

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293464** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.02.15

(22) Дата подачи заявки
2021.05.26

(51) Int. Cl. *A61P 11/00* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01)
C12N 5/09 (2010.01)
G01N 33/15 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 35/42 (2015.01)
A61L 27/38 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОРГАНОИДА, ПРОИСХОДЯЩЕГО ОТ ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ ЛЕГКИХ ИЛИ КЛЕТКИ РАКА ЛЕГКИХ**

(31) 2020-092303

(32) 2020.05.27

(33) JP

(86) PCT/JP2021/019947

(87) WO 2021/241621 2021.12.02

(71) Заявитель:

**ОЦУКА ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО.,
ЛТД.; РИКЕН (JP)**

(72) Изобретатель:

**Моримото Мицуру, Фудзимура Такаси
(JP)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Способ получения органоида, происходящего от эпителиальной клетки легких или клетки рака легких, где указанный способ включает культивирование образца, содержащего эпителиальную клетку легких или клетку рака легких, в культуральной среде, где культуральная среда содержит 0-10% (об./об.) внеклеточного матрикса и комбинацию по меньшей мере одного фактора, выбранного из группы, состоящей из фактора роста кератиноцитов (KGF), фактора роста фибробластов (FGF) 10 и фактора роста гепатоцитов (HGF); ингибитор белка остеогенеза (BMP); и ингибитор TGF β , и где культуральная среда, по существу, не содержит фидерных клеток.

A1

202293464

202293464

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576144EA/23

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОРГАНОИДА, ПРОИСХОДЯЩЕГО ОТ ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ ЛЕГКИХ ИЛИ КЛЕТКИ РАКА ЛЕГКИХ

Область техники

[0001]

Настоящее изобретение относится к способу получения органоида, происходящего от эпителиальной клетки легких. Настоящее изобретение также относится к способу получения органоида, происходящего от клетки рака легких. Настоящее изобретение также относится к органоиду, происходящему от эпителиальной клетки легких или клетки рака легких, к регенеративной лекарственной композиции, содержащей органоид, происходящий от эпителиальной клетки легких, и к способу скрининга вещества, эффективного для лечения рака легких.

Предпосылки создания изобретения

[0002]

Стволовые клетки ткани участвуют в соответствующем метаболизме дифференцированных клеток в условиях гомеостаза. Стволовые клетки ткани играют центральную роль в индуцированной повреждением регенерации тканей в результате снабжения дифференцированными клетками, если ткань повреждена. Ткани легких имеют несколько видов стволовых клеток. Методы культивирования органоидов были разработаны для некоторых видов стволовых клеток ткани в различных органах и оценены на возможность их применения для практических исследований стволовых клеток и в регенеративной медицине. Среди методов культивирования органоидов широко применяется метод культивирования с использованием фидерных клеток (Патентный документ 1). Методы культивирования органоидов без фидерных клеток были исследованы в последние годы (Патентный документ 2, Непатентный документ 1).

Список цитируемых документов

[0003]

Патентный документ 1: JP-A 2016-513469

Патентный документ 2: JP-A 2018-503360

[0004]

Непатентный документ 1: Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 515, Issue 4, 6 August 2019, Pages 579-585

Сущность изобретения

[0005]

Настоящее изобретение в основном относится к новому способу получения органоида, происходящего от эпителиальной клетки легких или клетки рака легких.

Решение проблемы

[0006]

Настоящее изобретение относится к способу получения органоида, происходящего

от эпителиальной клетки легких или клетки рака легких, где указанный способ включает культивирование образца, содержащего эпителиальную клетку легких или клетку рака легких, в культуральной среде, где культуральная среда содержит 0-10% (об./об.) внеклеточного матрикса и комбинацию по меньшей мере одного фактора, выбранного из группы, состоящей из фактора роста кератиноцитов (KGF), фактора роста фибробластов (FGF) 10 и фактора роста гепатоцитов (HGF); ингибитор белка остеогенеза (BMP); и ингибитор TGF β , и где культуральная среда по существу не содержит фидерных клеток.

[0007]

Настоящее изобретение также относится к органоиду, происходящему от эпителиальной клетки легких или клетки рака легких, где указанный органоид получают вышеописанным способом. Настоящее изобретение относится к органоиду, происходящему от эпителиальной клетки легких, где указанный органоид содержит внутрислойный слой и клеточный слой, обращенный к внутрислойному слою.

[0008]

Настоящее изобретение также относится к регенеративной лекарственной композиции, содержащей органоид, происходящий от эпителиальной клетки легких, полученной описанным выше способом.

[0009]

Настоящее изобретение также относится к способу скрининга вещества, эффективного для лечения рака легких, где указанный способ включает контактирование исследуемого вещества с органоидом, происходящим от клетки рака легких и полученным описанным выше способом; анализ органоида после его контактирования с исследуемым веществом и сравнение значения, полученного для органоида после его контактирования с исследуемым веществом, с контрольным значением.

[0010]

Настоящее изобретение также относится к способу получения органоида, происходящего от эпителиальной клетки легких или клетки рака легких, где указанный способ включает культивирование образца, содержащего эпителиальную клетку легких или клетку рака легких, в культуральной среде, где культуральная среда содержит 0-10% (об./об.) внеклеточного матрикса и практически не содержит фидерных клеток; и где указанная среда содержит следующую комбинацию: комбинацию, включающую агент, способный активировать передачу сигналов Wnt, ингибитор белка остеогенеза (BMP), ингибитор TGF β и фактор роста гепатоцитов (HGF); комбинацию, включающую один из или оба фактора роста кератиноцитов (KGF) и фактора роста фибробластов (FGF) 10, ингибитор BMP, ингибитор TGF β и HGF; или комбинацию, включающую один из или оба KGF и FGF10, агент, способный активировать передачу сигналов Wnt, ингибитор BMP, ингибитор TGF β и HGF.

[0011]

Настоящее изобретение включает следующие варианты:

[Вариант 1] Способ получения органоида, происходящего от эпителиальной клетки

легких или клетки рака легких, где указанный способ включает культивирование образца, содержащего эпителиальную клетку легких или клетку рака легких, в культуральной среде, где культуральная среда содержит 0-10% (об./об.) внеклеточного матрикса и комбинацию по меньшей мере одного фактора, выбранного из группы, состоящей из фактора роста кератиноцитов (KGF), фактора роста фибробластов (FGF) 10 и фактора роста гепатоцитов (HGF); ингибитор белка остеогенеза (BMP); и ингибитор TGF β , и где культуральная среда по существу не содержит фидерных клеток.

[Вариант 2] Способ согласно варианту 1, где комбинация дополнительно содержит один или оба агента, способных активировать передачу сигналов Wnt, и ингибитор Rho-киназы (ROCK).

[Вариант 3] Способ согласно варианту 2, где комбинация представляет собой комбинацию KGF, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ; комбинацию KGF, агента, способного активировать передачу сигналов Wnt, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ; комбинацию FGF10, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ; комбинацию FGF10, агента, способного активировать передачу сигналов Wnt, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ; комбинацию HGF, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ; комбинацию HGF, агента, способного активировать передачу сигналов Wnt, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ; комбинацию KGF, FGF10, HGF, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ; комбинацию KGF, FGF10, HGF, агента, способного активировать передачу сигналов Wnt, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ; комбинацию ингибитора ROCK, KGF, FGF10, HGF, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ; или комбинацию ингибитора ROCK, KGF, FGF10, HGF, агента, способного активировать передачу сигналов Wnt, ингибитора BMP и ингибитора TGF β .

[Вариант 4] Способ согласно любому из вариантов 1-3, где ингибитор BMP представляет собой Ноггин и/или ингибитор TGF β представляет собой SB431542.

[Вариант 5] Способ согласно любому из вариантов 2-4, где агент, способный активировать передачу сигналов Wnt, представляет собой CHIR99021, и/или ингибитор ROCK представляет собой Y-27632.

[Вариант 6] Способ согласно любому из вариантов 1-5, где эпителиальные стволовые клетки легких, включенные в образец, содержат клетки по меньшей мере одного типа, выбранные из группы, состоящей из базальных клеток, булавовидных клеток, бронхиоальвеолярных стволовых клеток и альвеолярных эпителиальных клеток.

[Вариант 7] Способ согласно любому из вариантов 1-5, где эпителиальные клетки легких, включенные в образец, в основном состоят из альвеолярных эпителиальных клеток типа 2 (далее обозначаемых «клеткой AT2»); в основном состоят из булавовидных клеток или в основном состоят из комбинации базальных и булавовидных клеток.

[Вариант 8] Способ согласно любому из вариантов 1-5, где эпителиальные клетки легких, включенные в образец, в основном состоят из альвеолярных эпителиальных клеток типа 2, или по существу состоят из булавовидных клеток.

[Вариант 9] Способ согласно любому из вариантов 1-8, включающий отбор булавовидных клеток - I, клеток AT2 или булавовидных клеток - II из образца на основе

по меньшей мере одного из клеточных маркеров, соответствующих булавовидным клеткам - I, клеткам AT2 и булавовидным клеткам - II и перечисленных в Таблице А, и их гомологов перед культивированием образца в культуральной среде.

Таблица А

Булавовидные клетки-I	Клетки AT2	Булавовидные клетки-II
Cbr2	Lamp3	Tff2
Hp	Lyz2	Reg3g
Cyp2f2	Napsa	Bpifb1
Prdx6	Slc34a2	Muc5b
Scgb1a1	Lyz1	Sult1d1
Ldhb	Rnase4	Fxyd3
Ces1d	Hc	Scgb3a1
Cckar	Cd74	Lypd2
Selenbp1	Scd1	Chad
Gstm2	Sftpc	S100a6
Scnn1b	Lgi3	Pglyrp1
Scgb1c1	Cldn18	Aldh3a1
Plpp3	Etv5	Bpifa1
Ephx1	Cxcl15	Gsto1
Dcxr	S100g	Lgals3
Alas1	Elov11	Pigr
Retnla	Fas	Scgb3a2
Sec14l3	H2-Aa	Ltf
Ptgr1	Fabp5	Qsox1
Krtap17-1	Rn4.5s	Cyp2a5
		Cpd
		Ly6a
		Perp
		Kcne3
		Il13ra1
		Slc15a2
		Cd14

[Вариант 10] Способ согласно любому из вариантов 1-9, дополнительно включающий культивирование в культуральной среде, не содержащей описанной выше

комбинации, клеток, культивируемых в культуральной среде, содержащей описанную выше комбинацию.

[Вариант 11] Органоид, происходящий от эпителиальной клетки легких или клетки рака легких, и полученный способом согласно любому из вариантов 1-10.

[Вариант 12] Органоид, происходящий от эпителиальной клетки легких и содержащий внутриполостной слой и клеточный слой, обращенный к внутриполостному слою, где эпителиальная клетка легких представляет собой альвеолярную клетку, а клеточный слой по существу состоит из: клеток AT2; комбинации клеток AT2 с клетками, экспрессирующими маркер клеток AT2 и маркер бронхиального эпителия; или клеток, экспрессирующих маркер бронхиального эпителия, или где эпителиальная клетка легких представляет собой клетку дыхательных путей, а клеточный слой по существу состоит из комбинации базальных клеток с клетками, экспрессирующими маркер базальных клеток и маркер бронхиального эпителия.

[Вариант 13] Органоид согласно варианту 12, где эпителиальная клетка легких представляет собой альвеолярную клетку, клеточный слой по существу состоит из клеток AT2, где клетки AT2 экспрессируют один или оба NT2-280 и SFTPC, а NT2-280 локализуется в клеточных мембранах или вблизи клеточных мембран клеток AT2, где клеточные мембраны обращены вовнутрь полости.

[Вариант 14] Органоид согласно варианту 12, где маркер клеток AT2 представляет собой один или оба из NT2-280 и SFTPC, маркер бронхиального эпителия представляет собой SOX2, и/или маркер базальных клеток представляет собой KRT5.

[Вариант 15] Регенеративная лекарственная композиция, содержащая органоид, происходящий от эпителиальной клетки легких и полученный способом согласно любому из вариантов 1-10; органоид, происходящий от эпителиальной клетки легких согласно любому из вариантов 12-14 и/или клетки из органоида.

[Вариант 16] Регенеративная лекарственная композиция, содержащая клетки эпителия легких, где клетки эпителия легких, по существу, состоят из булавовидных клеток - I, клеток AT2 или булавовидных клеток - II, экспрессирующих по меньшей мере один из клеточных маркеров, перечисленных в Таблице А, и их гомологов.

Таблица А

Булавовидные клетки-I	Клетки AT2	Булавовидные клетки-II
Cbr2	Lamp3	Tff2
Hp	Lyz2	Reg3g
Cyp2f2	Napsa	Bpifb1
Prdx6	Slc34a2	Muc5b
Scgb1a1	Lyz1	Sult1d1
Ldhb	Rnase4	Fxyd3
Ces1d	Hc	Scgb3a1

Cckar	Cd74	Lypd2
Selenbp1	Scd1	Chad
Gstm2	Sftpc	S100a6
Scnn1b	Lgi3	Pglyrp1
Scgb1c1	Cldn18	Aldh3a1
Plpp3	Etv5	Bpifa1
Ephx1	Cxcl15	Gsto1
Dcxr	S100g	Lgals3
Alas1	Elov11	Pigr
Retnla	Fas	Scgb3a2
Sec14l3	H2-Aa	Ltf
Ptgr1	Fabp5	Qsox1
Krtap17-1	Rn4.5s	Cyp2a5
		Cpd
		Ly6a
		Perp
		Kcne3
		Il13ra1
		Slc15a2
		Cd14

[Вариант 17] Способ скрининга вещества, эффективного для лечения рака легких, где указанный способ включает контактирование исследуемого вещества с органоидом, происходящим от клетки рака легких и полученным способом согласно любому из вариантов 1-10; анализ органоида после его контактирования с исследуемым веществом и сравнение значения, полученного для органоида после его контактирования с исследуемым веществом, с контрольным значением.

[Вариант 18] Фармацевтическая композиция, содержащая средство для лечения повреждения или заболевания легких и клетки эпителия легких, по существу состоящие из булавовидных клеток-II, где булавовидные клетки II выбраны из образца, включающего клетки эпителия легких, на основе по меньшей мере одного из клеточных маркеров, соответствующих булавовидным клеткам-II, и перечисленных в Таблице А, и их гомологов.

Краткое описание чертежей

[0012]

На фиг. 1 представлен график рассеяния эпителиальных стволовых клеток легких, иллюстрирующий интенсивность флуоресценции белка, флуоресцирующего в зеленом

диапазоне спектра (GFP), испускаемого эпителиальными стволовыми клетками легких, полученными от мыши SFTPC-GFP.

На фиг. 2 представлена гистограмма, иллюстрирующая скорость образования органоидов, происходящих от стволовых клеток эпителия легких во фракции GFP^{hi} , где органоиды образуются в культуральной среде, содержащей внеклеточный матрикс в качестве остова.

На фиг. 3 представлена гистограмма, показывающая большую ось органоидов, происходящих из стволовых клеток эпителия легких во фракции GFP^{hi} , где органоиды образуются в культуральной среде, содержащей внеклеточный матрикс в качестве остова.

На фиг. 4 представлена гистограмма, иллюстрирующая скорость образования органоидов, происходящих от стволовых клеток эпителия легких во фракции GFP^{lo} , где органоиды образуются в культуральной среде, содержащей внеклеточный матрикс в качестве остова.

На фиг. 5 представлена гистограмма, иллюстрирующая большую ось органоидов, происходящих от стволовых клеток эпителия легких во фракции GFP^{lo} , где органоиды образуются в культуральной среде, содержащей внеклеточный матрикс в качестве остова.

На фиг. 6 представлена гистограмма, иллюстрирующая скорость образования органоидов, происходящих от стволовых клеток эпителия легких, где органоиды образуются в культуральной среде, содержащей внеклеточный матрикс в качестве диспергированного компонента.

На фиг. 7 представлена гистограмма, иллюстрирующая процент образования органоидов, полученных из клеток рака легких.

На фиг. 8 представлена диаграмма рассеяния эпителиальных стволовых клеток легких, иллюстрирующая интенсивность флуоресценции GFP, испускаемой из эпителиальных стволовых клеток легких, полученных от мыши SFTPC-GFP.

На фиг. 9 представлена гистограмма, иллюстрирующая уровни экспрессии каждого маркерного гена для отдельных фракций GFP.

На фиг. 10 показаны флуоресцентные изображения органоидов, происходящих от эпителиальных стволовых клеток легких во фракции GFP^{neg} .

На фиг. 11 показаны флуоресцентные изображения органоидов, происходящих от эпителиальных стволовых клеток легких во фракции GFP^{lo} .

На фиг. 12 показаны флуоресцентные изображения органоидов, происходящих от эпителиальных стволовых клеток легких во фракции GFP^{hi} .

На фиг. 13A представлена гистограмма, иллюстрирующая скорость образования органоидов, происходящих от стволовых клеток эпителия легких во фракции GFP^{hi} , где органоиды образуются в культуральной среде, содержащей внеклеточный матрикс в качестве остова. На фиг. 13B представлен график, иллюстрирующий большую ось органоидов, происходящих от эпителиальных стволовых клеток легких во фракции GFP^{hi} , где органоиды образуются в культуральной среде, содержащей внеклеточный матрикс в качестве остова.

На фиг. 14А представлена гистограмма, иллюстрирующая скорость образования органоидов, происходящих от стволовых клеток эпителия легких во фракции GFP^{lo}, где органоиды образуются в культуральной среде, содержащей внеклеточный матрикс в качестве остова. На фиг. 14В представлен график, иллюстрирующий большую ось органоидов, происходящих от эпителиальных стволовых клеток легких во фракции GFP^{lo}, где органоиды образуются в культуральной среде, содержащей внеклеточный матрикс в качестве остова.

На фиг. 15А представлена гистограмма, иллюстрирующая скорость образования органоидов, происходящих от стволовых клеток эпителия легких во фракции GFP^{neg}, где органоиды образуются в культуральной среде, содержащей внеклеточный матрикс в качестве остова. На фиг. 15В представлен график, иллюстрирующий большую ось органоидов, происходящих от эпителиальных стволовых клеток легких во фракции GFP^{neg}, где органоиды образуются в культуральной среде, содержащей внеклеточный матрикс в качестве остова.

На фиг. 16А представлена схематическое изображение мышцы-донора и мышцы-реципиента, как описано в Примере 3.

На фиг. 16В представлена диаграмма, иллюстрирующая схему, описанную в Примере 3. На фиг. 16С представлено флуоресцентное изображение, иллюстрирующее замороженный срез легких мышцы, в который были инъецированы клетки, выделенные из органоидов. На фиг. 16D показаны увеличенные флуоресцентные изображения области, окруженной белым квадратом как показано на фиг. 16С.

На фиг. 17А представлено сделанное под микроскопом изображение, показывающее органоиды, образованные из альвеолярных клеток человека. На фиг. 17В представлено сделанное под микроскопом изображение, показывающее органоиды, образованные из клеток дыхательных путей человека.

На фиг. 18А представлено флуоресцентное изображение органоида легочного альвеолярного типа, образованного из альвеолярных клеток человека. На фиг. 18В представлено флуоресцентное изображение органоида бронхиоальвеолярного типа, образованного из альвеолярных клеток человека. На фиг. 18С представлено флуоресцентное изображение органоида бронхиального типа, образованного из альвеолярных клеток человека.

На фиг. 19А представлен график областей клеток, составляющих органоиды, культивированные из клеточной популяции. На фиг. 19В представлен график периметров клеток, составляющих органоиды, культивированные из клеточной популяции. На фиг. 19С представлен график большой оси клеток, составляющих органоиды, культивируемые в клеточной популяции. На фиг. 19D представлен график малой оси клеток, составляющих органоиды, культивированные из клеточной популяции. На фиг. 19E представлен график округлости клеток, составляющих органоиды, культивированные из клеточной популяции. На фиг. 19F представлен график значений (средних значений) уровня серого для клеток, составляющих органоиды, культивированные из клеточной

популяции. На фиг. 19G представлен график значений уровня серого (моды значений) для клеток, составляющих органоиды, культивированные из клеточной популяции. На фиг. 19H представлен график центроидов клеток, составляющих органоиды, культивированные из клеточной популяции.

На фиг. 20A представлен график областей клеток, составляющих органоиды, культивированные из отдельных клеток. На фиг. 20B представлен график периметров клеток, составляющих органоиды, культивированные из отдельных клеток. На фиг. 20C представлен график большой оси клеток, составляющих органоиды, культивируемые в отдельных клетках. На фиг. 20D представлен график малой оси клеток, составляющих органоиды, культивированные из отдельных клеток. На фиг. 20E представлен график округлости клеток, составляющих органоиды, культивированные из отдельных клеток. На фиг. 20F представлен график значений уровня серого (средних значений) для клеток, составляющих органоиды, культивированные из отдельных клеток. На фиг. 20G представлен график значений уровня серого (моды значений) для клеток, составляющих органоиды, культивированные из отдельных клеток. На фиг. 20H представлен график центроидов клеток, составляющих органоиды, культивированные из отдельных клеток.

На фиг. 21A представлена диаграмма рассеяния уровней экспрессии *Scgbl1* в отдельных кластерах. На фиг. 21B представлена диаграмма рассеяния уровней экспрессии *Sftpc* в отдельных кластерах. На фиг. 21C представлена диаграмма рассеяния клеток определенных типов в отдельных кластерах. На фиг. 21D представлен график площадей отдельных кластеров.

На фиг. 22 представлен график, иллюстрирующий высокую экспрессию девяти маркеров клеточной поверхности в клетках, соответствующих кластеру 2.

На фиг. 23A представлена гистограмма уровней экспрессии маркерных генов в $CD14^{+/-}$ -клетках. На фиг. 23B представлен график площадей $CD14^{+/-}$ -клеток.

На фиг. 24A показаны сделанные под микроскопом изображения $CD14^{+/-}$ -клеток на 9 день после культивирования. На фиг. 24B представлена гистограмма процентного содержания органоидов, полученных из $CD14^{+/-}$ -клеток.

На фиг. 25 представлена гистограмма уровней экспрессии маркерных генов в органоидах, полученных из $CD14^{+/-}$ -клеток.

На фиг. 26A показаны флуоресцентные изображения иммунологически окрашенного органоида, полученного из $CD14^{+}$ -клеток, на 9-й день после культивирования. На фиг. 26B показаны флуоресцентные изображения иммунологически окрашенного органоида, полученного из $CD14^{+}$ -клеток на 12-й день после культивирования.

На фиг. 27A представлена гистограмма количества кластеров, наблюдаемых в легких, в которые инъектировали $CD14^{+}$ -клетки. На фиг. 27B представлен график числа клеток, составляющих кластеры, наблюдаемые в легких, в которые инъектировали $CD14^{+/-}$ -клетки.

На фиг. 28 показаны флуоресцентные изображения, указывающие на то, что

CD14⁺-клетки, инъецированные в поврежденные блеомицином легкие, дифференцировались в клетки альвеолярного эпителия типа 1 (далее называемые «клетками AT1») или клетки альвеолярного эпителия типа 2 (далее называемые «клетками AT2»).

На фиг. 29 показаны флуоресцентные изображения, указывающие на то, что CD14⁺-клетки, инъецированные в поврежденные блеомицином легкие, дифференцируются в реснитчатые клетки.

Описание вариантов изобретения

[0013]

[Способ получения органоида, происходящего от эпителиальной клетки легких или клетки рака легких]

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу получения органоида, происходящего от эпителиальной клетки легких или клетки рака легких. Указанный способ включает культивирование образца, содержащего эпителиальную клетку легких или клетку рака легких, в культуральной среде, где культуральная среда содержит 0-10% (об./об.) внеклеточного матрикса и дополнительные агенты согласно изобретению, и где культуральная среда по существу не содержит фидерных клеток.

[0014]

Используемый здесь термин «органOID» относится к живому тканеподобному клеточному агрегату, продуцируемому *in vitro* в трех измерениях. В случае органоида, термин «подобный живой ткани» или «напоминающий живую ткань» означает, что органOID имеет анатомическую структуру, аналогичную структуре живой ткани. Большинство клеток, составляющих органOID, обладают, например, способностью дифференцироваться и размножаться. Культивируемые клетки, составляющие органOID, могут быть дифференцированы в клетки различных типов в соответствии с известными способами. Так, например, культивируемые клетки, составляющие органOID, могут быть дифференцированы в клетки различных типов путем добавления в культуральную среду или исключения из культуральной среды дополнительных агентов. Так, например, культивируемые клетки, составляющие органOID, могут быть индуцированы для дифференцировки путем их культивирования в культуральной среде, не содержащей дополнительных агентов согласно изобретению. ОрганOID может частично содержать дифференцированные клетки или клетки, не обладающие способностью к дифференцировке. Так, например, органOID может быть получен в соответствии с известными способами культивирования клеток. Так, например, органOID может быть получен путем поддержания данной клетки в культуральной среде, содержащей дополнительные агенты согласно настоящему изобретению, в устройстве для культивирования клеток. В одном варианте осуществления изобретения, органOID представляет собой органOID, полученный из эпителиальной стволовой клетки легких или клетки рака легких.

[0015]

В одном варианте осуществления изобретения, органоид представляет собой агрегат культивируемых клеток, при этом, такой агрегат имеет диаметр по меньшей мере 50 мкм при наблюдении под микроскопом. Если агрегат культивируемых клеток имеет эллиптическую форму, то его диаметр равен длине длинной оси. Диаметр агрегата культивируемых клеток сложной формы равен диаметру описанной окружности клеточного агрегата. Эффективность образования органоидов, то есть, эффективность образования колоний (CFE), представляет собой процент [%], вычисленный путем деления количества органоидов, диаметр которых составляет не менее 50 мкм, в культивируемом продукте на 6-й день после культивирования образца, включающего эпителиальные клетки легких или клеток рака легких в культуральной среде, на количество эпителиальных клеток легких или клеток рака легких, добавленных в культуральную среду.

[0016]

Используемый здесь термин «стволовая клетка» относится к клетке, способной к самопролиферации (называемой «способностью к пролиферации») и к дифференцировке в клетки определенного типа (называемой «способностью к дифференцировке»). Так, например, стволовые клетки могут дифференцироваться в эпителиальные стволовые клетки. Так, например, стволовые клетки также могут пролиферироваться, сохраняя при этом свою способность к дифференцировке в соответствии с известными способами. Так, например, стволовые клетки могут также пролиферироваться и дифференцироваться в клетки определенного типа в соответствии с известными способами.

[0017]

Используемый здесь термин «эпителиальная клетка легких» относится к клетке, которая составляет эпителиальную ткань легких. Эпителиальная клетка легких может представлять собой, например, булавовидную клетку, реснитчатую клетку, нейроэндокринную клетку, базальную клетку, бокаловидную клетку, альвеолярную эпителиальную клетку или эпителиальную стволовую клетку легких, способную дифференцироваться в вышеуказанные клетки. Альвеолярные эпителиальные клетки могут представлять собой, например, альвеолярные эпителиальные клетки типа 1 (альвеолярные эпителиальные клетки типа I: клетки AT1) или альвеолярные эпителиальные клетки типа 2 (клетки AT2) или те и другие. Используемый здесь термин «эпителиальная стволовая клетка легких» относится к клетке, которая присутствует в ткани легких и способна дифференцироваться в специфические эпителиальные клетки легких и пролиферироваться. Легочная ткань включает, например, трахею, бронхи, бронхиолы и легочные альвеолы.

[0018]

Эпителиальная стволовая клетка легких обладает способностью дифференцироваться по меньшей мере в клетки одного типа, например, выбранные из группы, состоящей из базальной клетки, булавовидной клетки и клетки альвеолярного эпителия типа 2. Эпителиальная стволовая клетка легких может представлять собой,

например, бронхоальвеолярную стволовую клетку (бронхоальвеолярные стволовые клетки: BASC). Эпителиальные стволовые клетки легких могут быть получены в соответствии с известными способами (например, способами, описанными в Патентном документе 2).

[0019]

Базальные клетки обладают способностью дифференцироваться в булавовидные клетки и реснитчатые клетки во время регенерации поврежденной трахеи в условиях гомеостатической регуляции. Булавовидные клетки обладают способностью дифференцироваться в реснитчатые клетки во время регенерации поврежденной трахеи в условиях гомеостатической регуляции. Булавовидные клетки обладают способностью дифференцироваться в клетки AT2 и клетки AT1 во время регенерации сильно поврежденных легочных альвеол.

[0020]

Используемый здесь термин «альвеолярная клетка» относится к клетке, полученной из ткани легочных альвеол. Альвеолярная клетка может быть получена из ткани легочных альвеол известными способами. Альвеолярные клетки являются коммерчески доступными. Альвеолярные клетки могут включать альвеолярные эпителиальные клетки. В одном примере, альвеолярные клетки включают одну или обе клетки AT1 и клетки AT2. Используемый здесь термин «клетка дыхательных путей» относится к клетке, полученной из ткани дыхательных путей. Клетка дыхательных путей может быть получена из ткани дыхательных путей известными способами. Клетки дыхательных путей являются коммерчески доступными.

[0021]

«Образец, включающий эпителиальную клетку легких» может быть получен, например, из легочной ткани млекопитающих. Так, например, образец, включающий эпителиальную клетку легких, может быть получен из ткани легких млекопитающего с использованием заданного клеточного маркера (например, специфического белка на поверхности клеточной мембраны) в качестве индикатора. Предварительно определенным клеточным маркером может быть, например, EPCAM. Образец, включающий эпителиальные клетки легких, может быть использован для получения образца, включающего эпителиальные клетки легких нужного типа. Так, например, при получении образца, включающего эпителиальные клетки легких нужного типа, рецептор фактора роста нервных клеток (NGFR) может быть использован в качестве клеточного маркера для базальных клеток (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.106 (31):12771-12775). Так, например, AT2-280 может быть использован в качестве клеточного маркера для клеток AT2 (Journal of Histochemistry & Cytochemistry, vol. 58 (10): 891-901, 2010). Так, например, клеточные маркеры могут представлять собой специфические РНК-мишени в живых клетках. РНК-мишень может представлять собой EPCAM, Sftpc, KRT-5 или Scgb1a1.

[0022]

Если конкретный белок на поверхности клеточной мембраны используется в

качестве заранее определенного клеточного маркера, то могут быть использованы меченные флуорофором антитела против этого белка, а флуоресценция, испускаемая флуорофором, может быть использована в качестве индикатора. Известные устройства (например, FACS) могут быть использованы для получения клеток с помощью клеточного маркера в качестве индикатора. Если РНК-мишень используется в качестве заранее определенного клеточного маркера, то такой способ получения может включать фракционирование образца, содержащего эпителиальные клетки легких, с помощью FACS в заранее определенных условиях и идентификацию типа клеток в полученном вышеупомянутом фракционированном образце на основе РНК-мишени (например, ОТ-ПЦР).

[0023]

Так, например, образцы, включающие эпителиальные клетки легких, получают путем разрезания ткани легких млекопитающих на небольшие кусочки, обработки этих кусочков ткани легких протеазой (например, коллагеназой, диспазой, эластазой или трипсином), с последующим их переносом в заранее определенный раствор и суспендированием в этом растворе (например, в базальной среде). Приготовленная клеточная суспензия может быть отфильтрована и/или центрифугирована для удаления чужеродного материала, такого как остатки ткани. В одном варианте осуществления изобретения, образец, включающий эпителиальные клетки легких, может быть получен из легочной ткани взрослого, неполовозрелого, новорожденного или младенца млекопитающего. В одном варианте осуществления изобретения, образец, включающий эпителиальные клетки легких, может включать эпителиальные клетки легких (но не включает модификации, сообщающие плюрипотентность), генетически модифицированные так, чтобы они обладали желаемыми свойствами после их получения из легочной ткани млекопитающих.

[0024]

В одном варианте осуществления изобретения, эпителиальные клетки легких, включенные в образец, содержат по меньшей мере клетки одного типа, выбранные из группы, состоящей из базальных клеток, булавовидных клеток, бронхиоальвеолярных стволовых клеток и альвеолярных эпителиальных клеток (например, одной или обеих клеток АТ1 и клеток АТ2). Образцы, включающие эпителиальные клетки легких, являются коммерчески доступными. Образец, включающий эпителиальные клетки легких, может представлять собой, например, образец, включающий альвеолярные клетки человека, или образец, включающий клетки дыхательных путей человека. В одном варианте осуществления изобретения, эпителиальные клетки легких, включенные в образец, могут состоять по существу из клеток по меньшей мере одного, по меньшей мере двух или по меньшей мере трех типов, выбранных из группы, состоящей из базальных клеток, булавовидных клеток, стволовых клеток эпителия бронхов и альвеолярных эпителиальных клеток. В одном варианте осуществления изобретения, эпителиальные клетки легких, включенные в образец, состоят по существу из клеток альвеолярного

эпителия типа 2. В одном варианте осуществления изобретения, эпителиальные клетки легких, включенные в образец, состоят по существу из булавовидных клеток. В одном варианте осуществления изобретения, эпителиальные клетки легких, включенные в образец, состоят по существу из комбинации базальных клеток и булавовидных клеток. Словосочетание «состоит в основном из», если оно относится к эпителиальным клеткам легких, не исключает понятия «состоит только из». В одном варианте осуществления изобретения, эпителиальные клетки легких, включенные в образец, состоят только из клеток определенного типа. Эпителиальные клетки легких, включенные в образец, включают, например, клетки определенного типа, содержание которых составляет не менее 80%, не менее 85%, не менее 90%, не менее 95%, не менее 97%, не менее 98% или не менее 99%.

