



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013110127/10, 16.08.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.08.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
19.08.2010 EP 10173455.6

(43) Дата публикации заявки: 27.09.2014 Бюл. № 27

(45) Опубликовано: 10.09.2015 Бюл. № 25

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US2010021437 A1, 28.01.2010. EP
0001516926 A1, 23.03.2005 . RU 2351648 C2,
10.04.2009 . RU 2407790 C2, 27.12.2010 . US
20090047263 A1, 19.02.2009(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 19.03.2013(86) Заявка РСТ:
EP 2011/064051 (16.08.2011)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2012/022725 (23.02.2012)

Адрес для переписки:

197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-
ПАТЕНТ", И.И. Липатова

(72) Автор(ы):

**КРИСТЕНСЕН Клаус (СН),
ГРАФ Мартин (СН),
ЯКОНЕ Роберто (СН),
ДЖАГАСИА Рави (DE)**

(73) Патентообладатель(и):

Ф.ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (СН)**(54) КОНВЕРСИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В ИНДУЦИРОВАННЫЕ РЕПРОГРАМИРОВАННЫЕ НЕЙРОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ (ИРНСК)**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложен In vitro способ получения нейральных стволовых клеток (НСК), включающий получение соматических клеток, выбранных из группы фибробластов, кератиноцитов или адипоцитов, и репрограммирование указанных соматических клеток в НСК с помощью введения в указанные соматические клетки по меньшей мере двух генов, *Bmi1* и *Sox2*; и культивирования указанных

соматических клеток в питательной среде, содержащей ростовые факторы, выбранные из группы FGF2, EGF и BDNF и малой молекулы ингибитора ROCK. Также предложены применение нейральных стволовых клеток в качестве модели заболеваний ЦНС in vitro, терапевтическая композиция и биобанк для применения в регенеративной медицине. 5 н. и 10 з.п. ф-лы, 16 ил., 1 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2013110127/10, 16.08.2011**(24) Effective date for property rights:
16.08.2011

Priority:

(30) Convention priority:
19.08.2010 EP 10173455.6(43) Application published: **27.09.2014** Bull. № 27(45) Date of publication: **10.09.2015** Bull. № 25(85) Commencement of national phase: **19.03.2013**(86) PCT application:
EP 2011/064051 (16.08.2011)(87) PCT publication:
WO 2012/022725 (23.02.2012)

Mail address:

**197101, Sankt-Peterburg, a/ja 128, "ARS-PATENT",
I.I. Lipatova**

(72) Inventor(s):

**KRISTENSEN Klaus (CH),
GRAF Martin (CH),
JaKONE Roberto (CH),
DZhAGASIA Ravi (DE)**

(73) Proprietor(s):

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)(54) **CONVERSION OF SOMATIC CELLS INTO INDUCED REPROGRAMMED NEURAL STEM CELLS (IRNSC)**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology. Claimed is an in vitro method of obtaining neural stem cells (NSC), which includes obtaining somatic cells, selected from the group of fibroblasts, keratinocytes or adipocytes and reprogramming of the said somatic cells into NSC by means of the introduction of at least two genes, Bmi1 and Sox2, into the said somatic cells; and cultivation

of the said somatic cells in a nutrient medium, which contains growth factors, selected from the group FGF2, EGF and BDNF and a small molecule ROCK inhibitor.

EFFECT: the application of the neural stem cells as a model of CNS diseases in vitro, therapeutic composition and biobank for application in regenerative medicine are claimed.

15 cl, 16 dwg, 1 ex

Данная заявка относится к способу конверсии соматических клеток в нейральные стволовые клетки (НСК). Кроме того, данная заявка относится к способу конверсии человеческих фибробластов, кератиноцитов или адипоцитов в нейральные стволовые клетки на основании сопряженной пошаговой трансдукции генов и индукции средой

5

Длительное время считалось общепринятой догмой, что полностью дифференцированные соматические клетки не способны изменять свои свойства в обратном направлении. Эта догма начала меняться, как только серия новаторских экспериментов показала, что профиль экспрессии «молчащих» генов может быть

10 полностью реактивирован с помощью слияния клеток различных типов (Blau, H.M. How fixed is the differentiated state? Lessons from heterokaryons. Trends Genet. 5, 268-272 (1989)). Относительно недавно было показано, что перенос ядра из соматической клетки в энуклеированную яйцеклетку способен привести к полной реверсии профиля экспрессии генов соматических клеток и формированию состояния плюрипотентной клетки,

