

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU<sup>(11)</sup> 2 599 420<sup>(13)</sup> C2

(51) МПК  
C12N 5/071 (2010.01)  
C12N 5/02 (2006.01)  
C12N 5/0735 (2010.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013114374/10, 17.08.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
17.08.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
31.08.2010 US 61/378,480

(43) Дата публикации заявки: 10.10.2014 Бюл. № 28

(45) Опубликовано: 10.10.2016 Бюл. № 28

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: KROON ET AL., Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo, Nature Biotechnology, vol.26, no.4, pp.443-452, 20.02.2008, the whole document, especially fig.1. Ostrom ET AL., Retinoic acid promotes the generation of pancreatic endocrine progenitor cells and their further (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 01.04.2013

(86) Заявка РСТ:  
US 2011/048131 (17.08.2011)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2012/030540 (08.03.2012)

Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):  
РЕЗАНИА Алиреза (US)

(73) Патентообладатель(и):  
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

2 5 9 9 4 2 0 C 2  
R U

(54) ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

(57) Реферат:

Изобретение относится к области эмбриологии. Способ получения популяции клеток-предшественников эндокринных клеток поджелудочной железы из плюрипотентных стволовых клеток, которые представляют собой человеческие эмбриональные стволовые клетки линии H9, H1, H7 и человеческие эмбриональные стволовые клетки линии SA002, включает стадии: культивирования популяции указанных

плюрипотентных стволовых клеток; дифференцирования популяции указанных плюрипотентных стволовых клеток в популяцию клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы; дифференцирования популяции клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы, в популяцию клеток первичной кишечной трубы;

R U  
2 5 9 9 4 2 0 C 2

R U 2 5 9 9 4 2 0 C 2

R U 2 5 9 9 4 2 0 C 2

дифференцирования популяции клеток первичной кишечной трубы в популяцию клеток заднего сегмента передней кишки и дифференцирования популяции клеток заднего сегмента передней кишки в популяцию предшественников эндокринных клеток поджелудочной железы

(56) (продолжение):

differentiations into beta-cells, PLoS one, vol.3, no.7, e2841, 30.07.2008, the whole document, especially abstract, fig.2-4. GILTAIRE ET AL., The CYP26 inhibitor R115866 potentiates the effects of all trans retinoic acid on cultured human epidermal keratinocytes, British Journal of Dermatology, vol.160, pp. 505-513, 2009, the whole document, especially summary, fig.4.

путем культивирования популяции клеток задней части передней кишки в среде с добавлением ингибитора CYP26A без добавления ретиноевой кислоты. Способ позволяет повысить эффективность дифференцирования. 17 з.п. ф-лы, 3 пр., 5 ил.

RUSSIAN FEDERATION



(19) RU<sup>(11)</sup> 2 599 420<sup>(13)</sup> C2

(51) Int. Cl.  
C12N 5/071 (2010.01)  
C12N 5/02 (2006.01)  
C12N 5/0735 (2010.01)

FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2013114374/10, 17.08.2011

(24) Effective date for property rights:  
17.08.2011

Priority:

(30) Convention priority:  
31.08.2010 US 61/378,480

(43) Application published: 10.10.2014 Bull. № 28

(45) Date of publication: 10.10.2016 Bull. № 28

(85) Commencement of national phase: 01.04.2013

(86) PCT application:  
US 2011/048131 (17.08.2011)

(87) PCT publication:  
WO 2012/030540 (08.03.2012)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,  
OOO "JUridicheskaja firma Gorodisskij Partnery"

(72) Inventor(s):  
REZANIA Alireza (US)

(73) Proprietor(s):  
YANSSEN BAJOTEK, INK. (US)

R U  
2 5 9 9 4 2 0 C 2

(54) DIFFERENTIATION OF PLURIPOTENT STEM CELLS

(57) Abstract:

FIELD: embryology.

SUBSTANCE: present invention relates to embryology. Method for producing a population of pancreatic endocrine precursor cells from of pluripotent stem cells which are human embryonic stem cells of line H9, H1, H7 and human embryonic stem cells of line SA002 consists of the following stages: the culturing of a population of the said pluripotent stem cells; the differentiation of the population of the said pluripotent stem cells into a population of marker-positive cells, specific for a formed endoderm line; the differentiation of the population of marker-positive cells, specific for a formed endoderm line, into a

population of gut cells; the differentiation of the population of gut cells into a population of the cells of the rear segment of the foregut and the differentiation of the population of cells of the rear segment of the foregut into a population of pancreatic endocrine precursor cells by culturing the population of the cells of the rear segment of the foregut in a medium with the addition of CYP26A inhibitor and without adding retinoic acid.

EFFECT: this method increases the efficiency of differentiation.

18 cl, 3 ex, 5 dwg

## ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка притязает на приоритет предварительной патентной заявки серийный номер 61/378480, поданной 31 августа 2010 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

*5*      **Область применения изобретения**

В данном изобретении описываются способы содействия дифференциации плюрипотентных стволовых клеток в клетки, вырабатывающие инсулин. В частности, настоящее изобретение представляет способ использования ингибитора CYP26A, для получения популяции клеток-предшественников эндокринных клеток поджелудочной железы.

*10*     **ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Последние достижения в области заместительной клеточной терапии для лечения сахарного диабета 1 типа и нехватка островков Лангерганса для трансплантации заставили обратить внимание на разработку источников инсулин-продуцирующих *15* клеток, или  $\beta$ -клеток, подходящих для трансплантации. Одним из подходов является формирование функциональных  $\beta$ -клеток из плюрипотентных стволовых клеток, таких как, например, эмбриональные стволовые клетки.

*20*     При эмбриональном развитии позвоночных плюрипотентные клетки дают начало группе клеток, формирующих три зародышевых листка (эктодерму, мезодерму и эндодерму) в ходе процесса, именуемого гаструляцией. Такие ткани, как, например, щитовидная железа, тимус, поджелудочная железа, кишечник и печень, будут развиваться из эндодермы через промежуточную стадию. Промежуточной стадией данного процесса является образование сформированной эндодермы. Клетки сформированной эндодермы экспрессируют ряд маркеров, как например, HNF3 beta, GATA4, MIXL1, CXCR4 и SOX17.

*25*     Формирование поджелудочной железы происходит при дифференцировании сформированной эндодермы в панкреатическую эндодерму. Клетки панкреатической эндодермы экспрессируют ген панкреатическо-дуоденального гомеобокса, Pdx1. При отсутствии Pdx1 развитие поджелудочной железы не идет дальше формирования вентрального и дорзального зачатков. Таким образом, экспрессия PDX1 характеризует *30* критическую стадию органогенеза поджелудочной железы. Зрелая поджелудочная железа содержит, помимо других типов клеток, экзокринную ткань и эндокринную ткань. Экзокринная и эндокринная ткани образуются при дифференцировании панкреатической эндодермы.

*35*     Развитие клеток поджелудочной железы *in vivo* по меньшей мере частично зависит от надлежащей регуляции сигналов, определяющих расположение клеток-предшественников органа. Kinkel et al. (PNAS May 12, 2009 vol. 106 no. 19 7864-7869) утверждают: "Путь развития клеток поджелудочной железы определяется ретиноевой кислотой (РК), а соответствующий размер и локализация ткани поджелудочной железы зависит от строгого контроля сигнальных путей с участием ретиноевой кислоты. Здесь мы показали, что ферменты Cyp26, разрушающие РК, играют решающую роль в *40* развитии поджелудочной железы с нормальной передней границей".

По имеющимся данным, клетки, обладающие свойствами островковых клеток, были получены из эмбриональных клеток мыши. Например, Lumelsky et al. описывает дифференцирование мышиных эмбриональных стволовых клеток в инсулин-секретирующие структуры, аналогичные островкам поджелудочной железы. Soria et al. (Diabetes 49:157, 2000) описывают инсулин-секретирующие клетки, производные мышиных эмбриональных стволовых клеток, которые нормализуют гликемию у мышей с диабетом, индуцированным стрептозотоцином.

В одном примере, Hori et al. (PNAS 99: 16105, 2002) описывают, что обработка мышиных эмбриональных стволовых клеток ингибиторами фосфоинозитид-3-киназы (LY294002) приводила к получению клеток, подобных  $\beta$ -клеткам.

в другом примере, Blyszczuk et al. (PNAS 100:998, 2003) сообщают о получении

5 инсулин-продуцирующих клеток из мышиных эмбриональных стволовых клеток с конститутивной экспрессией Pax4.

В публикации Micallef et al. сообщается, что ретиноевая кислота может регулировать способность эмбриональных стволовых клеток формировать Pdx1-положительную панкреатическую эндодерму. Ретиноевая кислота с наибольшей эффективностью 10 индуцирует экспрессию Pdx1 при добавлении в культуру на 4 день дифференцирования эмбриональных стволовых клеток в течение периода, соответствующего концу гаструляции эмбриона (Diabetes 54:301, 2005).

В публикации Miyazaki et al. сообщается о линии мышиных эмбриональных стволовых клеток со сверхэкспрессией Pdx1. Результаты показывают, что экспрессия экзогенного 15 Pdx1 очевидно повышает экспрессию генов инсулина, соматостатина, глюкокиназы, нейрогенина 3, p48, Pax6 и HNF6 в образующихся дифференцированных клетках (Diabetes 53: 1030, 2004).

В публикации Skoudy et al. сообщается, что активин A ( входящий в суперсемейство TGF- $\beta$ ) повышает экспрессию экзокринных панкреатических генов (p48 и амилаза) и 20 эндокринных генов (Pdx1, инсулин и глюкагон) в эмбриональных стволовых клетках мыши. Максимальный эффект наблюдался при использовании 1 нмоль/л активина A. Кроме того, авторы отметили, что экспрессия инсулина и Pdx1 мРНК не изменялась под действием ретиноевой кислоты; однако лечение с использованием 3нМ FGF7 привело к повышению уровня транскрипта для Pdx1 (Biochem. J. 379: 749, 2004).

25 В работе Shiraki et al. изучались эффекты факторов роста, специфически ускоряющих дифференцирование эмбриональных стволовых клеток в Pdx1-положительные клетки. Эти авторы наблюдали, что TGF- $\beta$ 2 приводил к воспроизводимому увеличению доли Pdx1-положительных клеток (Genes Cells. 2005 Jun; 10(6): 503-16.).

В работе Gordon et al. показана индукция образования брахиурических

30 [положительных]/HNF3 бета [положительных] эндодермальных клеток из эмбриональных стволовых клеток мыши в отсутствие сыворотки и в присутствии активина в сочетании с ингибитором сигнального каскада Wnt (патент США № 2006/0003446A1).

Gordon et al. (PNAS, т. 103, с. 16806, 2006) утверждают: «Для образования передней

35 первичной полоски одновременно требовались сигнальные пути Wnt и TGF-бета/nodal/активин».

Однако модель развития эмбриональных стволовых клеток на мышах может не имитировать в точности программу развития у высших млекопитающих, например, у человека.

40 В работе Thomson et al. эмбриональные стволовые клетки выделяли из человеческих бластоцитов (Science 282:114, 1998). Параллельно, Gearhart и соавторы получили клеточные линии эмбриональных зародышевых клеток человека (hEG) из ткани половых желез эмбриона (Shambrott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998). В отличие от эмбриональных стволовых клеток мыши, воспрепятствовать дифференцированию 45 которых можно путем простого культивирования с фактором, ингибирующим лейкемию (LIF), эмбриональные стволовые клетки человека необходимо культивировать в крайне специфических условиях (патент США № 6200806; WO 99/20741, WO 01/51616).