[0025]

В одном варианте осуществления изобретения, способ согласно данному аспекту дополнительно включает приготовление образца, содержащего эпителиальную клетку легких или раковую клетку легких, из легочной ткани млекопитающего. Приготовление образца может быть осуществлено в соответствии с раскрытыми здесь способами или известными способами. Используемый здесь термин «клетка рака легких» означает, например, опухолевую клетку, полученную из опухоли легких. Клетка рака легких может представлять собой, например, опухолевую клетку, которая циркулирует или не циркулирует в кровотоке. Клетки рака легких могут быть, например, коммерчески доступными или могут быть получены из легочной ткани, которая включает опухолевые клетки, в соответствии с известными способами. Клетка рака легких представляет собой, например, клетку аденокарциномы легких.

[0026]

Используемый здесь термин «образец, включающий клетки рака легких» может означать, например, образец, который был фракционирован из ткани легких млекопитающего, страдающего раком легких, с использованием маркера клеток рака легких в качестве индикатора. Клеточный маркер рака легких может представлять собой, например, SOX2, CD24, CD44, CD133, CD166 и ESA или их комбинацию. Так, например, клетки рака легких могут быть фракционированы с помощью FACS, в котором маркер клеток рака легких используется в качестве индикатора. Так, например, образец, который включает клетки рака легких, может быть получен путем суспендирования коммерчески доступных клеток рака легких, культивированных и пролиферирующих, в определенном растворе. Так, например, образцы, содержащие клетки рака легких, могут быть приготовлены в соответствии со способами, описанными для образцов, включающих эпителиальные клетки легких. Образец, включающий клетки рака легких, может также включать, например, нормальные эпителиальные клетки легких.

[0027]

Используемый здесь термин «млекопитающее» относится, например, к человеку или млекопитающему, не являющемуся человеком. Млекопитающими, не являющимися

человеком, могут быть, например, грызуны, такие как мыши, крысы, морские свинки или хомяки; приматы, не являющиеся человеком, такие как шимпанзе; парнокопытные, такие как коровы, козы или овцы; непарнокопытные, такие как лошади, и животные-компаньоны, такие как кролики, собаки или кошки. В одном варианте осуществления изобретения, млекопитающими являются грызуны или приматы, кроме человека. В одном варианте осуществления изобретения, млекопитающим является человек.

[0028]

Используемый здесь термин «органOID, полученный из эпителиальной клетки легких», или «органOID, полученный из клетки рака легких» относится к конструкции, подобной биологической ткани, полученной *in vitro* в трех измерениях, при этом, эту конструкцию получают из эпителиальной клетки (клеток) легких или клетки (клеток) рака легких. В одном варианте осуществления изобретения, органOID, полученный из эпителиальных клеток легких или клеток рака легких, представляет собой органOID, образованный путем культивирования эпителиальных клеток легких или клеток рака легких в культуральной среде, содержащей дополнительные агенты согласно изобретению. В одном варианте осуществления изобретения, органOID, полученный из эпителиальных клеток легких, включает внутрислойный слой и клеточный слой, обращенный к внутрислойному слою.

[0029]

Используемый здесь термин «культуральная среда» относится к жидкости, содержащей компоненты, необходимые для культивирования клеток. Культуральная среда включает, например, базальную среду и дополнительные агенты согласно настоящему изобретению. Культуральная среда может быть приготовлена, например, путем объединения базальной среды с дополнительными агентами согласно изобретению. Так, например, культуральная среда может быть приготовлена путем смешивания смеси, которая включает заданные количества каждого компонента (в твердой форме) для базальной среды и заданные количества дополнительных агентов (в твердой форме) согласно изобретению, с чистой водой до достижения заданных концентраций. Культуральная среда может дополнительно содержать фидерные клетки, которые способствуют пролиферации стволовых клеток, и внеклеточный матрикс. Так, например, культуральная среда может быть приготовлена путем добавления к смеси базальной среды и дополнительных агентов согласно изобретению одной или обеих фидерных клеток, которые стимулируют пролиферацию стволовых клеток, и внеклеточного матрикса.

[0030]

Используемый здесь термин «базальная среда» может означать известную среду для культивирования клеток и может представлять собой, например, среду Игла, модифицированную по способу Дульбекко (DMEM), минимальную поддерживающую среду (MEM), базальную среду Игла X (BME) или DMEM/F12. В одном варианте осуществления изобретения, базальная среда представляет собой DMEM/F12.

[0031]

Используемый здесь термин «дополнительные агенты» означает комбинацию двух или более веществ, которые влияют на эффективность образования органоидов, происходящих от эпителиальной(ых) клетки(клеток) легких или клетки(клеток) рака легких. Дополнительные агенты могут представлять собой, например, комбинацию двух или более веществ, которые повышают эффективность образования органоидов, происходящих от эпителиальных клеток легких или клеток рака легких. Дополнительные агенты могут включать, например, вещество, которое позволяет клеткам, составляющим сформированный органоид, сохранять способность к дифференцировке или индуцировать дифференцировку в клетки определенного типа.

[0032]

В одном варианте осуществления изобретения, дополнительные агенты могут представлять собой комбинацию, включающую по меньшей мере один фактор или состоящую по меньшей мере из одного фактора, выбранного из группы, состоящей из фактора роста кератиноцитов (KGF), фактора роста гепатоцитов (HGF) и фактора роста фибробластов (FGF) 10; ингибитора белка остеогенеза (BMP) (например, Ноггина); и ингибитора TGF β (например, SB431542). Предпочтительно, комбинация дополнительно содержит агент, способный активировать передачу сигналов Wnt (например, CHIR99021) вследствие эффективного образования органоидов AT2. Комбинация может дополнительно содержать ингибитор Rock (например, Y-27632).

[0033]

Благодаря эффективному образованию органоидов, дополнительные агенты могут представлять собой комбинацию, включающую агент или состоящую из агента, способного активировать передачу сигналов Wnt (например, CHIR99021), ингибитора BMP (например, Ноггин), ингибитора TGF β (например, SB431542) и HGF. Комбинация может дополнительно содержать ингибитор Rock.

[0034]

Благодаря более эффективному образованию органоидов, дополнительные агенты могут представлять собой комбинацию, включающую один или оба из KGF и FGF10 или ингибитор BMP (например, Ноггин); ингибитор TGF β (например, SB431542); и HGF или состоящую из них. В одном варианте осуществления изобретения, дополнительные агенты представляют собой комбинацию, включающую KGF, FGF10, ингибитор BMP (например, Ноггин); ингибитор TGF β (например, SB431542); и HGF или состоящую из них. Благодаря эффективному образованию органоидов AT2, комбинация предпочтительно дополнительно содержит агент, способный активировать передачу сигналов Wnt (например, CHIR99021). Комбинация может дополнительно содержать ингибитор Rock.

[0035]

Благодаря дальнейшему эффективному образованию органоидов, дополнительные агенты представляют собой комбинацию, включающую KGF, FGF10, агент, способный активировать передачу сигналов Wnt (например, CHIR99021), ингибитор BMP (например,

Ноггин), ингибитор TGF β (например, SB431542), HGF и FGF10, или состоящую из них. Дополнительные агенты представляют собой, например, комбинацию, включающую KGF, FGF10, агент, способный активировать передачу сигналов Wnt (например, CHIR99021), ингибитор BMP (например, Ноггин), ингибитор TGF β (например, SB431542), HGF, FGF10 и ингибитор Rock, или состоящую из них.

[0036]

Используемый здесь термин «фактор роста кератиноцитов (KGF)» относится к веществу, которое стимулирует пролиферацию эпителиальных клеток, составляющих поверхность кожи и слизистую оболочку ротовой полости, желудка и кишечного тракта. Так, например, KGF являются коммерчески доступными. Так, например, концентрация KGF при его включении в культуральную среду составляет 10-250 нг/мл, 20-100 нг/мл и 30-70 нг/мл, а предпочтительно, 50 нг/мл. KGF иногда обозначается здесь аббревиатурой «К».

[0037]

Используемый здесь термин «фактор роста гепатоцитов (HGF)» относится к цитокину, известному как наиболее активный фактор роста гепатоцитов. HGF обычно имеет гетеродимерную структуру с дисульфидной связью между тяжелой цепью с молекулярной массой приблизительно 60000 и легкой цепью с молекулярной массой приблизительно 35000. Так, например, HGF являются коммерчески доступными. Так, например, концентрация HGF, при его включении в культуральную среду, составляет 5-150 нг/мл, 10-75 нг/мл и 20-40 нг/мл, а предпочтительно 30 нг/мл. HGF иногда обозначается здесь аббревиатурой «Н».

[0038]

Используемый здесь термин «фактор роста фибробластов (FGF)10» относится к фактору передачи сигнала, который стимулирует пролиферацию, миграцию и дифференцировку эпителиальных клеток и тем самым способствует восстановлению поврежденной кожи или ткани слизистой оболочки. Так, например, FGF10 являются коммерчески доступными. Так, например, концентрация FGF10, при его включении в культуральную среду, составляет 10-250 нг/мл, 20-100 нг/мл и 30-70 нг/мл, а предпочтительно 50 нг/мл. FGF10 иногда обозначается здесь как «F10».

[0039]

Используемый здесь термин «агент, способный активировать передачу сигналов Wnt» относится к веществу, которое активирует транскрипцию посредством фактора транскрипции Т-клеток (TCF/LEF) в клетках. Агент, способный активировать передачу сигналов Wnt, также известен как агонист Wnt. Агентом, способным активировать передачу сигналов Wnt, может быть, например, вещество, которое ингибирует серин-треониновую протеинкиназу GSK-3, которая опосредует фосфорилирование аминокислотных остатков серина и треонина (это вещество называется «ингибитором GSK»); ингибитор белка семейства Wnt, или ингибитор разложения β -катенина, или комбинация двух или более из этих веществ. Так, например, агенты, способные

активировать передачу сигналов Wnt, являются коммерчески доступными.

[0040]

Агент, способный активировать передачу сигналов Wnt, может представлять собой, например, ингибитор GSK-3. Ингибитором GSK-3 может быть, например, SB216763 (Chemscene LLC), CHIR-98014 (Abcam), TWS119 (Cayman Chemical) или CHIR99021 (Sigma) или комбинация двух или более из этих веществ. Агент, способный активировать передачу сигналов Wnt, может представлять собой, например, белок семейства Wnt (называемый «лигандом Wnt»). Белок семейства Wnt может представлять собой, например, любой из 19 белков, происходящих от генов Wnt, известных специалистам в данной области, или комбинацию двух или более из этих веществ. Так, например, белок семейства Wnt может представлять собой Wnt-1, -2, -3a, -6, -7a, -7b, -8a, -9a, -10a или -16 или комбинацию двух или более из них. Белком семейства Wnt может быть, например, Wnt1. Агент, способный активировать передачу сигналов Wnt, может представлять собой, например, ингибитор разложения β -катенина. Ингибитор разложения β -катенина может представлять собой, например, вещество, которое ингибирует фосфорилирование β -катенина (например, UBE1-41).

[0041]

В одном варианте осуществления изобретения, агент, способный активировать передачу сигналов Wnt, представляет собой ингибитор GSK-3. Ингибитор GSK-3 предпочтительно представляет собой CHIR99021. Так, например, агент, способный активировать передачу сигналов Wnt, имеет такую концентрацию, при которой он может оказывать эффект ингибирования, соответствующий CHIR99021 в концентрации 0,5-15 мкМ, 1-7 мкМ или 2-5 мкМ, а предпочтительно 3 мкМ при включении в культуральную среду. CHIR99021 иногда обозначается здесь как «С».

[0042]

Используемый здесь термин «ингибитор BMP» относится к веществу, которое связывается с молекулой BMP с образованием комплекса. Ингибитором BMP может быть, например, низкомолекулярное соединение, белок (например, антитела), ДНК, РНК, малая интерферирующая РНК или антисмысловый олигонуклеотид. Так, например, ингибиторы BMP являются коммерчески доступными. Ингибитором BMP могут быть, например, Ноггин (ингибитор BMP), Хордин и хордин-подобные белки (системы R&D), содержащие хординовые домены, фоллистатин и родственные фоллистатину белки (системы R&D), содержащие фоллистатиновый домен, DAN и DAN-подобные белки (системы R&D), содержащие домен цистеинового узла DAN, склеростин/SOST (системы R&D), декорин (системы R&D) или макроглобулин альфа-2 (системы R&D), или комбинация двух или более из них. В одном варианте осуществления изобретения, ингибитор BMP представляет собой Ноггин. Так, например, BMP имеет такую концентрацию, при которой он может оказывать ингибирующее действие, соответствующее Ноггину в концентрации 20-500 нг/мл, 40-250 нг/мл и 80-125 нг/мл, а предпочтительно 100 нг/мл при включении в культуральную среду. Ноггин иногда обозначается здесь аббревиатурой «N».

[0043]

Используемый здесь термин «ингибитор TGF β » относится к веществу, которое ингибирует передачу сигналов TGF β . Ингибитор TGF β представляет собой, например, вещество, которое ингибирует внутриклеточную передачу сигналов посредством фосфорилирования белка Smad2/3 серин/треонинкиназой рецептора типа 1 (ALK5), активируемой связыванием TGF β . Ингибитор TGF- β может представлять собой, например, низкомолекулярное соединение, белок (например, антитело), ДНК, РНК, малую интерферирующую РНК или антисмысловый олигонуклеотид. Ингибиторами TGF- β могут быть A83-01 (Abcam), SB-431542 (Calbiochem), SB-505124 (системы R&D), SB-525334 (Chemscene LLC), LY364947 (Sigma-Aldrich), SD-208 (Sigma-Aldrich) или SJN2511 (системы R&D), или комбинация двух или более из них. В одном варианте осуществления изобретения, ингибитором TGF β является SB431542. Так, например, ингибитор TGF β имеет такую концентрацию, при котором он может оказывать эффект ингибирования, соответствующий SB431542 в концентрации 2-50 мкМ, 4-25 мкМ или 8-12 мкМ, а предпочтительно 10 мкМ при включении в культуральную среду. SB431542 иногда обозначается здесь как «S».

[0044]

Используемый здесь термин «эпидермальный фактор роста (EGF)» относится к белку, который регулирует рост и пролиферацию клеток посредством связывания с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) на клеточной поверхности. В основном, EGF имеет молекулярную массу приблизительно 6000 дальтон и состоит из 53 аминокислотных остатков и трех внутримолекулярных дисульфидных связей. Так, например, EGF являются коммерчески доступными (например, поставляются Corning). Так, например, концентрация EGF, при его включении в культуральную среду, составляет 5-125 нг/мл, 10-60 нг/мл, 20-30 нг/мл, а предпочтительно 25 нг/мл. EGF иногда обозначается здесь аббревиатурой «E».

[0045]

Используемый здесь термин «ингибитор Rho-киназы (ROCK)» означает, например, моногидрат дигидрохлорида R-(+)-транс-4-(1-аминоэтил)-N-(4-пиридил)циклогексанкарбоксамида (Y-27632, Sigma-Aldrich), 5-(1,4-дiazепан-1-илсульфонил)изохинолин (Fasudil или HA1077, Cayman Chemical) или дигидрохлорид (S)-(+)-2-метил-1-[(4-метил-5-изохинолинил)сульфонил]-гексагидро-1H-1,4-дiazепина (H-1152, Tocris Bioscience). Так, например, ингибиторы ROCK являются коммерчески доступными. В одном аспекте изобретения, ингибитор ROCK представляет собой Y-27632. Ингибитор ROCK имеет такую концентрацию, при которой он может оказывать ингибирующее действие, соответствующее действию Y-27632 в концентрации 2-50 мкМ, 4-25 мкМ или 8-12 мкМ, а предпочтительно 10 мкМ при включении в культуральную среду. Y-27632 иногда обозначается здесь как «Y».

[0046]

В одном варианте осуществления изобретения, дополнительные агенты согласно

изобретению могут представлять собой комбинацию по меньшей мере одного вещества, выбранного из группы, состоящей из KGF, FGF10 и HGF; ингибитора BMP; и ингибитора TGF β . Дополнительные агенты могут также включать один или оба агента, способных активировать передачу сигналов Wnt, и ингибитор ROCK. В одном варианте осуществления изобретения, дополнительные агенты могут представлять собой, например, комбинацию KGF, ингибитора BMP, ингибитора TGF β ; комбинацию KGF, агента, способного активировать передачу сигналов Wnt, ингибитора BMP, ингибитора TGF β ; комбинацию FGF10, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ; комбинацию FGF10, агента, способного активировать передачу сигналов Wnt, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ; комбинацию HGF, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ; комбинацию HGF, агента, способного активировать передачу сигналов Wnt, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ; комбинацию KGF, FGF10, HGF, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ; комбинацию KGF, FGF10, HGF, агента, способного активировать передачу сигналов Wnt, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ; комбинацию ингибитора ROCK, KGF, FGF10, HGF, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ; или комбинацию ингибитора ROCK, KGF, FGF10, HGF, агента, способного активировать передачу сигналов Wnt, ингибитора BMP и ингибитора TGF β . В этих дополнительных агентах, ингибитором BMP может быть Noggin; ингибитор TGF β может представлять собой SB431542; агент, способный активировать передачу сигналов Wnt, может представлять собой CHIR99021; и/или ингибитор ROCK может представлять собой Y-27632.

[0047]

В одном варианте осуществления изобретения, культуральная среда содержит «внеклеточный матрикс». Внеклеточный матрикс (ECM) включает, но не ограничивается ими, воду, полисахариды, эластин, интегрин и гликопротеины. Гликопротеины включают, например, коллаген, энтактин (нидоген), фибронектин и ламинин. Так, например, ECM может быть получен путем культивирования клеток, продуцирующих ECM (например, эпителиальных клеток, эндотелиальных клеток, клеток, подобных эндодермальным клеткам теменной доли или фибробластов) *in vitro*, с последующим удалением клеток, продуцирующих ECM. Клетки, продуцирующие ECM, могут представлять собой, например, хрящевые клетки, преимущественно продуцирующие коллаген и хондроциты; фибробласты, преимущественно продуцирующие коллаген типа IV, ламинин, стромальный проколлаген и фибронектин; и стромальные фибробласты, преимущественно продуцирующие коллаген (типа I, III и V), хондроитинсульфатные протеогликаны, гиалуроновую кислоту, фибронектин и тенасцин-C. ECM является коммерчески доступным. Коммерчески доступный внеклеточный матрикс может представлять собой, например, белок внеклеточного матрикса (Invitrogen), препараты базальной мембраны, полученные из мышечных клеток саркомы Энгельбрета-Хольма-Свама (EHS) (например, экстракт базальной мембраны Cultrex® (Trevigen, Inc.) или Matrigel®) (Corning Inc.)). ECM может представлять собой синтетический внеклеточный матрикс (например, ProNectin (Sigma Z378666)). Внеклеточный матрикс может

представлять собой внеклеточный матрикс одного вида или смесь двух или более видов. В одном варианте осуществления изобретения, ЕСМ представляет собой Матригель. В одном варианте осуществления изобретения, культуральная среда не содержит внеклеточного матрикса.

[0048]

Внеклеточный матрикс может присутствовать как «диспергированный компонент», если он включен в культуральную среду. Так, например, внеклеточный матрикс в качестве диспергированного компонента находится в форме, в которой компоненты внеклеточного матрикса диспергированы или растворены в культуральной среде. Внеклеточный матрикс в качестве диспергированного компонента включен, например, в количестве 10% об./об. или менее, 7% об./об. или менее, 5% об./об. или менее, например, 2,5% об./об. на объем культуральной среды. В одном варианте осуществления изобретения, культуральная среда содержит внеклеточный матрикс в количестве 0-10% об./об., 0-7% об./об., 0-5% об./об., 0,1-10% об./об., 0,1-7% об./об., 0,1-5% об./об., 1-10% об./об., 1-7% об./об., 1-5% об./об., 1-2,5% об./об., 2-10% об./об., 2-7% об./об., 2-5% об./об. или 2-2,5% об./об. Предположительно, что внеклеточный матрикс содержит препараты биологического происхождения (например, препараты базальной мембраны из клеток саркомы мыши). В этом случае, внеклеточный матрикс предпочтительно присутствует в культуральной среде в низких концентрациях для предотвращения образования микроорганизмов или уменьшения степени загрязнения этими микроорганизмами.

[0049]

Внеклеточный матрикс может присутствовать как «остов», если он включен в культуральную среду. Так, например, внеклеточный матрикс в качестве остова представляет собой форму для обеспечения клеток микроокружением, которое хотя бы частично напоминает клеточную нишу, в которой клетки присутствуют в природе. Внеклеточный матрикс в качестве остова может присутствовать, например, в форме геля. Внеклеточный матрикс в качестве остова может представлять собой, например, гель, количество которого составляет более 10% об./об., не менее 20% об./об., не менее 30% об./об., не менее 50% об./об. или не менее 70% об./об.

[0050]

Используемый здесь термин «фидерная клетка» относится к типу клеток, используемых для стимуляции пролиферации стволовых клеток. Фидерные клетки в основном используются для обеспечения поверхностей, подходящих для стимуляции пролиферации представляющих интерес клеток путем совместного культивирования с представляющими интерес клетками. Фидерные клетки сами по себе представляют собой клетки, выделенные из клеток определенного типа (например, первичных фибробластов взрослых мышей, клеточной линии фибробластов мышей (MLg) и клеточной линии эмбриональных фибробластов человека: MRC-5). Фидерные клетки получают путем введения антибиотиков или облучения гамма-лучами так, чтобы клетки не погибали раньше времени. Использование фидерных клеток нежелательно, поскольку это

усложняет пассирование представляющих интерес клеток. В одном варианте осуществления изобретения, культуральная среда по существу не содержит фидерных клеток. Используемый здесь термин «практически не содержит» не исключает понятия «полностью не содержит». В одном варианте осуществления изобретения, культуральная среда, по существу свободная от фидерных клеток, почти не включает фидерные клетки. В одном варианте осуществления изобретения, культуральная среда, по существу свободная от фидерных клеток, может включать менее 3%, менее 2%, менее 1% или менее 0,5% фидерных клеток по отношению к числу культивируемых клеток, где клетки включают клетки эпителия легких или клетки рака легких для культивирования. Предпочтительно, культуральная среда, включающая эпителиальные клетки легких или клетки рака легких, подлежащие культивированию, не включает фидерные клетки.

[0051]

Способы, раскрытые в Патентном документе 2, могут быть применены в качестве способа «культивирования» образца, включающего эпителиальные клетки легких или клетки рака легких, в культуральной среде. Способ культивирования может включать, например, введение образца, включающего эпителиальные клетки легких или клетки рака легких, в культуральную среду в сосуде для культивирования и поддержание культуральной среды при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Температура культивирования не ограничивается 37°C, но может быть подходящим образом использована любая температура, известная специалистам в области культивирования клеток. Концентрация CO₂ не ограничивается 5%, но может быть соответствующим образом использована любая концентрация CO₂, известная специалистам в области культивирования клеток. Культуральная среда может быть заменена новой культуральной средой через любые интервалы времени, например, через каждые 1-14 дней, каждые 2-12 дней или каждые 3-10 дней. Так, например, культуральную среду можно заменять через каждые 3-7 дней, каждые 3-5 дней или каждые 3 дня, если культивируемыми клетками являются клетки эпителия легких. Так, например, культуральную среду можно заменять через каждые 3-14 дней, каждые 5-10 дней или каждые 10 дней, если культивируемыми клетками являются эпителиальные стволовые клетки рака легких.

[0052]

«Органоид, полученный из эпителиальной клетки легких» или «органойд, полученный из клетки рака легких» в результате культивирования, может быть выделен из культуральной среды. Выделение может включать, например, фракционирование клеток по их размеру и отделение органоидов от клеток, которые не образуют агрегаты клеток. Так, например, выделение может быть осуществлено с помощью CELL HANDLER (Yamaha).

[0053]

В одном варианте осуществления изобретения, способ согласно аспекту настоящего изобретения включает отбор булавовидных клеток - I, клеток AT2 или булавовидных клеток - II из образца, который включает эпителиальные клетки легких,

приготовленные из ткани легких млекопитающего, на основе по меньшей мере одного из клеточных маркеров, соответствующих булавовидным клеткам - I, клеткам AT2 или булавовидным клеткам - II, и перечисленных в Таблице А, и их гомологов, перед культивированием образца в культуральной среде, содержащей дополнительные агенты согласно изобретению.

[Таблица 1]

Таблица А

Булавовидные клетки-I	Клетки AT2	Булавовидные клетки-II
Cbr2	Lamp3	Tff2
Hp	Lyz2	Reg3g
Cyp2f2	Napsa	Bpifb1
Prdx6	Slc34a2	Muc5b
Scgb1a1	Lyz1	Sult1d1
Ldhb	Rnase4	Fxyd3
Ces1d	Hc	Scgb3a1
Cckar	Cd74	Lypd2
Selenbp1	Scd1	Chad
Gstm2	Sftpc	S100a6
Scnn1b	Lgi3	Pglyrp1
Scgb1c1	Cldn18	Aldh3a1
Plpp3	Etv5	Bpifa1
Ephx1	Cxcl15	Gsto1
Dcxr	S100g	Lgals3
Alas1	Elov11	Pigr
Retnla	Fas	Scgb3a2
Sec14l3	H2-Aa	Ltf
Ptgr1	Fabp5	Qsox1
Krtap17-1	Rn4.5s	Cyp2a5
		Cpd
		Ly6a
		Perp
		Kcne3
		Il13ra1
		Slc15a2
		Cd14

[0054]

В одном варианте осуществления изобретения, способ включает отбор булавовидных клеток-I из образца на основе по меньшей мере одного из клеточных маркеров для булавовидных клеток I, перечисленных в Таблице А, и их гомологов. В одном варианте осуществления изобретения, способ включает отбор клеток АТ2 из образца на основе по меньшей мере одного из клеточных маркеров для клеток АТ2, перечисленных в Таблице А, и их гомологов. В одном варианте осуществления изобретения, способ включает отбор булавовидных клеток -II из образца на основе по меньшей мере одного из клеточных маркеров для булавовидных клеток-II, перечисленных в Таблице А, и их гомологов.

[0055]

Используемый здесь термин «булавовидные клетки-I» относится к булавовидным клеткам, которые экспрессирует по меньшей мере один из клеточных маркеров, перечисленных в Таблице А, и их гомологов. Так, например, булавовидные клетки-I образуют органоиды в культуральной среде, содержащей дополнительные агенты согласно изобретению. Так, например, булавовидные клетки I экспрессируют по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три или по меньшей мере четыре клеточных маркера, выбранных из группы, состоящей из Cbr2, Nr, Cyp2f2, Prdx6, Scgb1a1, Ldhd, Ces1d, Cckar, Selenbp1, Gstm2, Scnn1b, Scgb1c1, Plpp3, Ephx1, Dcxr, Alas1, Retnla, Sec14l3, Ptgr1 и Krtap17-1 и их гомологов.

[0056]

Используемый здесь термин «булавовидные клетки-II» относится к булавовидным клеткам, которые экспрессирует по меньшей мере один из клеточных маркеров, перечисленных в таблице А, и их гомологов. Так, например, булавовидные клетки-II образуют органоиды в культуральной среде, содержащей дополнительные агенты согласно изобретению. Так, например, булавовидные клетки-II имеют тенденцию к образованию органоидов в большей степени, чем булавовидные клетки-I. Так, например, булавовидные клетки-II экспрессируют по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три или по меньшей мере четыре клеточных маркера, выбранных из группы, состоящей из Tff2, Reg3g, Bpifb1, Muc5b, Sult1d1, Fxyd3, Scgb3a1, Lypd2, Chad, S100a6, Pglyrp1, Aldh3a1, Bpifa1, Gsto1, Lgals3, Pigr, Scgb3a2, Ltf, Qsox1, Cyp2a5, Cpd, Ly6a, Perp, Kcne3, Il13ra1, Slc15a2 и Cd14 и их гомологов. Так, например, булавовидные клетки-II экспрессируют по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три или по меньшей мере четыре клеточных маркера, выбранных из группы, состоящей из Fxyd3, Pigr, Cpd, Ly6a, Perp, Kcne3, Il13ra1, Slc15a2 и Cd14 и их гомологов.

[0057]

Термин «клетка АТ2» или «клетка альвеолярного эпителия типа 2» в соответствии с вариантами осуществления изобретения, в которых предварительно определенные клетки выбирают на основе клеточных маркеров, относится к клетке АТ2, экспрессирующей по меньшей мере один из клеточных маркеров, перечисленных в

Таблице А, и их гомологов. Так, например, клетки АТ2 образуют органоиды в культуральной среде, содержащей дополнительные агенты согласно изобретению. Так, например, клетки АТ2 экспрессируют по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три или по меньшей мере четыре клеточных маркера, выбранных из группы, состоящей из Lamp3, Lyz2, Napsa, Slc34a2, Lyz1, Rnase4, Hc, Cd74, Scd1, Sftpc, Lgi3, Cldn18, Etv5, Cxcl15, S100g, Elovl1, Fas, H2-Aa, Fabp5 и Rn4.5s и их гомологов.

[0058]

Используемый здесь термин «выбор» заранее определенных клеток означает выбор предварительно определенных клеток из образца, включающего клетки различных типов. Так, например, выбор предварительно определенных клеток может быть осуществлен путем оценки экспрессии маркеров предварительно определенных клеток (например, клеточных маркеров, перечисленных в Таблице А) в образце, содержащем клетки различных типов, и фракционирования клеток, экспрессирующих маркеры предварительно определенных клеток, в качестве предварительно определенных клеток на основе результатов анализа. Так, например, выбор предварительно определенных клеток может быть проведен с помощью клеточного сортирования с активацией флуоресценции (FACS). FACS может быть проведен, например, с помощью имеющегося в продаже устройства FACS, в котором используется флуоресцентный зонд. Флуоресцентный зонд представляет собой зонд (например, антитело), способный связываться с данным клеточным маркером, конъюгированным с флуорофором. В одном примере, если уровень экспрессии маркеров предварительно определенных клеток индивидуума выше, чем уровень экспрессии маркеров предварительно определенных клеток у негативного контроля, то указанные клетки могут быть выбраны в качестве предварительно определенных клеток. Так, например, флуорофор может быть получен известными способами или является коммерчески доступным. Так, например, зонды, например, антитела, связывающиеся с маркером предварительно определенных клеток, могут быть получены известными способами или являются коммерчески доступными. Так, например, конъюгирование флуорофора с зондами может быть осуществлено в соответствии с известными способами. В одном варианте осуществления изобретения, отбор предварительно определенных клеток эпителия легких может быть проведен на основе экспрессии по меньшей мере одного из клеточных маркеров, перечисленных в Таблице А, и их гомологов.

[0059]

Используемый здесь термин «гомолог» относится к гену или белку, последовательность и функция которого подобны последовательностям и функциям генов или белков одного и того же или различных видов. Используемыми здесь гомологами являются ортологи, паралоги и ксенологи. Так, например, «гомолог» определенного гена или белка по меньшей мере на 75%, 80%, 85% или 90%, а предпочтительно по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологичен конкретному гену или белку. Гомология относится к проценту идентичных нуклеотидных или аминокислотных

остатков между двумя последовательностями генов или белков после выравнивания с помощью алгоритма выравнивания, известного специалистам в данной области. Так, например, гомология может быть определена известными способами или с помощью общедоступных компьютерных программ (например, BLAST или FASTA).

[0060]

Используемый здесь термин «Cbr2» относится к карбонилредуктазе 2, которая участвует в синтезе NADPH.

Используемый здесь термин «Hr» здесь относится к гаптоглобину, который представляет собой белок, связывающий гемоглобин.

Используемый здесь термин «Cyp2f2» относится к цитохрому P450(CYP)2f2, который представляет собой специфичный для мышей мембраносвязанный белок, локализующийся на мембране эндоплазматического ретикулума. Известны также гомологи Cyp2f2 у млекопитающих, не являющихся мышами. Так, например, CYO2F1 является гомологом у человека.

Используемый здесь термин «Prdx6» относится к пероксиредоксину-6, который представляет собой белок, принадлежащий к семейству антиоксидантных ферментов пероксиредоксина. Белок, кодируемый геном PDRX6, является гомологом у человека.

Используемый здесь термин «Scgbl1a» относится к члену семейства секретоглобулинов 1A, который обладает противовоспалительным действием.

[0061]

Используемый здесь термин «Ldhb» относится к лактатдегидрогеназе B, которая представляет собой мономер фермента LDH, кодируемого геном LDHB.

Используемый здесь термин «Ces1d» относится к карбоксиэстеразе 1d.

Используемый здесь термин «Cckar» относится к рецептору холецистокинина A, который представляет собой подтип A двух различных подтипов рецепторов, связанных с G-белком посредством пептидных гормонов.

[0062]

Используемый здесь термин «Selenbp1» относится к селен-связывающему белку 1, который представляет собой белок, принадлежащий к семейству селен-связывающих белков. Selenbp1 кодируется геном SELENBP1 у человека.

Используемый здесь термин «Gstm2» относится к глутатион-S-трансферазе Mu2, которая представляет собой фермент, кодируемый геном GSTM2 у человека.

Используемый здесь термин «Scnn1b» относится к субъединице бета 1 натриевого канала, которая представляет собой белок, кодируемый геном SCN1B у человека.

[0063]

Используемый здесь термин «Scgblc1» относится к секретоглобину 1C1, также известному как лиганд-связывающий белок RYD5 Scgblc1. Scgblc1 кодируется геном секретоглобина 1C1.

Используемый здесь термин «Ppp3» относится к фосфолипидфосфатазе 3, также известной как фосфатаза фосфатидной кислоты типа 2B. Ppp3 представляет собой

фермент, кодируемый геном PPAR2B на хромосоме 1 человека.

Используемый здесь термин «Eрhх1» относится к ферменту 1, гидролизующему эпоксид, который является ферментом, кодируемым геном EPHX1 у человека.