15 способной воспроизвести целое животное (например, Gurdon, J.B. & Melton, D.A. Nuclear reprogramming in cells. Science 322, 1811-1815 (2008)). Яманака с коллегами (Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126, 663-676 (2006)) продемонстрировали, что соматические клетки могут быть репрограммированы в индуцированные плюрипотентные стволовые

20 клетки (ипСК) с помощью трансдукции четырех определенных факторов (Sox2, Oct4, Klf4, c-Myc). В плюрипотентное состояние ипСК были репрограммированы различные типы соматических клеток, включая фибробласты, кератиноциты и адипоциты. В последние годы возник вопрос, все ли специфические типы соматических клеток способны трансдифференцироваться в совершенно другой тип соматических клеток,

25 таких как нейроны. Этот вопрос изучали Вениг с коллегами, продемонстрировав прямую конверсию мышинных фибробластов в функциональные нейроны с помощью трансдукции трех критических генов: Mash1, Brn2 and Myt1I (Wernig et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. Nature 25; 463(7284): 1035-41 (2010)). Однако полученные нейроны являются постмитотическими клетками, которые по определению

30 не способны пролиферировать и не переносят процедуры замораживания-оттаивания. US 2010/0021437 раскрывает способ получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из фибробластов и индукции таких клеток к дифференцировке в нейральный фенотип.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Однако прямая конверсия дифференцированных соматических клеток в нейральные

35 стволовые клетки до сих пор не описана. Показано, что нейральные стволовые клетки являются мультипотентными стволовыми клетками, накапливаемыми в специфических условиях. Они требуют определенной химической среды, например, среды N2B27 (N2B27 является смесью 1:1 сред DMEM/F12 (Gibco, Пейсли, Великобритания) с добавлением N2 и B27 (обе от Gibco)) с добавлением FGF (фактор роста фибробластов 2) и EGF

40 (эпидермальный ростовой фактор). Они способны расти как монослойная адгезивная культура, например, в плашках, покрытых полиорнитин/ламинон, или как плавающие нейросферы в плашках для неадгезивных клеточных культур. Было показано, что два типа культур нейральных стволовых клеток (нейросферы, адгезивные культуры) полностью взаимно трансформируемы. Нейральные стволовые клетки растут

45 бесконечно и действительно остаются полностью мультипотентными. В определенных условиях они дифференцируются в клеточные типы, из которых состоит взрослый мозг, включая нейроны, астроциты и олигодендроциты. Нейральные стволовые клетки рассматриваются как возможное лечебное средство для лечения пациентов с

нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, нарушение мозгового кровообращения, и травмы спинного мозга.

Известно, что нейральные стволовые клетки также можно получить *in vitro* из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) (Chambers et al. Nature 27; 3 (2009)), либо они могут быть выделены напрямую из образцов мозга (Reynolds BA, Rietze RL (2005) Nat Methods 2: 333-336). Однако, также известно, что до сих пор эти методы обладают существенными недостатками, такими как повышенное число высокочувствительных этических вопросов и/или они требуют сложных и трудоемких технологий, которые страдают от серьезных проблем с воспроизводимостью. До сих пор не было описано способов, с помощью которых нейральные стволовые клетки могли быть напрямую получены из дифференцированных соматических клеток. В принципе, нейральные стволовые клетки можно получить из ипСК, полученных из дифференцированных клеток. Однако это подразумевает культивирование ипСК. Было показано, что ипСК растут бесконечно, но условия культивирования сложны и требуют гигантских усилий. В дополнение было отмечено, что образование нейральных стволовых клеток из плюрипотентных стволовых клеток колеблется из-за стохастических механизмов. Общим препятствием ипСК и ЭСК является тот факт, что даже минимальное число недифференцированных клеток может привести к формированию тератом (опухоли из зародышевых клеток, включающие несколько клеточных типов), которые являются внушающей опасения контаминацией, которую нельзя игнорировать. Следовательно, остается потребность в легко доступной и воспроизводимой технологии получения нейральных стволовых клеток. В настоящем изобретении предложен способ конвертации соматических клеток напрямую в нейральные стволовые клетки. Новый способ ослабляет необходимость получения ипСК и следовательно устраняет риск формирования тератом. Подобные клетки без способности формировать тератомы пригодны и безопасны для применения в регенеративной медицине. Предпочтительные соматические клетки - это соматические клетки млекопитающих, наиболее предпочтительны человеческие соматические клетки. Предпочтительные соматические клетки - это фибробласты, адипоциты или кератиноциты, наиболее предпочтительны фибробласты. Вышеупомянутые фибробласты, адипоциты или кератиноциты могут быть без труда и безопасно получены от пациента или здорового человека с помощью, например, неинвазивных методов, таких как биопсия кожи, или из выщипанных волос. Способ настоящего изобретения позволяет конвертировать соматические клетки, такие как фибробласты, адипоциты или кератиноциты от здоровых или больных людей напрямую в нейральные стволовые клетки. Такие нейральные стволовые клетки от здоровых людей, или пациент-специфичные, способны делиться бесконечно. Их культивирование удобно и хорошо охарактеризовано. Аликвоты нейральных стволовых клеток от здоровых людей и пациент-специфичных возможно воспроизводимо замораживать и оттаивать. В частности, нейральные стволовые клетки, полученные от пациента, представляют соответствующую заболеванию *in vitro* модель для изучения патофизиологии заболеваний ЦНС. Конверсия пациент-специфичных соматических клеток напрямую в нейральные стволовые клетки представляет легко доступную и воспроизводимую технологию создания БиоБанков пациент-специфичных нейральных стволовых клеток. Подобные БиоБанки имеют огромное значение для заболеваний ЦНС, патология которых была описана в клетках по меньшей мере трех типов, развивающихся из нейральных стволовых клеток: нейронов, олигодендроцитов и астроцитов. Таким образом, полученные с помощью описываемого способа нейральные стволовые клетки являются чрезвычайно ценной моделью заболеваний для поиска