D'Amour et al. описывают производство обогащенных культур сформированной

эндодермы, производной от человеческих эмбриональных стволовых клеток, в присутствии высокой концентрации активина и низкой концентрации сыворотки (Nature Biotechnology 2005). Трансплантация этих клеток под почечную капсулу мышьей привела к их дифференцированию в более зрелые клетки, обладающие характерными

- 5 особенностями некоторых эндодермальных органов. Клетки сформированной эндодермы, производные от эмбриональных стволовых клеток человека, могут подвергаться дальнейшему дифференцированию в Pdx1-положительные клетки после добавления FGF-10 (US 2005/0266554A1).

D'Amour et al. (Nature Biotechnology-24, 1392-1401 (2006)) утверждают: “Мы разработали

- 10 процесс дифференцировки, преобразующий эмбриональные клетки человека (hES) в эндокринные клетки, способные синтезировать гормоны поджелудочной железы: инсулин, глюкагон, соматостатин, панкреатический полипептид и грелин. Данный процесс имитирует органогенез поджелудочной железы *in vivo*, проводя клетки через фазы, напоминающие образование сформированной эндодермы, эндодермы кишечной
- 15 трубки, панкреатической эндодермы и превращение предшественников эндокринных клеток в клетки, экспрессирующие эндокринные гормоны”.

В другом примере, в публикации Fisk et al., сообщается о системе для производства островковых клеток поджелудочной железы из эмбриональных стволовых клеток человека (US2006/0040387A1). В данном случае процесс дифференцирования был

- 20 разделен на три стадии. Человеческие эмбриональные стволовые клетки были впервые дифференцированы до эндодермы с помощью сочетания бутират ацетата и активина A. Затем клетки культивировали с антагонистами ФНО- $\beta$ , например, Noggin, в сочетании с EGF или бетацеллютином для получения PDX1-положительных клеток. Окончательное дифференцирование запускалось никотинамидом.

- 25 Таким образом, сохраняется значительная потребность в разработке лабораторных способов создания *in vitro* функциональной экспрессирующей инсулин клетки, которая была бы более близка к  $\beta$ -клетке. Настоящее изобретение представляет собой альтернативный подход к повышению эффективности дифференцирования плюрипотентных стволовых клеток в клетки, экспрессирующие инсулин, основанный 30 на получении клеток-предшественников поджелудочной железы с помощью агента, разрушающего ретиноевую кислоту.

#### Краткое описание

- В одном варианте осуществления настоящего изобретение представляет способ использования ингибитора CYP26A, для получения популяции клеток-предшественников 35 эндокринных клеток поджелудочной железы.

- В одном варианте осуществления формирование популяции клеток-предшественников эндокринных клеток поджелудочной железы достигается путем использования пошагового протокола дифференцирования, при этом популяция плюрипотентных стволовых клеток сначала дифференцируется в популяцию клеток, экспрессирующих 40 маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы. Далее, популяция клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии дефинитивной эндодермы, дифференцируется в популяцию клеток первичной кишечной трубки. Далее, популяция клеток первичной кишечной трубки дифференцируется в популяцию клеток заднего 45 сегмента передней кишки. Затем популяция клеток заднего сегмента передней кишки дифференцируется в популяцию предшественников эндокринных клеток путем культивирования в среде с добавлением ингибитора CYP26A.

В одном варианте осуществления изобретения популяция предшественников эндокринных клеток далее дифференцируется в популяцию клеток, экспрессирующих

маркеры, характерные для линии эндокринных клеток поджелудочной железы.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1 показаны результаты анализа методом ПЦР в реальном времени образцов клеток на стадиях III-IV протокола, описанного в Примере 1, на а) PAX4, б) NGN3, с)

5 д) PDX1, е) NEUROD, е) NKX6.1, ф) CDX2 и г) альбумин. Ось у - кратность повышения по сравнению с недифференцированными Н1-клетками. На панели показан результат иммунологического окрашивания NGN3 контроля и культур с добавлением CYP26A на стадии IV.

На фиг. 2 показаны результаты анализа методом ПЦР в реальном времени образцов

10 клеток на стадиях III-IV протокола, описанного в Примере 2, на а) NGN3, б) NEUROD, с) CDX2, д) NKX6.1 и е) PDX1. Ось у - кратность повышения по сравнению с недифференцированными Н1-клетками.

На фиг. 3 показаны фазово-контрастные изображения клеток на стадиях I-VI протокола, описанного в Примере 3.

15 На фиг. 4 показаны графики экспрессии NKX6.1 в клетках на стадиях IV-VII протокола, описанного в Примере 3, по результатам флуоресцентной проточной цитометрии.

На фиг. 5 показаны результаты иммунохимического окрашивания на PDX1, NKX6.1 и CDX2 в клетках на стадиях V и VII протокола, описанного в Примере 3.

#### 20 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для ясности описания, а не для ограничения изобретения, подробное описание изобретения разделено на следующие подразделы, описывающие или иллюстрирующие определенные особенности, варианты осуществления или области применения настоящего изобретения.

#### 25 Определения

Стволовые клетки представляют собой недифференцированные клетки, определяемые по их способности на уровне единичной клетки как самообновляясь, так и дифференцироваться с образованием клеток-потомков, таких как самообновляющиеся клетки-предшественники, необновляющиеся клетки-предшественники и окончательно 30 дифференцированные клетки. Стволовые клетки также характеризуются способностью дифференцироваться *in vitro* в функциональные клетки различных клеточных линий дифференцирования из нескольких зародышевых листков (эндодермы, мезодермы и эктодермы), а также после трансплантации давать начало тканям, происходящим от нескольких зародышевых листков, и вносить существенный вклад в формирование 35 большинства, если не всех, тканей после инъекции в бластоциты.

Стволовые клетки классифицируют по потенциальному развитию: (1)totипотентные, то есть способные преобразоваться в любой из эмбриональных и внеэмбриональных типов клеток; (2) плюрипотентные, то есть способные преобразоваться во все типы эмбриональных клеток; (3) мультипотентные, то есть способные преобразоваться во 40 множество клеточных линий, но в рамках одной ткани, органа или физиологической системы (например, гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) могут порождать ГСК (самообновление), олигопотентные ограниченные клетки-предшественники крови и все типы клеток и элементов (например, тромбоциты), являющиеся стандартными составляющими крови); (4) олигопотентные, то есть способные преобразоваться в 45 более ограниченное подмножество клеточных линий, чем мультипотентные стволовые клетки; и (5) унипотентные, то есть способные преобразоваться в единственную клеточную линию (например, сперматогенные стволовые клетки).

Дифференцирование представляет собой процесс, при помощи которого

неспециализированная («некоммитированная») или менее специализированная клетка приобретает свойства специализированной клетки, например, нервной или мышечной клетки. Дифференцированная клетка или клетка с индуцированным дифференцированием представляет собой клетку, занявшую более специализированное («коммитированное»)

- 5 положение в линии дифференцирования клетки. Термин «коммитированная» применительно к процессу дифференцирования обозначает клетку, дошедшую в ходе процесса дифференцирования до стадии, от которой в нормальных условиях она продолжит дифференцироваться до определенного типа клеток или набора типов клеток и не сможет в нормальных условиях дифференцироваться в иной тип клеток
- 10 или вернуться обратно к менее дифференциированному типу. Дедифференцированием называется процесс, в ходе которого клетка возвращается к менее специализированному (или коммитированному) положению в линии дифференцирования. Используемый в настоящей заявке термин «линия дифференцирования клетки» определяет наследственность клетки, то есть определяет, из какой клетки произошла данная клетка
- 15 и каким клеткам она может дать начало. В линии дифференцирования клетка помещается в наследственную схему развития и дифференцирования. Маркером, специфичным для линии дифференцирования, называется характерная особенность, специфически ассоциированная с фенотипом клеток конкретной линии дифференцирования, которая может использоваться для оценки дифференцирования некоммитированных клеток в
- 20 клетки данной линии дифференцирования.

Используемые в настоящей заявке термины «клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы», «клетки стадии 1» или «стадия 1», относятся к клеткам, экспрессирующим по меньшей мере один из следующих маркеров: SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, Mix-подобный 25 гомеобоксовый белок, FGF4 CD48, эомезодермин (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 или OTX2. К клеткам, экспрессирующим маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы, относятся клетки-предшественники первичной полоски, клетки первичной полоски, клетки мезэндодермы и клетки сформированной эндодермы.

- 30 Используемый в настоящей заявке термин «клетки с экспрессией маркеров, характерных для линии панкреатической эндодермы» относится к клеткам с экспрессией по меньшей мере одного из следующих маркеров: PDX1, NKX6.1, HNF1-бета, PTF1-альфа, HNF6, HNF4-альфа, SOX9, HB9 или PROX1. К клеткам, экспрессирующим маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы, относятся клетки 35 панкреатической эндодермы, клетки первичной кишечной трубки и клетки поздней передней кишки.

Используемый в настоящей заявке термин «сформированная эндодерма» относится к клеткам, обладающим характерными особенностями клеток, происходящих в ходе гаструляции от эпивората, и формирующими желудочно-кишечный тракт и его производные. Клетки сформированной эндодермы экспрессируют следующие маркеры: 40 HNF3-бета, GATA4, SOX17, Cerberus, OTX2, goosecoid, C-Kit, CD99 и MIXL1.

- Используемый в настоящей заявке термин «маркеры» означает молекулы 45 нуклеиновых кислот или полипептидов с дифференциальной экспрессией в интересующих клетках. В данном контексте под дифференциальной экспрессией подразумевается повышение уровня экспрессии для положительного маркера и понижение уровня экспрессии для отрицательного маркера. Поддающийся обнаружению уровень маркерной нуклеиновой кислоты или полипептида в интересующих клетках оказывается значительно выше или ниже по сравнению с другими клетками, что позволяет

идентифицировать интересующую клетку и отличить ее от других клеток с помощью любого из множества известных в данной области способов.

Используемый в настоящей заявке термин “клетка-предшественник эндокринной клетки поджелудочной железы” относится к клеткам, экспрессирующим по меньшей мере один из следующих маркеров: NGN3, NEUROD или NKX2.2.

Используемый в настоящей заявке термин “клетка заднего сегмента передней кишки” относится к клеткам, экспрессирующим по меньшей мере один из следующих маркеров: PDX1 или HNF6.

Термин “Незрелые клетки поджелудочной железы, экспрессирующие гормоны” в

настоящей заявке относится к клеткам, экспрессирующим по меньшей мере один из следующих маркеров: инсулин, глюкагон, соматостатин, MAFB, PDX1, ARX, NKX6.1, NKX2.2 или NEUROD.

Используемый в настоящей заявке термин "клетка первичной кишечной трубы" относится к клеткам, экспрессирующим по меньшей мере один из следующих маркеров: HNF1-бета или HNF4-альфа.

«Панкреатической эндокринной клеткой», «клеткой, экспрессирующей гормон поджелудочной железы» или «клеткой, экспрессирующей характеристики эндокринной линии поджелудочной железы» в настоящем документе называется клетка, способная экспрессировать по меньшей мере один из следующих гормонов: инсулин, глюкагон, соматостатин и панкреатический полипептид.

**Выделение, размножение и культивирование полипотентных стволовых клеток**

**Характеристика плюрипотентных стволовых клеток**

Плюрипотентные стволовые клетки могут экспрессировать один или более стадийно-специфичных эмбриональных антигенов (SSEA) 3 и 4, а также маркеры, определяемые антителами, обозначенными как Tra-1-60 и Tra-1-81 (Thomson et al., Science 282:1145, 1998). Дифференцирование плюрипотентных стволовых клеток *in vitro* приводит к потере экспрессии SSEA-4, Tra 1-60 и Tra 1-81 (при наличии) и к повышению экспрессии SSEA-1. В недифференцированных полипотентных стволовых клетках, как правило, активна щелочная фосфатаза, которая может быть обнаружена путем фиксации клеток с помощью 4% параформальдегида, с последующим обнаружением с помощью Vector Red, применяемого в качестве субстрата, в соответствии с инструкциями производителя (Vector Laboratories, Burlingame Calif.). Недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки также, как правило, экспрессируют OCT4 и TERT, определяемые с помощью ПЦР в реальном времени.