[0064]

Используемый здесь термин «Dсхг» относится к дикарбонил-L-дикарбонилу, который представляет собой многофункциональный белок, участвующий в различных белок-белковых взаимодействиях в различных физиологических системах.

Используемый здесь термин «Alas1» относится к белку, известному как синтаза 1 дельта-аминолевулиновой кислоты, которая кодируется геном ALAS1 у человека.

Используемый здесь термин «Retnla» относится к резистин-подобной молекуле альфа, которая представляет собой белок, принадлежащий к семейству небольших секреторируемых белков, богатых цистеином.

[0065]

Используемый здесь термин «Sec14l3» относится к SEC14-подобному белку 3, который также известен как токоферол-ассоциированный белок 2 и представляет собой белок-переносчик фосфатидилинозита, который играет важную роль в биогенезе транспортных везикул, происходящих от аппарата Гольджи.

Используемый здесь термин «Ptgr1» относится к простагландинредуктазе 1, которая представляет собой белок, участвующий в катаболизме эйкозаноидов и в перекисном окислении липидов 4-гидроксиноненаля и т.п.

Используемый здесь термин «Krtap17-1» относится к кератин-ассоциированному белку 17-1, который представляет собой белок, принадлежащий к семейству кератин-ассоциированных белков (КАР).

[0066]

Используемый здесь термин «Tff2» относится к фактору «трилистника» 2, который представляет собой белок, кодируемый геном TFF2 у человека.

Используемый здесь термин «Reg3g» относится к регенерирующему белку 3-гамма панкреатических островков, который представляет собой белок, кодируемый геном REG3G у человека.

Используемый здесь термин «Vpifb1» относится к члену 1 семейства В, содержащему складчатый ВРІ, который представляет собой белок, кодируемый геном VPIFB1 у человека.

[0067]

Используемый здесь термин «Muc5b» относится к муцину 5 подтипа В, который представляет собой белок, кодируемый геном MUC5B у человека.

Используемый здесь термин «Sult1d1» относится к члену 1 сульфотрансферазы 1D, которая переносит сульфатные группы на гормоны и нейротрансмиттеры. Известно, что он является псевдогенным из-за мутации у человека.

Используемый здесь термин «Fхyд3» относится к регулятору 3 транспорта ионов, содержащему домен FXVD, который представляет собой белок, кодируемый геном

FXVD3 у человека.

[0068]

Используемый здесь термин «Scgb3a1» относится к члену 1 семейства секретоглобинов 3А, который представляет собой белок, кодируемый геном SCGB3A1 у человека.

Используемый здесь термин «Lypd2» относится к белку 2, содержащему домен Ly6/PLAUR, который представляет собой белок, кодируемый геном LYPD1 у человека.

Используемый здесь термин «Chad» относится к кадгерину, который представляет собой трансмембранный гликопротеин, участвующий в адгезии клеток животных.

[0069]

Используемый здесь термин «S100a6» относится к кальций-связывающему белку S100 A6, который представляет собой белок, кодируемый геном S100A6 у человека.

Используемый здесь термин «Pglyrp1» относится к пептидогликановому белку 1, распознающему пептидогликан, который представляет собой белок, кодируемый геном PGLYRP1 у человека.

Используемый здесь термин «Aldh3a1» относится к члену A1 семейства альдегиддегидрогеназы 3, который представляет собой белок, кодируемый геном ALDH3A1 у человека.

[0070]

Используемый здесь термин «Bpifa1» относится к белку клона эпителия неба, легких и носа (PLUNC), который представляет собой белок, кодируемый геном семейства A1, содержащим бактерицидные/увеличивающие проницаемость складки (BPIFA1).

Используемый здесь термин «Gsto1» относится к глутатион-S-трансферазе омега-1, которая представляет собой белок, кодируемый геном GSTO1 у человека.

Используемый здесь термин «Lgals3» относится к галектину-3, который представляет собой белок, кодируемый геном LGALS3 у человека и принадлежащий к семейству лектинов.

[0071]

Используемый здесь термин «Pigr» относится к макромолекулярному рецептору иммуноглобулина, который представляет собой трансмембранный белок, кодируемый геном PIGR у человека.

Используемый здесь термин «Scgb3a2» относится к члену 2 семейства секретоглобинов 3А, который представляет собой белок, кодируемый геном SCGB3A2 у человека.

Используемый здесь термин «Ltf» относится к лактоферрину, который представляет собой железо-связывающий гликопротеин, в основном содержащийся в молоке млекопитающих.

[0072]

Используемый здесь термин «Qsox1» относится к сульфгидрилоксидазе 1, которая представляет собой белок, кодируемый геном QSOX1 у человека.

Используемый здесь термин «Cyp2a5» относится к цитохрому P450(CYP)2A5, который представляет собой белок, экспрессируемый в обонятельном эпителии печени и носовой полости у мышей. Известны гомологи или ортологи Cyp2a5 у млекопитающих, не являющихся мышами. Так, например, ортологом является CYP2A6/13 у человека и CYP2A3 у крыс.

[0073]

Используемый здесь термин «Cpd» относится к карбоксипептидазе D, которая представляет собой белок, кодируемый геном CPD у человека.

Используемый здесь термин «Lуба» относится к комплексу антигена б лимфоцитов, локуса A, который также обозначается как Sca-1 и представляет собой белок, заякоренный гликозилфосфатидилинозитом (GPI).

Используемый здесь термин «Perp» относится к эффектору апоптоза p53, связанному с RMP-22, который представляет собой мембранный белок, кодируемый геном PERP у человека.

[0074]

Используемый здесь термин «Kcne3» относится к калиевому потенциалзависимому каналу, родственному семейству Isk, члену 3, который также упоминается здесь как MinK-родственный пептид 2 (MiRP2). Kcne3 представляет собой белок, кодируемый геном KCNE3 у человека.

Используемый здесь термин «Il3га1» относится к субъединице альфа 1 рецептора интерлейкина-13, которая образует гетеродимер с альфа-рецептором интерлейкина-4 и функционирует как рецептор интерлейкина-13.

Используемый здесь термин «Slc15a2» относится к семейству переносчиков растворенного вещества 15, члену 2, который упоминается как переносчик протон-связывающего пептида.

[0075]

Используемый здесь термин «Cd14» относится к белку CD14, который функционирует как компонент, используемый в системе врожденного иммунитета. CD14 может представлять собой, например, мембраносвязанный белок, mCD14 или растворимый белок, sCD14. Так, например, CD14 представляет собой mCD14, если он используется для отбора булавовидных клеток-II.

Используемый здесь термин «Lamp3» относится к ассоциированному с лизосомами мембранному гликопротеину 3, который представляет собой белок, кодируемый геном LAMP3 у человека.

Используемый здесь термин «Lyz2» относится к лизоциму C-2.

[0076]

Используемый здесь термин «Napsa» относится к напсину A, который представляет собой аспартатпротеиназу, кодируемую геном NAPSA у человека.

Используемый здесь термин «Slc34a2» относится к натрий-зависимому белку-переносчику фосфатов 2B (NaPi2b), который является белком, кодируемым геном SLC34

A2 у человека.

Используемый здесь термин «Lyz1» относится к лизоциму C-1.

[0077]

Используемый здесь термин «РНКаза 4» относится к рибонуклеазе 4, которая представляет собой белок, кодируемый геном РНКазы 4 у человека.

Используемый здесь термин «Hc» относится к гемолитическому комплементу, который является компонентом системы комплемента при врожденном иммунитете.

Используемый здесь термин «Cd74» относится к гамма-цепи антигена главного комплекса гистосовместимости HLA класса II, которая представляет собой белок, кодируемый геном CD74 у человека.

[0078]

Используемый здесь термин «Scd1» относится к стеароил-CoA-десатуразе-1, которая представляет собой фермент, играющий важную роль в метаболизме жирных кислот.

Используемый здесь термин «Sftpс» относится к белку поверхностно-активного вещества С (SP-C), одному из белков поверхностно-активного вещества легких. Sftpс кодируется геном SFTPC у человека.

Используемый здесь термин «Lgi3» относится к богатому лейцином белку, инактивированному при глиоме 3, где указанный белок представляет собой секретлируемый белок, принадлежащий к семейству LGI у позвоночных.

[0079]

Используемый здесь термин «Clдn18» относится к клаудину 18, который представляет собой белок, кодируемый геном CLDN18 у человека.

Используемый здесь термин «Etv5» относится к варианту 5 Ets, который также называют фактором транскрипции ERM. Etv5 представляет собой фактор транскрипции, кодируемый геном ETV5 у человека.

Используемый здесь термин «Cxc15» относится к лиганду 15 хемокина (мотиву CXС), который представляет собой цитокин, принадлежащий к семейству хемокинов CXС.

[0080]

Используемый здесь термин «S100g» относится к кальций-связывающему белку S100 G, который представляет собой белок, кодируемый геном S100G у человека.

Используемый здесь термин «Elov11» относится к элонгазе 1 жирных кислот, которая представляет собой фермент, играющий важную роль в продуцировании насыщенных и мононенасыщенных длинноцепочечных жирных кислот.

Используемый здесь термин «Fas» относится к синтазе жирных кислот, которая представляет собой фермент, кодируемый геном FASN у человека.

[0081]

Используемый здесь термин «H2-Aa» относится к гистону H2A типа 1-A, который представляет собой белок, кодируемый геном HIST1H2AA у человека.

Используемый здесь термин «Fabp5» относится к белку, связывающему жирные кислоты эпидермального типа, который представляет собой белок, кодируемый геном FABP5 у человека.

Используемый здесь термин «Rn4.5s» относится к РНК 4.5S.

[0082]

В одном варианте осуществления изобретения, способ согласно аспекту изобретения включает дальнейшее культивирование в культуральной среде, не содержащей дополнительных агентов согласно изобретению, эпителиальных клеток легких, культивируемых в среде для культивирования, содержащей дополнительные агенты. В одном варианте осуществления изобретения, эпителиальные клетки легких, культивируемые в культуральной среде, могут образовывать клеточные агрегаты диаметром менее 50 мкм или органоиды. Базальные клетки эпителия легких, культивируемые в культуральной среде, предпочтительно образуют органоиды. Дальнейшее культивирование в культуральной среде, не содержащей дополнительных агентов, эпителиальных клеток легких, культивируемых в культуральной среде, содержащей дополнительные агенты согласно изобретению, может приводить к дифференцировке культивируемых эпителиальных клеток легких, например, из булавовидных клеток в клетки альвеолярного эпителия (например, клетки AT2, клетки AT1).

[0083]

Культуральная среда, не содержащая дополнительных агентов согласно изобретению, может представлять собой, например, базальную среду. Культивирование клеток в культуральной среде, содержащей дополнительные агенты, может включать, например, пассирование культивируемых клеток. Культивирование клеток в культуральной среде, не содержащей дополнительных агентов, может включать, например, пассирование культивируемых клеток. Время культивирования клеток в культуральной среде может составлять, например, 1-30 дней, 1-25 дней или 1-20 дней.

[0084]

Так, например, органоиды, полученные из эпителиальных клеток легких, могут имитировать общую физиологическую функцию эпителиальной ткани легких. Соответственно, органоиды, полученные из эпителиальных клеток легких, могут оказаться полезными в регенеративной медицине. Кроме того, органоиды, полученные из клеток рака легких, являются подходящими для скрининга веществ, эффективных для лечения рака легких (NATURE COMMUNICATIONS 2019 103991).

[0085]

[Органоид, полученный из эпителиальной клетки легких или раковой клетки легких]

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к органоиду, полученному из эпителиальной клетки легких или клетки рака легких. Органоид может быть получен из образца, включающего эпителиальную клетку легких или раковую

клетку легких, способом согласно изобретению. Продуцируемый органоид, полученный из эпителиальной клетки легких или клетки рака легких, содержит, например, внутрислойный слой и клеточный слой, обращенный к внутрислойному слою.

[0086]

В одном варианте осуществления изобретения, органоид, полученный из эпителиальной клетки легких, содержит внутрислойный слой и клеточный слой, обращенный к внутрислойному слою. В одном примере, органоид, полученный из эпителиальной клетки легких, может представлять собой органоид, полученный из эпителиальных клеток легких, или органоид, полученный из клеток дыхательных путей. В одном примере, органоид, полученный из эпителиальной клетки легких, содержит внутрислойный слой и клеточный слой, обращенный к внутрислойному слою, при этом, клеточный слой состоит в основном из клеток АТ2. В одном из примеров, клетки АТ2 экспрессируют, например, один или оба из NT2-280 и SFTPC, а NT2-280 локализуется в клеточных мембранах или вблизи от клеточных мембран клеток АТ2, обращенных к внутрислойному слою.

[0087]

В других примерах, органоид, полученный из эпителиальной клетки легких, содержит внутрислойный и клеточный слой, обращенный к внутрислойному слою, где клеточный слой состоит по существу из комбинации клеток АТ2 и клеток, экспрессирующих маркеры для клеток АТ2 и бронхиального эпителия. В другом примере, органоид, полученный из эпителиальной клетки легких, содержит внутрислойный и клеточный слой, обращенный к внутрислойному слою, при этом, клеточный слой состоит по существу из клеток, экспрессирующих маркер бронхиального эпителия. В одном примере, органоид, полученный из клетки дыхательных путей, включает внутрислойный и клеточный слой, обращенный к внутрислойному слою, где клеточный слой состоит в основном из базальных клеток и клеток, экспрессирующих маркеры базальных клеток и бронхиального эпителия.

[0088]

В качестве маркера для клеток АТ2 может быть использован, например, любой известный маркер для клетки АТ2. Маркером для клетки АТ2 может быть, например, один или оба из NT2-280 и SFTPC. В качестве маркера бронхиального эпителия может быть использован, например, любой известный маркер бронхиального эпителия. Маркером бронхиального эпителия может быть, например, SOX2. В качестве маркера базальной клетки может быть использован, например, любой известный маркер базальной клетки. Маркером базальной клетки может быть, например, KRT5.

[0089]

Используемый здесь термин «NT2-280» относится к белку размером 280-300 кДа, экспрессированному в клетках альвеолярного эпителия типа 2. Используемый здесь термин «SFTPC» относится к белку С поверхностно-активного вещества легких. SFTPC имеет гидрофобную структуру α -спирали, соединенную с 9 гидрофильными

аминокислотами, где структура α -спирали состоит из 26 аминокислот. Используемый здесь термин «SOX2» относится к SRY-боксу, содержащему ген 2. SOX2 состоит из сайта связывания ДНК, домена HMG (группы с высокой подвижностью) и его С-концевого домена активации транскрипции. Домен HMG содержит две сигнальные последовательности ядерной локализации, а SOX2 локализуется в ядре. Используемый здесь термин «KRT5» относится к белку промежуточного филамента, кодируемому геном KRT5 у человека.

[0090]

[Регенеративная лекарственная композиция]

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к регенеративной лекарственной композиции. В одном варианте осуществления изобретения, регенеративная лекарственная композиция содержит органоид, полученный из эпителиальной клетки легких в соответствии с настоящим изобретением, и/или любой органоид, описанный выше. В одном варианте осуществления изобретения, регенеративная лекарственная композиция содержит эпителиальные клетки легких, состоящие по существу из булавовидных клеток-I, клеток AT2 или булавовидных клеток-II, экспрессирующих по меньшей мере один из клеточных маркеров, перечисленных в Таблице А, и их гомологов.

[Таблица 2]

Таблица А

Булавовидные клетки-I	Клетки AT2	Булавовидные клетки-II
Cbr2	Lamp3	Tff2
Hp	Lyz2	Reg3g
Cyp2f2	Napsa	Bpifb1
Prdx6	Slc34a2	Muc5b
Scgb1a1	Lyz1	Sult1d1
Ldhb	Rnase4	Fxyd3
Ces1d	Hc	Scgb3a1
Cckar	Cd74	Lypd2
Selenbp1	Scd1	Chad
Gstm2	Sftpc	S100a6
Scnn1b	Lgi3	Pglyrp1
Scgb1c1	Cldn18	Aldh3a1
Plpp3	Etv5	Bpifa1
Ephx1	Cxcl15	Gsto1
Dcxr	S100g	Lgals3
Alas1	Elovl1	Pigr

Retnla	Fas	Scgb3a2
Sec14l3	H2-Aa	Ltf
Ptgr1	Fabp5	Qsox1
Krtap17-1	Rn4.5s	Cyp2a5
		Cpd
		Ly6a
		Perp
		Kcne3
		Il13ra1
		Slc15a2
		Cd14

[0091]

Регенеративная лекарственная композиция может представлять собой, например, фармацевтическую композицию для лечения повреждения или заболевания легких. В одном варианте осуществления изобретения, регенеративная лекарственная композиция, содержащая эпителиальные клетки легких, состоящие, по существу, из булавовидных клеток-I, клеток AT2 или булавовидных клеток-II, экспрессирующих по меньшей мере один из клеточных маркеров, описанных выше, может представлять собой фармацевтическую композицию, содержащую дополнительные агенты согласно изобретению. В одном примере, регенеративная лекарственная композиция, содержащая эпителиальные клетки легких, содержащие или состоящие по существу из булавовидных клеток-I, может быть применена в качестве регенеративной лекарственной композиции для лечения повреждения или заболевания легких, поскольку булавовидные клетки-I обладают способностью образовывать органоиды и дифференцироваться в клетки легочных альвеол и бронхов, не вызывая воспаления или других побочных эффектов в легком, в которое они доставляются.

[0092]

В одном примере, регенеративная лекарственная композиция, включающая эпителиальные клетки легких, содержащие булавовидные клетки-II или состоящие по существу из них, может быть применена в качестве фармацевтической композиции для лечения повреждения или заболевания легких с использованием булавовидных клеток-II в качестве носителей для лекарственного средства (например, органического соединения, гена или белка) для лечения поврежденных или больных легких. Соответственно, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей лекарственное средство для лечения повреждения или заболевания легких и эпителиальные клетки легких, состоящие по существу из булавовидных клеток-II, где булавовидные клетки-II выбирают из образца, включающего клетки эпителия легких, на основе клеточных маркеров для булавовидных клеток-II, перечисленных в Таблице А, и

их гомологов, где образец получают из ткани легких млекопитающего.

[0093]

Регенеративная лекарственная композиция может содержать, например, фармацевтически приемлемый носитель. Регенеративная лекарственная композиция может быть получена известными способами. Регенеративная лекарственная композиция может быть получена, например, путем смешивания органоидов, полученных из эпителиальных клеток легких, и/или клеток органоидов с фармацевтически приемлемым носителем. Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к любому компоненту, отличающемуся от органоидов, происходящих от эпителиальных клеток легких согласно изобретению, где указанный компонент является безопасным для млекопитающих и обладает низкой аллергической активностью. Фармацевтически приемлемый носитель включает, например, водный или безводный растворитель (например, физиологический раствор, базальную среду или раствор-консервант клеточной суспензии), подходящий для введения лекарственного средства, криопротектор (например, глицерин), водорастворимый полимер (например, декстран) или буфер (например, фосфатный буфер).

[0094]

Органоид, происходящий от эпителиальных клеток легких, может быть получен в соответствии со способом согласно изобретению. Органоид, полученный из эпителиальных клеток легких, включает внутрислойный слой и клеточный слой, обращенный к внутрислойному слою. «Клетки органоидов, происходящих из клеток легочного эпителия» могут представлять собой клетки в форме агрегата, составляющего органоид, происходящий из клеток легочного эпителия, и/или клеток в форме, индивидуально диспергированной из органоида, происходящего из клеток легочного эпителия. Клетки в форме, индивидуально диспергированной из органоида, полученного из эпителиальных клеток легких, могут быть приготовлены, например, путем обработки органоида протеазой (например, коллагеназой, диспазой, эластазой или трипсином), с последующим его суспендированием в заданном растворе (например, в базальной среде). Если регенеративная лекарственная композиция содержит клетки в форме агрегата, составляющего органоид, полученный из эпителиальных клеток легких, то клеточные агрегаты в регенеративной лекарственной композиции могут быть обработаны, например, для получения отдельных клеток перед их введением нуждающемуся в этом млекопитающему.

[0095]

Так, например, регенеративную лекарственную композицию вводят млекопитающему, нуждающемуся в этом, путем хирургической трансплантации в заданный участок или путем инъекции в заданный участок. Из-за сниженного отторжения трансплантата, млекопитающие, которым вводят регенеративную лекарственную композицию, предпочтительно должны относиться к тому же виду, а более предпочтительно, к тому же виду, что и млекопитающие, которым были введены

эпителиальные клетки легких для образования органоидов. Что касается регенеративной лекарственной композиции, то млекопитающим является, например, человек.

[0096]

Используемый здесь термин «повреждение легких» или «заболевание легких» относится, например, к патологическому заболеванию, раку легких (например, мелкоклеточному или немелкоклеточному раку легких (например, аденокарциноме, плоскоклеточной карциноме или крупноклеточной карциноме)), к интерстициальному заболеванию легких, к пневмонии (например, к пневмосклерозу), туберкулезу, муковисцидозу, бронхиту, легочному фиброзу, саркоидозу, гиперплазии типа II, хронической обструктивной болезни легких, эмфиземе, астме, отеку легких, острому респираторному дистресс-синдрому, стридору, бронхоэктазии, хантавирусному легочному синдрому, ближневосточному респираторному синдрому (MERS), тяжелому острому респираторному синдрому (SARS) и к пневмокоциозу. Патологическими заболеваниями могут быть, например, заболевания, вызванные аденовирусом, коронавирусом (например, COVID-19, SARS-CoV, SARS-CoV-2 или MERS-CoV или их мутантными штаммами), метапневмовирусом человека, вирусом гриппа, вирусом парагриппа, респираторно-синцитиальным вирусом, риновирусом, хантавирусами, энтеровирусами (например, энтеровирусом D68:EV-D68), *Bordetella pertussis*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *дифтерией*, *Coxiella burnetii*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Bacillus tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* или *Streptococcus pyogenes*.

[0097]

[Способ скрининга вещества, эффективного для лечения рака легких]

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу скрининга вещества, подходящего для лечения рака легких. Способ скрининга включает контактирование исследуемого вещества с органоидом, происходящим из клеток рака легких, полученных способом согласно изобретению; анализ органоида после контактирования с исследуемым веществом и сравнение значения, вычисленного для органоида после контактирования с рассматриваемым веществом, с контрольным значением. В одном варианте осуществления изобретения, способ включает определение, исходя из результатов сравнения, того факта, является ли исследуемое вещество эффективным для лечения рака легких.

[0098]

Используемый здесь термин «рак легких» может означать, например, мелкоклеточный рак легких или немелкоклеточный рак легких (например, аденокарциному, плоскоклеточную карциному или крупноклеточную карциному).

[0099]

Используемый здесь термин «исследуемое вещество» относится, например, к низкомолекулярному соединению, к белку (например, антителу), к ДНК, РНК, малой интерферирующей РНК или к антисмысловому олигонуклеотиду. Так, например,

рассматриваемое вещество может представлять собой средство для лечения заболевания или рака, отличающегося от рака легких. Так, например, рассматриваемое вещество может представлять собой вещество одного вида или смесь веществ двух или более видов. Рассматриваемое вещество предпочтительно представляет собой вещество одного вида.

[0100]

«Контактирование» органоида, полученного из клеток рака легких, с рассматриваемым веществом согласно изобретению означает помещение органоида и рассматриваемого вещества в условия, в которых они могут контактировать. Так, например, контакт между органоидом и рассматриваемым веществом может быть достигнут путем добавления рассматриваемого вещества к раствору, содержащему органоид.

[0101]

Используемый здесь термин «оценка органоида» может включать, например, определение размера органоида или оценку уровня экспрессии маркерного белка в клетках, составляющих органоид. Так, например, размер органоида может быть определен с помощью известного устройства (например, под микроскопом или с помощью FACS). Экспрессия маркерного белка в клетках, составляющих органоид, может быть оценена с помощью известного устройства (например, под микроскопом или с помощью FACS) и известного реагента (например, меченого флуорофором антитела). Так, например, размером органоида может быть периметр, диаметр (например, большая ось и малая ось) или площадь органоида. Так, например, экспрессия маркерного белка в клетках, составляющих органоид, может иметь интенсивность флуоресценции, соответствующую количеству маркерного белка на площадь органоида. Оцениваемый маркерный белок может представлять собой один маркерный белок или комбинацию двух или более маркерных белков. Оцениваемый маркерный белок предпочтительно представляет собой комбинацию двух или более маркерных белков.

[0102]

Используемый здесь термин «измеренное значение органоида» может означать, например, одно измеренное значение по одному измерению, среднее значение по множеству измерений или среднее значение измеренных значений по множеству органоидов. Измеренное значение органоида может представлять собой, например, измененное значение (например, разность или кратность) до и после контакта с исследуемым веществом.

[0103]

Используемый здесь термин «контрольное значение» может означать, например, измеренное значение, если в качестве контрольного вещества используется средство для лечения рака легких. Так, например, если измеренное значение для органоида представляет собой измеренное значение для органоида после контакта с исследуемым веществом, то контрольное значение может представлять собой измеренное значение для контрольного органоида, которым является органоид до контактирования с исследуемым

веществом или в отсутствии такого контактирования.

[0104]

В случае, если измеренным значением является размер органоида, то «определение» того факта, является ли исследуемое вещество эффективным для лечения рака легких, может включать, например, определение того факта, является ли исследуемое вещество эффективным для лечения рака легких, если размер органоида после контакта с исследуемым веществом меньше контрольного значения.

[0105]

[Культуральная среда]

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к культуральной среде для получения органоида из клеток эпителия легких или клеток рака легких. Культуральная среда содержит 0-10% об./об. внеклеточного матрикса и содержит комбинацию по меньшей мере одного фактора, выбранного из группы, состоящей из фактора роста кератиноцитов (KGF), фактора роста фибробластов (FGF) 10 и фактора роста гепатоцитов (HGF); ингибитора белка остеогенеза (BMP); и ингибитора TGF β .

[0106]

Так, например, культуральная среда может иметь жидкую форму, в которой каждый компонент смешан до желаемой концентрации. Так, например, культуральная среда может иметь твердую форму, в которой каждый компонент смешивают до достижения желаемой концентрации путем смешивания с заданным количеством чистой воды.

[0107]

Если это не оговорено особо, то описание терминов и вариантов осуществления изобретения в настоящей заявке надлежащим образом применимы и к другим аспектам и вариантам осуществления изобретения.

[0108]

Конкретные примеры описаны ниже. Однако, эти примеры даны лишь для описания предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения и никоим образом не ограничивают объем изобретения, определенный в прилагаемой формуле изобретения.

ПРИМЕРЫ

[0109]

[Пример получения 1]

(Получение суспензий, включающих эпителиальные стволовые клетки легких)

Были взяты мыши SFTPC-GFP. Эти мыши имеют ген, кодирующий белок, флуоресцирующий в зеленом диапазоне спектра (GFP) и находящийся под контролем промотора белка С поверхностно-активного вещества легких человека (SFTPC), и этот ген экспрессирует GFP вместе с Sftpc (J. Immunol 2008; 180: 881-888 и Rapid Communications: L349-L356). Срезы тканей периферических областей легких мышей SFTPC-GFP подвергали иммунологическому окрашиванию на Sftpc и Scgb1a1 (также известные как

CC10 или CCSP).

[0110]

Scgb1a1 известен как клеточный маркер булавовидных клеток. Вышеупомянутое иммунологическое окрашивание показало, что клетки AT2, экспрессирующие Sftpc и GFP, присутствуют в легочной альвеолярной области и что бронхиоальвеолярные стволовые клетки (BASC), экспрессирующие Sftpc, GFP и Scgb1a1, и булавовидные клетки (также известные как варианты булавовидных клеток), слабо экспрессирующие Sftpc и GFP и экспрессирующие Scgb1a1, присутствуют в периферической области бронхов. Паттерн экспрессии GFP в периферической области легких был аналогичен паттерну, описанному в STEM CELLS 2012; 30: 1948-1960. Результаты иммунологического окрашивания показали, что GFP, экспрессия которого регулируется промотором SFTPC, может быть использован в качестве индикатора для идентификации клеток AT2, BASC и булавовидных клеток, которые представляют собой легочные эпителиальные стволовые клетки, среди различных клеток в тканях легких SFTPC-GFP-мышей.

[0111]

SFTPC-GFP-мышь подвергали эвтаназии диоксидом углерода, и делали забор крови. Грудную клетку удаляли для обнажения легких и трахеи. Через трахею вводили SURFLO®, а именно, в легкие и трахею вводили 1,5 мл раствора протеазы. У SFTPC-GFP-мышей удаляли легкие и помещали на Schale, в который заливали 2,5 мл раствора протеазы. Легкие разрезали на мелкие кусочки на Schale и пипетировали для получения суспензии легочной ткани. Суспензию легочной ткани центрифугировали (400g × 5 мин) при 4°C, а затем осадок отделяли от супернатанта и супернатант отбрасывали. Осадок смешивали с PBS, содержащим 3% FBS, с получением суспензии, включающей стволовые клетки эпителия легких.

[0112]

Суспензию, включающую стволовые клетки эпителия легких, смешивали с антителом против EpCAM, меченным флуорофорами. Молекула эпителиальной клеточной адгезии (EpCAM) представляет собой трансмембранный гликопротеин типа I, известный как молекула межклеточной адгезии, специфичная для эпителиальных клеток. FACS Aria II (BD) использовали для идентификации легочных эпителиальных стволовых клеток на основе интенсивности флуоресценции, наблюдаемой при использовании антител против EpCAM. Идентифицированные легочные эпителиальные стволовые клетки были дополнительно разделены на три фракции, P17, P18 и P19, исходя из их интенсивности флуоресценции, излучаемой GFP (фиг. 1).

[0113]

[Пример испытаний 1]

Паттерны экспрессии маркерных генов исследовали для идентификации типов клеток в каждой фракции. Паттерны экспрессии маркерных генов исследовали путем амплификации каждого маркерного гена с помощью количественной ПЦР. Результат показал, что фракция P17 преимущественно включала булавовидные клетки, реснитчатые

клетки, альвеолярные эпителиальные клетки типа I (клетки AT1) и базальные клетки. Это также указывало на то, что фракция P18 включала варианты булавовидных (дистальных булавовидных) клеток, а фракция P19 включала клетки AT2 и BASC.

[0114]

(Базальная среда)

Суспензию фракции P19, включающую легочные эпителиальные стволовые клетки, суспензию фракции P18, включающую легочные эпителиальные стволовые клетки, и суспензию фракции P17, включающую легочные эпителиальные стволовые клетки, показанные на фиг. 1, культивировали без фидерных клеток с образованием органоидов. МТЕС/В27 использовали в качестве базальной среды для культивирования. Компоненты МТЕС/В27 описаны ниже.

[Таблица 3]

Компоненты	Дистрибьютор	Объем (мл)
DMEM/F12 без фенолового красного	Life technologies	500
1M HEPES	Nacalai tesque	7,5
7,5% NaHCO ₃	Nacalai tesque	2
Бессывороточная добавка B27 [®] (×50)	GIBCO	10
FBS (конечная концентрация 5%)	SIGMA	25
Фунгизон (конечная концентрация 250 нг/мл)	ThermoFisher	500 [мкл]
Пенициллин/стрептомицин (конечная концентрация 100 ед./мл, 100 мкг/мл)	Nacalai	5

[0115]

(Дополнительные агенты)

Базальную среду соответствующим образом дополняли описанными ниже дополнительными агентами для получения культуральной среды.

[Таблица 4]

Сокращенное название	Название	Дистрибьютор	Конечная концентрация	Столбец примечаний
K	Рекомбинантный мышинный KGF/Fgf7	R&D	50 нг/мл	Fgf7, лиганд Fgf
C	CHIR99021	SIGMA	3 мкМ	Ингибитор GSK-3 (активатор Wnt)
N	Рекомбинантный мышинный Ноггин	PeproTech	100 нг/мл	Ингибитор BMP
S	Ингибитор RI-киназы TGF-бета VI	Calbiochim	10 мкМ	Ингибитор ALK4,5

	SB431542			(ингибитор сигнала Tgf β)
H	Рекомбинантный мышинный HGF	R&D	30 нг/мл	Лиганд Met
F10	Рекомбинантный FGF-10 человека	PEPROTECH	50 нг/мл	Лиганд Fgf
E	EGF	Corning	25 нг/мл	Лиганд Egf
X	XAV939	SIGMA	10 мкМ	Ингибитор танкиразы (ингибитор Wnt/ β -катенина)
Y	Y-27632, дигидрохлоридная соль	LC Laboratories	10 мкМ	Ингибитор Rock

[0116]

(Образование органоидов из стволовых клеток эпителия легких)

Суспензию, включающую стволовые клетки эпителия легких, центрифугировали (400g, 10 минут, 4°C), а осадок суспендировали в МТЕС/В27. Эпителиальные стволовые клетки легких в заданном количестве смешивали с 50% или 75% Matrigel® (Matrigel Matrix с базальной мембраной и с пониженным уровнем фактора роста (Corning Corp.)). Полученную смесь по 20 мкл закапывали в каждую лунку 48-луночного планшета, нагретого до 37°C. Планшет выдерживали при 37°C в течение 20 минут для образования геля в каждой лунке. На образовавшийся гель наносили культуральную среду объемом 250 мкл, базальную среду с добавлением комбинации Hgf, Fgf10, KGF, Ноггина и SB431542. Планшет инкубировали при 37°C в течение 6 дней в атмосфере 5% CO₂. Культуральную среду заменяли один раз через каждые 3 дня.