эффективных и безопасных лекарственных препаратов.

Множество нейродегенеративных заболеваний характеризуются потерей нервных клеток. Регенеративная способность взрослого мозга в ответ на черепно-мозговые травмы и нейродегенеративные заболевания весьма ограничена. Более того, фармакологическое воздействие часто все в большей степени теряет эффективность из-за прогрессирующей гибели популяции чувствительных к нему нейронов. Полученные с помощью описываемого здесь способа нейральные стволовые клетки также могут быть использованы в регенеративной медицине для лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, хорея Хантингтона, боковой амиотрофический склероз (болезнь Лу Герига) и травм спинного мозга. С помощью описываемого новаторского способа теперь возможно производить достаточное количество нейральных клеток-предшественников для использования при лечении методами клеточной трансплантации. Нейральные стволовые клетки могут быть получены из соматических клеток, выделенных как из здорового человека, так и из пациента. Пациент-специфичные нейральные стволовые клетки, полученные с помощью описываемого способа, являются новым привлекательным донорским источником для лечения методами аутологичной клеточной трансплантации вследствие подавления любого иммунного отторжения, вызванного иммунологической несовместимостью между пациентом и донором. Данная стратегия способна устранить необходимость иммунной супрессии при лечении методами клеточной трансплантации. Более того, создание БиоБанков нейральных стволовых клеток, полученных от здоровых людей с различными гомозиготными HLA аллелями, может быть использовано как донорский банк для лечения пациентов, нуждающихся в помощи. Гетерологичная трансплантация нейральных стволовых клеток с совместимым HLA-типом снижает риск нежелательных иммунных ответов, которые могут привести к отторжению пересаженных клеток.

Для достижения описываемого крупного научного прорыва, было необходимо обойти некоторые существующие ограничения репрограммирования, а также объединить трансдукцию генов с использованием стадии индукции в специальной среде.

В настоящем изобретении предложен способ конверсии соматических клеток в нейральные стволовые клетки (НСК), вышеупомянутый способ включает в себя следующие стадии:

- а) получение соматических клеток
 - б) репрограммирование упомянутых соматических клеток в нейральные стволовые клетки с помощью введения по меньшей мере двух генов и
 - в) индукция репрограммирования с помощью факторов роста и малой молекулы;
- В дополнительном воплощении указанный способ дополнительно включает в себя
- г) инкубацию продуктов стадий б) и в) в условиях, подходящих для пролиферации нейральных стволовых клеток. Обычно, продукты стадий б) и в) могут быть легко идентифицированы в клеточной культуре как нейросферы. Предпочтительно вышеупомянутые условия пролиферации нейральных стволовых клеток включают сбор описываемых нейросфер и их рост в среде определенного химического состава. Предпочтительно, указанная среда является средой для роста, а нейросферы культивируются в неадгезивных условиях. Неограниченные примеры ростовых сред описываются ниже.

