpc (A9), так и вентральной области покрышки (A10) (фиг. 4o,p). Как и у мышей (фиг. 13), среди клеток крыс серотонинергические и ГАМК-ергические клетки встречались редко (< 1% от общего количества клеток), как и происходящие в основном от хозяина GFAP+ глиальные клетки (7 % от общего количества клеток; (фиг. 14). При том, что в трансплантате было детектировано незначительное число положительных по серотонину нейронов, наблюдались отрицательные по hNCAM клетки, представлявшие собой, вероятно, происходящие от хозяина серотонинергические волокна (фиг. 14). При приживлении трансплантата происходящих из вентральной пластинки ДА нейронов у мышей, крыс и обезьян наблюдалось неожиданное восстановление нейрональной функции у видов грызунов и приматов. Анализы краткосрочной (6 недель) выживаемости были продлены для исследования неожиданной долгосрочной выживаемости до 5 месяцев после трансплантации в стриатум мышей-хозяев с очаговыми поражениями 6OHDA и иммунной недостаточностью. Фактически, прямое сравнение традиционного способа получения ДА

нейронов на основе розеток (Perrier, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 12543-8 (2004)) и нового протокола дифференцировки ДА нейронов на основе вентральных пластинок, описанного в настоящем документе, показало, что происходящие из вентральной пластинки ДА нейроны были способны обеспечивать долгосрочное приживление трансплантата ДА нейронов, в отличие от нейронов на основе розеток (фиг. 4a-c).

В частности, устойчивая индукция восстановления поведения у мышей с вращательным поведением, вызванным амфетаминами, у мышей с нанесенными соединением 6-OH повреждениями после применения полученных из вентральной пластинки нейронов (fp, синяя линия) и полученных из розеток (красная линия) ДА нейронов (Фигура 4d) показала, что происходящие из вентральной пластинки нейроны обеспечивали более высокую степень восстановления. Мыши с трансплантированными ДА нейронами, полученными из вентральной пластинки, продемонстрировали практически полное восстановление по амфетаминовой шкале. Животные с трансплантатами из полученных из розеток ДА нейронов продемонстрировали более низкое улучшение поведенческих симптомов, в некоторых случаях с течением времени восстанавливалось исходное высокое число поворотов.

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

Приведенные здесь результаты продемонстрировали прекрасные выживаемость трансплантата и результаты, связанные с поведением, в двух независимых моделях на

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

В частности, способы, связанные с исследованиями на обезьянах, включали партии, содержащие 50×106 трансплантируемых предшественников ДА нейронов, полученных на 25 день дифференцировки с применением протокола, основанного на использовании вентральной пластинки. Классическая доза составляла 3 мг MPTP-HCL, инъецируемых в сонную артерию (диапазон 0,5–5 мг). За этим следовала системная инъекция 0,2 мг/кг MPTP в/в. Клетки инъецировали в три участка (задний отдел хвостатого ядра и прекомиссуральную часть скорлупы) с каждой стороны головного мозга (в общей сложности в 6 трактов, 1,25×106 клеток/тракт), и иммунитет животных подавляли циклоспорином-А. С одной стороны головного мозга инъецировали ДА-предшественники из экспрессирующего GFP

субслона H9, тогда как с другой стороны прививали клетки, происходящие из немеченых клеток H9. Результаты, демонстрирующие приживление трансплантата нейронов у макак-резус с продолжением экспрессии FOX2A и продуцирования TH показаны на фиг. 4q-t. Через месяц после трансплантации наблюдалось устойчивое выживание ДА нейронов среднего мозга по оценке на основании экспрессии GFP (фиг. 15) и специфического цитоплазматического маркера человека (SC-121) (фиг. 4q). Центральную часть каждого трансплантата окружал ореол TH+ волокон, выходящих на расстояние до 3 мм в организм хозяина (фиг. 4r). Центральная часть трансплантатов состояла из TH+ нейронов, коэкспрессирующих SC-121 (фиг. 4s) и FOXA2 (фиг. 4t). Отрицательные по SC-121 и GFP области в составе трансплантата содержали Iba1+ микроглию хозяина (фиг. 15), что указывает на неполное подавление иммунитета.

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

Таким образом, был обнаружен новый протокол дифференцировки чПСК на основе вентральной пластинки, обеспечивающий точное воспроизведение развития ДА нейронов среднего мозга. Доступность клеток, обладающих основными признаками ДА нейронов среднего мозга, позволит использовать их для широкого спектра вариантов биомедицинского применения, такие как базовые исследования развития, высокоэффективный поиск новых лекарственных средств и моделирование заболеваний на основе БП-иПСК. Важно отметить, что в указанном исследовании наконец был разработан способ получения масштабируемого источника FOXA2+/TH+ нейронов для нейрональной трансплантации – значительный шаг на пути к клеточной терапии БП.

Кроме того, при получении аутентичных ДА нейронов среднего мозга из чЭСК продемонстрирована превосходная результативность in vivo (см. фиг. 4) и получение ДА нейронов в момент пересадки (приблизительно 40% зрелых нейронов в популяции на 25–30 день дифференцировки, что было выше процентного содержания при препарировании

фетальной ткани вентрального отдела среднего мозга человека (составляющего, как правило, приблизительно 10%) (Sauer, et al., Restor. Neurol. Neurosci. 2:123-135 (1991)).

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

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

i- Индукция очаговых поражений. Односторонние инъекции 6-гидроксидофамина (6-OHDA) в медиальный пучок переднего мозга (MFB) представляет собой один из стандартных способов индукции паркинсоноподобных симптомов у крыс. 6-OHDA представляет собой нейротоксин, посредством ретроградного транспорта через нигростриальный путь в MFB попадающий обратно в черную субстанцию, приводя к смерти нейрональных клеток в результате повреждения митохондриальных дыхательных ферментов. Целевые нейроны включают дофаминергические нейроны A9 в составе компактной части черного вещества (SNC), а также нейроны A10 в вентральной области покрышки. Указанная модель очагового поражения широко исследуется и считается превосходной доклинической моделью для исследования нейрохимических и поведенческих последствий поздних стадий БП, поскольку приводит к экстенсивному одностороннему истощению дофамина в составе комплекса хвостатое ядро/скорлупа (CPU). Поведенческие

последствия также хорошо описаны и включают спонтанное и индуцированное лекарственными средствами вращение, а также нарушения функционирования конечностей (см. ниже). Двусторонние модели паркинсонизма могут лучше имитировать заболевание человека, однако приводят к адипсии и афагии у крыс.

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

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

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

b- Тест с шаганием. Указанный тест предназначен для определения акинезии передних конечностей. Экспериментатор удерживает крысу одной рукой, фиксируя задние конечности (слегка приподнимая туловище), а другой рукой фиксирует переднюю

конечность, мониторинг которой не проводится. Таким образом, весь вес переносится на другую переднюю лапу. Крысу медленно передвигают в боковом направлении как спереди, так и сзади. Подсчитывают число корректирующих шагов в обоих направлениях для обеих лап.

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

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

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

пролиферативный индекс (% Ki67+). Перечисленные антитела коммерчески доступны и были использованы при разработке настоящих изобретений.

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

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

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

В среднем при трансплантации 15 000 TH+/FoxA2+ нейронов на 250 000 клеток животные выживали на протяжении 5 месяцев после пересадки. При краткосрочной выживаемости выживало и было подсчитано значимо меньшее число клеток с двумя метками. Соответственно, предполагаемые результаты in vivo, приведенные в таблице 9, соответствуют консервативной оценке. Примеры показателей, используемых для оценки статуса успешности/неуспешности для состава трансплантатов приведены в таблице 10.

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

представляют собой примеры ориентиров, определенных при разработке настоящих изобретений.

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

A. Комплексные поведенческие анализы для оценки степени реиннервации стриатума. В стандартных поведенческих тестах (согласно описанию в настоящем документе) продемонстрирована прямая корреляция с числом выживших дофаминовых нейронов в составе трансплантата. Крысы, получавшие лечение зрелыми ДА нейрональными клетками в соответствии с настоящими изобретениями, в поведенческих тестах демонстрируют максимальное восстановление с расчетным показателем восстановления, составляющим приблизительно 30% ДА нейронов, что необходимо для снижения уровня индуцированных амфетамином вращений. Соответственно, после достижения порога выживания ДА нейронов у хозяина (расчетный показатель: 800–1200 ДА нейронов в модели на крысах), может быть трудно отличить поведенческие различия, отражающие стратегии усовершенствования. Был описан способ с применением микротрансплантации, при котором в пределах стриатума размещают несколько трансплантатов небольшого размера, а не

трансплантаты большого размера. Контролируя общее число трансплантированных ДА клеток, наблюдали различия поведенческих исходов при сравнении 2 групп: у крыс с несколькими трансплантатами небольшого размера наблюдалось более ранее и более экстенсивное поведенческое восстановление в отношении индуцированных лекарственными средствами вращений и в тестах с шаганием по сравнению с животными с одним трансплантатом большого размера, при таком же числе ДА нейронов и таком же уровне высвобождения дофамина. Неожиданным образом, имело место отчетливое различие в ловкости использования передних конечностей: у животных с широко распределенными трансплантатами небольшого размера наблюдалось улучшение, в отличие от крыс – носителей стандартных трансплантатов. Считается, что ловкость использования передних конечностей является задачей, требующей пространственного и временного контроля над высвобождением ДА, и, соответственно, надлежащей взаимосвязи между пересаженными нейронами и стриатумом хозяина. Соответственно, в некоторых вариантах реализации применение зрелых ДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями для процедур трансплантации приводило к восстановлению использования передних конечностей. Соответственно, в некоторых вариантах реализации зрелые ДА нейроны в соответствии с настоящими изобретениями вводят в один участок стриатума. В других вариантах реализации зрелые ДА нейроны в соответствии с настоящими изобретениями вводят по меньшей мере в 2 или более участков в составе стриатума.

B. Тест на ловкость использования передних конечностей (или лестничный тест). Тест на использование передних конечностей для анализа выполняемых передними конечностями движений вытягивания и захвата выполняли до и после очагового поражения, а также после трансплантации. Животным не давали пищи в течение 48 часов перед тестом, и проводили тестирование ежедневно в течение 5 дней до очагового поражения, и затем дважды после очагового поражения с 3-недельным интервалом. После пересадки тест повторяли еще 2 раза, на 3 и 5 месяц. Животных помещали в плексигласовую камеру, оснащенную двойной лестницей. Гранулы корма размещают на 5 ступеньках с двух сторон при тестировании до трансплантации, и с одной стороны (со стороны пораженной конечности, контралатерально к вращению) после пересадки. Животных тестируют на протяжении заданного временного промежутка (например, 10 минут), подсчитывают число и долю съеденных гранул (успешное извлечение) и гранул, которые были захвачены, и

сравнивают с результативностью у индивидуального животного до очагового поражения. Использовали несколько вариаций указанного теста, отличающихся числом повторов и временными характеристиками теста.

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

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

Предусмотрено применение электрофизиологических измерений на препаратах живых срезов, т.е. биоптатов из привитых областей. В одном варианте реализации ДА нейроны A9 или A10 типа, происходящие из трансплантатов, идентифицируют in vivo на

основании тестирования на автономную пейсмейкерную активность, специфическую для дофаминовых нейронов A9-типа, на которые в наибольшей степени влияет БП. Другими словами, нейроны A10-типа не обладают пейсмейкерной активностью. Задавали условия для регистрации in vivo происходящих из плюрипотентных стволовых клеток человека ДА нейронов в препаратах живых срезов, см. фиг. 26. В частности, оценивали электрофизиологические признаки трансплантированных ДА нейронов человека, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, и было обнаружено, что они обладают электрофизиологическими признаками, типичными для нейронов компактной части черного вещества мышей (SNpc); на фиг. 26A сверху представлена реконструкция нейрона-пейсмейкера в области трансплантата. Снизу приведен пример микрофотографии среза головного мозга крысы, в который за 9 месяцев до этого были инъецированы происходящие из чЭС-клеток нейроны; трансплантат обведен; изображение с большим увеличением приведено на вставке снизу. Срез обрабатывали для выявления тирозингидроксилазы, которая окрашена белым, фиг. 26B. Кроме того, сверху представлен пример пэтч-регистрации в конфигурации «присоединенная клетка» с предполагаемого ДА нейрона в трансплантате; снизу представлен пример регистрации в конфигурации «целая клетка» с той же клетки. Регистрацию проводили в присутствии глутамата и антагонистов рецептора ГАМК (50 мкМ AP5, 10 мкМ CNQX и 10 мкМ габазин) для элиминации синаптического входа. Результаты указанной регистрации показали, что происходящие из ПС-клеток нейроны представляли собой автономные пейсмейкеры с нормальной внутрисоматической динамикой напряжения. Другой зарегистрированный нейрон в образце трансплантата обладал аналогичными свойствами, фиг. 26C. Для сравнения представлены способы регистрации в конфигурации «присоединенная клетка» и регистрации в конфигурации «целая клетка» с дофаминергического нейрона SNpc взрослой мыши. Сокращения (CTx = кора, STr = стриатум, SNpc = компактная часть черного вещества, ДА = дофаминергический). Указанные данные отражают функциональные исследования in vivo в стриатуме крыс после пересадки через месяцы после трансплантации. Соответственно, в некоторых вариантах реализации функциональные исследования in vivo на привитой ткани демонстрируют восстановление компактной части черного вещества (SNpc).

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

В указанном примере описано открытие, заключающееся в получении больших популяций дифференцированных ДА нейронов среднего мозга с характеристиками нейронов БП-пациента при использовании линии клеток БП-пациента, т.е. мутантных клеток БП-иПСК PINK1, полученных способом, не приводящим к уничтожению эмбриона, в качестве популяции клеток для получения FOXA2/LIM1XA/TH+ ДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями.

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

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

A. Направленная дифференцировка показала, что генетически обусловленные БП-иПС клетки PINK1 обладали способностью развиваться в ДА нейроны, подобные ДА нейронам среднего мозга. См. фиг. 20–25. Дифференцировку мутантной линии БП-иПСК PINK1 Q456X в ДА нейроны среднего мозга осуществляли с применением нового протокола (способа) на основе вентральной пластинки, описанного в настоящем документе, который обеспечивал получение ДА нейронов среднего мозга, демонстрировавших профили дифференцировки, сопоставимые с профилями дифференцированных ДА нейронов, полученных с помощью нового протокола на основе вентральной пластинки среднего мозга из линии H9. (Фиг. 20). В указанном примере описано открытие, заключающееся в получении больших популяций дифференцированных ДА нейронов среднего мозга с характеристиками нейронов БП-пациента при использовании линии клеток от БП-пациента, т.е. мутантных клеток БП-иПСК PINK1, полученных способом, не приводящим к уничтожению эмбриона, в качестве популяции клеток для получения FOXA2/LIM1XA/TH+ ДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями.

Клетки мутантной линии БП-иПСК PINK1 Q456X дифференцировали в ДА нейроны среднего мозга с применением нового протокола (способа) на основе вентральной пластинки в соответствии с настоящими изобретениями, который обеспечивает профили дифференцировки в нейроны среднего мозга, сопоставимые с профилями для иПСК линии H9. A-C) Иммуноцитохимический анализ мутантных БП-иПСК линии PINK1 на 11 день дифференцировки (стадия предшественников среднего мозга), на FOXA2 (красный), LMX1A (зеленый) и DAPI (синий) (A), 25 день дифференцировки (ранняя постмитотическая стадия ДА нейронов), на FOXA2 (красный) и TH (зеленый) (B) и на NURR1 (красный) и TH (зеленый) (C). D-F) Та же группа иммуноцитохимических анализов, проведенных с применением происходящих из H9 клеток, на 11 день дифференцировки, на FOXA2 (красный), LMX1A (зеленый) и DAPI (синий) (D), на 25 день дифференцировки, на FOXA2 (красный) и TH (зеленый) (E); и на NURR1 (красный) и TH (зеленый) (F).

B. Генетически обусловленные БП-иПСК проявляли БП-подобный фенотип с агрегацией белков. Фиг. 21–24. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что мутантные БП-иПСК PINK1 демонстрировали наличие экспрессии α-синуклеина (основной компонент телец Леви у БП-пациентов) в цитозоле TH+ ДА нейронов на день 55

дифференцировки с применением нового протокола индукции ДА нейронов среднего мозга на основе вентральной пластинки (фиг. 21a–b). A, B). Иммуноцитохимический анализ мутантных БП-иПСК линии PINK1 на день 55 дифференцировки на α-синуклеин (LB509, красный), TH (зеленый); и объединенное изображение (A) для α-синуклеина (красный) и убиквитина (зеленый) (B). Указанные положительные по α-синуклеину клетки также демонстрировали высокие уровни экспрессии убиквитина (классический маркер телец Леви). Напротив, ДА нейроны, происходящие из линии контрольных иПС-клеток, демонстрировали нормальную синаптическую (в противоположность цитозольной) экспрессию α-синуклеина и очень низкие уровни убиквитина (фиг. 21c-d). C, D) Иммуноцитохимический анализ линии контрольных иПСК на день 55 дифференцировки на α-синуклеин (красный) и TH (зеленый) (C); и α-синуклеин (красный) с убиквитином (зеленый) (D).

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

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

D. Различия в паттернах экспрессии α-синуклеина наблюдаются в зависимости от протокола дифференцировки. Авторы настоящего изобретения предположили, что происходящие из вентральной пластинки «аутентичные» ДА нейроны среднего мозга демонстрировали БП-специфическую уязвимость и соответствующие специфические фенотипы in vitro. ДА нейроны, полученные с применением классического протокол дифференцировки на основе стромальных клеток-фидеров MS5 (Perrier et al., PNAS

2004, цитируемый источник включен в настоящий текст путем ссылки), давали значительные количества TH+ нейронов. Однако, на основании данных, полученных при разработке настоящих изобретений, авторы настоящего изобретения показали, что TH+ клетки на основе MS5 не представляли собой аутентичные происходящие из вентральной пластинки ДА нейроны среднего мозга. В культурах, дифференцированных с применением протокола MS5, присутствовало много положительных по α-синуклеину клеток. Однако указанные клетки не коэкспрессировали TH. Кроме того, отсутствовали различия в паттернах экспрессии БП-иПСК и контрольных иПСК при применении стратегии дифференцировки MS5 (фиг. 23a-b). Эти данные показывают, что α-синуклеин также экспрессируется в других типах клеток, не являющихся ДА клетками, и что такой не-ДА α-синуклеин не изменяется в пораженных заболеванием клетках относительно происходящих из контрольных иПСК клеток – в частности, при применении стандартных протоколов дифференцировки с MS5. Указанные клетки представлены ДА-подобными происходящими из розеток нейронами, описанными в опубликованных источниках (например, Perrier PNAS 2004). Указанные TH+ клетки на основе MS5 (=ДА-подобные клетки) использованы для сравнения на фиг. 3, 10, 13 и 16. Эти данные показывают, что α-синуклеин также экспрессируется в других, не-ДА типах клеток, и что такой не-ДА α-синуклеин не изменяется в пораженных заболеванием клетках относительно происходящих из контрольных иПСК клеток – в частности, при применении стандартных протоколов дифференцировки MS5. Наконец, новый протокол дифференцировки на основе вентральной пластинки, описанный в настоящем документе, дает значительное число TH+ клеток, коэкспрессирующих α-синуклеин. Указанные TH+ клетки экспрессируют α-синуклеин согласно цитозольному паттерну экспрессии. Фиг. 24A, B) Иммуноцитохимический анализ на α-синуклеин (LB509, красный), TH (зеленый) мутантных БП-иПСК линии PINK1 на день 60 дифференцировки на основе MS5 (A) и контрольных иПСК (B). C) Иммуноцитохимический анализ мутантных БП-иПСК линии PINK1 на день 55 дифференцировки на основе вентральной пластинки на α-синуклеин (красный), TH (зеленый).

E. ДА нейроны, происходящие из генетически обусловленных БП-иПС клеток, более уязвимы для токсической стимуляции. Фиг. 24–25. Происходящие из БП-иПСК TH+ ДА нейроны, полученные с помощью протокола на основе вентральной пластинки, были более уязвимы для стимуляции токсином (валиномицин: ионофор митохондрий, 5 мкМ

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

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

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

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

XI. Способы обогащения ДА нейронами среднего мозга.

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

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

При разработке настоящих изобретений при получении аутентичных ДА нейронов среднего мозга из чЭСК наблюдались прекрасные показатели *in vivo* (см. фиг. 4); применение протоколов согласно описанию в настоящем документе приводило к выходу приблизительно 40% ДА нейронов к моменту трансплантации. Указанный процент выше процента ДА нейронов, полученных при препарировании фетальной ткани вентрального отдела среднего мозга человека (составляющего, как правило, приблизительно 10%). Соответственно, предполагается, что применение источника ДА нейронов на основе чЭСК согласно описанию в настоящем документе обеспечит дальнейшее повышение чистоты при применении стратегий очистки клеток. Кроме того, были разработаны генетические репортерные линии для применения с чЭСК, аналогичные используемым в исследованиях на мышах, включая линию клеток человека в качестве линии *Nurr1::GFP*. Тем не менее, применение генетических репортеров может быть проблематичным при трансляции у человека, так как GFR (ЗФБ) является для человека иммуногенным, и, соответственно, не подходит для применения у человека. Кроме того, может представлять трудности FACS-сортировка для создания маточного банка ДА нейронов клинического класса (т.е. получение замороженных культур ДА нейронов человека для применения при трансплантации),

учитывая продолжительность времени, необходимого для сортировки партий размером приблизительно 10^9 клеток, необходимых для каждого трансплантата, помимо потенциальной высокой стоимости и более низкого выхода клеток при восстановлении после хранения.

Вместо использования генетических репортерных систем и выделения клеток на основе метода FACS, авторы изобретения предложили выделение ДА нейронов на основе экспрессии поверхностных маркеров с применением альтернативных стратегий с использованием техник разделения клеток, предложенных для применения у пациентов с БП. Так, сортировка с применением магнитных частиц (например, система CliniMACS®) широко применялась в одобренных FDA методах на основе клеток, и обеспечивала быстрое, экономически эффективное выделение до 10^{10} клеток в соответствующих правилам надлежащей медицинской практики (GMP) условиях, т.е. условиях, одобренных для выделения клеток, предназначенных для применения у человека. Соответственно, в некоторых вариантах реализации предложена сортировка с применением магнитных частиц для обогащения зрелыми ДА нейронами, например, с применением CD142, присоединенного к магнитным частицам для обогащения Nurr1+ нейронами, предназначенными для применения в трансплантатах.

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

Данные об экспрессии маркеров клеточной поверхности, собранные при разработке настоящих изобретений, позволили идентифицировать несколько новых маркеров клеточной поверхности, экспрессируемых на ДА нейронах среднего мозга. В частности, были обнаружены маркеры для дополнительного идентифицирования клеток, таких как специфические клетки, дифференцирующие в зрелые ДА нейроны, зрелые ДА нейроны в соответствии с настоящими изобретениями и клетки A9. Для идентификации таких поверхностных маркеров применялись две главные стратегии: во-первых, несмещенный скрининг генной экспрессии в генетических репортерных линиях (Фиг. 27a) показал наличие нескольких кандидатных маркеров, включая CD142 и маркер, называемый DCSM1, который избирательно экспрессировался в ДА нейронах среднего мозга и, как обнаружено, представлял собой, в частности, маркер ДА нейронов A9-типа (Фиг. 27b. Вторая стратегия состояла в использовании скрининга на CD-маркеры клеточной поверхности в полученных

из чЭСК ДА нейронах, которые тестировали с 242 коммерчески доступными антителами в 96-луночном формате (Фиг. 27c,d). Результаты такого типового скрининга (Фиг. 27e) позволили идентифицировать по меньшей мере 5 подтвержденных маркеров, которыми богаты ДА нейроны среднего мозга, включая CD142, избирательный маркер, характерный для стадии Nurr1+ ДА нейронов (Фиг. 27f), помимо CD63, CD99 и DCSM1.

В частности, как видно из фиг. 27, скрининг поверхностных CD-маркеров полученных из WA09 ДА нейронов на 25 день дифференцировки, протестированных с индивидуальными антителами в количестве до 242. Указанные результаты сравнивали с дублирующим скринингом широкого спектра других полученных из WA09 типов нервных клеток (например, полученных из чЭСК *HB9::GFP+* мотонейронов, полученных из чЭСК кортикальных нейронов, полученных из чЭСК *Nkx2.1::GFP+* предшественников вентральной части переднего мозга, и нескольких других полученных из чЭСК типов нейронов. Полученную базу данных экспрессионных профилей поверхностных маркеров затем использовали для отбора кандидатных CD-маркеров, избирательно обогащающих любой заданный подтип, например, ДА нейроны среднего мозга (Фиг. 27). Один из выявленных маркеров, связанный с дифференцировкой ДА нейронов из чЭСК, представлял собой CD142. Отбор клеток по CD142, специфически обогащенных, в частности, полученными из чЭСК ДА нейронами на стадии Nurr1+ при истощении других подтипов нейронов. В некоторых вариантах реализации CD142 экспрессируется до Nurr1+. В некоторых вариантах реализации популяция ДА нейронов среднего мозга, отсортированная по CD142, содержит клетки Nurr1+ и Nurr1-. В некоторых вариантах реализации популяция ДА нейронов среднего мозга, отсортированная по CD142, содержит клетки Nurr1-. В некоторых вариантах реализации популяция культивируемых отсортированных по CD142+ Nurr1- ДА нейронов среднего мозга начинает экспрессировать Nurr1 (т.е. становится Nurr1+) в течение периода до двух дней после сортировки.

Помимо CD142, полученные из чЭСК ДА нейроны были обогащены маркерами CD63 и CD99. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации, ДА-культуры нервных клеток обогащают ДА нейронами путем сортировки или отбора по маркерам, включая, но не ограничиваясь перечисленными, CD142, CD63, CD99, DCSM1, Nurr1+ и т.д. Маркер CD142, как правило, присутствует у приблизительно 30% общего количества клеток в популяции на 25 день дифференцировки (Фиг. 28a). Избирательность CD142 в отношении стадии Nurr1+

ДА нейронов была подтверждена для нескольких независимых линий чЭСК и чиПСК (Фиг. 28b). Важно, что, помимо обогащения ДА нейронами, CD142 избирательно истощает другие подтипы нейронов, такие как GABA и серотонинергические нейроны. (Фиг. 28c-f). Проводились исследования *in vivo*, демонстрирующие способность CD142 приводить к формированию высокочистых ДА нейронных трансплантатов без детектируемых примесей GABA и серотонинергических нейронов. Серотонинергические нейроны представляют собой тип клеток, при трансплантировании фетальных тканей человека задействованный в качестве потенциального источника трансплантат-индуцированной дискинезии. Хотя применение способов трансплантации согласно описанию в настоящем документе с применением неочищенных клеток уже приводило к немногочисленности серотонинергических нейронов, применение CD142 должно снизить указанный риск в еще большей степени.

A. Маркеры для идентификации зрелых мДА нейронов A9-типа. Было обнаружено, что полученные из A9/полученные из A10 ДА нейроны обладают, in vitro и in vivo, различными функциональными характеристиками и специфическими паттернами иннервации, соответствующими их роли для функционирования мезостриатума/ мезолимбической системы. При разработке настоящих изобретений авторы обнаружили, что аутентичные мДА нейроны, полученные посредством способов в соответствии с настоящими изобретениями (Фиг. 4), приводят к появлению нейронов, обладающих свойствами, характерными в большей степени для A9, чем для A10. В частности, по меньшей мере часть аутентичных мДА нейронов, позитивных по ТГ (TH+), экспрессировала Girk2, маркер, используемый для определения ДА нейронов A9-типа. Кроме того, многие зрелые ДА нейроны демонстрировали автономную пейсмейкерную активность, представляющую собой функциональную характеристику A9-типа, но не A10-типа ДА нейронов. Тем не менее, некоторые TH+ клетки, полученные *in vitro*, не принадлежали типу A9. Соответственно, авторами изобретения предложены процедуры для обогащения, например, описанные в настоящем документе, для получения очищенных популяций аутентичных мДА нейронов человека A9-типа (а не A10-типа). Согласно описанию в настоящем документе, авторы изобретения обнаружили по меньшей мере два маркера, уникальных для нейронов типа A9, и по меньшей мере два маркера, уникальных по меньшей мере для нейронов типа A10.

Соответственно, в некоторых вариантах реализации нейроны типа A9 идентифицируют по маркерам (Girk2, Aldh1), отличным от маркеров A10 (кальбиндин, Otx2).

B. Определение набора маркеров, повышающий выход ДА нейронов среднего мозга подтипа A9. Для определения A9-специфических поверхностных маркеров были предложены по меньшей мере два стратегии: кандидатные маркеры получали с применением скрининга генной экспрессии, например, согласно описанию в настоящем документе, и кандидатные CD-антитела – с применением скрининга на поверхностные маркеры, согласно описанию в настоящем документе. Популяции В другом методе проводят глобальный анализ транскриптома в очищенных популяциях полученных из ЭСК мыши мДА нейронов на разных этапах дифференцировки (с применением трансгенной технологии BAC; см. фиг. 27a,b). Присутствие поверхностных маркеров обнаруживали в профиле поверхностных маркеров на ДА нейронах, полученных из RCB WA09, с помощью следующих типовых способов. Полученные из RCB WA09 ДА нейроны на 25 день дифференцировки разъединяли и повторно высевали в 96-луночные планшеты, а затем обрабатывали 242 CD-антителами и проводили анализ данных с применением сканера для многопараметрического анализа Operetta (Operetta High Content). Величину ДА-обогащения проверяли по меньшей мере для 5 дополнительных антител, связывавшихся с CD-маркерами, идентифицированными в ходе указанных скринингов (например, CD142, CD63 и CD99). Кандидатные CD-позитивные/CD-негативные клетки оценивали с применением анализа на соответствие показателям ДА (DA QC), включая экспрессию FOXA2/TH и TH/Nurr1 (см. таблицу 7). В некоторых вариантах реализации предложено использование профилей глобальной генной экспрессии для сравнения не отсортированных по CD142 (CD142+) клеток. В некоторых вариантах реализации экспрессию требуемого маркера в отсортированных/разделенных клетках использовали для краткосрочных и долгосрочных in vivo исследований согласно описанию в настоящем документе. Среди специфических для ДА нейронов маркеров, идентифицированных в ходе указанных исследований, присутствовал ген поверхностного маркера, названного DCSM1 (поверхностный маркер 1 ДА клеток). На основе данных относительно экспрессии in situ экспрессия соответствует вентральной части среднего мозга, однако, как было более неожиданно обнаружено, экспрессия по меньшей мере частично избирательна в отношении A9, и в развивающемся и взрослом головном мозге мышей (Фиг. 27), и во взрослом головном мозге человека. В

полученных из чЭСК ДА нейронах наблюдалось множество клеток, экспрессирующих DCSM1. In vitro анализы на принадлежность A9/A10 включали долгосрочную дифференцировку позитивных по маркеру клеток (50 день и 75 день дифференцировки) и анализ i) экспрессии маркеров A9, (Girk2, Aldh1) или же A10 (кальбиндин, Otx2) в зрелых нейронах, (ii) дифференциального аксонального наведения в ответ на Netrin-1 и Sema3, и (iii) анализ A9-обогащенных нейронов с помощью электрофизиологических тестов. ДА нейроны A9 демонстрировали специфические функциональные характеристики согласно описанию в настоящем документе в случае полученных из чЭСК A9-нейронов. Клетки, экспрессирующие DCSM1 и другие маркеры, исследовали in vivo для подтверждения i) экспрессии маркеров A9 (Girk2, Aldh1) или маркеров A10 (кальбиндин, Otx2), ii) разрастание волокон ДА-трансплантата и iii) электрофизиологических свойств A9 срезов трансплантированных клеток (см. фиг. 26).

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

Интеграция трансплантата и степень разрастания ДА-волокон представляют собой проблемные вопросы методов трансплантации, включая исследования трансплантации фетальных тканей у пациентов с БП. Одной из проблем, возникающих в трансплантированных тканях и клетках, является ограниченное разрастание волокон из указанных трансплантатов при лечении пациентов. Указанная проблема является особенно критичной для человека, поскольку восстановление у пациента требует обширной реиннервации стриатума. В ранее существовавших методах для достижения адекватной реиннервации после трансплантации ткани требовалось неоднократное инъецирование порций клеток в разные области стриатума. Каждая из инъекций может привести к повреждению стриатума и воспалению, а также связана с другими хирургическими рисками. Такие риски включают повреждение кровеносного сосуда во время инъецирования клеток, что потенциально может спровоцировать инсульт или судороги у пациента. ПСК представляет собой природный гомополимер сиаловой кислоты (а именно, альфа-2,8-связанную сиаловую кислоту) на поверхности клеток, который, как было обнаружено, является постранслящионным модификатором (за счет действия фермента полисиалилтрансферазы (PST)) других молекул клеточной поверхности, таких как (полисиалилированная) молекула адгезии нервных клеток (NCAM), NCAM (CD56) и т.п.

Обнаружено, что ПСК задействован в регуляции пластичности некоторых типов поведения клеток, требующих изменения межклеточных взаимодействий, включая миграцию клеток и разрастание аксонов. Интенсивно экспрессируясь в организме эмбриона, ПСК понижающе регулируется в тканях взрослого организма, за исключением локальных участков ЦНС, обеспечивающих поддержание структурной и физиологической пластичности (таких как гиппокамп, супрахиазмальное ядро, СВЗ). Соответственно, в некоторых вариантах реализации полисиаловая кислота (ПСК) предложена для применения для стимуляции разрастания волокон успешно трансплантированных клеток. Примеры применения ПСК в других типах клеток приведены в WO 2006/042105, полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации авторы настоящего изобретения предполагают применение аутентичных ДА нейронов в комбинации с ПСК согласно описанию в настоящем документе.

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

Регуляция клеточных взаимодействий полисиаловой кислотой (ПСК) представляет собой один из факторов, способствующих распространению клеток, разрастанию аксонов и направленной иннервации при развитии позвоночных животных, см., например, Rutishauser, Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. Nat Rev Neurosci 9, 26-35 (2008). ПСК представляла собой углеводный полимер, присоединенный к молекуле адгезии нервных клеток (NCAM), ослаблявший межклеточные взаимодействия, и таким образом способствовавший тканевой пластичности. В глиальном рубце повышенная экспрессия ПСК во взрослом ГМ способствовала миграции предшественников нейронов из

субвентрикулярной зоны в кортекс и улучшению аксонального роста (El et al. Use of polysialic acid in repair of the central nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 16989-16994 (2006). Согласно описанию в настоящем документе, искусственное повышение экспрессии ПСК на очищенных полученных из ЭСК мыши ДА нейронов приводило к увеличению числа клеток трансплантата, обширному разрастанию волокон ДА нейронов в стриатум хозяина и, неожиданным образом, улучшению восстановления поведенческих функций у мышей с болезнью Паркинсона. Далее, применение генной инженерии для повышения уровней ПСК на поверхности полученных из ЭСК ДА нейронов одновременно повышало *in vivo* выживание и разрастание волокон в стриатум хозяина. Один типовой вариант реализации с применением гена PST млекопитающих, т.е. мыши или человека, представлен на Фиг. 29. В других типовых вариантах реализации, проиллюстрированных фиг. 29, представлено применение бактериальной PST, т.е. PSTnm. В частности, согласно описанию в настоящем документе, увеличение количества ПСК на клетках при клеточной терапии на основе зрелых ДА нейронов предложено для применения при лечении БП.

B. Применение PST мыши для повышения экспрессирования ПСК. Результаты in vivo указывают на улучшенное распространение нейритов и значимый регресс индуцированного амфетамином вращения у мышей 6-OHDA, которым трансплантировали модифицированные PST клетки мыши, тогда как равные количества клеток, не модифицированных PST, не обеспечивали такого результата (Фиг. 33). Кроме того, наблюдалась корреляция между улучшением иннервации волокнами ДА и улучшением поведенческих результатов в модели БП на мышах, например, при введении небольших (инъецирование приблизительно 50 000 клеток) ПСК-позитивных клеточных трансплантатов последние обеспечивали интеграцию трансплантата и разрастание волокон, составляющие приблизительно 70% захваченных областей относительно сопоставимых трансплантатов большего размера (100 000 или более клеток). Сравнение клеток полученных из ЭСК ДА нейронных трансплантатов после стимуляции ПСК и после контрольной обработки показало восстановление поведенческих функций в группе с ПСК (каждый из трансплантатов состоял из 55 000 трансплантированных клеток), но не наблюдалось для контрольных клеток. При трансплантировании 100 000 полученных из ЭСК ДА нейронов в головной мозг мышей наблюдалось восстановление поведенческих функций за счет полученных из ЭСК ДА нейронов, прошедших либо обработку ПСК, либо контрольную обработку, что,

предположительно, означает, что объем трансплантатов, составляющий 100 000 клеток, достаточен для реиннервации головного мозга мыши в отсутствие ПСК-стимуляции. Соответственно, в другом варианте реализации искусственная экспрессия ПСК на поверхности аутентичных ДА нейронов предложена для применения в процедурах для лечения пациентов с БП. При индуцировании ПСК на нервных клетках в соответствии с настоящими изобретениями указанная ПСК была идентична полимеру ПСК, встречающемуся в природе в клетках головного мозга, соответственно, в отличие от применения других молекул клеточной поверхности для конструирования терапевтических типов клеток, клетки, сконструированные для экспрессирования ПСК, предположительно обладают малой антигенностью in vivo при использовании для трансплантационных процедур у человека. Кроме того, высокие уровни ПСК на успешно трансплантированных клетках, либо эндогенных нейрональных предшественников (Battista et al., J Neurosci. 30(11):3995-4003 (2010)), шванновских клетках (Ghosh et al., Glia. 60(6):979-92(2012)), либо полученных из ЭСК ДА нейронов в соответствии с настоящими изобретениями, не вызывали детектируемых побочных эффектов при использовании в различных моделях на взрослых грызунах. При искусственном экспрессировании эффективных уровней ПСК задействован один фермент, полисиалилтрансфераза (PST), единственный продукт которого представлен указанным уникальным гликополимером. Неожиданным образом, количество экспрессируемого белка и природа продукта указанного фермента оставались в значительной степени постоянными и близкими к показателям ПСК, обнаруживаемой в естественных условиях в эмбриональных тканях.

Согласно описанию в настоящем документе предложено искусственное экспрессирование ПСК на нервных клетках для применения в процедурах трансплантации. В частности, предложено применение ПСК при подготовке клеток для терапевтического применения, для решения проблем, возникающих при использовании индуцируемой экспрессии других типов маркеров клеточной поверхности. Кроме того, применение экспрессирования ПСК обеспечивало воспроизводимость в межвидовых протоколах для позвоночных животных (например, при использовании генов PST мыши для экспрессирования в клетках человека), так как ее акцепторы также отличаются совместимой структурой у разных видов и обнаруживаются на поверхности большинства клеток. Встраивание генов PST в чЭСК для увеличения количества ПСК на ДА нейронах. Ген,

кодирующий полисиалилтрансферазу человека (чPST), вводили в линию клеток чЭСК (WA01) с применением лентивирусного вектора (pLenty, Invitrogen) и согласно описанию в настоящем документе. Двадцать отобранных клонов размножали и анализировали экспрессию PST. PST-экспрессирующие чЭСК клоны дифференцировали для подтверждения того, что ген PST в ДА нейронах не сайленсирован. Количественное определение ПСК-NCAM на разных этапах дифференцировки (дни 0, 11, 25, и 50) выполняли с применением FACS-анализа и иммунофлюоресценции (Operetta). Показатели позитивных клонов сравнивали с совокупностью качественных контрольных показателей ДА нейронов, приведенных в таблице 7. По меньшей мере 3 клона, у которых сохранялись высокие постоянные уровни ПСК-NCAM на протяжении дифференцировки, и которые демонстрировали хорошие контрольные качественные показатели (таблица 7), отбирают для оценки разрастания нейритов в сверхэкспрессирующих PST полученных из чЭСК ДА нейронах. Отсортированные контрольные и PST-сверхэкспрессирующие чЭСК клоны дифференцировали в ДА нейроны с применением стандартного протокола согласно описанию в настоящем документе, после чего фиксировали и анализировали клетки на 25 и 50 дни. Число и длину положительных по ТГ волокон в таких культурах количественно определяли с помощью микроскопа Operetta High Content. С помощью модуля для анализа нейритов программы Harmony 3.0 количественно определяли число и длину нейритов, с PST или без PST, и данные статистически анализировали с применением двустороннего анализа ANOVA. Сверхэкспрессирующие PST и контрольные клоны чЭСК, отобранные в ходе описанных выше *in vitro* исследований, снова дифференцировали в ДА нейроны и трансплантировали крысам в модели БП. Проводили краткосрочные трансплантационные исследования (4–6 недель) для определения выживаемости, экспрессии ПСК-NCAM и разрастания нейритов. Все клоны, прошедшие краткосрочные испытания in vivo с удовлетворительными показателями, использовали для долгосрочных трансплантационных исследований. В указанных исследованиях животным вводили половину или четверть стандартной (200×10^3) дозы клеток. Указанные исследования были направлены на выяснение того, приводит ли увеличение количества ПСК к повышению долгосрочной выживаемости после трансплантации (5 месяцев), и способны ли меньшие количества ДА нейронов обеспечить такие же или лучшие функциональные возможности по сравнению не содержащими PST трансплантатами, содержащими стандартные дозы клеток (фиг. 27).

Дополнительно проводили комплексные поведенческие тесты, чувствительные к степени реиннервации стриатума, для дополнительного мониторинга отличий функционального потенциала PST-трансплантатов и контрольных ДА нейронных трансплантатов. После завершения поведенческих тестов животных умерщвляли и количественно определяли разрастание волокон с применением специфических антител человека NCAM и SC121 и антител против ТГ (см. также фиг. 29). Измеряли интенсивность и распределение в трансплантате hNCAM+, SC121+ и TH+, а также процент клеток человека, коэкспрессирующих маркеры ДА нейронов (TH, FOXA2) и ПСК. Количественно определяли плотность NCAM/TH+ ореола нейритов, распространяющихся из трансплантата, на разных расстояниях. Данные сравнивали между группами с применением двустороннего анализа ANOVA с поправкой Бонферрони. Дополнительно исследовали срезы для обнаружения качественных изменений (например, ветвления, толщины, распространения и формы трансплантата). Кроме того, получают срезы некоторых трансплантатов для электрофизиологических исследований (см. фиг. 26) в отношении принадлежности A9-фенотипу, формирования синапсов со стриатумом хозяина, а также иннервации эндогенными афферентами.

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

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

нейронных маркеров или маркеров среднего мозга в ЗФБ-очищенных ДА нейронах (фиг. 30F).

Другие исследования на гемипаркинсонических мышах с индуцированными 6OHDA повреждениями показали, что для обеспечения надежного функционального восстановления требуется трансплантация приблизительно 100 000 полученных из ЭСК предшественников ДА нейронов, по оценке с применением теста со стимулированным амфетамином вращением. В ходе настоящих исследований авторы стремились трансплантировать субоптимальное число клеток, чтобы иметь возможность провести оценку улучшений за счет стимулированной экспрессии ПСК. Для трансплантирования высокообогащенных ДА нейронами популяций в истощенных по контаминирующим плюрипотентным клеткам очищенных с помощью FACS культурах на 14 день дифференцировки проводили тестирование на управляемую Nurr1 экспрессию ЗФБ и отсутствие экспрессии SSEA-1 (Фиг. 31). В отсутствие свехэкспрессирования PST при снижении минимального эффективного размера трансплантата в два раза (55 000 Nurr1+ ДА клеток) детектируемое восстановление поведенческих функций не происходило. С другой стороны, при повышенном экспрессировании ПСК такое же количество Nurr1/PST ДА нейронов обеспечивало значимую коррекцию обусловленных БП расстройств поведения ($p < 0,01$; двусторонний анализ ANOVA), с полным восстановлением приблизительно через 5 недель после хирургического вмешательства (Фиг. 32A). Удаление ПСК до трансплантация путем инкубирования с endoN показало специфичность стимуляции ПСК, так как обработка endoN частично обращало восстановление функций за счет применения Nurr1/PST (Фиг. 32A).

Для изучения характеристик трансплантированных клеток проводили иммуногистохимическое исследование животных через два месяца после трансплантации. Наблюдалось различие в количестве живых Nurr1+ нейронов; у тех животных, которым трансплантировали клетки PST-трансфицированной линии, в среднем присутствовало в два раза больше положительных по ЗФБ (GFR+) клеток, чем у животных, которым трансплантировали контрольные клетки (9300+/-1400 против 4230+/-1010 GFR+ клеток на трансплантат, для PST или контрольных образцов, соответственно; Фиг. 32B, $p < 0,05$, критерий Стьюдента). Кроме того, трансплантаты Nurr1/PST также демонстрировали более высокие уровни экспрессирования ПСК in vivo (Фиг. 32C, D). При этом пропорции клеток, экспрессирующих маркеры ДА нейронов среднего мозга ТГ и FoxA2 в центре трансплантата,

были сопоставимыми для Nurr1 и Nurr1/PST клеток (ТГ: 62,0% +/- 8,0 против 51,3%+/- 7,0; p = 0,33; FoxA2: 63,2% +/- 8,6 против 55,4% +/- 2,0, p = 0,3, соответственно; Фиг. 32E).