[0117]

Каждую из суспензий фракций P17-P19, включающую легочные эпителиальные стволовые клетки, культивировали как описано выше. В результате, под микроскопом наблюдались клеточные агрегаты диаметром не менее 50 мкм. Продукты культивирования окрашивали иммуногистохимическим методом. Иммуногистохимическое окрашивание показало, что наблюдаемые клеточные агрегаты из фракции P19 представляли собой органоиды, экспрессирующие Sftpc и состоящие преимущественно из клеток AT2. Это указывало на то, что наблюдаемые клеточные агрегаты из фракции P18 представляли собой органоиды, состоящие преимущественно из клеток, экспрессирующих Sftpc и Scgbl1a1 и подобных вариантам булавовидных клеток. Это указывало на то, что наблюдаемые клеточные агрегаты из фракции P17 представляли собой органоиды, в высокой степени экспрессирующие Scgbl1a1, которые, как считалось, произошли от булавовидных клеток, и органоиды, состоящие преимущественно из клеток,

экспрессирующих Krt5, и эти органоиды были соответствующим образом сформированы.

[0118]

[Пример испытаний 2]

Суспензии, включающие легочные эпителиальные стволовые клетки, получали от каждой из шести SFTPC-GFP-мышей (n=6) как описано в Примере получения 1. Фракция, соответствующая фракции P19, и показанная на диаграмме рассеяния легочных эпителиальных стволовых клеток, построенной по данным интенсивности флуоресценции GFP на фигуре 1, далее будет называться фракцией GFP^{hi}. Таким образом, фракция, соответствующая фракции P18, у которой интенсивность флуоресценции GFP ниже, чем у фракции P19, далее будет называться фракцией GFP^{lo}. Фракция, соответствующая фракции P17, у которой интенсивность флуоресценции ниже, чем у фракции P18, далее будет называться фракцией GFP^{neg}.

[0119]

(Фракция GFP^{hi})

Суспензию фракции GFP^{hi}, включающую легочные эпителиальные стволовые клетки, культивировали как описано в Примере испытаний 1. В Примере испытаний 2, в культуральной среде добавляли следующую комбинацию дополнительных агентов, и суспензию, включающую эпителиальные стволовые клетки легких одного типа, культивировали в 4 лунках, которые включали 5000 клеток на лунку, в отличие от Примера испытаний 1.

[Таблица 5]

	Название	KCN S	HCN S	F10CNS	KNS	KC S	KC N	KF10HCN S	ECNS
K	KGF	+	-	-	+	+	+	+	-
C	CHIR9902 1	+	+	+	-	+	+	+	+
N	Ноггин	+	+	+	+	-	+	+	+
S	SB431542	+	+	+	+	+	-	+	+
H	HGF	-	+	-	-	-	-	+	-
F10	FGF10	-	-	+	-	-	-	+	-
E	EGF	-	-	-	-	-	-	-	+

+: Добавлен как дополнительный агент

-: Не добавлен как дополнительный агент

[0120]

После культивирования в течение 6 дней, культивируемые продукты визуализировали под микроскопом и с помощью компьютерной программы подсчитывали клеточные агрегаты диаметром не менее 50 мкм. Эффективность образования органоидов оценивали по ЭОК [%], то есть, по проценту, полученному путем деления количества клеточных агрегатов в каждой лунке на количество добавленных клеток. Среднее значение ЭОК (n=6) и его стандартное отклонение вычисляли по значениям ЭОК, полученным для 6 мышей (фиг. 2). Среднее значение большой оси [мкм] (n=6) и его стандартное отклонение вычисляли исходя из диаметров органоидов, полученных для 6

мышей (фиг. 3).

[0121]

Комбинации из четырех дополнительных агентов

На фигурах 2 и 3 показано, что объединение четырех дополнительных агентов, «KCNS», давало ЭОК приблизительно 0,18% и среднее значение на большой оси приблизительно 136 мкм, соответственно. Комбинация из четырех дополнительных агентов «HCNS», которая была получена путем замены в KCNS дополнительного агента К на Н, указывала на ЭОК и большую ось, соответственно, сравнимые с «KCNS». Этот результат позволяет предположить, что дополнительный агент «К» в комбинации из четырех дополнительных агентов KCNS был заменен на «Н», что способствовало эффективному образованию органоидов.

[0122]

Комбинация дополнительных агентов «F10CNS», которая была получена путем введения в «KCNS» дополнительного агента F10 вместо К, указывает на ЭОК и большую ось, соответственно, сравнимые с «KCNS». Этот результат позволяет предположить, что дополнительный агент «К» в комбинации дополнительных агентов «KCNS» был заменен на «F10», что способствовало эффективному образованию органоидов. Комбинация дополнительных агентов «ECNS», которая была получена путем введения в «KCNS» дополнительного агента Е вместо К, давала значительно более низкий эффект в отношении ЭОК, чем «KCNS» (критерий Тьюки, *: $P < 0,05$).

[0123]

Комбинации из трех дополнительных агентов

Было проведено исследование, играют ли три дополнительных агента, кроме дополнительного агента «К», который заменяет дополнительный агент «Н» или «F10» в комбинации из четырех дополнительных агентов «KCNS», важную роль в эффективном образовании органоидов (в отношении высокой ЭОК и значения большой оси органоидов). Комбинация дополнительных агентов «KCS», в которой был удален дополнительный агент «N» из «KCNS», имела значительно более низкие значения ЭОК и большой оси, чем «KCNS», соответственно (критерий Тьюки, *: $P < 0,05$). Комбинация дополнительных агентов «KCN», в которой был удален дополнительный агент «S» из «KCNS», существенно не отличалась от «KCNS» в отношении ЭОК, но имела тенденцию к снижению. Результаты показали, что дополнительные агенты «N» и «S» в комбинации четырех дополнительных агентов «KCNS» играют важную роль в эффективном образовании органоидов.

[0124]

Комбинация дополнительных агентов «KNS», в которой дополнительный агент «С» был удален из «KCNS», существенно не отличалась по ЭОК или главной оси от «KCNS». Этот результат позволяет предположить, что дополнительный агент «С» в комбинации из четырех дополнительных агентов «KCNS» не играет важной роли в эффективном образовании органоидов. С другой стороны, было показано, что

дополнительный агент «С» индуцирует дифференцировку легочных эпителиальных стволовых клеток, которые составляют клеточные агрегаты, как показано в Примере испытаний 3.

[0125]

- Комбинация из шести дополнительных агентов

На фигурах 2 и 3 показано, что комбинация из шести дополнительных агентов, «KF10HCNS», давала ЭОК приблизительно 0,87% и значение для большой оси приблизительно 113 мкм, соответственно. Комбинация из шести дополнительных агентов «KF10HCNS» давала значительно больший эффект в отношении ЭОК, чем комбинации из четырех дополнительных агентов «KCNS» и «F10CNS» (критерий Тьюки, *: $P < 0,05$). «KF10HCNS» давала значение для большой оси, сравнимое с «KCNS» и показала самое большое значение большой оси среди четырех комбинаций дополнительных агентов. Этот результат позволяет предположить, что комбинация из шести дополнительных агентов «KF10HCNS» является предпочтительной для эффективного образования органоидов.

[0126]

- Комбинация из пяти дополнительных агентов

Было высказано предположение, что, как описано выше, дополнительный агент «С» в комбинации из шести дополнительных агентов «KF10HCNS» не является необходимым для эффективного образования органоидов. Соответственно, считается, что комбинация из пяти дополнительных агентов «HF10KNS», в которой дополнительный агент «С» удален из «KF10HCNS», является предпочтительной для эффективного образования органоидов.

[0127]

(Фракция GFP^{lo})

Суспензию GFP^{lo}, включающую легочные эпителиальные стволовые клетки, культивировали способом, аналогичным способу получения описанной выше суспензии GFP^{hi}, включающей легочные эпителиальные стволовые клетки, и ЭОК [%] вычисляли, как описано в Примере испытаний 1. В отличие от фракции GFP^{hi}, культивирование проводили в планшете по 150 клеток на лунку. Было вычислено среднее значение и стандартное отклонение ЭОК (n=6) (фиг. 4). Затем вычисляли среднее значение и стандартное отклонение для большой оси органоидов (n=6) (фиг. 5).

[0128]

- Комбинация из четырех дополнительных агентов

На Фигурах 4 и 5 показано, что комбинация из четырех дополнительных агентов, «KCNS», давала ЭОК приблизительно 8,0% и значение большой оси приблизительно 127 мкм, соответственно. Комбинация дополнительных агентов «HCNS» или «F10CNS», в которой дополнительный агент «Н» или «F10» были заменены на дополнительный агент «К» в «KCNS», существенно не отличалась по ЭОК или по главной оси от «KCNS». Эти результаты позволяют предположить, что дополнительный агент «К» в комбинации из четырех дополнительных агентов «KCNS», который заменяет «Н» или «F10», играет

важную роль в отношении эффективного образования органоидов. Комбинация дополнительных агентов «ECNS», в которой дополнительный агент «Е» заменяет «К» в «KCNS», давала значительно более низкий эффект в отношении ЭОК, чем «KCNS» (критерий Тьюки, *: $P < 0,05$).

[0129]

- Комбинация из трех дополнительных агентов

Фракцию GFP^{lo} также оценивали на значения ЭОК и большой оси, полученные с использованием комбинаций «KNS», «KCS» или «KCN», из которых были удалены дополнительные агенты «С», «N» или «H» из комбинации из четырех дополнительных агентов «KCNS», как и в исследовании фракции GFP^{hi} . «KCS» давала значительно более низкий эффект в отношении ЭОК и большой оси, чем «KCNS» (критерий Тьюки, *: $P < 0,05$). ЭОК, достигнутая с использованием «KNS», существенно не отличалась от ЭОК и большой оси, полученных с использованием «KCNS», но имела тенденцию к снижению. Комбинация дополнительных агентов «KNS», в которой был удален дополнительный агент «С» из «KCNS», существенно не отличалась по ЭОК или по главной оси от «KCNS». Это указывает на то, что результат был таким же, как и для фракции GFP^{hi} .

[0130]

- Комбинация из шести дополнительных агентов и комбинация из пяти дополнительных агентов

На фигурах 4 и 5 показано, что комбинация из шести дополнительных агентов «KF10HCNS» существенно не отличается по эффективному образованию органоидов от комбинации из четырех дополнительных агентов «KCNS», но имеет тенденцию к повышению эффективности. «KF10HCNS» существенно не отличается по эффективному образованию органоидов от комбинаций из четырех дополнительных агентов «HCNS» и «F10CNS». Дополнительный агент «С» в комбинации из шести дополнительных агентов «KF10HCNS» не играл важной роли в эффективном образовании органоидов, как описано выше. Соответственно, предполагается, что комбинация из пяти дополнительных агентов «HF10KNS» является предпочтительной для эффективного образования органоидов из фракции GFP^{lo} .

[0131]

(Фракция GFP^{neg})

ЭОК [%] суспензии фракции GFP^{neg} , включающей легочные эпителиальные стволовые клетки, также вычисляли, как и ЭОК для суспензии фракции GFP^{hi} , включающей легочные эпителиальные стволовые клетки. Комбинация из трех дополнительных агентов, «KNS», давала ЭОК 0,75%.

[0132]

В Примере испытаний 2 было высказано предположение, что комбинация, состоящая по меньшей мере из одного вещества, выбранного из группы, состоящей из дополнительных агентов, KGF (K), HGF (H) и FGF10 (F10); ингибитора BMP, такого как Ноггин (N); и ингибитора $TGF\beta$, такого как SB431542 (S), является предпочтительной для

эффективного образования органоидов. Было высказано предположение, что комбинация, состоящая из CHIR99021 (C), «N», «S» и «H», является более предпочтительной, а комбинация, состоящая из «K», «N», «S», «H» и «F10» или комбинация, состоящая из «K», «C», «N», «S», «H» и «F10», является более предпочтительной для более эффективного образования органоидов. Добавление «C» является предпочтительным для эффективного образования органоида AT2, как показано в Примере испытаний 3.

[0133]

[Пример испытаний 3]

Пример испытаний 2 показал, что добавление CHIR99021 (агента, способного активировать передачу сигналов Wnt) не влияет на эффективность образования органоидов. В Примере испытаний 3 описано исследование влияния CHIR99021 (C) на дифференцировку легочных эпителиальных стволовых клеток. Был использован канонический ингибитор Wnt, XAV939 (X). Суспензию, включающую легочные эпителиальные стволовые клетки из фракций GFP^{hi} и GFP^{lo}, культивировали, как описано в Примере испытаний 2, с образованием органоидов. Комбинацию из четырех дополнительных агентов «KCNS» или «KXNS» добавляли к базальной среде MTEC/B27 для получения культуральной среды. Из образовавшихся после культивирования органоидов приготавливали парафиновые срезы. Парафиновые срезы органоидов подвергали иммунологическому окрашиванию антителом против Sftpc и антителом против Sox2, то есть, маркерами клеток бронхиального эпителия.

[0134]

Что касается фракции GFP^{hi}, то Sox2 слабо экспрессировался в части органоидов, образованных комбинацией дополнительных агентов KCNS, которая включала CHIR99021 (C), являющийся агентом, способным активировать передачу сигналов Wnt. Sox2 в высокой степени экспрессировался в части органоидов, образованных комбинацией дополнительных агентов «KXNS», которая включала 10 мкМ XAV939 (X), являющегося ингибитором Wnt/ β -катенина. Комбинация дополнительных агентов «KCNS» имеет тенденцию к более высокой экспрессии Sftpc по сравнению с комбинацией дополнительных агентов «KXNS». Как показано в Примере испытаний 1, фракция GFP^{hi} включает AT2 в большей части и BASC в меньшей части. Эти результаты соответственно позволяют предположить, что BASC, включенные в часть фракции GFP^{hi}, дифференцировались в AT2 в присутствии агента, способного активировать передачу сигналов Wnt, что приводило к образованию органоидов AT2. Предполагается, что органоиды, образующиеся в присутствии ингибитора Wnt, включают органоиды по меньшей мере двух типов: органоиды, полученные из частично включенных BASC, и органоиды, полученные преимущественно из AT2.

[0135]

Что касается фракции GFP^{lo}, то Sox2 слабо экспрессировался в органоидах при использовании комбинации дополнительных агентов «KCNS», которая включала агент, способный активировать передачу сигналов Wnt. И напротив, Sox2 в высокой степени

экспрессировался в органоидах при использовании комбинации дополнительных агентов «KXNS», которая включала ингибитор Wnt. «KCNS» имеет тенденцию к высокой экспрессии Sftpс по сравнению с «KXNS». Результаты для фракции GFP^{lo} показали тенденции, сходные с результатами для фракции GFP^{hi}.

[0136]

Результаты Примера испытаний 3 позволяют предположить, что образование органоидов из эпителиальных стволовых клеток легких в присутствии агента, способного активировать передачу сигналов Wnt (например, CHIR99021), приводит к образованию органоидов AT2 из клеток, тип которых отличается от типа клеток AT2.

[0137]

[Пример 1] Образование органоидов из легочных эпителиальных стволовых клеток
Эпителиальные стволовые клетки легких во фракции GFP^{hi} высевали на 96-луночный планшет со сверхнизкой адгезией (96-луночный планшет с клеточным репеллентом) по 2500 клеток на лунку. Эти клетки культивировали в течение 6 дней с культуральной средой для вычисления ЭОК (фиг. 6), как описано в Примере испытаний 2. Используемой культуральной средой является базальная среда MTEC/B27, которую охлаждали на льду, и в которую добавляли комбинацию из семи дополнительных агентов, то есть, агентов Y-27632(Y), HGF(H), Fgf10(F10), KGF(K), CHIR99021(C), CHIR99021(N) и SB431542(S) и 2,5% Матригеля. Как указано выше, легочные эпителиальные стволовые клетки фракции GFP^{lo} высевали по 200 клеток на лунку и культивировали в течение 6 дней, а затем вычисляли ЭОК (фиг. 6).

[0138]

На фигуре 6 показано, что органоиды легочных эпителиальных стволовых клеток образуются в результате культивирования легочных эпителиальных стволовых клеток в культуральной среде, содержащей Матригель в низкой концентрации 2,5%, и что эффективность образования органоидов составляет приблизительно 1,4% для фракции GFP^{hi} и приблизительно 6,4% для фракции GFP^{lo}. Было показано, что эти результаты были сопоставимы с результатами эффективности образования органоидов из легочных эпителиальных стволовых клеток в культуральной среде, включающей гель с 50% или 75% Матригеля, и составляли 0,86% для фракции GFP^{hi} и 12% для фракции GFP^{lo}.

[0139]

В Примере 1 было высказано предположение, что органоиды легочных эпителиальных стволовых клеток могут образовываться в культуральной среде, включающей гель внеклеточного матрикса (например, 50% или 75% Матригеля) в качестве остова, или в культуральной среде, содержащей внеклеточный матрикс (например, 2,5% Матригеля) в качестве диспергированного компонента при условии наличия дополнительных агентов в соответствии с настоящим изобретением.

[0140]

[Примере испытаний 4]

Было проведено исследование, обладают ли образовавшиеся органоиды

способностью к дифференцировке. Эпителиальные стволовые клетки легких из фракции GFP^{hi} культивировали в культуральной среде в течение 8 дней, как описано в Примере испытаний 2. Культуральной средой является базальная среда MTEC/B27, дополненная комбинацией из четырех дополнительных агентов «KCNS». Один из двух культуральных продуктов культивировали в культуральной среде еще 4 дня, а другой культивировали в базальной среде еще 4 дня. На 12-й день после культивирования было обнаружено, что органоиды, образованные при культивировании в базальной среде, в высокой степени экспрессировали Норх, то есть, клеточный маркер клеток АТ1, которые представляют собой дифференцированные клетки легочных альвеол. В Примере испытаний 4 показано, что органоиды, образованные в присутствии дополнительных агентов согласно настоящему изобретению, обладают способностью к дифференцировке.

[0141]

[Пример получения 2]

(Приготовление суспензий, включающих клетки аденокарциномы легких)

Была взята мышь Sftpc-CreERT2; KRASLSLG12D; Rosa26-mTmG, полученная путем скрещивания трех типов мышей: мыши B6.129S-Sftpcrtm1 (cre/ERT2) Blh/J («Sftpc-CreERT2») (Jackson Lab, Stock No. 028054), мыши B6.129(Cg)-Gt(ROSA) 26Sortm4 (ACTB-tdTomato,-EGFP) Luo/J (Rosa26-mTmG») (Jackson Lab, номер 007676) и мыши B6N.Cg-Krastm4 Tyj/CjDswJ (KrasLSLG12D) (Jackson Lab, номер 019104). У мышей Sftpc-CreERT2;KRASLSLG12D;Rosa26-mTmG, клеточная мембрана Kras-активированной клетки испускает флуоресцентное излучение в зеленом диапазоне спектра, происходящее от EGFP.

[0142]

Рекомбиназа Cre активируется в Sftpc-CreERT2 без введения тамоксифена, и такая рекомбинация наблюдается приблизительно в 5-10% клеток (Barkauskas CE.et al., J Clin Invest. 2013;123(7):3025-36). В легких мышей Sftpc-CreERT2; KRASLSLG12D; Rosa26-mTmG наблюдалось множество узелков, что свидетельствует о наличии раковых клеток в легких этих мышей.

[0143]

Суспензии, включающие эпителиальные клетки легких, приготавливали у мышей Sftpc-CreERT2; KRASLSLG12D; Rosa26-mTmG, как описано в Примере получения 1. Суспензии, включающие Kras-активированные клетки аденокарциномы легких, получали из приготовленных суспензий, включающих эпителиальные клетки легких, на основе флуоресценции меченого флуорофором антитела против ЕрСАМ и флуоресценции GFP, как описано в Примере получения 1.

[0144]

[Пример 2] Образование органоидов из клеток аденокарциномы легких

Клетки аденокарциномы легких, полученные как описано выше, высевали на 96-луночный планшет со сверхнизкой адгезией (96-луночный планшет с клеточным репеллентом) по 2500 клеток на лунку. Эти клетки культивировали в течение 6 дней с

культуральной средой для вычисления ЭОК (фиг. 7), как описано в Примере испытаний 2. Используемой культуральной средой является базальная среда MTEC/B27, которую охлаждали на льду, и в которую добавляли комбинацию из семи дополнительных агентов, то есть, агентов Y-27632(Y), HGF(H), Fgf10(F10), KGF(K), CHIR99021(C), CHIR99021(N) и SB431542(S) и 2,5% Матригеля. Как указано выше, клетки аденокарциномы легких культивировали в культуральной среде, которая представляла собой базальную среду MTEC/B27 с добавлением 2,5% Матригеля, в течение 6 дней, а затем вычисляли ЭОК (фиг. 7).

[0145]

На фигуре 7 показано, что культивирование клеток аденокарциномы легких в присутствии дополнительных агентов («+» на фигуре 7) приводило к образованию органоидов и ЭОК приблизительно на 1,7%. При этом, не наблюдалось образования органоидов из клеток аденокарциномы легких в отсутствие дополнительных агентов («-» на фиг. 7).

[0146]

Результаты Примера 2 позволяют предположить, что органоиды клеток аденокарциномы легких могут образовываться даже в культуральной среде, которая не включает остов, при условии, что она включает дополнительные агенты согласно настоящему изобретению.

[0147]

[Пример получения 3]

Суспензии, включающие легочные эпителиальные стволовые клетки, получали из легких мышей SFTPC-GFP и разделяли на три предварительно определенные фракции (GFP^{hi} , GFP^{lo} и GFP^{neg}) исходя из интенсивностей GFP-флуоресценции, измеренных с помощью FACS Aria II (BD) (фиг. 8), как описано в Примере получения 1. Фракция GFP^{hi} соответствует фракции P19 в Примере испытания 2. Фракция GFP^{lo} соответствует фракции P18 в Примере испытания 2. Фракция GFP^{neg} соответствует фракции P17 в Примере испытания 2.

[0148]

[Пример испытаний 5]

Маркерные гены амплифицировали с помощью количественной ПЦР для исследования паттернов экспрессии маркерных генов, и типы клеток, включенных в каждую фракцию, определяли по паттернам экспрессии, как описано в Примере испытаний 1 (фиг. 9). Результат показал, что фракция GFP^{neg} преимущественно включала базальные клетки, которые были позитивными по Krt5, и булавовидные клетки, которые были позитивными по Scgb1a1 и Scgb3a2. Фракция GFP^{neg} также включала реснитчатые клетки и клетки AT1, такие как фракция P17 в Примере испытаний 1. Было показано, что фракция GFP^{lo} преимущественно включала булавовидные клетки, которые были позитивными по Scgb1a1 и Scgb3a2. Это указывает на то, что фракция GFP^{hi} преимущественно включала клетки AT2, которые были позитивными по Sftpc и Abca3, и

предположительно включала некоторые BASC.

[0149]

[Пример испытаний 6]

Клетки каждой из фракций GFP^{hi}, GFP^{lo} и GFP^{neg} культивировали без фидерных клеток в питательной среде (включая 50% Матригеля), которая представляла собой базальную среду МТЕС/В27 с добавлением HGF (H), FGF10 (F10), KGF (K), NOGGIN (N), SB431542 (S) и CHIR99021 (C) в конечных концентрациях, описанных в Таблице 2. CHIR99021(C) добавляли в базальную среду, поскольку CHIR99021(C) может участвовать в дифференцировка булавовидных клеток в клетки АТ2, хотя это не является существенным для образования органоидов. На 9-й день после культивирования, культуральную среду заменяли на базальную среду МТЕС/В27 и клетки культивировали еще 3 дня с образованием органоидов, в которых происходило ускорение их дифференцировки.

[0150]

Экспрессию маркерных белков в образовавшихся органоидах до и после ускорения дифференцировки исследовали с помощью иммунологического окрашивания следующими реагентами.

[Таблица 6]

Название	Номер по каталогу	Дистрибьютор	Примечания
CC10(В6)	sc-390313	Santa Cruz	Хозяин: мышь 1:500-1000
Про-белок поверхностно-активного вещества С (proSP-C)	AB3786	Millipore	Хозяин: кролик 1:300
Человеческое/мышинное/крысиное антитело против SOX2	14-9965-82	R&D	Хозяин: коза 1:200
Антитело против цитокератина 5 (EP1601Y) (кроличье)	ab52635	Abcam	Хозяин: кролик 1:500
Моноклональное антитело против ацетилированного тубулина, полученное у мышей	T7541	Sigma	Хозяин: мышь 1:1000
Очищенный крысиный моноклональный IgG клон 175410 против m/tRAGE	MAВ1179	R&D	Хозяин: крыса 1:200
Антитело против НОРХ, полученное у кролика	HPA030180	Sigma	Хозяин: кролик 1:200

Антитело против NT2-280	TB-27AXT2-280	TERRACE BIOTECH	Хозяин: мышь 1:50
Трипсин для изучения биологии клетки, выделенный из поджелудочной железы свиньи	T4799-5G	Sigma	
Демаскирующий раствор антигена	H-3300	Vector	
Демаскирующий раствор антигена (с высоким pH)	H-3301	Vector	
Набор для иммунодетектирования MOM (в исследовании на мышах)	BMK-2202	Vector	

[0151]

Культивирование клеток фракции GFP^{neg} приводило к образованию органоидов по меньшей мере двух типов (фиг. 10). Органоиды одного типа до дифференцировки (d9) состояли из клеточной популяции, включающей базальные клетки, которые были позитивными по Krt5 (маркеру базальных клеток), и булавовидные клетки, которые были позитивными по SCGB1A1 (маркеру булавовидных клеток). Условия дифференцировки в Примере испытаний 6 не позволяли дифференцировать клетки, составляющие органоиды, в реснитчатые клетки. Органоиды другого типа до дифференцировки (d9) состояли из клеточной популяции, включающей булавовидные клетки, которые были позитивными по SCGB1A1 (маркеру булавовидных клеток), и состояли после дифференцировки (d12) из клеточной популяции, включающей булавовидные клетки, которые были позитивными по ACTUB (маркеру реснитчатых клеток).

[0152]

Культивирование клеток фракции GFP^{lo} приводило к образованию органоидов по меньшей мере двух типов (фиг. 11). Органоиды одного типа состояли до дифференцировки (d9) из клеточной популяции, включающей булавовидные клетки, позитивные по SCGB1A1 (маркеру булавовидных клеток), клетки, позитивные по SOX2 (маркеру бронхиального эпителия), и клетки, позитивные по SFTPC (клеточному маркеру AT2) и состояли после дифференцировки (d12) из клеточной популяции, включающей клетки легочного альвеолярного эпителия, которые были позитивными по AGER (маркеру клеток AT1). Органоиды другого типа состояли до дифференцировки (d9) из популяции клеток, которые были позитивными по SOX2 (маркеру бронхиального эпителия) и по SFTPC (клеточному маркеру AT2), и состояли после дифференцировки (d12) из клеточной популяции, включающей альвеолярные клетки легких, которые были позитивными по AGER (маркеру клеток AT1).

[0153]

Культивирование клеток фракции GFP^{hi} приводило к образованию органоида по меньшей мере одного типа (фиг. 12). Органоиды состояли до дифференцировки (d9) из

клеточной популяции, включающей клетки, которые были позитивными по SFTPC (маркеру клеток AT2) и состояли после дифференцировки (d12) из клеточной популяции, включающей клетки AT2, которые были позитивными по AGER (маркеру клеток AT1).

[0154]

[Пример испытаний 7]

Эффективность комбинаций дополнительных агентов, описанных ниже, в отношении образования органоидов оценивали с использованием клеток фракций GFP^{hi}, GFP^{lo} и GFP^{neg}, полученных от мышей SFTPC-GFP, в качестве клеток-мишеней. Гели, содержащие клетки, получали с использованием 50% или 75% Matrigel[®] и культивировали, как описано в Примере испытаний 2. Эффективность образования органоидов оценивали по ЭОК [%] и большой оси органоидов. В Примере испытаний 7 использовали шесть мышей SFTPC-GFP и в общей сложности использовали 120000 клеток фракции GFP^{hi}, 3600 клеток фракции GFP^{lo} и 24000 клеток фракции GFP^{neg} (n=6).

[0155]

(Фракция GFP^{hi})

Эпителиальные стволовые клетки легких из фракции GFP^{hi} культивировали в культуральной среде, дополненной комбинацией дополнительных агентов, описанной ниже, с образованием органоидов, как описано в Примере испытаний 2. Культивирование проводили с использованием 5000 клеток, засеянных в лунку. ЭОК [%] и большую ось [мкм] измеряли, как описано в Примере испытаний 2 (фиг. 13).

[Таблица 7]

	Название	KCN S	KNS	KCS	KC N	CNS	ECNS	F10CN S	HCN S	KF10 HCN S
K	KGF	+	+	+	+	-	-	-	-	+
C	CHIR9902 1	+	-	+	+	+	+	+	+	+
N	Ноггин	+	+	-	+	+	+	+	+	+
S	SB431542	+	+	+	-	+	+	+	+	+
H	HGF	-	-	-	-	-	-	-	+	+
F1 0	FGF10	-	-	-	-	-	-	+	-	+
E	EGF	-	-	-	-	-	+	-	-	-

+: Добавлен как дополнительный агент

-: Не добавлялся в качестве дополнительного агента

[0156]

По сравнению с комбинацией трех дополнительных агентов «CNS», «KCNS», «KNS», «F10CNS», «HCNS» или «KF10HCNS» указывали на более высокое значение ЭОК

(фиг. 13А). Любая из этих комбинаций дополнительных агентов существенно не отличалась в отношении главной оси (фиг. 13В).

[0157]

- Комбинация из шести дополнительных агентов

Использование комбинации из шести дополнительных агентов «KF10HCNS» давало наивысшее значение ЭОК, сходное с результатами в Примере испытаний 2 (фиг. 13А). Так, например, «KF10HCNS» давала значительно более высокое значение ЭОК, чем комбинация из четырех дополнительных агентов «KCNS», «ECNS» или «F10CNS», которая дополнительно включала комбинацию из трех дополнительных агентов «CNS» с одним активатором тирозинкиназного рецептора.

[0158]

- Комбинация из четырех дополнительных агентов

Комбинация из четырех дополнительных агентов «HCNS» давала значительно более высокое значение ЭОК, чем «CNS» или «ECNS» (фиг. 13А). Каждая из комбинаций четырех дополнительных агентов, «KCNS», «F10CNS» и «HCNS», давала сравнимые ЭОК (фиг. 13А). Эти результаты показали, что дополнительные агенты «К», «F10» и «Н» являются взаимозаменяемыми в отношении эффективного образования органоидов, аналогично результатам, полученным в Примере испытаний 2.

[0159]

- Комбинация из трех дополнительных агентов

Комбинация из трех дополнительных агентов «KCS», в которой был удален дополнительный агент «N» из комбинации четырех дополнительных агентов «KCNS», или комбинация из трех дополнительных агентов «KCN», из которой был удален дополнительный агент S, имела тенденцию к снижению значения ЭОК, в отличие от «KCNS» (фиг. 13А). Результаты показали, что дополнительные агенты «N» и «S» из четырех дополнительных агентов «KCNS» играют важную роль в эффективном образовании органоидов, что соответствовало результатам в Примере испытаний 2.

[0160]

Комбинация дополнительных агентов «KNS», в которой был удален дополнительный агент С из KCNS, значимо не отличалась по ЭОК от «KCNS» (фиг. 13А). Результат показал, что дополнительный агент «С» не играет важной роли в эффективном образовании органоида, что соответствует результатам в Примере испытаний 2. С другой стороны, указанный дополнительный агент «С» вызывает дифференцировку эпителиальных стволовых клеток легких, которые представляют собой клеточные агрегаты, как показано в Примере испытаний 3.

[0161]

(Фракция GFP^{lo})

ЭОК [%] легочных эпителиальных стволовых клеток из фракции GFP^{lo} вычисляли, как описано для фракции GFP^{hi}. Следует отметить, что на лунку культивировали 150 клеток, в отличие от фракции GFP^{hi}. Затем вычисляли среднее значение и стандартное

отклонение ЭОК (n=6) (фиг. 14А). Также вычисляли среднее значение и стандартное отклонение для большой оси органоидов (n=6) (фиг. 14В).

По сравнению с комбинацией из трех дополнительных агентов «CNS», комбинации «KCNS», «KNS», «F10CNS», «HCNS» или «KF10HCNS» показали более высокое значение ЭОК (фиг. 14А).

[0162]

- Комбинация из шести дополнительных агентов

Комбинация из шести дополнительных агентов «KF10HCNS» давала наибольшие значения ЭОК и большой оси (фиг. 14А и В), аналогично результатам в Примере испытаний 2. Так, например, «KF10HCNS» давала значительно более высокие значения ЭОК, чем комбинация из трех дополнительных агентов «CNS» или комбинация из четырех дополнительных агентов «ECNS», которая дополнительно включала комбинацию из трех дополнительных агентов с EGF(E) (фиг. 14А). «KF10HCNS» давала значительно более высокие значения для главной оси, чем «ECNS» (фиг. 14В).

[0163]

- Комбинация из четырех дополнительных агентов _

Комбинация из четырех дополнительных агентов «F10CNS» или «HCNS» давала значительно большие значения ЭОК по сравнению с комбинацией из трех дополнительных агентов «CNS» (фиг. 14А). Комбинации из четырех дополнительных агентов «KCNS», «F10CNS» и «HCNS» соответственно давали сравнимые значения ЭОК (фиг. 14А). Результаты показали, что эти дополнительные агенты «К», «F10» и «Н» являются взаимозаменяемыми в отношении эффективного образования органоидов, аналогично результату Примера испытаний 2. Комбинация из четырех дополнительных агентов «ECNS», которая была получена путем замены в «KCNS» дополнительного агента «К» на «Е», давала значительно более низкие значения ЭОК и большой оси, чем KCNS (фиг. 14А и В). Эти результаты показали, что дополнительный агент «Е» не может быть заменен дополнительными агентами «К», «F10» или «Н» в отношении эффективного образования органоидов.