Другим желательным фенотипическим свойством выращенных плюрипотентных стволовых клеток является потенциал дифференцирования в клетки всех трех зародышевых листков: в эндодермальные, мезодермальные и эктодермальные ткани. Полипотентность полипотентных стволовых клеток может быть подтверждена, например, путем инъекции клеток мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID), фиксирования образующихся тератом с помощью 4% параформальдегида, и их гистологического исследования для получения доказательств наличия клеточных типов, происходящих от трех зародышевых листков. В качестве альтернативы плюрипотентность можно определить по созданию эмбриоидных телец и анализа их на предмет присутствия маркеров, ассоциирующихся с тремя зародышевыми листками.

Выращенные линии плюрипотентных стволовых клеток могут быть кариотипированы с применением стандартного способа окрашивания с использованием красителя Гимза (G-banding) и сравнения с опубликованными кариотипами соответствующих видов

приматов. Желательно получить клетки, имеющие «нормальный кариотип», т.е. эуплоидные клетки, в которых все человеческие хромосомы присутствуют и не имеют видимых изменений.

#### Источники плюрипотентных стволовых клеток

К типам плюрипотентных стволовых клеток, которые можно использовать, относятся устойчивые линии плюрипотентных клеток, получаемые из формируемой после вынашивания плода ткани, в том числе из преэмбриональной ткани (такой как бластоциста), эмбриональной ткани или ткани плода, взятой в любой момент в ходе вынашивания, как правило, но не обязательно, до срока приблизительно 10-12 недель беременности. Примерами, не ограничивающими настоящее изобретение, являются стабильные линии человеческих эмбриональных стволовых клеток или человеческих эмбриональных зародышевых клеток, например, клеточные линии человеческих эмбриональных стволовых клеток H1, H7 и H9 (WiCell). Также возможно использование описываемых в настоящей заявке составов в ходе первоначального установления или 15 стабилизации таких клеток, в этом случае исходными клетками являются первичные плюрипотентные клетки, взятые напрямую из тканей-источников. Также соответствуют целям настоящего изобретения клетки, взятые из популяции плюрипотентных стволовых клеток, уже культивированных в отсутствие питающих клеток. Также соответствуют 20 целям настоящего изобретения клетки мутантных линий эмбриональных стволовых клеток человека, таких как, например, BG01v (BresaGen, Атенс, Джордания, США).

В одном варианте осуществления получения человеческих эмбриональных стволовых клеток было описано Thomson et al. в патенте США № 5843780; Science 282:1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:7844, 1995.

#### Культивирование плюрипотентных стволовых клеток

В одном варианте осуществления плюрипотентные стволовые клетки культивируют на питающем слое клеток, которые поддерживают плюрипотентные стволовые клетки в различных отношениях. Как вариант, полипотентные стволовые клетки культивируются в культуральной системе, по существу не содержащей питающих клеток, но, тем не менее, поддерживающей пролиферацию полипотентных стволовых 25 клеток и не допускающей существенной дифференцировки. Рост плюрипотентных стволовых клеток в свободной от питающих клеток культуральной системе без дифференцирования поддерживается путем использования среды, кондиционированной посредством предварительного культивирования клеток иного типа. В качестве альтернативы рост плюрипотентных стволовых клеток в свободной от питающих 30 клеток культуральной системе без дифференцирования поддерживается путем использования среды с химически определенным составом.

В одном варианте осуществления плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать на питающем слое эмбриональных фибробластов мыши в соответствии со способами, изложенными в работе Reubinoff et al. (Nature Biotechnology 18: 399-404 40 (2000)). В альтернативном варианте осуществления плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать на питающем слое эмбриональных фибробластов мыши в соответствии со способами, изложенными в работе Thompson et al. (Science 6, ноябрь 1998 г., Vol. 282. no. 5391, pp. 1145-1147). В альтернативном варианте осуществления изобретения плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать на любом из 45 питающих слоев клеток, описанных в работе Richards et al. (Stem Cells 21: 546-556, 2003).

В одном варианте осуществления изобретения плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать на питающем слое клеток человека в соответствии со способами, изложенными в работе Wang et al. (Stem Cells 23: 1221-1227, 2005). В альтернативном

варианте осуществления изобретения плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать на питающем слое клеток человека, описанных в работе Stojkovic et al. (Stem Cells 2005 23: 306-314, 2005). В альтернативном варианте осуществления изобретения плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать на питающем слое клеток человека, описанных в работе Miyamoto et al. (Stem Cells 22: 433-440, 2004). В альтернативном варианте осуществления изобретения плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать на питающем слое клеток человека, описанных в работе Amit et al. (Biol. Reprod 68: 2150-2156, 2003). В альтернативном варианте осуществления изобретения плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать на питающем слое клеток человека, описанных в работе Inzunza et al. (Stem Cells 23: 544-549, 2005).

В одном варианте осуществления плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать в культуральной среде, полученной в соответствии со способами, представленными в патенте США № 20020072117. В альтернативном варианте осуществления плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать в культуральной среде, полученной в соответствии со способами, представленными в патенте США № 6642048. В альтернативном варианте осуществления изобретения плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать в культуральной среде, полученной в соответствии со способами, представленными в международной заявке WO 2005014799. В альтернативном варианте осуществления изобретения плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать в культуральной среде, полученной в соответствии со способами, представленными в работе Xu et al. (Stem Cells 22: 972-980, 2004). В альтернативном варианте осуществления плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать в культуральной среде, полученной в соответствии со способами, представленными в патенте США № 20070010011. В альтернативном варианте осуществления плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать в культуральной среде, полученной в соответствии со способами, представленными в патенте США № 20050233446. В альтернативном варианте осуществления плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать в культуральной среде, полученной в соответствии со способами, представленными в патенте США № 6800480. В альтернативном варианте осуществления изобретения плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать в культуральной среде, полученной в соответствии со способами, описанными в международной заявке WO 2005065354.

В одном варианте осуществления изобретения плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать по методам, описанным Cheon et al. (BioReprod DOI:10.1095/biolreprod.105.046870, October 19, 2005). В альтернативном варианте осуществления изобретения плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать в соответствии со способами, представленными в работе Levenstein et al. (Stem Cells 24: 568-574, 2006). В альтернативном варианте осуществления плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать в соответствии со способами, представленными в патенте США № 20050148070. В альтернативном варианте осуществления плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать в соответствии со способами, представленными в патенте США № 20050244962. В альтернативном варианте осуществления изобретения плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать в соответствии со способами, описанными в международной заявке WO 2005086845.

Плюрипотентные стволовые клетки могут быть высажены на соответствующий культуральный субстрат. В одном из вариантов осуществления соответствующим культуральным субстратом является компонент внеклеточного матрикса, такой как,

например, компонент, полученный из базальной мембраны, или компонент, который может участвовать в лиганд-рецепторном взаимодействии с участием молекулы адгезивного слоя. В одном из вариантов осуществления подходящим культуральным субстратом является МАТРИГЕЛЬ® (Becton Dickenson). МАТРИГЕЛЬ® представляет собой растворимый препарат из клеток опухоли Энгельбрета-Холма-Суорма, который при комнатной температуре превращается в гель и образует восстановленную базальную мембрану.

В качестве альтернативы можно использовать другие компоненты внеклеточного матрикса и смеси компонентов. В зависимости от типа пролиферирующих клеток, это может быть ламинин, фибронектин, протеогликан, энтактин, гепарансульфат и т.п., по отдельности или в различных сочетаниях.

Плюрипотентные стволовые клетки могут высеваться на субстрат с соответствующим распределением по поверхности и в присутствии среды, поддерживающей выживание, размножение и сохранение требуемых характеристик клеток. Все эти характеристики улучшаются при тщательном подходе к распределению клеток при посеве и могут быть определены специалистом в данной области.

Подходящая культуральная среда может быть изготовлена, например, из следующих компонентов модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (DMEM), Gibco № 11965-092, нокаутная модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (KO DMEM), Gibco № 10829-018, базовая среда Хэма F12/50% DMEM, 200 ммоль/л L-глутамина, Gibco № 15039-027; раствор неосновных аминокислот, Gibco 11140-050; β-меркаптоэтанол, Sigma № M7522; человеческий рекомбинантный основной фактор роста фибробластов (bFGF), Gibco № 13256-029.

Образование клеток-предшественников эндокринных клеток поджелудочной железы из плюрипотентных стволовых клеток

Настоящее изобретение представляет способы получения популяции клеток-предшественников клеток поджелудочной железы из популяции плюрипотентных стволовых клеток. В одном варианте осуществления настоящего изобретения представляет способы дальнейшей дифференциации клеток-предшественников эндокринных клеток поджелудочной железы в клетки, экспрессирующие маркеры линии эндокринных клеток поджелудочной железы.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предлагается способ получения клеток-предшественников панкреатических эндокринных клеток, включающий следующие этапы:

- 35 а. Культивирование популяции плюрипотентных стволовых клеток;
- б. Дифференцирование популяции плюрипотентных стволовых клеток в популяцию клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы;
- с. Дифференцирование популяции клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы, в популяцию клеток первичной кишечной трубки;
- 40 д. Дифференцирование популяции клеток первичной кишечной трубки в популяцию клеток заднего сегмента передней кишки; и
- е. Дифференцирование популяции клеток заднего сегмента передней кишки в популяцию предшественников эндокринных клеток поджелудочной железы путем 45 использования среды с добавлением ингибитора CYP26A.

Популяция предшественников эндокринных клеток может подвергаться дальнейшей обработке для получения популяции клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии эндокринных клеток поджелудочной железы.

Эффективность дифференцирования может быть определена путем обработки популяции клеток агентом (например, антителом), специфически распознающим белковый маркер, экспрессируемый клетками, экспрессирующими маркеры, характерные для желательного вида клеток.

- 5 Способы оценки экспрессии маркеров белков и нуклеиновых кислот в культивированных или выделенных клетках являются стандартными для данной области. Сюда относятся количественная ревертазная полимеразная цепная реакция (OT-ПЦР), Нозерн-блот, гибридизация *in situ* (см., например, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 2001, доп.)), а также способы иммунологического анализа,
- 10 такие как имmunогистохимический анализ среза материала, Вестерн-блоттинг, а для маркеров, доступных в интактных клетках, - способ проточной цитометрии (FACS) (см., например, Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

Характеристики плорипотентных стволовых клеток хорошо известны специалистам 15 в данной области, и продолжается выявление дополнительных характеристик плорипотентных стволовых клеток. К маркерам плорипотентных стволовых клеток относится, например, экспрессия одного или нескольких следующих маркеров: ABCG2, CRIPTO, FOXD3, Connexin43, Connexin45, OCT4, SOX2, Nanog, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, Tra 1-81.

- 20 После обработки плорипотентных стволовых клеток с применением способов, составляющих предмет настоящего изобретения, дифференцированные клетки могут быть выделены путем воздействия на популяцию клеток агентом (например, антителом), специфически распознающим белковый маркер, например CXCR4, экспрессируемый клетками, экспрессирующими маркеры, характерные для линии сформированной 25 эндодермы.