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

Указанные открытия показали, что по меньшей мере некоторые из эффектов ПСК на функционирование трансплантата являются результатом увеличения иннервации стриатума волокнами. Соответственно, имела место высокая корреляция между функционированием трансплантата и относительным уровнем разрастания ЗФБ-позитивных волокон, например в зону IV (Фиг. 33F; $p < 0,001$, $r2 = 0,65$, $n = 17$). Неожиданным образом, связь разрастания волокон с поведенческой функцией в экспериментальных группах (контрольной, ПСК-стимулированной и обработанной endoN) была стабильной, указывая на то, что иннервация трансплантат→хозяин представляет собой показатель восстановления поведенческой функции в модели БП на мышах. Ряд факторов механически способствовал увеличению

разрастания волокон, например, повышение проницаемости зоны реактивной глии, инкапсулирующей центр трансплантата, увеличение способности к спраутингу, улучшенное разрастание в окружающую ткань хозяина (например, более легкое перемещение конуса роста), и предотвращение преждевременного формирования связей с тканью хозяина в непосредственной близости от центра трансплантата. Типовые механизмы согласуются с ролью ПСК, способствующей процессу разрастания при нормальном развитии и в нервной системе взрослого организма.

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

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

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

Животные: Мышей 129S3/SvImJ в возрасте 6 недель (Jackson Laboratory) содержали в условиях контролируемой температуры и свободного доступа к пище и воде. Экспериментальные процедуры проводили в соответствии с правилами Национального института здоровья (NIH) и институционального содержания и использования животных, и

были одобрены локальным Комитетом по институциональному уходу за животными и их использованию (IACUC) и Комитетом по институциональной биобезопасности (IBC).

Инъецирование 6OHDA и тест с индуцированным амфетамином вращением: Животных анестезировали пентобарбиталом натрия (10 мг/кг) и инъецировали в стриатум с правой стороны 2 мкл 6OHDA (4 мкг/мкл в солевом растворе, 0,5% аскорбиновой кислоты). Инъецирование осуществляли с помощью шприца Hamilton в участок с координатами: 0,5 мм в постериальном и 1,8 мм в латеральном направлении от брегмы и на 2,5 мм вентральнее поверхности ГМ. Перед хирургическим вмешательством животные получали одну интраперитонеальную инъекцию дезипрамина (25 мг/кг, Sigma). Через две недели после хирургического вмешательства животных оценивали в тесте с индуцированным амфетамином вращением. Животных помещали на прозрачные пластиковые цилиндры диаметром 30 см на полчаса, после чего они получали одну интраперитонеальную инъекцию амфетамина (10 мг/кг, Sigma). Через 20 минут и на протяжении следующих 20 минут подсчитывают число ипсилатеральных/контралатеральных вращений. Животных тестировали один раз в неделю на протяжении семи недель, затем под глубокой анестезией перфузировали через сердце ФСБ и 4% параформальдегида в 0,1М фосфатном буфере (ФБ, pH 7,4). Головной мозг извлекали и дополнительно фиксировали в течение ночи при 4 °C в 4 % параформальдегиде, а затем получали с помощью вибратома (Pelco-101, Ted Pella) сагиттальные срезы толщиной 40 мкм.

Дифференцировка и трансплантация клеток: Клетки Nurr1::GFP BAC-трансгенной репортерной линии ЭСК BAC-мышей (т.е. экспрессия ЗФБ регулируется промотором Nurr1) 5 трансфицировали лентивирусом (pLenti, Invitrogen), содержащим ген PST мыши под контролем промотора ЦМВ. ЭСК размножали на обработанных митомицином С клетках ЭФМ (StemCell Technologies) в среде DMEM (Invitrogen), 10% ФБС (HyClone) с добавлением 1400 единиц/мл ЛИФ (ESGRO; Invitrogen), 2 мМ L-глутамина, 1 мМ β- меркаптоэтанола, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen). Дифференцировку ДА клеток индуцировали в соответствии с Barberi et al., Nat Biotechnol 21, 1200-1207 (2003), с некоторыми модификациями. Вкратце, клетки дифференцировали на фидерных клетках MS5 на покрытых желатином чашках (10 000 клеток на чашку диаметром 10 см) и культивировали в течение 4 дней на заменяющей сыворотку среде (SRM). На 4 день добавляли белки Sonic hedgehog (SHH, 200 нг/мл) и ФРФ-8 (100 нг/мл). на 7 день

дифференцировки среду заменяли на N2 с добавлением SHH, ФРФ-8 и ОФРФ (10 нг/мл). на 11 день индуцировали конечную дифференцировку, удаляя SHH, ФРФ-8 и ОФРФ, и добавляя аскорбиновую кислоту (АК, 200 мкМ) и BDN (нейротрофический фактор головного мозга, 20 нг/мл).

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

Отсортированные по Nurr1::GFP клетки анализировали на жизнеспособность и ресуспендировали в N2 с BDN и АК с получением конечной концентрации 55 000 клеток/мкл. 1 мкл инъецировали в поврежденный стриатум мышей с помощью 50 мкм заостренного тонкого стеклянного капилляра в участок с координатами: 0,3 мм в постериальном, 1,5 мм в латеральном направлении от брегмы, и на 2,2 мм вентральнее поверхности ГМ. Аликвоту суспензии клеток повторно высевали на покрытые матригелем 6 мм чашки для дальнейшего исследования.

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

Обработка EndoN: Для удаления ПСК с NCAM, вечером накануне сбора клеток клетки обрабатывали 20 единицами endoN, фагового фермента, в частности, устраняющего ПСК 7-9. Затем клетки собирали и инъецировали, как описано выше, но ресуспендировали в N2 с BDN

и АК и 5 единицами endoN. Ранее авторы установили, что инъекции того же количества endoN отдельно мышам с повреждениями не улучшает поведенческую функцию у животных.

Анализ PST мРНК и ПСК-NCAM in vitro: Для проведения вестерн-блоттинга клетки обрабатывали буфером для вестерн-блоттинга (WB) (ФСБ с 1% NP40, 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA и 1× ингибиторов протеазы/фосфатазы, добавляемых непосредственно перед экстрагированием, при pH 7,4), обрабатывали ультразвуком дважды в течение 5 секунд, центрифугировали и ресуспендировали в буфере Лэммли (ЛБ). Аликвоты, не содержащие ЛБ, сохраняли для определения белка. Равные количества белка загружали на 6% полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия для гель-электрофореза (BioRad). Белки переносили с помощью электрофореза на поливинилиденовые мембраны (Millipore). Мембраны блокировали в течение 1–6 ч в 0,1% Triton X-100 TBS (TBS-T) с 5 % обезжиренного сухого молока и инкубировали в течение ночи с антителом против NCAM (1:10 000, Santa Cruz) в TBS-T с 5% молока. Блоты инкубировали с конъюгированным с пероксидазой вторичным антителом (1:10 000, Jackson) и проводили детекцию с применением метода усиленной хемилюминесценции (ECL) (Amersham Pharmacia Biotech). Уровни белка количественно определяли с применением программного обеспечения ImageJ.

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

Иммуногистологические и стереологические процедуры: Свободноплавающие коронарные срезы блокировали в 0,1% Triton X-100, 5% сыворотке осла в ФСБ в течение 30 мин при комнатной температуре и инкубировали на протяжении 48 часов при 4 °C с различными антителами: кролика против ЗФБ (1:300), курицы против ЗФБ (1:200, Chemicon), мыши против ТН (1:200), IgM мыши против ПСК (1:1000), мыши против NeuN (1:400),

козьим против FoxA2 (1:300), кролика против Girk2 (1:300, Alomone Labs), мыши против синапсина (1:200, BD Transduction Laboratories). Затем срезы промывали и инкубировали с вторичными антителами: Cy2, Cy3 и Cy5-конъюгированными антителами осла (1:400, Jackson). Для ПСК использовали Cy5-конъюгированный анти-IgM осла (1:500 Jackson). Инкубирование проводили на протяжении 2 ч при комнатной температуре. Срезы дважды промывали в ФСБ и монтировали в Mowiol (Calbiochem). Каждый третий из коронарных срезов мозга анализировали для каждого иммуннооокрашивания.

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

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

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

C. Сверхэкспрессия гена PST (полисиалилтрансферазы) человека. Группы имеющих повреждения животных получали одну из 3 доз: клетки дикого типа, либо клетки,

экспрессирующие PST, либо клетки, предварительно обработанные ферментом PST. На них проводили поведенческие тесты согласно парадигмам, представленным в таблице 11 (индуцированное амфетамином вращение, тест с цилиндром, степ-тест). Выбранные дозы (например, 200 тыс., 100 тыс., 50 тыс. клеток) успешно применялись у мышей, таким образом, что полученные нейроны демонстрировали результаты согласно описанию в настоящем документе для генов PST мыши.

D. Непосредственное введение очищенного фермента PST в клетки. Другими словами, нетрансгенный способ индукции PST. Предварительная обработка клеток ферментом PST, которая приводит к полисиалилированию и повышенной экспрессии поверхностного PST. Несмотря на то, что PST млекопитающих представляют собой малораспространенные мембранные белки, функционирующие в аппарате Гольджи, очищенная α2,8-полисиалилтрансфераза *Neisseria meningitides* (PST-NM) функционировала во внеклеточной среде при использовании коммерчески доступного нетоксичного субстрата (а именно, ЦМФ-сиаловой кислоты) и синтезировала полимер, химически идентичный PST млекопитающих. В одном из примеров активный фрагмент указанного фермента эффективно добавлял PST в терапевтические белки *in vitro*, улучшая фармакокинетику *in vivo*. В присутствии ЦМФ-сиаловой кислоты PST синтезировался PST-NM непосредственно на поверхности клеток разнообразных типов *in vitro,* в том числе на ЭСК мыши и человека (фиг. 35A-E). Прямая инъекция PST-NM и субстрата *in vivo* запускает повышенное накопление PST на поверхности клеток в областях зрелого головного мозга, в том числе в коре головного мозга, стриатуме и спинном мозге (фиг. 35GH). PST, синтезированный PST-NM, разлагался эндонейраминидазой (эндо-H) (фиг. 35B), удалявшей индуцированный PST, демонстрируя, что синтезируемый PST-NM PST обладал функциональными свойствами, сравнимыми с свойствами эндогенного PST (фиг. 35A,C, D). Экспрессирование PST с помощью PST-NM происходило менее чем через час, что превосходит скорость медленного трансгенного индуцирования PST. Экспрессирование продолжалось на протяжении нескольких недель *in vivo*, после чего уровень маркеров PST снижался, таким образом, удавалось избежать побочных эффектов продолжительной индукции трансгена PST. Соответственно, предложено применение *in vitro* обработки клеток PST-NM + субстрат как простая альтернативная стратегия стимуляции повышенных уровней PST в полученных из ЭСКч ДА

нейронах и других типах клеток для применения при процедурах трансплантации. Кроме того, указанный альтернативный подход при трансляции, т. е. переходу к применению для процедур трансплантации у человека, обладает преимуществами неинвазивности, т. е. исключает применение трансгенных методов; для указанных процедур используют отвечающие стандартам GMP реагенты для соответствия протоколам применения в клинической практике, и обеспечивает временную биохимически стимулированную экспрессию PST, соответствующую ожидаемым временным рамкам, для ДА-волокон, выходящих из области трансплантата и проникающих в мозг хозяина, что необходимо для недопущения некоторых опасных побочных эффектов применения клеток, сконструированных для трансплантации.

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

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

инъецирование только PST-NM не оказывает эффекта, тогда как совместное введение с субстратом (H) обеспечивает значительные уровни экспрессии PST в стриатуме мышей.

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

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

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

мостиков при регенерации аксонов *in vivo*. Тем не менее, никакое терапевтическое вмешательство не обеспечивало восстановления двигательной функции у пациента, в том числе контроля тонких мышечных движений. В соответствии с настоящим описанием повышение экспрессирования PST на шванновских клетках, применяемых для трансплантации, приводило к усиленной миграции шванновских клеток и аксональному росту, что впоследствии приводило к сильно выраженному стимулирующему действию на двигательные функции (фиг. 30A-D). Соответственно, в некоторых вариантах реализации повышенное экспрессирование PST на шванновских клетках in vitro рассматривается для применения при процедурах трансплантации у человека с повреждением спинного мозга. Другая стратегия применения искусственной экспрессии PST за счет повышенной экспрессии генов PST в применяемых у человека процедурах включала полученные из ЭСК HB9 двигательные нейроны, при этом введение гена PST в указанные нейроны с помощью экспрессии генов на основе лентивирусного вектора приводило к резкому повышению разрастания аксонов как в культуре, так и после трансплантирования мышам для восстановления механически индуцированного повреждения седалищного нерва. Последнее приводило к улучшенному специфичному направленному действию на мышечную ткань (фиг. 30E-H). Соответственно, в другом варианте реализации искусственное экспрессирование PST на поверхности полученных из ЭСК двигательных нейронов применяется для восстановления функции седалищного нерва.

IVX. Повышенная безопасность трансплантируемых ДА нейронов.

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

Несмотря на то, что клетки, полученные с применением способов, описанных в настоящем документе, демонстрировали такие характеристики, как пониженный риск для пациентов при использовании для трансплантации, рассматриваются дополнительные варианты реализации для дальнейшего снижения возможного риска для здоровья пациентов, получающих клеточные трансплантаты. Одной из ряда проблем при процедурах клеточной терапии на основе ЭСКч является возможность введения примеси недифференцированных клеток, не поддавшихся дифференцировке, которые в посттрансплантационных условиях развиваются в клетки, причиняющие пациенту вред. В случае плюрипотентных клеток

одним из возможных пагубных результатов является образование тератомы, что ставит под угрозу жизнь пациента. Описано образование тератомы в результате спонтанной дифференцировки клеток при применении полученных из ЭСКч клеток после использования краткосрочных протоколов нейронной дифференцировки. Тем не менее, применение авторами настоящего изобретения полученных из ЭС-клеток человека нервных клеток, в отличие от аналогов, полученных из ЭСК мыши, редко приводило к образованию тератом после применения соответствующих стратегий нейронной дифференцировки, описанных в настоящем изобретении (т. е. монослойная культура, протокол двойного ингибирования SMAD-сигнализации и культивирование с цитокинами, которые не способствуют пролиферации). Фактически, образования тератом не наблюдалось за последние 10 лет при анализе нескольких сотен животных с трансплантатами клеток человека на фоне применения ряда стратегий нейронной дифференцировки. Более того, тератомы не наблюдались при процедурах БП-трансплантации в соответствии с настоящими изобретениями с применением клеток человека для трансплантатов. Разница при применении клеток человека относительно применения клеток мыши для процедур трансплантации для применения у человека, предположительно, связана с разными стадиями плюрипотентности, на которых находятся ЭСК человека/мыши, поэтому свойства клеток человека, как считают, соответствуют стадии плюрипотентности, описанной как Epi-SC, в отличие от ЭСК мыши, которые могут находиться на другой стадии развития.

При этом по меньшей мере одна из проблем при применении клеток в предшествующих трансплантационных исследованиях, состоящая в постоянном риске избыточного нейронального роста, существенно выраженного при протоколе Perrier et al., PNAS 2004 и аналогичных протоколах, неожиданным образом отсутствует при применении зрелых ДА нейронов и способов трансплантации в соответствии с настоящими изобретениями. Далее, другая проблема, обнаруженная при трансплантационных экспериментах в ходе предыдущих исследований, заключалась в образовании происходящих из ЭСКч нейроэпителиальных структур (т. е. нейрональных розеток), продолжающих пролиферировать *in vivo*. Указанная экспансия трансплантированных нейроэпителиальных клеток in vivo наблюдалась при различных парадигмах нейрональной трансплантации, в том числе в трансплантационных исследованиях с применением полученных из ЭСКч ДА нейронов в моделях на грызунах с болезнью Паркинсона и хореей Гентингтона. Указанные

«нейрональные розеткообразующие» пролиферирующие клетки представляли собой нетрансформированные первичные клетки с высоким собственным потенциалом роста, что приводило к образованию у животных после трансплантации трансплантатов значительного размера, состоящих из эктопической, по большей части кортикально-подобной ткани. В соответствии с настоящим описанием был использован ряд стратегий для устранения примесей плюрипотентных или нейроэпителиальных клеток во время трансплантации (например, отбор по SSEA-4 (маркер плюрипотентности) или Forse-1 (нейроэпителиальный маркер). Указанные стратегии были отчасти успешными при применении стратегий дифференцировки на основе розеток, при этом избыточный нейрональный рост по-прежнему наблюдался в подгруппе трансплантатов, отобранных по Forse1, или при негативном отборе на SSEA-4. Неожиданным образом, после освоения указанной процедуры дифференцировки в ДА нейроны на основе вентральной пластинки, а не розеткообразующих клеток, проблема разрастания нейроэпителия была решена. Происходящие из трансплантата пролиферирующие клетки в функциональных полученных из ЭСКч вентральной пластинки ДА нейронных трансплантатах наблюдались редко.

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

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

В предпочтительных вариантах реализации предложены ЭСК человека для применения в способах получения и использования клеток для процедур трансплантации у человека, иными словами, клеточной терапии для лечения БП. В частности, применение ЭСК человека обладает многочисленными преимуществами по сравнению с применением иСК человека в способах согласно настоящим изобретениям, например, в качестве примера, при получении подходящих для трансплантации ДА нейронов среднего мозга для применения в качестве клеточной терапии БП. В частности, применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иСК) в качестве источника клеток для образования ДА нейронов имеет ряд преимуществ, таких как обеспечение генетически совместимого источника клеток для каждого пациента. Тем не менее, в результате нескольких недавних исследований возникли сомнения относительно безопасности и полной генетической совместимости иСК. Перепрограммированные клетки, как было показано, являются носителями потенциально опасных генетических и эпигенетических нарушений, нежелательных при клиническом применении. Далее, в работах на иСК мыши было показано, что полученные из иСК клетки не полностью иммуносовместимы, что является главным возражением против их применения для трансплантации у человека. Далее, не существует одобренных FDA процедур с применением иСК для трансплантации. Наконец, потенциальное создание удовлетворяющих стандартам GMP с полным контролем качества (QC) банков клеток для каждого отдельного пациента было бы непрактичным и слишком затратным. Наряду с этим, генетическая стабильность иСКч по сравнению с ЭСКч интенсивно изучалась. Несмотря на то, что в культивируемых ЭСКч, согласно наблюдениям, со временем возникают мутации, время и скорость возникновения таких мутаций, как оказалось, отличаются от свойственных иСКч, при этом ЭСКч в целом признаны более генетически стабильными, чем иСК, см. примеры у Hussein, et al., Nature 471, 58-62 (2011); Mayshar, et al. Cell Stem Cell 7, 521-531 (2010); Lister, et al. Nature 471, 68-73 (2011); Laurent, et al. Cell Stem Cell 8, 106-118 (2011). Кроме того, для нескольких линий ЭСКч были разработаны стандартные операционные процедуры, удовлетворяющие требованиям безопасности при тщательной проверке, обязательной согласно FDA для продуктов, применяемых для клеточной и генной терапии. Две группы в США получили разрешение FDA на переход к клиническому применению

клеточной терапии на основе ЭСКч. Так, компания Geron Corporation начала исследование фазы I полученных из ЭСКч клеток-предшественников олигодендроцитов (GRNOPC1), а Advanced Cell Technology (ACT), Inc. в настоящее время проводит два исследования фазы I/II с применением полученных из ЭСКч пигментных эпителиальных клеток сетчатки для лечения макулярной дистрофии Штаргардта (исследование NCT01345006) и прогрессирующей сухой возрастной макулярной дегенерации (исследование NCT01344993). Наконец, тот факт, что оба одобренных FDA клинических исследования с применением ЭСКч направлены на терапию расстройств нервной системы, демонстрирует преимущества применения способов на основе ЭСКч для получения материала для трансплантации для лечения заболеваний и повреждений нервной системы. Нервная система считается иммуно-привилегированной областью, так как в НС чужеродная ткань (аллотрансплантаты) вызывает слабый иммунный ответ по сравнению с таким же трансплантатом, размещенным на периферии. Так, спустя 25 лет после трансплантации фетальных клеток в мозг человека, было обнаружено, что некоторые аллогенные нейроны сохраняли жизнеспособность в мозге человека до 16 лет при транзиторной иммуносупрессии. Таким образом, как оказалось, полная антигенная совместимость источника клеток и реципиента трансплантата не является обязательной. Соответственно, в качестве универсального аллогенного источника ДА нейронов для лечения БП, помимо других заболеваний, расстройств и повреждений нервной системы предложены ЭСКч. Предполагается, что пациентам, получающим клетки в соответствии с настоящими изобретениями предложены, поставлен клинический диагноз БП. Предложены аутентичные ДА нейронные трансплантаты для применения при ранних вмешательствах и при БП от умеренной до тяжелой формы, включая пациентов, у которых наблюдается недостаточный контроль симптомов при применении доступных медикаментозных средств, таких как леводопа, вспомогательные лекарственные средства и т.д. В некоторых вариантах реализации предложено введение нейронных трансплантатов пациентам, у которых наблюдаются слабовыраженные симптомы ранней БП (например, при применении нейровизуализации для обнаружения дофаминергической недостаточности, ФДГ-ПЭТ, симптомы дискинезии и т.д. Оценку дискинезии при мониторинге пациентов до и после трансплантации предложено проводить согласно унифицированной шкале двигательных расстройств UDysRS («Unified Dyskinesia Rating scale») (Goetz, et al., Mov Disord. 23, 2398-2403 (2008)). Также для пациентов могут быть характерны «томограммы без

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

Нейровизуализация и другие биомаркеры: Функциональная визуализация широко использовалась в задействующих хирургические методы исследованиях БП. Хотя анализ состояния трансплантата предусматривает применения визуализации на основе дофамина (например, ФДОПА-ПЭТ), предложены для применения техники нейровизуализации с

применением других лигандов, включая визуализацию на основе маркеров, например, нацеленных на воспаление, а также невизуализируемых системных маркеров, например, сбор экспериментальных данных. Визуализация может быть использована для предоперационного планирования, например, для определения степени и локализации ДА-истощения в базальных ганглиях, и включение данных ПЭТ при индивидуальном хирургическом планировании для каждого пациента. Локализация трансплантата и число вводимых клеток. В некоторых вариантах реализации сайтами трансплантации (введения) клеток является скорлупа (Freed, et al. N. Engl. J. Med. 344, 710-719 (2001); Lindvall, et al. Prog. Brain Res. 82, 729-734 (1990) и посткомиссуральная часть скорлупы (Olanow, et al. Ann. Neurol. 54, 403-414 (2003)). В некоторых вариантах реализации предложено несколько точек размещения с применением различных вариантов хирургического доступа. Для мониторинга трансплантированных клеток предложено использовать МРТ с системой ClearPoint, обеспечивающей построение и визуализацию траектории в реальном масштабе времени и точность нацеливания. Указанную систему размещают в месте входа электродов для глубокой стимуляции головного мозга у пациентов с БП. Число клеток и состав трансплантата. Фетальные исследования проводили с применением по существу неизвестного числа ДА нейронов, так как использовался фетальный трансплантируемый материал, содержащий множество клеточных типов. На основании данных, представленных в настоящем документе, для восстановления функции ДА нейронов предложено расчетное количество, равное 100 000–200 000 жизнеспособных TH+ нейронов.

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

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

№ колонки	ID Колонки	Кратное изменение	p-значение
7304	FOXA1	22.5512	5.03E-16
7305	FOXA2	17.3328	5.70E-17
31270	SPON1	16.4393	2.14E-14
31684	SYT4	13.2693	9.61E-12
4334	COL22A1	8.54042	2.05E-17
6616	FBLN1	8.24162	4.97E-18
32035	TFF3	8.01805	1.08E-13
5324	DKK1	7.95664	1.19E-09
3244	CAPN6	7.58928	1.77E-08
2544	C20ORF56	7.58575	6.71E-15
27591	PKDCC	7.42271	2.02E-11
23584	LOC91461	5.43556	9.86E-09
5037	DDC	5.19301	2.09E-08
13598	LDB2	4.76303	2.92E-09
7	AMOT	4.5	5.
23		8838	68E-08
4978	DBX1	4.40946	2.36E-09
31138	SOX8	4.32227	9.29E-08
30193	SILV	4.3198	2.52E-07
30148	SHISA2	4.31109	1.60E-07
31509	STK39	3.65624	2.90E-06
27661	PLCL2	3.63607	6.81E-11
24425	MGST1	3.59223	2.48E-11
32945	TSPAN7	3.57361	7.36E-07
29082	RHOU	3.51768	5.89E-06
9283	HS.191933	3.49663	6.24E-13
5478	DOCK10	3.43476	8.18E-07
25094	MMP11	3.40705	2.13E-08
29975	SERPINF1	3.36169	1.97E-10
29042	RGS4	3.33544	7.01E-06
926	APCDD1	3.33059	3.47E-10
№	Column	кра	p-

колонки	ID	тное изменение	значение
12640	IRX3	3.32454	1.65E-05
26837	OSBPL10	3.3051	9.55E-07
32086	THBS4	3.29135	9.77E-07
14581	LOC100130506	3.1293	5.81E-09
4931	DAB2	3.02851	4.80E-09
12642	IRX5	2.95938	2.73E-08
13774	LMX1A	2.81057	1.42E-06
31516	STOM	2.76317	2.01E-07
26374	ODZ4	2.75644	3.06E-06
8210	GSC	2.75053	3.47E-07
26170	NRCAM	2.71264	1.82E-08
28414	PTCH1	2.63379	2.99E-08
31578	SULF2	2.59351	1.42E-07
7366	FREM1	2.5697	2.25E-07
13743	LITAF	2.55681	3.65E-08
26236	NTNG1	2.55383	1.78E-07
25869	NEUROG2	2.55012	5.05E-06
26132	NPY	2.54575	4.48E-06
25967	NKX2-1	2.52195	0.00023
27101	PCDH18	2.46481	1.69E-05
32557	TNFRSF19	2.45297	4.06E-08
5759	EFEMP1	2.44308	7.78E-09
31148	SP5	2.43459	5.34E-06
28069	PQLC3	2.42685	2.59E-05
30313	SLC20A2	2.40457	1.24E-06
30743	SNHG4	2.35277	8.69E-08
27607	PKP2	2.34734	5.34E-05
25520	MYL4	2.3327	3.93E-08
26128	NPTX2	2.29568	1.08E-05
26006	NMD3	2.29039	3.18E-05
16924	LOC391019	2.28656	1.25E-05
19975	LOC646966	2.26444	6.23E-05
29894	SEMA6A	2.25036	0.000844
6161	EYA2	2.23175	0.00024
26105	NPFFR2	2.23095	7.31E-05

4818	CXXC4	2.23047	1.66E-05
2764	C4ORF14	2.22128	5.73E-06
18269	LOC642989	2.22053	0.000735
13059	KIAA1324L	2.21906	4.75E-05
23663	LRIG3	2.21159	4.38E-07
6196	FABP5L2	2.19875	3.09E-05
29347	RPL13A	2.19362	0.000122
12446	IL1RAPL1	2.19134	1.75E-05
28455	PTN	2.18577	9.36E-05
30746	SNHG7	2.18224	4.35E-07
28788	RASL12	2.16856	1.39E-05
17150	LOC401074	2.16782	1.07E-06
30283	SLC16A3	2.16541	6.06E-05
15378	LOC100133008	2.16461	3.15E-05
32180	TLE6	2.16433	6.35E-07
12887	KCNQ1OT1	2.1641	2.97E-06
31210	SPATS2L	2.16393	0.000597
4241	CMTM8	2.16297	0.000392
30933	SNORD25	2.15953	0.000363
2803	C5ORF13	2.15734	3.94E-05
32131	TIGA1	2.15335	1.80E-05
1667	BMP7	2.14281	0.000497
20837	LOC649946	2.14098	8.39E-05
25756	NCRNA00219	2.12543	6.42E-07
8003	GPM6B	2.08967	3.45E-05
5650	DYM	2.08942	0.000179
29606	S1PR3	2.08344	0.000479
27681	PLEKHA5	2.08285	0.000217
11495	HS.570308	2.08044	1.67E-06
26232	NTN1	2.06755	2.49E-08
12635	IRS1	2.06435	0.000109
20404	LOC648343	2.05497	0.000791
29352	RPL15	2.05205	2.82E-06
33800	WNT5A	2.03874	1.08E-06
30481	SLC38A4	2.03653	1.13E-06
12059	HS.709319	2.01993	2.66E-06

2 2500	LOC728 126	2.0 183	1. 16E-06
1 6095	LOC136 143	2.0 1775	5. 71E-05
1 2718	ITPR3	2.0 1384	1. 67E-05
4 004	CHN2	2.0 0649	7. 18E-06
3 2162	TIPARP	2.0 0538	0. 000633
4 82	ADSS	2.0 0282	0. 000136
2 196	C17ORF 45	2.0 0241	6. 15E-05
3 447	CCDC5 1	- 2.00054	0. 000177
5 945	ENC1	- 2.0038	0. 000468
2 7915	POU3F2	- 2.00877	2. 04E-07
2 3143	LOC729 779	- 2.01527	0. 000972
2 3972	MAP1L C3A	- 2.01892	3. 37E-06
7 611	GAS6	- 2.02463	9. 63E-08
1 7062	LOC399 959	- 2.02793	2. 39E-05
2 9519	RSPO3	- 2.03762	1. 61E-05
2 9038	RGS20	- 2.04076	3. 60E-09
1 9157	LOC644 936	- 2.04097	0. 000128
3 0502	SLC3A2	- 2.04467	5. 58E-05
3 3508	VCAM1	- 2.05421	2. 51E-06
4 90	AFAP1 L2	- 2.05673	8. 23E-07
2 3275	LOC730 167	- 2.06009	0. 000652
2 9215	RNF175	- 2.06406	6. 81E-05
5 923	EMILIN 2	- 2.06713	2. 81E-06
3 4367	ZNF462	- 2.07292	1. 63E-05
2 6244	NUAK1	- 2.0732	0. 000172
2 5818	NEBL	- 2.07351	1. 55E-06
2 9624	SALL3	- 2.0787	2. 15E-06
3 3491	VANGL 2	- 2.08497	0. 000402
3 0581	SLC7A8	- 2.08722	1. 40E-08
8 75	ANXA3	- 2.08727	0. 000227
3 4075	ZFP36L 1	- 2.08803	5. 08E-05
1 5637	LOC100 133760	- 2.09319	8. 14E-05
1 227	ASNS	- 2.10169	8. 03E-05
3 3804	WNT7B	- 2.1052	3. 00E-08
2 4064	MARS	- 2.107	0. 000146
3 3725	WDR72	- 2.11201	0. 000617

31295	SPRY1	-2.12339	2.43E-05
7495	GABARAPL1	-2.12367	1.70E-05
4331	COL1A2	-2.12521	1.97E-05
6821	FILIP1	-2.1288	0.00026
24246	METRN	-2.13118	1.99E-05
12056	HS.66187	-2.13789	2.97E-05
28438	PTGIS	-2.14246	7.36E-06
12980	KIAA0367	-2.15304	1.92E-05
1575	BCMO1	-2.16946	7.40E-05
25473	MXRA5	-2.17542	3.63E-06
32537	TNFAIP1	-2.17984	7.66E-06
34064	ZFHX4	-2.23036	0.00046
28787	RASL11B	-2.23056	0.000115
5632	DUSP6	-2.23366	0.000732
3149	CACHD1	-2.23514	5.39E-05
3221	CAMKV	-2.25983	5.01E-08
7248	FLNC	-2.26856	1.13E-05
28307	PRSS8	-2.28456	1.35E-05
12662	ISYNA1	-2.29255	1.40E-05
7524	GADD45A	-2.2962	7.46E-07
5921	EMID2	-2.29995	1.55E-05
941	APLP1	-2.31453	2.03E-07
30576	SLC7A5	-2.32091	0.000757
7474	FZD3	-2.32644	6.13E-06
5940	EMX2OS	-2.3303	2.65E-07
1259	ATF3	-2.34034	2.59E-06
33806	WNT8B	-2.34155	3.96E-08
31388	SST	-2.34663	1.83E-06
3188	CALCB	-2.34833	3.49E-06
1075	ARHGEF6	-2.35421	1.54E-08
26885	OTX1	-2.35607	0.00023
26393	OLFM3	-2.35759	2.32E-07
33087	TUBB2A	-2.36013	0.000777
31747	TAGLN	-2.36809	2.16E-05
5372	DMRTA1	-2.36884	5.28E-08
3614	CD200R1	-2.37345	1.25E-14

17147	LOC401056	-2.37854	8.57E-10
33801	WNT5B	-2.3794	3.01E-08
28590	RAB11FIP1	-2.40833	6.65E-07
23362	LOC730525	-2.41129	1.59E-06
27658	PLCH1	-2.4212	3.31E-07
7000	FLJ32310	-2.42179	5.77E-06
3339	CBX4	-2.43314	1.13E-07
6073	ERRFI1	-2.44539	1.44E-05
32521	TMSB15A	-2.45505	1.31E-05
13242	KLHL14	-2.51767	2.71E-11
30201	SIPA1L2	-2.52018	3.67E-06
32760	TRIB1	-2.52274	1.73E-06
13641	LFNG	-2.53204	5.33E-07
12285	IER3	-2.54594	1.65E-07
28506	PTPRZ1	-2.55447	1.62E-06
1608	BEX2	-2.56331	0.000109
32179	TLE4	-2.56513	0.000135
10888	HS.551307	-2.56708	0.000405
683	ALPK2	-2.57443	2.83E-06
32551	TNFRSF12A	-2.59274	4.02E-06
32610	TNRC9	-2.59782	3.23E-07
777	ANKRD1	-2.61554	3.15E-05
13622	LEMD1	-2.62351	2.97E-05
26777	OR7E156P	-2.64884	3.51E-07
24377	MGC39900	-2.66479	1.46E-05
12267	ID1	-2.66562	6.68E-07
27726	PLP1	-2.69279	9.13E-07
4350	COL4A6	-2.69704	1.17E-07
4320	COL11A1	-2.71039	1.79E-09
3127	CA2	-2.71276	2.35E-08
26151	NR2E1	-2.72059	4.25E-14
31267	SPOCK1	-2.7283	3.38E-05
13744	LIX1	-2.73818	9.34E-06
32038	TFPI	-2.77685	6.23E-05
32776	TRIM24	-2.79151	8.73E-08
32756	TRH	-2.79963	3.98E-07

32652	TOX3	-2.81075	9.35E-06
2405	C1ORF21	-2.81457	9.49E-09
5371	DMRT3	-2.82614	4.28E-09
32381	TMEM2	-2.83489	1.83E-05
2437	C1ORF61	-2.85324	3.53E-09
2868	C6ORF141	-2.8569	6.05E-06
1178	ARX	-2.87861	0.000122
26245	NUAK2	-2.95666	4.14E-08
33796	WNT2B	-2.96258	1.15E-10
28507	PTRF	-2.97439	2.07E-07
7662	GCNT1	-2.98108	1.49E-06
5930	EMP1	-2.9918	1.11E-06
31844	TBC1D9	-3.00324	2.53E-09
4352	COL5A2	-3.02084	1.26E-07
4699	CTNNA2	-3.04046	6.91E-09
2516	C20ORF177	-3.04277	4.86E-08
3518	CCL2	-3.04332	9.50E-11
34315	ZNF385B	-3.05084	5.56E-07
12058	HS.7023	-3.0642	3.72E-08
23661	LRIG1	-3.07681	3.30E-07
7813	GLI3	-3.07936	1.22E-08
31513	STMN2	-3.09098	4.93E-06
30023	SFRP1	-3.09686	1.13E-06
1128	ARMCX2	-3.09746	2.91E-06
4689	CTGF	-3.11416	4.47E-08
6365	FAM18A1	-3.1422	2.56E-09
4121	CLDN1	-3.15492	1.93E-06
627	ALDH1A1	-3.15745	1.18E-12
629	ALDH1A3	-3.17887	4.46E-13
33501	VAT1L	-3.18253	1.21E-06
4912	CYR61	-3.18856	3.58E-07
12781	KANK4	-3.20054	7.99E-12
3067	C9ORF171	-3.24146	3.73E-11
12363	IGFBP3	-3.34999	1.02E-06
4533	CRIP1	-3.45501	6.62E-08
3740	CDH11	-3.48609	2.23E-08

816	ANKRD38	-3.48622	6.93E-12
12730	JAG1	-3.58463	3.83E-08
12271	ID4	-3.72402	1.78E-12
810	ANKRD34B	-3.76606	1.15E-11
12850	KCNJ13	-3.81092	2.16E-09
6112	ETV5	-3.81591	4.37E-10
9265	HS.181245	-3.86611	1.24E-09
633	ALDH2	-3.87108	1.97E-09
26180	NRIP3	-3.92066	6.08E-08
30413	SLC2A1	-4.11899	1.18E-05
5479	DOCK11	-4.35251	5.67E-09
25658	NAV1	-4.35259	1.02E-10
5349	DLL1	-4.47474	1.58E-07
34418	ZNF533	-4.49025	1.16E-09
327	ACTC1	-4.63509	7.37E-09
1037	ARHGAP15	-4.67561	9.89E-10
31132	SOX3	-4.72958	7.45E-09
26153	NR2F1	-4.73849	1.53E-09
3129	CA4	-4.7904	3.00E-09
33071	TTYH1	-4.79045	8.94E-14
5766	EFHD1	-4.86615	1.16E-09
867	ANXA1	-4.95401	1.41E-08
8500	HES4	-5.24189	1.63E-11
4299	CNTNAP2	-6.14001	2.94E-08
23947	MAMDC2	-6.36522	2.23E-10
7605	GAS1	-6.38074	2.63E-11
31151	SP8	-8.88965	4.42E-20
30024	SFRP2	-9.73482	4.24E-14
13677	LHX2	-10.9076	6.16E-11
5939	EMX2	-11.5085	1.34E-19
21068	LOC650757	-12.1496	7.71E-20
27068	PAX6	-15.7636	2.24E-22
5554	DRD4	-17.3929	3.17E-16
26065	NOS2A	-20.0139	2.83E-16
1501	BARHL1	-20.6077	2.59E-14
26064	NOS2	-25.1751	7.45E-17

8501	HES5	-38.4549	8.90E-22

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

№ колонки	ID набора данныз	кратное изменение	p-значение
31575	SYT4	14.8775	3.24E-12
7195	FOXA1	11.8929	2.65E-13
4225	COL22A1	8.26361	3.21E-17
5215	DKK1	6.39507	1.32E-08
7956	GPR177	5.98201	5.65E-12
13508	LEF1	5.07514	2.45E-11
2435	C20ORF56	5.02955	2.71E-12
4928	DDC	5.0147	3.23E-08
11952	HS.71947	4.81098	5.13E-09
13665	LMX1A	4.7485	3.59E-10
12427	INHBE	4.72434	3.41E-07
32562	TPBG	4.63162	1.44E-09
1152	ATF5	4.48583	0.000153048
5369	DOCK10	4.23427	4.29E-08
31414	STOX1	4.20695	3.94E-10
4869	DBX1	4.17519	5.31E-09
31977	THBS4	4.13195	3.66E-08
2694	C5ORF13	4.0095	7.84E-10
31469	SULF2	3.83814	8.51E-11
31468	SULF1	3.81974	3.96E-07
34285	ZNF503	3.81092	2.76E-08
12531	IRX3	3.73598	3.93E-06
4935	DDIT4	3.73152	3.78E-05
31369	STC2	3.70632	8.48E-08
№ колонки	ID набора данных	кратное изменение	p-значение
27482	PKDCC	3.69823	2.20E-07
4257	COLEC12	3.6503	5.20E-06
31926	TFF3	3.62059	1.12E-08
25244	MSX1	3.60243	0.000146141
2	LOC91	3.5	2.08

3475	461	8231	E-06
26777	OTX2	3.47814	3.97E-09
13489	LDB2	3.44124	3.22E-07
13657	LMO3	3.29197	2.61E-12
817	APCDD1	3.21277	6.95E-10
4822	DAB2	3.18324	1.84E-09
25760	NEUROG2	3.16851	1.30E-07
31101	SPATS2L	3.15744	2.80E-06
1311	AXIN2	3.13274	1.80E-06
32448	TNFRSF19	3.11104	2.48E-10
4934	DDIT3	3.08248	4.83E-05
26776	OTX1	3.05293	6.14E-06
28360	PTPN13	3.03567	5.18E-06
994	ARL4A	2.98803	1.45E-07
26728	OSBPL10	2.94508	5.19E-06
32836	TSPAN7	2.86094	1.65E-05
5665	EFNB2	2.78085	0.000222563
8101	GSC	2.75066	3.46E-07
6426	FAM84B	2.74213	7.89E-07
29866	SERPINF1	2.73192	1.26E-08
924	ARHGAP10	2.72522	3.36E-07

31039	SP5	2.68162	9.57E-07
28210	PSAT1	2.64735	9.82E-06
28933	RGS4	2.6312	0.000148375
13547	LGI1	2.61567	1.30E-06
7369	FZD7	2.61404	2.46E-06
25351	MUSTN1	2.55841	4.85E-07
25411	MYL4	2.55345	4.77E-09
28424	PVRL3	2.55083	1.04E-07
299	ADAMTS9	2.53131	2.88E-08
1555	BMP4	2.52708	9.40E-05
31161	SPON1	2.5133	0.000145864
26265	ODZ4	2.50312	1.46E-05
33730	XBP1	2.50164	1.72E-06
28766	RBP1	2.49237	6.12E-05
12533	IRX5	2.48929	7.43E-07
1118	ASNS	2.47416	4.50E-06
2770	C6ORF160	2.40219	3.58E-05
12337	IL1RAPL1	2.40145	3.15E-06
12526	IRS1	2.3994	7.70E-06
7221	FOXJ1	2.39492	8.89E-05
2	RARB	2.3	9.11

8647		7013	E-09
14472	LOC100130506	2.36331	1.36E-06
3979	CITED2	2.36201	2.92E-05
31430	STT3B	2.34069	1.29E-05
26023	NPY	2.3346	1.98E-05
6052	EYA2	2.3192	0.000136915
26991	PCDH17	2.31776	8.71E-05
26127	NTNG1	2.31615	1.30E-06
373	ADSS	2.29099	1.20E-05
6120	FAM107A	2.26256	0.000677009
28387	PTPRM	2.25934	1.41E-05
31572	SYT17	2.257	7.10E-05
7143	FLRT2	2.24042	1.35E-07
32372	TMEM88	2.2394	4.55E-05
27552	PLCL2	2.23488	1.24E-06
5681	EGLN3	2.23059	0.000841858
3837	CHAC1	2.22744	2.61E-05
26045	NR2F2	2.21836	1.71E-05
7196	FOXA2	2.21691	8.01E-05
12950	KIAA1324L	2.18683	6.09E-05
3667	CDK6	2.1717	0.00076066
9540	HS.36053	2.15618	5.44E-07
19012	LOC644860	2.15508	7.00E-06
4366	CPNE8	2.15418	9.80E-06
4936	DDIT4L	2.14147	0.000195501
29691	SDCBP	2.13721	3.10E-05
7144	FLRT3	2.11969	0.00033768
5851	ENPP2	2.10048	0.000485738
1558	BMP7	2.0876	0.000718573
23514	LPAR4	2.08062	1.96E-06
23554	LRIG3	2.07935	1.81E-06
5964	ERRFI1	2.07249	0.000220066
3623	CDCA7	2.07177	0.000280326
30635	SNHG5	2.0594	4.95E-06
32620	TRAM2	2.04784	0.000111169
12809	KCTD6	2.04602	0.000114945
28901	RGL1	2.04043	0.000167278
30628	SNHG1	2.03706	0.000252445
27947	PPPDE1	2.02017	2.69E-05
5434	DPYSL3	-2.00257	0.000139976
23863	MAP1LC3A	-2.00377	4.01E-06
2	MGC18	-	0.000