[0164]

- Комбинация из трех дополнительных агентов

Комбинация из трех дополнительных агентов «KCS» или «CNS», которая была получена путем удаления дополнительных агентов «N» или «К» из комбинации из четырех дополнительных агентов «KCNS», соответственно, давала значительно более низкое значение ЭОК, чем «KCNS» (фиг. 14А). Использование «KCNS» давало значительно более короткую главную ось, чем «KCS» (фиг. 14В). Комбинация из трех дополнительных агентов «KCN», которая была получена путем удаления дополнительного агента S из «KCNS», имела тенденцию к снижению ЭОК по сравнению с «KCNS» (фиг. 14А). Эти результаты показали, что дополнительные агенты «N» и S играют важную роль в эффективном образовании органоидов, аналогично результатам, полученным в Примере испытаний 2.

[0165]

Комбинация дополнительных агентов «KNS», которую получали путем удаления дополнительного агента «С» из «KCNS», существенно не отличалась по ЭОК от «KCNS» (фиг. 14А). Этот результат показал, что дополнительный агент «С» не играет существенной роли в эффективном образовании органоида, что соответствовало результатам, полученным в Примере испытаний 2.

[0166]

(Фракция GFP^{neg})

ЭОК [%] эпителиальных стволовых клеток легких из фракции GFP^{neg} измеряли, как описано для фракции GFP^{hi}. Следует отметить, что на лунку культивировали 1000 клеток, в отличие от фракции GFP^{hi}. Затем вычисляли среднее значение и стандартное отклонение для ЭОК (n=6) (фиг. 15А). Также вычисляли среднее значение и стандартное отклонение большой оси органоидов (n=6) (фиг. 15В). «KCNS», «KNS», «F10CNS», «HCNS» или «KF10HCNS» давали более высокое значение ЭОК по сравнению с комбинацией из трех дополнительных агентов «CNS» (фиг. 15А). Эти комбинации дополнительных агентов включали «N» и «С», а также включали по меньшей мере один агент, выбранный из группы, состоящей из «K», «H» и «F10».

[0167]

- Комбинация из шести дополнительных агентов

Использование комбинации из шести дополнительных агентов «KF10HCNS» давало наибольшие значения ЭОК и главной оси (фиг. 15А и В). Так, например, «KF10HCNS» давала значительно более высокое значение ЭОК, чем комбинация из трех дополнительных агентов «CNS», которая не включала активатор тирозинкиназного рецептора (фиг. 15А).

[0168]

Использование комбинации из четырех дополнительных агентов «KCNS», «ECNS», «F10CNS» или «HCNS» в сочетании с комбинацией из трех дополнительных агентов «CNS» с одним активатором тирозинкиназного рецептора давало значительно большие значения для главной оси, чем комбинация из трех дополнительных агентов «CNS» (фиг. 15В). Эти результаты показали, что объединение комбинации из трех дополнительных агентов «CNS» с любым из четырех активаторов тирозинкиназных рецепторов «K», «E», «F10» и «H» играет важную роль в образовании органоидов.

[0169]

Использование ECNS для клеток фракции GFP^{neg} значительно отличалось с точки зрения образования органоидов по сравнению с использованием CNS, в отличие от клеток фракции GFP^{hi/lo} (фиг. 13А, фиг. 14А и фиг. 15В). Этот результат соответствует использованию EGF при культивировании базальных клеток без использования фидерных клеток (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009 Aug 4; 106(31):12771-5).

[0170]

Результаты Примера испытаний 7 позволяют предположить, что комбинация,

состоящая по меньшей мере из одного вещества, выбранного из группы, состоящей из дополнительных агентов, KGF (K), HGF (H) и FGF10 (F10); ингибитора BMP, такого как Noggin (N); и ингибитора TGF β , такого как SB431542 (S), является предпочтительной для эффективного образования органоидов. Было высказано предположение, что комбинация, состоящая из CHIR99021 (C), «N», «S» и «H», является более предпочтительной, а комбинация, состоящая из «K», «N», «S», «H» и «F10» или комбинация, состоящая из «K», «C», «N», «S», «H» и «F10», является наиболее предпочтительной для эффективного образования органоидов.

[0171]

[Пример 3] Трансплантация органоидов, полученных из булавовидных клеток, мышам с повреждением легких

Были получены генетически модифицированные мыши rShh-Cre, Rosa26-CAG-LSL-H2B-mCherry, SFTPC-GFP (фиг. 16A, мыши-доноры). Генетически модифицированную мышь получали путем скрещивания мышей трех типов, мыши B6.Cg-Shhtm1 (EGFP/cre)Cjt/J (сокращенно называемой здесь «Shh-Cre») (Jackson Lab. номер 005602), B6; мыши 129S-Gt(ROSA)26Sortm1.1Ksv0/J (сокращенно называемой здесь «ROSA26-mCherry») (Jackson Lab. номер № 023139) и мыши SFTPC-GFP.

[0172]

Популяцию клеток (булавовидных клеток) из фракции GFP^{lo} получали у генетически модифицированных мышей, как описано в Примере получения 1. Полученное клеточное ядро окрашивали mCherry. GFP в высокой степени экспрессировался в том случае, когда клетки становились клетками AT2.

[0173]

В соответствии со способами, описанными ниже, органоиды получали из клеток, взятых у генетически модифицированных мышей, и клетки, полученные из органоидов, вводили мышам с повреждением легких (фиг. 16B). Популяцию клеток, включающую клетки, полученные от генетически модифицированных мышей в среде (MTEC/B27+YHF10KCNS+2,5% Матригеля, 2 мл), высевали на 6-луночный планшет по 1×10^4 клеток на лунку. В лунки один раз в 3 дня добавляли среду без Матригеля по 1 мл и культивировали в общей сложности 9 дней. На 9-й день культивирования, культуральную среду, содержащую органоиды, центрифугировали (400g, 3 минуты, 4°C) для сбора органоидов. Собранные органоиды смешивали с 10 мл раствора протеазы (аккутазы, коллагеназы типа I (450 ед/мл, Worthington), ДНКазы (0,1 мг/мл, SIGMA)), предварительно нагретого до 37°C, и осторожно перемешивали на роторе при 37°C в течение 20 минут. Вышеупомянутый раствор пипетировали для получения клеточной суспензии, и суспензию центрифугировали (400g, 5 минут, 4°C) для сбора клеточных агрегатов. Собранные клеточные агрегаты смешивали с 5 мл 0,25% трипсина (Gibco, содержащего 0,1 мг/мл ДНКазы) и осторожно перемешивали на роторе при 37°C в течение 10 минут. Раствор пипетировали для получения клеточной суспензии, и клеточную суспензию смешивали с 10 мл DMEM/F12 (содержащей 10% FBS) для

завершения протеазной реакции. Суспензию клеток центрифугировали (400g, 5 минут, 4°C), а собранные клетки суспендировали в 90 мкл среды (МТЕС/В27+»УНН10КНС») так, чтобы 75 мкл среды включали 4×10^5 жизнеспособных клеток.

[0174]

Мышей с повреждением легких подготавливали за 9 дней до инъекции клеток, полученных из органоидов, путем анестезии бестимусных мышей изофлураном (Pfizer) и интраназального введения раствора блеомицина (Nippon Kayaku) в объеме 3 мг/кг.

[0175]

Мышей с повреждением легких анестезировали изофлураном (Pfizer) в день инъекции клеток, полученных из органоидов, и приготовленную выше клеточную суспензию вводили мышам через трахею. Через две недели после инъекции клеток, мышей с повреждением легких вскрывали и готовили замороженные срезы легких. Изображения флуоресценции mCherry и GFP в замороженных срезах оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии и исследовали на адгезию введенных клеток в легочной ткани и выживания клеток в этой ткани (фиг. 16C и D).

[0176]

В срезе легких показаны клетки с флуоресцентным излучением mCherry в клеточном ядре (фиг. 16C). Результат указывает на то, что булавовидные клетки, полученные после сбора булавовидных клеток у генетически модифицированных мышей в качестве донора и образования органоидов из булавовидных клеток, прикреплялись к легочной ткани мышей с повреждением легких, являющихся реципиентом, и выживали в этой ткани. Среди клеток с флуоресцентным излучением mCherry в клеточном ядре, некоторые клетки излучали GFP-флуоресценцию (фиг. 16D). Результат указывает на то, что клетки AT2, дифференцированные из булавовидных клеток, прикреплялись к легочной ткани мышей с повреждением легких и выживали в этой ткани.

[0177]

[Пример 4] Образование органоидов из первичных клеток человека

Были приобретены альвеолярные клетки человека (легочные альвеолярные эпителиальные клетки человека: HPAEpiC) и клетки дыхательных путей человека (эпителиальные клетки малых дыхательных путей человека: HPSAEpiC), описанные ниже.

[Таблица 8]

Название	Номер по каталогу	Дистрибьютор	Число партий
Эпителиальные клетки малых дыхательных путей человека (HPSAEpiC)	3230	ScienCell	28775
Легочные альвеолярные эпителиальные клетки человека (HPAEpiC)	3200	ScienCell	28699

[0178]

Приобретенные замороженные первичные клетки человека оттаивали при 37°C и

100 мкл размороженного раствора суспендировали в 2 мл культуральной среды (МТЕС/В27+»УНН10КСНС»+5% Матригеля). Суспензию клеток высевали на 6-луночный репеллентный планшет таким образом, чтобы количество засеянных клеток НРАЕріС составляло $1,44 \times 10^5$ клеток на лунку, а количество добавленных клеток НРSАЕріС составляло $5,6 \times 10^4$ клеток на лунку. На 3-й день после культивирования добавляли 1 мл культуральной среды. Культивируемые клетки пассировали на 6-й день после культивирования таким образом, чтобы количество клеток составляло 2×10^5 клеток на лунку. После этого клетки пассировали каждые 12 дней.

[0179]

Клетки, пассированные на 6-й день после культивирования первичных клеток человека, культивировали и наблюдали на 12-й день после культивирования (фиг. 17). Органоиды наблюдали в лунках, где культивировали альвеолярные клетки человека и клетки дыхательных путей человека, соответственно (фиг. 17А и В). Реагенты, перечисленные в Таблице 4 Примера испытаний 6, использовали для иммунологического окрашивания для исследования экспрессии маркерных белков в образованных органоидах (фиг. 18). Иммунологическое окрашивание проводили на парафиновых срезах органоидов. Результаты показали, что органоиды трех типа были образованы из альвеолярных клеток человека (фиг. 18А-С), а органоиды одного типа были образованы из клеток дыхательных путей человека (фиг. 18D).

[0180]

На Фигуре 18А показано, что органоид, образованный из альвеолярных клеток человека, представляет собой тип легочных альвеол, который экспрессирует специфический для человека клеточный маркер АТ2 (НТ2-280) и клеточный маркер АТ2 (SFTPC), общий для мышей. На фигуре 18В показано, что органоид, образованный из альвеолярных клеток человека, представляет собой органоид бронхоальвеолярного типа, который экспрессирует два маркерных белка, НТ2-280 и SFTPC, и маркер бронхиального эпителия SOX2. На фигуре 18С показано, что органоид, образованный из альвеолярных клеток человека, относится к бронхиальному типу и экспрессирует только маркер бронхиального эпителия, SOX2. В Примере 4 было продемонстрировано, что из альвеолярных клеток человека образовались органоиды трех типов. Результаты указывают на то, что приобретенные альвеолярные клетки человека были загрязнены клетками периферических дыхательных путей.

[0181]

На фигуре 18D показано, что органоид, образованный из клеток дыхательных путей человека, состоит из базальных клеток, экспрессирующих маркер базальных клеток (KRT5) и маркер бронхиального эпителия (SOX2).

[0182]

Пример 4 показал, что культивирование первичных клеток легких человека в культуральной среде, содержащей комбинацию описанных здесь дополнительных агентов, может приводить к образованию органоидов.

[0183]

[Пример 5] Визуализация образования органоидов путем культивирования клеточной популяции

Эпителиальные клетки легких получали от генетически модифицированных мышей Scgbl1a1-CreER; Rosa26-mTmG. Введение тамоксифена генетически модифицированной мыши приводит к включению Scgbl1a1 в локус Rosa26 посредством рекомбиназы Cre. В результате, экспрессия Scgbl1a1 может быть обнаружена по флуоресценции локализованного в клеточной мембране GFP (mGFP).

[0184]

Тамоксифен вводили генетически модифицированным мышам пять раз. Через три недели после введения тамоксифена была проведена резекция трахеи для удаления легких. Суспензию клеток приготавливали из удаленных легких, как описано в Примере получения 1. Суспензию клеток смешивали с нижеследующими антителами, а именно, с антителом против EPCAM-PE-Cy7 (№ 25-5791-80, eBioscience), антителом против CD24-APC (#25-0242-80, Invitrogen), антителом против CD45-биотина (#13-0451, eBioscience), антителом против CD31-биотина (#13-0311, eBioscience), и оставляли для реакции на льду на 20 минут. Реакционный раствор суспендировали в 500 мкл DPBS(-)/3% FBS и центрифугировали (400g, 3 минуты, 4°C). Осажденные клетки ресуспендировали в 100 мкл DPBS(-)/3% FBS. Клеточную суспензию смешивали со стрептавидином APC-Cy7 из расчета 0,25 мкл на 1×10^6 клеток и оставляли для реакции на льду на 10 минут. Клетки суспендировали в 500 мкл DPBS(-)/3% FBS, центрифугировали (400g, 3 мин, 4°C) и осажденные клетки ресуспендировали в 500 мкл DPBS(-)/3% FBS. Суспензию клеток смешивали с 7-аминоактиномицином D (7-AAD) из расчета 5 мкл на 1×10^6 клеток и оставляли для реакции на льду на 20 минут. Из реакционного раствора удаляли клеточные агрегаты с помощью клеточного 40 мкм- фильтра и подвергали FACS.

[0185]

FACS проводили для удаления погибших клеток, окрашенных 7-AAD, эндотелиальных клеток, окрашенных антителом против CD31, и гемопоэтических клеток, окрашенных антителом против CD45, из приготовленной клеточной суспензии. Из оставшейся клеточной популяции отбирали эпителиальные клетки, окрашенные антителами против EPCAM, а затем собирали Scgbl1a1-позитивные клетки (в основном булавовидные клетки) с флуоресцентным GFP-излучением, и тканевые стволовые клетки/клетки-предшественники, окрашенные антителом против CD24 (CD24^{lo}), собирали. Собранные клетки центрифугировали (400g, 5 минут, 4°C), и осажденные клетки суспендировали в культуральной среде (MTEC/B27+5% FBS+»YHF10KNS»), после чего культуральную среду (MTEC/B27+5% FBS+»YHF10KNS») смешивали для приготовления клеточной суспензии, включающей 300 клеток на 250 мкл. Клеточную суспензию высевали на 96-луночные планшеты со сверхнизкой адгезией (CELLSTAR, #655970, Greiner), и 96-луночные планшеты помещали в микроскоп, объединенный с инкубатором, то есть, микроскоп Celldiscoverer7 (Zeiss). Во время инкубирования клеток в течение 10

дней, культивируемые клетки визуализировали в ярком поле через заданные промежутки времени. Визуализацию проводили каждые 4 часа в первый день (0-й день) и один раз в день с 1-го по 10-й день. Был использован объектив с увеличением 10×. Семнадцать изображений были сделаны с интервалом в 45 мкм по оси Z. Соответственно, файл снятого изображения содержит данные, включающие 17 изображений в направлении оси Z в каждый момент времени.

[0186]

(Метод анализа изображений)

Программное обеспечение для анализа изображений ZEN3.0 (синяя версия) использовали для преобразования полученных файлов изображений в файлы Tiff, а затем для их анализа использовали программное обеспечение для анализа изображений Image J (версия 1.52n). Процесс образования органоида из одной клетки прослеживали по файлам изображений с 0-го по 10-й день. При росте клеточного агрегата по большой оси не менее 50 мкм, его определяли как образование органоида. Анализ при отслеживании образования органоида исключал клетки, находящиеся вне фокуса; клетки, свойства которых невозможно было определить из-за расположения на краю при мозаичной обработке; клетки, контактировавшие с другой клеткой; и клетки, которые нельзя было отследить на 6-й день после культивирования по какой-либо причине (например, если клетки перекрывались с культивированными органоидами). Файлы изображений были созданы путем обрезания областей, где можно было наблюдать процесс образования органоида из одной клетки в изображении на день 0. Графический программный фильтр для Image J, StackReg (<http://bigwww.epfl.ch/thevenaz/stackreg/>) использовали для интеграции файлов обрезанных изображений, содержащих данные изображения в направлении оси Z. Трехмерные сконструированные клетки в собранных данных изображения оценивали для определения клеточной морфологии. Оценка морфологии включала определения площади, периметра, большой оси, малой оси, округлости, значений уровня серого и центроида.

[0187]

(Результаты)

Процессы образования органоидов наблюдали для отдельных клеток в клеточной популяции из 1056 клеток, которые были взяты из клеточной суспензии, полученной от трех мышей и культивированной. Из 1056 клеток, 235 клеток образовывали органоиды, а остальные 821 клетка не образовывали органоидов. Органоид-образующие и не образующие органоиды клетки оценивали на клеточную морфологию, соответственно (фиг. 19). На фигуре 19А показано, что клетки, образующие органоиды, были значительно больше по площади, чем клетки, не образующие органоидов. На фигурах 19В-19D показано, что клетки, образующие органоиды, были значительно больше по периметру, большой оси и малой оси, соответственно, чем клетки, не образующие органоиды. На фигурах 19Е-19Н не наблюдалось существенных различий в округлости, значениях уровня серого (среднее значение, мода) и центроидах между клетками, образующими

органоиды, и клетками, не образующими органоиды.

[0188]

В Примере 5 показано, что среди эпителиальных клеток легких, полученных от мышей, относительно крупные клетки, особенно клетки с большой площадью, периметром, большой и/или малой осью, с большей вероятностью будут образовывать органоиды.

[0189]

[Пример 6] Визуализация образования органоидов путем культивирования отдельных клеток

Культивирование клеточной популяции и наблюдение за отдельными клетками в клеточной популяции в ходе процесса культивирования, как показано в Примере 5, иногда приводило к невозможности проследить процесс образования органоидов из-за перекрывания клетки другой клеткой с течением времени и т.п. В Примере 6 было проведено тщательное исследование морфологических признаков клеток, которые, вероятно, образует органоид, путем посева и культивирования одной клетки в одной лунке.

[0190]

Суспензию клеток, включающую эпителиальные клетки легких, приготавливали у мышей, а затем подвергали FACS для сбора булавовидных клеток, как показано в Примере 5. Булавовидные клетки суспендировали в культуральной среде (MTEC/B27+5% FBS+»YHF10KNS») для получения клеточной суспензии, включающей от 2500 до 5000 клеток на мл культуральной среды. Суспензию клеток объемом 2 мл высевали на 6-луночные планшеты Elplasia (Corning 4444), которые делали неадгезивными с помощью Biosurfine AWP-MRH (6% водного раствора) (Toyo Gosei), а затем планшеты оставляли на 30 минут. Затем использовали систему сбора и визуализации клеток Cell Handler® (Yamaha) для получения изображений в ярком поле (BF) и получения флуоресцентных изображений с использованием иодида пропидия (PI, #130-093-233, Miltenyi Biotec) для лунок, а также использовали систему для сбора и переноса отдельных PI-негативных живых клеток в 50 мкл культуральной среды (MTEC/B27+5% FBS+»YHF10KNS»+2,5% Матригеля) в каждой лунке 384-луночного планшета (CELLSTAR, # 655892, Greiner). Отдельные клетки в каждой лунке инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 10 дней для образования органоидов. При росте клеточного агрегата по большой оси не менее 50 мкм, его определяли как образование органоида. Процессы образования органоидов из отдельных клеток визуализировали с такими же интервалами, как описано в Примере 5. Программу для визуализации J (версия 1.52n) использовали для получения данных изображений в анализе на морфологию клеток, как описано в Примере 5.

[0191]

(Результаты)

Процессы образования органоидов из отдельных клеток наблюдали путем культивирования каждой из 1053 клеток, полученных от трех мышей, в отдельных лунках.

Из 1053 клеток, 307 клеток образовывали органоиды, а остальные 746 клеток не образовывали органоидов. Органоид-образующие клетки и клетки, не образующие органоиды, оценивали на клеточную морфологию, соответственно (фиг. 20). Органоид-образующие клетки были значительно больше по площади, периметру, большой оси и малой оси, соответственно, чем клетки, не образующие органоидов (фиг. 20А-20D). При этом, не наблюдалось каких-либо значимых различий в округлости, в значениях уровня серого (среднее значение, мода) и в центроидах между органоид-образующими клетками и клетками, не образующими органоидов (фиг. 20Е-20Н).

[0192]

В Примере 6 показано, что среди эпителиальных клеток легких, полученных от мышей, относительно крупные клетки, а особенно клетки с большой площадью, периметром, большой и/или малой осью, с большей вероятностью будут образовывать органоиды как описано в Примере 5.

[0193]

[Пример 7] Комбинированная оценка клеточной морфометрии и секвенирования РНК в отдельных клетках

Данные морфометрии клеток объединяли с данными секвенирования РНК из отдельных молекул для использования паттернов экспрессии генов в клетках, имеющих морфологические признаки, описанные в Примерах 5 и 6.

Булавовидные клетки собирали из эпителиальных клеток легких, полученных от мышей, и суспендировали в культуральной среде (МТЕС/В27+5% FBS+«Y») для приготовления клеточной суспензии, содержащей от 2500 до 5000 клеток на мл культуральной среды, как описано в примере 6. Суспензию клеток объемом 2 мл высевали на 6-луночные планшеты Elplasia (Corning 4444), которые делали неадгезивными с помощью Biosurfine AWP-MRH (6% водного раствора) (Тоуо Gosei), и эти планшеты оставляли на 30 минут. Затем с помощью Cell Handler[®] (Yamaha) получали изображения ВF и изображения PI лунок планшетов, а также собирали и переносили отдельные PI-негативные живые клетки в 2 мкл раствора ингибитора РНКазы (РНКазин плюс 0,2 мкл 5× Maxima, 0,4 мкл Н-буфера, 1,4 мкл воды без РНКазы) в каждую лунку 96-луночного планшета для ПЦР. Секвенирование РНК осуществляли на каждой из клеток для получения данных секвенирования РНК отдельных клеток. Кроме того, программу Image J (версия 1.52n) использовали для оценки элементов клеточной морфологии по данным изображения каждой клетки, как показано в Примере 5. Программное обеспечение для анализа Seurat (версия 3) использовали для объединения данных анализа изображений, касающихся морфологии клеток, и данных секвенирования РНК отдельных клеток.

[0194]

(Результаты)

Данные анализа изображений, касающиеся морфологии клеток для отдельных клеток, объединяли с данными секвенирования РНК отдельных клеток для проведения анализа на кластеризацию, в результате чего оцененные клетки были классифицированы в

первую очередь по трем кластерам (фиг. 21). На фигурах 21А-С, кластер, показанный в правом верхнем углу, называется «Кластер 0», кластер, показанный в правом нижнем углу, называется «Кластер 1», а кластер, показанный в левом нижнем углу, называется «Кластер 2». На фигуре 21А показан уровень экспрессии маркера булавовидных клеток, *Scgb1a1*, в каждом кластере, что указывает на высокую экспрессию *Scgb1a1* в кластерах 0 и 2. Этот результат показал, что клетки, соответствующие кластерам 0 и 2, представляют собой булавовидные клетки (фиг. 21С). На фигуре 21В показан уровень экспрессии клеточного маркера АТ2, *Sftpc*, в каждом кластере, что указывает на высокий уровень экспрессии *Sftpc* в кластере 1. Этот результат показал, что клетки, соответствующие кластеру 1, представляют собой клетки АТ2 (фиг. 21С).

[0195]

На фигуре 21D показана площадь клеток, соответствующих каждому кластеру. На Фигуре 21D показано, что булавовидные клетки, соответствующие кластеру 2 (правая сторона на Фиг. 21D), больше по площади, чем булавовидные клетки, соответствующие кластеру 0 (левая сторона на Фиг. 21D). Принимая во внимание результаты примеров 4 и 5, было сделано предположение, что относительно крупные булавовидные клетки, соответствующие кластеру 2, имеют более высокую тенденцию к образованию органоидов.

[0196]

Объединение данных анализа изображений, касающихся морфологии клеток, с данными секвенирования РНК из отдельных клеток показало, что клетки, соответствующие каждому кластеру, экспрессируют специфические гены на высоком уровне. В таблице, представленной ниже, показаны 20 наилучших генов с высокой экспрессией в каждом кластере.

[Таблица 9]

Ранжирование уровня экспрессии по рейтингу	Кластер 0	Кластер 1	Кластер 2
1	<i>Cbr2</i>	<i>Lamp3</i>	<i>Tff2</i>
2	<i>Hp</i>	<i>Lyz2</i>	<i>Reg3g</i>
3	<i>Cyp2f2</i>	<i>Napsa</i>	<i>Bpifb1</i>
4	<i>Prdx6</i>	<i>Slc34a2</i>	<i>Muc5b</i>
5	<i>Scgb1a1</i>	<i>Lyz1</i>	<i>Sult1d1</i>
6	<i>Ldhb</i>	<i>Rnase4</i>	<i>Fxyd3</i>
7	<i>Ces1d</i>	<i>Hc</i>	<i>Scgb3a1</i>
8	<i>Cckar</i>	<i>Cd74</i>	<i>Lypd2</i>
9	<i>Selenbp1</i>	<i>Scd1</i>	<i>Chad</i>
10	<i>Gstm2</i>	<i>Sftpc</i>	<i>S100a6</i>
11	<i>Scnn1b</i>	<i>Lgi3</i>	<i>Pglyrp1</i>

12	Scgb1c1	Cldn18	Aldh3a1
13	Plpp3	Etv5	Bpifa1
14	Ephx1	Cxcl15	Gsto1
15	Dcxr	S100g	Lgals3
16	Alas1	Elov11	Pigr
17	Retnla	Fas	Scgb3a2
18	Sec14l3	H2-Aa	Ltf
19	Ptgr1	Fabp5	Qsox1
20	Krtap17-1	Rn4.5s	Cyp2a5

[0197]

Были исследованы уровни транскрипции генов, соответствующих белкам, в высокой степени экспрессированным в клетках кластера 2, по сравнению с клетками других кластеров (фиг. 22). Результат показал, что кластер 2 экспрессирует Fxyd3, Pigr, Cpd, Lyba, Perp, Kcne3, Il13ra1, Slc15a2 и Cd14 на относительно высоком уровне, соответственно.

[0198]

Данные Примеров 5-7 позволяют предположить, что отбор эпителиальных клеток легких, экспрессирующих маркеры, выявленные в Примере 7, позволяет отбирать эпителиальные клетки легких с более высокой тенденцией к образованию органоидов.

[0199]

[Пример 8] Образование органоидов из булавовидных CD14⁺-клеток

Среди маркеров, выявленных в Примере 7, CD14 использовали для выделения CD14⁺-клеток, экспрессирующих CD14 (клеток, соответствующих кластеру 2), из эпителиальных клеток легких и для того, чтобы определить, могут ли CD14⁺-клетки образовывать органоиды.

Суспензию клеток приготавливали для проведения FACS, как описано в Примере 5, за исключением того, что использовали следующие антитела: антитело против CD14-APC (#17-1401-81, Invitrogen); антитело против МНС класса 2, конъюгированное с eFluoro450 (#48-5321, eBioscience); антитело против CD24-PEcy7 (#25-0242-80, Invitrogen); антитело против CD45-биотина (#13-0451, eBioscience); и антитело против CD31-биотина (#13-0311, eBioscience).

[0200]

(Фракционирование CD14⁺-клеток)

FACS осуществляли для удаления мертвых клеток, окрашенных 7-AAD, эндотелиальных клеток, окрашенных антителом против CD31, гемопоэтических клеток, окрашенных антителом против CD45, и клеток AT2, окрашенных антителом против МНС класса 2 (клеток, соответствующих кластеру 1) из приготовленной клеточной суспензии. Из популяции оставшихся клеток собирали Scgb1a1-позитивные клетки (в основном

булавовидные клетки), излучающие флуоресценцию, происходящую от GFP, и собирали тканевые стволовые клетки/клетки-предшественники ($CD24^{lo}$), окрашенные антителом против CD24. Это приводило к фракционированию клеток, соответствующих кластеру 0 и кластеру 2. $CD14^+$ -клетки, окрашенные антителом против CD14, и $CD14^-$ -клетки, не окрашенные антителом, были фракционированы. $CD14^+$ -клетки и $CD14^-$ -клетки фракционировали с помощью FACS следующим образом: сначала клеточную суспензию с изотипическими антителами подвергали FACS и устанавливали стробирующий импульс для того, чтобы перекрыть полученное распределение клеток. Затем клеточную суспензию с антителом против CD14 подвергали FACS, а затем фракционировали клетки, которые превышали установленный стробирующий импульс, как и $CD14^+$ -клетки, и фракционировали клетки в пределах установленной области стробирующего импульса как и $CD14^-$ -клетки.

[0201]

Для того, чтобы проверить, являются ли $CD14^+$ -клетки булавовидными клетками, соответствующими кластеру 2, уровни экспрессии *Muc5b*, *Scgb3a1* и *Tff2*, которые представляют собой гены, экспрессированные в высокой степени в клетках кластера 2, исследовали с помощью количественной ПЦР (фиг. 23А). На фигуре 23А показано, что уровни экспрессии *Muc5b*, *Scgb3a1* и *Tff2*, маркерных генов, которые были обнаружены с высокой степенью экспрессии в клетках, соответствующих кластеру 2, были высокими в $CD14^+$ -клетках. Результат позволяет предположить, что $CD14^+$ -клетки представляют собой булавовидные клетки, соответствующие кластеру 2.

[0202]

Далее была проведена оценка, являются ли $CD14^+$ -клетки относительно крупными и существует ли высокая вероятность образования органоидов (фиг. 23В). Полученные $CD14^{+/}$ -клетки центрифугировали (400G, 5 минут, 4°C), ресуспендировали в 250 мкл базальной среды, смешивали с 5 мкл PI, диспергировали в черном 96-луночном планшете со стеклянным дном (Sensoplate, Greiner № 655892), а затем помещали в 96-луночный планшет на 30 минут. Затем для каждой лунки были получены изображения в ярком поле (BF) и флуоресцентные изображения GFP/PI. Мертвые клетки, окрашенные PI, исключали из последующего анализа. Из последующего анализа также исключали нефокусированные клетки, клетки, все свойства которых невозможно было определить из-за расположения на краю при мозаичной обработке, и клетки, контактировавшие с другой клеткой. Булавовидные клетки, излучающие флуоресценцию, происходящую от GFP, оценивали для определения морфологии клеток. Оценку морфологии клеток осуществляли с помощью данных изображения BF, полученных с использованием программы получения изображения J, как описано в Примере 5 (фиг. 23В). На фигуре 23В показано, что $CD14^+$ -клетки были значительно больше по площади, чем $CD14^-$ -клетки. Эти результаты позволяют предположить, что отбор клеток на основе по меньшей мере одного из клеточных маркеров, описанных выше (например, $CD14^+$), позволяет отбирать клетки, площадь которых относительно велика, что соответствует кластеру 2.

[0203]

(Образование органоидов из CD14⁺-клеток)

CD14⁺-клетки, полученные как описано выше, исследовали на наличие у них высокой тенденции к образованию органоида. CD14^{+/−}-клетки засеивали клеточной суспензией, содержащей культуральную среду (MTEC/B27+»YHF10KNS»+2,5% Матригеля, 2 мл) по 300 клеток на лунку, как описано в Примере 3, и культивировали в течение 9 дней с образованием органоидов (фиг. 24А). На фигуре 24А показано, что CD14⁺-клетки образовывали органоиды большего размера и в большем количестве по сравнению с CD14[−]-клетками. Процент клеточных агрегатов, образованных при культивировании CD14^{+/−}-клеток (ЭОК [%]), также подтверждает, что CD14⁺-клетки со значительно большей вероятностью будут образовывать органоиды, чем CD14[−]-клетки (фиг. 24В).

[0204]

Булавовидные клетки, соответствующие кластеру 2, в органоидах, образованных из CD14^{+/−}-клеток на 9 день после культивирования, исследовали на степень их дифференцировки (фиг. 25). На фигуре 25 показано, что как CD14⁺-, так и CD14[−]-клетки существенно не различаются по экспрессии маркерных генов альвеолярной линии, а в частности Sftpc, Ager и Hox. С другой стороны, экспрессия маркерных генов для бронхиол, особенно Sox2 (маркер клеток бронхиального эпителия), была значительно ниже в CD14[−]-клетках, чем в CD14⁺-клетках. Кроме того, экспрессия Scgb1a1 (маркера булавовидных клеток) и Foxj1 (маркера реснитчатых клеток) имеет тенденцию к снижению в CD14[−]-клетках, чем в CD14⁺-клетках. Результаты показали, что CD14[−]-клетки, соответствующие кластеру 0, имеют более высокую тенденцию к дифференцировке из булавовидных клеток в альвеолярные клетки.

[0205]

Иммунологическое окрашивание проводили на органоидах, полученных из CD14^{+/−}-клеток, на 9-й и 12-й день после культивирования (на 9-й день после культивирования, культуральную среду заменяли базальной средой для их культивирования в течение 3 дней для индуцирования дифференцировки) (фиг. 26). На фигуре 26А показано, что органоид на 9-й день после культивирования включает клетки, коэкспрессирующие как маркер булавовидных клеток, SCGB1A1, так и маркер клеток АТ2, SFTPC. На Фигуре 26В показан органоид на 9 день после культивирования, коэкспрессирующий оба клеточных маркера клеток АТ1, а именно, AGER и HOPX. Эти результаты показали, что CD14⁺-клетки, соответствующие кластеру 2, имеют более высокую тенденцию к дифференцировке в клетки линии легочных альвеол в органоидах, происходящих от клеток, описанных выше.