К плорипотентным стволовым клеткам, которые могут использоваться в настоящем изобретении, относятся, например, человеческие эмбриональные стволовые клетки линии H9 (код NIH: WA09), человеческие эмбриональные стволовые клетки линии H1 (код NIH: WA01), человеческие эмбриональные стволовые клетки линии H7 (код NIH: 30 WA07) и человеческие эмбриональные стволовые клетки линии SA002 (Cellartis, Швеция). Также для использования в рамках настоящего изобретения подходят клетки, экспрессирующие по меньшей мере один из следующих маркеров, характерных для плорипотентных клеток: ABCG2, cripto, CD9, FOXD3, CONNEXIN43, CONNEXIN45, OCT4, SOX2, Nanog, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60 и Tra 1-81.

- 35 Маркеры характерные для сформированной линии эндодермы выбираются из группы, содержащей SOX17, GATA4, HNF3-бета, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, Mix-подобный гомеобоксовый белок, FGF4, CD48, эомезодермин (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 и Otx2. Подходит для использования в настоящем изобретении клетка, экспрессирующая, как минимум, один из маркеров, характерных 40 для линии сформированной эндодермы. В одном из аспектов настоящего изобретения клетка, экспрессирующая маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы, представляет собой клетку-предшественника первичной полоски. В другом аспекте настоящего изобретения клетка, экспрессирующая маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы, представляет собой мезэндодермальную клетку. В другом 45 аспекте настоящего изобретения клетка, экспрессирующая маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы, представляет собой клетку сформированной эндодермы.

Маркеры, характерные для линии эндодермы поджелудочной железы (включающей

клетки первичной кишечной трубы и клетки задней части передней кишки), выбираются из группы, состоящей из: PDX1, NKX6.1, HNF1-бета, PTF1-альфа, HNF6, HNF4-альфа, SOX9, HB9 и PROX1. Подходит для использования в настоящем изобретении клетка, экспрессирующая, как минимум, один из маркеров, характерных для линии

- 5 панкреатической эндодермы. В одном из аспектов настоящего изобретения клетка, экспрессирующая маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы, представляет собой клетку панкреатической эндодермы.

Маркеры, характерные для линии дифференцирования панкреатических эндокринных клеток, выбирают из группы, состоящей из следующих маркеров: NGN3, NEUROD,

- 10 ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4, NGN3 и PTF-1-альфа. В одном варианте осуществления панкреатическая эндокринная клетка способна к экспрессии по меньшей мере одного из следующих гормонов: инсулин, глюкагон, соматостатин и панкреатический полипептид. Соответствующей целям настоящего изобретения является клетка, экспрессирующая по меньшей мере один из маркеров, характерных для линии

- 15 панкреатических эндокринных клеток. В одном из аспектов настоящего изобретения клетка, экспрессирующая маркеры, характерные для линии панкреатических эндокринных клеток, представляет собой панкреатическую эндокринную клетку. Панкреатическая эндокринная клетка может представлять собой панкреатическую клетку, экспрессирующую гормоны. В альтернативном варианте осуществления

- 20 панкреатическая эндокринная клетка может представлять собой панкреатическую клетку, секретирующую гормоны.

В одном аспекте настоящего изобретения панкреатическая эндокринная клетка представляет собой клетку с экспрессией маркеров, характерных для линии дифференцирования  $\beta$ -клеток. Клетка с экспрессией маркеров, характерных для линии

- 25  $\beta$ -клеток, экспрессирует PDX1 и по меньшей мере один из следующих транскрипционных факторов: NGN3, NKX2.2, NKX6.1, NEUROD, ISL1, HNF3-бета, MAFA, PAX4 и PAX6. В одном аспекте настоящего изобретения клетка с экспрессией маркеров, характерных для линии дифференцирования  $\beta$ -клеток, представляет собой  $\beta$ -клетку.

Формирование клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии

- 30 сформированной эндодермы, из плюрипотентных стволовых клеток

Популяции клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии сформированной панкреатической эндодермы, могут быть получены из популяций плюрипотентных стволовых клеток любыми известными способами.

Например, популяции плюрипотентных стволовых клеток могут быть

- 35 дифференцированы в клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы, в соответствии со способами, описанными в публикации D'Amour et al., Nature Biotechnology 23, 1534-1541 (2005).

Например, популяции плюрипотентных стволовых клеток могут быть

дифференцированы в клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для линии

- 40 сформированной эндодермы, в соответствии со способами, описанными в публикации Shinozaki et al., Development 131, 1651-1662 (2004).

Например, популяции плюрипотентных стволовых клеток могут быть

дифференцированы в клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для линии

- 45 сформированной эндодермы, в соответствии со способами, описанными в публикации McLean et al., Stem Cells 25, 29-38 (2007).

Например, популяции плюрипотентных стволовых клеток могут быть

дифференцированы в клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для линии

сформированной эндодермы, в соответствии со способами, описанными в публикации

D'Amour et al., Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006).

Например, популяции плюрипотентных стволовых клеток могут быть дифференцированы в клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы, путем обработки плюрипотентных стволовых клеток в соответствии со способами, изложенными в заявке на патент США Сер. № 11/736908.

Например, популяции плюрипотентных стволовых клеток могут быть дифференцированы в клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы, путем обработки плюрипотентных стволовых клеток в соответствии со способами, изложенными в заявке на патент США Сер. № 11/779311.

Например, популяции плюрипотентных стволовых клеток могут быть дифференцированы в клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы, путем обработки плюрипотентных стволовых клеток в соответствии со способами, изложенными в заявке на патент США Сер. № 12/493741.

Например, популяции плюрипотентных стволовых клеток могут быть дифференцированы в клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы, путем обработки плюрипотентных стволовых клеток в соответствии со способами, изложенными в заявке на патент США Сер. № 12/494789.

Образование клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы

К клеткам, экспрессирующими маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы, относятся клетки панкреатической эндодермы, клетки первичной кишечной трубы и клетки поздней передней кишки. В одном варианте осуществления изобретения популяцию клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии дефинитивной эндодермы, которая была получена способами настоящего изобретения, далее

дифференцируют в популяцию клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы, любым известным способом.

Например, популяции клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии дефинитивной эндодермы, полученные по способам настоящего изобретения, могут быть дополнительно дифференцированы в популяции клеток, экспрессирующие маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы, путем обработки популяции клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии дефинитивной эндодермы, в соответствии со способами, представленными в работе D' Amour et al., Nature Biotechnology, 24, 1392-1401 (2006).

Например, популяции клеток, экспрессирующие маркеры, характерные для линии дефинитивной эндодермы, полученные по методам настоящего изобретения, могут быть дополнительно дифференцированы в популяции клеток, экспрессирующие маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы, путем обработки популяции клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии дефинитивной эндодермы, в соответствии со способами, представленными в заявке на патент США Сер. № 11/736908.

Формирование популяции клеток-предшественников панкреатических эндокринных клеток

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предлагается способ получения клеток-предшественников панкреатических эндокринных клеток, включающий следующие этапы:

а. Культивирование популяции плюрипотентных стволовых клеток;

б. Дифференцирование популяции плюрипотентных стволовых клеток в популяцию клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы;

с. Дифференцирование популяции клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы, в популяцию клеток первичной кишечной трубы;

d. Дифференцирование популяции клеток первичной кишечной трубы в популяцию

5 клеток заднего сегмента передней кишки; и

е. Дифференцирование популяции клеток заднего сегмента передней кишки в популяцию предшественников эндокринных клеток поджелудочной железы путем культивирования в среде с добавлением ингибитора СYP26A.

Ингибитор СYP26A может применяться в концентрации от приблизительно 1 нмоль/л

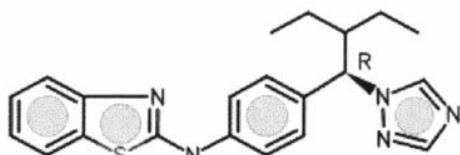
10 до приблизительно 1000 нмоль/л. Альтернативно, ингибитор СYP26A может применяться в концентрации от приблизительно 10 нмоль/л до приблизительно 100 нмоль/л.

Для использования в настоящем изобретении подходит любой ингибитор СYP26A.

Например, ингибитор СYP26A может быть выбран из соединений, описанных в заявке

15 на патент США №7468391. Альтернативно, ингибитор СYP26A может быть выбран из соединений, описанных в патентной заявке США №2005/0187298 A1. Альтернативно, ингибитор СYP26A может быть выбран из соединений, описанных в заявке на патент США №2004/0106216 A1. Альтернативно, ингибитор СYP26A может быть выбран из соединений, описанных в международной заявке WO 2005058301 A1. Альтернативно, ингибитор СYP26A может быть выбран из соединений, описанных в

20 PNAS от 12 мая 2009 г, т. 106, №19 7864-7869. В одном варианте осуществления ингибитор СYP26A представляет собой N-{4-[2-этил-1-(1Н-1,2,4-триазол-1-ил)бутил]фенил}-1,3-бензотиазол-2-амин. См. Формулу 1.



ФОРМУЛА 1.

В одном варианте осуществления изобретения в среду с добавлением ингибитора СYP26A, дополнительно добавлен по меньшей мере один фактор, выбранный из группы, состоящей из фактора, способного ингибировать BMP, ингибитора сигнального каскада

рецепторов TGF $\beta$ , а также витамина А и активатора РКС.

В одном варианте фактором, способным ингибировать BMP, является Noggin. Noggin может использоваться в концентрациях от приблизительно 50 нг/мл до приблизительно 500 мкг/мл. В одном из вариантов осуществления Noggin используется в концентрации

35 100 нг/мл.

В одном из вариантов ингибитором сигнализации рецептора TGF $\beta$  является ингибитор ALK5. В одном из вариантов ингибитором ALK5 является ингибитор ALK5 II. Ингибитор ALK5 II может применяться в концентрации от приблизительно 0,1 мкмоль/л до приблизительно 10 мкмоль/л. В одном варианте осуществления ингибитор ALK5 II

40 применяется в концентрации 1 мкмоль/л.

В одном варианте осуществления активатор протеинкиназы С (РКС) выбран из группы, состоящей из (2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(трифторметил)фенил)-2,4-

пентадиеноиламино)бензолактама, индолактама V (ILV), форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA) и форбол-12,13-дибутират (PDBu). В одном из вариантов активатором

45 протеинкиназы С является (2S, 5S)-(E, E)-8-(5-(4-(трифторметил)фенил) -2,4-пентадиеноиламин)бензолактам. (2S, 5S)-(E, E)-8-(5-(4-(трифторметил)фенил) -2,4-пентадиеноиламин)бензолактам может использоваться в концентрации приблизительно от 20 нм до 500 нм. (2S, 5S)-(E, E)-8-(5-(4-(Трифторметил)фенил)-2,4-пентадиеноиламино)

бензолактам в настоящем документе называется «ТРВ».

Создание клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии панкреатических эндокринных клеток

В одном варианте осуществления популяция клеток-предшественников эндокринных

5 клеток поджелудочной железы, полученная методами настоящего изобретения, далее дифференцируется в популяцию клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии эндокринных клеток поджелудочной железы, любым известным способом.

Например, популяции клеток, экспрессирующие маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы, могут быть дополнительно дифференцированы в

10 популяции клеток, экспрессирующие маркеры, характерные для линии панкреатических эндокринных клеток, путем обработки популяции клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы, в соответствии со способами, представленными в работе D'Amour et al., *Nature Biotechnology*, 2006.

Например, популяции клеток, экспрессирующие маркеры, характерные для линии

15 панкреатической эндодермы, могут быть дополнительно дифференцированы в популяции клеток, экспрессирующие маркеры, характерные для линии панкреатических эндокринных клеток, путем обработки популяции клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы, в соответствии со способами, представленными в работе D'Amour et al., *Nature Biotechnology*, 2006.

20 Например, популяции клеток, экспрессирующие маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы, могут далее дифференцироваться в популяции клеток, экспрессирующие маркеры, характерные для линии эндокринных панкреатических клеток, путем обработки популяции клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы, в соответствии со способами, описанными в

25 заявке на патент США Сер. № 11/736908.