Используемый здесь термин «соматическая клетка» подразумевает любую клетку, которая формирует тело организма и не является клеткой зародышевой линии (такой как сперматозоид и яйцеклетка, и клетками из которых они происходят (гаметоциты))

и недифференцированной стволовой клеткой. Внутренние органы, кожа, кости, кровь и соединительная ткань, все состоит из соматических клеток. Предпочтительные соматические клетки, используемые в описываемом здесь способе, являются фибробластами, адипоцитами или кератиноцитами, и предпочтительно получены с помощью биопсии кожи.

Предпочтительно, чтобы соматические клетки, используемые для конверсии в нейральные стволовые клетки, происходили от млекопитающих, наиболее предпочтительно - от человека. Данные человеческие соматические клетки могут быть получены от здоровых людей или от пациентов. Упомянутые предпочтительные соматические клетки выбраны из группы фибробластов, адипоцитов или кератиноцитов. Данные донорские клетки могут быть легко получены от любого подходящего источника. В данном случае предпочтительным источником является такой, который позволяет изолировать донорские клетки без инвазивных процедур для человеческого тела. Методы изоляции фибробластов хорошо известны в уровне техники. Фибробласты могут быть получены из любого подходящего источника, например, из тканей различных органов или из тканей кожи. Предпочтительны фибробласты легких, фибробласты крайней плоти и фибробласты взрослой кожи. В одном из воплощений настоящего изобретения вышеупомянутые человеческие фибробласты получены от пациента, например, с помощью биопсии кожи (например, Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. George Q. Daley et al. Nature 2008; A method for the isolation and serial propagation of keratinocytes, endothelial cells, and fibroblasts from a single punch biopsy of human skin, Normand et al. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 1995). Адипоциты и кератиноциты также могут быть легко получены с помощью биопсии кожи или из выщипанных волос (Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells, Belmonte et al. Nature Protocols 2010) и также являются предпочтительными донорскими клетками для способа данного изобретения.

В одном из предпочтительных аспектов настоящее изобретение представляет собой способ создания пациент-специфичных нейральных стволовых клеток. Другим аспектом представленного изобретения является способ создания нейральных стволовых клеток из соматических клеток, полученных от здоровых людей.

Как используется в настоящем изобретении, «нейральные стволовые клетки» относятся к подклассу плюрипотентных клеток, которые экспрессируют некоторые нейральные маркеры, включая, например, нестин. Полученные с помощью представленного здесь способа нейральные стволовые клетки также относятся к «ирНСК»: индуцированные репрограммированные нейральные стволовые клетки. Нейральные стволовые клетки могут делиться бесконечно и могут дифференцироваться в нейроны или глиальные клетки (такие как астроциты и олигодендроциты). Термин «пациент-специфичная нейральная стволовая клетка» относится к нейральным стволовым клеткам, полученным из соматических клеток пациента, также как и к аутологичным нейральным стволовым клеткам. Используемый здесь термин «нейральные стволовые клетки от здорового человека» относится к нейральным стволовым клеткам, полученным из соматических клеток человека, который считается, что не страдает ни от каких болезней или расстройств.

Как здесь используется, термин «репрограммирование» относится к одному или более стадиям, необходимым для того, чтобы конвертировать соматическую клетку в менее дифференцированную клетку, например, чтобы конвертировать фибробласт, адипоцит или кератиноцит в нейральную стволовую клетку. Репrogramмирование

соматической клетки в нейральную стволовую клетку достигается введением по меньшей мере двух генов, вовлеченных в поддержание свойств нейральной стволовой клетки. Список генов, подходящих для репрограммирования соматических клеток в нейральные
5 стволовые клетки, включает Sox2 (Seq ID No. 1), Brn2 (Seq ID No. 2), Bmi1 (Seq ID No. 3), Mash1 (Seq ID No. 4), Sox11 (Seq ID No. 5), NCam (Seq ID No. 6), Kpna1 (Seq ID No. 7), Foxg1 (Seq ID No. 8), Emx2 (Seq ID No. 9) и Pax6 (Seq ID No. 10), но не ограничивается ими. В предпочтительном варианте вводятся по меньшей мере два гена в другом
10 предпочтительном варианте вводится три гена. Предпочтительная комбинация генов для введения в соматические клетки включает в себя Bmi1 и Sox2. В дальнейшем предпочтительный вариант такой комбинации по меньшей мере двух генов
дополнительно включает в себя Mash1. В другом варианте данная комбинация по меньшей мере двух генов дополнительно включает в себя один ген, выбранный из группы Mash1, Emx2, Foxg1, Pax6 и Sox11. В дополнительном варианте комбинация по
15 меньшей мере двух генов включает в себя Bmi1, и Sox2, и Mash1.