4226	216	2.01184	204988
4818	D4S234E	-2.01244	8.77E-05
4825	DACH2	-2.01277	8.71E-07
4386	CPXM2	-2.02106	2.02E-05
32224	TMEM169	-2.02651	0.000222019
151	ACBD7	-2.03074	6.94E-05
8643	HOOK1	-2.03984	1.85E-05
4278	COPG2IT1	-2.04004	8.62E-07
32981	TUBB3	-2.04044	0.000989413
5887	EPHA1	-2.05082	1.41E-06
28929	RGS20	-2.06283	2.60E-09
28068	PRKCH	-2.06869	4.13E-06
33539	WBP2	-2.0692	0.000157614
23711	LY6E	-2.07026	8.93E-05
29803	SEPP1	-2.08034	2.48E-05
12713	KCND2	-2.08768	1.63E-08
34309	ZNF533	-2.08871	0.000231468
14009	LOC100129034	-2.09106	4.54E-07
25915	NMU	-2.09244	0.000184692
24132	MEST	-2.09269	2.92E-06
2715	C5ORF41	-2.09563	1.42E-05
27778	PON2	-2.09758	1.79E-05
24105	MEG3	-2.10214	5.69E-07
31812	TCF7L2	-2.10261	0.000153698
33783	YBX2	-2.1118	6.90E-06
28329	PTGIS	-2.11465	9.61E-06
6694	FHDC1	-2.11553	8.86E-06
24175	MFNG	-2.11579	2.95E-05
6640	FEZ1	-2.11631	2.58E-06
2407	C20ORF177	-2.12232	3.62E-05
26783	OVOL2	-2.12627	3.53E-07
28883	RFTN2	-2.13498	7.25E-08
19038	LOC644919	-2.13675	2.95E-06
30004	SH3BP4	-2.13785	0.000314453
31020	SOX2	-2.14642	0.000107169
16268	LOC284422	-2.16056	1.07E-05
4819	DAAM1	-2.16701	3.85E-05
32404	TMPRSS2	-2.1693	6.26E-07
26668	OR7E156P	-2.17193	1.53E-05
12609	ITPR3	-2.18226	3.09E-06
6372	FAM65B	-2.18271	1.37E-06
1	JARID2	-	4.46

2635		2.18541	E-05
25024	MOBKL2B	-2.19737	5.45E-05
31567	SYT13	-2.19832	2.30E-05
25658	NDRG1	-2.20101	5.25E-07
24318	MGST3	-2.20252	3.24E-07
2147	C18ORF26	-2.2117	2.55E-06
31010	SOSTDC1	-2.21381	2.23E-08
4662	CXCL14	-2.21955	1.81E-08
33161	UCA1	-2.21966	2.19E-05
12176	IER3	-2.21992	2.75E-06
7171	FNBP1	-2.23104	1.98E-05
12199	IFITM3	-2.23167	4.22E-06
25635	NCRNA00153	-2.24173	2.01E-05
27531	PLAC9	-2.24346	9.11E-08
25743	NES	-2.2469	3.16E-06
31405	STMN3	-2.25856	0.000796798
7536	GCA	-2.27697	1.34E-05
12275	IGSF3	-2.28535	4.08E-06
17038	LOC401056	-2.2854	2.45E-09
4533	CSRP2	-2.28899	0.000244001
31606	TACSTD1	-2.28933	0.000115538
29372	RRAGD	-2.29258	0.000537359
5884	EPCAM	-2.29475	0.00099285
28398	PTRF	-2.29476	1.92E-05
12672	KANK4	-2.29735	1.73E-08
3505	CD200R1	-2.30795	3.06E-14
33264	UPK2	-2.30847	1.37E-10
24978	MMD	-2.317	1.46E-05
6002	ETV4	-2.32842	6.04E-09
27655	PMP22	-2.33585	4.94E-12
5657	EFHD1	-2.33997	7.47E-05
31186	SPRY1	-2.34859	3.56E-06
3631	CDH11	-2.35006	1.77E-05
29555	SAT1	-2.35602	2.21E-05
33268	UPP1	-2.36162	5.38E-08
1968	C14ORF4	-2.36739	2.59E-06
9512	HS.34447	-2.37168	7.49E-08
16243	LOC283953	-2.38022	4.57E-07
3203	CAV2	-2.38208	1.09E-11
26223	NYNRIN	-2.40311	1.90E-05
22623	LOC728715	-2.41353	0.000504831

25084	MPPED2	-2.42024	6.42E-10
13403	LAMC2	-2.42245	5.32E-10
25083	MPPED1	-2.42332	3.73E-14
13402	LAMC1	-2.43845	7.40E-05
15722	LOC100134265	-2.44777	4.60E-06
5836	ENC1	-2.45175	1.84E-05
244	ACVR2A	-2.46307	1.87E-06
33616	WDR72	-2.46656	6.61E-05
28509	RAB31	-2.47199	1.57E-06
3629	CDH1	-2.4799	3.05E-06
28905	RGMA	-2.50113	4.45E-06
29475	S100A11	-2.50568	3.24E-06
8259	HAPLN1	-2.50809	7.14E-07
3942	CHST7	-2.51075	9.78E-08
12543	ISL1	-2.51716	2.76E-10
28305	PTCH1	-2.52418	7.32E-08
32541	TOX	-2.5288	5.34E-09
6067	F2RL1	-2.54309	2.36E-08
32334	TMEM54	-2.57701	2.04E-06
3436	CCND1	-2.58061	6.72E-05
707	ANKRD38	-2.58621	4.12E-09
5241	DLL3	-2.5911	8.77E-08
33424	VGF	-2.59836	0.000406676
23253	LOC730525	-2.61609	3.32E-07
31368	STC1	-2.63136	1.20E-05
31910	TFAP2C	-2.63773	4.72E-08
25012	MN1	-2.6469	8.33E-08
28419	PVALB	-2.67012	1.23E-10
6960	FLJ37644	-2.67066	1.78E-12
7417	GADD45G	-2.68804	2.14E-06
4709	CXXC4	-2.68958	5.39E-07
8050	GRHL3	-2.73097	4.15E-11
23990	MBIP	-2.73995	9.29E-07
5418	DPPA4	-2.75778	5.66E-08
32212	TMEM158	-2.77503	9.30E-06
5896	EPHB1	-2.77518	2.29E-06
31404	STMN2	-2.79651	2.03E-05
12454	INSM1	-2.81526	1.15E-09
13142	KLHL24	-2.81638	2.31E-07
9856	HS.475334	-2.82304	1.09E-05
3	UBL3	-	2.77

3125		2.85607	E-08
13655	LMO1	-2.90621	4.10E-06
6003	ETV5	-2.90987	5.54E-08
966	ARHGEF6	-2.92751	9.82E-11
31187	SPRY2	-2.94814	6.74E-09
28501	RAB25	-2.97139	5.77E-07
4675	CXCR7	-2.9864	6.13E-07
32652	TRIB2	-2.99455	8.47E-08
28397	PTPRZ1	-3.02099	8.00E-08
31158	SPOCK1	-3.02198	8.12E-06
25849	NKD2	-3.02555	4.12E-11
25471	MYT1	-3.03712	6.21E-09
6856	FLJ25404	-3.03813	1.95E-08
30304	SLC2A1	-3.05478	0.000275534
12256	IGFBP5	-3.06686	2.00E-06
23779	MAF	-3.07491	2.81E-08
28198	PRSS8	-3.08336	6.31E-08
9923	HS.509165	-3.09539	2.57E-07
4243	COL5A2	-3.10066	8.01E-08
3112	CAMKV	-3.10668	3.37E-11
29915	SFRP2	-3.13051	3.42E-07
13092	KIT	-3.13441	8.27E-12
6684	FGFR3	-3.13726	7.73E-09
8646	HOPX	-3.15424	1.07E-14
29497	S1PR3	-3.15587	8.43E-07
33399	VCAM1	-3.15952	2.02E-10
5240	DLL1	-3.18075	1.28E-05
28112	PRODH	-3.18595	2.33E-07
23200	LOC730278	-3.27115	1.92E-07
1202	ATP1B2	-3.29446	2.34E-08
6720	FJX1	-3.3039	6.85E-07
3609	CDC42EP4	-3.33348	2.25E-09
12198	IFITM2	-3.35237	3.41E-11
3679	CDKN1C	-3.37225	1.15E-09
3202	CAV1	-3.37517	5.73E-13
31171	SPRED1	-3.42954	3.76E-08
30010	SH3GL3	-3.43813	3.73E-11
8335	HDC	-3.45787	1.51E-12
8391	HES4	-3.49495	1.00E-08
33335	USP44	-3.50303	6.22E-11
1101	ASCL1	-3.54534	1.26E-11
2	SFTA3	-	1.59

9945		3.5611	E-07
13619	LIPA	-3.56979	1.34E-08
27178	PDPN	-3.72978	5.33E-12
7370	FZD8	-3.74383	7.14E-09
3647	CDH3	-3.80687	3.54E-09
2759	C6ORF141	-3.94476	5.10E-08
13595	LIMCH1	-3.94759	2.52E-11
13513	LEMD1	-3.98954	6.68E-08
5961	ERP27	-4.02755	8.38E-13
29666	SCRG1	-4.03799	1.96E-17
7286	FRZB	-4.04927	2.19E-05
12977	KIAA1598	-4.04996	4.12E-09
2380	C20ORF100	-4.16273	2.94E-12
25866	NKX6-2	-4.17171	1.46E-10
31030	SOX9	-4.21749	9.69E-10
27805	POU3F1	-4.22404	1.53E-11
7879	GPC4	-4.23918	8.64E-08
17977	LOC642590	-4.36113	1.29E-10
19608	LOC646347	-4.53146	1.77E-08
5238	DLK1	-4.62809	8.12E-05
8401	HEY1	-4.68961	2.52E-12
30592	SMS	-4.74656	5.18E-12
29914	SFRP1	-4.84227	1.53E-09
13376	L1TD1	-4.85832	6.96E-08
7984	GPR56	-4.87971	1.88E-13
7367	FZD5	-5.00247	2.43E-11
25858	NKX2-1	-5.06868	2.84E-08
7801	GNG8	-5.39693	2.22E-13
9156	HS.181245	-5.99308	1.43E-12
32962	TTYH1	-6.33607	1.00E-15
5523	DUSP6	-6.34711	8.15E-10
6091	FABP7	-6.56016	2.28E-09
5248	DLX5	-6.56829	8.74E-13
12754	KCNK12	-6.912	1.07E-12
30165	SLC15A3	-7.17663	1.60E-19
6675	FGF8	-7.58196	1.32E-18
31023	SOX3	-7.63996	1.53E-11
8395	HESX1	-8.28818	3.36E-10
28692	RAX	-8.87763	6.24E-12
20959	LOC650757	-9.74543	1.18E-18
14470	LOC100130502	-10.333	1.53E-10
1	LHX2	-	4.81

3568		14.1638	E-12
30111	SIX3	-15.019	8.24E-13
12197	IFITM1	-16.4704	9.16E-16
25859	NKX2-2	-18.6642	7.93E-20
1	IGFBP3	-	8.81

2254		19.1294	E-16
8392	HES5	-33.7356	2.69E-21
30114	SIX6	-39.4411	2.59E-18

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

№ колонки	ID колонки	кратное изменение	p-значение
1209	ASCL1	33.085	1.60E-09
3978	CHGA	28.1727	4.44E-13
31604	STMN2	20.9978	1.47E-08
32159	TH	15.2965	2.12E-08
31606	STMN4	15.2102	3.72E-09
7685	GAP43	12.5729	5.42E-09
4926	D4S234E	10.7914	4.91E-08
8593	HES6	10.6527	2.94E-09
4342	COL3A1	10.0606	3.86E-06
12149	HS.7023	9.60731	3.97E-08
5691	EBF3	9.28771	5.13E-11
29820	SCG2	9.22584	1.02E-06
12655	INSM2	9.01409	3.73E-12
27988	POSTN	8.79262	1.09E-10
№ колонки	ID колонки	кратное изменение	p-значение
28590	PTPRO	8.70512	3.13E-10
30386	SLC17A6	8.22904	2.02E-06
31767	SYT13	8.1735	3.63E-07
30390	SLC18A1	8.15448	6.47E-15
5689	EBF1	8.05344	2.30E-06
5029	DCX	8.00552	8.30E-08
2470	C1QL1	7.47022	8.68E-10
12609	INA	6.92121	5.72E-07

26250	NR4A2	6.75723	1.27E-13	28123	PPP2R2B	5.56067	2.80E-08
29624	RTN1	6.6247	6.52E-07	27287	PCSK1N	5.43156	3.22E-09
9374	HS.19193	6.58382	1.95E-08	32126	TFF3	5.26964	3.17E-08
436	ADCYAP1	6.49154	9.75E-11	27288	PCSK2	5.22877	9.14E-10
1607	BEX2	6.33986	8.93E-09	4533	CRIP2	5.18375	8.40E-08
34098	ZCCHC12	6.19663	9.95E-07	12506	IL13RA2	5.1246	1.31E-06
7056	FLJ25404	6.19296	2.14E-06	32417	TMEM163	5.01765	7.55E-09
31605	STMN3	6.17605	8.77E-07	30813	SNAP91	4.92061	4.28E-05
№ колонки	ID колонки	кратное изменение	p-значение	13260	KIF5C	4.86241	2.93E-06
7997	GNG3	6.1196	1.26E-06	15798	LOC100133923	4.83074	3.74E-07
25922	NEFM	6.11347	2.51E-04	32412	TMEM158	4.76646	4.81E-06
12359	ID2	6.07844	1.32E-06	3770	CDK5R1	4.75524	1.18E-05
29017	REEP1	6.04393	2.25E-06	5739	EEF1A2	4.75232	9.53E-05
30810	SNAP25	6.03677	3.62E-06	32697	TNRC4	4.75179	1.29E-05
25671	MYT1	5.86419	8.19E-06	5455	DNER	4.71709	1.52E-05
33297	UBE2J1	5.76887	6.22E-08	6700	FAT3	4.68785	1.91E-06
5349	DLL3	5.76451	4.92E-08	6197	ETS2	4.67343	1.08E-10
29133	RGS4	5.69761	1.87E-06	25753	NBEA	4.65265	6.99E-07

12944	KCNJ16	4.53077	3.54E-12	13296	KLC1	4.0528	4.19E-06
3979	CHGB	4.52218	7.76E-05	27773	PLEKHA6	4.0464	2.57E-07
25562	MXD4	4.445	7.25E-07	25618	MYLIP	3.99268	2.96E-06
3941	CGNL1	4.44195	7.24E-06	5036	DDC	3.96553	8.46E-05
26499	ONECUT2	4.37403	2.39E-07	33181	TUBB3	3.93922	1.52E-04
2867	C6ORF141	4.35252	2.58E-10	24522	MIAT	3.93906	9.87E-05
12362	ID4	4.32183	6.05E-05	27411	PEG10	3.9374	3.48E-05
26011	NHLH2	4.31928	5.91E-05	32343	TMEFF2	3.92112	6.49E-07
2035	C14ORF132	4.31666	9.46E-07	29821	SCG3	3.92108	6.47E-06
9428	HS.204481	4.29602	1.66E-09	31759	SYP	3.89869	2.51E-04
8288	GRM8	4.17846	1.62E-06	9425	HS.202577	3.89053	2.85E-07
7617	GADD45G	4.17663	2.21E-06	33943	XKR4	3.87043	1.49E-06
4298	CNTNAP2	4.13552	4.10E-05	33178	TUBB2A	3.86265	6.11E-05
1408	AUTS2	4.13111	2.79E-05	12654	INSM1	3.84646	5.59E-05
23822	LRRC4C	4.11703	1.27E-09	13236	KIF1A	3.84543	3.27E-05
31454	SRRM4	4.11574	8.04E-07	25721	NAPB	3.81995	3.50E-05
4003	CHN2	4.09589	3.30E-07	31765	SYT11	3.77827	1.14E-05
27665	PITX2	4.08382	1.94E-11	5877	ELAVL3	3.70028	9.69E-05

13858	LMO4	3.69359	2.09E-06	27054	PAFAH1B1	3.25816	1.30E-04
4103	CLASP2	3.64468	1.79E-05	32432	TMEM170B	3.25165	2.44E-05
2956	C7ORF41	3.63616	5.69E-05	27686	PKIA	3.24255	4.29E-05
33362	UCHL1	3.61003	5.64E-05	1748	BSN	3.2101	0.000169219
29645	RUNDC3A	3.54448	8.42E-05	6213	EVL	3.17682	3.36E-05
24063	MAP1LC3A	3.53736	4.36E-06	34217	ZMIZ1	3.16249	3.29E-04
5944	ENC1	3.51677	0.000141473	16419	LOC283514	3.15057	4.57E-06
28730	RAB40B	3.48084	4.57E-07	32081	TERF2IP	3.13818	3.43E-05
25162	MLLT11	3.4633	3.13E-05	4932	DACH1	3.11457	7.79E-06
7469	FRMD4A	3.46181	7.40E-06	5424	DNAJC19	3.09946	1.64E-09
13070	KIAA0363	3.43032	6.39E-05	8093	GPM6A	3.07619	1.59E-03
13342	KLHL24	3.41191	3.34E-05	15034	LOC100131718	3.0686	4.01E-05
7988	GNB3	3.38669	3.31E-09	8706	HIST1H4K	3.06394	1.84E-06
31840	TAGLN3	3.36355	1.67E-03	28238	PRICKLE2	3.06341	1.98E-06
12147	HS.66187	3.34592	0.000125172	31429	SRGAP3	3.0575	7.84E-06
4549	CRMP1	3.32015	2.42E-04	13760	LHFP	3.04812	0.000126565
23453	LOC730525	3.31501	1.64E-03	3181	CADPS	3.03806	6.60E-06
31514	ST6GALNAC5	3.29449	1.19E-05	3186	CALCA	3.03372	3.13E-08

1672	BMPR2	3.03171	9.26E-06	12733	IRX5	2.88659	1.21E-04
25861	NDRG4	3.00851	0.000239868	1254	ATCAY	2.86583	7.41E-04
2265	C18ORF8	2.99462	9.07E-06	31763	SYT1	2.86449	1.02E-03
4698	CTNNA2	2.962	6.07E-05	29193	RIMBP2	2.84834	6.29E-06
1606	BEX1	2.96088	5.37E-05	28741	RAB6B	2.84821	0.000698361
32769	TPH1	2.96087	2.88E-07	27533	PHF21B	2.8457	6.44E-05
31986	TCEAL7	2.95947	3.43E-05	24135	MAPT	2.83633	5.22E-04
3322	CBLN2	2.95729	1.12E-04	10116	HS.505676	2.83499	1.50E-05
29639	RUFY3	2.95504	2.59E-05	8712	HIST2H2BE	2.82687	0.000157254
3851	CELSR3	2.9545	6.27E-04	24061	MAP1B	2.82235	0.000357426
3177	CADM1	2.95335	1.81E-04	13054	KIAA0182	2.8162	2.66E-04
20895	LOC649841	2.94392	2.21E-05	34044	ZBTB20	2.81539	8.77E-08
13713	LEMD1	2.93152	9.17E-06	29509	RPRM	2.81168	0.000475144
8184	GPR56	2.93095	3.08E-04	34007	YPEL5	2.81061	1.16E-04
31935	TBC1D9	2.92862	6.60E-05	13609	LANCL2	2.80004	8.07E-06
8046	GOLSYN	2.9099	2.80E-06	940	APLP1	2.77078	2.57E-05
33004	TSHZ1	2.90158	2.76E-07	29849	SCN3B	2.76654	7.14E-05
5876	ELAVL2	2.90115	0.00136166	29201	RIMS3	2.76205	2.94E-04

27394	PDZD4	2.75594	0.000212095	2000		3327	-06
1364	ATP6V1G2	2.75366	0.0012022	3497	CCDC92	2.6296	2.23E-05
31778	SYT7	2.74946	4.15E-05	5610	DUSP1	2.60841	1.78E-04
32351	TMEM106A	2.73965	0.000217998	14524	LOC100130053	2.60135	4.53E-04
7717	GATS	2.72521	3.10E-05	26279	NRSN1	2.59336	0.00111467
506	AGAP3	2.71696	2.07E-05	25711	NANOS3	2.58916	4.15E-06
24141	MARCH4	2.70659	8.96E-04	5543	DPYSL4	2.58236	0.000223516
5348	DLL1	2.7028	2.05E-04	6231	EXOC7	2.58163	4.89E-06
6212	EVI5L	2.6886	6.79E-05	24134	MAPRE3	2.57689	4.85E-05
3196	CALM1	2.68129	8.50E-05	9382	HS.193784	2.57602	2.18E-06
31386	SPRY1	2.67788	1.15E-03	1608	BEX4	2.57251	9.83E-05
33128	TTR	2.66999	2.76E-05	6514	FAM36A	2.56726	7.62E-05
				13640	LBH	2.56551	1.34E-05
297	ACPL2	2.66551	1.52E-06	9920	HS.437111	2.55902	4.44E-05
5325	DKK3	2.65119	5.63E-05	33904	WSB2	2.55865	5.08E-04
23853	LRRN3	2.64615	1.37E-03	9757	HS.369017	2.55838	4.25E-05
32615	TMSL3	2.63733	4.56E-05	18920	LOC644250	2.55607	0.000475214
29822	SCG5	2.63452	1.42E-04	27311	PDCD4	2.55148	0.000139052
3	TCF12	2.6	1.80E	7	FZD1	2.5	2.48E

562		4808	-06	2754	P2	7324	-05
1 3191	KIAA16 88	2.5 4643	9.31E -05	2 9037	REM2	2.4 6751	0.000 170127
4 292	CNTN2	2.5 3802	2.29E -04	3 4742	ZNF84	2.4 6625	2.39E -04
3 2474	TMEM2 00A	2.5 3495	4.93E -07	3 872	CENTA 1	2.4 6106	3.74E -04
6 635	FAM89 B	2.5 341	1.64E -05	2 3918	LY6H	2.4 5793	0.000 317539
2 3500	LOC730 990	2.5 3197	3.94E -05	2 9595	RSBN1	2.4 5785	8.01E -04
1 375	ATP9A	2.5 2973	1.09E -04	1 733	BRP44L	2.4 5488	5.07E -04
8 126	GPR137 C	2.5 2944	0.000 217768	2 751	C3ORF7 0	2.4 5314	1.92E -06
1 9248	LOC644 936	2.5 2867	4.31E -04	1 2862	JUN	2.4 481	4.37E -04
4 916	CYTH2	2.5 213	6.31E -06	1 5357	LOC100 132727	2.4 4481	0.000 58635
2 0654	LOC648 921	2.5 1994	1.76E -03	1 3224	KIDINS 220	2.4 3944	0.000 68445
2 445	C1ORF7 1	2.5 0491	9.78E -04	3 3183	TUBB4 Q	2.4 3584	0.001 71503
2 1820	LOC652 726	2.4 9851	5.58E -05	6 85	ALPP	2.4 3222	3.60E -05
1 6100	LOC100 134868	2.4 9288	0.000 76351	1 4002	LOC100 128274	2.4 3042	1.90E -04
2 7105	PAPSS2	2.4 9026	0.000 148906	2 0699	LOC649 095	2.4 2655	0.000 40167
3 2246	TIMP2	2.4 8501	3.26E -05	7 123	FLJ3539 0	2.3 9837	0.001 62187
2 7648	PIP5K2 B	2.4 8028	0.000 236563	1 6740	LOC387 856	2.3 9594	8.21E -04
1 2214	HSBP1	2.4 7723	1.82E -04	7 033	FLJ2218 4	2.3 897	4.07E -04
3	TP53IN	2.4	2.42E	2	LOC648	2.3	8.38E

0602	740	8616	-06	347	7B	2504	-04
1 0392	HS.538962	2.3 8583	0.000 324449	7 31	AMY1A	2.3 232	0.000 158787
3 1615	STOX2	2.3 8135	4.42E -04	7 610	GABRR 1	2.3 1983	8.23E -08
2 3592	LOC731 895	2.3 779	0.000 838915	1 520	BAZ2B	2.3 0948	5.18E -04
3 2863	TRIM2	2.3 7536	5.63E -04	7 920	GLRA2	2.3 0858	6.83E -05
3 0075	SERTA D4	2.3 6897	0.000 363024	1 0190	HS.522924	2.3 0739	1.62E -03
2 6135	NOL4	2.3 6463	0.000 261492	7 762	GDAP1	2.3 0342	6.22E -05
2 7620	PIK3R1	2.3 5977	1.01E -07	3 1325	SPHK2	2.2 9983	1.68E -04
2 7073	PAK3	2.3 4949	1.62E -04	3 1499	ST18	2.2 969	9.74E -04
2 7855	PMP22	2.3 4705	7.89E -06	1 5124	LOC100 131989	2.2 9335	1.57E -04
2 7636	PINK1	2.3 4687	1.17E -05	2 3665	LOC88523	2.2 9171	0.000 476299
3 223	CAMSA P1	2.3 4021	1.96E -04	3 0325	SKP1	2.2 8675	1.76E -04
9 323	HS.168950	2.3 3738	1.84E -04	2 743	C3ORF58	2.2 8463	0.000 119256
1 7248	LOC401 115	2.3 3367	0.000 151535	2 7566	PHYHIP L	2.2 8388	1.72E -03
6 270	F3	2.3 2945	2.00E -08	2 7332	PDE4D	2.2 8016	3.70E -05
2 256	C18ORF 32	2.3 2914	4.41E -04	7 60	ANK2	2.2 7803	3.84E -05
7 77	ANKRD 10	2.3 2837	2.48E -04	1 101	ARL3	2.2 6792	1.03E -03
5 372	DMRTA 2	2.3 2784	5.27E -06	2 5218	MNX1	2.2 6631	4.41E -07
6	FAM11	2.3	9.42E	7	FLJ4404	2.2	6.84E

255	8	6493	-06	9467	452	1703	168591
30029	SERINC1	2.26355	3.12E-04	6533	FAM46A	2.21591	1.24E-03
34800	ZSWIM6	2.2634	3.19E-04	26308	NT5C2	2.21285	0.00159191
13943	LOC100128062	2.26302	0.000498795	1086	ARID5B	2.21184	0.000139405
18811	LOC644033	2.2611	5.93E-04	494	AFF3	2.21139	1.28E-03
20075	LOC646996	2.25787	1.36E-04	29124	RGS16	2.21012	2.33E-05
7976	GNAO1	2.25676	0.00121073	10056	HS.475334	2.20669	1.41E-03
22799	LOC728661	2.25642	0.000599836	3738	CDH10	2.20522	0.000389319
979	APPBP2	2.25324	6.41E-04	9819	HS.388347	2.2022	2.82E-05
25716	NAP1L3	2.24879	9.43E-04	34703	ZNF786	2.20193	1.65E-03
14359	LOC100129502	2.24469	1.52E-04	8705	HIST1H4J	2.19897	4.86E-06
25580	MYCBP2	2.24333	0.000445387	9740	HS.360533	2.19737	3.65E-05
27083	PAM	2.23671	0.00170991	651	ALG13	2.19414	4.86E-05
22583	LOC728105	2.2358	0.000601193	33588	VASH2	2.19373	0.000586609
29747	SARM1	2.2285	5.83E-07	28810	RALGPS1	2.19311	0.000999046
7602	GABRB3	2.22682	4.00E-04	5774	EFNB3	2.1991	0.000919096
30261	SIAH3	2.22476	1.89E-05	1745	BSCL2	2.18758	8.17E-04
27664	PITX1	2.22382	0.00102378	29151	RHBDL3	2.18758	4.86E-05
1	LOC645	2.2	0.000	3	CDH12	2.1	0.000

740		8674	112317	1746	BSDC1	2.13842	0.000430355
24064	MAP1LC3B	2.18347	2.00E-04	27997	POTEF	2.13305	0.000655028
32539	TMEM59	2.17758	1.77E-03	2969	C7ORF55	2.12929	5.66E-05
33171	TUBA3E	2.17556	2.58E-04	29923	SEC11C	2.12843	8.11E-04
526	AGPAT4	2.17042	1.95E-04	31488	SSX2IP	2.12215	5.19E-06
27832	PLXNA1	2.16997	0.000477137	29277	RNF128	2.12203	5.41E-06
34219	ZMPSTE24	2.16821	0.00130116	30348	SLC12A2	2.12048	0.000343525
34669	ZNF738	2.16494	0.00145642	8277	GRK5	2.11347	0.000106085
28749	RAB9B	2.16376	1.41E-03	8573	HEPACAM2	2.11332	2.39E-09
3350	CCBE1	2.16311	2.69E-04	1610	BEXL1	2.10951	2.62E-04
5875	ELAVL1	2.15865	6.37E-04	4229	CMIP	2.10246	0.000705627
13154	KIAA1370	2.15727	5.07E-05	30224	SHANK2	2.10164	0.000611099
1356	ATP6V1B2	2.15309	0.000839601	23763	LRP1B	2.09999	4.76E-05
6457	FAM181B	2.15303	6.91E-04	6724	FBXL16	2.09975	8.65E-04
25137	MKL2	2.14461	0.000214816	26092	NLRP8	2.09701	0.00161834
27876	PNMA1	2.14384	0.000290225	17496	LOC440704	2.09699	0.0015232
23806	LRRC37B2	2.14195	4.81E-04	2543	C20ORF56	2.09698	4.79E-07
6851	FGD3	2.139	1.84E-04	32624	TMX4	2.09279	8.41E-04

20006	LOC646821	2.0917	5.47E-05	49	PPT	4017	-04
25809	NCOA6	2.09025	1.61E-03	1970	C12ORF51	2.038	0.000668525
2811	C5ORF28	2.08938	6.33E-04	31721	SVOP	2.03603	7.00E-04
3279	CASD1	2.0821	6.10E-05	1389	ATXN1	2.03408	3.27E-05
28256	PRKAR1A	2.08207	0.00119569	20667	LOC648980	2.03345	0.00062575
6208	EVI1	2.07806	4.85E-05	24523	MIB1	2.03159	3.22E-04
6920	FJX1	2.07539	1.80E-03	31982	TCEAL3	2.03073	0.00151379
31199	SORBS2	2.07266	7.37E-05	12229	HSD17B7	2.03003	1.50E-03
3968	CHD6	2.06939	4.92E-05	27402	PDZRN4	2.02983	2.33E-05
34605	ZNF652	2.06441	0.00172675	6395	FAM13B	2.02944	3.18E-04
4838	CYCS	2.06436	1.39E-03	1349	ATP6V0C	2.02572	1.08E-03
				12828	JAKMIP2	2.01869	8.10E-04
34025	ZADH2	2.05857	3.02E-05	34227	ZMYND11	2.01687	0.00171037
17246	LOC401098	2.05589	1.58E-03	31603	STMN1	2.00603	0.000940483
27462	PFN2	2.05533	1.58E-03	29145	RHBDD2	2.00523	6.87E-04
27137	PARP6	2.05441	5.65E-04	25808	NCOA5	2.00244	0.000102715
5651	DYNC1I1	2.04874	0.000834135	30330	SLAIN1	2.00203	1.00E-03
7587	GABARAPL2	2.04534	0.00165234	2195	C17ORF45	-2.00166	0.00119767
1	AASDH	2.0	7.58E	2	LOC730	-	1.67E

3469	746	2.00168	-03	4518	130009	2.03222	-05
3	SND1	-	0.001	2	LYN	-	0.000
0825		2.00433	28091	3928		2.03236	609191
1	LOC645	-	1.69E	2	LOC648	-	0.000
9456	436	2.00559	-03	0489	294	2.0327	4778
6	EXOSC	-	0.000	3	TIMM9	-	0.001
242	7	2.00603	798232	2244		2.03469	5035
1	LOC442	-	7.96E	2	RPA1	-	1.70E
7727	232	2.00726	-05	9412		2.03493	-03
2	PPIH	-	8.70E	3	WDR12	-	5.96E
8062		2.00996	-04	3756		2.03533	-04
2	LOC729	-	4.05E	2	NCAPD	-	0.001
3234	779	2.01096	-04	5781	2	2.03535	32141
3	TYK2	-	0.000	1	LOC645	-	0.001
3239		2.01275	787726	9436	385	2.03595	51373
2	P4HA2	-	1.30E	2	C14ORF	-	6.93E
7020		2.01467	-03	095	93	2.04138	-06
4	CRTAP	-	2.86E	3	TYRO3	-	4.26E
563		2.01592	-06	3243		2.04437	-04
2	RHBDF	-	9.21E	1	KNTC1	-	1.95E
9147	1	2.01731	-04	3396		2.04704	-05
1	LOC643	-	0.000	1	LOC644	-	0.000
8367	007	2.01867	867101	9027	464	2.051	744833
2	C1ORF1	-	2.06E	1	ATP6V1	-	0.000
331	06	2.02039	-04	355	B1	2.0528	263628
1	ATP5G2	-	0.001	3	TKT	-	0.000
332		2.02135	69599	2263		2.05643	380042
2	MRPL4	-	0.001	1	ARHGA	-	6.74E
5354	5	2.02158	79523	039	P19	2.05734	-05
1	HS.5527	-	1.41E	4	CYYR1	-	1.68E
1023	99	2.02363	-04	923		2.05748	-05
1	LOC402	-	0.001	3	SESN1	-	2.09E
7333	112	2.02644	78903	0076		2.05841	-04
4	COL2A	-	0.001	5	DDX10	-	0.000
341	1	2.03118	12645	054		2.06089	505
1	LOC100	-	1.54E	1	ITGB3B	-	6.73E

2782	P	2.06492	-06	4423	129685	2.1066	-03
1	LOC440	-	4.64E	2	PLOD3	-	0.000
7492	589	2.06666	-04	7816		2.10673	954258
2	LOC729	-	0.000	8	HNRNP	-	1.74E
3246	816	2.06873	791801	805	A1	2.10967	-05
2	MAPKA	-	0.001	6	FHL3	-	5.26E
4128	PK3	2.06933	46997	898		2.1127	-05
1	HSD17	-	2.25E	1	LOC642	-	1.02E
2221	B11	2.07106	-05	8250	741	2.1147	-03
3	TRIM71	-	2.28E	3	TMEM4	-	0.000
2916		2.07489	-05	2523	5A	2.1169	464867
1	LOC136	-	4.81E	1	LOC441	-	1.02E
6186	143	2.07533	-04	7691	876	2.11785	-03
3	STOX1	-	0.000	1	BAIAP2	-	3.63E
1614		2.07691	191887	488	L1	2.11832	-05
2	RAB38	-	6.33E	4	CLEC2	-	0.000
8717		2.07726	-04	156	D	2.11902	733653
2	LOC653	-	1.41E	6	FLJ1098	-	0.000
1994	156	2.07967	-03	966	6	2.12606	420546
2	RPSA	-	0.000	1	LOC100	-	4.96E
9560		2.08096	379606	4281	129237	2.12997	-04
1	LOC401	-	6.58E	1	LOC388	-	6.52E
7241	074	2.08141	-08	6802	556	2.13532	-04
8	HES1	-	0.000	2	MRPS3	-	3.28E
588		2.08285	819562	5385	0	2.13565	-04
2	RPLP1	-	1.30E	1	LOC642	-	0.001
9494		2.08688	-03	8023	250	2.13595	07704
6	FGFR3	-	5.89E	3	SNRPA	-	6.40E
884		2.09082	-06	1129		2.13825	-04
4	DBX1	-	0.000	3	CDCA5	-	0.001
977		2.09957	222703	730		2.14343	6145
2	RPS5	-	0.001	2	NOB1	-	3.43E
9544		2.10042	38553	6121		2.14482	-06
2	RIPK2	-	0.000	3	CDCA8	-	0.000
9213		2.10641	218454	733		2.14728	158263
1	LOC100	-	1.19E	3	WDYH	-	0.000

3839	V1	2.14889	901318	6653	184	2.19197	-05
1 5213	LOC100 132299	- 2.14934	3.42E -05	5 697	EBPL	- 2.19209	2.05E -05
2 3294	LOC729 964	- 2.14942	0.000 145725	2 763	C4ORF1 4	- 2.19304	0.001 28088
2 3388	LOC730 246	- 2.15222	5.52E -04	4 474	CPNE8	- 2.19514	2.56E -04
2 9474	RPL36	- 2.15341	1.12E -03	1 7500	LOC440 737	- 2.19615	0.000 989795
2 0693	LOC649 076	- 2.15494	0.000 533848	2 2974	LOC729 102	- 2.1963	0.000 282713
1 4136	LOC100 128771	- 2.15556	6.32E -05	2 1275	LOC651 149	- 2.19678	1.31E -03
2 9459	RPL27	- 2.15569	8.13E -04	1 7403	LOC440 055	- 2.19775	1.17E -03
2 0894	LOC649 839	- 2.15637	0.000 233819	2 9440	RPL13L	- 2.19817	2.16E -05
5 649	DYM	- 2.15657	5.43E -04	2 7368	PDK3	- 2.20067	3.05E -04
6 676	FANCG	- 2.15913	2.75E -04	3 1760	SYPL1	- 2.20452	0.000 128778
2 6223	NPY	- 2.15981	4.99E -04	1 4389	LOC100 129585	- 2.20627	8.87E -05
2 2700	LOC728 428	- 2.16464	0.001 22727	2 9490	RPL8	- 2.20725	1.35E -04
2 7540	PHGDH	- 2.17929	0.000 926407	1 5083	LOC100 131866	- 2.20753	2.67E -05
2 3875	LSM4	- 2.18409	0.000 36081	2 915	C6ORF4 8	- 2.20788	0.000 428494
1 5295	LOC100 132528	- 2.18468	8.34E -04	1 9976	LOC646 766	- 2.21365	0.000 33802
1 4997	LOC100 131609	- 2.187	0.000 875169	2 8801	RAI14	- 2.21753	0.000 675636
2 9442	RPL14L	- 2.18734	4.55E -04	1 8557	LOC643 433	- 2.21779	0.000 542767
1	LOC343	-	6.17E	1	LOC389	-	0.000

6862	141	2.21829	459763	2392	44	2.27099	-08
5715	ECT2	-2.21838	1.41E-03	7652	GALK1	-2.27206	9.50E-04
29558	RPS8	-2.22068	0.00161471	27192	PCDH18	-2.27211	0.000113843
19556	LOC645691	-2.22442	0.00107987	4297	CNTNAP1	-2.2794	2.43E-04
16693	LOC347544	-2.22526	0.000534957	23041	LOC729279	-2.28142	5.88E-05
23972	MAD2L1	-2.22823	0.000457464	5840	EIF3H	-2.28165	0.000193064
18286	LOC642817	-2.23024	0.00054939	8828	HNRPC	-2.28204	0.00128473
31588	STK24	-2.23459	3.03E-04	30493	SLC27A3	-2.29001	2.85E-04
31024	SNORD25	-2.236	5.13E-05	5742	EEF1D	-2.29339	0.000126152
1282	ATIC	-2.24113	0.000182776	30601	SLC44A1	-2.29419	0.000172089
33110	TTK	-2.24337	4.48E-04	3866	CENPN	-2.2944	0.000143689
23352	LOC730107	-2.24665	0.000445574	29449	RPL22	-2.29465	0.00105741
8727	HJURP	-2.24769	2.63E-05	20804	LOC649447	-2.29999	0.000262246
23237	LOC729789	-2.24864	3.21E-04	28036	PPAT	-2.3009	0.000393145
29503	RPP40	-2.25604	1.62E-04	25509	MTP18	-2.30185	3.55E-05
17594	LOC441246	-2.25891	4.60E-04	3538	CCNA2	-2.30784	0.000412267
17228	LOC400963	-2.26592	0.000542002	33891	WNT5A	-2.3104	3.36E-04
29521	RPS18	-2.26781	0.00151457	28110	PPP1R3C	-2.31108	3.02E-06
3	TMEM1	-	5.66E	1	BMP2	-	2.31E

659		2.32278	-05	9046	511	2.36244	514797
1 8725	LOC643 863	- 2.32406	1.02E -03	5 044	DDIT4L	- 2.36718	0.000 107365
3 59	ADA	- 2.3269	2.14E -05	5 45	AHCY	- 2.3677	0.000 431822
1 3751	LGMN	- 2.32715	4.54E -05	1 8592	LOC643 531	- 2.37199	1.01E -03
1 2250	HSP90A B1	- 2.32781	1.49E -03	5 744	EEF1G	- 2.37611	0.000 630065
5 850	EIF4B	- 2.32818	1.13E -03	5 765	EFHD1	- 2.38043	1.20E -03
1 3724	LEPRE L1	- 2.32851	0.000 169338	3 2637	TNFRS F10B	- 2.38066	1.53E -05
1 7534	LOC440 991	- 2.33062	1.54E -04	2 6099	NME1- NME2	- 2.38426	4.44E -05
2 9559	RPS9	- 2.33092	1.06E -04	2 2757	LOC728 564	- 2.38494	3.69E -04
3 724	CDC7	- 2.33576	0.000 342965	8 826	HNRPA 1P4	- 2.38609	3.87E -05
2 7035	PABPC 4	- 2.33611	0.000 164425	1 7458	LOC440 359	- 2.38691	5.63E -04
3 3241	TYMS	- 2.34068	0.001 06577	2 8560	PTPN13	- 2.39211	0.000 413752
3 0229	SHC1	- 2.34608	0.001 05777	1 5180	LOC 1001321 99	- 2.39337	2.68E -05
2 1754	LOC652 624	- 2.34734	2.21E -04	4 955	DARS	- 2.39728	1.56E -03
5 846	EIF3M	- 2.34987	0.001 81367	1 882	C11ORF 1	- 2.39828	2.51E -05
1 5032	LOC100 131713	- 2.35114	0.000 201749	2 3282	LOC729 926	- 2.39973	7.65E -04
2 9432	RPL10A	- 2.35345	0.001 31867	1 5041	LOC 1001317 35	- 2.40035	2.35E -05
2 4235	MCM6	- 2.35636	0.001 08431				
1	LOC644	-	0.000	2 2829	LOC728 732	- 2.40089	6.11E -05

3973	CHEK1	-2.40178	1.16E-06	6156295		2.43999	-04
600	AKR1A1	-2.40346	0.000695089	29565	RPUSD3	-2.44425	1.98E-07
15586	LOC100133372	-2.40481	1.53E-04	16979	LOC390578	-2.44648	8.18E-08
31607	STOM	-2.40533	3.40E-07	15104	LOC100131940	-2.44655	2.19E-05
22710	LOC728453	-2.40686	0.0001068	26103	NME4	-2.44757	0.00114224
29457	RPL26	-2.4112	0.000285349	8825	HNRPA1L-2	-2.45235	5.46E-04
29921	SEC11A	-2.41182	0.00102718	1537	BCAR3	-2.45546	0.000368573
16776	LOC388275	-2.41288	5.56E-06	14206	LOC100129028	-2.45901	3.51E-04
29438	RPL13A	-2.41592	0.000922424	16672	LOC345041	-2.46013	0.000101781
3795	CDKN3	-2.41856	0.000112421	3125	CA14	-2.46417	0.000205741
30404	SLC20A2	-2.41879	6.23E-06	32089	TET1	-2.46774	3.21E-05
				12231	HSD17B8	-2.47022	0.000519001
32648	TNFRSF19	-2.42065	6.93E-05	4479	CPS1	-2.47967	2.21E-06
31239	SP5	-2.42085	2.37E-09	25464	MTA3	-2.48169	8.09E-05
23974	MAD2L2	-2.42585	0.000123115	5758	EFEMP1	-2.48833	1.42E-05
12602	IMPA2	-2.42996	1.90E-06	28160	PQLC3	-2.48845	0.000585543
17525	LOC440927	-2.43391	0.00119949	30245	SHMT2	-2.48964	0.00117427
29414	RPA3	-2.43719	0.00177478	23103	LOC729423	-2.50041	6.49E-06
1	LOC127	-	5.06E				

12741	ISG20L1	-2.50404	9.70E-05
29539	RPS3	-2.50954	0.000103446
22857	LOC728791	-2.5096	5.69E-06
23391	LOC730255	-2.50972	1.22E-03
24097	MAP4K2	-2.51767	5.17E-06
7686	GAPDH	-2.51826	0.00128279
2433	C1ORF57	-2.51861	1.49E-03
2262	C18ORF56	-2.51885	0.000156088
1792	BUB1	-2.52119	9.50E-06
5831	EIF2S3	-2.52373	3.38E-04
29039	RENBP	-2.53102	4.92E-07
29481	RPL39L	-2.53153	0.00013954
17141	LOC399804	-2.5389	3.38E-05
34552	ZNF581	-2.54051	9.37E-05
1156	ARRDC4	-2.54054	2.88E-05
8789	HMMR	-2.54277	8.17E-05
28953	RBMX	-2.5493	5.57E-05
32179	THEM2	-2.55298	5.30E-04
13239	KIF20A	-2.55316	1.13E-05
1403	AURKA	-2.55681	5.93E-05
27066	PAICS	-2.55763	0.00111653
5836	EIF3D	-2.56061	6.72E-05
13252	KIF2C	-2.56757	1.70E-06
14814	LOC100130980	-2.57639	4.33E-05
31821	TAF1D	-2.57677	6.27E-06
27653	PIR	-2.58392	2.26E-06
7564	FZD2	-2.58518	0.000146094
28778	RAD51AP1	-2.59104	5.06E-06
14695	LOC100130562	-2.59563	3.41E-05
8547	HEATR1	-2.59617	5.95E-07
22591	LOC728126	-2.59998	3.37E-05
29483	RPL4	-2.62451	7.56E-05
25783	NCAPG	-2.62632	6.41E-05
20366	LOC647856	-2.6267	1.31E-05
29462	RPL29	-2.62809	4.36E-07
2	LOC729	-	4.28E