Например, популяции клеток, экспрессирующие маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы, могут далее дифференцироваться в популяции клеток, экспрессирующие маркеры, характерные для линии эндокринных панкреатических клеток, путем обработки популяции клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы, в соответствии со способами, описанными в

30 заявке на патент США Сер. № 11/779311.

Например, популяции клеток, экспрессирующие маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы, могут далее дифференцироваться в популяции клеток, экспрессирующие маркеры, характерные для линии эндокринных панкреатических клеток, путем обработки популяции клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы, в соответствии со способами, описанными в

35 заявке на патент США Сер. № 60/953178.

Например, популяции клеток, экспрессирующие маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы, могут далее дифференцироваться в популяции клеток, экспрессирующие маркеры, характерные для линии эндокринных панкреатических клеток, путем обработки популяции клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии панкреатической эндодермы, в соответствии со способами, описанными в

40 заявке на патент США Сер. № 60/990529.

Настоящее изобретение далее иллюстрируется, помимо прочих, следующими

45 примерами.

## ПРИМЕРЫ

### Пример 1

Дифференциация клеток человеческой эмбриональной линии H1 в клетки-

предшественники эндокринных клеток поджелудочной железы в культуральной среде без ФБС и с добавлением ингибитора CYP26A

Клетки линии человеческих эмбриональных стволовых клеток H1 (p40-p50)

5 культивировали на чашках, покрытых субстратом МАТРИГЕЛЬ® (разведение 1:30) (BD Biosciences; Кат. № 356231) в среде MEF-CM (среда, кондиционированная мышьями эмбриональными фибробластами) в виде колоний, и дифференцировали в клетки-предшественники эндокринных клеток поджелудочной железы следующим образом:

10 а. Стадия I (сформированная энодерма): Человеческие эмбриональные стволовые клетки культивировали в среде RPMI с добавлением 2% БСА без жирных кислот (кат. № 68700, ProLiant, Огайо, США), 100 нг/мл активина A (R&D Systems, Миннесота, США, 20 нг/мл WNT-3a (№ по каталогу 1324-WN-002, R&D Systems, Миннесота, США) и 8 нг/мл bFGF (№ по каталогу 00-18B, PeproTech, Нью-Джерси, США) в течение суток, затем использовали среду RPMI с добавлением 2% БСА, 100 нг/мл активина A, 8 нг/мл bFGF в течение еще двух суток, затем

15 б. Стадия II (клетки первичной кишечной трубки): Клетки культивировали в RPMI + 2% БСА без жирных кислот и 50 нг/мл FGF7 в течение 2 суток, затем

20 в. Стадия III (задний отдел передней кишки): Клетки помещали в среду DMEM/c высокой концентрацией глюкозы с добавлением ITS-X в разведении 1:200 (Invitrogen, Калифорния), 0,1% БСА (богатого липидами) (Invitrogen, кат. № 11021-045), 50 нг/мл FGF7, 0,25 мкМ SANT-1, 2 мкмоль/л ретиноевой кислоты (РК) (Sigma, Миссури), 100 нг/мл белка Noggin (R&D Systems, Миннесота), 2,5 мкмоль/л 4-[4-(4-фторфенил)-1-(3-фенилпропил)-5-пиридин-4-ил-1Н-имидацол-2-ил]бут-3-ин-1-ола (ингибитор P38, описанный в патенте США № 6521655), и активина A 20 нг/мл на пять суток, затем

25 д. Стадия IV (предшественник эндокринных клеток поджелудочной железы): Клетки помещали в среду DMEM/высокую концентрацию глюкозы с добавлением ITS-X в разведении ITS-X (Invitrogen, Калифорния), 0,1% БСА (Invitrogen, Калифорния), 100 нг/мл белка Noggin, 1 мкмоль/л ингибитора ALK5(SD-208, описанного в Molecular Pharmacology 2007 72:152-161), 500 нмоль/л TPB (модулятор белка-предшественника α-амилоида) (Кат. № 565740, EMD, Калифорния), 10-100 нмоль/л ингибитора CYP26A N-{4-[2-этил-1-(1Н-1, 2, 4-триазол-1-ил)бутил]фенил}-1, 3-бензотиазол-2-амина и 10-100 нмоль/л витамина А (Кат. № R7632, Sigma, Миссури) в течение 4 суток, или

30 В некоторых культурах стадию IV продлевали до 6 суток. мРНК выделяли на стадиях III и IV для анализа генов панкреатических клеток методом ПЦР в реальном времени.

Как показано на фиг. 1, добавление ингибитора CYP26A на стадии IV значительно усиливало экспрессию предшественников эндокринных клеток (NGN3, Pax4, NeuroD) вместе с маркером панкреатической энодермы NKX6.1 в зависимости от дозы.

35 Добавление витамина А вместе с ингибитором CYP26A значительно не изменяло экспрессию маркеров панкреатической энодермы или предшественников эндокринных клеток. Кроме того, добавление ингибитора CYP26A на стадии IV уменьшало экспрессию CDX2 (маркера кишечных клеток) и альбумина (маркера клеток печени).

40 Иммунохимическое окрашивание на NGN3 (Кат. № AF3444, R&D systems, MN) на стадии IV очевидно показало значительное ускорение экспрессии NGN3 в культурах с добавлением 100 нмоль/л ингибитора CYP26A.

45 Пример 2

Альтернативный способ дифференцирования клеток человеческой эмбриональной линии стволовых клеток H1 в клетки-предшественники эндокринных клеток поджелудочной железы в питательной среде без ФБС с ингибитором CYP26A

Стволовые клетки человеческой эмбриональной линии H1 (p40-p52) высевали по

отдельности из суспензии 100000 кл./см<sup>2</sup> на чашки, покрытие субстратом МАТРИГЕЛЬ® (разведение 1:30) (BD Biosciences; Кат. № 356231) в MEF-CM (среду, кондиционированную мышиными фибробластами) с добавлением 16 нг/мл FGF2 (Кат. № 100-18B, PeproTech, Нью Джерси) и 10 мкмоль/л Y27632 (ингибитор Rock, Кат. № Y0503, Sigma, Миссури).

<sup>5</sup> Через 72 ч после посева культуры дифференцировали в сформированную эндодерму (СЭ) следующим образом:

а. Стадия I (сформированная эндодерма): Человеческие эмбриональные клетки культивировали на среде MCDB-131 (Кат. № 10372-019, Invitrogen, Калифорния) с добавлением 2% БСА без жирных кислот (кат. № 68700, Proliant, Айова), 0,0025 г/мл бикарбоната натрия (Кат. № S3187, Sigma, Миссури), 1X Глутамакса™ (кат. № 35050-079, Invitrogen, Калифорния) и 100 нг/мл активина A (R&D Systems, MN) + 20 нг/мл WNT-3а (кат. № 1324-WN-002, R&D Systems, MN) в течение суток, затем использовали среду MCDB-131 с добавлением 2% БСА, натрия бикарбоната, Глутамакса и 100 нг/мл активина A каждый день в течение последующих трех суток, затем

<sup>10</sup> б. Стадия II (клетки первичной кишечной трубки): Клетки культивировали на среде MCDB-131 + 2% БСА без жирных кислот + 50 нг/мл FGF7 в течение 3 суток, затем

с. Стадия III (задний отдел передней кишки): Клетки культивировали в среде MCDB-131/высокой концентрации глюкозы (25 ммоль/л глюкозы) с добавлением ITS-X в разведении 1:200 Invitrogen, Калифорния), 1X Глутамакса™ (Кат. № 35050-079, Invitrogen, Калифорния), 0,0025 г/мл натрия бикарбоната (Кат. № S3187, Sigma, Миссури), 0,1% БСА (богатого липидами) (Invitrogen, Калифорния № 11021-045), 50 нг/мл FGF7, 0,25 мкмоль/л SANT-1, 2 мкмоль/л ретиноевой кислоты (РК) (Sigma, Миссури), 2,5 мкмоль/л 4-[4-(4-фторфенил)-1-(3-фенилпропил)-5-пиридин-4-ил-1Н-имидазол-2-ил]бут-3-ин-1-ол (ингибитор p38, описанный в патенте США № 6521655), 100 нмоль/л LDN-193189 (ингибитор рецептора BMP, Кат. № 04-0019, Stemgent, Калифорния), 500 нмоль/л ингибитора CYP26A N-{4-[2-этил-1-(1Н-1, 2, 4-триазол-1-ил)бутил]фенил}-1, 3-бензотиазол-2-амин и активин А 20 нг/мл в течение четырех суток, затем

<sup>25</sup> д. Стадия IV (предшественник эндокринных клеток поджелудочной железы): Клетки культивировали в среде MCDB-131/высокой концентрации глюкозы (25 ммоль/л глюкозы) с добавлением ITS-X в разведении 1:200 Invitrogen, Калифорния), 1X Глутамакса™ (Кат. № 35050-079, Invitrogen, Калифорния), 0,0025 г/мл натрия бикарбоната (Кат. № S3187, Sigma, Миссури) Sigma Миссури, 1 мкмоль/л ингибитора ALK5 (SD-208, описан в Molecular Pharmacology 2007 72:152-161), 500 нмоль/л PDBu (активатор РК) (Кат. № P1269, Sigma, Миссури), 100 нмоль/л LDN-193189 (ингибитор рецептора BMP, кат. № 04-0019, Stemgent, Калифорния), 0,25 мкмоль/л SANT-1 (#S4572, Sigma, Миссури) и 500 нмоль/л ингибитора CYP26A N-{4-[2-этил-1-(1Н-1, 2, 4-триазол-1-ил)бутил]фенил}-1, 3-бензотиазол-2-амина в течение 7 суток, или

<sup>30</sup> е. Стадия IV (предшественник эндокринных клеток поджелудочной железы): Клетки культивировали в среде MCDB-131/высокой концентрации глюкозы (25 ммоль/л глюкозы) с добавлением ITS-X в разведении 1:200 Invitrogen, Калифорния), 1X Глутамакса™ (Кат. № 35050-079, Invitrogen, Калифорния), 0,0025 г/мл натрия бикарбоната (Кат. № S3187, Sigma, Миссури), 1 мкмоль/л ингибитора ALK5 (SD-208, описан в Molecular Pharmacology 2007 72:152-161), 500 нмоль/л PDBu (активатор РК) (Кат. № P1269, Sigma, Миссури), 100 нмоль/л LDN-193189 (ингибитор рецептора BMP кат. № 04-0019, Stemgent, Калифорния), 0,25 мкмоль/л SANT-1 (#S4572, Sigma, Миссури) в течение 7 суток.

мРНК для анализа генов клеток поджелудочной железы методом ПЦР в реальном времени выделяли на стадиях III и IV. Как и в описанном выше Примере 1 добавление

ингибитора CYP26A на стадии IV усиливало экспрессию маркеров предшественников эндокринных клеток, например, NGN3 и NeuroD. (См. фиг. 2). Добавление ингибитора на стадиях III и IV дополнительно усиливало экспрессию NGN3 и NeuroD. Удивительно, что добавление ингибитора CYP26A на стадии III (в присутствии ретиноевой кислоты) 5 значительно подавляло PDX-1 и NKX6.1, усиливая экспрессию CDX2. Эти результаты позволяют предположить, что оптимальной стадией для добавления ингибитора CYP26A является стадия IV.