Используемый здесь термин «введение генов» относится к любому способу, который приводит к стабильной экспрессии указанного гена в соматической клетке. Указанные гены вводятся в соматическую клетку с помощью известных в уровне техники способов, таких как доставка в клетку через репрессирующие векторы, или через активацию
20 указанных генов с помощью малых молекул. Примерами репрессирующих векторов являются ретровирусы, лентивирусы, аденовирусы, плазмиды и транспозоны. В данном случае для доставки указанных генов преимущество отдается использованию лентивируса. Примерами малых молекул, подходящих для надежной активации
25 указанных генов, являются ингибиторы метилирования ДНК, ингибиторы деацетилирования гистонов, эрголины (например, этиламид лизергиновой кислоты), флавоны (например, 7'гидроксифлавоны), пауллоны (например, кенпауллон)
(Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4 PNAS 2009 106 (22) 8912-8917), антагонисты каналов L-типа
(например, VIX01294), BayK8644 и 5'азоцитидин (Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic Fibroblasts by Oct4 and Klf4 with Small-Molecule Compounds Yan Shi et al.
30 Cell Stem Cell - 6 November 2008 (Vol. 3, Issue 5, pp.568-574)). Для успешной индукции репрограммирования соматические клетки выращивались в соответствующей среде с добавлением факторов роста и малых молекул. Используемый здесь термин «фактор
роста» подразумевает биологически активный полипептид, который вызывает клеточную пролиферацию, и включает как сами факторы роста, так и их аналоги. Они
35 включают, без ограничений, эпидермальный ростовой фактор, трансформирующий ростовой фактор, фактор роста нервов, кислый и основной факторы роста фибробластов и фактор ангиогенеза, фактор роста тромбоцитов, инсулин и инсулиноподобный
ростовой фактор, включая соматомедины, миксома и оспавакциновый ростовые факторы из вирусов. Предпочтительно использовались ростовые факторы BDNF
40 (мозговой нейротрофический фактор), FGF2 (фактор роста фибробластов 2) и EGF (эпидермальный ростовой фактор). Факторы роста можно использовать поодиночке или в попарной комбинации, но наиболее предпочтительно использовать все три фактора вместе. Кроме того, фибробласты культивировались в присутствии по меньшей мере одной малой молекулы. Используемый здесь термин «малая молекула», или «малое
45 соединение» подразумевает органические или неорганические молекулы, как искусственно синтезированные, так и природные, как правило имеющие молекулярный вес менее чем 10000 г/моль, желателно менее 5000 г/моль, и желателно менее 2000 г/моль. В одном предпочтительном варианте данная малая молекула включает в себя

ингибитор Rho-ассоциированной суперспирализованной серин/треонин киназы (ROCK) семейства протеинкиназ. Неограничивающие примеры ингибиторов ROCK включают в себя фасудил (1-(5-изокинолинсульфонил)гомопиперазин), тиазовивин (N-бензил-2-(пиримидин-4-иламино)тиазол-4-карбоксамид), Y27632 ((+)-(R)-транс-4-(1-аминоэтил)-N-(4-пиридил)циклогексанкарбоксамид дигидрохлорид) и баланолоподобное-324 соединение (N-((3R,4R)-4-[4-(2-фтор-6-гидрокси-3-метокси-бензоил)-бензоиламино]-азепан-3-ил)-4-гидрокси-3,5-диметилбензамид). В другом варианте осуществления малая молекула выбрана среди ингибиторов одной или более киназ: АМПК (АМФ-активируемая протеинкиназа, бета 1 некаталитическая субъединица; официальное обозначение: PRKAB1), СНК2 (СНК2 чекпойнт гомолог (*S.pombe*), официальное обозначение СНЕК2), MSK1 (рибосомальный белок S6 киназа, 90 кДа, полипептид 5; официальное обозначение PRKACA), PKGα (протеинкиназа, цГМФ-зависимая, типа I; официальное обозначение PRKG1) и SGK1 (сывороточная и регулируемая глюкокортикоидами киназа 1, официальный символ: SGK1).