3274	903	2.63121	-05	0602	2	2.70757	-03
15975	LOC100134393	-2.6327	2.71E-04	16741	LOC387867	-2.71424	2.45E-05
				23060	LOC729340	-2.7157	0.000999351
9745	HS.363526	-2.6341	0.000643774				
				27743	PLCD1	-2.72	1.14E-07
561	AIF1L	-2.63663	1.37E-04				
				22597	LOC728139	-2.72434	4.77E-05
8597	HEXB	-2.63709	1.51E-03				
				28530	PTGR1	-2.72675	7.39E-05
5993	EPDR1	-2.63912	0.001056376				
				5741	EEF1B2	-2.7289	4.84E-05
7966	GMPS	-2.64155	1.99E-04				
				18360	LOC642989	-2.73236	0.000921883
27563	PHYH	-2.64322	2.14E-05				
				20058	LOC646942	-2.74335	5.41E-05
4100	CKS1B	-2.64512	1.68E-04				
				16737	LOC387825	-2.74954	5.93E-06
7898	GLDC	-2.64809	0.00143371				
				16236	LOC148430	-2.76485	2.32E-05
5513	DPH5	-2.6481	2.11E-05				
				29441	RPL14	-2.76505	4.49E-06
18914	LOC644237	-2.66097	0.0011589				
				31176	SNX5	-2.77426	4.41E-08
20185	LOC647285	-2.66563	1.82E-04	13592	LAMA1	-2.77535	2.89E-07
22536	LOC727984	-2.67684	0.000223687	16814	LOC388707	-2.77694	1.99E-06
8625	HIBADH	-2.68374	0.00144114				
				29179	RHPN2	-2.78226	0.00110049
684	ALPL	-2.69266	2.39E-06				
				23133	LOC729500	-2.78295	8.63E-06
17636	LOC441506	-2.70546	6.10E-05				
				2524	C20ORF199	-2.79683	8.26E-05
3	SLC44A	-	1.24E	2	PDLIM1	-	0.000

7370		2.79852	250318	49		2.88477	447642
2 7030	PABPC 1	-2.7998	0.000 107149	3 0500	SLC29A 1	-2.91375	2.94E -06
7 486	FRZB	-2.81189	5.35E -04	1 7086	LOC391 833	-2.91531	4.06E -05
1 7023	LOC391 075	-2.82637	0.001 39394	2 0614	LOC648 771	-2.91567	7.23E -05
6 705	FBL	-2.8276	2.59E -05	2 7493	PGM1	-2.92082	0.000 287518
1 3708	LEF1	-2.83207	1.15E -05	3 0836	SNHG6	-2.92725	2.13E -05
4 101	CKS2	-2.83376	0.000 537912	2 0015	LOC646 849	-2.95184	3.75E -05
1 3438	KRT19	-2.83803	2.34E -05	1 6783	LOC388 339	-2.95309	4.55E -05
2 8410	PSAT1	-2.8451	8.29E -07	3 785	CDKN1 A	-2.95807	0.000 310093
3 3979	YAP1	-2.84569	0.001 06156	2 9436	RPL12P 6	-2.97114	2.40E -06
2 9435	RPL12	-2.85091	4.23E -05	5 258	DIMT1 L	-2.97803	1.83E -06
2 2553	LOC728 031	-2.85482	8.14E -05	1 5940	LOC100 134304	-2.98223	4.08E -08
2 9524	RPS2	-2.85918	1.32E -05	1 3733	LGALS 1	-2.98473	0.001 60731
2 3861	LRTM1	-2.85972	1.48E -12	2 7902	PODXL	-3.00627	2.35E -08
2 6404	NUSAP 1	-2.86459	9.00E -05	1 6630	LOC341 315	-3.02065	1.10E -04
2 0473	LOC648 249	-2.86802	4.01E -06	4 81	ADSS	-3.02244	4.06E -06
2 3319	LOC730 029	-2.87607	3.58E -05	2 9557	RPS7	-3.06985	2.69E -06
2 4516	MGST1	-2.87812	2.82E -06	1 406	AURKB	-3.07612	5.67E -07
3	ACVR1	-	0.000	2	LOC730	-	4.32E

3373	187	3.08276	-06	2	NKD1	-	4.37E
2	MND1	-	3.39E	6048		3.24181	-06
5214		3.08698	-07	6	FAM10	-	0.000
1	LOC	-	0.001	320	7A	3.24905	449795
4412	1001296	3.08986	20608	1	LOC286	-	6.05E
	57			6552	444	3.25137	-06
3	UBE2C	-	4.69E	2	NUP37	-	3.70E
3282		3.09218	-06	6390		3.26236	-05
3	SFRP1	-	0.000	1	LOC646	-	1.06E
0114		3.10477	250519	9783	294	3.28211	-06
1	LOC391	-	2.05E	2	C17ORF	-	2.68E
7015	019	3.10602	-05	210	61	3.28907	-05
2	PTTG1	-	2.05E	1	LOC645	-	3.95E
8602		3.11309	-05	9553	688	3.29172	-06
1	LOC441	-	6.73E	2	NCRNA	-	7.23E
7541	013	3.11866	-07	5847	00219	3.29327	-05
2	LOC648	-	3.24E	2	QPRT	-	2.04E
0657	931	3.12515	-09	8663		3.29832	-05
3	SUCLG	-	5.75E	3	SPON1	-	5.27E
1661	2	3.13505	-07	1361		3.32269	-06
1	BCL2L1	-	4.40E	3	SNHG5	-	0.000
559	2	3.13599	-07	0835		3.32459	204237
3	TIGA1	-	7.09E	4	CSDA	-	0.000
2222		3.13783	-05	596		3.3629	363294
7	GDF15	-	1.42E	4	ADM	-	4.11E
770		3.14204	-07	55		3.40482	-05
2	C6ORF1	-	0.000	2	LOC729	-	2.20E
878	60	3.15022	111744	3228	768	3.41997	-05
1	LOC100	-	1.51E	1	BST2	-	1.17E
5382	132795	3.21797	-05	753		3.42742	-07
4	DAB2	-	2.91E	2	LOC649	-	1.63E
930		3.2203	-05	0685	049	3.46913	-06
3	TRIP6	-	1.32E	1	LOC401	-	3.79E
2933		3.23132	-06	7292	537	3.50501	-07
2	LOC647	-	4.86E	6	FBLN1	-	3.88E
0091	030	3.23731	-05	707		3.53279	-06

28241	PRIM1	-3.53892	1.17E-06	7501	FSTL1	-3.80754	0.000136961
8754	HLA-E	-3.54293	2.03E-07	27805	PLIN2	-3.82123	4.77E-10
643	ALDOA	-3.55096	0.000184641	28975	RBPMS2	-3.82727	3.95E-06
14422	LOC100129681	-3.55393	9.42E-07	23218	LOC729742	-3.84552	7.82E-07
8773	HMGB2	-3.56419	9.08E-05	13597	LAMB1	-3.85107	1.24E-07
32964	TRPM4	-3.5945	2.41E-06	6291	FABP7	-3.85422	0.000335025
12398	IFITM2	-3.59918	1.38E-03	12606	IMPDH2	-3.85952	4.79E-06
32177	THBS4	-3.6116	6.59E-07	13834	LITAF	-3.86	4.66E-05
3540	CCNB1IP1	-3.62989	3.35E-08	3953	CHCHD10	-3.91295	4.20E-06
5477	DOCK10	-3.64495	7.09E-07	2439	C1ORF64	-3.9544	5.48E-10
28387	PRSS23	-3.67253	0.000258012	8473	HAUS4	-3.96227	4.95E-12
26369	NUDT7	-3.67565	7.62E-05	925	APCDD1	-3.97854	6.09E-08
26207	NPM3	-3.69114	1.35E-06	5952	ENO3	-4.00663	6.90E-09
23887	LTA4H	-3.69913	6.82E-05	27019	P4HA1	-4.01147	0.00032695
12399	IFITM3	-3.70541	0.000779898	4724	CTSL2	-4.01208	1.47E-06
8769	HMGA1	-3.72752	3.30E-08	19348	LOC645173	-4.02454	2.71E-06
323	ACTA2	-3.74071	1.75E-04	28605	PTTG3P	-4.02805	3.37E-06
1530	BBS9	-3.7636	3.82E-07	4239	CMTM7	-4.08386	7.09E-09

8089	GPI	-4.08821	1.18E-05
1616	BGN	-4.11601	0.000348095
23196	LOC729679	-4.2525	4.55E-08
3694	CDC20	-4.28351	3.38E-06
32729	TOP2A	-4.29945	1.43E-06
30828	SNHG1	-4.38641	2.77E-06
3243	CAPN6	-4.44794	4.50E-07
30284	SILV	-4.59486	1.80E-07
15342	LOC100132673	-4.69254	2.18E-07
29716	SALL4	-4.95909	2.66E-08
3541	CCNB2	-5.23718	4.33E-08
30511	SLC2A3	-5.39887	5.64E-07
13691	LDHA	-5.76362	0.000569306
7	FST	-	8.74E
500		5.82949	-09
1543	BCAT1	-6.13131	3.52E-06
5323	DKK1	-6.17493	4.94E-08
4343	COL4A1	-6.21986	6.18E-07
8078	GPC3	-6.35513	0.000466041
4333	COL22A1	-6.371	1.87E-08
32774	TPM2	-6.8139	1.85E-08
2430	C1ORF54	-7.81915	1.70E-07
965	APOE	-9.10671	6.03E-07
13804	LIN28	-26.8821	1.20E-13

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

				колонки		изменение	
№	Column ID	кратное	p-значение	32126	TFF3	25.0585	2.47E-14

1209	ASCL1	14.9328	1.97E-07	1	4597	-09		
7395	FOXA1	12.9897	4.15E-14	3	SPON1	4.93795	4.69E-08	
29133	RGS4	11.0181	6.65E-09	1	LMO3	4.83578	7.25E-08	
27988	POSTN	8.20403	2.16E-10	1	LMX1A	4.63407	1.51E-06	
7396	FOXA2	7.98132	1.60E-14	2	C20ORF56	4.4431	3.63E-13	
4342	COL3A1	7.58625	2.49E-05	1	IRX5	4.2929	1.45E-06	
12731	IRX3	7.42399	1.64E-06	7	GNB3	4.13634	1.52E-10	
9374	HS.19193	7.27196	7.36E-09	3	TH	4.08743	0.000370318	
3978	CHGA	7.14305	2.77E-08	5	DLK1	4.02203	1.73E-05	
2470	C1QL1	7.1366	1.38E-09	3	SYT4	4.00669	0.000372793	
30390	SLC18A1	7.04751	3.52E-14	9	HS.204481	3.88697	6.71E-09	
22823	LOC728715	6.5801	8.79E-09	6	ETS2	3.70155	3.07E-09	
№ колонки	Column ID	кратное изменение	p-значение	5	DDC	3.61254	0.000194062	
12456	IGFBP5	6.15962	3.65E-05	2	NR4A2	3.55879	9.29E-10	
27665	PITX2	6.10679	6.79E-14	2	C6ORF141	3.48146	6.97E-09	
12655	INSM2	5.18438	1.70E-09	2	OSBPL10	3.27941	3.81E-07	
12944	KCNJ16	4.98753	8.89E-13	5	DMRTA2	3.26437	1.81E-08	
4	ADCYAP	4.9	2.43E	3	XBP1	3.2414	0.000921089	
				2	PITX1	3.2	1.10E	

7664		3009	-05	9509		3138	35525
9819	HS.388347	3.14523	8.26E-08	32144	TGFBR3	2.46754	8.27E-07
30239	SHISA2	3.13411	4.23E-05	13689	LDB2	2.40983	2.56E-05
2743	C3ORF58	3.10109	1.50E-06	2850	C6ORF117	2.4009	0.000508473
623	ALCAM	3.00487	0.000307411	31806	TACSTD1	2.38661	0.00154495
6533	FAM46A	2.99243	3.45E-05	24375	MFNG	2.31488	5.04E-05
28590	PTPRO	2.94164	4.45E-05	5424	DNAJC19	2.30405	4.42E-07
18750	LOC643911	2.93448	1.14E-06	12986	KCNS3	2.28802	0.000136062
31669	SULF2	2.92397	8.02E-05	27855	PMP22	2.27371	1.36E-05
5348	DLL1	2.92274	8.36E-05	4003	CHN2	2.26467	0.000550787
30066	SERPINF1	2.76873	0.000156193	5691	EBF3	2.26453	0.000571924
5349	DLL3	2.75425	0.000173675	3187	CALCB	2.11359	2.49E-06
3186	CALCA	2.71125	2.10E-07	28325	PROX1	2.08192	0.000135872
30590	SLC39A8	2.67444	2.25E-05	25218	MNX1	2.05528	3.37E-06
32000	TCF12	2.66777	1.46E-06	6270	F3	2.01261	5.71E-07
3941	CGNL1	2.63848	0.00120585	2245	C18ORF10	-2.00297	0.00129421
32769	TPH1	2.62647	1.95E-06	28546	PTN	-2.003	0.000354472
25941	NENF	2.55992	0.000599552	5920	EMID2	-2.00456	1.77E-05
2	RPRM	2.5	0.001	2	MGC1108	-	2.75E

4405	2	2.00498	-05	7749		2.0426	234672
5	ENKUR	-	0.000	1	LOC28498	-	0.000
949		2.00742	107398	6489	8	2.04353	785305
2	NUP93	-	0.001	9	HS.440518	-	0.000
6398		2.01111	24009	938		2.04573	285223
1	HS.545615	-	2.65E	2	PPM1H	-	0.000
0837		2.01378	-05	8076		2.04637	38276
1	IQCC	-	0.000	4	ADCY3	-	0.000
2688		2.01383	19749	29		2.05728	712376
6	ETS1	-	0.000	3	SORBS2	-	8.31E
196		2.01751	848186	1199		2.05812	-05
2	PCSK5	-	0.001	1	LOC44145	-	3.05E
7290		2.02079	22771	7624	3	2.0676	-06
1	LOC10019	-	4.35E	1	LIM2	-	0.000
6112	2378	2.0216	-05	3793		2.07092	40641
1	LOC64634	-	0.000	3	TUB	-	0.000
9806	5	2.02311	183202	3165		2.07384	187156
2	LRRIQ1	-	0.000	3	CCDC65	-	0.001
3846		2.02718	541683	462		2.07613	51516
2	PLCE1	-	0.000	4	COBL	-	0.000
7746		2.02761	217281	305		2.07819	485834
2	C3ORF39	-	0.000	6	FILIP1	-	9.69E
727		2.03023	131521	912		2.07924	-05
2	NLGN3	-	2.45E	5	DGCR6	-	0.000
6072		2.03154	-05	195		2.07943	935686
2	C4ORF22	-	0.001	3	WSCD1	-	0.000
770		2.03489	13778	3905		2.08212	33792
3	CCDC88C	-	0.001	1	KCNIP1	-	3.72E
491		2.03515	12864	2933		2.08721	-05
2	NAV3	-	8.63E	4	DACH2	-	9.24E
5751		2.03716	-05	933		2.09051	-05
3	SLC22A1	-	0.000	2	NEUROG	-	0.001
0413	7	2.03749	703407	5960	2	2.09361	11856
1	KDELC2	-	0.001	2	NEK2	-	0.001
3014		2.04133	47391	5930		2.09683	44313
2	PLCH1	-	0.000	3	CASP3	-	0.000

288		2.09925	130992	9816		2.14266	-05
12971	KCNMB4	-2.09934	0.001 40267	1 2212	HS6ST2	-2.14751	0.000 20473
3125	CA14	-2.10277	0.001 47559	4 213	CLSTN2	-2.15117	2.14E -05
17153	LOC399959	-2.10829	0.000 816932	1 6924	LOC389816	-2.15626	4.60E -09
15855	LOC100134073	-2.10866	0.000 366572	2 102	C15ORF26	-2.15663	0.000 242005
26322	NTM	-2.10973	0.000 159062	1 103	ARL4C	-2.16184	0.000 49625
7595	GABRA2	-2.11173	0.001 69771	3 1151	SNX10	-2.16614	0.000 623725
5618	DUSP18	-2.11289	8.90E -05	1 6382	LOC255783	-2.17123	0.000 592438
4289	CNTFR	-2.11375	0.001 32713	3 0372	SLC16A14	-2.17701	0.000 382805
3760	CDH8	-2.11381	7.41E -05	1 3177	KIAA1598	-2.1779	0.000 634174
3196	CALM1	-2.11418	0.001 57715	2 8587	PTPRM	-2.17848	0.000 334455
13615	LARGE	-2.11685	2.37E -05	8 661	HIST1H2AC	-2.18157	0.000 18782
32933	TRIP6	-2.11829	0.000 47459	3 0015	SEPT6	-2.18483	0.001 01243
2242	C17ORF97	-2.12666	0.000 851745	6 572	FAM65B	-2.18593	1.46E -05
5478	DOCK11	-2.12763	0.000 306132	4 614	CSMD2	-2.18777	0.000 579739
7377	FNDC4	-2.13338	0.000 482465	1 9737	LOC646168	-2.18864	0.000 417767
29672	RYR3	-2.13573	0.000 392208	2 429	C1ORF53	-2.19182	0.001 7844
30669	SLC7A6	-2.13865	0.000 299041	1 7855	LOC641785	-2.19315	0.000 255891
2	SCD5	-	9.40E	5	DSCR6	-	0.001

570		2.20122	37487	39		2.25784	-05
1 3835	LIX1	-2.20141	6.32E-06	3 472	CCDC74A	-2.25911	3.66E-05
2 3979	MAF	-2.20457	6.38E-05	2 7561	PHTF1	-2.26039	0.001 13655
4 734	CTXN1	-2.21039	0.000 7813	2 6505	OPCML	-2.26062	2.34E-05
2 049	C14ORF159	-2.2127	0.000 171696	2 3859	LRRTM4	-2.26387	0.000 50229
3 0388	SLC17A8	-2.21639	0.000 916084	2 7040	PACRG	-2.26701	8.08E-05
2 6228	NQO1	-2.21974	0.000 753734	2 4318	MELK	-2.27019	0.000 423662
2 3817	LRRC46	-2.22159	0.000 756129	1 0017	HS.452398	-2.27201	0.000 477927
3 2380	TMEM132D	-2.22662	0.000 463067	9 237	HS.147562	-2.27279	0.000 798954
2 705	C3ORF15	-2.2299	0.000 615847	2 6976	OTX1	-2.27327	0.000 877908
2 7781	PLEKHG1	-2.23885	1.49E-05	8 046	GOLSYN	-2.27724	0.000 100581
2 9607	RSPH9	-2.24091	0.000 109859	1 074	ARHGEF6	-2.27982	0.000 748746
2 3965	MAB21L1	-2.24222	2.00E-05	4 639	CSRNP3	-2.28361	0.000 213299
2 5942	NEO1	-2.24511	2.27E-05	2 7547	PHLDA1	-2.28667	2.70E-05
3 4157	ZFP106	-2.24688	0.001 29693	3 537	CCNA1	-2.28864	6.92E-05
3 3083	TTC29	-2.24927	0.000 317648	2 6071	NLGN2	-2.29131	0.000 215422
3 415	CCDC19	-2.25412	0.000 638581	5 325	DKK3	-2.29195	0.000 372444
3 0209	SH3GL2	-2.2573	0.001 75354	6 326	FAM108C1	-2.29624	0.000 567659
8	ANKS1B	-	6.46E	2	RAB3B	-	0.000

8721		2.30577	211905	2034	1	2.40988	60003
2372	C1ORF158	-2.3174	0.001 84147	31146	SNTN	-2.42893	0.000 945171
32499	TMEM231	-2.32173	0.000 378145	30057	SERPINB6	-2.43305	1.01E-05
5550	DRD1IP	-2.3265	0.001 29147	28580	PTPRD	-2.43513	6.24E-05
12785	ITGB5	-2.32837	0.001 43999	28210	PRDM8	-2.44594	0.000 113613
30937	SNORA79	-2.32935	0.000 394221	2614	C22ORF15	-2.45467	0.000 112958
2538	C20ORF46	-2.34101	0.000 827542	12892	KBTBD9	-2.45472	2.16E-06
5939	EMX2OS	-2.34991	1.28E-05	6246	EXT1	-2.4653	0.000 117948
3153	CACNA1E	-2.35127	0.000 755994	25946	NETO2	-2.46601	0.000 568595
28906	RBKS	-2.35486	1.25E-05	493	AFF2	-2.4707	0.001 2124
3806	CDRT4	-2.36622	0.000 173226	31610	STOML3	-2.48765	0.000 560404
32129	TFPI	-2.36876	0.000 644776	31577	STIL	-2.49103	0.000 199457
5763	EFHC1	-2.36977	0.001 12503	4826	CYB5D1	-2.49147	0.000 128822
3746	CDH18	-2.37821	6.60E-06	2078	C14ORF45	-2.49501	0.000 787004
33006	TSHZ3	-2.38415	0.001 60322	33501	USP13	-2.49771	6.06E-05
6901	FHOD3	-2.38572	0.001 06294	34226	ZMYND10	-2.50015	0.000 105158
13805	LIN28B	-2.38688	0.000 393414	28507	PTCHD1	-2.50016	0.001 20417
1806	C10ORF107	-2.39735	0.000 750154	5322	DKFZP781N1041	-2.50483	0.000 661286
3	TCTEX1D	-	0.001	3	CAPSL	-	0.000

253		2.50626	844682	758		2.6075	303268
14289	LOC100129268	-2.508	0.000176359	7043	FLJ23152	-2.60944	0.000143522
17551	LOC441054	-2.5088	0.00166136	31282	SPATA17	-2.61656	0.00020388
26395	NUP62CL	-2.51081	0.000373281	7106	FLJ33590	-2.61873	0.00025779
1776	BTG3	-2.51582	0.00131261	16264	LOC151162	-2.62005	0.000666466
33005	TSHZ2	-2.51649	3.77E-05	32440	TMEM178	-2.62313	0.00011953
4705	CTNND2	-2.52798	0.00038507	1987	C12ORF69	-2.62861	5.06E-06
29792	SCARNA11	-2.53148	3.35E-06	2970	C7ORF57	-2.63494	0.000118643
4965	DBC1	-2.53221	0.000370596	23830	LRRC6	-2.63632	0.000197619
32507	TMEM31	-2.53343	2.39E-06	6173	ESM1	-2.63913	0.000368518
1927	C11ORF75	-2.53649	0.000498243	153	ABAT	-2.64114	3.81E-06
6740	FBXO15	-2.54184	0.00139562	2793	C4ORF47	-2.64571	0.00134045
27370	PDLIM1	-2.54956	0.000681773	23011	C19ORF51	-2.64617	7.44E-05
728	AMPH	-2.55801	6.39E-06	34155	ZFHX4	-2.66127	5.12E-06
33718	VWC2	-2.56363	0.000340976	5762	EFHB	-2.66338	0.000148296
13724	LEPREL1	-2.56798	4.43E-05	6920	FJX1	-2.66433	8.09E-05
1057	ARHGDIB	-2.573	5.20E-06	12872	KANK4	-2.66744	0.000457332
5765	EFHD1	-2.59294	0.000474204	26104	NME5	-2.66836	0.000118819
3	CDH6	-	0.000	3	CACHD1	-	0.000

148		2.67846	100474	2531		2.77628	-06
25628	MYO16	-2.67972	8.67E-05	15778	LOC100133887	-2.78135	1.17E-05
28838	RAPGEF2	-2.68049	7.06E-05	8 15	ANKRD38	-2.79552	0.000168264
5553	DRD4	-2.68408	0.000500735	3758	WDR16	-2.80194	0.000532777
4087	CITED2	-2.68818	0.00192224	12801	ITM2C	-2.81062	7.32E-05
23790	LRRC26	-2.68889	2.44E-06	32847	TRH	-2.84178	0.00148109
2631	C22ORF42	-2.69089	0.00039382	2881	C6ORF165	-2.84456	6.28E-05
25564	MXRA5	-2.69302	0.00192861	15644	LOC100133542	-2.84572	9.65E-05
12836	JAZF1	-2.70808	5.58E-05	29811	SCARNA8	-2.84646	9.99E-06
13346	KLHL29	-2.71506	5.11E-06	33964	XPR1	-2.85352	5.49E-06
25749	NAV1	-2.71696	0.000248061	25940	NELL2	-2.86423	0.00024831
29306	RNF175	-2.71799	3.04E-05	5455	DNER	-2.87832	0.00127284
13815	LINGO2	-2.71868	2.30E-05	33807	WDR63	-2.88707	4.43E-05
25208	MMRN1	-2.73481	0.000116097	3038	C9ORF116	-2.89396	0.000215965
3918	CFDP1	-2.73575	0.000150699	2553	C20ORF85	-2.89405	7.84E-05
31242	SP8	-2.73862	5.04E-05	5531	DPY19L1	-2.90287	0.000183171
11311	ATP1B3	-2.7498	8.64E-05	31955	TBR1	-2.90815	7.60E-06
25939	NELL1	-2.7509	0.000086776	8655	HIST1H1C	-2.91043	9.46E-05
3	TMEM51	-	6.84E	3	CCDC146	-	0.000

401		2.91057	155147	215	1	3.16181	561888
3 1935	TBC1D9	-2.91662	6.93E-05	8 016	GNRH1	-3.16554	1.25E-05
7 421	FOXJ1	-2.94694	0.000 577632	1 3037	KHDRBS 3	-3.16572	0.000 269437
3 2783	TPPP3	-2.95648	0.000 353912	5 681	E2F7	-3.17981	2.36E-07
5 337	DLG2	-2.96987	1.13E-06	8 174	GPR37	-3.18311	2.85E-05
2 7810	PLK4	-2.98102	1.71E-06	2 9510	RPRML	-3.19177	0.000 271322
2 4315	MEIS2	-3.03243	0.001 09977	4 349	COL4A6	-3.1938	5.88E-05
3 1243	SPA17	-3.03709	0.000 523067	2 7887	PNOC	-3.19863	4.88E-05
1 0979	HS.551307	-3.04712	1.13E-05	1 543	BCAT1	-3.20615	0.000 858798
2 9794	SCARNA 13	-3.05568	4.35E-05	2 8813	RALYL	-3.21662	0.000 509498
3 2378	TMEM132 B	-3.06408	1.54E-06	3 0531	SLC32A1	-3.24737	0.000 2618
2 690	C2ORF77	-3.07752	4.19E-05	2 5216	MNS1	-3.25707	0.000 109366
2 7660	PITPNM1	-3.09871	2.62E-05	3 364	CCDC109 B	-3.26787	0.000 147649
3 2963	TRPM3	-3.10437	0.000 937085	4 004	CHODL	-3.28962	0.001 14785
3 640	CD36	-3.10624	0.000 121554	9 65	APOE	-3.29237	0.001 55578
2 6070	NLGN1	-3.1408	9.93E-05	5 764	EFHC2	-3.29611	0.000 143319
5 749	EFCAB1	-3.15705	0.000 423897	2 9002	RDH10	-3.30034	0.000 369857
3 121	CA10	-3.15947	0.000 537722	2 9600	RSHL3	-3.30753	6.17E-05
3	CAMK2N	-	0.000	1	HTRA1	-	0.000

2317		3.31522	437969	8536		3.54413	188892
2398	C1ORF194	-3.31829	1.21E-05	1283	SPATA18	-3.54742	5.71E-05
5895	ELMOD1	-3.32218	0.000142072	3071	C9ORF24	-3.55395	9.04E-05
3066	C9ORF171	-3.33251	4.78E-05	7432	FOXN4	-3.57299	5.14E-09
33592	VAT1L	-3.3402	0.000247714	27171	PBX3	-3.57487	0.000447274
12399	IFITM3	-3.3542	0.0016376	32270	TLE4	-3.57637	7.16E-05
28319	PROM1	-3.35504	5.84E-05	28981	RCAN2	-3.61105	0.000608261
29034	RELN	-3.43956	1.30E-05	32069	TEKT1	-3.61846	8.36E-05
2397	C1ORF192	-3.45738	0.000124675	17491	LOC440585	-3.62588	0.000175217
586	AKAP14	-3.46559	1.94E-05	5660	DYNLRB2	-3.6297	6.28E-05
5032	DDAH1	-3.46896	1.42E-05	5938	EMX2	-3.66175	1.17E-06
3766	CDK2AP2	-3.4706	3.31E-06	24314	MEIS1	-3.68295	0.000402893
3652	CD47	-3.47334	6.18E-05	13856	LMO2	-3.74164	7.37E-06
4283	CNR1	-3.48521	9.70E-05	6004	EPHB1	-3.77917	0.000119962
12694	IQCG	-3.4934	2.59E-05	7504	FSTL5	-3.80048	0.000392914
10300	HS.537002	-3.49808	0.000142247	1119	ARMC3	-3.82142	2.66E-05
12506	IL13RA2	-3.50471	5.79E-05	31257	SPAG6	-3.86214	1.74E-05
28709	RAB31	-3.51372	7.79E-05	7865	GJA1	-3.88524	0.000511853
2	PTH2	-	0.000	3	CASC1	-	2.00E

274		3.88963	-05	9972		5.03965	-05	
7696	GAS1	-3.95396	2.45E-07	3695	CDC20B	-5.17405	5.72E-07	
7805	GFRA2	-4.00209	0.000116201	4298	CNTNAP2	-5.33902	4.01E-06	
3050	C9ORF135	-4.09611	3.21E-05	2006	C13ORF30	-5.4414	1.12E-06	
23853	LRRN3	-4.2728	1.34E-05	3600	VCAN	-5.47499	0.000917643	
29603	RSPH1	-4.35627	1.08E-05	1936	C11ORF88	-5.55748	2.96E-06	
6458	FAM183A	-4.40302	2.73E-05	30115	SFRP2	-6.27713	3.81E-08	
3220	CAMKV	-4.47543	4.97E-05	27159	PAX6	-6.64236	3.94E-10	
27284	PCP4	-4.64191	1.37E-05	866	ANXA1	-7.3691	4.96E-06	
29723	SAMD3	-4.7132	2.41E-06	3561	CCNO	-9.3158	2.19E-08	
31223	SOX3	-4.74012	8.45E-06	13768	LHX2	-9.53566	3.56E-05	
29396	ROPN1L	-4.86578	3.17E-06					
2	SEMA3C	-	4.16E					

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

№ колонки	ID колонки	Кратное изменение	p-значение
32126	TFF3	24.0181	3.37E-14
1209	ASCL1	22.1637	1.69E-08
9374	HS.19193	14.7045	1.42E-11
7395	FOXA1	13.8748	2.30E-14
13865	LMX1A	10.953	4.33E-10
1	IGFBP5	9.5	1.58E

2456		6964	-06	372	2	1111	-12
4342	COL3A1	9.49528	5.64E-06	7988	GNB3	5.55425	2.56E-12
12361	ID3	9.45077	3.33E-08	31669	SULF2	5.51821	6.78E-08
27988	POSTN	9.10453	7.82E-11	33128	TTR	5.48234	2.88E-09
7396	FOXA2	8.85174	5.07E-15	2543	C20ORF56	5.42131	2.00E-14
3941	CGNL1	8.71553	1.37E-08	32762	TPBG	5.30583	7.23E-05
30390	SLC18A1	8.37911	4.77E-15	436	ADCYAP1	5.20834	1.29E-09
5689	EBF1	8.02385	2.37E-06	26977	OTX2	5.10526	6.89E-06
2470	C1QL1	7.76325	5.90E-10	3978	CHGA	5.07311	7.78E-07
22823	LOC728715	7.73246	1.77E-09	№ колонки	ID колонки	Кратное изменени	р-значение
27665	PITX2	7.32855	7.16E-15	32000	TCF12	5.05883	1.27E-10
12655	INSM2	7.04572	4.97E-11	4003	CHN2	4.53859	9.76E-08
26250	NR4A2	6.75415	1.28E-13	2867	C6ORF141	4.43629	1.97E-10
8156	GPR177	6.28979	1.08E-05	32417	TMEM163	4.40645	3.65E-08
13857	LMO3	6.20624	4.64E-09	26245	NR2F2	4.38488	8.32E-05
33930	XBP1	5.8436	6.74E-06	5036	DDC	4.37185	3.55E-05
12944	KCNJ16	5.71955	1.37E-13	6700	FAT3	4.28732	4.74E-06
27821	PLS3	5.62251	8.45E-07	9428	HS.204481	4.25031	1.93E-09
5	DMRTA	5.6	8.09E	8	GRM8	4.1	1.67E

288		6549	-06	7664		0016	-06
28590	PTPRO	4.13365	8.06E-07	2743	C3ORF58	3.31658	5.91E-07
32159	TH	4.10876	0.000355952	30590	SLC39A8	3.30002	1.28E-06
31361	SPON1	4.063	4.56E-07	32144	TGFBR3	3.28727	6.00E-09
34166	ZFP36L1	4.05459	0.000219198	18750	LOC643911	3.2583	2.43E-07
13689	LDB2	3.9497	1.90E-08	17491	LOC440585	3.24609	0.000469294
32057	TEAD2	3.94608	6.68E-06	24375	MFNG	3.24122	3.31E-07
12731	IRX3	3.93674	0.000270763	5346	DLK1	3.21349	0.000161289
28942	RBM47	3.91109	0.000154758	7562	FZD1	3.15302	8.07E-08
30066	SERPINF1	3.84276	3.72E-06	3186	CALCA	3.14299	1.75E-08
1666	BMP7	3.83782	1.66E-05	27772	PLEKHA5	3.09727	0.000150905
25444	MSX1	3.74709	3.45E-05	26335	NUAK1	3.08699	1.10E-05
8593	HES6	3.66092	5.43E-05	34155	ZFHX4	3.05463	6.49E-07
12149	HS.7023	3.65165	0.000170814	27855	PMP22	3.03785	1.12E-07
30239	SHISA2	3.60636	8.64E-06	4491	CPVL	3.02972	0.000317992
9819	HS.388347	3.52316	1.46E-08	7421	FOXJ1	3.01784	0.000461499
7564	FZD2	3.48734	3.69E-06	2850	C6ORF117	3.00725	3.47E-05
26928	OSBPL10	3.44485	1.91E-07	27105	PAPSS2	2.97981	1.49E-05
2	PITX1	3.4	5.92E	1	ID1	2.9	0.000

2358		4361	160308	399		8556	-07
3 3004	TSHZ1	2.9 3637	2.29E -07	1 6419	LOC283 514	2.5 5654	7.18E -05
5 691	EBF3	2.9 2465	2.26E -05	1 2986	KCNS3	2.5 1225	3.59E -05
1 086	ARID5B	2.9 2012	2.33E -06	6 270	F3	2.5 0649	4.09E -09
3 2769	TPH1	2.8 8914	4.24E -07	3 2177	THBS4	2.4 8547	9.17E -05
5 424	DNAJC 19	2.8 7234	6.43E -09	6 457	FAM18 1B	2.4 8092	0.000 1071
6 208	EVI1	2.8 6069	2.04E -07	1 2644	INPPL1	2.4 7363	7.08E -06
1 3858	LMO4	2.8 5216	4.81E -05	2 8624	PVRL3	2.4 7112	3.32E -05
1 2733	IRX5	2.8 4963	0.000 139911	2 885	C6ORF1 73	2.4 5642	9.25E -05
5 879	ELF1	2.7 8573	1.43E -06	2 5218	MNX1	2.4 4999	9.15E -08
2 3752	LRIG1	2.7 7491	0.000 210665	3 835	CEBPD	2.4 4764	0.000 160544
2 3822	LRRC4 C	2.7 7041	5.37E -07	6 197	ETS2	2.4 3482	2.74E -06
4 780	CXCR4	2.7 2468	5.12E -07	8 206	GPR98	2.3 7781	0.000 437636
2 7696	PKNOX 2	2.7 166	1.59E -05	3 0664	SLC7A2	2.3 6837	5.80E -11
3 1514	ST6GA LNAC5	2.7 0116	0.000 12729	7 853	GINS2	2.3 541	7.75E -05
3 2854	TRIL	2.6 6182	5.76E -06	2 9887	SDC2	2.3 4674	3.00E -05
7 617	GADD4 5G	2.6 2149	0.000 385727	2 7402	PDZRN 4	2.2 9374	2.31E -06
5 349	DLL3	2.6 2131	0.000 304562	1 6112	LOC100 192378	2.2 867	4.57E -06
8	GULP1	2.5	2.34E	2	LOC650	2.2	4.94E

1088	494	7924	-06	3375		0568	336807
8583	HERC5	2.27663	2.89E-07	1039	HS.553187	-2.00024	0.000182185
1775	BTG2	2.27014	6.72E-06	972	GNAI1	-2.00345	0.000400577
30719	SLK	2.24997	3.57E-05	241	ASTN1	-2.00503	0.000267753
19806	LOC646345	2.232	3.69E-05	29957	SEL1L3	-2.00817	9.40E-06
25137	MKL2	2.22229	0.00012672	9721	HS.348844	-2.06728	9.46E-05
7610	GABRR1	2.21011	2.33E-07	403	ADAMTS5	-2.09516	8.41E-07
8573	HEPACAM2	2.17226	1.17E-09	5268	DIRAS2	-2.10442	0.000137286
29151	RHBDL3	2.16408	5.80E-05	1042	ARHGAP22	-2.11082	9.20E-05
27016	P2RY5	2.16065	5.91E-06	24440	MGC27121	-2.11477	1.75E-08
30261	SIAH3	2.14795	3.46E-05	28124	PPP2R2C	-2.12982	0.000152152
30517	SLC2A8	2.13975	8.81E-05	2812	C5ORF30	-2.14976	2.66E-06
7457	FREM1	2.12587	7.87E-08	8046	GOLSYN	-2.15553	0.000225269
1102	ARL4A	2.11255	0.000248586	7626	GAGE12C	-2.16085	1.15E-07
29277	RNF128	2.07512	8.41E-06	728	AMPH	-2.19127	7.33E-05
29124	RGS16	2.06237	7.60E-05	28104	PPP1R1C	-2.2262	3.10E-07
8211	GPRC5C	2.04839	5.12E-05	28251	PRKACB	-2.27738	6.28E-05
26002	NGF	2.01869	9.29E-08	26252	NR5A1	-2.3262	1.83E-08
3	UCP2	2.0	0.000	1	ABAT	-	2.64E

53		2.33538	-05	2801		2.50635	289334
28721	RAB3B	-2.33887	0.000174687	1641	BLCAP	-2.52288	0.000363648
31151	SNX10	-2.35266	0.000210353	30231	SHC3	-2.53075	2.70E-06
26936	OSBPL8	-2.36481	0.000356878	33964	XPR1	-2.55331	2.67E-05
30232	SHC4	-2.36756	5.88E-06	28266	PRKCE	-2.55567	1.75E-07
28689	RAB15	-2.37701	4.57E-05	26521	OPTN	-2.57271	0.000282119
31222	SOX2OT	-2.37929	5.44E-06	5325	DKK3	-2.57389	8.27E-05
10203	HS.525171	-2.37949	0.000112764	33325	UBL3	-2.58024	0.000136606
27287	PCSK1N	-2.39396	0.000122619	6859	FGF13	-2.58447	3.31E-05
30200	SH3BGRL2	-2.39696	0.000352607	32210	THY1	-2.60259	0.000107047
23918	LY6H	-2.3986	0.000426406	30015	SEPT6	-2.63038	0.000101624
31543	STAMBPL1	-2.40424	0.000210764	30351	SLC12A5	-2.64265	0.000195945
12256	HSPA12A	-2.4161	5.00E-06	607	AKR1C4	-2.66634	0.000217452
12209	HS3ST5	-2.42056	1.64E-08	7635	GAGE2B	-2.67196	4.87E-10
1764	BTBD3	-2.43171	9.02E-05	13177	KIAA1598	-2.67619	4.25E-05
32742	TOX2	-2.47449	6.41E-06	1986	C12ORF68	-2.67913	0.000114615
896	AP1S2	-2.4814	0.000411095	25516	MTSS1	-2.69402	0.000290278
13764	LHFPL4	-2.49494	0.000177306	32535	TMEM55A	-2.70095	5.71E-06
1	ITM2C	-	0.000	2	NDST3	-	9.29E

5864		2.72344	-06	3313		3.16185	-05
3 3591	VAT1	-2.74928	0.000228555	7 613	GAD1	-3.18763	0.000116615
2 6498	ONECUT1	-2.77372	1.86E-05	2 9400	RORB	-3.1967	5.32E-08
1 2634	INPP1	-2.79095	5.83E-05	2 7566	PHYHIPL	-3.21046	3.97E-05
5 703	ECEL1	-2.83259	0.000107266	2 5628	MYO16	-3.21287	9.14E-06
1 6740	LOC387856	-2.84534	0.000116969	2 5284	MPPED2	-3.23371	0.000114488
5 631	DUSP6	-2.85825	8.35E-05	3 0531	SLC32A1	-3.23601	0.000270573
3 1568	STC1	-2.8677	0.000365825	2 9034	RELN	-3.32027	1.95E-05
2 27	ABLIM2	-2.8948	2.50E-06	2 6058	NKX2-1	-3.35392	4.84E-06
2 7415	PELI2	-2.9135	2.07E-05	3 0114	SFRP1	-3.38198	0.00010787
2 538	C20ORF46	-2.92994	6.05E-05	4 965	DBC1	-3.3928	1.25E-05
4 639	CSRNP3	-2.9364	6.80E-06	3 1763	SYT1	-3.47973	0.00017165
3 1628	STS-1	-2.94215	9.63E-07	2 9624	RTN1	-3.48718	0.000208889
3 0210	SH3GL3	-2.94559	0.000343973	3 121	CA10	-3.49466	0.000217475
1 0017	HS.452398	-3.01786	1.26E-05	2 4095	MAP4	-3.54296	0.000118613
4 705	CTNND2	-3.02031	4.91E-05	9 476	HS.223856	-3.61087	5.18E-05
2 4516	MGST1	-3.02712	1.36E-06	3 2343	TMEFF2	-3.6559	1.52E-06
4 283	CNR1	-3.13389	0.000271812	7 13	AMHR2	-3.65957	2.10E-08
1	KLF6	-	3.73E	2	PSD2	-	0.000

8417		3.70127	123589	215	N1	5.84508	-06
7106	FLJ33590	-3.74166	4.19E-06	3592	VAT1L	-6.26024	7.74E-07
4386	COPG2IT1	-3.9994	7.98E-05	27971	POMC	-6.74106	6.72E-05
3207	CALY	-4.03219	3.21E-06	26219	NPTX2	-7.85511	1.15E-05
30824	SNCG	-4.48956	2.76E-06	25939	NELL1	-8.58778	1.80E-08
5455	DNER	-4.58982	1.95E-05	33624	VGF	-8.61516	1.37E-05
5550	DRD1IP	-4.64486	5.89E-07	31223	SOX3	-10.3701	8.71E-09
26253	NR5A2	-4.70942	1.65E-11	30314	SIX6	-12.5834	1.04E-12
12954	KCNK12	-4.77483	2.25E-06	26965	OTP	-14.2469	6.08E-10
5352	DLX1	-4.89802	0.000316228	12743	ISL1	-21.0507	6.48E-05
26332	NTS	-4.92922	0.000411631	31479	SST	-21.3179	0.000281588
33565	UTS2	-5.26698	2.91E-07				
3220	CAMKV	-5.35563	1.08E-05				
2631	C22ORF42	-5.4488	2.15E-07				
29220	RIT2	-5.49937	9.53E-12				
31359	SPOCK2	-5.66406	5.68E-06				
12746	ISLR2	-5.6746	0.000247482				
32591	TMOD1	-5.689	7.66E-12				
3	CAMK2	-	2.30E				

12746	ISLR2	-5.6746	0.000247482
32591	TMOD1	-5.689	7.66E-12
3215	CAMK2N1	-5.84508	2.30E-06

Таблица 6: показан примерный список антител, применяемых в качестве маркеров, включая концентрацию (т.е. разбавление) антител, применяемых в качестве примера источника антител. В некоторых вариантах реализации, связанные антитела идентифицировали с применением вторичных антител, конъюгированных с Alexa488, Alexa555 или Alexa647 (Molecular Probes, Carlsbad, Калифорния, США). В некоторых вариантах реализации применяли вторичные биотинилированные антитела для идентификации связанных первичных антител, с последующей визуализацией с применением хромогена DAB (3,3'-диаминобензидина).