### Пример 3

Альтернативный способ дифференцирования клеток человеческой эмбриональной

10 линии стволовых клеток H1 в эндокринные клетки поджелудочной железы в питательной среде без ФБС с ингибитором CYP26A

Стволовые клетки человеческой эмбриональной линии H1 (p40-p52) высевали

отдельными клетками из суспензии 100000 кл./см<sup>2</sup> на чашки, покрытые субстратом

15 МАТРИГЕЛЬ® (разведение 1:30) (BD Biosciences; Кат. № 356231), в MEF-CM (среду, кондиционированную мышьями фибробластами) с добавлением 16 нг/мл FGF2 (Кат. № 100-18B, PeproTech, NJ) и 10 мкмоль/л Y27632 (ингибитор Rock, Кат. № Y0503, Sigma, Миссури). Через 72 ч после посева культуры дифференцировали в сформированную эндодерму (СЭ) следующим образом:

20 а. Стадия I (сформированная эндодерма): Человеческие эмбриональные стволовые клетки высевали одиночно на чашки, покрытые субстратом МАТРИГЕЛЬ, со средой MCDB-131 (Кат. № 10372-019, Invitrogen, Калифорния) с добавлением 2% БСА без жирных кислот (Кат. № 68700, ProLiant, Айова), 0,0025 г/мл натрия бикарбоната (Кат. № S3187, Sigma, Миссури), 1Х Глутамакса™ (Кат. № 35050-079, Invitrogen, Калифорния) и 100 нг/мл GDF-8 (R&D Systems, MN) + 2,5 мкмоль/л ингибитора GSK3B 14-проп-2-ен-1-ил-3,5,7,14,17,23,27-гептаазотетрацикло[19.3.1.1~2,6~1~8,12~]гептакоза-1(25),2(27),3,5,8 (26),9,11,21,23-нонаен-16-она в течение суток, затем использовали среду MCDB-131 с 2% БСА, натрия бикарбонатом, Глутамаксом и 100 нг/мл GDF-8 следующие трое суток, затем

30 б. Стадия II (клетки первичной кишечной трубки): Клетки культивировали в среде MCDB-131+2% БСА без жирных кислот +50 нг/мл FGF7 в течение 3 суток, затем

35 в. Стадия III (задний отдел передней кишки): Клетки культивировали в среде MCDB131 /высокой концентрации глюкозы (25 ммоль/л глюкозы) с добавлением ITS-X в разведении 1:200 Invitrogen, Калифорния), 1Х Глутамакса™ (Кат. № 35050-079, Invitrogen, Калифорния), 0,0025 г/мл натрия бикарбоната Кат. № S3187, Sigma, Миссури), 0,1% БСА (богатого липидами) (Invitrogen, Калифорния №. 11021-045), 50 нг/мл FGF7, 0,25 мкмоль/л SANT-1, 2 мкмоль/л ретиноевой кислоты (РК) (Sigma, Миссури), 2,5 мкмоль/л 4-[4-(4-фторфенил)-1-(3-фенилпропил)-5-пиридин-4-ил-1Н-имидацол-2-ил]бут-3-ин-1-ола, 100 нмоль/л LDN-193189 (ингибитор рецептора BMP Кат. № 04-0019, Stemgent, Калифорния) и активина А 20 нг/мл в течение четырех суток, затем

40 г. Стадия IV (предшественники клеток поджелудочной железы): Клетки культивировали в среде MCDB131/высокой концентрации глюкозы (25 ммоль/л глюкозы) с добавлением ITS-X в разведении 1:200 Invitrogen, Калифорния), 0,5% БСА (Invitrogen, Калифорния), 1Х Глутамакса™ (Кат. № 35050-079, Invitrogen, Калифорния), 0,0025 г/мл натрия бикарбоната (Кат. № S3187, Sigma, Миссури), 100 нмоль/л LDN-193189 (ингибитор рецептора BMP, кат. № 04-0019, Stemgent, Калифорния), 50 нмоль/л PDBu (активатор РК) (кат. №P1269, Sigma, Миссури), 0,25 мкмоль/л SANT-1 (#S4572, Sigma, Миссури) и 100 нмоль/л ингибитора CYP26A N-{4-[2-этил-1-(1Н-1, 2, 4-триазол-1-ил)бутил]фенил}-1, 3-бензотиазол-2-амина в течение 3 суток, затем

е. Стадия V (предшественники эндокринных клеток поджелудочной железы): Клетки культивировали в среде MCDB13/высокой концентрации глюкозы (25 ммоль/л глюкозы) с добавлением ITS-X в разведении 1:200 Invitrogen, Калифорния), 1X Глутамакса™ (Кат. № 35050-079, Invitrogen, Калифорния), 0,0025 г/мл натрия бикарбоната (Кат. № 5 S3187, Sigma, Миссури), 100 нмоль/л LDN-193189 (ингибитор рецептора BMP, кат. № 04-0019, Stemgent, Калифорния), 0,25 мкмоль/л SANT-1 (#S4572, Sigma, Миссури), 2

мкмоль/л ингибитора ALK5 (SD-208, описан в Molecular Pharmacology 2007 72:152-161) и 100 нмоль/л ингибитора CYP26A N-{4-[2-этил-1-(1Н-1, 2, 4-триазол-1-ил)бутил]фенил}-1, 3-бензотиазол-2-амина в течение 3 суток, затем F. Стадия VI (незрелые клетки

поджелудочной железы, экспрессирующие гормоны): Клетки культивировали в среде MCDB131/высокой концентрации глюкозы (25 ммоль/л глюкозы) с добавлением ITS-X в разведении 1:200 Invitrogen, Калифорния), 0,1% БСА (Invitrogen, Калифорния), 1X Глутамакса™ (Кат. № 35050-079, Invitrogen, Калифорния), 0,0025 г/мл натрия бикарбоната (Кат. № S3187, Sigma, Миссури) 100 нмоль/л LDN-193189 (ингибитор

рецептора BMP, Кат. № 04-0019, Stemgent, Калифорния) и 2 мкмоль/л ингибитора ALK5 (SD-208, описан в Molecular Pharmacology 2007 72:152-161) в течение 3 суток, затем

g. Стадия VII (Клетки поджелудочной железы, экспрессирующие гормоны): Клетки культивировали на среде MCDB131/высокой концентрации глюкозы (25 ммоль/л глюкозы) с добавлением ITS-X в разведении 1:200 Invitrogen, Калифорния), 0,1% БСА (Invitrogen, Калифорния), 1X Глутамакса™ (Кат. № 35050-079, Invitrogen, Калифорния), 0,0025 г/мл натрия бикарбоната (Кат. № S3187, Sigma, Миссури) 100 нмоль/л LDN-193189 (ингибитор рецептора BMP Кат. № 04-0019, Stemgent, Калифорния), 2 мкмоль/л ингибитора ALK5 (SD-208, описан в Molecular Pharmacology 2007 72:152-161) и 100 нмоль/л витамина А (Кат. № R7632, Сигма, Миссури) в течение 3 суток.

25 В некоторых культурах стадию VII продлевали до 18 дней. На стадиях V, VI отбирали пробы для ПЦР в реальном времени, иммунофлуоресцентного анализа (ИФА) и флуоресцентной проточной цитометрии. И при проточной цитометрии, и при иммунофлуоресцентном анализе антитела к NKX6.1 получали из банка гибридом Университета Айовы (Кат. № F55A12), антитела к CDX2 приобретали в компании Abcam

30 (Кат. № ab76541, Кембридж, Массачусетс), а антитела к PDX-1 приобретали в компании Abcam (Кат. № ab47267). На фиг. 3 показана морфология культур на разных стадиях дифференциации. После стадии II культуры имели однородную морфологию на стадиях III-VI. На фиг. 4 показана экспрессия NKX6.1 по результатам флуоресцентной проточной цитометрии на разных стадиях дифференциации. На этом чертеже подчеркивается, что

35 протокол, описанный в Примере 3, позволяет сохранить высокую экспрессию NKX6.1 на поздних стадиях дифференциации. На фиг. 4 показаны результаты иммунофлуоресцентного окрашивания на PDX1, NKX6.1, и CDX2 на стадиях V и VII по протоколу. Более 90% NKX6.1-положительных клеток также положительны по PDX1, однако менее 10% клеток положительны по CDX2.

40 Публикации, цитируемые в настоящем документе, полностью включаются в настоящий документ посредством ссылки. Хотя различные аспекты изобретения иллюстрируются выше ссылками на примеры и предпочтительные варианты осуществления, подразумевается, что область изобретения ограничивается не упомянутым выше описанием, а следующими пунктами формулы изобретения, 45 составленными в соответствии с принципами патентного законодательства.

#### Формула изобретения

1. Способ получения популяции клеток-предшественников эндокринных клеток

поджелудочной железы из плюрипотентных стволовых клеток, которые представляют собой человеческие эмбриональные стволовые клетки линии H9, H1, H7 и человеческие эмбриональные стволовые клетки линии SA002, включающий стадии:

а. культивирования популяции указанных плюрипотентных стволовых клеток;

5 б. дифференцирования популяции указанных плюрипотентных стволовых клеток в популяцию клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы;

10 в. дифференцирования популяции клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы, в популяцию клеток первичной кишечной трубы;

10 г. дифференцирования популяции клеток первичной кишечной трубы в популяцию клеток заднего сегмента передней кишки; и

е. дифференцирования популяции клеток заднего сегмента передней кишки в популяцию предшественников эндокринных клеток поджелудочной железы путем

15 15 культивирования популяции клеток задней части передней кишки в среде с добавлением ингибитора CYP26A без добавления ретиноевой кислоты.

2. Способ по п. 1, в котором дифференциация на стадии б., с. и д. включает обработку в среде без ингибитора CYP26A.

3. Способ по п. 1 или 2, в котором ингибитор CYP26A используют в концентрации

20 от приблизительно 1 нмоль/л до приблизительно 1000 нмоль/л.

4. Способ по п. 1 или 2, в котором ингибитор CYP26A используют в концентрации от приблизительно 10 нмоль/л до приблизительно 100 нмоль/л.

5. Способ по пп. 1-4, в котором ингибитор CYP26A представляет собой N-{4-[2-этил-1-(1Н-1,2,4-триазол-1-ил)бутил]фенил}-1,3-бензотиазол-2-амин.

25 6. Способ по п. 1, в котором обработка повышает экспрессию маркеров эндокринного предшественника NGN3, Pax и NeuroD.

7. Способ по п. 1, в котором обработка уменьшает экспрессию

CDX2 и альбумина.

8. Способ по любому из пп. 1-5, в котором среда с добавлением ингибитора CYP26A

30 также содержит по меньшей мере один фактор, выбранный из группы, состоящей из фактора, способного ингибировать BMP, ингибитора сигнального каскада рецепторов TGF $\beta$  и активатора РКС.

9. Способ по п. 8, в котором фактор, способный ингибировать BMP, включает Noggin.

10. Способ по п. 8, в котором ингибитор сигнального каскада рецепторов TGF $\beta$

35 включает ингибитор ALK5.

11. Способ по п. 10, в котором ингибитор ALK5 представляет собой ингибитор ALK5 II.

12. Способ по п. 8, в котором активатор РКС выбран из группы, состоящей из (2S,5S)-  
40 -(E,E)-8-(4-(трифторметил)фенил)-2,4-пентадиеноиламино)бензолактама, индолактама V (ILV), форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA) и форбол-12,13-дибутират (PDBu).

13. Способ по любому из пп. 1-5, в котором стадия дифференцировки популяции плюрипотентных стволовых клеток в популяцию клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы, включает культивирование плюрипотентных стволовых клеток в среде, содержащей активин А.

45 14. Способ по любому из пп. 1-5, в котором стадия дифференцировки популяции плюрипотентных стволовых клеток в популяцию клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы, включает культивирование плюрипотентных стволовых клеток в среде с GDF-8 и ингибитором GSK3B.

15. Способ по п. 14, в котором ингибитор GSK3B представляет собой 14-проп-2-ен-1-ил-3,5,7,14,17,23,27-гептаазотетрацикло[19.3.1.1-2,6~.1~8,12~]гептакоза-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-нонаен-16-он.