[0206]

[Пример 9] Трансплантация первичных эпителиальных клеток легких мышам с моделью повреждения легких

Была проведена оценка, могут ли CD14^{+/−}-клетки пролиферироваться или

дифференцироваться в альвеолярные клетки в легких во время восстановления после повреждения легких. CD14⁺-клетки собирали у генетически модифицированных мышей Scgbl1a1-CreER; Rosa26-mTmG, как описано в Примере 8, и CD14⁻-клетки и CD14⁺-клетки суспендировали в культуральной среде (MTEC/B27+5% FBS +»YHF10KNS»), соответственно, для приготовления суспензии CD14⁺-клеток, включающей 7000 клеток на 75 мкл культуральной среды. Блеомицин вводили интраназально в дозе 3 мг/кг бестимусным мышам BALB/cSlc-nu/nu (в возрасте 10 недель, не менее 25 г), у которых отсутствовала функция тимуса и Т-клеток, для подготовки мышей с моделью повреждения легких за неделю до инъекции клеточной суспензии. Суспензию клеток вводили в легкие мышей с моделью повреждения легких через трахею.

[0207]

Мышей с моделью повреждения легких вскрывали для исследования выживаемости и пролиферации инъецированных клеток в легких через две недели после инъекции клеточной суспензии (фиг. 27). В этом исследовании использовали левое легкое мышей. Из левого легкого приготавливали замороженные блоки, из которых на микротоме вырезали срезы ткани толщиной 8 мкм. Интервал между каждым срезом ткани составлял приблизительно 100 мкм. Флуоресценцию, испускаемую GFP, оценивали для сорока срезов ткани на мыш. Жизнеспособность клеток, инъецированных в легкое, оценивали по количеству кластеров, наблюдаемых в легком (фиг. 27А), и по количеству клеток, включенных в один кластер (фиг. 27В). Популяцию клеток, излучающих флуоресценцию GFP на расстоянии не более 100 мкм, определяли как кластер в Примере 9.

[0208]

На фигуре 27А показано, что CD14⁺-клетки и CD14⁻-клетки были жизнеспособными в легких, поврежденных блеомицином, соответственно. На фигуре 27А показано, что CD14⁺-клетки были значительно более жизнеспособными в легких, чем CD14⁻-клетки. На фигуре 27В показано, что кластеры, происходящие от CD14⁺-клеток, состоят из значительно большего количества клеток, чем кластеры, происходящие от CD14⁻-клеток. Фиброз, предположительно вызванный воспалением, наблюдался в легких мышей, которым вводили CD14⁺-клетки. С другой стороны, у мышей, которым инъецировали CD14⁻-клетки, фиброз в легких был меньше, чем у мышей, которым инъецировали CD14⁺-клетки.

[0209]

Клетки, инъецированные в легкие, исследовали на их способность к дифференцировке путем изучения экспрессии клеточных маркеров в клетках, излучающих флуоресценцию, происходящую от GFP, в легких. В исследовании использовали правое легкое мышей. Из правого замороженного легкого приготавливали парафиновые блоки, из которых делали срезы ткани толщиной 6 мкм. Иммунологическое окрашивание проводили на срезах тканей. Иммунологическое окрашивание показало, что клетки AT2, экспрессирующие GFP и маркер клеток AT2, SFTPC, и клетки AT1,

экспрессирующие GFP и маркер клеток AT1, PDPN, присутствуют в легких, в которые были введены CD14⁺-клетки. В легких не наблюдалось ни реснитчатых клеток, экспрессирующих маркер реснитчатых клеток, AcTub, ни клеток, экспрессирующих маркер базальных клеток, AcTub. Эти результаты позволяют предположить, что инъекцированные CD14⁺-клетки (GFP-позитивные клетки) дифференцировались в клетки AT2 и клетки AT1, которые относятся к линии легочных альвеол (фиг. 28). Иммунологическое окрашивание также показало, что булавовидные клетки, экспрессирующие GFP и маркер булавовидных клеток, SCGB1A1, и реснитчатые клетки, экспрессирующие GFP и маркер реснитчатых клеток, AcTub, присутствуют в легких, в которые были введены CD14⁺-клетки. Результат свидетельствует о том, что инъекцированные CD14⁺-клетки (GFP-позитивные клетки) также дифференцировались в реснитчатые клетки бронхиального происхождения из-за коэкспрессии маркера булавовидных клеток SCGB1A1 и маркера реснитчатых клеток AcTUB (фиг. 29).

[0210]

В Примере 9 продемонстрировано, что клетки, соответствующие кластеру 0 (например, CD14⁻-клетки), не вызывают побочных эффектов, таких как воспаление в легком, в которое они доставлены, обладают способностью образовывать органоиды и могут дифференцироваться в клетки легочных альвеол и бронхиальные клетки, что позволяет предположить, что они могут быть использованы в качестве регенеративной лекарственной композиции для лечения повреждения или заболевания легких. В Примере 9 также продемонстрировано, что клетки, соответствующие кластеру 2 (например, CD14⁺-клетки), обладают способностью эффективно образовывать органоиды и могут дифференцироваться в клетки легочных альвеол и бронхиальных клеточных линий, что позволяет предположить, что они могут быть использованы в качестве регенеративной лекарственной композиции для лечения повреждения или заболеваний легких. Кроме того, предполагается, что клетки, соответствующие кластеру 2 (например, CD14⁺-клетки), могут быть использованы в качестве носителя для доставки лекарственного средства (например, органического соединения, гена или белка) для лечения повреждения или заболевания легких.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения органоида, происходящего от эпителиальной клетки легких или клетки рака легких, где указанный способ включает культивирование образца, содержащего эпителиальную клетку легких или клетку рака легких, в культуральной среде, где

культуральная среда содержит 0-10% (об./об.) внеклеточного матрикса и комбинацию по меньшей мере одного фактора, выбранного из группы, состоящей из фактора роста кератиноцитов (KGF), фактора роста фибробластов (FGF) 10 и фактора роста гепатоцитов (HGF); ингибитора белка остеогенеза (BMP) и ингибитора TGF β , и где культуральная среда практически не содержит фидерных клеток.

2. Способ по п. 1, где комбинация дополнительно содержит один или оба агента, способных активировать передачу сигналов Wnt, и ингибитор Rho-киназы (ROCK).

3. Способ по п. 2, где комбинация представляет собой:

комбинацию KGF, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ;

комбинацию KGF, агента, способного активировать передачу сигналов Wnt, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ;

комбинацию FGF10, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ;

комбинацию FGF10, агента, способного активировать передачу сигналов Wnt, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ;

комбинацию HGF, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ;

комбинацию HGF, агента, способного активировать передачу сигналов Wnt, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ;

комбинацию KGF, FGF10, HGF, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ;

комбинацию KGF, FGF10, HGF, агента, способного активировать передачу сигналов Wnt, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ;

комбинацию ингибитора ROCK, KGF, FGF10, HGF, ингибитора BMP и ингибитора TGF β ; или

комбинацию ингибитора ROCK, KGF, FGF10, HGF, агента, способного активировать передачу сигналов Wnt, ингибитора BMP и ингибитора TGF β .

4. Способ по любому из пп. 1-3, где

ингибитор BMP представляет собой Ноггин и/или

ингибитор TGF β представляет собой SB431542.

5. Способ по любому из пп. 2-4, где

агент, способный активировать передачу сигналов Wnt, представляет собой CHIR99021, и/или

ингибитор ROCK представляет собой Y-27632.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где эпителиальные стволовые клетки легких в образце содержат клетки по меньшей мере одного типа, выбранные из группы, состоящей из базальных клеток, булавовидных клеток, бронхиоальвеолярных стволовых клеток и альвеолярных эпителиальных клеток.

7. Способ по любому из пп. 1-6, включающий отбор булавовидных клеток-I, клеток AT2 или булавовидные клеток-II из образца на основе по меньшей мере одного из клеточных маркеров, соответствующих булавовидной клетке-I, клетке AT2 и булавовидной клетке-II, и перечисленных в Таблице А, и их гомологов перед культивированием образца в культуральной среде.

Таблица А

Булавовидные клетки-I	Клетки AT2	Булавовидные клетки-II
Cbr2	Lamp3	Tff2
Hp	Lyz2	Reg3g
Cyp2f2	Napsa	Bpifb1
Prdx6	Slc34a2	Muc5b
Scgb1a1	Lyz1	Sult1d1
Ldhb	Rnase4	Fxyd3
Ces1d	Hc	Scgb3a1
Cckar	Cd74	Lypd2
Selenbp1	Scd1	Chad
Gstm2	Sftpc	S100a6
Scnn1b	Lgi3	Pglyrp1
Scgb1c1	Cldn18	Aldh3a1
Plpp3	Etv5	Bpifa1
Ephx1	Cxcl15	Gsto1
Dcxr	S100g	Lgals3
Alas1	Elovl1	Pigr
Retnla	Fas	Scgb3a2
Sec14l3	H2-Aa	Ltf
Ptgr1	Fabp5	Qsox1
Krtap17-1	Rn4.5s	Cyp2a5
		Cpd
		Ly6a
		Perp
		Kcne3
		Il13ra1
		Slc15a2
		Cd14

8. Органоид, происходящий от эпителиальной клетки легких или клетки рака

легких и полученный способом по любому из пп. 1-7.

9. Органоид, происходящий от эпителиальной клетки легких и содержащий внутриполостной слой и клеточный слой, обращенный к внутриполостному слою, где эпителиальные клетки легких являются альвеолярными клетками, а клеточный слой в основном состоит из:

клеток AT2;

комбинации клеток AT2 с клетками, экспрессирующими клеточный маркер AT2 и маркер бронхиального эпителия; или

клеток, экспрессирующих маркер бронхиального эпителия, или где

эпителиальная клетка легких является клеткой дыхательных путей, и

клеточный слой в основном состоит из комбинации базальных клеток с клетками, экспрессирующими маркер базальных клеток и маркер бронхиального эпителия.

10. Органоид по п. 9, где эпителиальная клетка легких представляет собой альвеолярную клетку; клеточный слой по существу состоит из клеток AT2; клетки AT2 экспрессируют один или оба из NT2-280 и SFTPC; и NT2-280 локализуется в клеточных мембранах клеток AT2 или рядом с ними, где клеточные мембраны обращены вовнутрь полости.

11. Органоид по п. 9, где

маркер клеток AT2 представляет собой один или оба из NT2-280 и SFTPC,

маркер бронхиального эпителия представляет собой SOX2 и/или

маркер базальных клеток представляет собой KRT5.

12. Регенеративная лекарственная композиция, содержащая органоид, происходящий от эпителиальной клетки легких и полученный способом по любому из пп. 1-7; органоид, происходящий от эпителиальной клетки легких по любому из пп. 9-11, и/или клетки этого органоида.

13. Способ скрининга вещества, эффективного для лечения рака легких, где указанный способ включает:

контактирование исследуемого вещества с органоидом, полученным из клетки рака легких способом по любому из пп. 1-7,

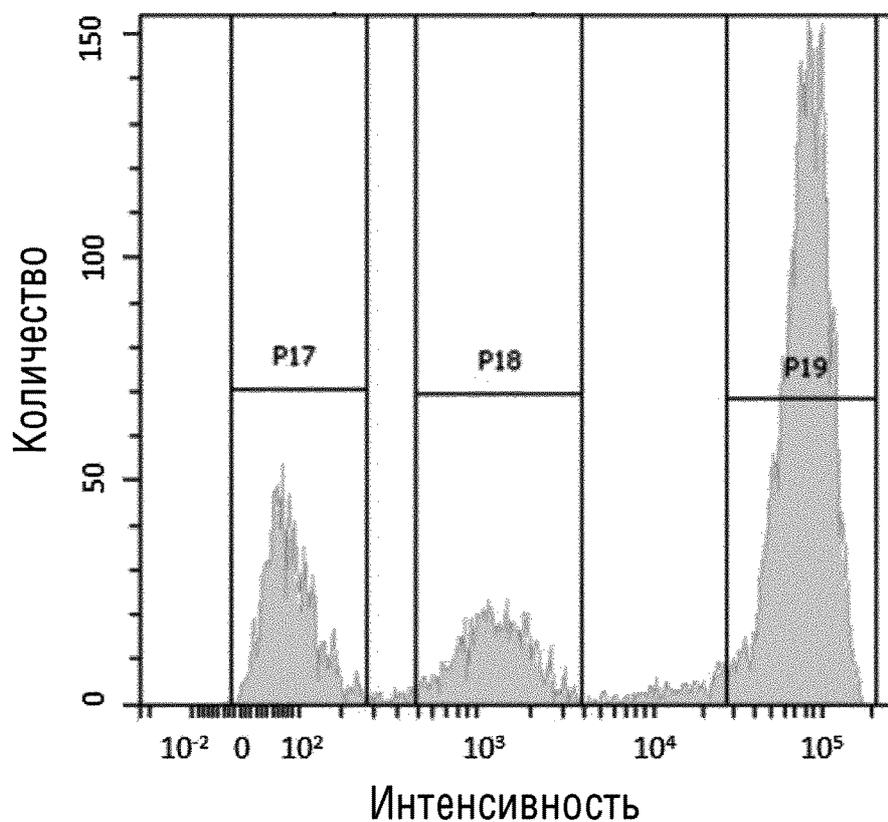
оценку органоида после его контактирования с исследуемым веществом, и

сравнение значения, определенного для органоида после его контакта с исследуемым веществом, с контрольным значением.