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

Pitx3	1:100	Millipore	Billerica, MA
β-катенин	1:100	BD	Franklin Lakes, NJ
коллаген	1:100	Oncogene	LaJolla, CA
цитокертин	1:100	DAKO	Glostrup DK
Oct-4	1:200	Santa Cruz	Billerica, MA
Ki-67	1:200 / 1:400	Zymed / DAKO	San Francisco, CA
поликлональная GABA	1:2000	Sigma	St Louis, MI
серотонин (5-HT)	1:2000	Sigma	St Louis, MI
поликлональная GFAP	1:2000	DAKO	Glostrup, DK
калбидин	1:300	Abcam	Cambridge, MA
VMAT2	1:200	Millipore	Billerica, MA
DAT	1:1000 / 1:2000	Millipore	Billerica, MA
GFP	1:1000	Molecular Probes	Carlsbad, CA
Girk2	1:200	Abcam /Alomone	Cambridge, MA / Israel
FoxG1	1:100	NeuraCell	Rensselaer, NY
Pax6	1:100	Covance	Princeton, NJ
Otx2	1:2000	Strategic Diagnostics	Newark, DE
Lmx1a	1:2000	Millipore	Pittsburgh, PA
синапсин	1:1000	Sigma	St Louis, MI
Iba-1	1:200	Millipore	Billerica, MA
ED-1	1:200	Millipore	Pittsburgh, PA

NCAM человека (Eric-1)	1:100	Santa Cruz	Santa Cruz, CA
специфичный для человека цитоплазматический (SC-121)	1:1000	Stem Cells Inc.	Newark, CA
Nurr-1	1:1500	Perseus Proteomics	Япония

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

Тип клеток	**маркер**	**описание анализа**	**предполагаемые пределы**
FP/ DA среднего мозга	FOXA2/LMX1A	ИГХ: со-экспрессия @ в день 13 & день 25; валидация количественной ПЦР-ОТ	> 50%
предгественник ДА нейронов	FOXA2/TH; TH/NURR1	ИГХ: со-экспрессия @ в день 25; валидация количественной ПЦР-ОТ	> 25%
Плюрипотентные клетки	OCT-4;	ИГХ: @ в день 25; валидация количественной ПЦР-ОТ	< 2 %
Пролиферирующие клетки	Ki67	ИГХ	< 25 %
предшественник (переднего мозга)	FOXG1; PAX6	ИГХ: @ в день 25; валидация количественной ПЦР-ОТ	< 10%
выход ДА нейронов	TH/FOXA2	ИГХ: со-экспрессия @ в день 25 из ЭСКч, посеянных в день 0	> 1DA n/ЭСКч

выживание In vivo	TH/FOXA 2 (in vivo)	Гистология in vivo @ 4 недели после приживления 200 тыс клеток	> 2,000 / животное

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

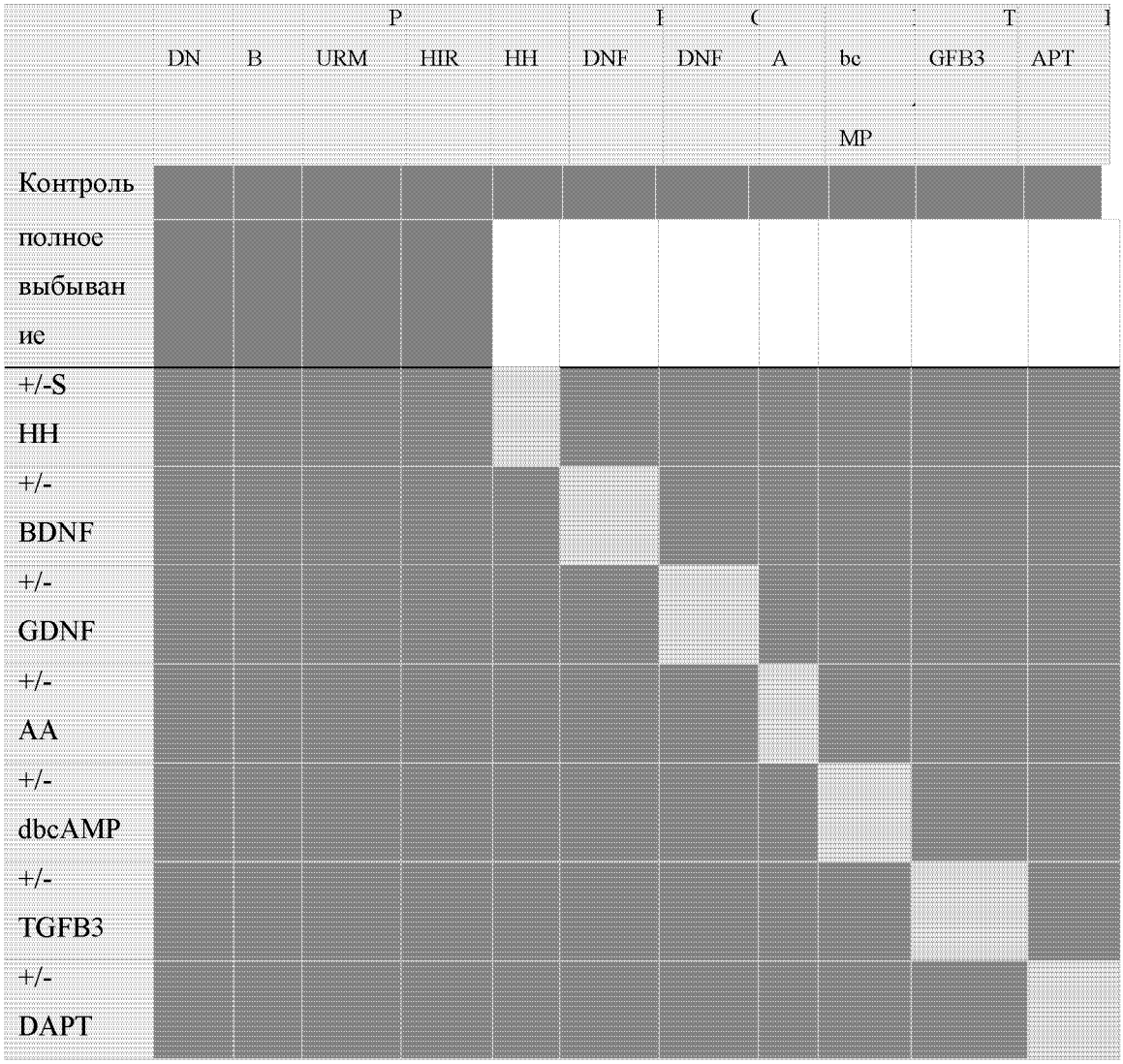


Таблица 9. Примеры способов масштабирования культуры смДА нейронов, в частности, в получении культур уровня GMP для применения в клинике.

	Пилотный масштаб	**промежуточный**	**клинический**

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

Таблица 10. Пример in vivo оценки продуктов лини ЭСКч – состав трансплантата.

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

Таблица 11. Пример in vivo оценки продуктов лини ЭСКч – поведенческие тесты.

Тест	Параметр	Описание анализа	Предполагаемые пределы
Асфетаминовые повороты (*)	Общее число поворотов/мин (ипси-минус, контралатеральные)	Повороты в сторону повреждения после интраперитонеальной инъекции амфетамина	< 1 поворотов/мин
Шаговый тест	% компенсация контралатеральных шагов /общая	Начало шагания с использованием конечности на	40-50%

	компенсация	контралатеральной стороне	
тест с цилиндром	% использование ипсилатеральной конечности /общее число	Спонтанное исследование ипси-конечностью по сравнению с контралатеральной конечностью	Мин. 20% улучшение по сравнению с состоянием до пересадки

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

Экспериментальная часть

Приведенные ниже примеры служат для иллюстрации конкретных вариантов осуществления и аспектов настоящего изобретения, и не предназначены для ограничения его объёма. В последующих описаниях экспериментов применяются следующие сокращения: N (H) (нормальный); M (молярный); мМ (миллимолярный); мкМ (микромолярный); моль (моль); ммоль (миллимоль); мкмоль (микромоль); нмоль (наномоль); пмоль (пикомоль); г (грамм); мг (миллиграмм); мкг (микрограмм); нг (нанограмм); пг (пикограмм); л (литр); мл (миллилитр); мкл (микролитр); см (сантиметр); мм (миллиметр); мкм (микрометр); нм (нанометр); U (единица); мин (минута); с и сек (секунда); град. (градус); pen (пенициллин), **strep (**стрептомицин) и °C (градус Цельсия).

ПРИМЕР I.

Материалы и методы.

Краткое описание методов: Линии человеческих ЭСК (ESC) (H9, H1) и иПСК (2C6 и SeV6) обрабатывали в соответствии с модифицированным протоколом индукции вентральных пластинок (Fasano, и др., *Cell Stem Cell* 6:336-347 (2010), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки), основанном на двойном ингибировании SMAD (Dual SMAD-inhibition) (Chambers, *и др. Nat. Biotechnol.* 27:275-280 (2009), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Время воздействия реагентов SHH C25II, пурморфамина, FGF8 и CHIR99021 на вентральные пластинки среднего мозга оптимизировали для получения новых популяций ДА нейронов (см. Фиг. 1d). После индукции вентральных пластинок последующее созревание (11-25 дней или дольше 25 дней в культуре до по меньшей мере 100 дней в культуре) осуществляли в среде для дифференцировки на основе Neurobasal/B27 в присутствии факторов выживаемости и созревания ДА нейронов (Perrier, *и др. Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12543-8 (2004), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки), таких как AA, BDNF, GDNF, TGFβ3 и dbcAMP (подробности приведены в полном описании метода). Фенотип полученной популяции ДА нейронов тщательно исследовали иммуноцитохимическими методами, методом количественной ОТ-ПЦР, определения глобального профиля экспрессии генов, ВЭЖХ-анализа для определения дофамина и регистрации электрофизиологических характеристик *in vitro*. Исследования *in vivo* осуществляли на грызунах с гемипаркинсонизмом (мыши или крысы, которым токсин

6OHDA был введён в одно полушарие мозга). Указанные исследования проводили на невзрослых мышах *NOD-SCID IL2Rgc* (Jackson labs) и взрослых крысах Sprague Dawley из Taconic Farms, у которых вызывали повреждения 6-гидроксидопамном посредством стереотактических инъекций указанного токсина как описано ранее, а также на двух взрослых макаках-резус, получавших односторонние инъекции MPTP в сонную артерию.

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

ДА нейрон. Линии ЭСКч H9 (WA-09, XX, 27-55 пассажей после 10/2009), H1 (WA-01, XY, 30-40 пассажей после 6/2010) и линии иПСК 2C6 (Kim, *и др. Cell Stem Cell* 8:695-706 (2011), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) (XY, 20-30 пассажей) и SeV6 (XY, 20-30 пассажей; получены из эмбриональных фибробластов MRC-5 с применением неинтегрирующей 4-х факторной векторной системы Sendai (Ban, и др. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A (2011) 108(34):14234-14239:10,1073/pnas.1103509108, цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) поддерживали на эмбриональных фибробластах мыши при расчётных концентрациях посева в диапазоне от 0,5 x10^3 на $см^2$ до 100 x10^3 на $см^2$ на по ЭС клеткам человека, при которых клетки склонны к образованию кластеров (MEF, Global Stem, Rockville, MD) в оптимальной среде для ЭС клеток человека, содержащей 20% заменителя сыворотки Knockout serum replacement (KSR, Invitrogen, Carlsbad, California) (как описано ранее (Kim, *и др. Cell Stem Cell* 8:695-706 (2011), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Используемое количество Knockout serum replacement может варьировать в диапазоне от 0% до 40%.

Индукция нейронов. Для индукции дофаминовых нейронов вентральной пластинки среднего мозга использовали модифицированную версию двойного ингибирования SMAD

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

тыс. клеток/см^2) на чашки, предварительно покрытые полиорнитином (PO); 15 мкг/мл (в диапазоне концентраций 1 - 50 мкг/мл) / ламинином (1 мкг/мл) (в диапазоне концентраций 0,1- 10 мкг/мл) / фибронектином (2 мкг/мл (в диапазоне концентраций 0,1- 20 мкг/мл) в среде для дифференцировки (NB/B27 + BDNF, AA, GDNF, dbcAMP (в диапазоне концентраций, указанных в настоящем описании), TGFβ3 и DAPT (в диапазоне концентраций, указанных в настоящем описании) до достижения желаемой стадии созревания для конкретного эксперимента.

Для индукции ДА нейронов на основе розеток частично использовали ранее описанные протоколы (Perrier, и др. Proc Natl Acad Sci U S A 101:12543-8 (2004), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) с по меньшей мере одним исключением, когда двойное ингибирование SMAD использовали для ускорения начальной стадии индукции нейронов. Вкратце, ЭСКч индуцировали для нейронного пути развития совместным культивированием с облучёнными клетками MS5 в среде KSR с добавлением SB431542 и Noggin (250 нг/мл (в диапазоне концентраций 10-1000 нг/мл); R&D), с 2-8 дней и SHH+FGF8 с 6-11 дней дифференцировки. После 11 дней в среде KSR нейронные розетки собирали вручную и выращивали (стадия P1) в среде N2 с добавлением SHH, FGF8, BDNF и AA как описано ранее (Perrier, *и др. Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12543-8 (2004), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). После 5-7 дней на стадии P1 розетки снова собирали вручную и измельчали в порошок с последующей инкубацией в не содержащем Ca^2/Mg^2 сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) в течение 1 часа и пересевали на чашки, покрытые полиорнитином (PO) / ламинином / фибронектином. Составление паттерна с SHH/FGF8 продолжали в течение 7 дней на стадии P2 с последующей окончательной дифференцировкой в присутствии BDNF, AA, GDNF, TGFb3 и dbcAMP как описано выше до достижения желаемой стадии созревания для конкретного эксперимента (обычно 5-7 дней для экспериментов по трансплантации или 32 дня для функциональных экспериментов *in vitro*).

Анализ экспрессии генов. Тотальную РНК выделяли в ходе дифференцировки в следующие дни: 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 и 25 для каждого эксперимента с условиями: контроль LSB, LSB/SHH/FGF8 и LSB/SHH/FGF8/CHIR с применением набора RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Для анализа на биочипах тотальную РНК обрабатывали на аппарате MSKCC Genomic core и гибридизовали на биочипах в виде бусин Illumina Human ref-12 в

соответствии с инструкцией производителя. Сравнения осуществляли каждый день и для каждого набора условий с применением пакета LIMMA от Bioconductor (worldwideweb.bioconductor.org). Гены, у которых скорректированное значение P было меньше 0,05, а кратность изменения экспрессии была выше двух, считали статистически значимыми. Некоторые из описательных анализов данных на биочипах и представление выполняли с применением коммерчески доступного программного пакета (Partek Genomics Suite (версия 6.10,0915)). Для анализа количественной ОТ-ПЦР тотальную РНК на 25 день для каждого набора условий подвергали обратной транскрипции (Quantitech, Qiagen) и амплифицированный материал анализировали с применением коммерчески доступной тест-системы «Taqman gene expression assays» (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) с нормировкой данных по HPRT. Каждая точка представляет 9 технических повторов из 3 независимых биологических образцов. Первичные данные экспериментов на биочипах ещё не доступны на GEO worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov/geo).

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

Мыши. Мышей, нокаутных по *NOD-SCID IL2Rgc* (весом 20–35 г; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, США) подвергали анестезии кетамином (90 мг/кг; Akorn, Decatur, IL) и ксилазином (4 мг/кг; Fort Dodge, IA). 6-Гидроксидофамин (10 мкг (в диапазоне концентраций 0,1- 20 мкг), 6-OHDA (Sigma-Aldrich) вводили стереотактически в стриатум со следующими координатами (в миллиметрах): AP, 0,5 (от брегмы; в качестве точки отсчёта для стереотактического хирургического вмешательства использовали шов черепа); ML, -2,0; DV, -3,0 (от твёрдой мозговой оболочки, мембраны покрывающей мозг, использовавшейся в в качестве точки отсчёта). Мыши с успешными поражениями (в среднем > 6 вращений в минуту) были выбраны для трансплантации. Общее количество 150 x 10^3 клеток вводили в объёме 1,5 мкл в стриатум по следующим координатам (в мм): AP, 0,5; ML, -1,8; DV, 3,2. Мышей умерщвляли через 18 недель после трансплантации.

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

Приматы. Двух взрослых (17-18 лет; 10-12 кг; самки) макак-резус приводили в состояние гемипаркинсонизма введением MPTP в сонную артерию с последующим еженедельным внутривенным введением MPTP для создания двустороннего паркинсоновского синдрома (Kordower, *и др. Science* 290:767-773 (2000), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). У обоих животных наблюдались паркинсоновские симптомы, согласующиеся с повреждениями от средней до сильной тяжести, основанные на анализе поведения, включая искривлённую осанку, подволакивание ноги и симптомы мышечной ригидности (непластичность движений), пренебрежения (моторное восприятие латерального стимула) и брадикинезия (замедленная инициация движения). Эти параметры могут быть оценены на обезьянах с применением модифицированной паркинсоновской клинической шкалы оценки (CRS). В день операции по тренсплантации животным вводили тренквилизатор кетамин (3,0 мг/кг внутримышечно) и дексдомитора (0,02-0,04 мг/кг внутримышечно), интубировали, чтобы поддерживать стабильную вентиляцию дыхательных путей и подвергали анестезии изофлураном. Затем их помещали в стереотактическую рамку для хирургического вмешательства. Обеих макак-резус подвергали опреации однократно с тремя внутричерепными инъекциями культур ДА,

полученны из вентральных пластинок человека, основываясь на стереотаксических координатах (Paxinos, *и др. The Rhesus Monkey Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press, 2000), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Двусторонние инъекции клеток (10 мкл в инъекции; 125,000 клеток/мкл) осуществляли в три положения (1 - задний хвостовой придаток, 2-пре-комиссуральную скорлупу и вышележащее белое вещество) общим объёмом 30 мкл на полушарие. Использовали инфузионный насос, присоединённый к стереотаксическому микроманипулятору, для доставки клеток на скорости 1 мкл/мин посредством шприца Hamilton объёмом 50 мкл с иглой 28 G. После завершения инъекций иглу оставляли на месте на 2-5 минут, чтобы инфузат смог диффундировать из наконечника шприца, а затем медленно извлекали шприц. Немедленно после хирургического воздействия животные получали анальгетик (бупренекс, 0,01 мг/кг внутримышечно, два раза в день в течение 72 часов после хирургического вмешательсва; мелоксикам, 0,1 мг/кг подкожно, один раз в день в течение 72 часов после хирургического вмешательсва), а также антибиотик (цефазолин, 25 мг/кг внутримышечно, два раза в день) в течение 72 часов после хирургического вмешательсва. Животные получали циклоспоррин А (Neoral, Sandimmune) орально (30 мг/кг со снижением до 15 мг/кг) ежедневно, начиная за 48 часов до хирургического вмешательства и до момента умерщвеления, в течение одного месяца после трансплантации.

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

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

Обработка тканей.

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

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

Иммуногистохимия: Клетки фиксировали в 4% PFA и блокировали 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA) с 0,3% Тритоном. Секции тканей мозга отмывали в холодном PBS и обрабатывали одинаковым образом. Первичные антитела разбавляли в 1-5% BSA или нормализованной козьей сыворотки и инкубировали в соответствии с рекомендациями производителя. Полный список антител и источников приведён в Таблице 6. Подходящие вторичные антитела, конъюгированные с Alexa488, Alexa555 и Alexa647

(Molecular Probes, Carlsbad, California), использовали с ядерным контрастным красителем 4′,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (Thermo Fisher, Rockford, Illinois). Для некоторых анализов использовали биотинилированные антитела с последующей визуализацией с помощью хромогена DAB (3,3'-диаминобензидин).

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

Регистрация электрофизиологических параметров: Культуры переносили в регистрирующую камеру на прямой микроском, оборудованный 40X водоиммерсионным объективом (Eclipse E600FN; Nikon); культуры перфузировали физраствором, содержащим, в мМ: 125 NaCl, 2.5 KCl, 25 $NaHCO_3$, 1.25 NaH_2PO_4, 2 CaCl, 1 $MgCl_2$ и25 глюкозы (34 °C; насыщенным 95% O_2-5% CO_2; pH 7.4; 298 мОсм/л). Скорость потока физраствора составляла 2-3 мл/мин при пропускании через втроенный нагреватель (SH-27B с контроллером TC-324B; Warner Instruments). Нейроны визуализировали методом видео-микроскопии с охлажаемоей цифровой ПЗС-камерой (CoolSNAP ES^2, Photometrics, Rona Scientific, Tucson, Arizona, США). Для регистрации электрофизиологических параметров отбирали клетки, похожие по форме на нейроны, с хорошим ветвлением дендритов. Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp) на целых соматических клетках в текущей конфигурации фиксации осуществляли с применением усилителя MultiClamp 700B (Molecular Devices). Сигналы фильтровли ф диапазоне 1-4 кГц и оцифровывали на 5-20 к ГЦ с применением Digidata 1440A (Molecular Devices). Регистрирующие контактные электроды были выполнены из волокна из боросиликатного волокна (Sutter Instruments), вытянутого на пуллере Flaming-Brown (P-97, Sutter Instruments) иимели сопротивление 4-6 МОМ в ванне. Электроды заполняли внутренним раствором, содержащим в мМ: 135 K-$MeSO_4$, 5 KCl, 5

HEPES, 0.25 EGTA, 10 фосфокреатина-ди(трис), 2 АТФ-Mg и 0.5 ГТФ-Na (pH 7.3, осмолярность доводили до 290-300 мосм/л). Мостиковый усилитель настраивали таким образом, чтобы компенсировать сопротивление электродов, и следили за ним. Емкость электродов компенсировали. Если последовательное соединение возрастало >20% в ходе фиксации потенциала даннные отбрасывали, поскольку повышение сопративление указывает на частичные технические неполадки в ходе измерения.

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

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

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

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

Среда N2 для дифференцировки ЭСКч (1 литр): 985 мл дистиллированной H_2O с порошком DMEM/F12, 1.55 г глюкозы (Sigma, № по катологу G7021), 2.00 г бикарбоната натрия (Sigma, № по катологу S5761), путресцин (аликвота объемом 100 мкл из раствора 1.61 грамм в 100 мл дистиллированной воды; Sigma, № по катологу P5780), прогестерон (аликвота 20 мкл раствора 0.032 грамм в 100 мл 100% этанола; Sigma, № по катологу P8783), селенит натрия (аликвота объемом 60 0.5 мМ раствора в дистиллированной воде; Bioshop Canada, № по катологу SEL888), и 100 мг трансферрина (Celliance/Millipore, № по катологу 4452-01), и 25 мг инсулина (Sigma, № по катологу I6634) в 10 мл 5 мМ NaOH.

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

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

ПРИМЕР II.

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

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

Авторы настоящего изобретения ранее использовали несколько других методов направленной дифференцировки, которые приводили к получению популяции клеток,

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

В частности, ЭСКч клетки в фазе P0 приводили в контакт с молекулами для начала нейронной индукции клеток Oct4+ в клетки розеткообразных структур с применением фидерных клеток MS5 (Perrier и др., 2004). На стадии P1 клетки розеткообразных структур развивались в результате контакта клеток с дополнительными молекулами для дифференцировки клеток в клетки стадии P2 с характерным паттерном экспрессии, включая клетки-предшественники Pax2+/En1+DA, и затем дифференцировались в нейроны TH+/En1+ДА. Эти клетки использовали для приживления трансплантата у крыс с вызванными 6OHDA повреждениями и иммуносупрессией, индуцированной цикоспорином А. Описанные эксперименты по трансплантации показали плохую выживаемость *in vivo*, потерю фенотипа TH+, проблемы, связанные с дальнейшим разрастанием в нежелательные, возможно летальные, клетки, такие как тератомы, и ростом в неприемлемые типы нейронов, которые могут вызвать дополнительные медицинские проблемы у пациента.

Наблюдалось очень маленькое количество выживших TH+ нейронов через 4,5 месяца после трансплантации (< 50 TH+ клеток / животное) в трансплантатах из предшественников ДА нейронов, полученных из рощ структур, Фиг. 16А. Однако, в противоположность клеткам TH+, клетки, маркированные GFP (GFP находился под контролем убиквитарного промотора), показали довольно хорошую выживаемость после трансплантации. Это говорило о том, что клетками с наиболее хорошей выживаемостью были нейронные клетки,

не относящиеся к ДА нейронам (16B). Несколько клеток, полученных из трансплантата (hNA+, зелёные), одновременно экспрессировали TH (красные), что также говорило о том, что большинство трансплантированных клеток человека относятся к фенотипам нейронов, не являющихся ДА нейронами, Фиг. 16C. Секции Фиг.16 D-E показывают, что, несмотря на очень плохую выживаемость *in vivo*, наблюдалось некоторое улучшение (варьируемое в низкой и высокой степени) в нескольких тестах поведения, таких как тест на вращение, индуцированное амфетамином, (D), тест в цилиндре и спонтанные вращения (E).

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

Как показано в настоящем описании, популяция клеток, содержащая плюрипотентные клетки, была выбрана авторами настоящего изобретения в качестве исходной популяции и посеяна в день 0. Перед дифференцировкой клетки выращивали до состояния, близкого к полной заселённости (между 60 – 100% конфлюентности). Эти клетки приводили в контакт с двойными ингибиторами SMAD (то есть обрабатывали LDN-193189 + SB431542 = «LSB») в день 0. Авторы настоящего изобретения поддерживали популяцию клеток с периодической подкормкой, содержащей свежий LSB до 11 дня и обнаружили, что некоторые из оставшихся клеток были LMX1A+, но не экспрессировали FOXA2 (Фиг. 1a,b). Авторы посеяли дубликат исходной популяции клеток, а затем протестировали тип клеток (то есть паттерны экспрессии генов/белков) после обработки смесями, содержащими любой из следующих агонистов SHH (пурморфамин + SHH) и FGF8 (S/F8), приводившихся в контакт с клетками в различных режимах обработки, то есть контактировавшими с клетками в день 0, или 1 день,

или 2 день, и т.д. в течение определённого периода времени, то есть 24 часа, 48 часов и т.д.. Исследовали три первичных примера условий культивирования, а именно: 1) клетки контактировали с LDN/SB (LSB) в день 0, затем контактировали со свежим LSB до 5 дня, на 5 день клетки приводили в контакт со свежим LDN без SB до 11го дня, 2) клетки контактировали с LDN/SB (LSB) в день 0, затем контактировали со свежим LSB до 5 дня, на 5 день клетки приводили в контакт со свежим LDN без SB до 11 дня, при этом в течение этого времени клетки дополнительно контактировали со свежим пурморфамином, SHH и FGF8 до 7 дня, и 3) клетки приводили в контакт с LDN/SB (LSB) в день 0, затем приводили в контакт со свежим LSB до 5 дня, на 5 день клетки приводили в контакт со свежим LDN без SB до 11 дня, при этом в течение этого времени клетки дополнительно контактировали со свежим пурморфамином, SHH и FGF8 до 7 дня, а также дополнительно контактировали со свежим CHIR, начиная с 3 дня культивирования до 11 дня с несколькими вариациями этих первичных условий. Эти эксперименты были направлены на определение оптимального выхода типов клеток. Систематические сравнения этих трёх условий культивирования (Фиг. 1d) осуществляли, путем определения глобального временного профиля экспрессии генов. См. примеры на Фиг. 8 и Таблицы 1-6. Иерархическое выделение кластеров дифференциально экспрессировавшихся генов позволило различать эти три набора условий обработки на 11 день дифференцировки (Фиг. 8a). *FOXA1, FOXA2* и несколько других мишеней SHH ниже по каскады, включая *PTCH1*, были среди наиболее дифференциально регулировавшихся транскриптов в LSB/S/F8/CHIR в сравнении с наборами обработки LSB (Фиг. 1e). Экспрессия *LMX1A, NGN2,* и *DDC* указывала на предопределённость пути развития в предшественника ДА нейрона среднего мозга уже на 11 день (Фиг. 1e,f). В отличие от этого, культуры LSB на 11 день были обогащены маркерами предшественников дорсального заднего мозга, такими как *HES5, PAX6, LHX2, и EMX2.* Прямое сравнение LSB/S/F8/CHIR с обработкой LSB/S/F8 (Фиг. 1f) подтвердило селективное обогащение маркеров предшественников ДА нейронов среднего мозга в группе LSB/S/F8/CHIR и указывало на идентичность предшественников гипоталамуса в культурах, обработанных LSB/S/F8, на основании дифференциальной экспрессии *RAX1, SIX3*, и *SIX6* (см. также экспрессию *POMC, OTP* на Фиг. 2d).

Примеры списков дифференциально экспрессировавшихся транскриптов на 11 день приведены в Таблицах 1, 2 и на 25 день в Таблицах 3-5, а онтологический анализ генов - на

Фиг. 8b (DAVID; http://david.abcc.ncifcrf.gov), подтверждая обогащение канонического сигнального пути WNT при обработке CHIR. Первичные данные ещё недоступны на GEO worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ accession#: [TBD]). Сравнительный временной анализ экспрессии генов маркеров предшественников ДА среднего мозга (Фиг. 1g) с маркерами пути развития передних и вентральных нейронов, не являющихся ДА (Фиг. 1h), привел к выявлению трех типов индукции: i) LSB: дорсальный задний мозг; ii) LSB/S/F8: вентральный/гипоталамический и iii) LSB/S/F8/CHIR: идентичный предшественнику DA среднего мозга.

ПРИМЕР III.

Дифференцировка ДА нейронов. Для дальнейшей дифференцировки клетки-предшественники содержали в среде для созревания нейронов (BAGCT – см. Материалы и методы). Проводили следующие виды сравнений между популяциями дифференцировавших клеток, полученных ранее известными методами и методами согласно настоящему изобретению: A) Иммуноцитохимический анализ на 50 день дифференцировки для TH в сомбинации с LMX1A, FOXA2 и NURR1, B) Подсчёт клеток TH+, FOXA2+, LMX1+, и NURR1+ среди общего количества клеток, сравнивая культуры, полученные из розеткообразных структур, с культурами, полученными из вентральных пластинок (LSB/S/F8/CHIR), C) Подсчёт процентов подтипов нейронов серотонин+ (5-HT), и GABA+ (примесь нейронов, не являющихся ДА) на 50 день в культуре, полученной из вентральных пластинок, и культуре ДА нейронов, полученных из розеткообразных структур, и D) Анализ ВЭЖХ для измерения дофамина и метаболитов: сравнение уровней ДА, DOPAC и HVA между культурой из вентральных пластинок и культурой, полученной из розеткообразных структур. К 25 дню в трёх популяциях клеток образовывались Tuj1+ нейроны (Фиг. 2a) и клетки, экспрессирующие TH, фермент, ограничивающий скорость синтеза ДА. Однако обработка LSB/S/F8/CHIR привела к образованию TH+ клеток, которые одновременно экспрессировали LMX1A и FOXA2, и у которых наблюдалась сильная индукция ядерного рецептора NURR1 (NR4A2) (Фиг. 2a,b). Сравнение экспрессии генов в культурах на 13 день и 25 день подтвердило сильную индукцию других постмитотических маркеров ДА нейронов (Фиг. 2c). Характеристика идентичности ДА нейронов на 25 день в сравнении с культурами, обработанными LSB и LSB/S/F8, подтвердило обогащение по известным транскриптам ДА нейронов среднего мозга и выявило множество новых кандидатов в маркеры (Фиг. 2d,

Таблицы 3-5, Фиг. 8b). Например, наиболее обогащённым транскриптом в LSB/S/F8/CHIR (группа DA среднего мозга) был *TTF3*, ген, который ранее не ассоциировался с развитием ДА нейронов среднего мозга, но экспрессирующийся в высокой степени в чёрном веществе человека (Фиг. 8c; Allen Brain Atlas: http://human.brain-map.org).

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

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

Было обнаружено несколько GABA- и серотонин (5-HT)-положительных ДА нейронов (Фиг. 3c)., также его метаболиты DOPAC и HVA присутствовали в культурах, полученных как по одному, так и по второму протоколу, но уровни ДА были примерно в 8 раз выше в культурах вентральных пластинок (Фиг. 3d,e). ДА нейроны среднего мозга демонстрировали сильное разрастание волокон и сильную экспрессию нейронных маркеров созревания,

включая синапсин, транспортёр дофамина (DAT), и сопряженныйс G-белком калиевый канал входящего выпрямления Kir3.2, также называемый GIRK2, экспрессирующийся в ДА нейронах компактной части чёрного тела (substantia nigra pars compacta, SNpc)) (Фиг. 3f, Фиг. 11). ДА нейроны SNpc *in vivo* проявляют электрофизиологический фенотип, отличает их от большинства других нейронов в мозге. В частности, они с небольшой частотой генерируют спонтанные пики (1-3 Гц). Более того, такая генерировать редкие пики дополняется медленным подпороговым колебательным потенциалом. После 2-3 недель *in vitro*, такие же физиологические признаки демонстрировали ДА нейроны SNpc, выращенные из ранних постнатальных мышей. ДА нейроны, дифференцированные из ЭСКч клеток устойчиво (4/4) демонстрировали этот отличительный физиологический фенотип (Фиг. 3g-i).

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

ПРИМЕР IV.

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

одной из сложных задач в данной области является возможность получения из ПСКч клеток ДА нейронов среднего мозга, которые функционально приживаются *in vivo* без риска избыточного роста нейронов или неприемлемой дифференцировки в нейроны, не являющиеся нейронами среднего мозга, или образования тератом. На основании изучения трансплантации эмбриональных тканей авторы настоящего изобретения предположили, что время окончания клеточного цикла, маркером которого является экспрессия NURR1, может быть подходящей стадией для трансплантации (приблизительно 25 день дифференцировки - Фиг. 2). Начальные эксперименты с применением клеток на 25 день на взрослых мышах без повреждений показали высокую выживаемость нейронов FOXA2+/TH+, полученных из ПСКч клеток, через 6 недель после трансплантации (Фиг. 12). Проверяли долгосрочную выживаемость клеток FOXA2+/TH+ в реципиентах с паркинсонизмом без последующего разрастания нейронов. Для этой цели с помощью 6-гидроксидофамина (6-OHDA) создавали повреждения (Tabar, и др. Nature Med. 14:379-381 (2008), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) в нокаутных по *NOD-SCID IL2Rgc* мышах, линии,

которая эффективно обеспечивает выживаемость ксенотрансплантата с особенной чувствительностью к воздействию редкими онкогенным клетками (Quintana, *и др.* Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456:593-598 (2008), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Культуры ДА нейронов, как полученных из вентральных пластинок, так и из розеткообразных структур, трансплантировали (150 x 10^3/животное) без предварительной очистки с целью выявления потенциальных загрязняющих клеток с высоким пролиферативным потенциалом. Через четыре с половиной месяца после трансплантации трансплантаты ДА нейронов, полученные из вентральных пластинок, показали хорошо сформированное ядро трансплантата, состоящее из TH+ клеток, одновременно экспрессирующих FOXA2 и специфический маркер hNCAM человека (Фиг. 4a-c). Функциональный анализ показал устранение поведения с вращением, индуцированного амфетаминами. В отличие от этого, в трансплантатах ДА нейронов, полученных из розеткообразных структур, обнаружилось только несколько TH+ нейронов, и они не вызывали значительного облегчения поведения с вращением (Фиг. 4d), а также было выявлено массивное разрастание нейронов (объём трансплантата > 20 мм^3; Фиг. 13). Обширное разрастание нейронов, полученных из розеткообразных структур, использовавшихся при трансплантации, как описано в настоящей заявке, сравнивали с предыдущими работами с трансплантатами ДА, полученными из розеткообразных структур, группы авторов настоящего изобретения (Kim, и др. miR-371-3 Expression Predicts Neural Differentiation Propensity in Human Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell 8:695-706 (2011) , цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки) и others (Hargus, *и др. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:15921-15926 (2010), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Разрастание наблюдалось, вероятно, ввиду более продолжительных периодов выживаемости (4,5 месяца в сравнении с 6 неделями), отсутствием очистки методом FACS перед трансплантацией и выбором нокаутных по *NOD-SCID IL2Rgc* реципиентов. Количество пролиферирующих Ki67+ клеток было минимальным в трансплантатах, полученных из вентральных пластинок (< 1% от общего количества клеток), в то время как трансплантаты, полученные из розеткообразных структур, содержали очаги пролиферирующих предшественников нейронов. Предположили, что разрастание нейронов было вызвано примитивными нейроэктодермальными клетками-прешественниками в трансплантате

(Elkabetz, *и др. Genes Dev.* 22:152-165 (2008); Aubry, *и др. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 105:16707-16712 (2008), цитируемый источник включен в настоящее описание посредством ссылки). Эта гипотеза подтверждалась экспрессией маркера FOXG1 переднего мозга в трансплантатах, полученных из розеткообразных структур, а не из вентральных пластинок. Небольшой процент астроглиальных клеток присутствовал как в трансплантатах, полученных из вентральных пластинок, так и в трансплантатах, полученных из розеткообразных структур, хотя большинство клеток GFAP+ не содержало маркеров человека, указывающих на происхождение реципиентов (Фиг. 13).

Результаты, полученные на нокаутных по *NOD-SCID IL2Rgc* мышах, описанные в настоящей заявке, продемонстрировали высокую продолжительную выживаемость FOXA2+/TH+ нейронов, полное обращение поведения с вращением, индуцированного амфетамином, и отсутствие каких-либо признаков разрастания нейронов. Однако некоторые из этих результатов могут быть характерны конкретно для использования нокуатных по *NOD-SCID IL2Rgc* мышей. Для проверки этой гипотезы культуры ДА нейронов, полученных из вентральных пластинок, (250 x 10^3 клеток) трансплантировали взрослым крысам с повреждениями, вызванными 6-OHDA, подвергнутых фармакологической иммуносупрессии с применением циклоспорина А. Через пять месяцев после трансплантации выживаемость трансплантата была высокой (Фиг. 4e-h) со средним значением более 15000 TH+ клеток, одновременно экспрессирующих FOXA2 (Фиг. 4g), и ядерный антиген человека (hNA) (Фиг. 4e); волокна TH+/hNCAM+ распространялись из ядра трансплантата в окружающий его стриатум реципиента (Фиг. 4f). В дополнение к FOXA2, TH+ клетки экспрессировали маркеры PITX3 и NURR1 ДА нейронов среднего мозга (Фиг. 4h-j). Исследования поведения показали полное устранение асимметрии вращения, индуцированного амфетамином, в отличие от животных с фиктивной трансплантацией, которые не показали какого-либо улучшения (Фиг. 4k). Животные, подвергнутые трансплантации, также продемонстрировали улучшения в тесте на фокальную акинезию (Фиг. 4l) с измерением акинезии передних конечностей и в тесте с цилиндром (Фиг. 4m), исследованиях, не зависящих от фармакологической стимуляции ДА системы. Позднее начало выздоровления (приблизительно 3-4 месяца после трансплантации) ожидается для ДА нейронов человека, в зависимости от скорости созревания *in vivo*, такой как уровни экспрессии DAT (Фиг. 4n). Присутствие TH+ клеток, экспрессирующих каналы Kir3.2 (GIRK2) или кальбиндин,

свидетельствовало о том, что в трансплантате присутствовали ДА нейроны, как SNpc (A9), так и вентральной тегментальной области (A10) (Фиг. 4o,p).

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

ПРИМЕР V.

Трансплантация популяции новых ДА нейронов приматам с повреждёнными нейронами.

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

Порции 50 x 10^6 трансплантируемых предшественников ДА нейронов были получены на 25 день дифференцировки с применением протокола, основанного на использовании вентральных пластинок. Классической дозой для индукции состояний, похожих на паркинсоновские, была доза 3 мг MPTP-HCL, введённая в сонную артерию (в диапазоне 0,5 - 5 мг). Затем проводили системные инъекции MPTP в концентрации 0,2 мг/кг MPTP внутривенно. Клетки вводили в три участка (задняя часть хвостатого ядра и пре-комиссуральная скорлупа) на каждой стороне мозга (в общей сложности 6 нервных пучков, 1.25 x 10^6 клеток/пучок), животных подвергали иммуносупрессии с применением циклоспорина A. На одной стороне в мозг вводил предшественники ДА из субклона H9, экспрессирующего GFP, а во вторую сторону трансплантировали клетки, полученные из немеченых клеток H9. Результаты, показывающие трансплантацию макакам-резус нейронов с продолжающейся экспрессией FOX2A и продукцией TH, приведены на Фиг. 4q-t. Через

один месяц после трансплантации наблюдалась высокая выживаемость ДА нейронов среднего мозга, согласно оценке по экспрессии GFP (Фиг. 15) и специфического для человека цитоплазматического маркера (SC-121) (Фиг. 4q). Каждое ядро трансплантата было окружено ореолом TH+ волокон, распространяющихся до 3 мм внутрь реципиента (Фиг. 4r). Ядра трансплантатов состояли из TH+ нейронов, одновременно экспрессирующих SC-121 (Фиг. 4s) и FOXA2 (Фиг. 4t). SC-121- и GFP-отрицательные области в трансплантатах содержали Iba1+ микроглию реципиента (Фиг. 15), что свидетельствовало о неполной иммуносупрессии.

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

ПРИМЕР VI.

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

В настоящем примере описано, что большие популяции ДА нейронов среднего мозга, у которых развились свойства нейронов пациентов с болезнью Паркинсона (БП), когда линия клеток таких пациентов, а именно клеток БП-иПСК, мутантных по PINK1, полученная способом, не вызывающим разрушение эмбриона, была использована в качестве популяции клеток для получения FOXA2/LIM1XA/TH+ ДА нейронов согласно настоящему изобретению.

Линию БП-иПСК Q456X, мутантную по PINK1, дифференцировали с применением нового протокола получения ДА нейронов среднего мозга на основе вентральных пластинок (способа) согласно настоящему изобретению, который приводит к профилям дифференцировки среднего мозга, сравнимым с профилями, полученных для линии иПСК H9. (Фиг. 20). A-C) Иммуноцитохимический анализ линии БП-иПСК, мутантной по PINK1, на 11 день дифференцировки (стадия предшественника среднего мозга) для FOXA2 (красный), LMX1A (зелёный) и DAPI (синий) (A), 25 день дифференцировки (ранняя постмитотическая стадия ДА нейронов) для FOXA2 (красный) и TH (зелёный) (B), и для

NURR1 (красный) и TH (зелёный) (C). D-F) Тот же набор иммуноцитохимических анализов, выполненный с применением клеток, полученных из H9 на 11 день дифференцировки для FOXA2 (красный), LMX1A (зелёный) и DAPI (синий) (D), на 25 день дифференцировки для FOXA2 (красный) и TH (зелёный) (E), и для NURR1 (красный) и TH (зелёный) (F).

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

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

В тот же день дифференцировки клетки, полученные из БП-иПСК, мутантных по PINK1, продемонстрировали сильную экспрессию фосфорилированного по Ser129 α-синуклеина в отличие от клеток, полученных из контрольных клеток iPSC, которые продемонстрировали очень низкие уровни экспрессии (Фиг. 22). Клетки, полученные из БП-иПСК, мутантных по PINK1, продемонстрировали сильную экспрессию фосфорилированного по Ser129 α-синуклеина в отличие от клеток, полученных из

контрольных клеток iPSC, которые продемонстрировали очень низкие уровни экспрессии. A, B) Иммуноцитохимический анализ фосфорилированного по Ser129 α-синуклеина (зелёный) и DAPI (синий) в клетках, полученных из БП-иПСК, мутантных по PINK1, на 55 день дифференцировки (A) и подходящих контрольных клетках, полученных из iPSC (B).

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

TH+ клеток, одновременно экспрессирующих α-синуклеин. Такие TH+ клетки экспрессируют α-синуклеин в паттерне цитозольной экспрессии. Фиг. 24A, B) Иммуноцитохимический анализ α-синуклеина (LB509, красный), TH (зелёный) линии БП-иПСК, мутантной по PINK1, на 60 день дифференцировки на основе MS5 (A) и контрольной линии иПСК (B). C) Иммуноцитохимический анализ линии БП-иПСК, мутантной по PINK1, на 55 день дифференцировки на основе вентральных пластинок в отношении α-синуклеина (красный), TH (зелёный).

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

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

обработки (H) и контрольная иПСК в нормальных условиях (I) и условиях токсической обработки (J). K-N) изображения иммуноцитохимических исследований малой мощности для Tuj1 (красный) и TH (зелёный) по протоколу на основе MS5 на 60 день дифференцировки: БП-иПСК при нормальных условиях (K) и условиях токсической обработки (L) и контрольная иПСК в нормальных условиях (M) и условиях токсической обработки (N).

Пример подсчета в тесте на выживаемость клеток в зависимости от дозы при токсической обработке. Тест на выживаемость клеток с alamar-blue после 48 часов обработки валиномицином показал различную выживаемость клеток в характерном диапазоне дозировок при токсической обработке (5 и 10 мкМ) при сравении БП-иПСК и контрольной iPSC (60 день дифференцировки на основе вентральных пластинок). Замечание: эти тесты изучают общую гибель клеток, хотя особенно заметные эффекты наблюдались на ДА нейронах (см. Фиг. 14). Поэтому, подсчёт на основе alamar blue с большой вероятностью будет преуменьшать степень различных эффектов, наблюдаемых в линиях ДА нейронов.