16. Способ по п. 1, в котором клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы, представляют собой сформированные клетки энтодермы.

17. Способ по п. 1, в котором стадия дифференцировки клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы в популяцию клеток первичной кишечной трубы включает культивирование клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для линии сформированной эндодермы в среде, содержащей FGF7.

18. Способ по п. 1, в котором стадия дифференцировки популяции клеток первичной кишечной трубы в популяцию клеток заднего сегмента передней кишки включает культивирование популяции клеток первичной кишечной трубы в среде, содержащей ретиноевую кислоту и ингибитор P38.

20

25

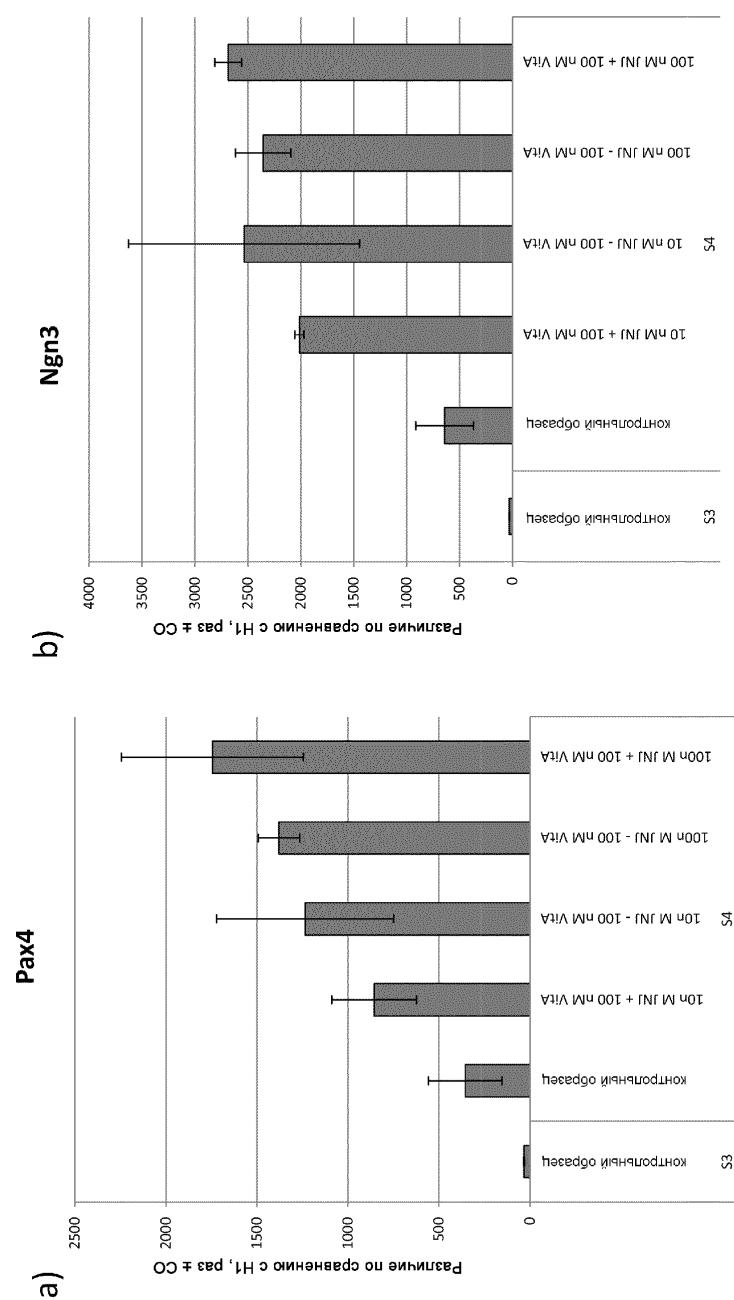
30

35

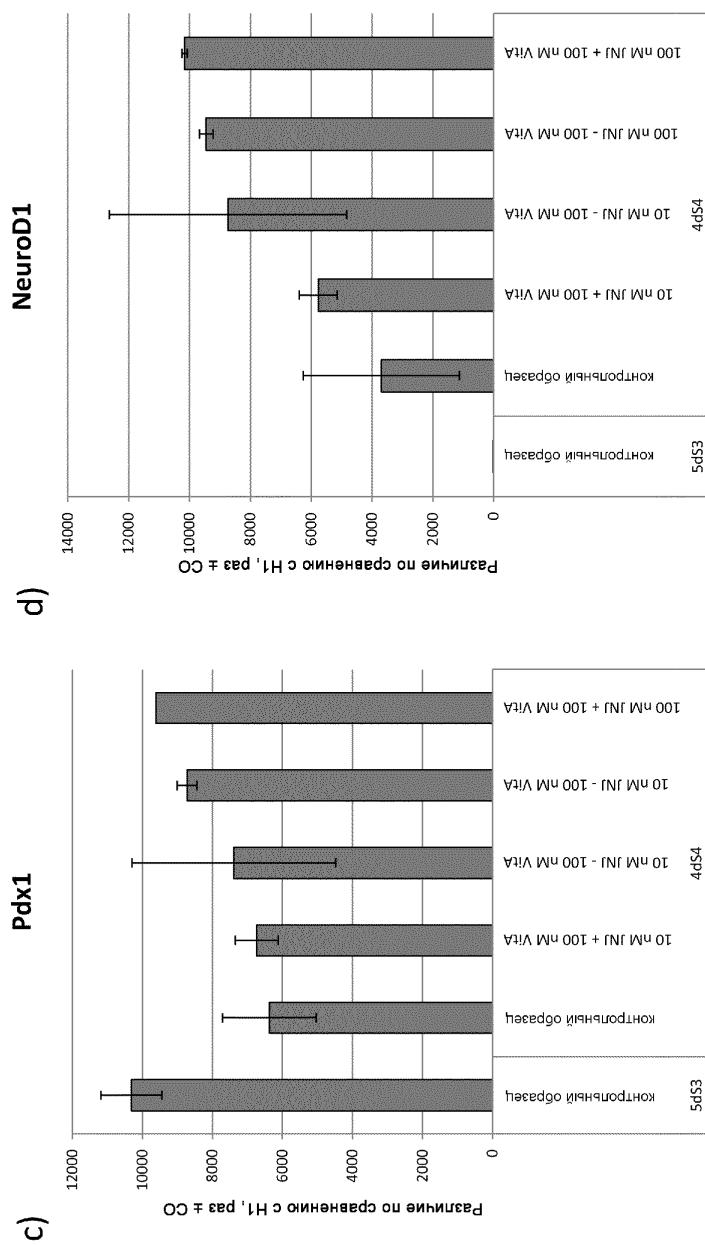
40

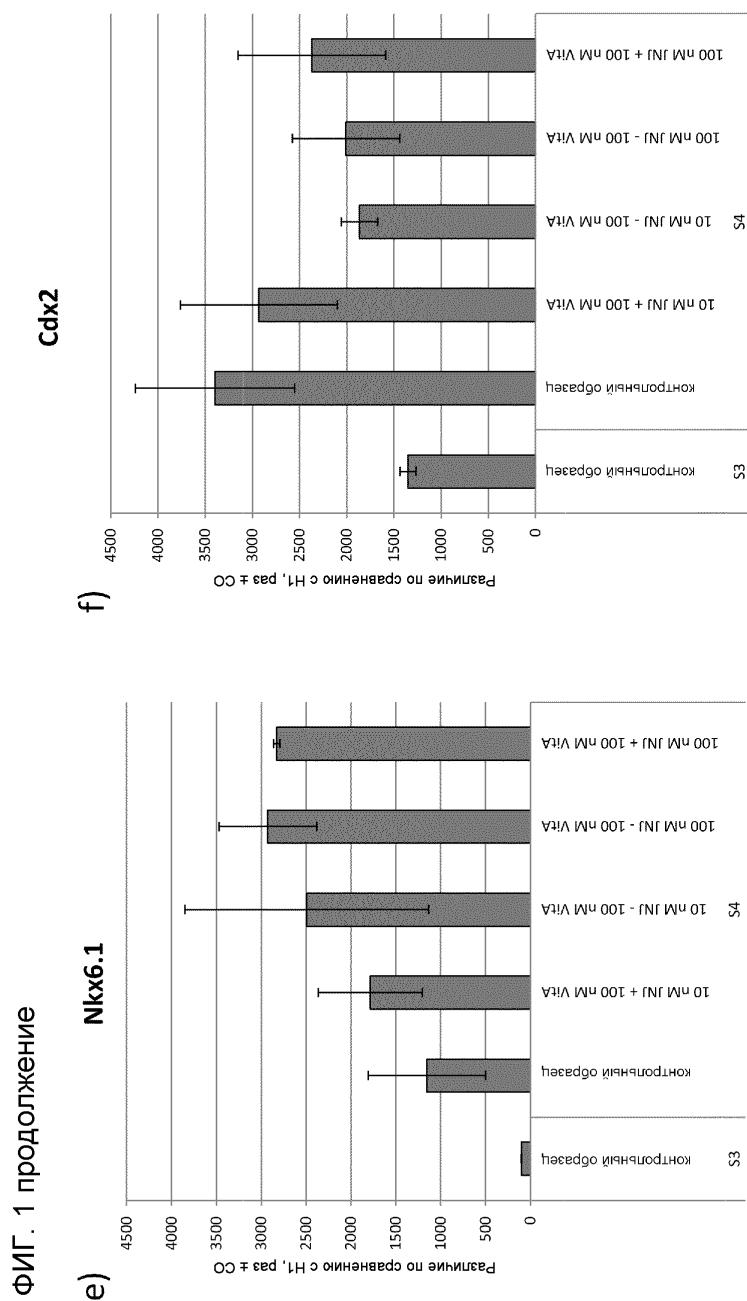
45

ΦΙΛΓ. 1

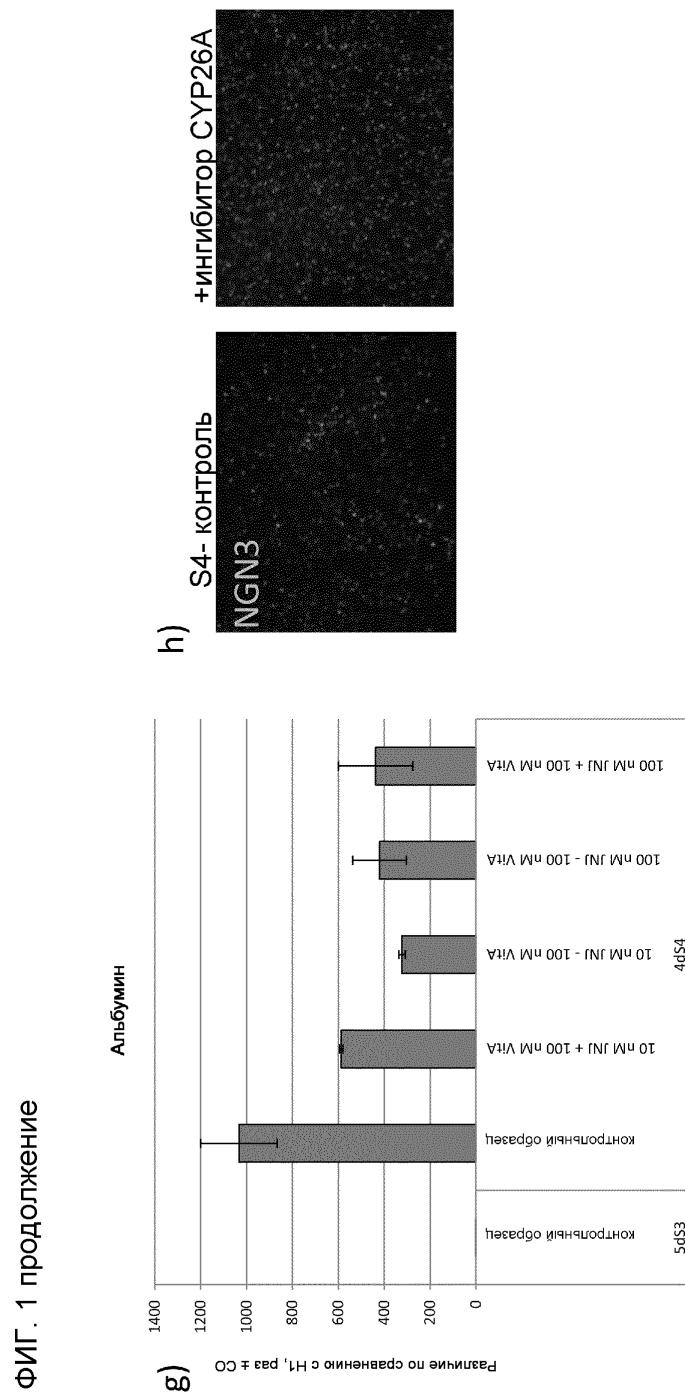


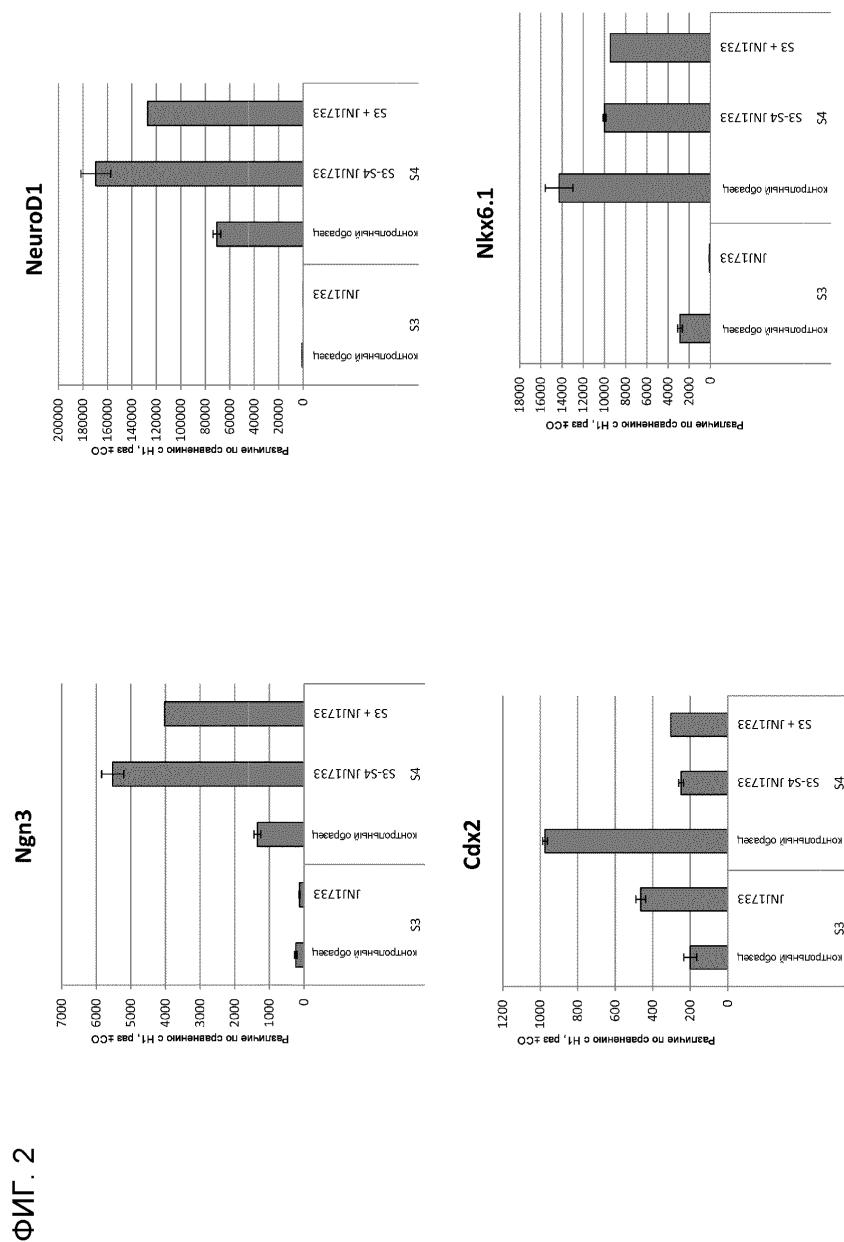
ФИГ. 1 продолжение



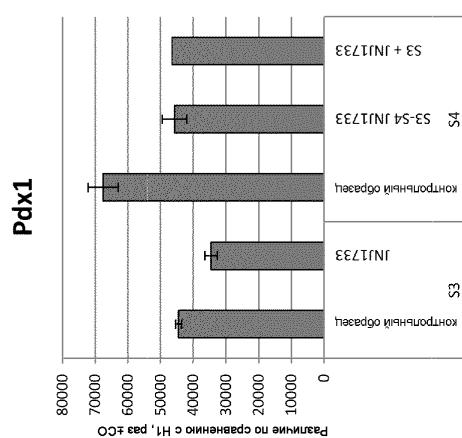


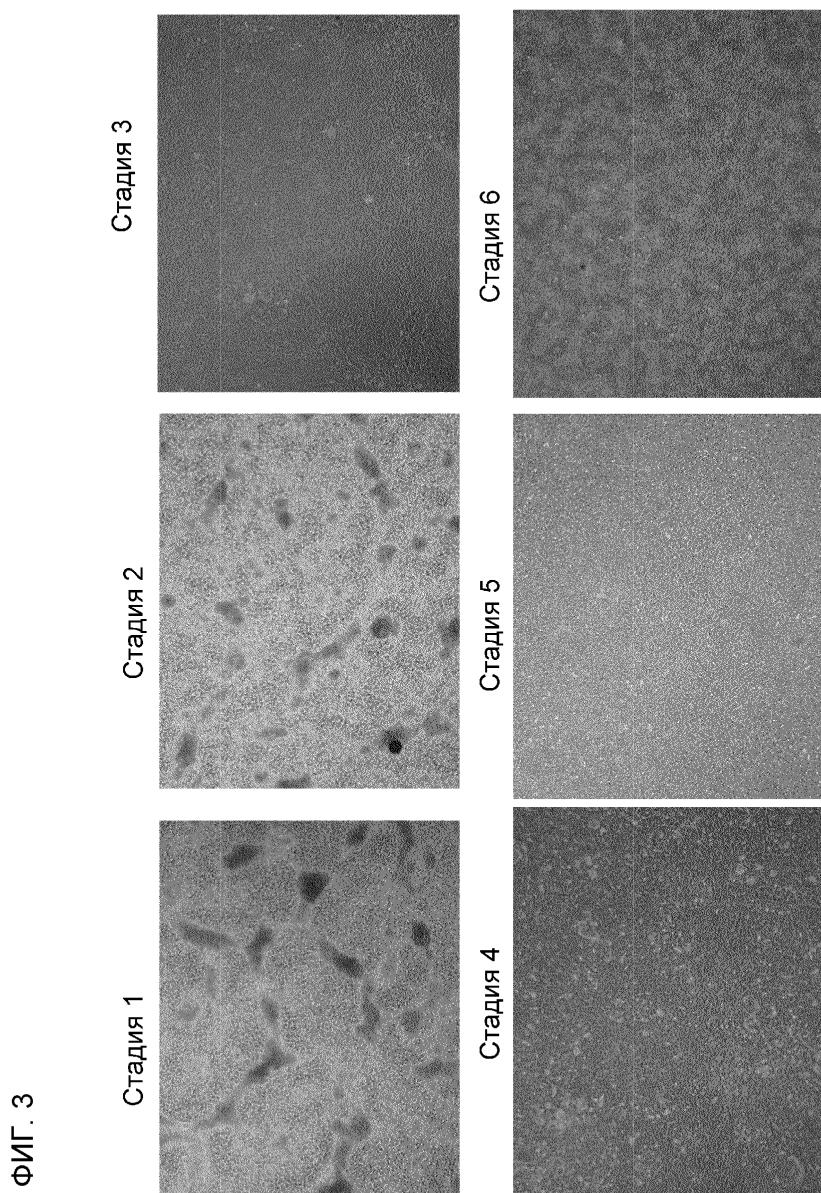
ФИГ. 1 продолжение

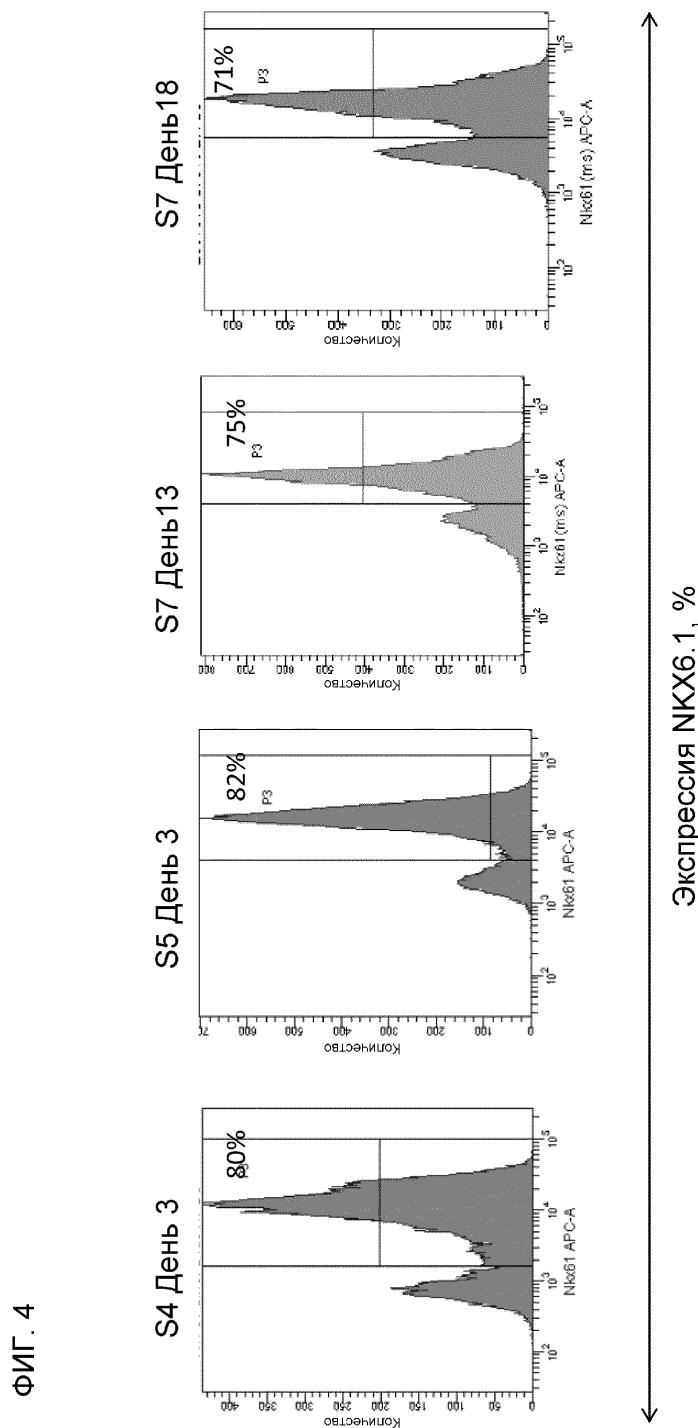




ФИГ. 2 продолжение







ФИГ. 4

ФИГ. 5