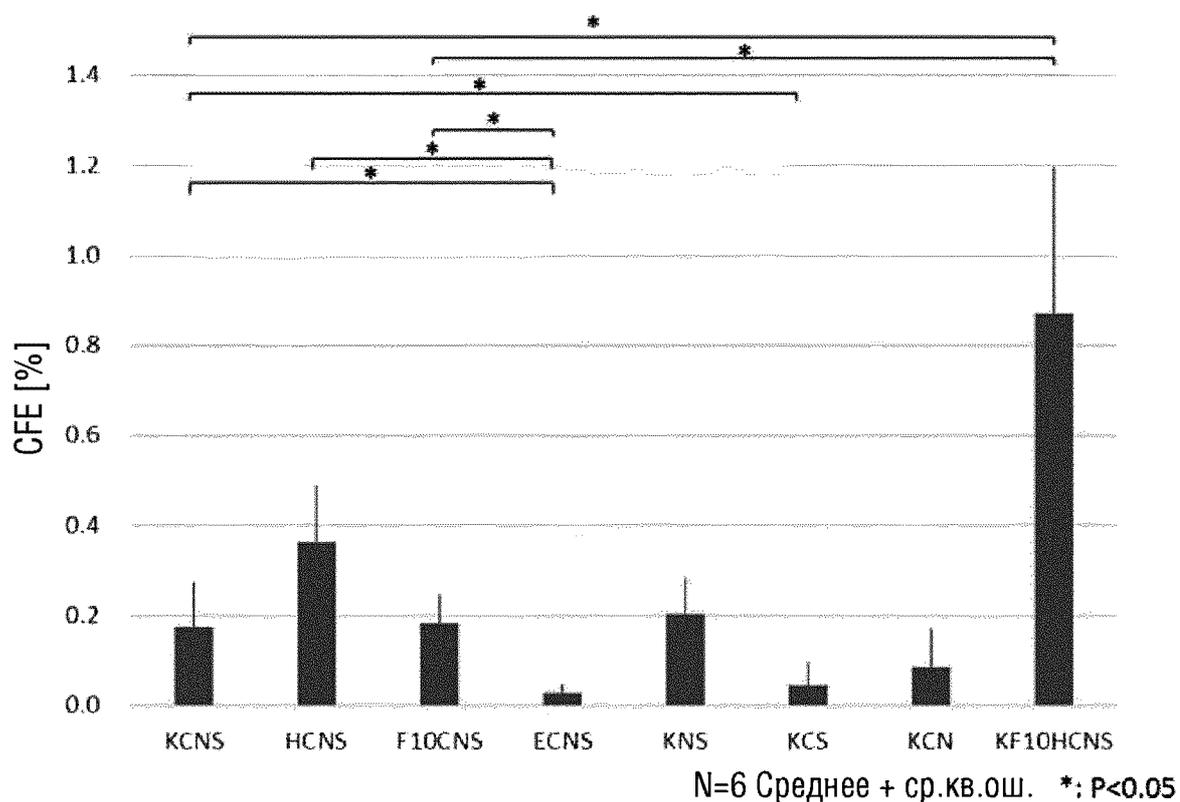
По доверенности

1/23

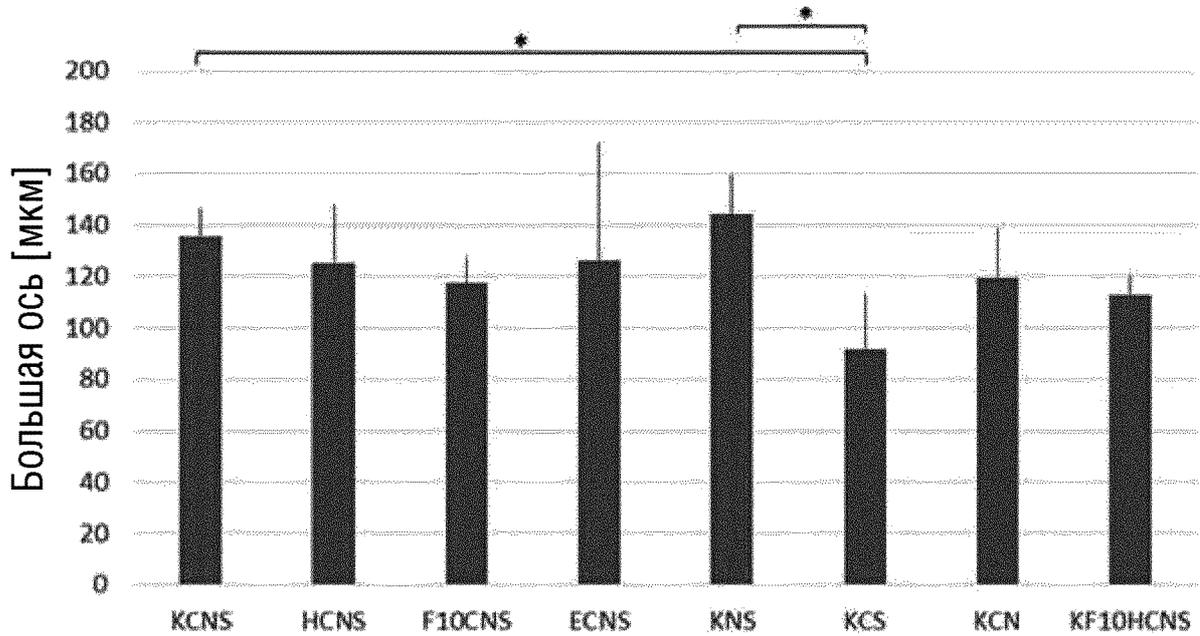
ФИГ.1



ФИГ.2

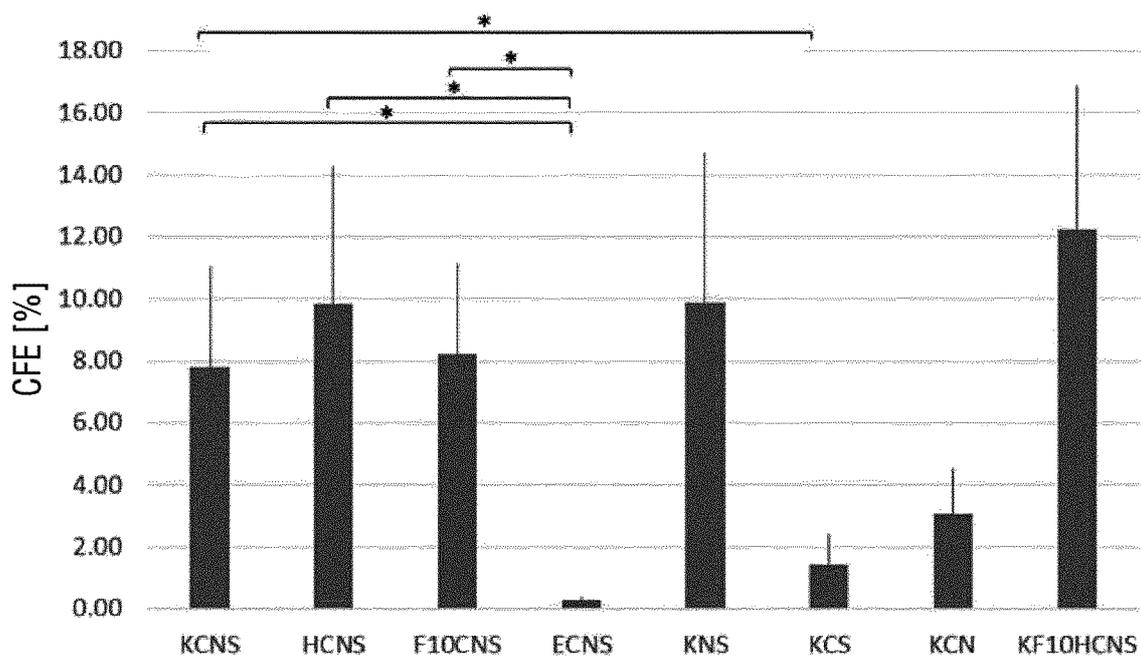


ФИГ.3



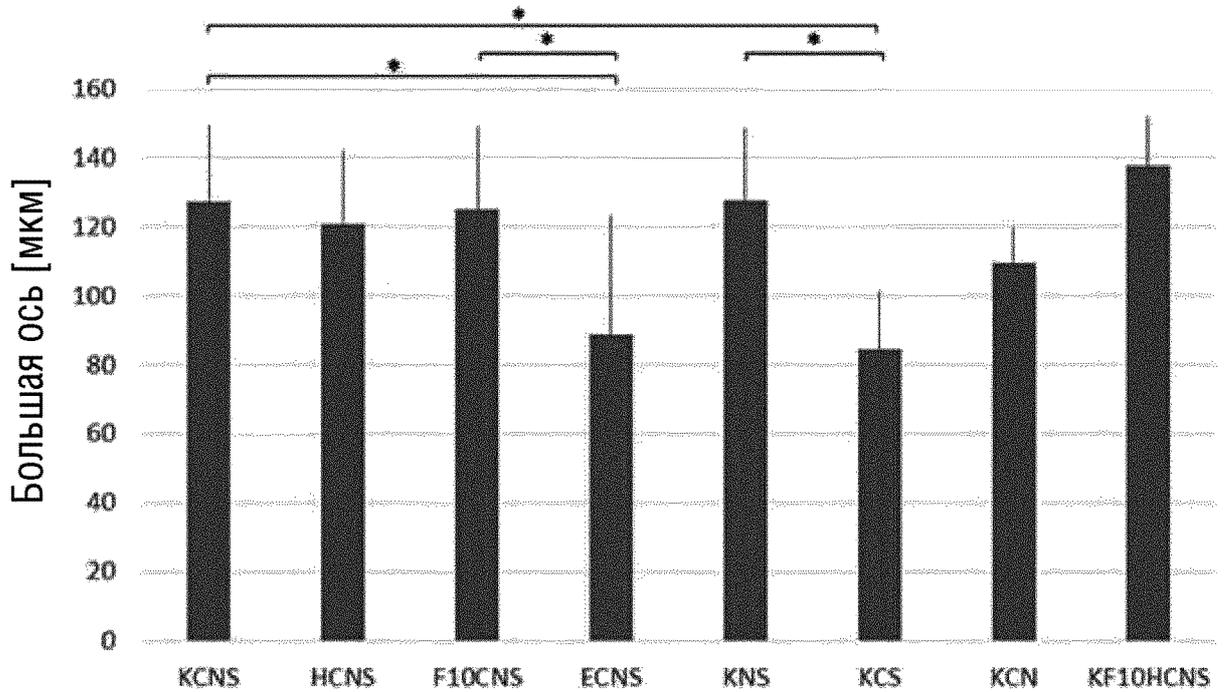
N=6 Среднее + ср.кв.ош. *: P<0.05

ФИГ.4



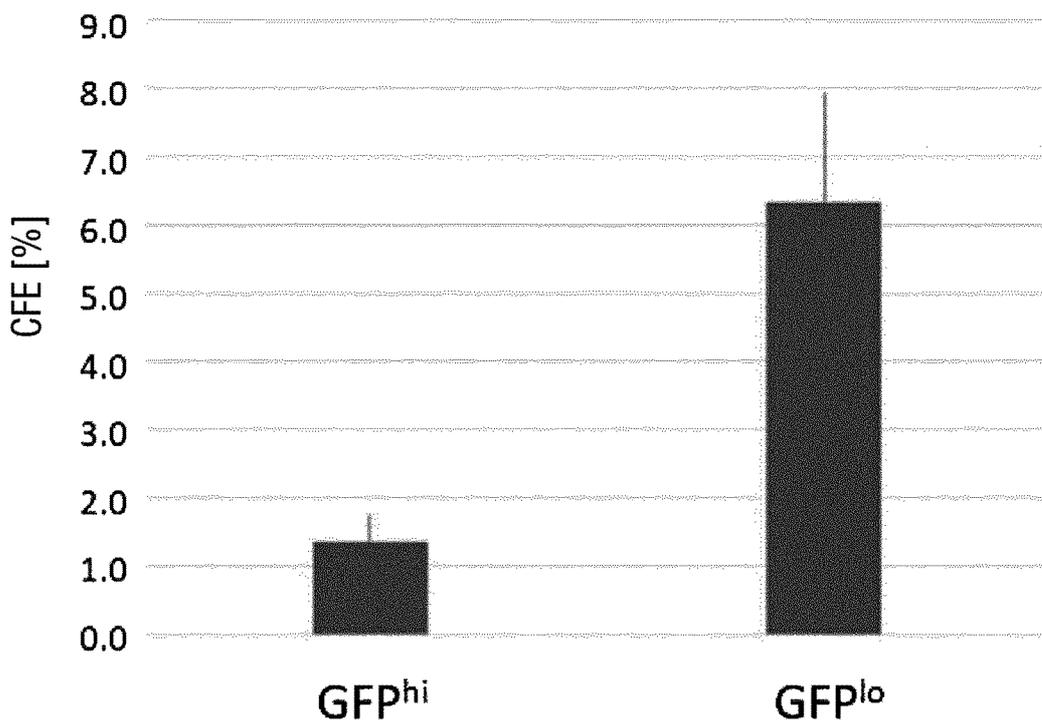
N=6 Среднее + ср.кв.ош. *: P<0.05

ФИГ.5

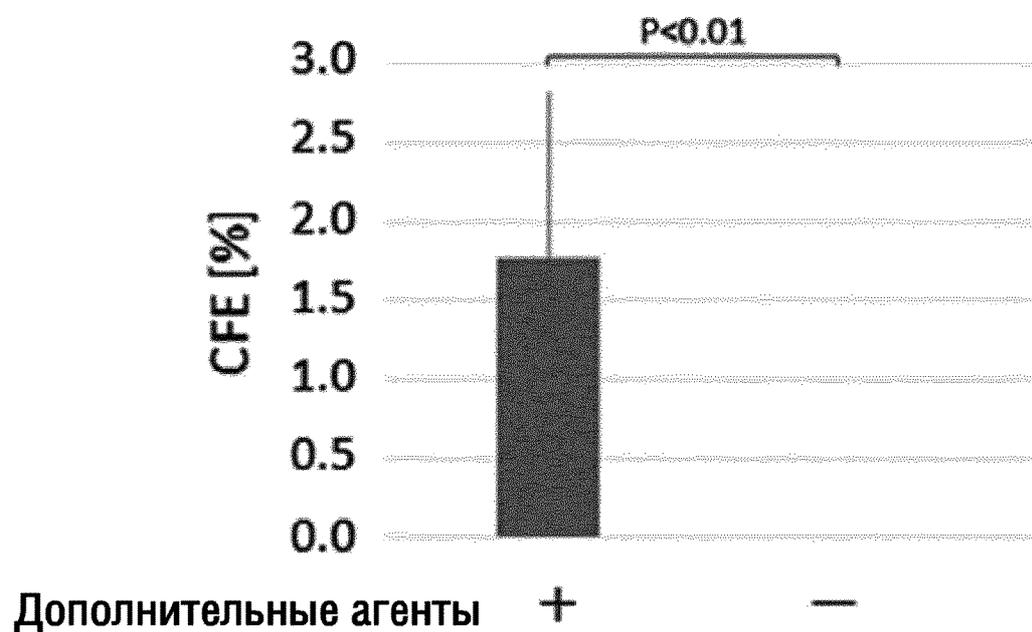


N=6 Среднее + ср.кв.ош. * : P<0.05

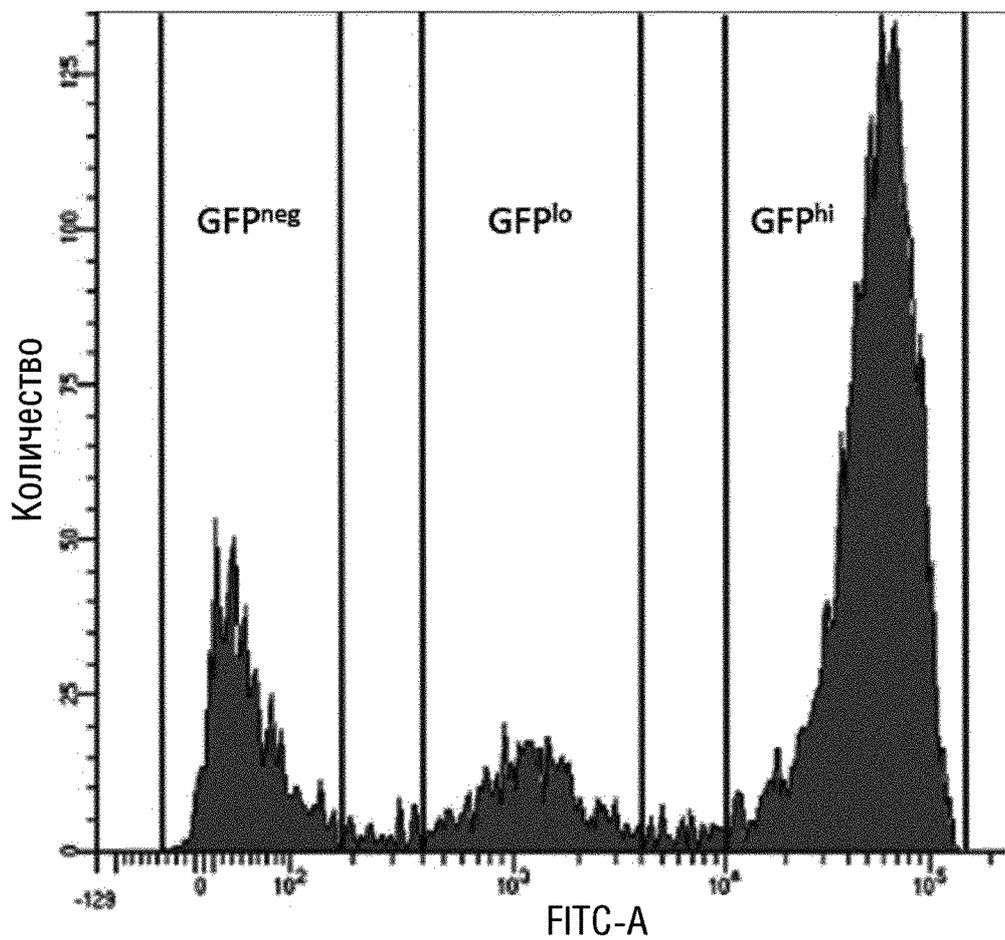
ФИГ.6



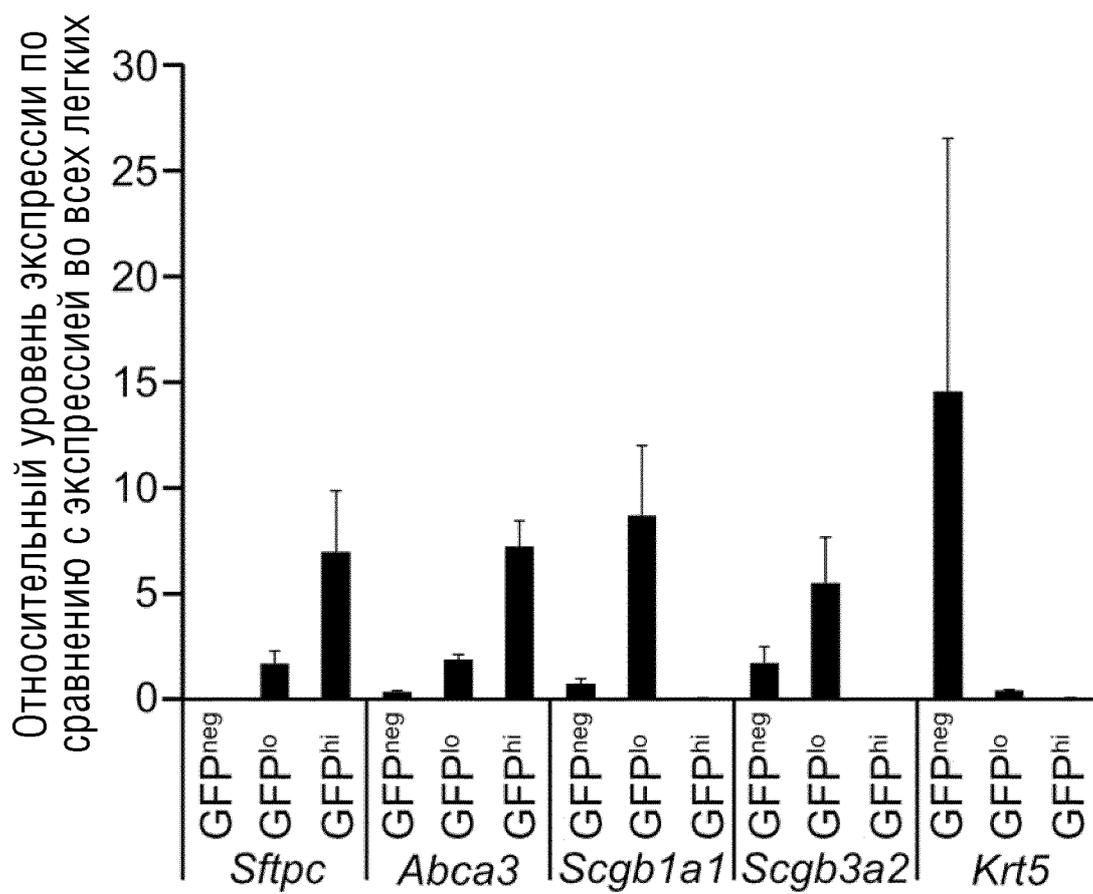
ФИГ.7



ФИГ.8

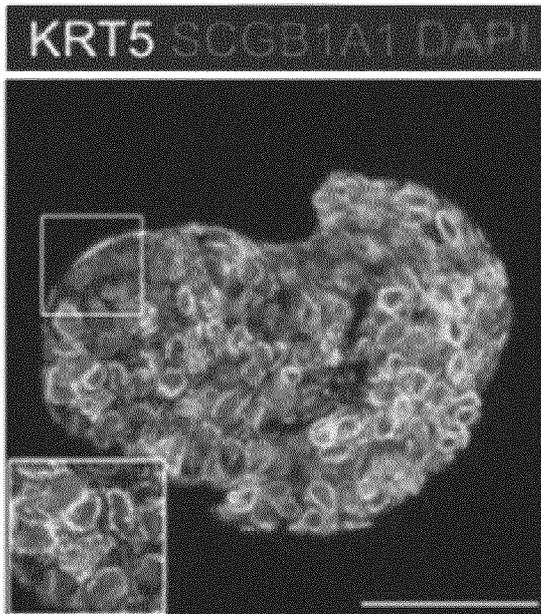


ФИГ.9

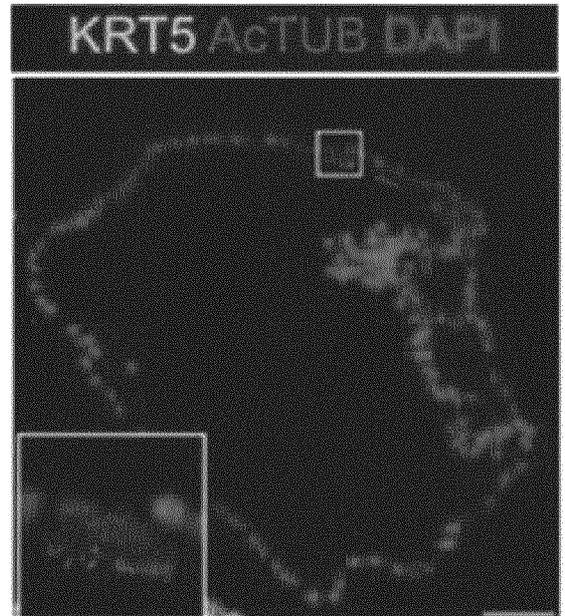
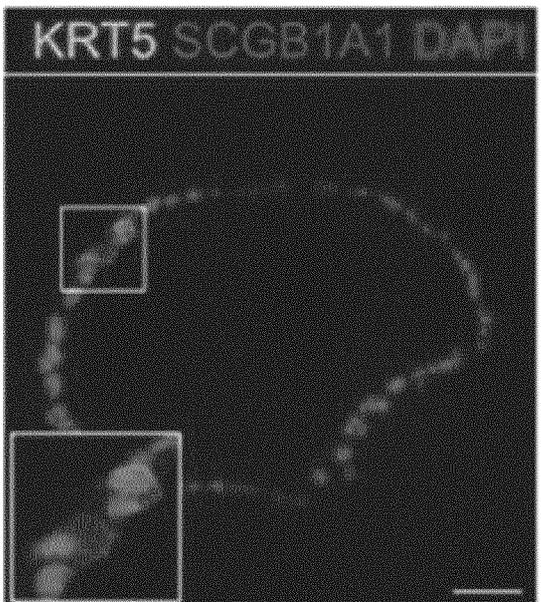
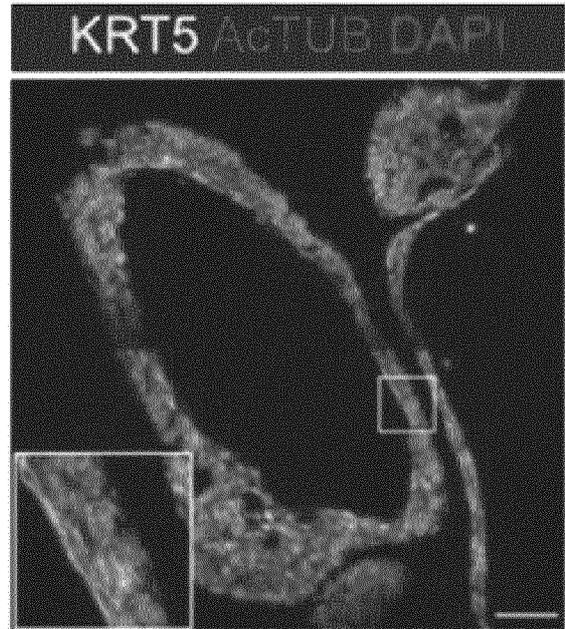


ΦΙΓ.10

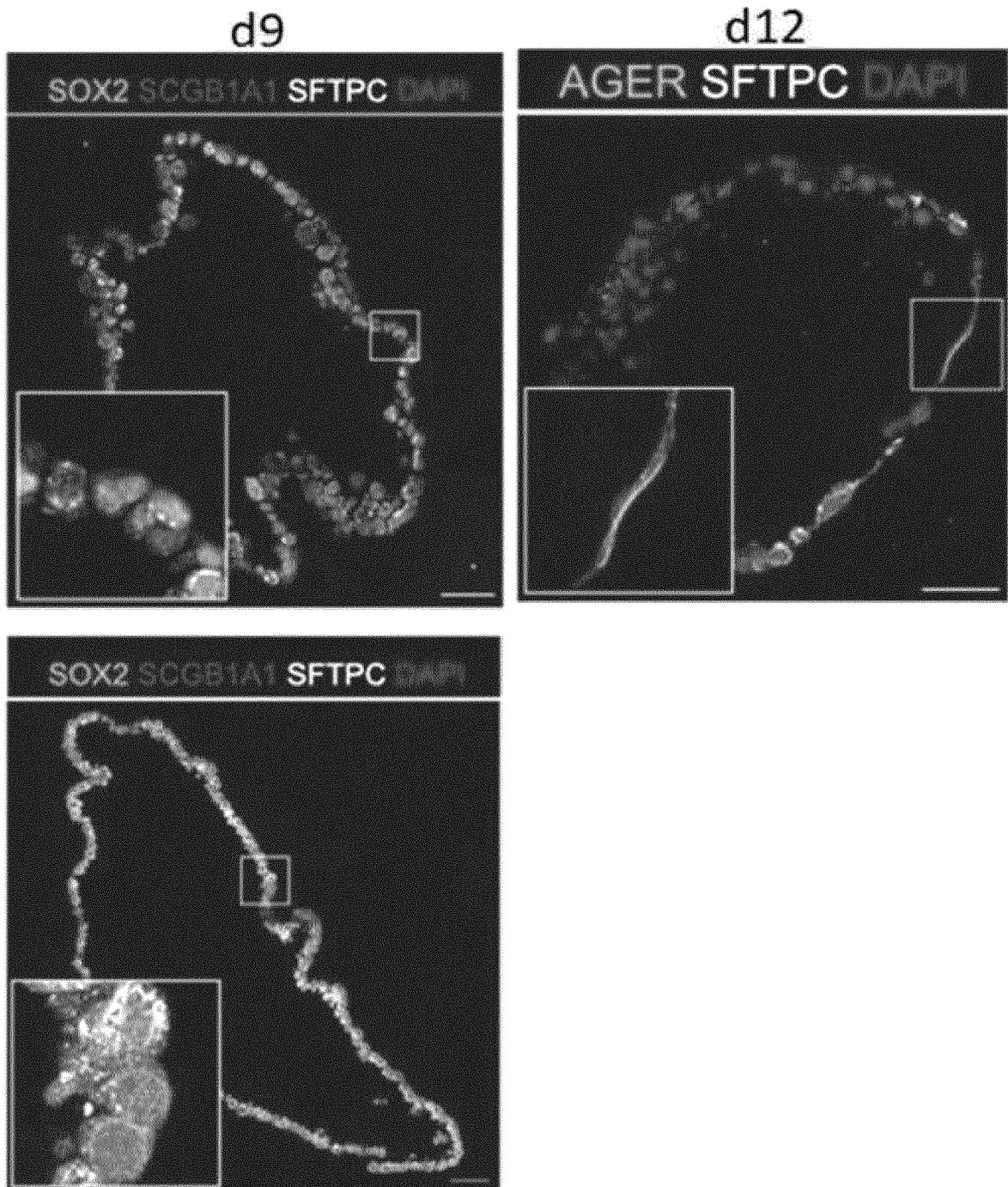
d9



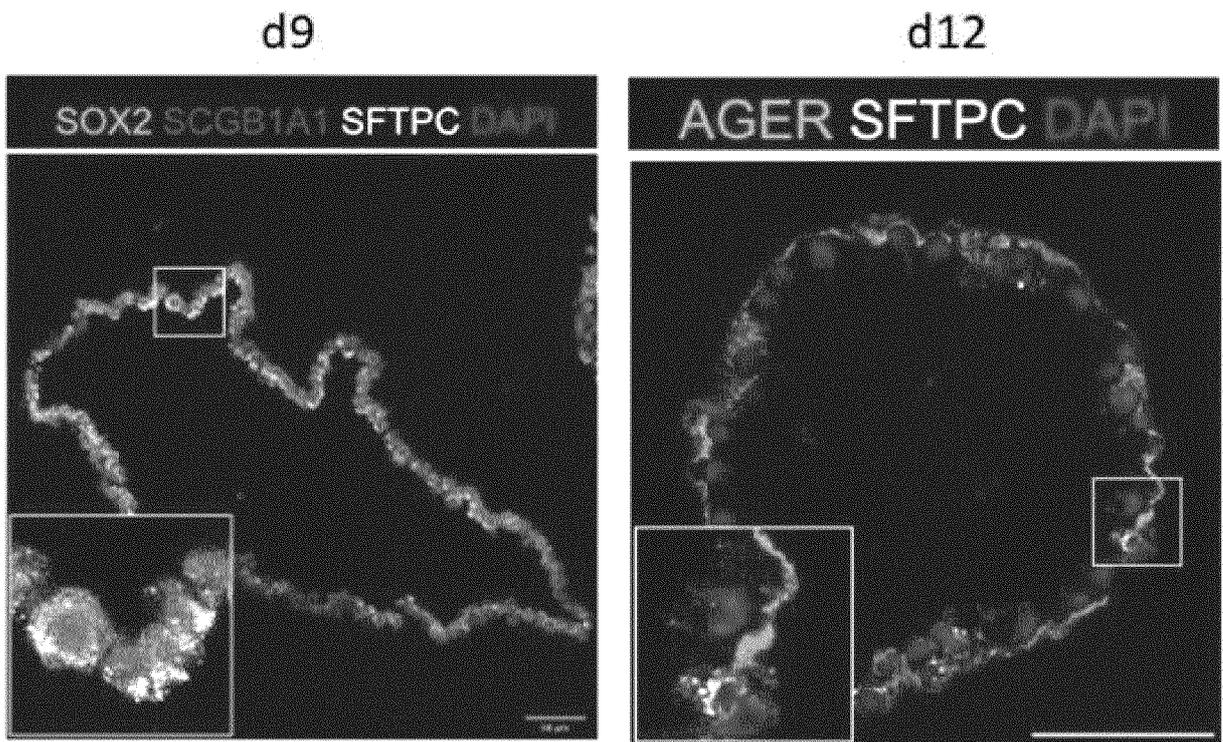
d12



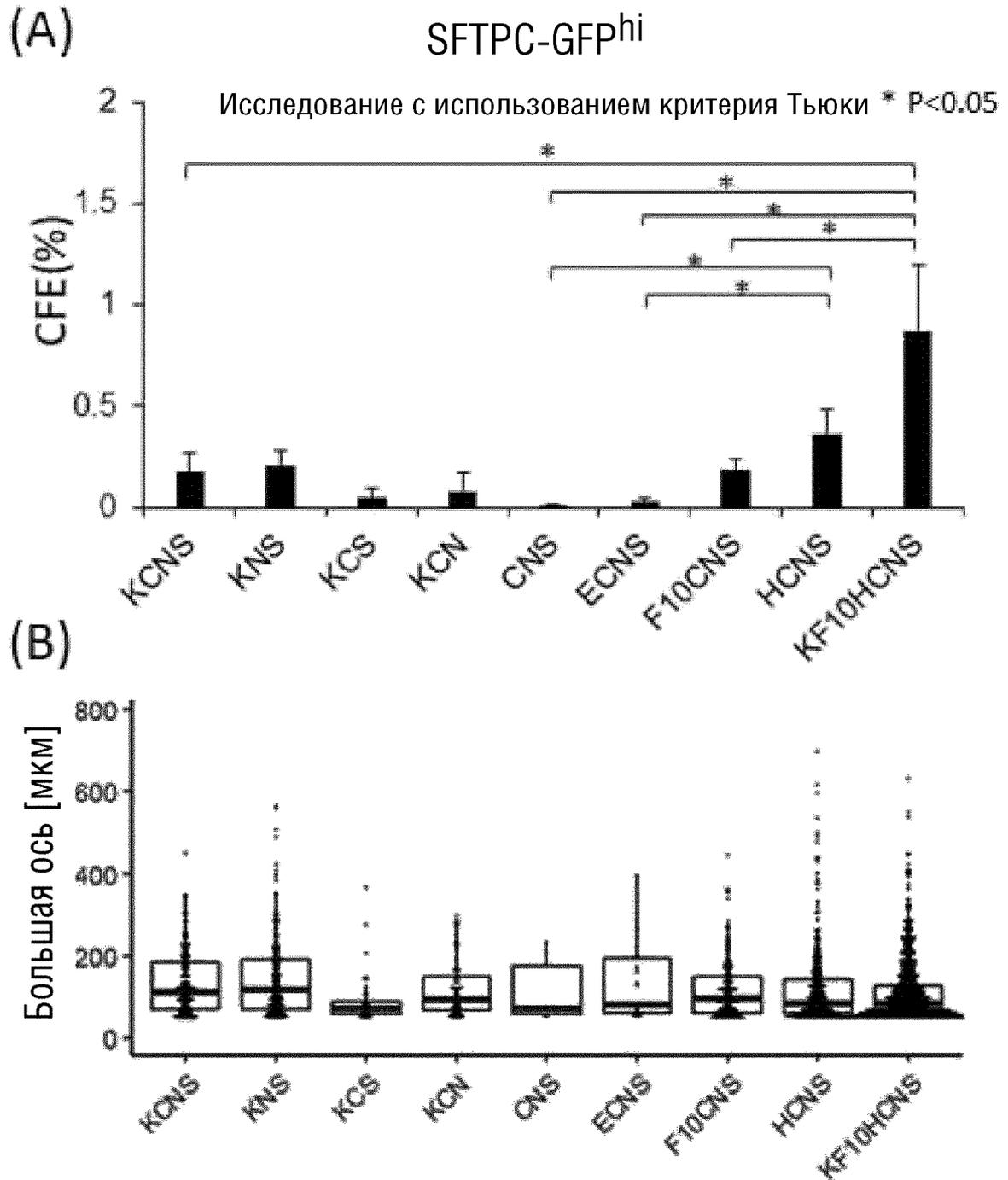
Φ/Γ.11



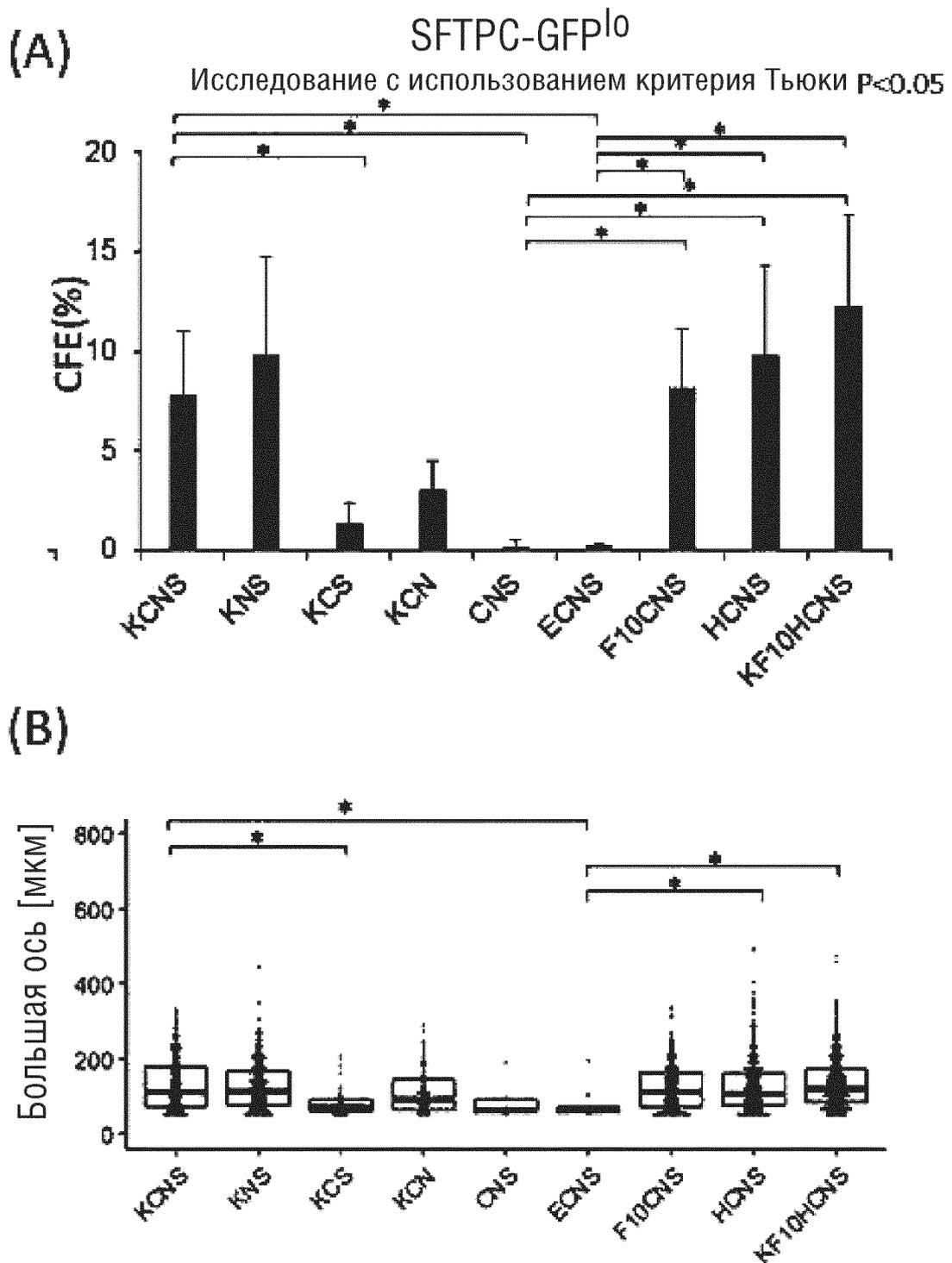
ΦΙΓ.12



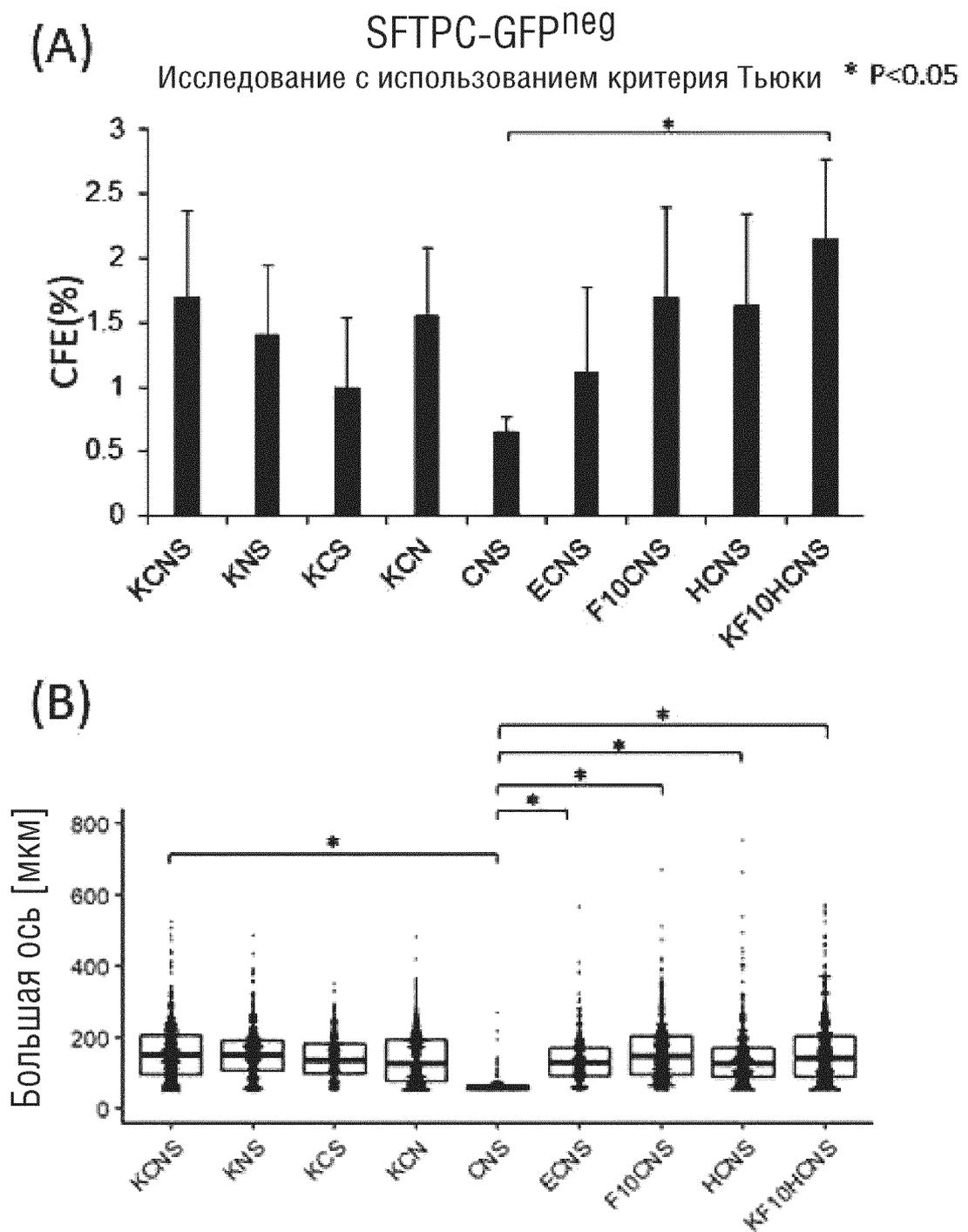
ФИГ.13



ФИГ.14



ФИГ.15



ФИГ.16

(A)

Shh-Cre, Rosa^{mCherry};SFTPC-GFP

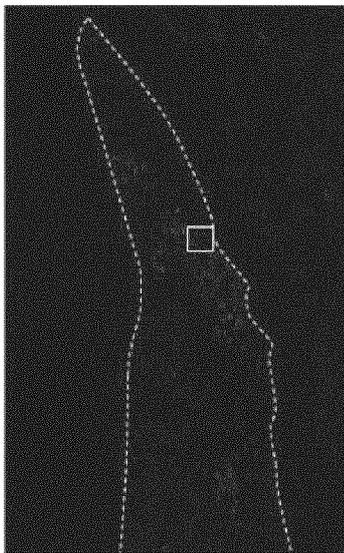
(B)

FACS-сортинг (GFPlow,
булавовидные клетки)

Культура органоидов Сбор

Блеомицин, Трансплантация
3 мг/кг, i.p. 4x10⁵ клеток, i.t. Оценка

(C)

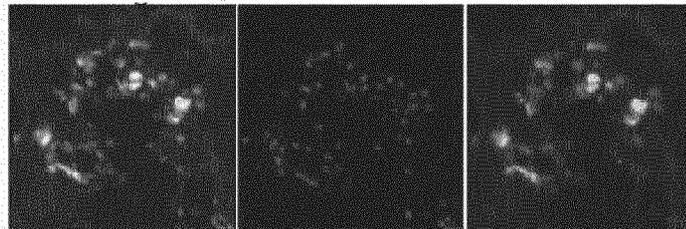


(D)

Слияние

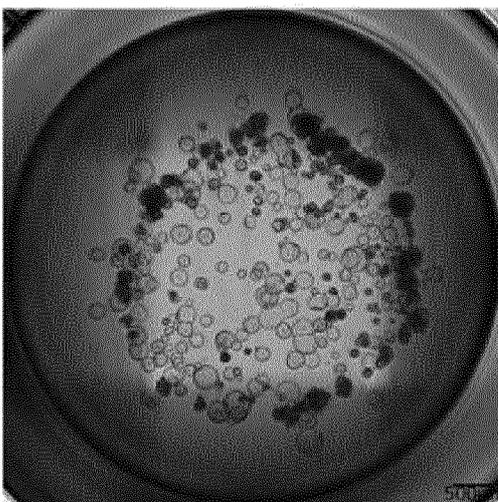
Rosa^{mCherry}

SFTPC-GFP

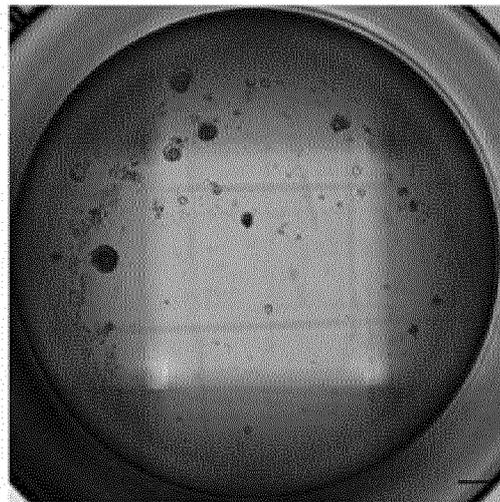


ФИГ.17

(A)

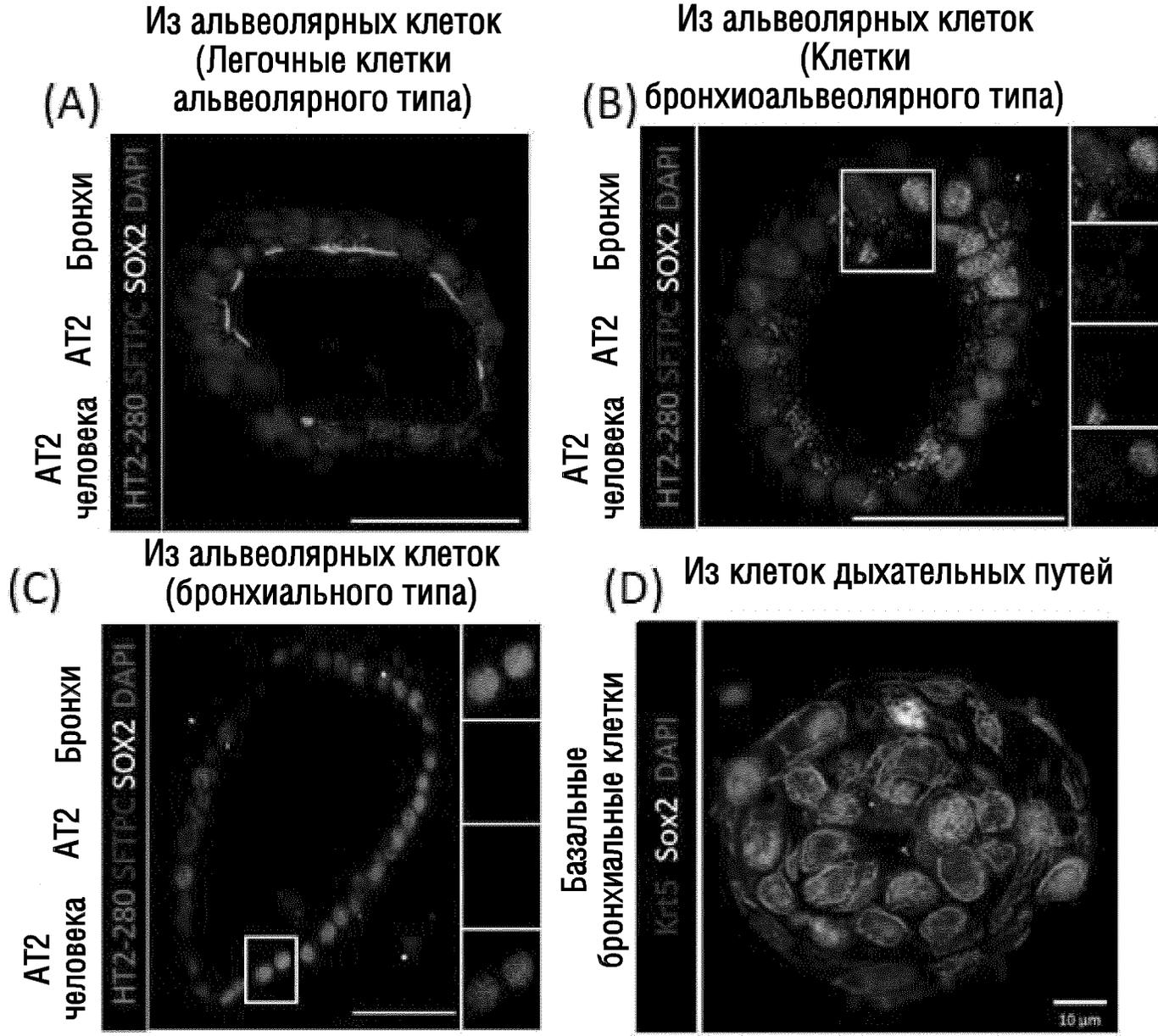
Альвеолярные клеткиАльвеолярные эпителиальные
клетки легких человека
HPAEpiC(ScienCell)

(B)

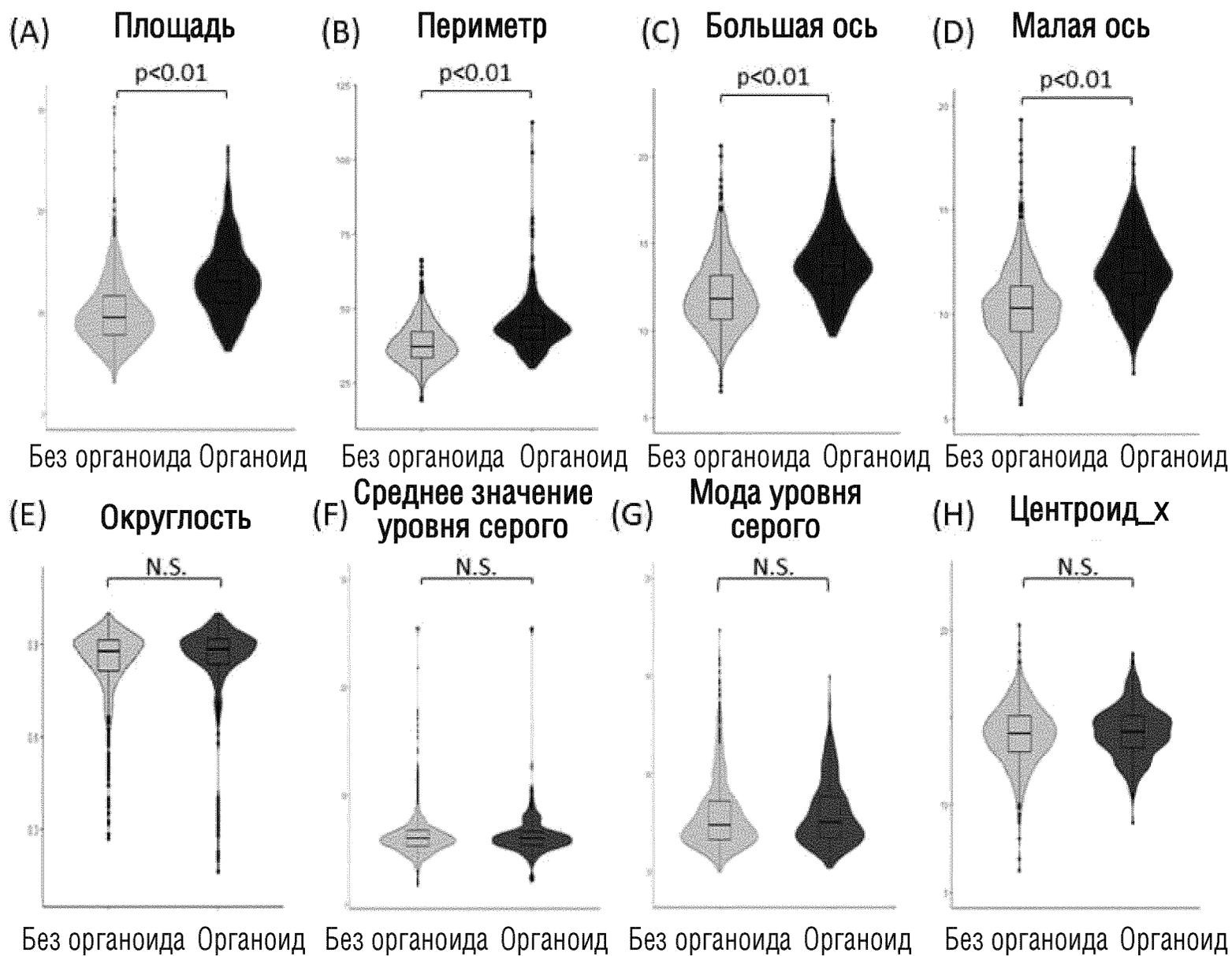
Клетки дыхательных путейЭпителиальные клетки малых
дыхательных путей человека
HPSAEpiC(ScienCell)