Документы, включённые в настоящее описание посредством ссылки: Li, *и др. Nat. Biotechnol.* 23, 215-221 (2005); Perrier, *и др. Proc Natl Acad Sci U S* 101, 12543-8 (2004); Perrier, *и др. Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12543-8 (2004); Tabar, *и др. Nature Med.* 14, 379-381 (2008); Perrier, *и др. Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12543-8 (2004); Wernig, *и др. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 5856-5861 (2008); Lindvall, *и др. J. Clin. Invest* 120, 29-40 (2010); Roy, *и др. Nature Med.* 12, 1259-1268 (2006); Elkabetz, *и др. Genes Dev.* 22, 152-165 (2008); Kittappa, *и др. PLoS. Biol.* 5, e325 (2007 ; Ferri, *и др. Development* 134, 2761-2769 (2007); Roelink, *и др. Cell* 76, 761-775 (1994); Liem, *и др. Cell* 82, 969-979 (1995); Fasano, *и др. Cell Stem Cell* 6, 336-347 (2010) ; Chambers, *и др. Nat. Biotechnol.* 27, 275-280 (2009) ; Muroyama, *и др. Genes Dev.* 16, 548-553 (2002) ; Joksimovic *и др. Nat Neurosci* 12, 125-131 (2009) ; Lyashenko, *и др. Nat. Cell Biol.* 13, 753-761 (2011) ; VanDunk, *и др. J. Neurosci.* 31, 6457-6467 (2011) ; Huang, *и др. Nat. Protoc.* 4, 44-57 (2009) ; Costa, *и др. Mol. Cell Biol.* 9, 1415-1425 (1989) ; Elkabetz, *и др. Genes Dev.* 22, 152-165 (2008) ; Soldner, *и др. Cell* 136, 964-977 (2009) ; Guzman, *и др. J. Neurosci.* 29, 11011-11019 (2009) ; Nedergaard, *и др. J. Physiol* 466, 727-747 (1993) ; Ferrari, *и др. Eur. J. Neurosci.* 24, 1885-1896 (2006) ; Olanow, *и др. Trends Neurosci.* 19, 102-109 (1996) ; Zetterström, *и др. Science* 276, 248-250 (1997) ; Quintana, *и др. Nature* 456, 593-598 (2008) ; Kim, *и др.* dicts Neural Differentiation Propensity in Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 8, 695-706

(2011) ; Hargu, *и др. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15921-15926 (2010) ; Aubry, *и др. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 105, 16707-16712 (2008); Blume, и др., *Exp. Neurol.* 219, 208-211 (2009); Ban, и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*(2011); Studer, и др., *Nature Neurosci.* 1, 290-295 (1998); Kordower, и др., *Science* 290, 767-773 (2000); Paxinos, и др., *The Rhesus Monkey Brain in Stereotaxic Coordinates*(Academic Press, 2000); Crawley, *What's Wrong With My Mouse: Behavioral Phenotyping of Transgenic u Knockout Mice*(Wiley-Liss, 2000); Studer, и др., *Brain Res. Bull.* 41, 143-150 (1996); Tabar, и др., *Nat. Biotechnol.* 23, 601-606 (2005); и Placantonakis, и др., *Stem Cells* 27, 521-532 (2009).

ПРИМЕР VII.

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

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

Были установлены характерные условия для записи *in vivo* ДА нейронов, полученных из плюрипотентных стволовых клеток человека, в тонкослойных препаратах; см. Фиг. 26. В частности, были произведены измерения в отношении трансплантированных ДА нейронов человека, полученных из плюрипотентных стволовых клеток человека, и обнаружено, что они обладают электрофизиологическими признаками, типичными для признаков, обнаруженных в части компактов чёрного тела (substantia nigra pars compacta, SNpc) мышей, Фиг. 26A, где на виде вверху показана реконструкция нейрона - создателя ритма (нейрона-ритмоводителя) в участке трансплантата. На виде снизу показана типичная фотомикрография полученного из крысы среза мозга, в который 9-тью месяцами ранее были введены нейроны, полученные из hES; трансплантат очерчен; изображение с большим увеличением приведено внизу в виде вставки. Срез был обработан тирозингидроксилазой, которая показана белым, Фиг. 26B. Далее, на виде вверху показана типичная присоединённая

накладка, производящая запись с предполагаемого в трансплантате; на виде внизу типичная запись с целой клетки той же самой клетки. Запись осуществляли в присутствии антагонистов рецепторов глютамата и GABA (50 мкМ AP5, 10 мкМ CNQX и 10 мкМ GABAzine) для того, чтобы элиминировать синаптический входной сигнал. Эти записи продемонстрировали, что указанные нейроны, полученные из PS, были нейронами-ритмоводителями с нормальными интрасоматическими траекториями напряжения. Другие нейроны, записанные в образце трансплантата, имели схожие свойства, Фиг. 26C. Для сравнения приведены записи с присоединением к клетке и записи целой клетки дофаминергических нейронов в SNpc взрослой мыши. Сокращения (CTx= кортекс, STr= стриатум, SNpc= часть компактов чёрного тела, ДА= дофаминергический). Эти данные показывают функциональные исследования *in vivo* в полосатом теле крысы с трансплантатом через месяц после трансплантации. Таким образом в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, функциональные исследования *in vivo* в тканях, подвергнутых трансплантации, демонстрируют восстановление части компактов чёрного тела (substantia nigra pars compacta, SNpc).

ПРИМЕР VIII.

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

Две основные стратегии для идентификации кандидатов в поверхностные маркеры: Беспристрастная проверка экспрессии генов в линиях генетических репортёров (Фиг. 27a), в ходе которой найдены несколько кандидатов в маркеры, включая маркер, названный DCSM1, который селективно экспрессировался в ДА нейронах среднего мозга и представляющийся в особенности маркеров ДА нейронов типа A9 (Фиг. 27b). Вторая стратегия заключается с использовании проверки поверхностных маркеров клеток CD в ДА нейронах, полученных из hESC, тестирующего 242 коммерчески доступных антитела в 96-луночном формате (Фиг. 27c,d). Результатом такой проверки (Фиг. 27e) стала идентификация по меньшей мере 5 подтверждённых маркеров, обогащённых в ДА нейронах среднего мозга, включая CD142, маркер, селективно указывает на стадию нейронов Nurr1+ DA (Фиг. 27f). При использовании клеточной процедуры ДА нейронов, описанной в настоящей заявке, CD142 обычно маркировал приблизительно 30% общей популяции клеток на 25 день

дифференцировки (Фиг. 28a). Селективность CD142 к стадии нейронов Nurr1+ DA была подтверждена в множестве независимых линий hESC и hiPSC 1 (Фиг. 28b). В дополнение к обогащению ДА нейронов, обогащение CD142-положительными клетками приводило к селективному истощению нежелательных подтипов нейронов, таких как GABA- и серотонинэргические нейроны. (Фиг. 28c-f). Исследования *in vivo* подтвердили способность популяции CD142-положительных клеток давать начало трансплантатам с высокой чистотой ДА нейронов, что позволяет преодолеть проблемы контаминации GABA- и серотонинэргическими нейронами. Хотя процедура трансплантации, в которых используются неочищенные клетки, уже привела к получению незначительного количества серотонинэргических нейронов, использование селекции клеток-предшественников на основе CD142 предполагается для дальнейшего снижения риска введения серотонинэргических нейронов, типа контаминирующих клеток, которое имело следствием неудачную трансплантацию в человека тканей эмбриона как потенциальный источник нежелательных дискинезий, индуцированных трансплантацию в человека тканей эмбриона.

ПРИМЕР IX.

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

В частности, в настоящем Примере показаны встроенные в hESCs гены PST для усиления экспрессии PSA в ДА нейронах. Ген, кодирующий полисиалилтрансферазу человека (hPST), ввели в линию hESC line (WA01) с применением лентивирусного вектора (pLenty, Invitrogen). Двадцать отобранных клонов подрастили и проанализировали на предмет экспрессии PST. Клоны hESC, экспрессирующие PST, дифференцировали для того, чтобы убедиться , что экспрессия PST не подавлена в ДА нейронах. Подсчёт PSA-NCAM на различных стадия дифференцировки (дни 0, 11, 25 и 50) был произведён с применением анализа FACS и иммунофлюоресценции (Operetta). Положительным клонам было необходимо соответствовать параметрам QC ДА нейронов, приведённым в Таблице 7. По меньшей мере 3 клона, которые сохраняли высокие, неизменные уровни PSA-NCAM в ходе дифференцировки и хорошо соответствовали параметрам QC (Таблица 7), будут способствовать установлению разрастания аксонов в ДА нейронах, экспрессирующих PST и

полученных из hESC. Подобранный контроль и экспрессирующие PST клоны hESC дифференцировали в ДА нейроны с применением стандартного протокола, описанного в настоящей заявке, с последующей фиксацией клеток и анализом на 25 и 50 дни. Количество и длину TH-положительных волокон в этих культурах оценивали с помощью высоко контрастного микроскопа Operetta. Модуль анализа аксонов в программном обеспечении Harmony 3.0 подсчитывал количество аксонов и длину, с PST или без него, а данные были статистически проанализированы с применением двухфакторного анализа ANOVA. Клоны, экспрессирующие PST, и контрольные клоны hESC, которые были выбраны на основании исследований *in vitro*, описанных выше, снова дифференцировали в ДА нейроны и трансплантировали в модельных крыс с заболеванием Паркинсона. Были сделаны краткосрочные трансплантаты (4-6 недель) для определения выживаемости, экспрессии PSA-NCAM и разрастания аксонов. Каждый клон, который удовлетворял краткосрочным параметрам *in vivo*, подвергали долгосрочным исследованиям в трансплантате. В этих исследованиях животные получали половину или четверть стандартной (200 x 10^3) дозировки клеток. Эти исследования были направлены на выяснение, приводит ли повышенный PSA к повышению долгосрочной выживаемости после трансплантации (5 месяцев), и способно ли меньшее количество ДА нейронов конкурировать или превосходить функциональную способность трансплантатов без PST, трансплантированных в стандартной дозировке клеток (Фиг. 27).

В дополнение, комплексный тест поведения, чувствительный к стриарной реиннервации, был проведён для того, чтобы далее охарактеризовать функциональный потенциал трансплантатов ДА нейронов с PST в сравнении с контрольными. Животных умерщвляли после завершения тестов поведения, и разрастание волокон обсчитывали с применением специфических антител NCAM и SC121 человека и антител против TH (см. также Фиг. 29). Интенсивность и распространение трансплантата hNCAM+, SC121+ и TH+ были измерены, также как процент клеток человека одновременно экспрессирующих маркеры ДА нейронов (TH, FOXA2) и PSA. Плотности NCAM/TH+ гало аксонов, распространяющихся из трансплантата, были посчитаны на различных расстояниях. Данные между группами сравнивали с применением двухфакторного анализа ANOVA в post-hoc тесте Бонферрони. В дополнение, изучали качественные изменения срезов (например, разветвление, толщина, распределение трансплантата и форма). В дополнение, некоторые

трансплантаты подвергали электрофизиологической оценке тонкого слоя с точки зрения фенотипа A9, образования синапсов с полосатым телом реципиента, а также иннервации эндогенными афферентными нервами.

ПРИМЕР X.

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

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

Другие исследования гемипаркинсоновских мышей с повреждениями, вызванными 6OHDA, показали, что требуется трансплантация приблизительно 100,000 предшественников ДА нейронов, полученных из ES, для получения сильного функционального восстановления, измеряемого в тесте на вращение, индуцированное амфетамином. В настоящих исследованиях, стремились трансплантировать суб-оптимальное количество клеток для того, чтобы достичь прироста путём усиления экспрессии PSA. Для того, чтобы трансплантировать популяции, сильно обогащённые ДА нейронами, в которых уменьшено количество контаминирующих плюрипотентных клеток, культуры, очищенные на FACS, на 14 день дифференцировки проверяли на на экспрессию GFP под контролем Nurr и на отсутствие экспрессии SSEA-1 (Фиг. 31). Без суперэкспрессии PST снижение минимально эффективного размера трансплантата вполовину (55,000 клеток Nurr1+ DA) не приводило к

детектируемому восстановлению поведения. В противоположность этому, при усилении экспрессии PSA такое же количество Nurr1/PST ДА нейронов приводило к существенной коррекции ухудшения поведения при болезни Паркинсона ($p < 0,01$; двухфакторный анализ ANOVA) с полным восстановлением примерно через 5 недель после хирургического вмешательства (Фиг. 32A). Удаление PSA перед трансплантацией посредством индукции endoN показывало специфичность увеличения количества PSA, поскольку обработка endoN частично инвертировала функциональное восстановление, полученное с помощью Nurr1/PST (Фиг. 32A).

Для проверки характеристик трансплантированных клеток животных подвергали иммуногистохимическим исследованиям через два месяца после трансплантации. Было обнаружено различие в количестве выживших Nurr1+ нейронов, поскольку животные, в которых трансплантировали PST-трансдуцированные линии, имели в среднем вдвое больше GFP+ клеток, чем животные, в которых трансплантировали контрольные клетки (9,300 +/- 1,400 против 4,230 +/- 1010 GFP+ клеток в трансплантате в образцах PST в сравнении с контрольными образцами, соответственно; Фиг. 32B, $p < 0,05$, t-тест Стьюдента). Более того, трансплантаты Nurr1/PST gтакже продемонстрировали более высокие уровни экспрессии PSA *in vivo* (Фиг. 32C,D). Однако, пропорции клеток, экспрессирующих маркеры ДА нейронов среднего мозга TH и FoxA2 в ядре трансплантата, были сравнимыми для клеток Nurr1 и Nurr1/PST (TH: 62.0% +/- 8.0 против 51.3%+/- 7.0 $p = 0,33$; FoxA2: 63.2% +/- 8.6 vs. 55.4% +/- 2.0, $p = 0,3$, соответственно; Фиг. 32E).

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

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

Эти открытия продемонстрировали, что по меньшей мере некоторые из результатов действия PSA на функционирование трансплантата являются результатом улучшенной иннервации полосатого тела волокнами. Соответственно, наблюдалась сильная корреляция между функционированием трансплантата и относительной степенью разрастания GFP-положительных волокон, например в зоне IV (Фиг. 33F; $p < 0,001$, $r2 = 0,65$, $n = 17$). Неожиданно оказалось, что соотношение разрастание волокон/поведение было постоянным для экспериментальных групп (контрольные, с увеличенным содержанием PSA, и обработанные с помощью endoN), указывая на то, что иннервация трансплантат-реципиент был параметром, определяющим восстановление поведения в модели с паркинсоновскими мышами. Несколько факторов вносили механический вклад в усиленное разрастание волокон, таких как улучшенная проницаемость реактивной глии, окружающей ядро трансплантата, улучшенная способность к прорастанию, усиленное разрастание в окружающие ткани реципиента (например, коническая транслокация более лёгкого роста), и предохранение от преждевременных связей с тканями реципиента в непосредственной близости от ядра трансплантата. Характерные механизмы соотносятся с ролью PSA в процессах содействия разрастанию в ходе нормального развития и в зрелой нервной системе.

Эксперименты, описанные в настоящей заявке, продемонстрировали использование генно-инженерного PSA в трансплантации ДА нейронов прививки, которое обеспечило превосходные результаты по сравнению с трансплантатами из других типов клеток. Данные чётко показали, что увеличение количества PSA обеспечило значительное увеличение способности трансплантированных ДА нейронов обеспечивать иннервацию полосатого тела трансплантата и ослаблять функциональный дефицит при болезни Паркинсона. Поэтому

предполагается перевод метода в клиническое использование, включающее использование ДА нейронов согласно настоящему изобретению, для обеспечения клеток перед трансплантацией. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, над клетками будут проведены генетические манипуляции для экспрессии PSA. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения PST может быть доставлен в непосредственно клетки посредством обработки очищенным ферментом и субстратом, *in vitro*, перед трансплантацией. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предполагается использование стратегии PSA для трансплантации у человека в случае трансплантации при болезни Паркинсона для минимизации необходимости множественных инъекций и, вследствие этого, снижения рисков от хирургических вмешательств, обусловленных такими множественными инъекциями.

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

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

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

Инъекция 6OHDA и тест с введением амфетамина: Животных подвергали анестезии пентобарбиталом натрия (10 мг/кг) и в правое стриатум вводили 2 мкл 6OHDA (4 мкг/мкл солевом растворе, 0,5% аскорбиновой кислоты). Инъекции осуществляли шприцом Hamilton в координаты: 0,5 мм сзади, 1,8 мм вбок по отношению к брегме и 2,5 мм внутрь по отношению к поверхности мозга. Перед хирургическим вмешательством животные получали одну внутрибрюшинную инъекцию дезипрамина (25 мг/кг, Sigma). Через две недели после хирургического вмешательства животных оценивали в тесте на вращение, индуцированное

амфетамином. Их помещали в прозрачные пластиковые цилиндры диаметром 30 см на полчаса, после чего они получали одну внутрибрюшинную инъекцию амфетамина (10 мг/кг, Sigma). Через 20 мин подсчитывали количество ипсилатеральных/контралатеральных вращений в течение следующих 20 мин. Животных оценивали еженедельно в течение семи недель, затем подвергали глубокой анестезии и осуществляли перфузию через сердце PBS и 4 % параформальдегида в 0,1 М фосфатном буфере (PB, pH 7.4). Мозги извлекали и дополнительно фиксировали в течение ночи при 4ºC в 4 % параформальдегиде, затем с применением вибратома (Pelco-101, Ted Pella) получали срезы толщиной 40 мкм саггитальных сечений.

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

Клетки собирали на 14-15 день с обработкой Accutase® в течение 45 мин, один раз промывали средой N2 и инкубировали с антителом против SSEA-1, конъюгированным с AlexaFluor-647 (BD Pharmingen) в течение 25 мин. Клетки один раз промывали средой N2, ресуспендировали в буфере HEPES с 0,1 % BSA. Для оценки выживаемости добавляли DAPI. Осуществляли FACS с применением сортировщика клеток MoFlo и интересующую популяцию сортировали по флюоресценции GFP (Nurr1). Популяции с позитивным сигналом

от AlexaFluor-647 (SSEA-1) отбраковывали. В качестве контроля без GFP использовали необработанные клетки ES мышей J1 на той же стадии дифференцировки.

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

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

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

Анализ мРНК PST и PSA-NCAM *in vitro*: Для анализа вестерн-блот клетки обрабатывали буфером WB (PBS с 1% NP40, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, и 1x ингибиторы протеаз/фосфатаз, добавленные непосредственно перед экстракцией, при pH 7,4) и ультразвуком дважды в течение 5 сек, центрифугировали и ресуспендировали в буфере Лэмли (LB). Аликвоты без LB сохраняли для определения белков. Равные количества белков загружали в полиакриламидный гель для электрофореза с 6 % додецилсульфатом натрия (BioRad). Белки переносили электрофорезом на мембраны из поливинилидена (Millipore). мембраны блокировали в течение 1- 6 часов в 0,1 % Тритон X-100 TBS (TBS-T) с 5 % обезжиренным сухим молоком и инкубировали в течение ночи с антителами против NCAM

(1:10,000, Santa Cruz) в TBS-T с 5% молоком. Затем мембраны инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой (1:10,000, Jackson) и детектировали с применением метода детекции ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Уровни белков подсчитывали с применением программного обеспечения ImageJ.

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

Иммуногистологические и стереологические процедуры: Свободно плавающие корональные срезы блокировали 0,1 % Тритон X-100, 5 % сывороткой осла в PBS в течение 30 минут при комнатной температуре и инкубировали 48 часов при 4 °C с различными антителами: антитела кролика против GFP (1:300), антитела цыплят против GFP (1:200, Chemicon), антитела мыши против TH (1:200), IgM мыши против PSA (1:1000), антитела мыши против NeuN (1:400), антитела козы против FoxA2 (1:300), антитела кролика против Girk2 (1:300, Alomone Labs), антитела мыши против синапсина (1:200, BD Transduction Laboratories). Затем срезы промывали и инкубировали с вторичными антителами: антителами осла, конъюгированными с Cy2, Cy3 и Cy5 (1:400, Jackson). Для PSA использовали антитела осла против IgM, конъюгированные с Cy5 (1:500 Jackson). Осуществляли инкубирование в течение 2 часов при комнатной температуре. Среды дважды промывали с помощью PBS и устанавливали в Mowiol (Calbiochem). Каждый из трёх корональных срезов мозга анализировали для каждого окрашивания антителами.

Цифровые изображения получали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 с тремя лазерами (Argon 488, HeNe 543 и HeNe 633) с с-апохроматическим 40 x объективом (водноиммерсионный). Количество клеток GFP+ и TH+ подсчитывали в каждом третьем срезе, охватив весь мозг через 40x объектив, и оценивали

общее количество клеток в трансплантате. Дважды меченые клетки анализировали в одной оптической плоскости вдоль всей оси z.

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

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

ПРИМЕР XI.

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

Несмотря на эффективность, трансфекция гена PST вынуждала произвести модификации hESCs с ограниченным контролем в ходе полисиалилирования. В настоящем примере описано обнаружение того, что внешний PSTnm индуцировал PSA, вместо доставки гена, (см., Фиг. 35). На Фиг. 35A, шванновские клетки (SC), обработанные PST, (зелёная линия - средняя линия) обладали повышенным временем адгезии, в то время как PSA, полученный из PSTnm, ингибировал адгезию. В частности, (A) PSA, полученный из PSTnm, ингибирует адгезию шванновских клеток в суспензии в монослой шванновских клеток даже более эффективно (красная линия -самая нижняя линия), чем PSA, полученный в ходе усиленной экспрессии PST ((зелёная линия - средняя линия). (B) Иммуноблоттинг PSA в мотонейронах HB9, полученных из ESC, демонстрирует, что контрольные образцы,

обработанные только PSTnm, имели недетектируемые уровни PSA. Инкубирование с PSTnm + субстрат CMP-сиаловая кислота приводит к получению большой полосы PSA, которая исчезает при обработке endoN. (C, D) Аналогично эффектам, полученным с геном PST, полисиалилирование этих клеток посредством PSTnm и субстрата в ходе дифференцировки усиливает разрастание аксонов и миграцию клеток (острия стрелок). (E) Иммуноокрашивание PSA на 30 день ДА нейронов, полученных из hESC. (F) Это окрашивание существенно усиливается после обработки PSTnm и субстратом. (G) Инъекция *in vivo* только PSTnm не имело эффекта, хотя его одновременное введение с субстратом (H) приводило к большому уровню экспрессии PSAв полосатом теле мышей.

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

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

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящем описании выше включены в настоящее описание посредством ссылки. Различные модификации и варианты описанных способов и систем настоящего изобретения будут очевидны специалисту в данной области техники,

которые не выходят за рамки настоящего изобретения и не изменяют его сущность. Хотя настоящее изобретение описано в связи с конкретными предпочтительными вариантами его осуществления, следует понимать, что заявленное настоящее изобретение не следует неоправданно ограничивать этими конкретными вариантами его осуществления.

Действительно, различные модификации описанных методов для осуществления настоящего изобретения, которые очевидны специалисту в области клеточной биологии, нейробиологии, биологии клеток рака, молекулярной биологии, биохимии, химии, органического синтеза, или смежных областях, входят в объём следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Первая популяция *in vitro* дифференцированных дофаминовых нейронов среднего мозга, полученная из второй популяции клеток, содержащей клетки, экспрессирующие и белок forkhead box A2 (FOXA2), и LIM-гомеобоксный фактор транскрипции 1-альфа (LMX1A), причем вторая популяция клеток получена способом, включающим: осуществление контакта плюрипотентных стволовых клеток с по меньшей мере одним ингибитором сигнализации SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic) и осуществление контакта клеток с по меньшей мере одним активатором сигнализации белка Sonic hedgehog (SHH) и по меньшей мере одним активатором сигнализации белка wingless (Wnt), причем клетки приводят в контакт с указанным по меньшей мере одним активатором сигнализации Wnt в дни с третьего (3го) по одиннадцатый (11й) после первичного контакта клеток с по меньшей мере одним ингибитором сигнализации SMAD.

2. Популяция клеток по п. 1, в которой клетки, экспрессирующие FOXA2 и LMX1A представляют собой предшественники вентральной пластинки среднего мозга.

3. Популяция клеток по п. 1 или 2, характеризующаяся тем, что вторая популяция клеток содержит по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50% или по меньшей мере 70% клеток, экспрессирующих FOXA2 и LMX1A.

4. Популяция клеток по любому из пп. 1-3, в которой более 40% первой популяции клеток экспрессирует тирозингидроксилазу (TH).

5. Популяция клеток по любому из пп. 1-3, в которой дофаминовые нейроны среднего мозга экспрессируют по меньшей мере один маркер, выбранный из группы, состоящей из FOXA2, LIM -гомеобоксного фактора транскрипции 1, дофамина, 3,4-дигидрокси-фенилуксусной кислоты (DOPAC), гомованилиновой кислоты (HVA), тирозингидроксилазы (TH), белка 1, белка, связанного с ядерным рецептором 1 (NURR1), нейрон-специфичного бета-тубулина класса III (Tuj1), фактора 3 семейства Trefoil (TTF3), гомеобоксного белка 3, содержащего домен, подобный спаренному (PITX3), комплекса achaete-scute (ASCL), раннего фактора 1 B-клеток (EBF-1), раннего фактора 3 B-клеток

(EBF-3), транстиретина (TTR), синапсина, дофаминового транспортера (DAT), сопряженного с G-белком калиевого канала внутреннего выпрямления (Kir3.2/GIRK2), CD142, DCSM1, CD63 и CD99.

6. Популяция клеток по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один ингибитор сигнализации SMAD выбран из группы, состоящей из LDN-193189, SB431542, Noggin, дорсоморфина и их комбинаций.

7. Популяция клеток по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один ингибитор сигнализации SMAD содержит по меньшей мере один ингибитор сигнализации TGFβ/активин-Нодаль и по меньшей мере один ингибитор фактора сигнализации белка морфогенеза костей (BMP).

8. Популяция клеток по любому из пп. 1-7, характеризующаяся тем, что указанный по меньшей мере один ингибитор сигнализации TGFβ/активин-Нодаль содержит 4-[4-(1,3-бензодиоксол -5-ил)-5-(2- пиридинил)-1H-имидазол-2-ил] бензамид (SB431542).

9. Популяция клеток по п. 7, характеризующаяся тем, что по меньшей мере указанный по меньшей мере один ингибитор сигнализации BMP содержит LDN-193189.

10. Популяция клеток по любому из пп. 1-9, характеризующаяся тем, что указанный по меньшей мере активатор сигнализации SHH выбран из группы, состоящей из белков SHH, агонистов белка Smoothened (SAG) и их комбинаций.

11. Популяция клеток по п. 10, характеризующаяся тем, что белок SHH содержит рекомбинантный SHH.

12. Популяция клеток по п. 11, характеризующаяся тем, что рекомбинантный SHH содержит SHH C25II.

13. Популяция клеток по п. 10, характеризующаяся тем, что SAG содержит пурморфамин.

14. Популяция клеток по любому из пп. 1-13, характеризующаяся тем, что указанный по меньшей мере активатор сигнализации Wnt представляет собой ингибитор сигнализации киназы гликогенсинтазы 3β (GSK3β), который активирует сигнализацию wingless (Wnt).

15. Популяция клеток по любому из пп. 1-14, характеризующаяся тем, что по меньшей мере один активатор сигнализации Wnt выбран из группы, состоящей из CHIR99021, Wnt3A, Wnt1 и комбинаций двух или более из вышеперечисленного.

16. Популяция клеток по любому из пп. 1-15, характеризующаяся тем, что указанный по меньшей мере один активатор сигнализации Wnt содержит CHIR99021.

17. Популяция клеток по любому из пп. 1-16, характеризующаяся тем, что вторая популяция клеток содержит менее 10% клеток, экспрессирующих по меньшей мере один маркер, выбранный из группы, состоящей из PAX6, EMX2 и LHX2.

18. Популяция клеток по любому из пп. 1-17, характеризующаяся тем, что вторая популяция клеток содержит менее 10% клеток, экспрессирующих PAX6.

19. Популяция клеток по любому из пп. 1-18, характеризующаяся тем, что плюрипотентные стволовые клетки дифференцируются в клетки, экспрессирующие FOXA2 и LMX1A, в течение 11 дней после первичного контакта клеток с по меньшей мере одним ингибитором сигнализации SMAD.

20. Популяция клеток по любому из пп. 1-19, характеризующаяся тем, что первичный контакт клеток с по меньшей мере одним активатором сигнализации SHH осуществляют между 24 часами и 36 часами от первичного контакта клеток с по меньшей мере одним ингибитором сигнализации SMAD.

21. Популяция клеток по любому из пп. 1-20, характеризующаяся тем, что контакт клеток с по меньшей мере одним активатором сигнализации SHH составляет до 144 часов.

22. Популяция клеток по любому из пп. 1-21, характеризующаяся тем, что первичный контакт клеток с по меньшей мере одним активатором сигнализации Wnt осуществляют через от 24 до 36 часов от первичного контакта клеток с по меньшей мере одним активатором сигнализации SHH.

23. Популяция клеток по любому из пп. 1-22, характеризующаяся тем, что способ дополнительно включает приведение клеток в контакт с по меньшей мере одним активаторам сигнализации семейства фактора роста фибробластов (FGF).

24. Популяция клеток по п. 23, характеризующаяся тем, что указанный по меньшей мере один активатор сигнализации семейства FGF содержит FGF8.

25. Популяция клеток по п. 23 или 24, характеризующаяся тем, что первичный контакт клеток с по меньшей мере одним активатором семейства FGF осуществляют через от 24 часов до 36 часов от первичного контакта клеток с по меньшей мере одним ингибитором сигнализации SMAD.

26. Популяция клеток по любому из пп. 23-25, характеризующаяся тем, что контакт клеток с по меньшей мере одним активатором сигнализации семейства FGF составляет до 144 часов.

27. Популяция клеток по любому из пп. 23-26, характеризующаяся тем, что плюрипотентные стволовые клетки выбраны из группы, состоящей из эмбриональных стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) модифицированных стволовых клеток.

28. Композиция, содержащая популяцию клеток по любому из пп. 1-27.

29. Композиция по п. 28, характеризующаяся тем, что композиция содержит по меньшей мере 1×10^9 клеток.

30. Популяция клеток по любому из пп. 1-27 для применения в лечении по меньшей мере одного симптома у субъекта с неврологическим расстройством, характеризующимся снижением функции дофаминовых нейронов.

31. Популяция клеток для применения по п. 30, характеризующаяся тем, что неврологические расстройство представляет собой болезнь Паркинсона или Паркинсон-плюс синдром.

32. Популяция клеток для применения по п. 31, характеризующаяся тем, что симптом неврологического расстройства выбран из группы, состоящей из тремора, брадикинезии, сутулой позы, постуральной неустойчивости, ригидности, дисфагии и деменции.

33. Популяция клеток по любому из пп. 1-27 для применения в *in vivo* приживлении.

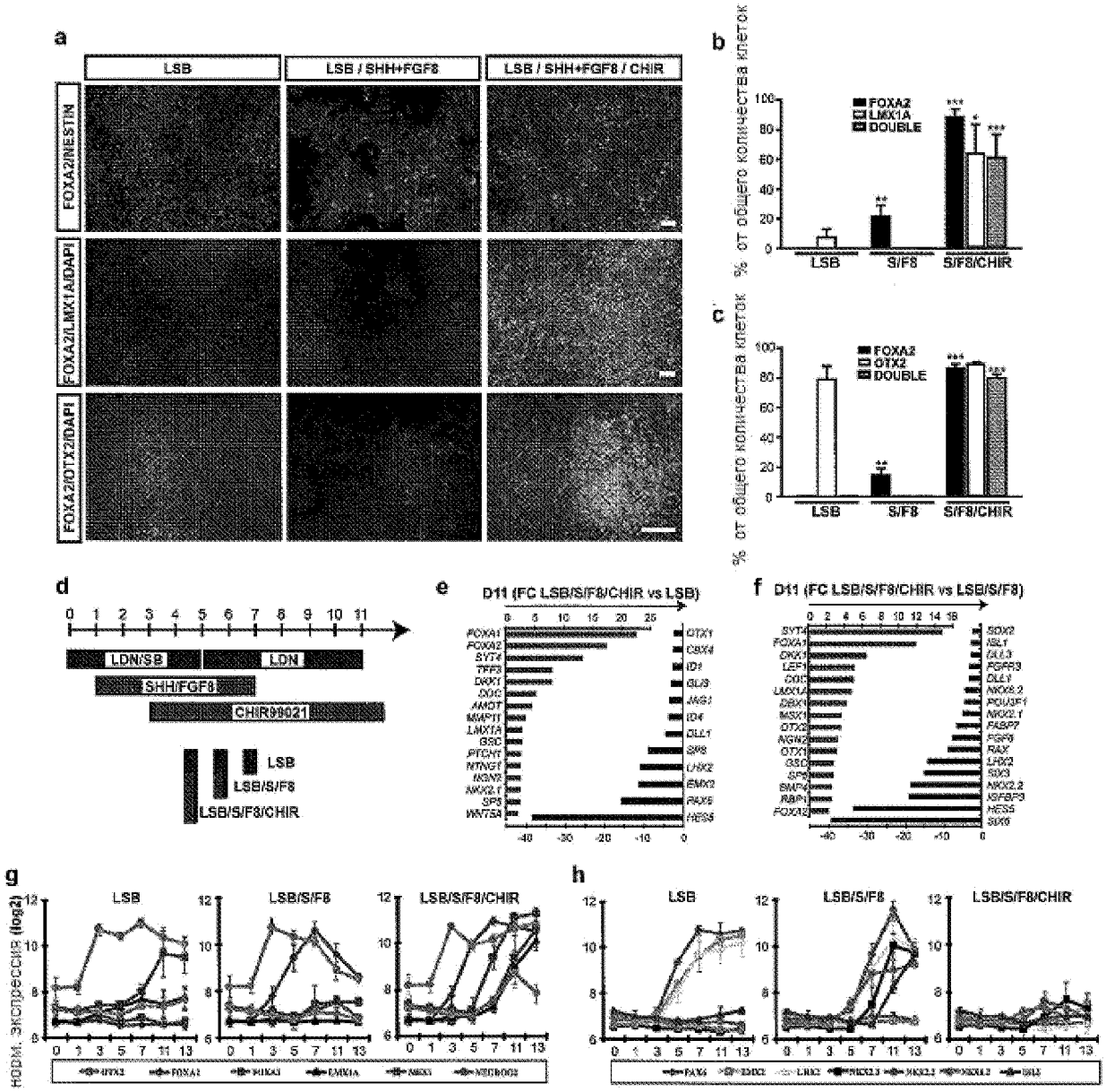
34. Популяция клеток для применения по п. 33, характеризующаяся тем, что *in vivo* приживление выполняют для нейрональной функции.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток по любому из пп. 1-27, для применения в лечении по меньшей мере одного симптома у субъекта с неврологическим расстройством, характеризующимся снижением функции дофаминовых нейронов, причем неврологические расстройство представляет собой болезнь Паркинсона или Паркинсон-плюс синдром.

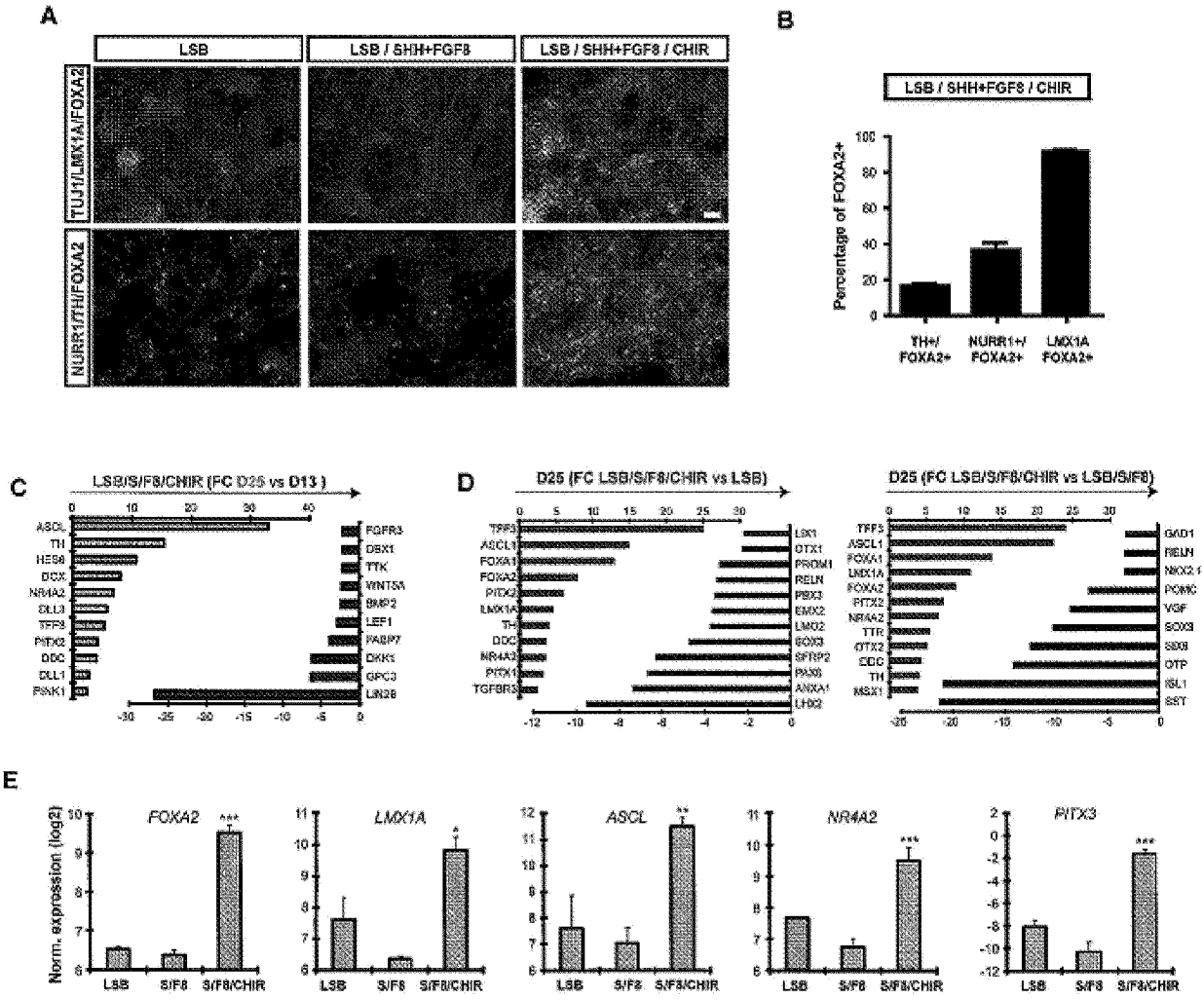
36. Фармацевтическая композиция для применения по п. 35, характеризующаяся тем, что симптом неврологического расстройства выбран из группы, состоящей из тремора, брадикинезии, сутулой позы, постуральной неустойчивости, ригидности, дисфагии и деменции.

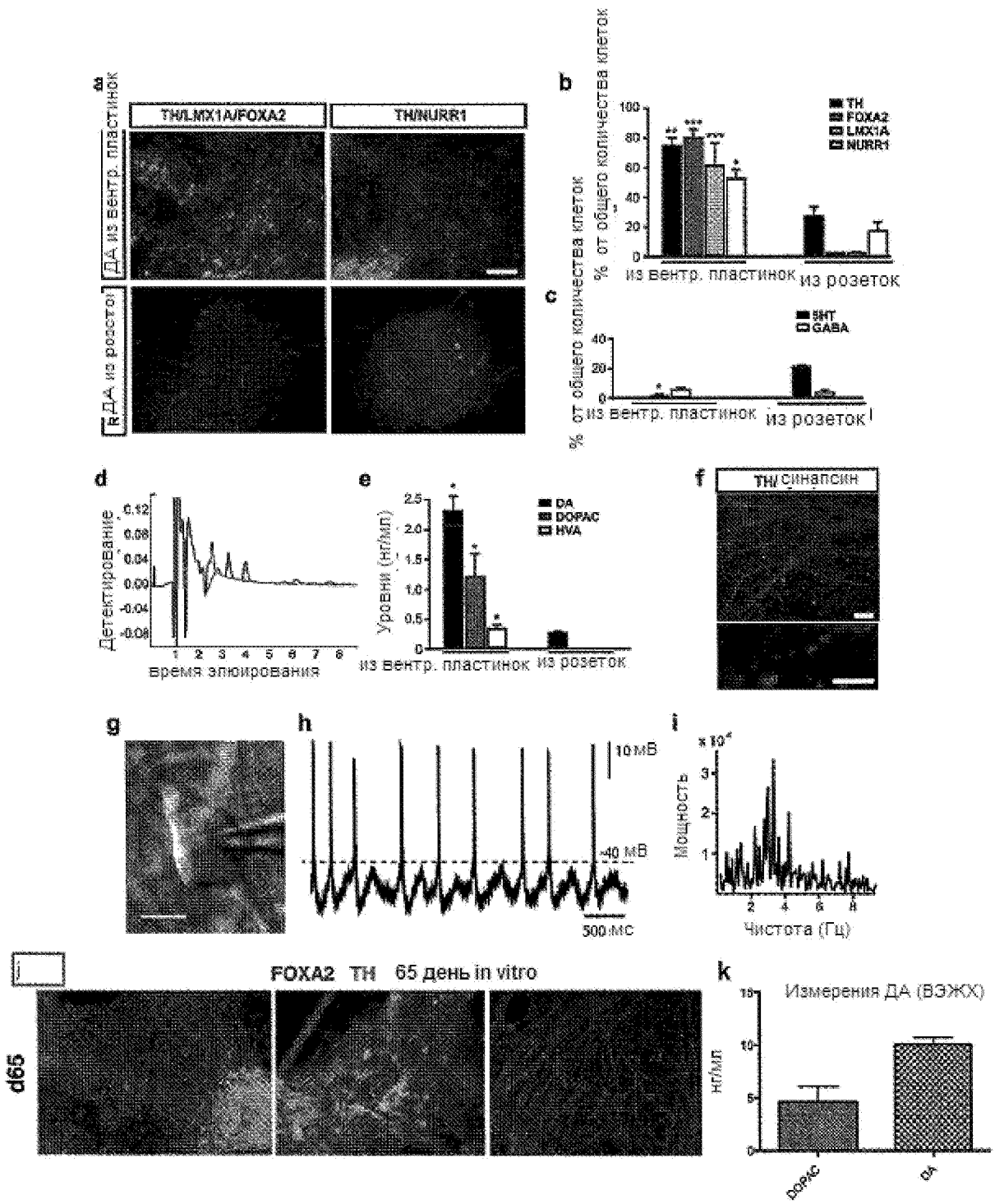
37. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток по любому из пп. 1-27 для применения в *in vivo* приживлении.

38. Фармацевтическая композиция для применения по п. 37, характеризующаяся тем, что *in vivo* приживление выполняют для восстановления нейрональной функции.