на день 12

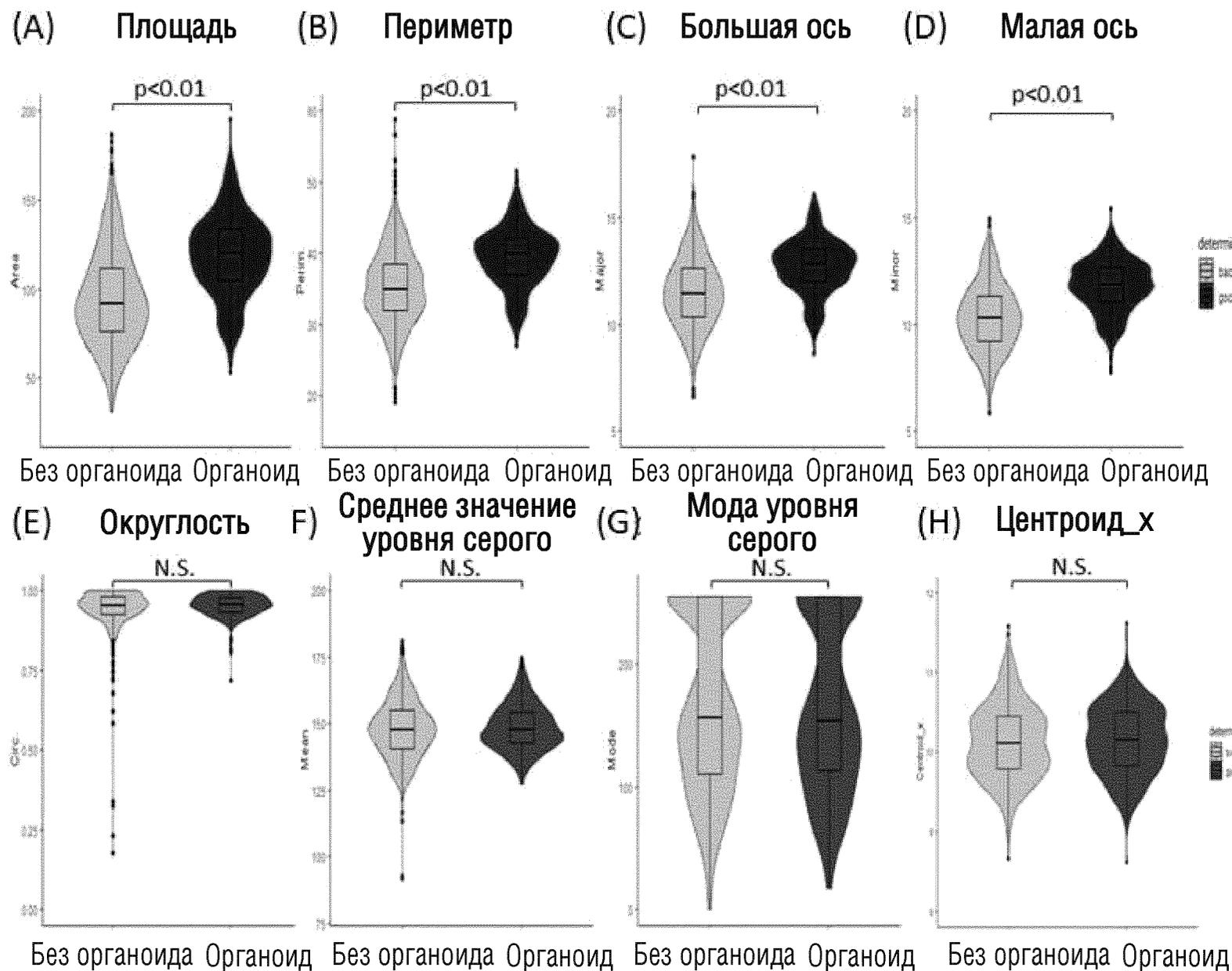
ФИГ.18



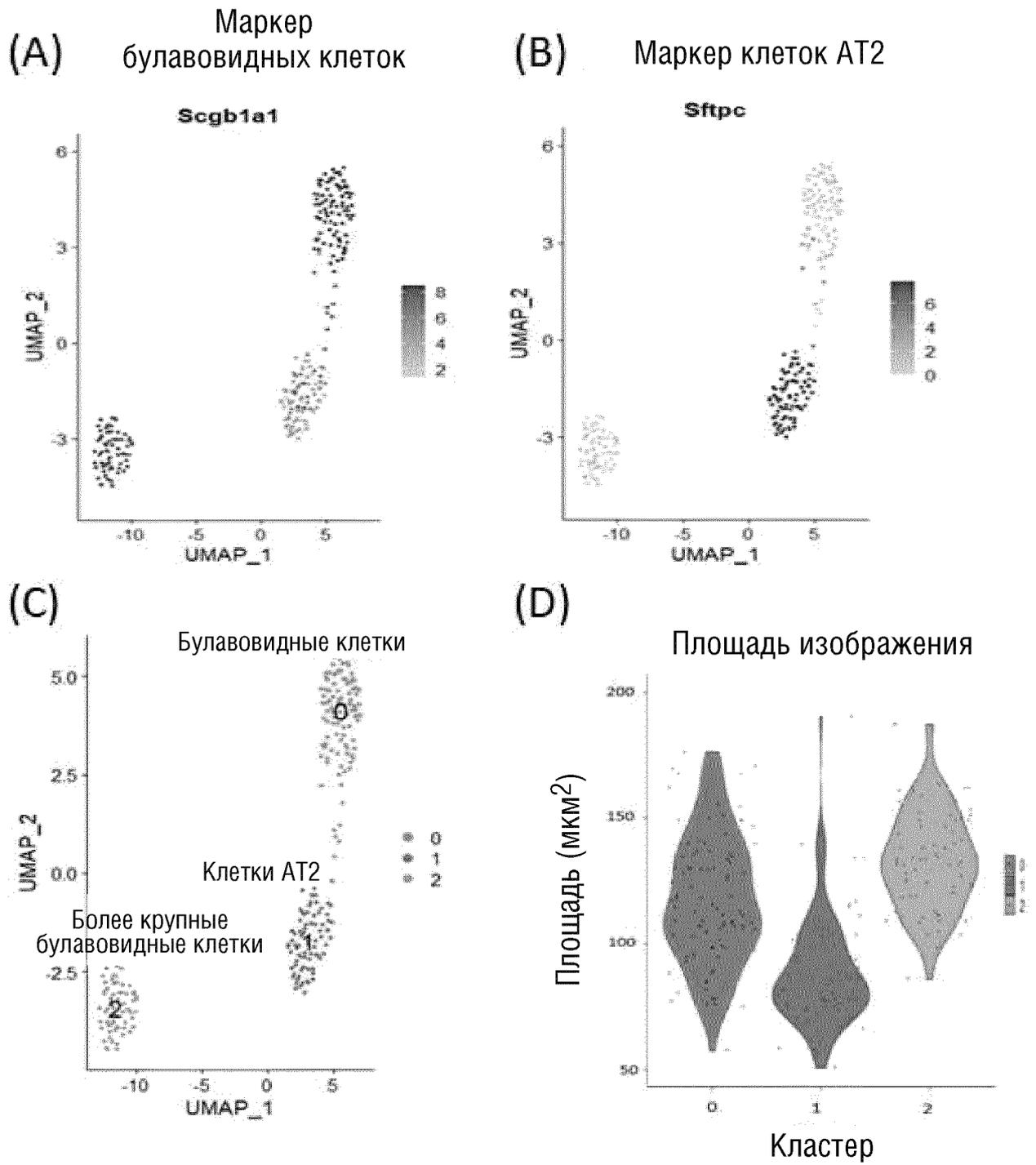
ФИГ.19



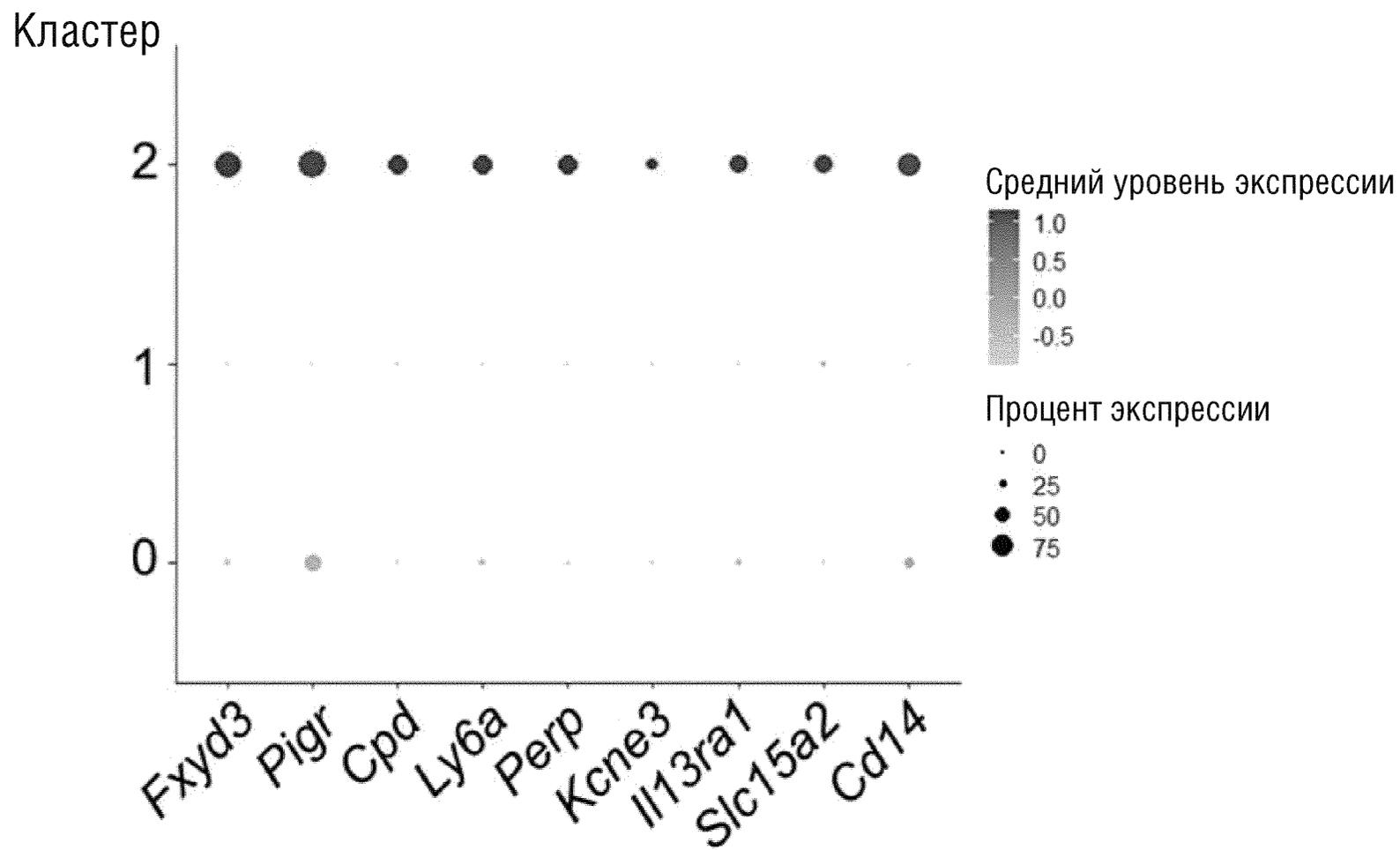
ФИГ.20



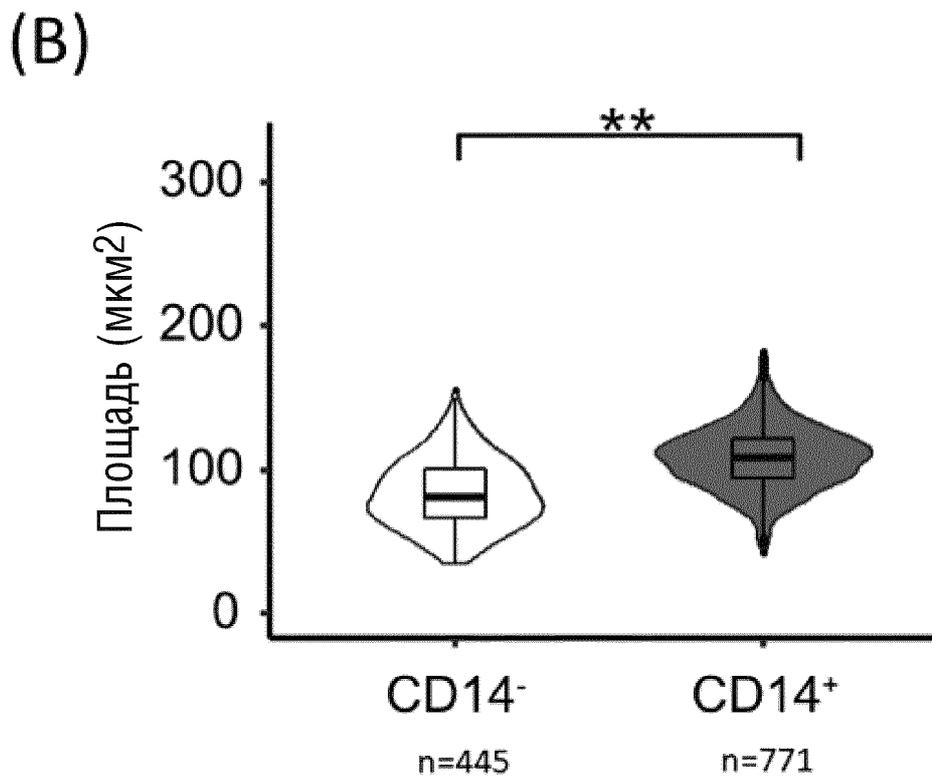
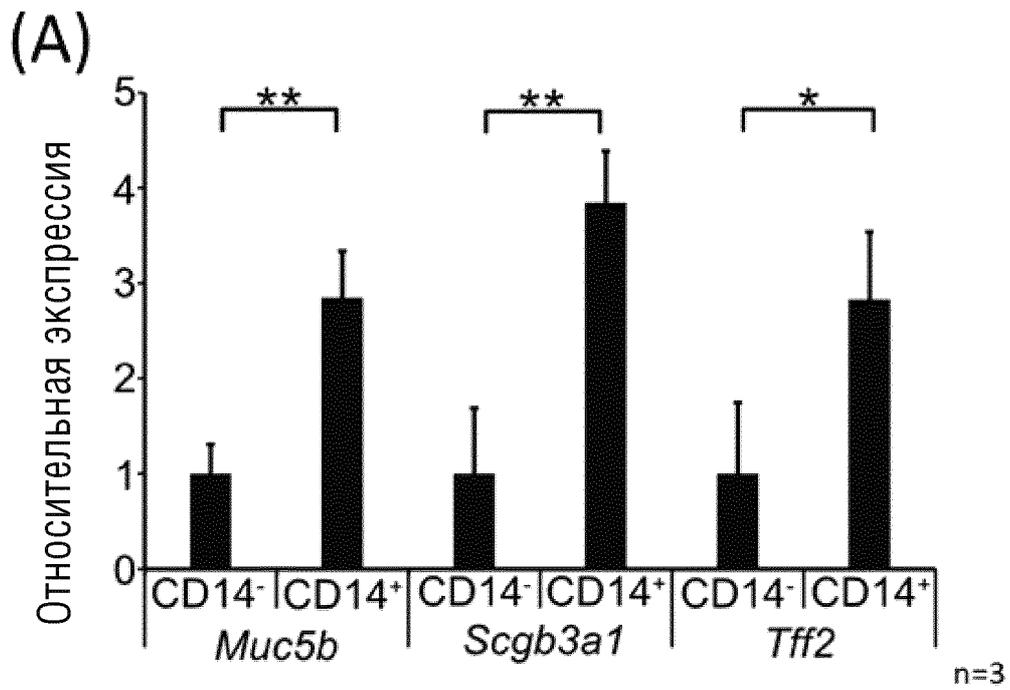
ФИГ.21



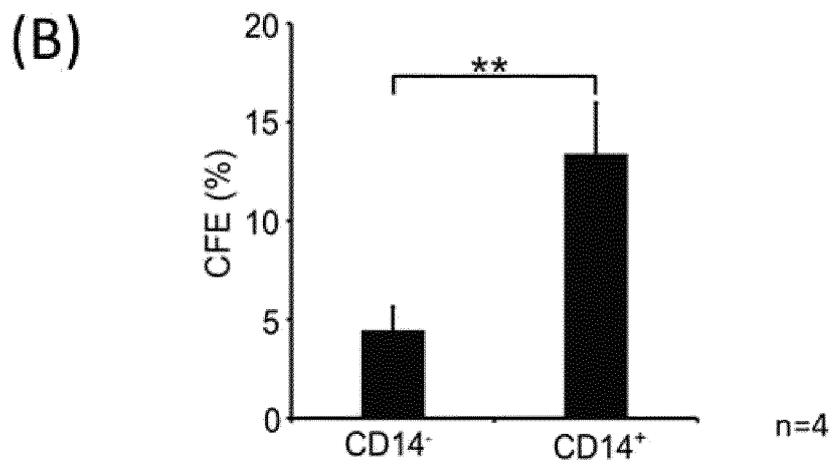
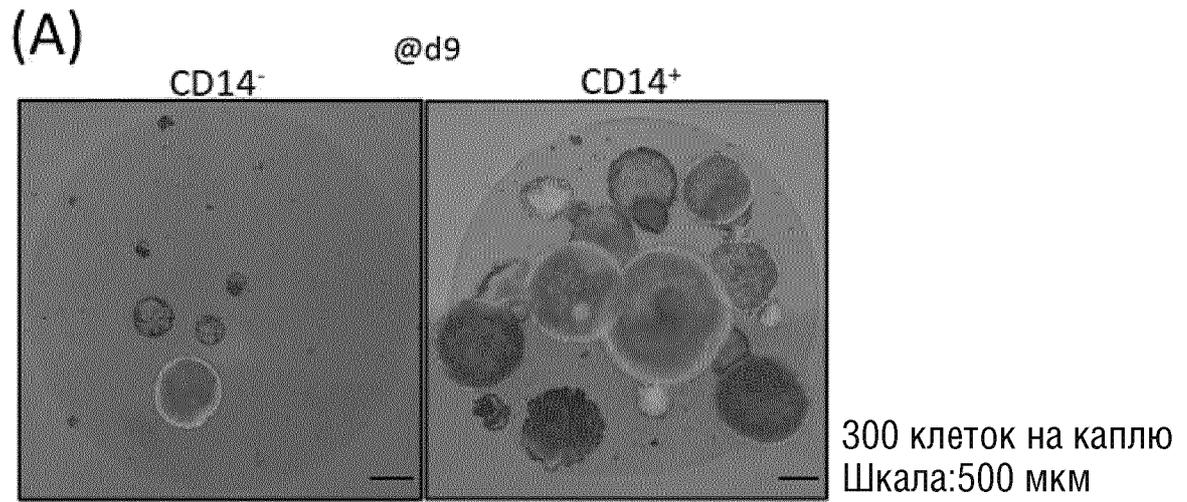
ФИГ.22



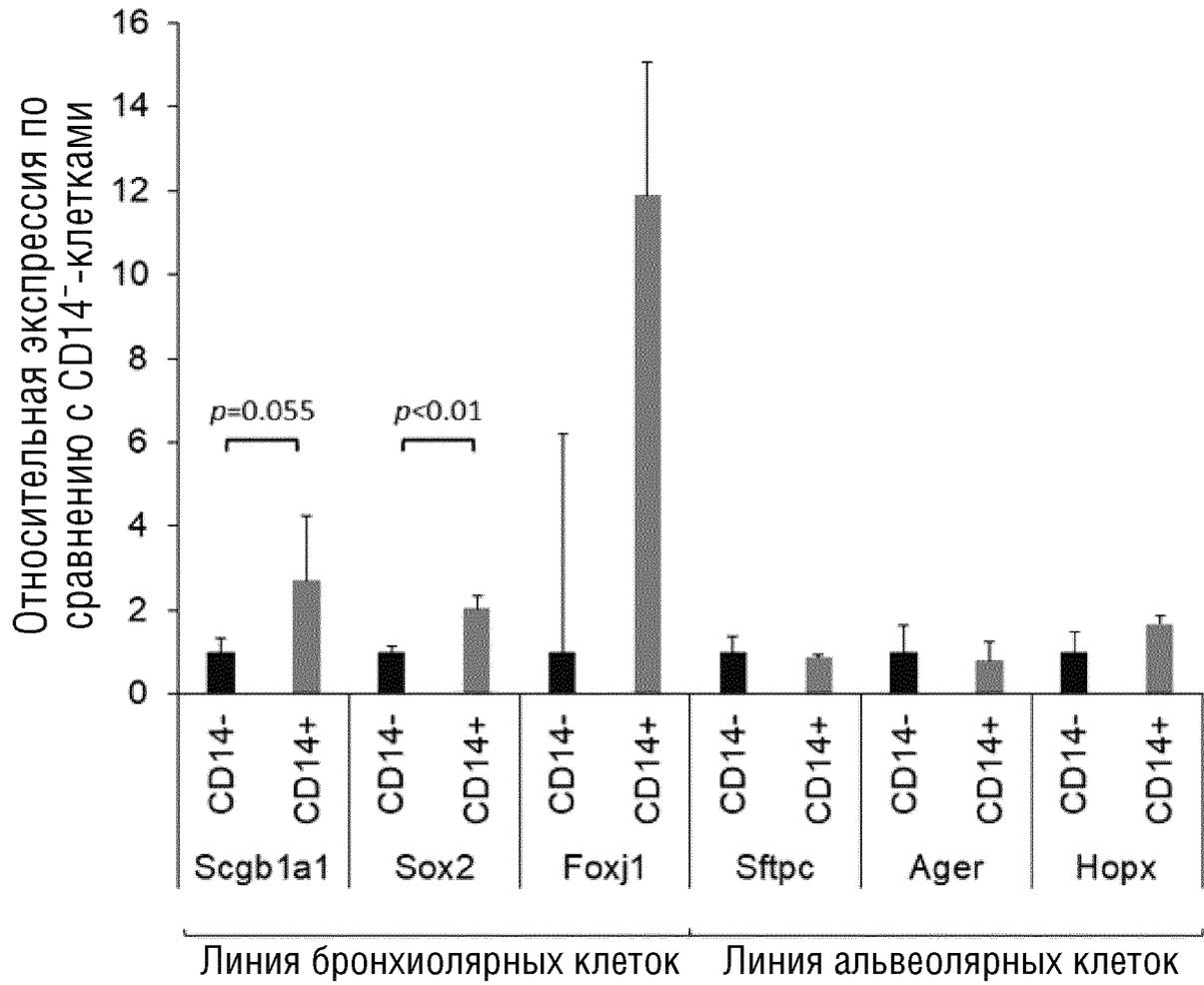
ФИГ.23



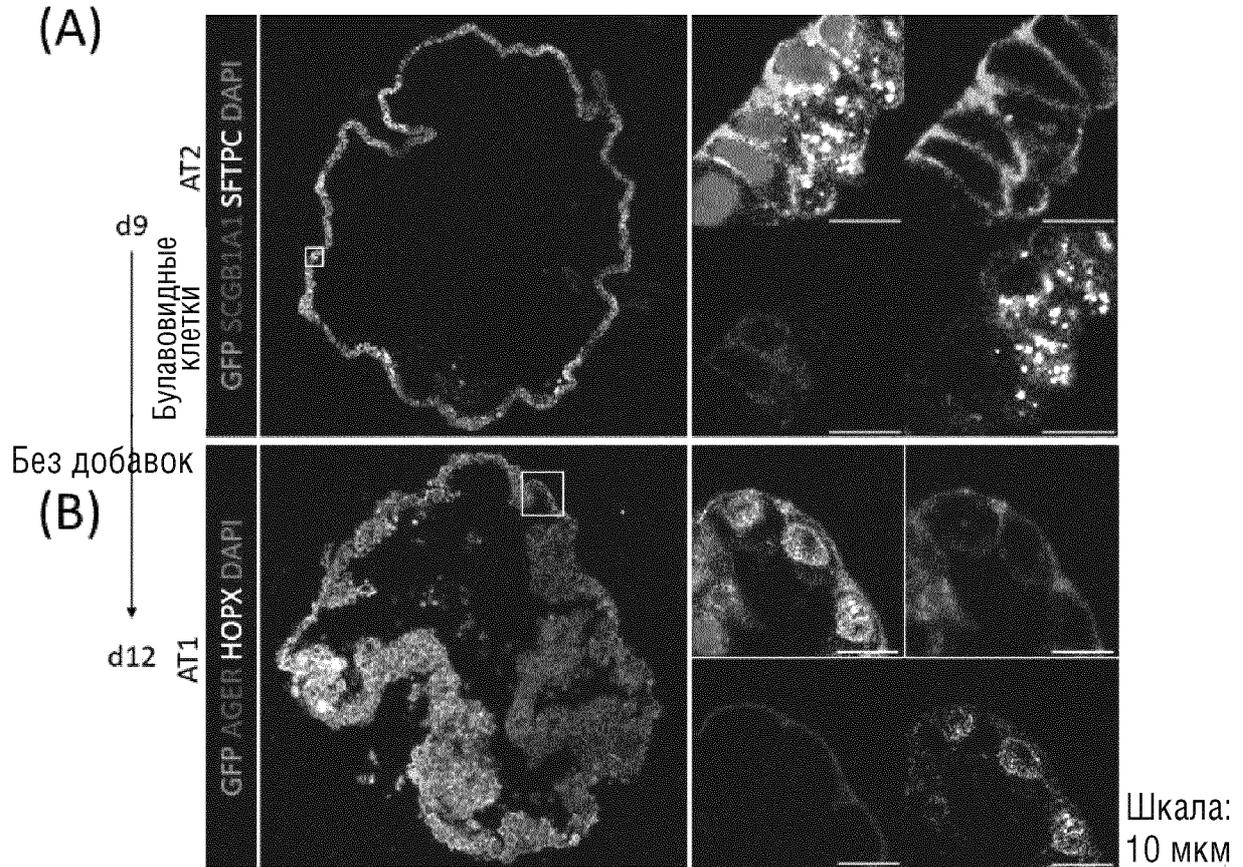
ФИГ.24



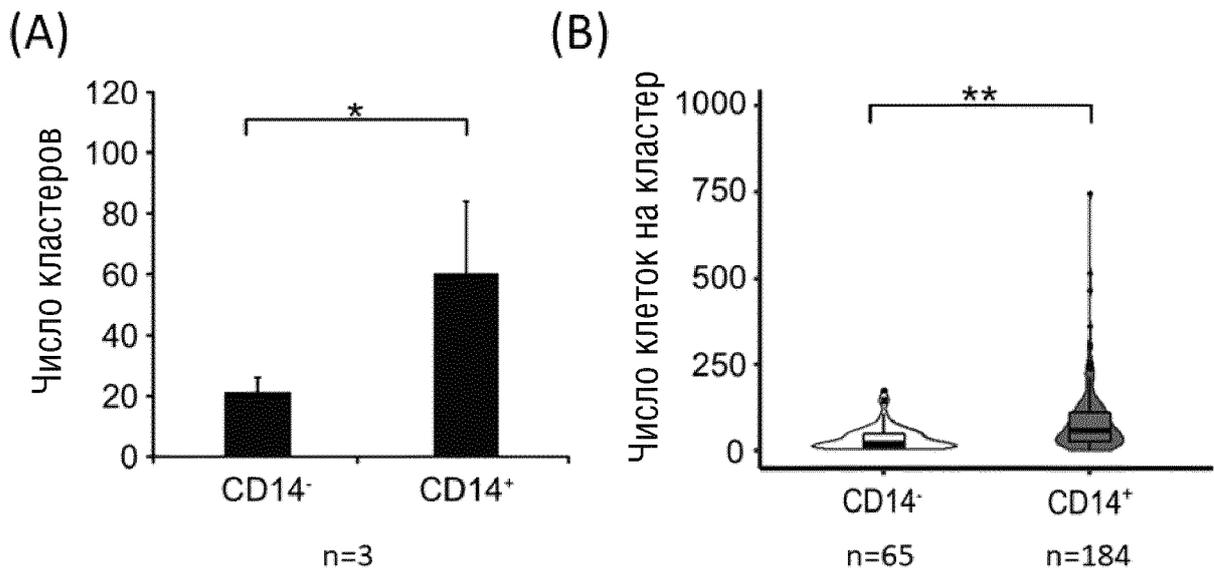
ФИГ.25



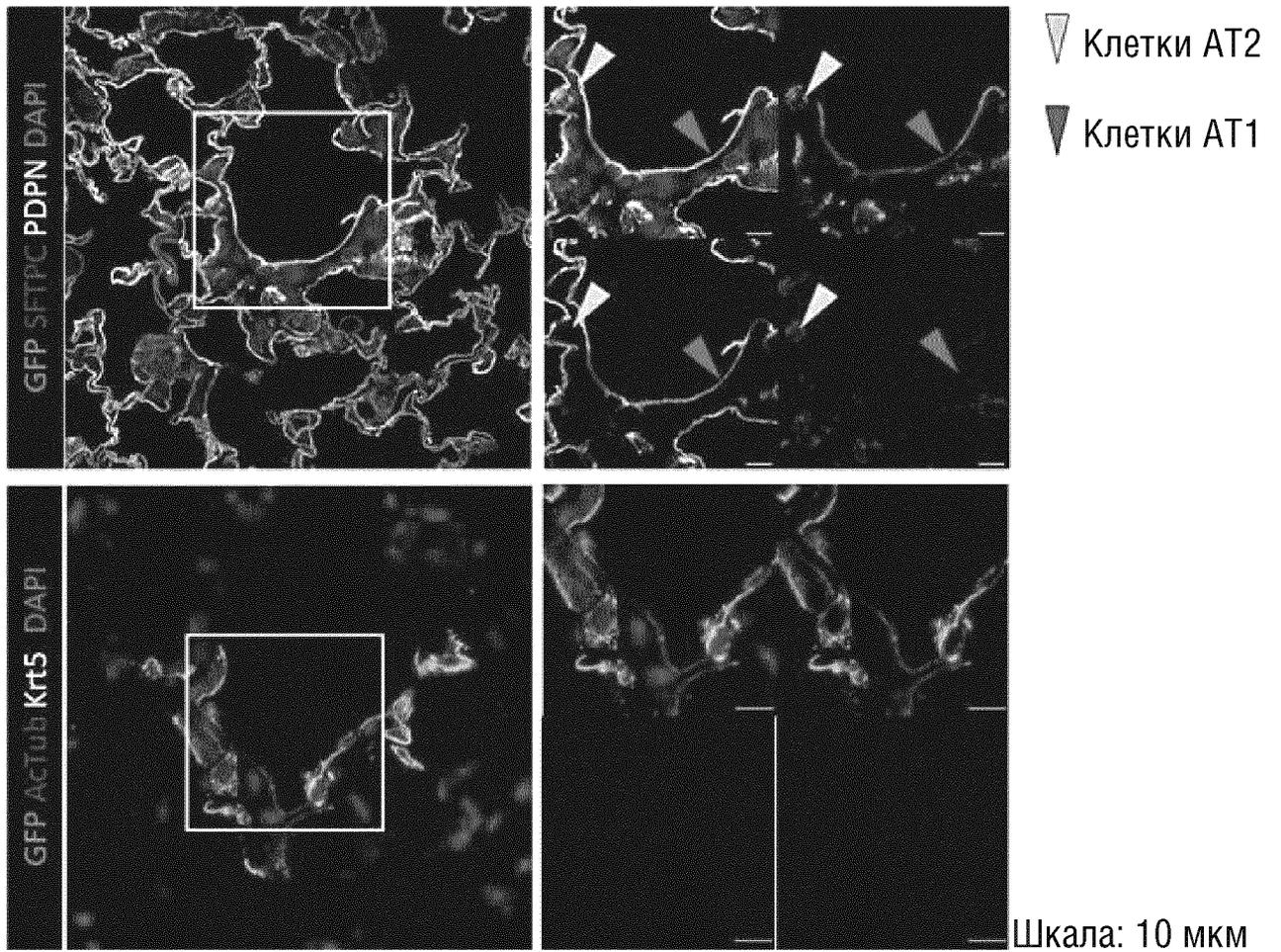
ФИГ.26



ФИГ.27



ФИГ.28



ФИГ.29