DOUBLE = «двойной»

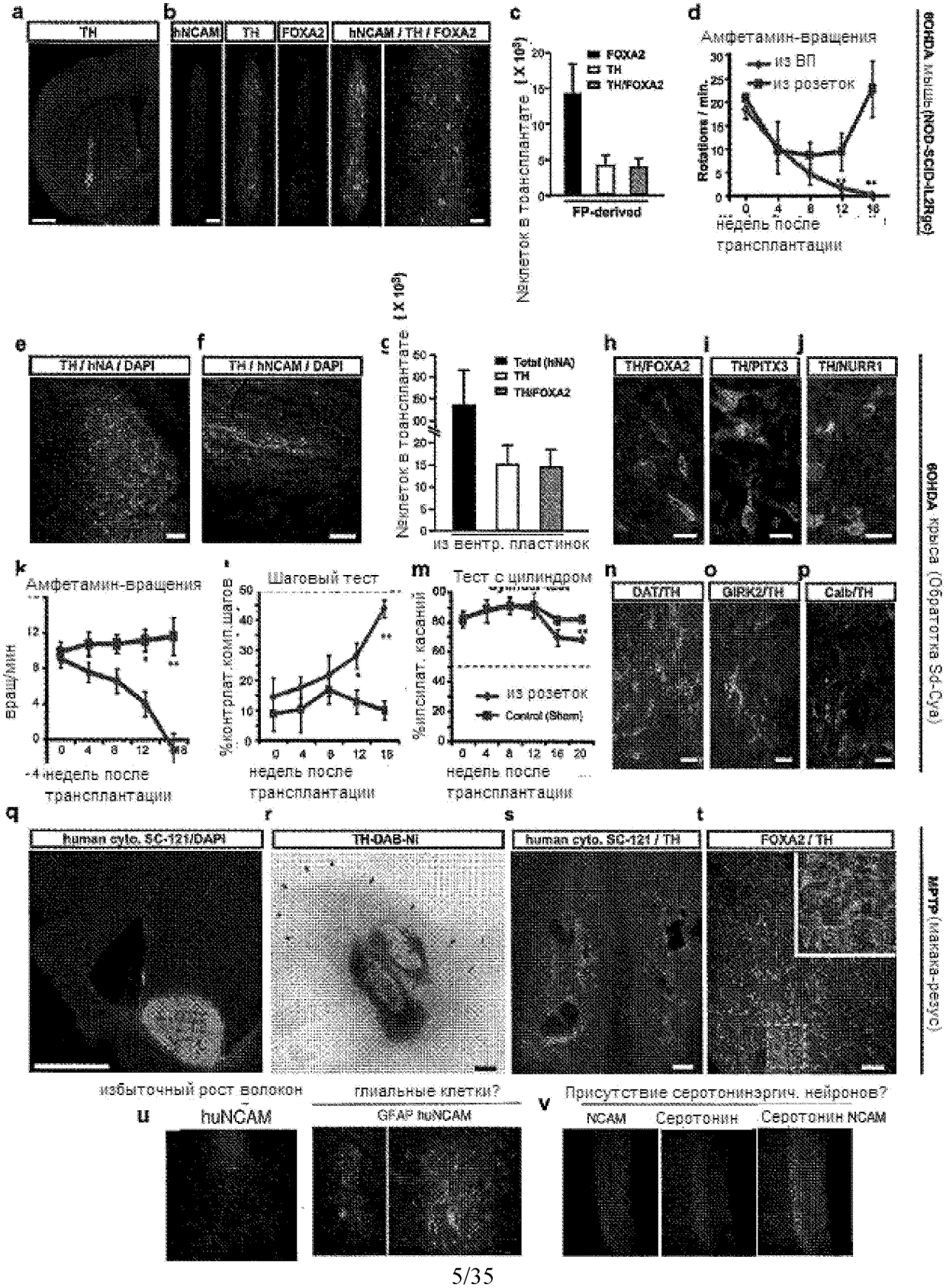

A
LSB
LSB / SHH+FGF8
LSB / SHH+FGF8 / CHIR
TUJ1/LMX1A/FOXA2
NURR1/TH/FOXA2
B
LSB / SHH+FGF8 / CHIR
Percentage of FOXA2+
TH+/ FOXA2+
NURR1+/ FOXA2+
LMX1A FOXA2+
C
LSB/S/F8/CHIR (FC D25 vs D13)
ASCL
TH
HES5
DCX
NR4A2
DLL3
TFF3
PITX2
DDC
DLL1
PSNK1
FGFR3
DBX1
TTK
WNT5A
BMP2
LEF1
FABP7
DKK1
GPC3
LIN28
D
D25 (FC LSB/S/F8/CHIR vs LSB)
TFF3
ASCL1
FOXA1
FOXA2
PITX2
LMX1A
TH
DDC
NR4A2
PITX1
TGFBR3
LSX1
OTX1
PROM1
RELN
PBX3
EMX2
LMO2
SOX3
SFRP2
PAX6
ANXA1
LHX2
D25 (FC LSB/S/F8/CHIR vs LSB/S/F8)
TFF3
ASCL1
FOXA1
LMX1A
FOXA2
PITX2
NR4A2
TTR
OTX2
DDC
TH
MSX1
GAD1
RELN
NKX2.1
POMC
VGF
SOX3
SIX3
OTP
ISL1
SST
E
Norm. expression (log2)
FOXA2
LMX1A
ASCL
NR4A2
PITX3
LSB
S/F8
S/F8/CHIR

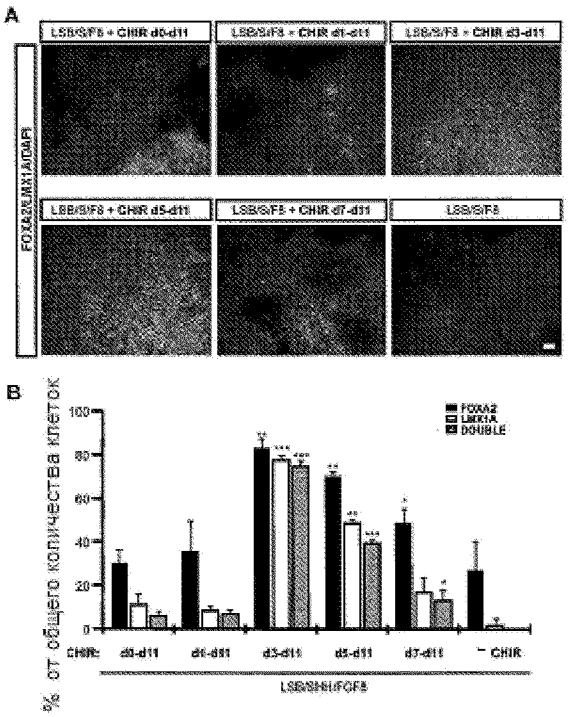

a
TH/LMX1A/FOXA2
TH/NURR1
ДА из вентр. пластинок
ДА из розеток
b
% от общего количества клеток
TH
FOXA2
LMX1A
NURR1
из вентр. пластинок
из розеток
c
5HT
GABA
% от общего количества клеток
из вентр. пластинок
из розеток
d
Детектирование
время элюирования
e
DA
DOPAC
HVA
Уровни (нг/мл)
из вентр. пластинок
из розеток
f
TH/ синапсин
g
h
10 мВ
-40 мВ
500 мс
i
Мощность
Частота (Гц)
j
FOXA2 TH 65 день in vitro
d65
k
Измерения ДА (ВЭЖХ)
нг/мл
DOPAC
DA

DA=ДА

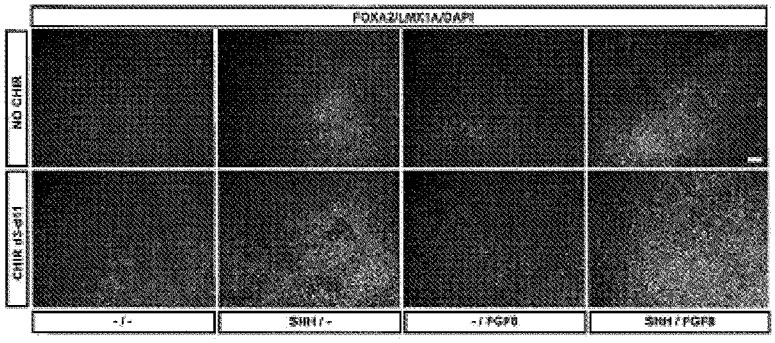
Фигура 2-3

11 ДЕНЬ
а (ВП среднего мозга)
25 ДЕНЬ
ДА-предшественники среднего мозга
30 ДЕНЬ
(ДА нейроны среднего мозга)
FOXA2/LMX1A/DAPI
TUJ1/LMX1A/FOXA2
TH/LMX1A/FOXA2

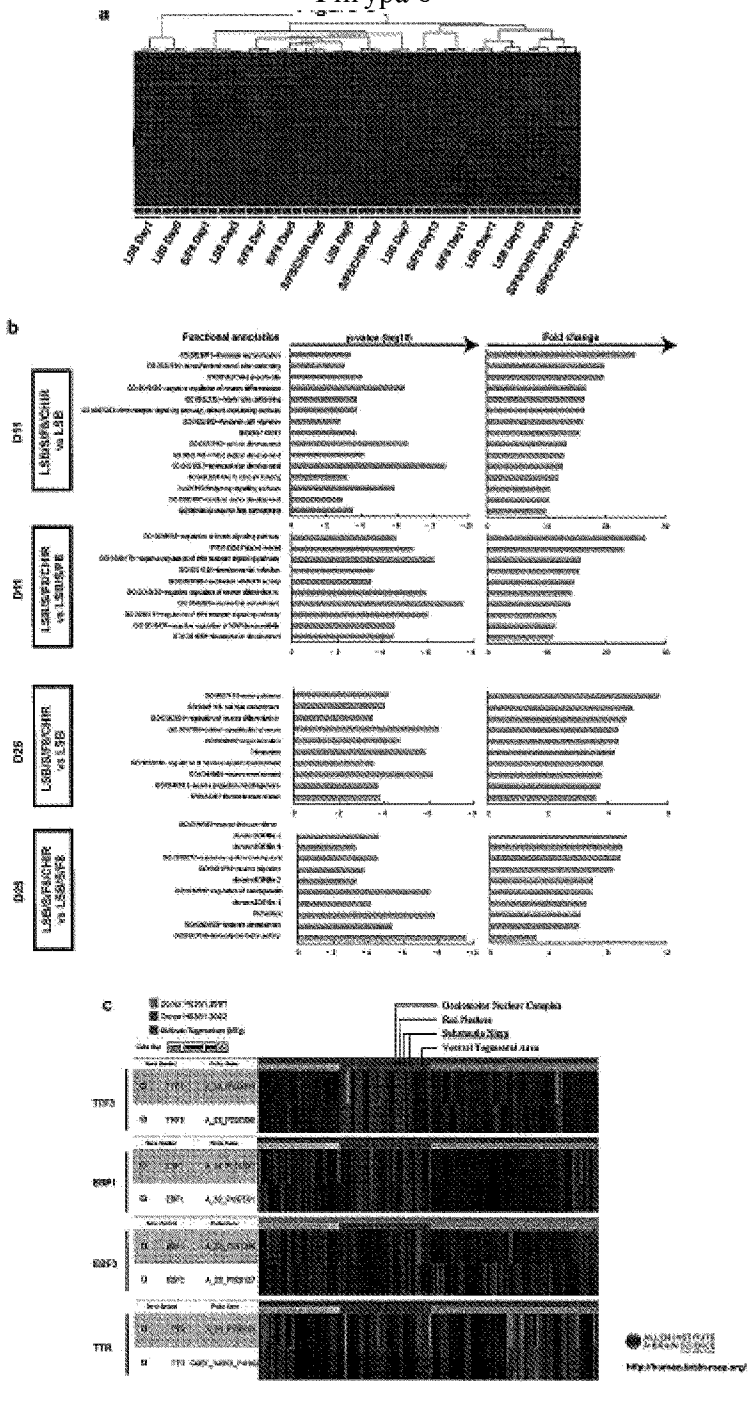

6OHDA мышь (NOD-SCID-IL2Rgc)
6OHDA крыса (Обработка Sd-Cya)
MPTP (макака-резус)
a
TH
b
hNCAM
TH
FOXA2
hNCAM / TH / FOXA2
c
№клеток в трансплантате (X 10³)
FOXA2
TH
TH/FOXA2
FP-derived
d
Амфетамин-вращения
из ВП
из розеток
Rotations / min.
недель после трансплантации
e
TH / hNA / DAPI
f
TH / hNCAM / DAPI
g
№клеток в трансплантате (X 10³)
Total (hNA)
TH
TH/FOXA2
из вентр. пластинок
h
TH/FOXA2
i
TH/PITX3
j
TH/NURR1
k
Амфетамин-вращения
вращ/мин
недель после трансплантации
l
Шаговый тест
%контрлат.комп.шагов
недель после трансплантации
m
Тест с цилиндром
%ипсилат. касаний
из розеток
Control (Sham)
недель после трансплантации
n
DAT/TH
o
GIRK2/TH
p
Calb/TH
q
human cyto. SC-121/DAPI
r
TH-DAB-Ni
s
human cyto. SC-121 / TH
t
FOXA2 / TH
избыточный рост волокон
глиальные клетки?
u
huNCAM
GFAP huNCAM
v
Присутствие серотонинэргич. нейронов?
NCAM
Серотонин
Серотонин NCAM


A
LSB/SB/F8 + CHIR d0-d11
LSB/SB/F8 + CHIR d1-d11
LSB/SB/F8 + CHIR d3-d11
LSB/SB/F8 + CHIR d5-d11
LSB/SB/F8 + CHIR d7-d11
LSB/SB/F8
FOXA2/LMX1A/DAPI
B
% от общего количества клеток
FOXA2
LMX1A
DOUBLE
CHIR:
d0-d11
d1-d11
d3-d11
d5-d11
d7-d11
– CHIR
LSB/SB/FGF8

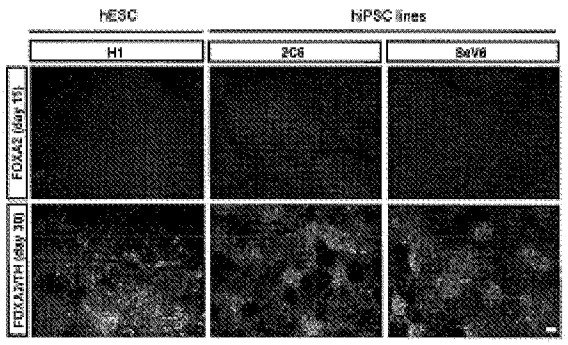
Фигура 6



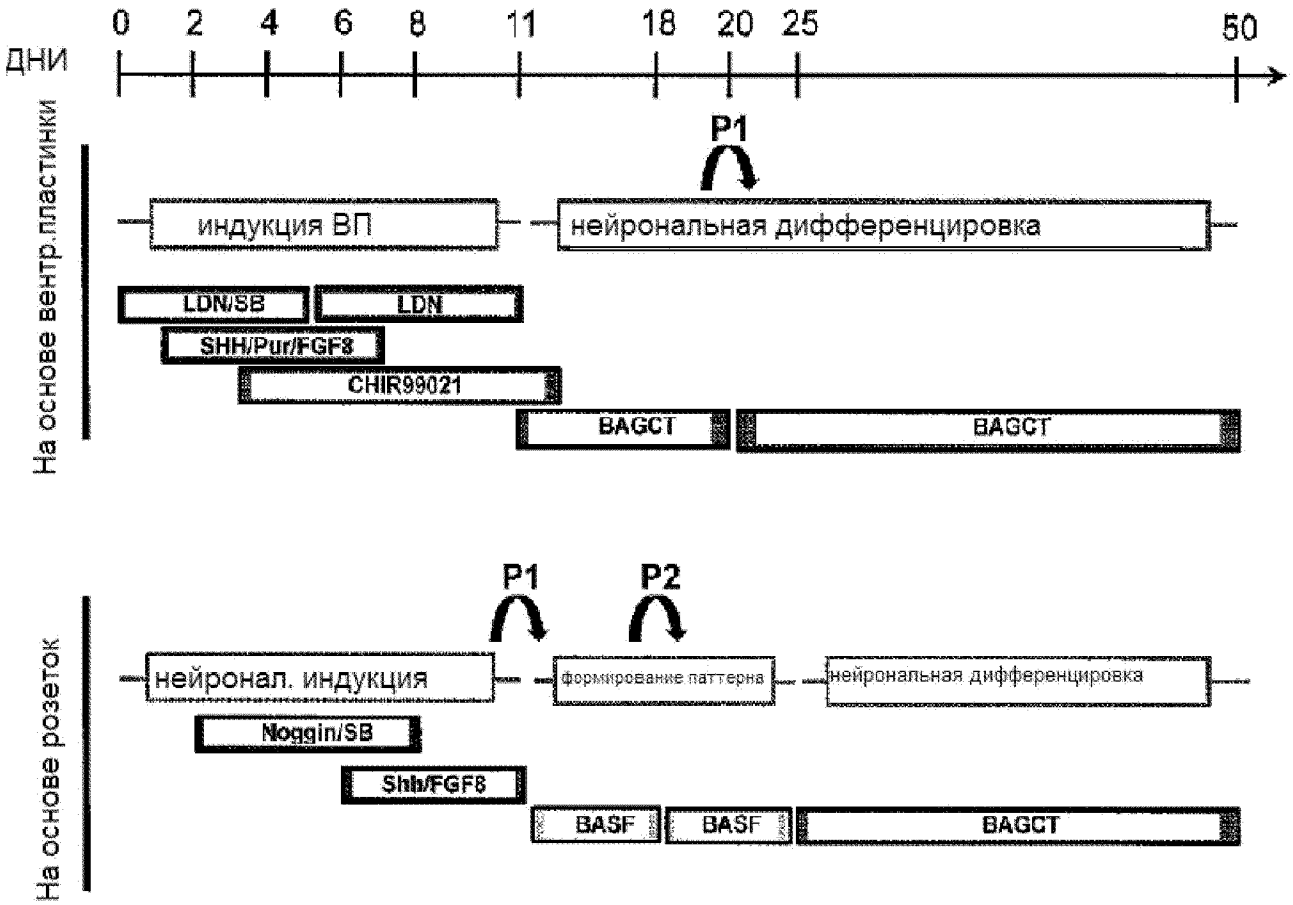
Фигура 8



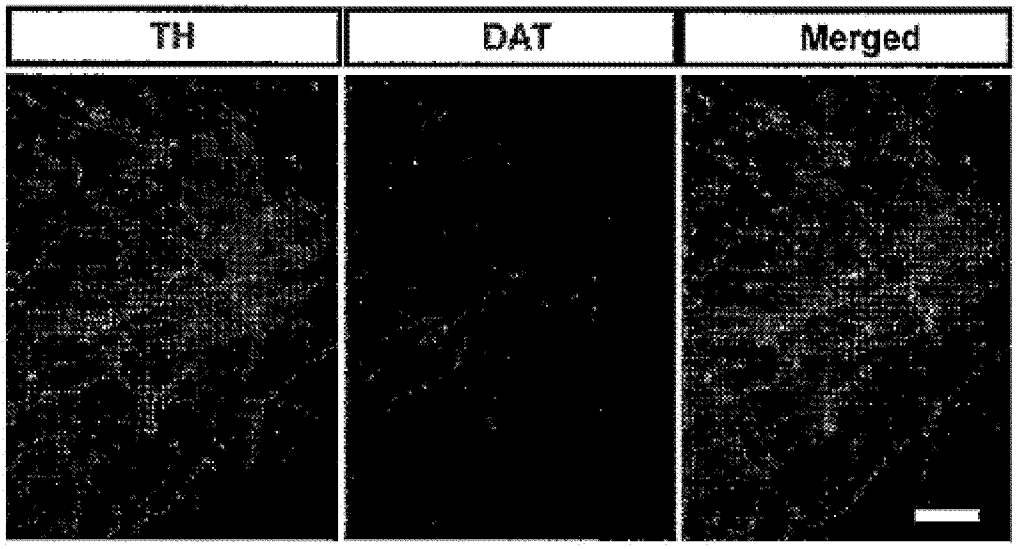
Фигура 9



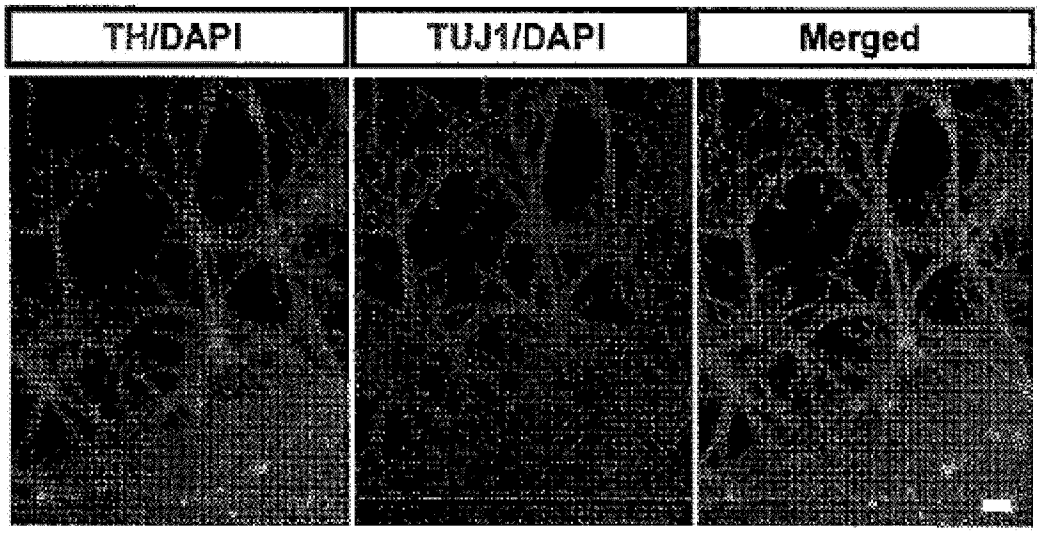
Фигура 10


ДНИ
0
2
4
6
8
11
18
20
25
50
На основе вентр.пластинки
P1
индукция ВП
нейрональная дифференцировка
LDN/SB
LDN
SHH/Pur/FGF8
CHIR99021
BAGCT
BAGCT
На основе розеток
P1
P2
нейронал. индукция
формирование паттерна
нейрональная дифференцировка
Noggin/SB
Shh/FGF8
BASF
BASF
BAGCT

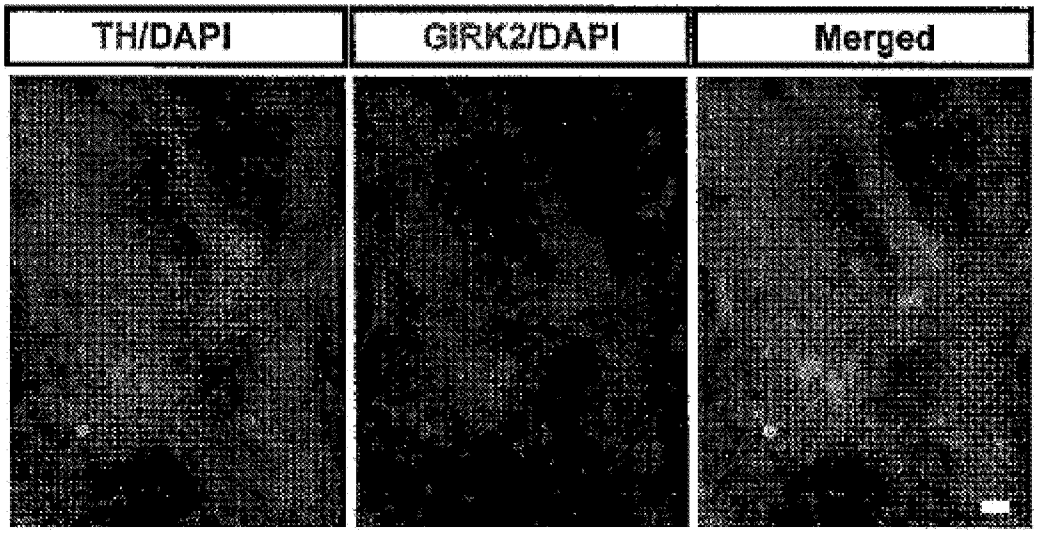
a


TH
DAT
Merged

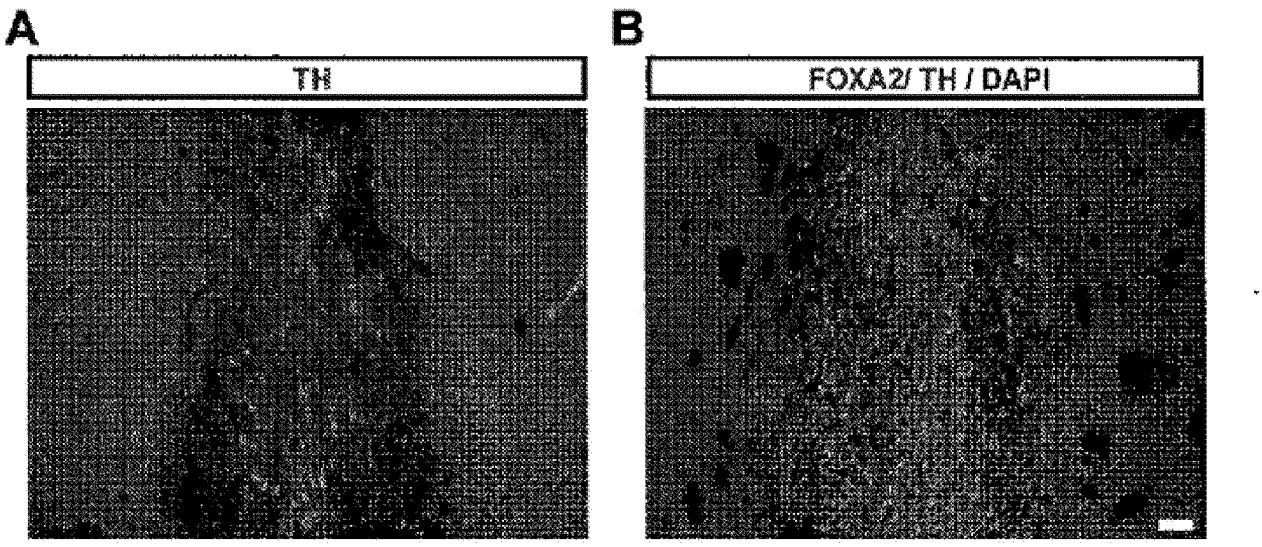
b


TH/DAPI
TUJ1/DAPI
Merged

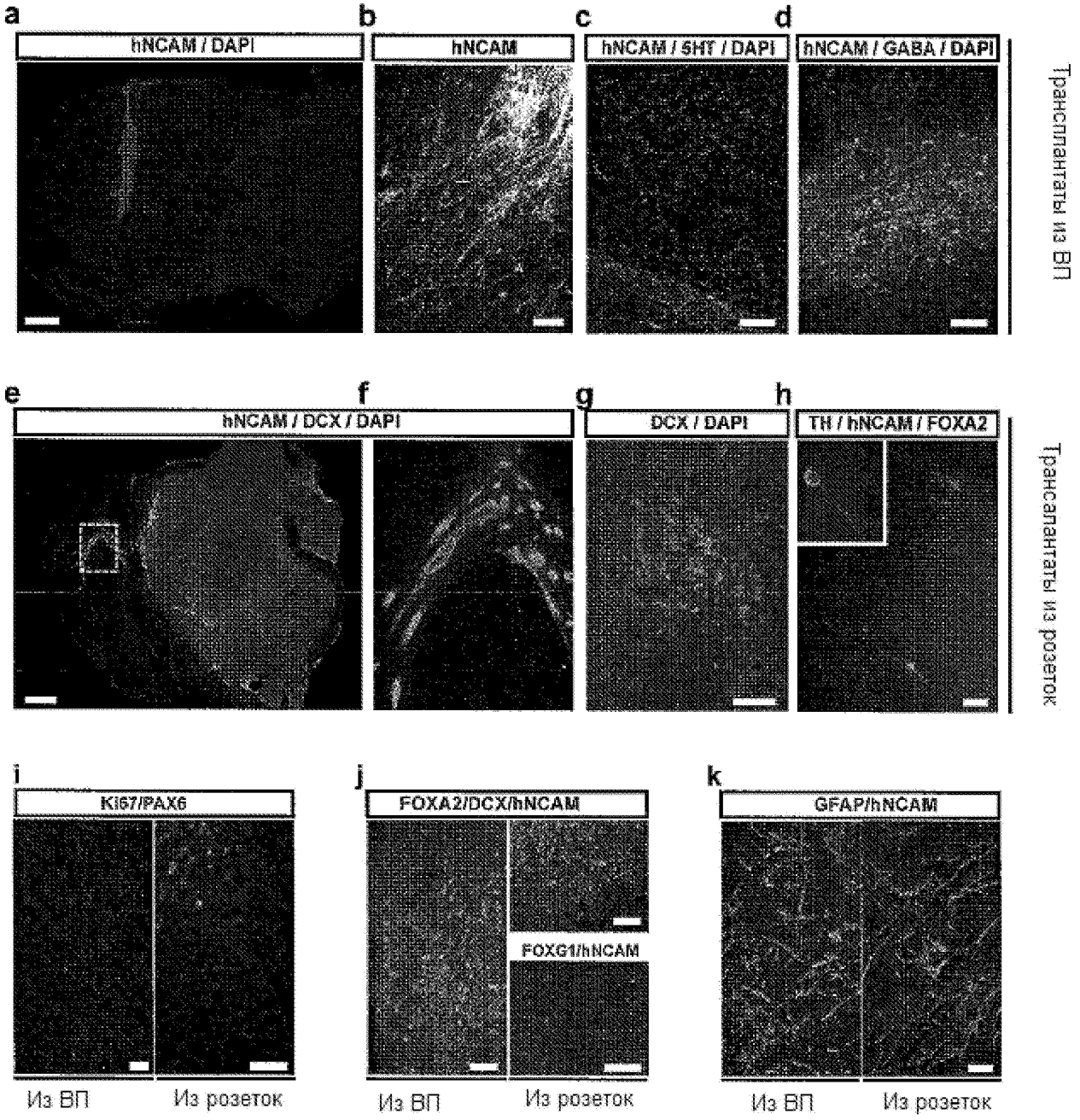
c


TH/DAPI
GIRK2/DAPI
Merged

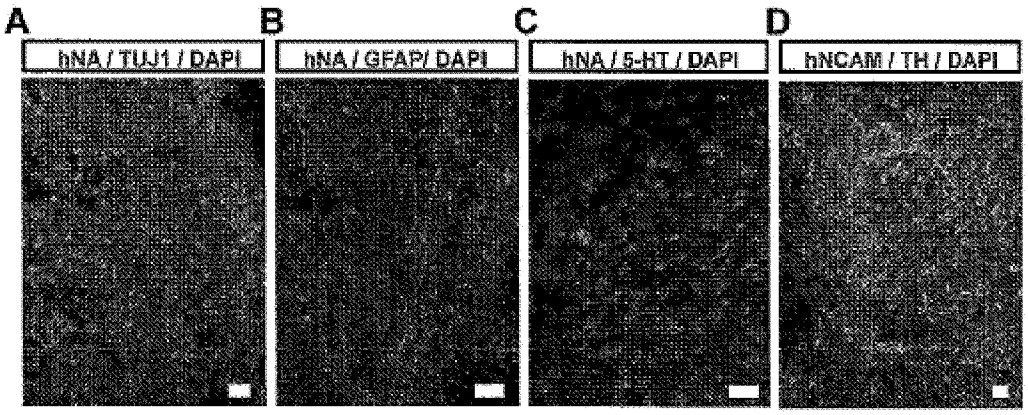
Фигура 12



Фигура 13

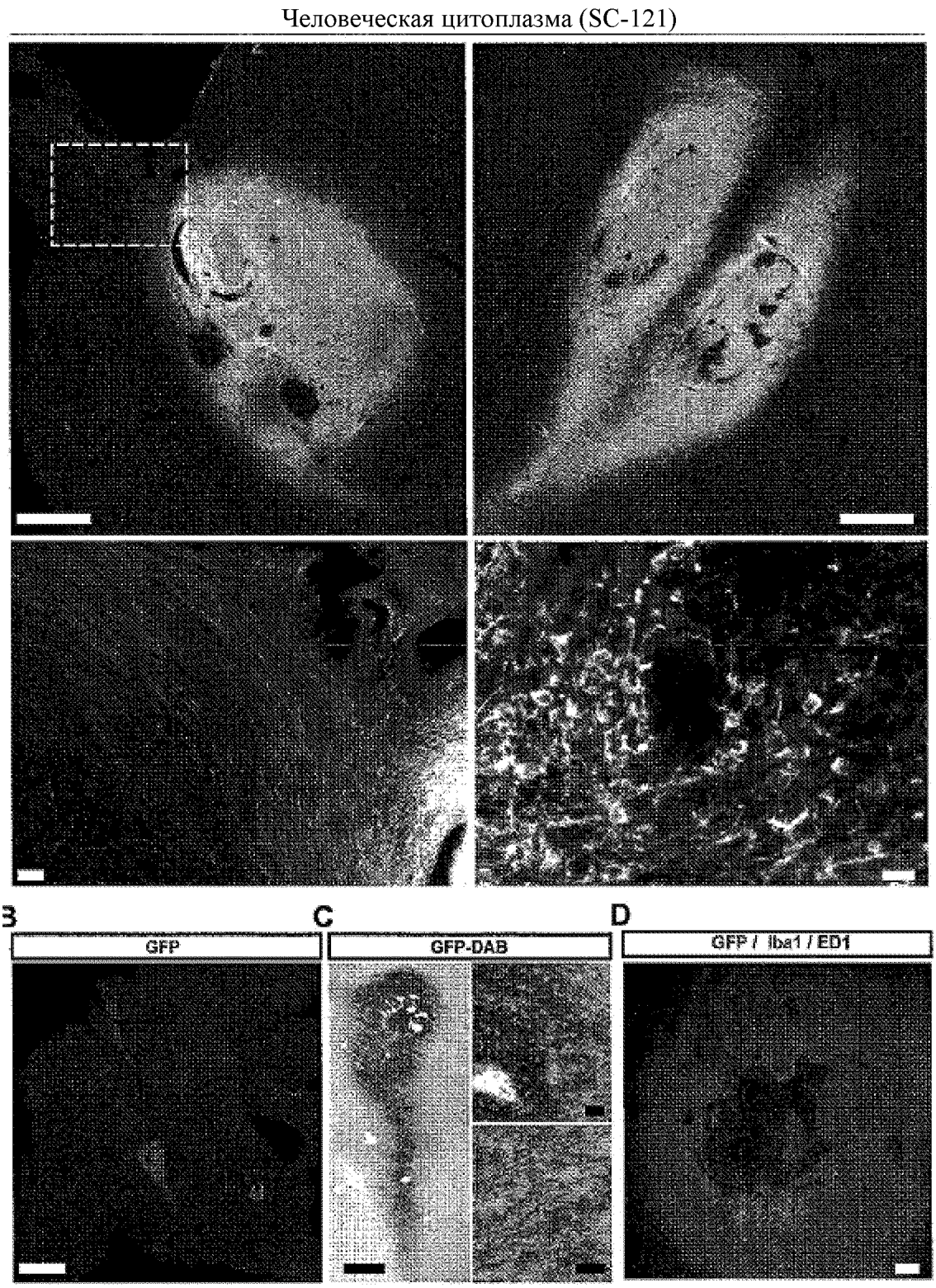

a
hNCAM / DAPI
b
hNCAM
c
hNCAM / 5HT / DAPI
d
hNCAM / GABA / DAPI
Трансплантаты из ВП
e
hNCAM / DCX / DAPI
f
g
DCX / DAPI
h
TH / hNCAM / FOXA2
Трансплантаты из розеток
i
Ki67/PAX6
Из ВП
Из розеток
j
FOXA2/DCX/hNCAM
FOXG1/hNCAM
Из ВП
Из розеток
k
GFAP/hNCAM
Из ВП
Из розеток

Фигура 14

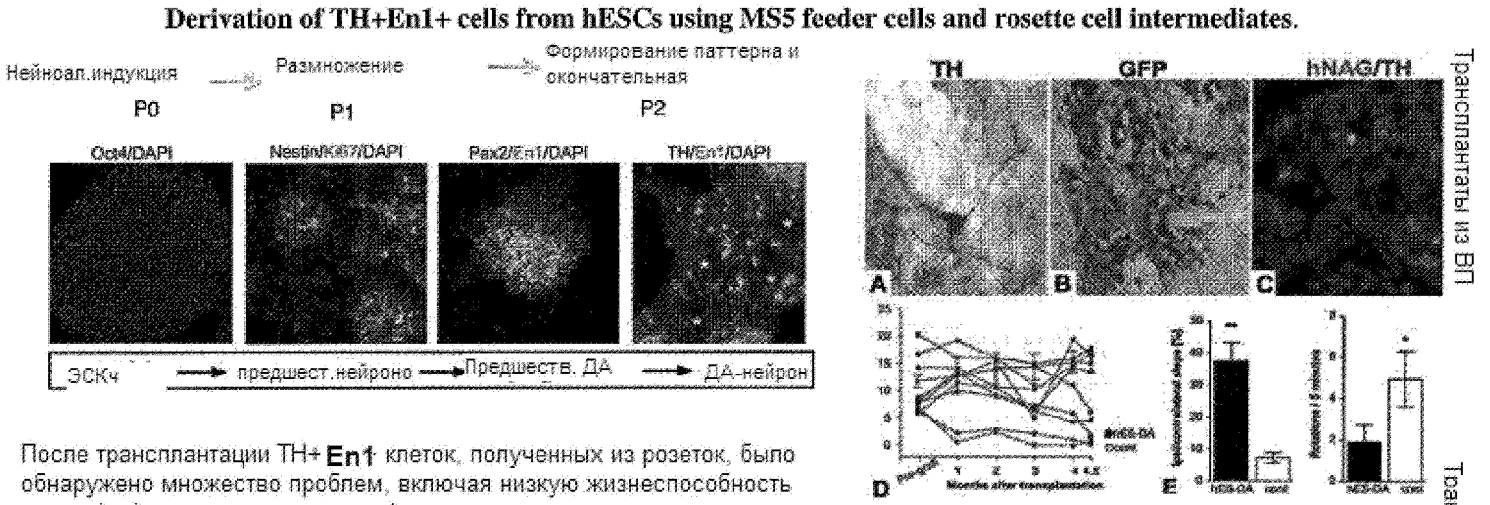


Фигура 15

A



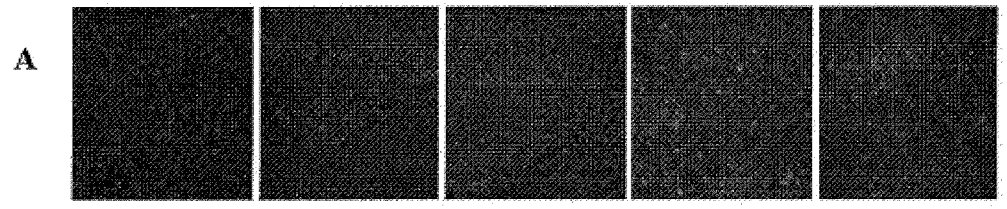
Фиг. 16



После трансплантации TH+ **En1**+ клеток, полученных из розеток, было обнаружено множество проблем, включая низкую жизнеспособность клеток in vivo, потерю исходного фенотипа трансплантата, затруднения, связанные с избыточным ростом клеток, такие как тератому и неприемлемые типы нейронов.

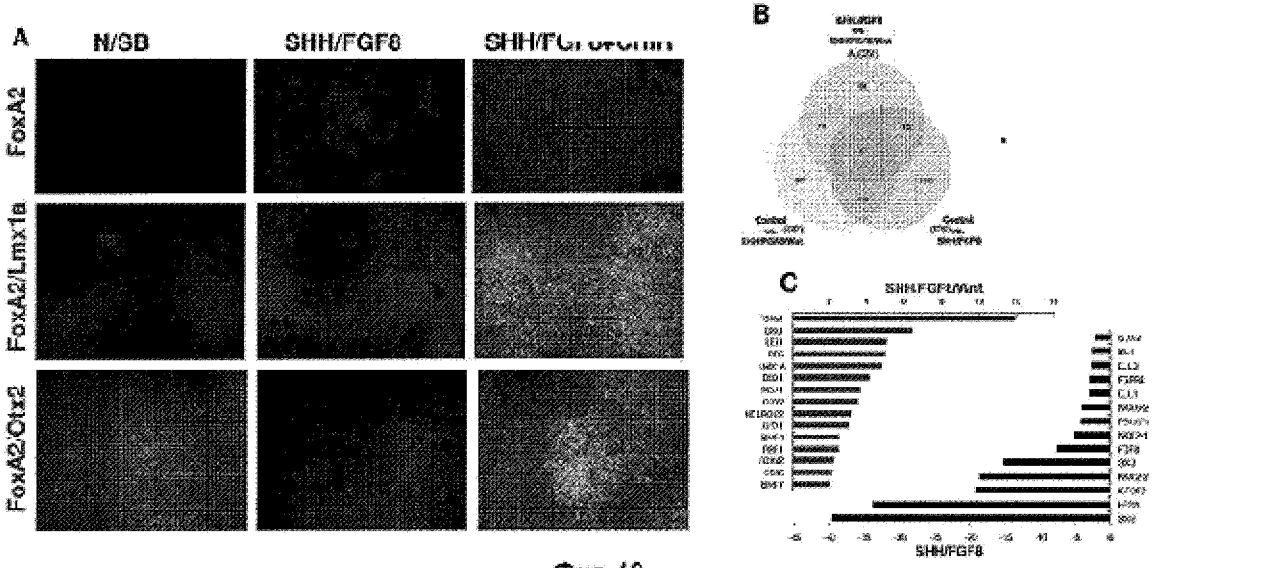
Фиг. 17

Протокол двойного ингибирования SMAD в комбинации с передачей сигнала SHH и Wnt использовали для получения низкого процентного содержания FoxA2+клеток

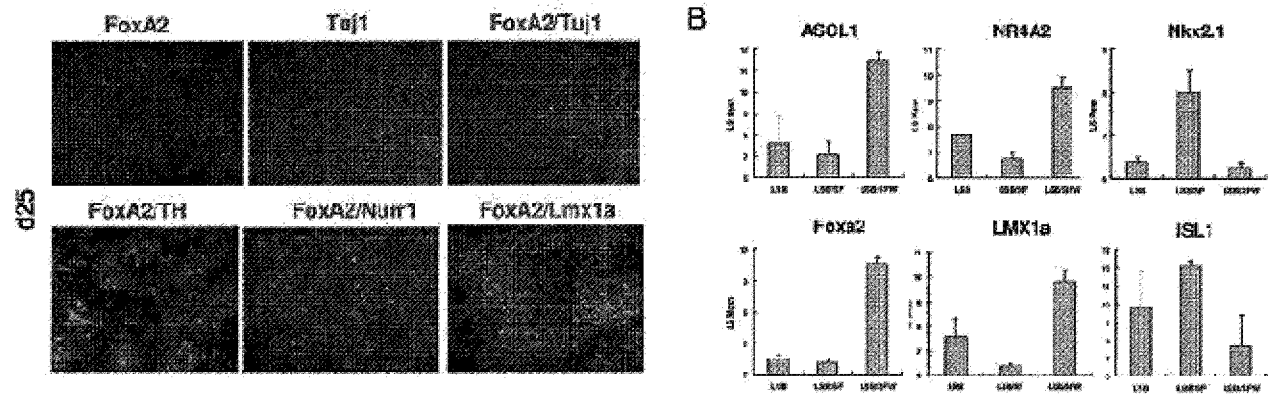


Получение EP+En1+ клеток из ЭСКч с использованием фидерных клеток MS5 и промежуточных розеточных клеток

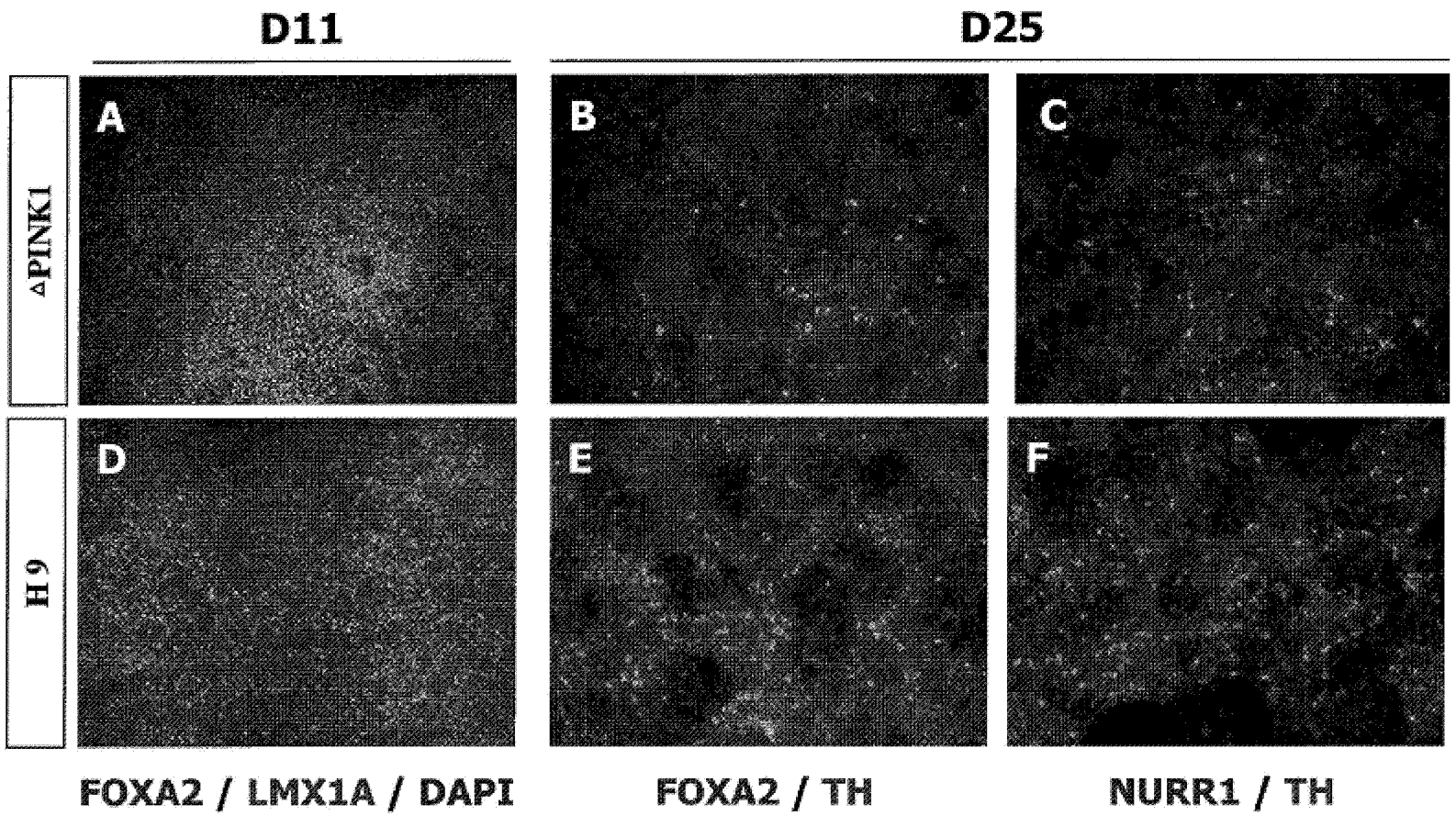
Фиг. 18


A
N/3B
SHH/FGF8
FoxA2
FoxA2/Lmx1a
FoxA2/Otx2
B
C
SHH/FGF8/Wnt
SHH/FGF8

Фиг. 19


FoxA2
Tuj1
FoxA2/Tuj1
d25
FoxA2/TH
FoxA2/Nurr1
FoxA2/Lmx1a
B
AGOL1
NR4A2
Nkx2.1
Foxa2
LMX1a
ISL1

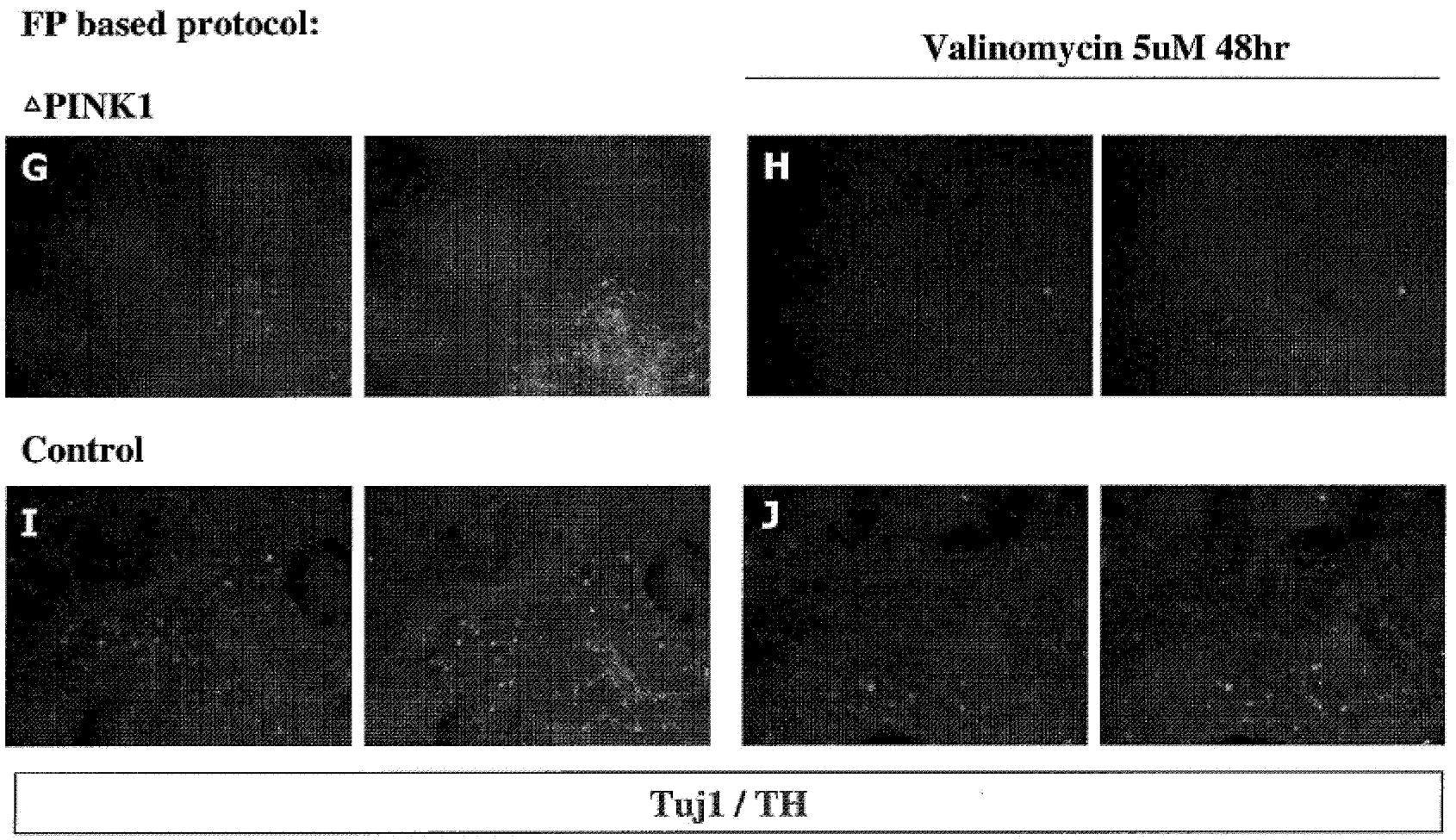
Фигура 20

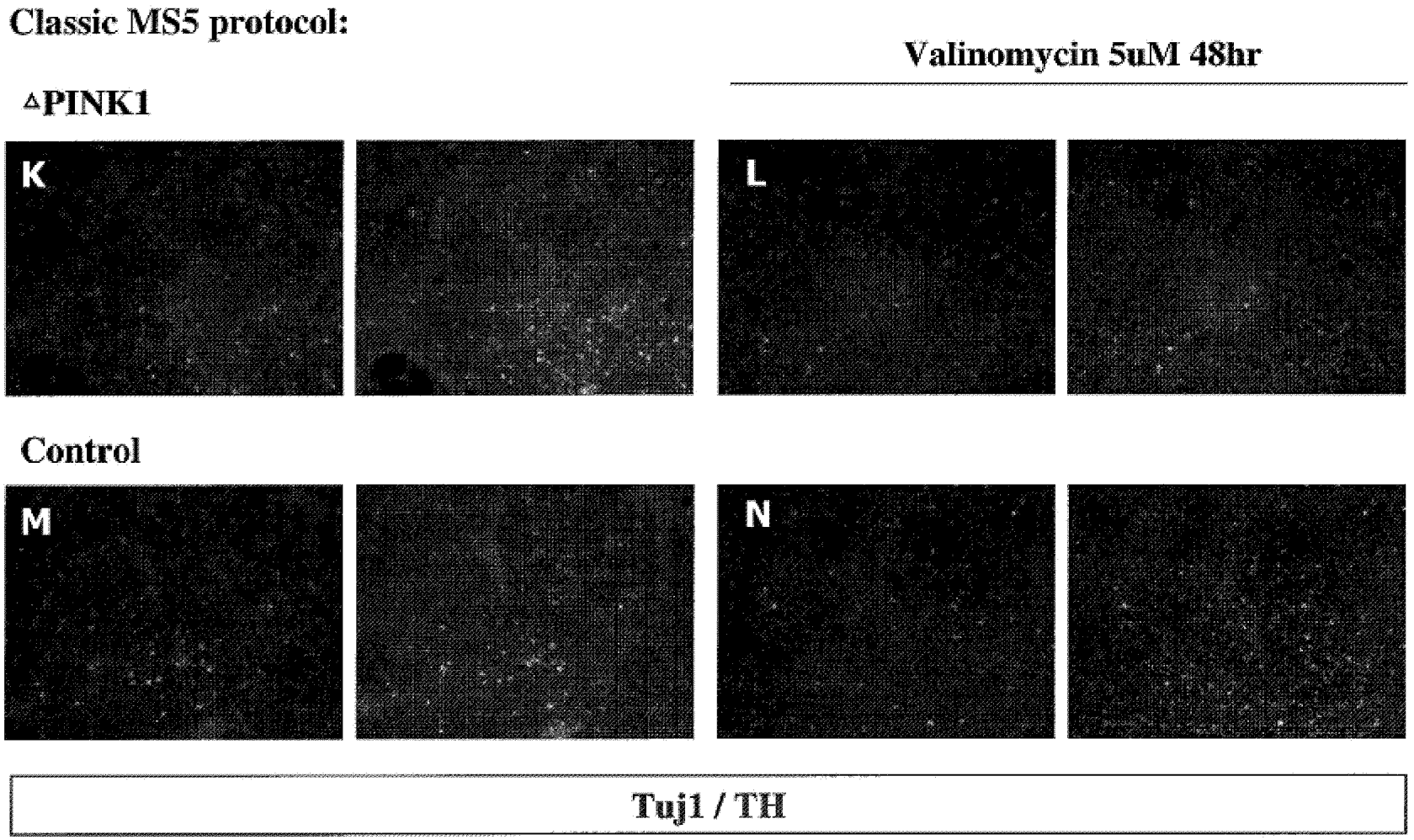


Фигура 21

α-Syn / TH
Classic MS5 protocol
A
B
ΔPINK1
Control
FP based protocol
C
ΔPINK1

Valinomycin 5uM 48hr
Normal
ΔPINK1
Control
FP based protocol
Classic MS5 protocol
A
B
C
D
E
F


FP based protocol:
Valinomycin 5uM 48hr
ΔPINK1
G
H
Control
I
J
Tuj1 / TH


Classic MS5 protocol:
Valinomycin 5uM 48hr
ΔPINK1
K
L
Control
M
N
Tuj1 / TH

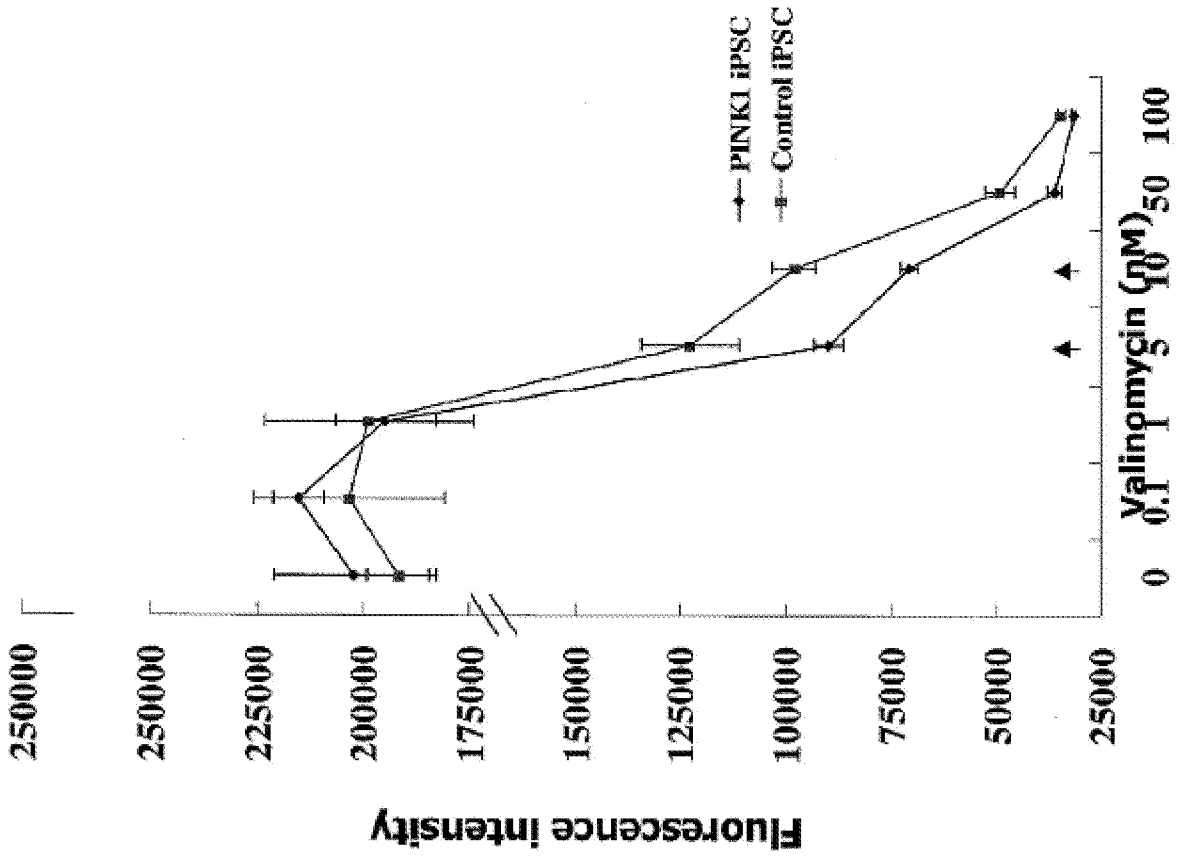

Fluorescence intensity
250000
250000
225000
200000
175000
150000
125000
100000
75000
50000
25000
PINK1 iPSC
Control iPSC
0
0.1
1
5
10
50
100
Valinomycin (μM)

Figure 25.

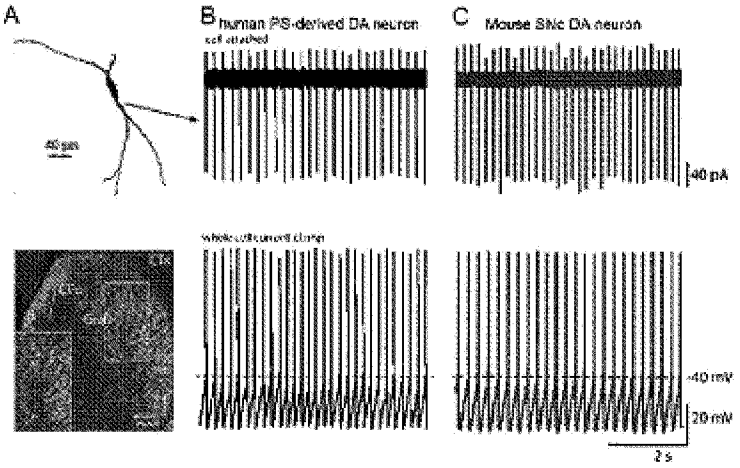
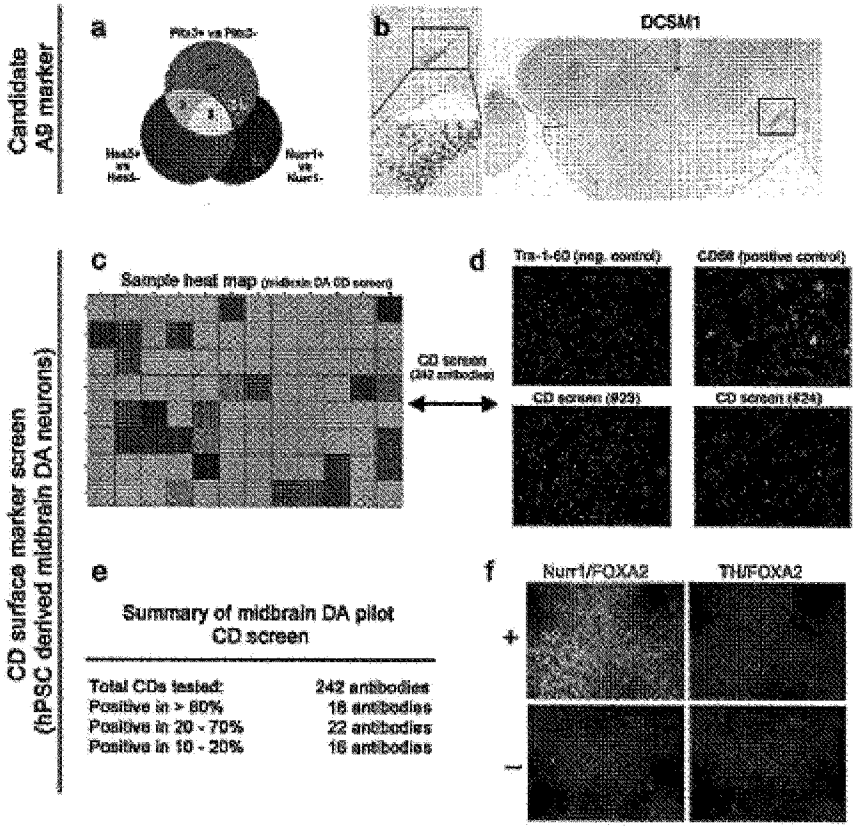
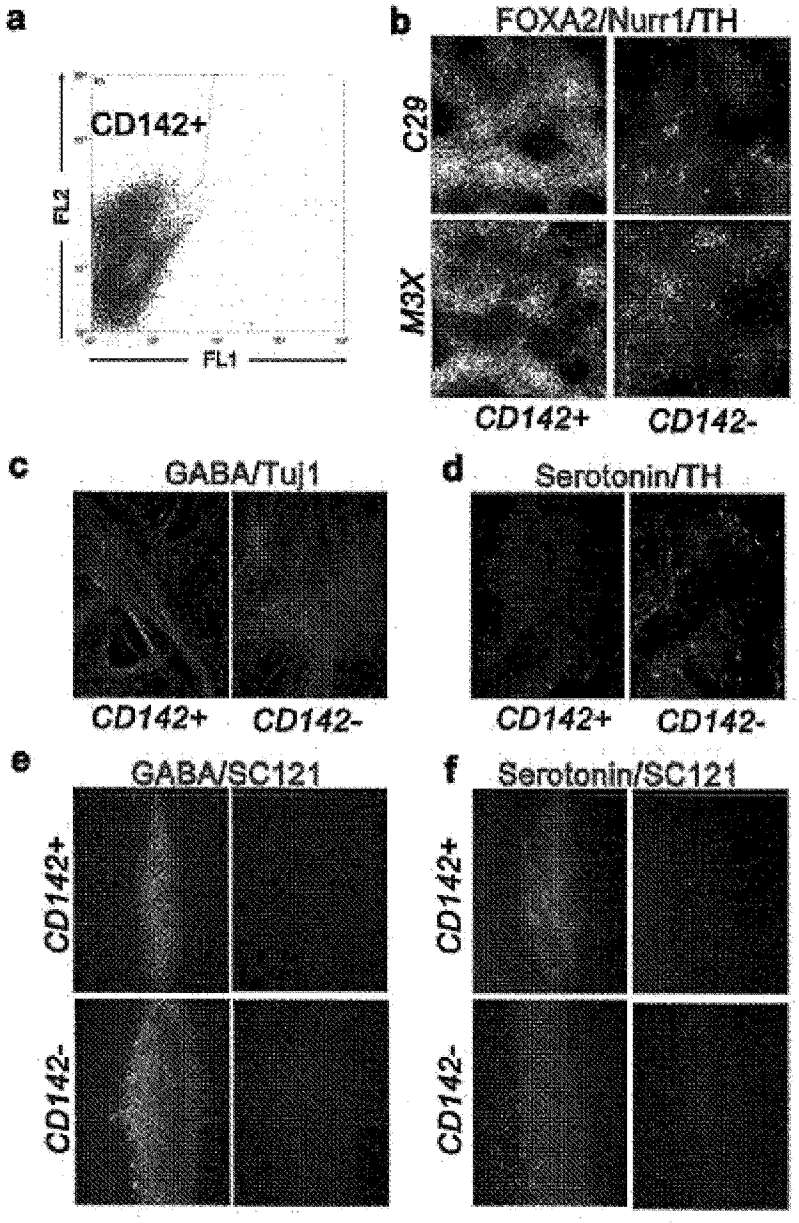

A
B human PS-derived DA neuron
C Mouse SNc DA neuron
40 pA
-40 mV
20 mV
2 s

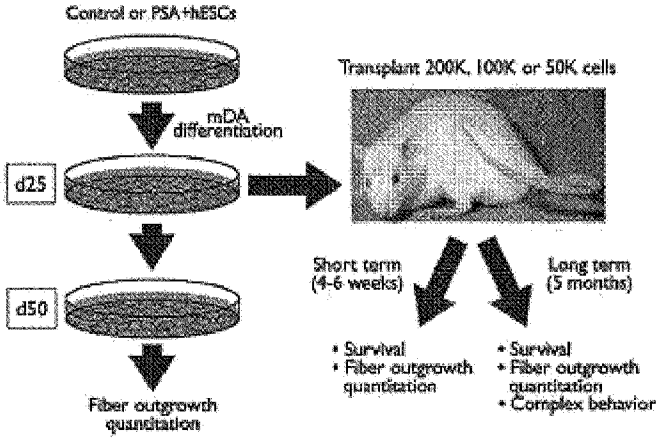
Figure 27


Candidate A9 marker
a
b
DCSM1
CD surface marker screen (hPSC derived midbrain DA neurons)
c
Sample heat map
d
Tra-1-60 (neg. control)
CD68 (positive control)
CD screen (242 antibodies)
e
Summary of midbrain DA pilot CD screen
Total CDs tested: 242 antibodies
Positive in > 80% 18 antibodies
Positive in 20 - 70% 22 antibodies
Positive in 10 - 20% 16 antibodies
f
Nurr1/FOXA2
TH/FOXA2
+
-

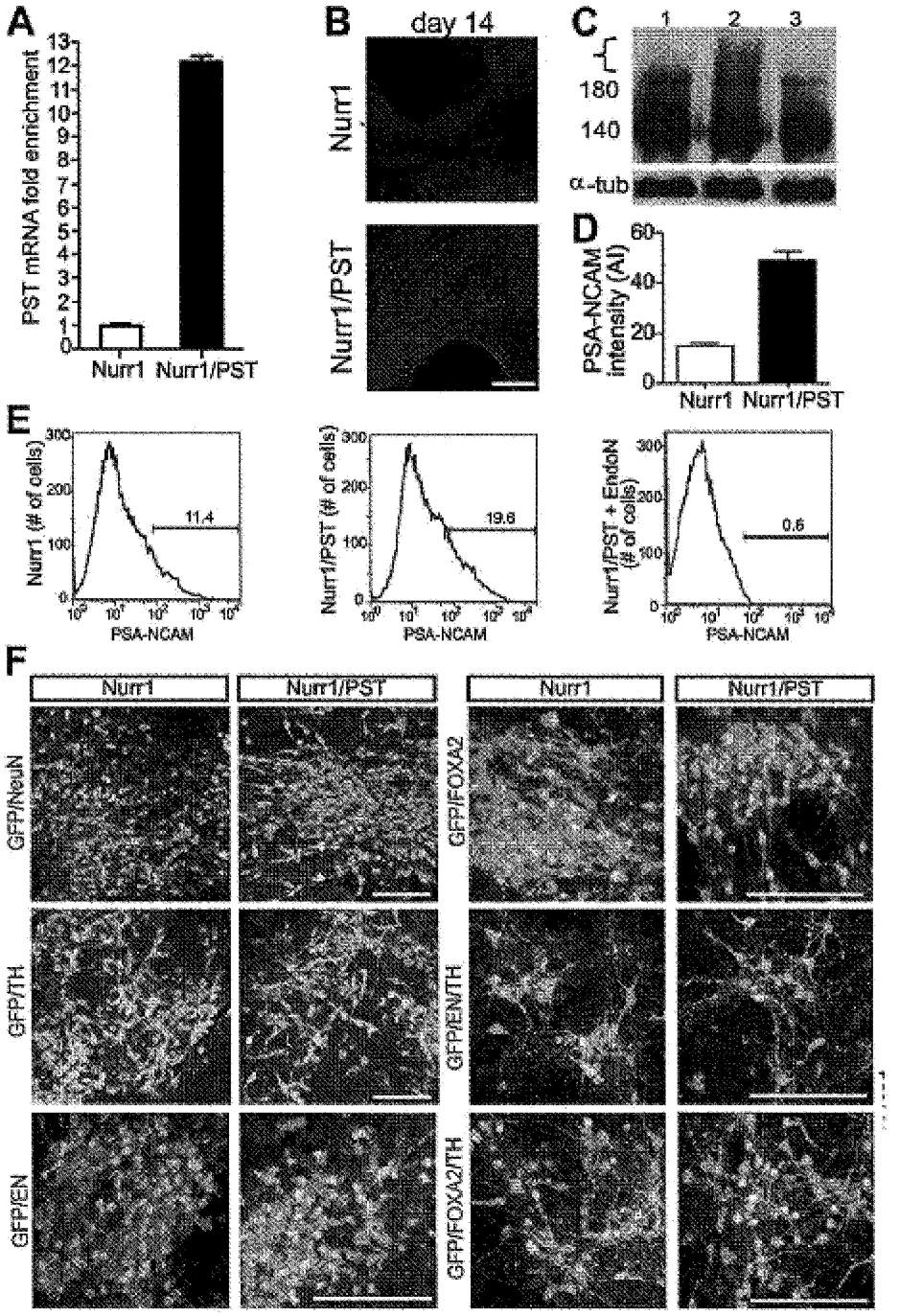
Фигура 28


a
CD142+
FL2
FL1
b
FOXA2/Nurr1/TH
C29
M3X
CD142+
CD142-
c
GABA/Tuj1
CD142+
CD142-
d
Serotonin/TH
CD142+
CD142-
e
GABA/SC121
CD142+
CD142-
f
Serotonin/SC121
CD142+
CD142-

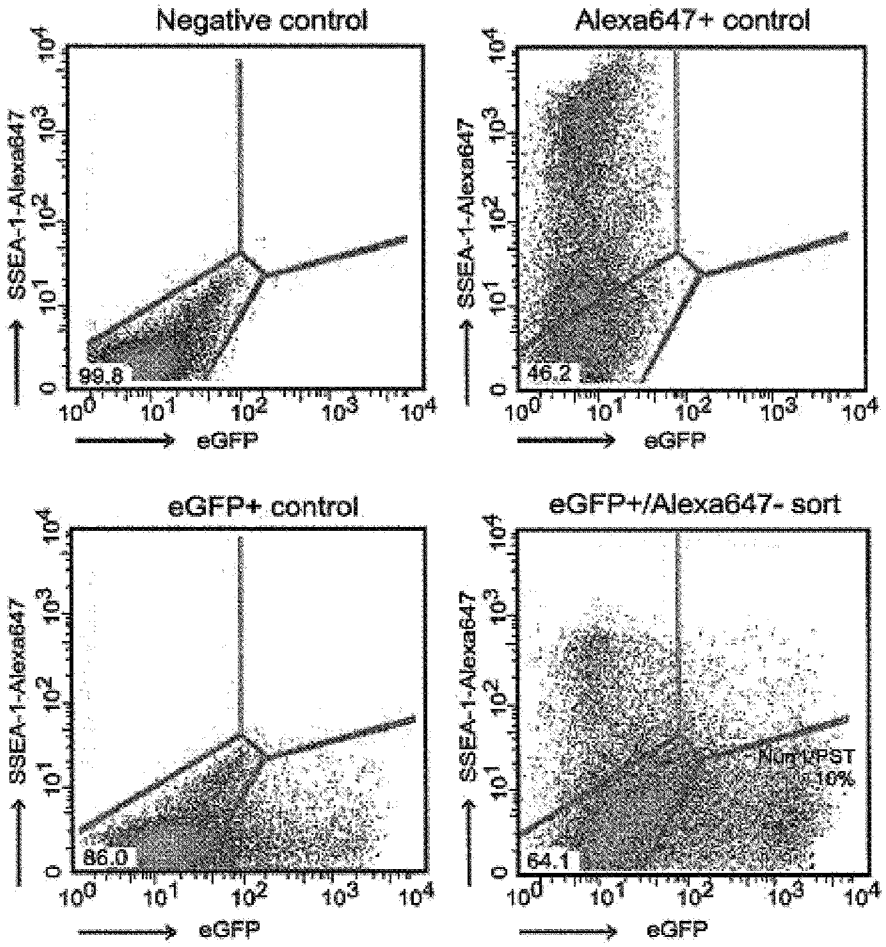
Фигура 29


Control or PSA+hESCs
mDA differentiation
d25
d50
Fiber outgrowth quantitation
Transplant 200K, 100K or 50K cells
Short term (4-6 weeks)
Long term (5 months)
• Survival
• Fiber outgrowth quantitation
• Survival
• Fiber outgrowth quantitation
• Complex behavior

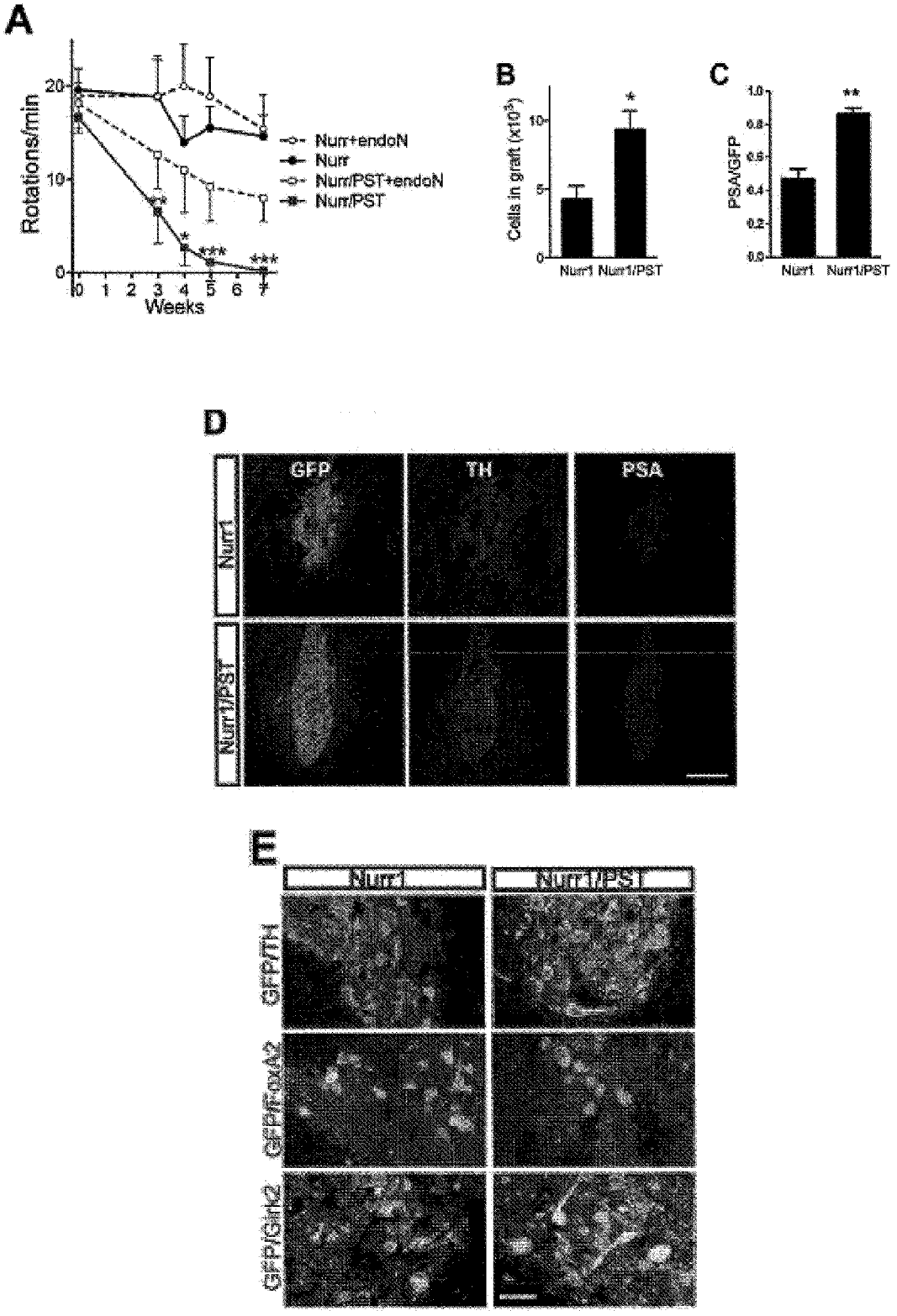
Фигура 30


A
PST mRNA fold enrichment
Nurr1
Nurr1/PST
B
day 14
Nurr1
Nurr1/PST
C
1
2
3
180
140
α-tub
D
PSA-NCAM intensity (AI)
Nurr1
Nurr1/PST
E
Nurr1 (# of cells)
11.4
PSA-NCAM
Nurr1/PST (# of cells)
19.8
PSA-NCAM
Nurr1/PST + EndoN (# of cells)
0.6
PSA-NCAM
F
Nurr1
Nurr1/PST
Nurr1
Nurr1/PST
GFP/NeuN
GFP/FOXA2
GFP/TH
GFP/EN/TH
GFP/EN
GFP/FOXA2/TH

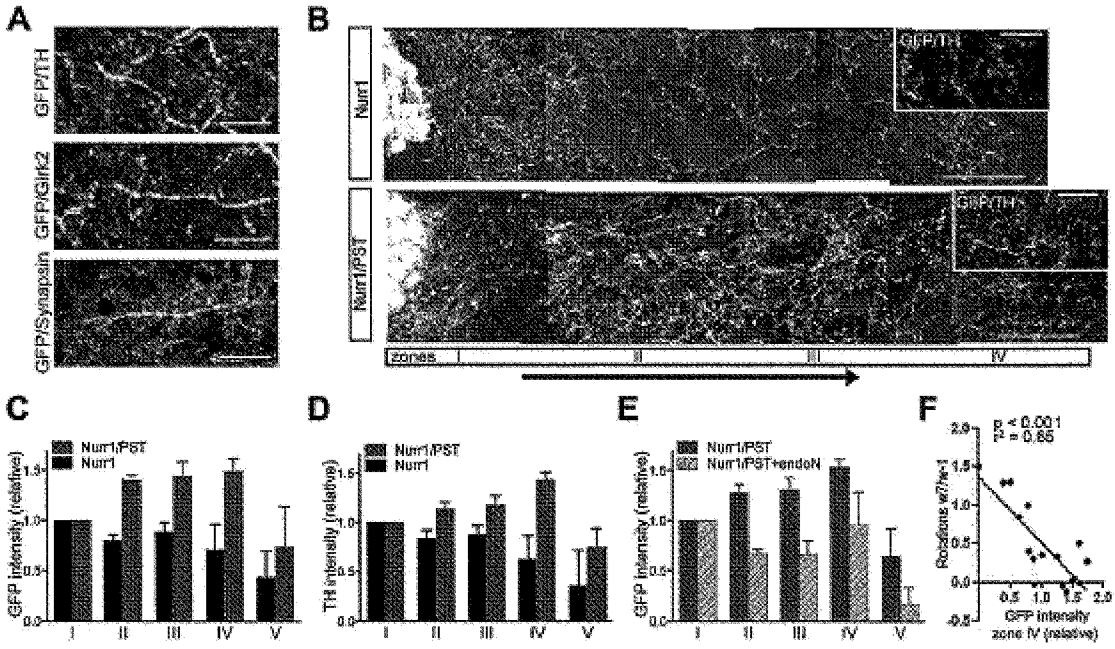
Фигура 31


Negative control
Alexa647+ control
eGFP+ control
eGFP+/Alexa647- sort
SSEA-1-Alexa647
eGFP
99.8
46.2
86.0
64.1
Num UPST
10%

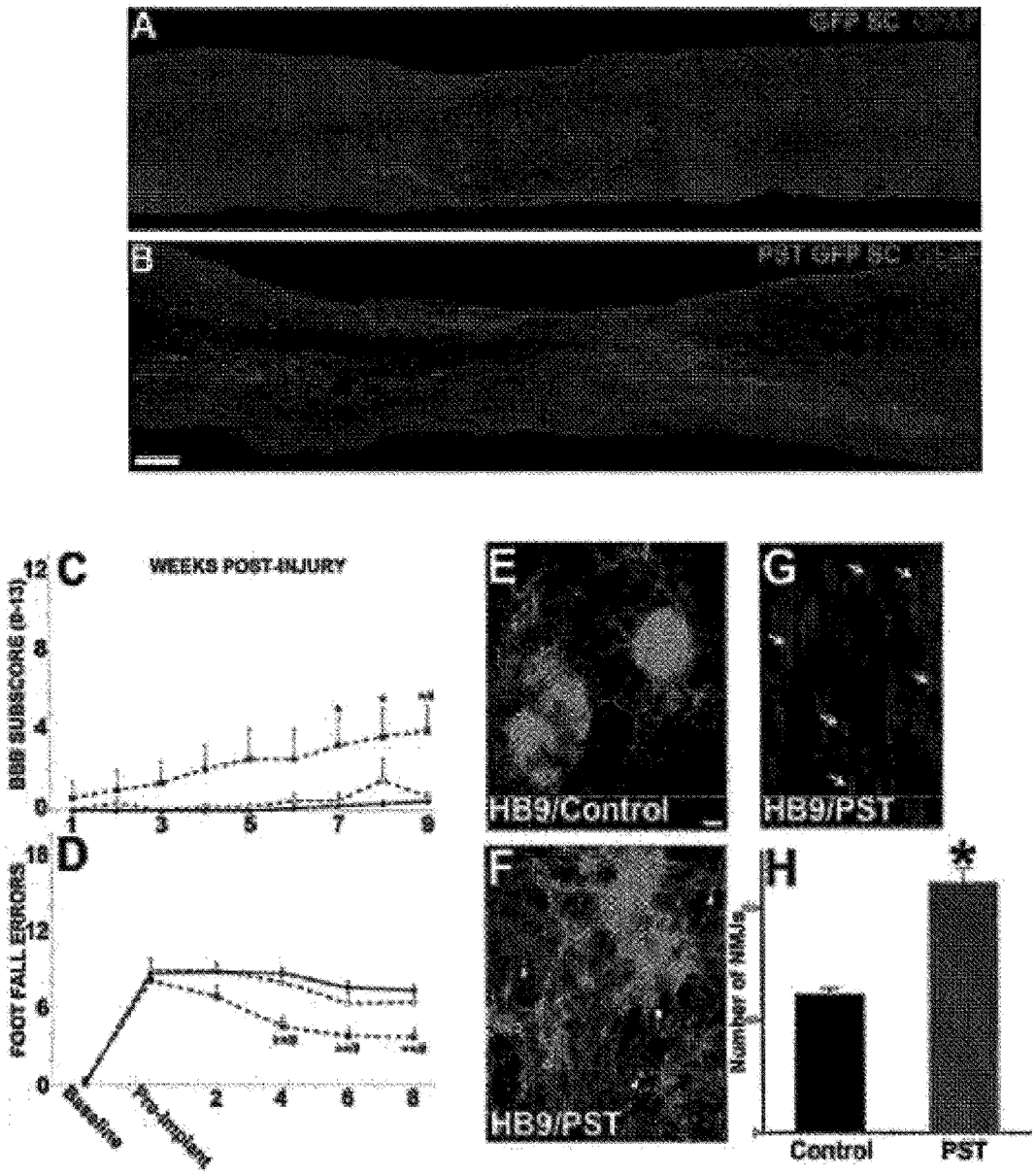
Фигура 32


A
Rotations/min
Weeks
Nurr+endoN
Nurr
Nurr/PST+endoN
Nurr/PST
B
Cells in graft (x10³)
Nurr1
Nurr1/PST
C
PSA/GFP
Nurr1
Nurr1/PST
D
GFP
TH
PSA
Nurr1
Nurr1/PST
E
Nurr1
Nurr1/PST
GFP/TH
GFP/FoxA2
GFP/Girk2

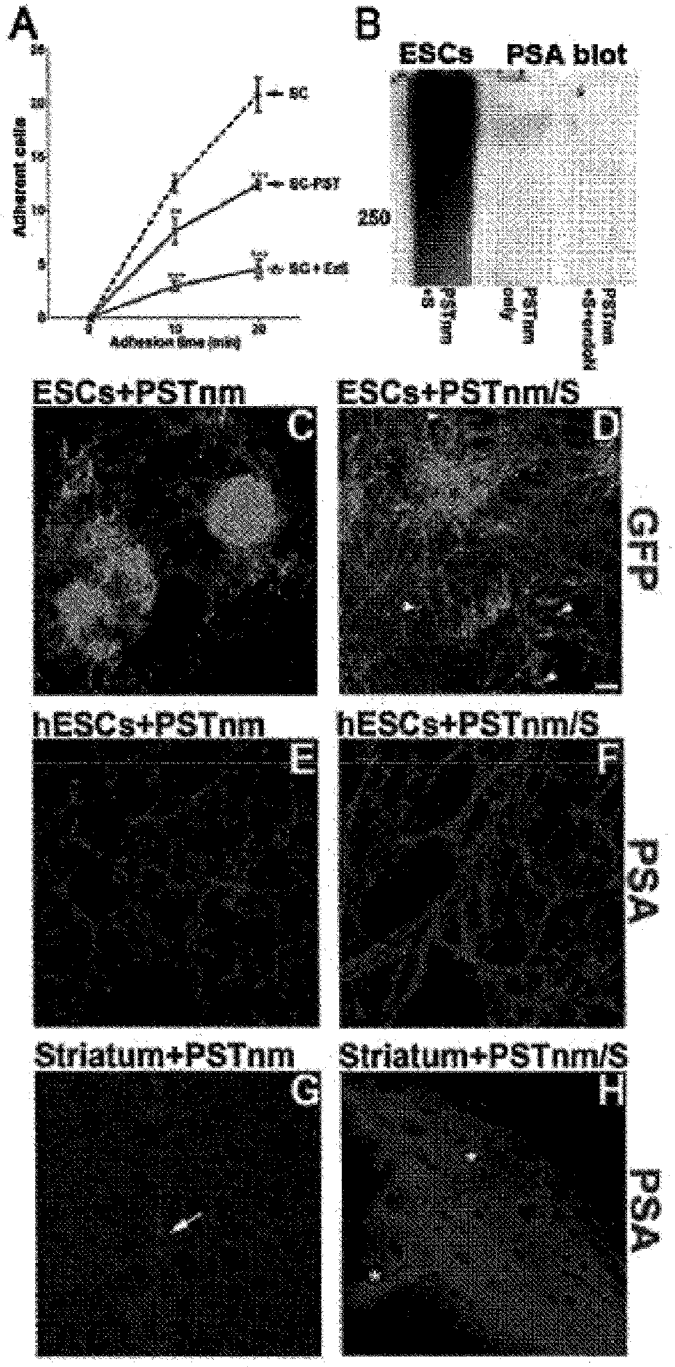
Фигура 33


A
GFP/TH
GFP/Glrk2
GFP/Synapsin
B
Nurr1
Nurr1/PST
GFP/TH
zones
I
II
III
IV
C
Nurr1/PST
Nurr1
GFP intensity (relative)
D
Nurr1/PST
Nurr1
TH intensity (relative)
E
Nurr1/PST
Nurr1/PST+endoN
GFP intensity (relative)
F
p < 0.001
r² = 0.85
Rotations w/7 hr-1
GFP intensity zone IV (relative)

Фигура 34


A
B
C
WEEKS POST-INJURY
BBB SUBSCORE (0-13)
D
FOOT FALL ERRORS
Baseline
Pre-implant
E
HB9/Control
F
HB9/PST
G
HB9/PST
H
Number of NMJs
Control
PST

Фигура 35


A
Adherent cells
SC
SC-PST
SC + Ecti
Adhesion time (min)
B
ESCs
PSA blot
250
PSTnm +S
PSTnm only
PSTnm +S+ectoin
ESCs+PSTnm
C
ESCs+PSTnm/S
D
GFP
hESCs+PSTnm
E
hESCs+PSTnm/S
F
PSA
Striatum+PSTnm
G
Striatum+PSTnm/S
H
PSA

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202291344

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C12N 5/071, 5/0793, 5/074, A61K 35/30, 38/00, A61P 25/00, 25/16

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

Espacenet, ЕАПАТИС, EPOQUE Net, Reaxys, Google

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	RU 2345133 C2 (РЕЛАЙАНС ЛАЙФ САЕЕНСИЗ ПВТ. ЛДТ.) 27.01.2009, пример 1, формула, страница 7, строки 45-51, страница 8, строки 7-11, 23-32, страница 10, строки 13-16, 37-43, страница 11, строки 28-33, страница 12, строки 49-50, страница 13, строки 11-21, страница 17, строки 16-30, страница 19, строки 33-44, страница 20, строки 16-25, страница 32, строка 51-страница 33, строки 1, строки 20-21	1-38
X	YAN Yiping et al. Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. Stem Cells, 2005, 23, pp. 781–790 doi: 10.1634/stemcells.2004-0365, реферат, разделы "Matherial and methods", "Discussion"	1-27, 30-32
A	БОГДАНОВ Р. Р. и др. Современное состояние проблемы этиопатогенеза болезни Паркинсона и возможности ранней диагностики. Альманах клинической медицины, 2006, No. 13, с. 147-155, страница 152	1-38
A	WERNIG Marius et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. PNAS, 2008, Vol. 105, No. 15, pp. 5856–5861, www.pnas.org_cgi_doi_10.1073_pnas.0801677105, реферат	1-38

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:
«A» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«T» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 06 декабря 2022 (06.12.2022)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

Документ подписан электронной подписью
Сертификат: 1653480328483
Владелец: CN=Аверкиев С.
Действителен: 25.05.2022-25.05.2023

С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202291344

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

C12N 5/0793 (2010.01)
C12N 5/074 (2010.01)
A61K 35/30 (2015.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)