Используемый термин «среда, подходящая для индукции репрограммирования», он же «среда для индукции» обозначает любую среду определенного химического состава, пригодную для индукции репрограммирования соматических клеток. Предпочтительна бессывороточная среда с добавлением инсулина, трансферрина и прогестерона. Предпочтительная используемая здесь среда содержит 10-50 мкг/мл инсулина, 10-100 мкг/мл трансферрина и 10-50 нМ прогестерона. Примерами бессывороточной среды, подходящей для индукции репрограммирования, являются среда N2B27 (N2B27 является смесью 1:1 сред DMEM/F12 (Gibco, Пейсли, Великобритания) с добавлением N2 и B27 (обе от Gibco)), среда N3 (состоит из DMEM/F12 (Gibco, Пейсли, Великобритания), 25 мкг/мл трансферрина, 30 нМ селенита натрия, 20 нМ прогестерона (Sigma), 100 нМ путресцина (Sigma), или среда для пролиферации NeuroCult® NS-A Proliferation medium (Stemcell Technologies). Наиболее предпочтительно применение описанной выше бессывороточной среды с дополнительным добавлением FGF2, EGF, BDNF и ингибиторов ROCK. Предпочтительно, чтобы данные ингибиторы ROCK включали в себя фасудил или баланолоподобное-324 соединение. В предпочтительном варианте среда дополнялась 10-50 нг/мл FGF2, 10-50 нг/мл EGF, 1-20 нг/мл BDNF и 1-50 мкМ фусидила или 1-10 мкМ баланолоподобного-324 соединения. После введения по меньшей мере двух генов соматические клетки, предназначенные для репрограммирования, предпочтительно выращиваются на вышеупомянутой среде для индукции в течение по меньшей мере 1 дня, предпочтительно от 1 до 7 дней, наиболее предпочтительно в течение от 2 до 3 дней.

В одном варианте осуществления соматические клетки на стадии а) предварительно обработаны ингибитором деацетилазы гистонов (HDAC). Как используется здесь «предварительная обработка», или «обработка перед воздействием» подразумевает инкубацию соматических клеток в подходящей среде с добавками вышеуказанных ингибиторов HDAC в течение от 4 до 60 часов, предпочтительно 48 часов. Пригодные для данной процедуры ингибиторы HDAC выбраны из группы, содержащей бутират натрия (натриевая соль масляной кислоты), трихостатин А (TSA, 7-[4-(диметиламино)фенил]-N-гидрокси-4,6-диметил-7-оксогепта-2,4-диенамид) и вальпроевую кислоту (2-пропил-пентановая кислота). В одном варианте осуществления соматические клетки на стадии а) предварительно обработаны вальпроевой кислотой. Во втором варианте осуществления соматические клетки на стадии а) предварительно обработаны вальпроевой кислотой в течение 48 часов.

Для стимуляции пролиферации нейральных стволовых клеток в виде культивируемых

нейросфер, индуцированные нейральные стволовые клетки выращивались в ростовой среде, включающей в себя бессывороточную среду с добавлением инсулина, трансферрина, прогестерона и ростовых факторов, как описано выше. Предпочтительно, указанные ростовые факторы включают в себя FGF2, BDNF и EGF. В другом варианте осуществления вышеуказанная ростовая среда дополнительно включает в себя одну или более добавок, выбранных из группы гепарина, аскорбиновой кислоты, SHH (рекомбинантный человеческий сигнальный белок Sonic Hedgehog), FGF8 (Рекомбинантный человеческий FGF8a изоформа), DLL4 (рекомбинантный человеческий DLL4), Jagged1 (рекомбинантный человеческий Jagged1 Fc химера), фасудил и баланолоподобное-324 соединение.

В другом варианте осуществления изобретения, на следующей стадии стимулировали дифференцировку полученных описанным здесь способом нейральных стволовых клеток посредством удаления по меньшей мере одного из ростовых факторов из репрограммирующей среды. Предпочтительно факторы роста для изъятия включали в себя EGF и FGF.

В другом предпочтительном осуществлении данного изобретения, для облегчения оценки и количественного определения успешно репрограммированных нейральных стволовых клеток был использован маркерный ген. Например, в целевые соматические клетки методом лентивирусной трансдукции вводился ген, кодирующий флуоресцентный маркерный белок. Примерами флуоресцентных маркерных белков являются GFP, YFP, EGFP или DsRed. Предпочтительно вышеупомянутый маркерный ген для удобства использования сцеплен с промотором нестина.

Нестин характерно экспрессируется в нейральных стволовых клетках, таким образом, маркерный ген под контролем промотора нестина позволяет быстро оценить и идентифицировать индуцированные репрограммированные нейральные стволовые клетки. Впоследствии, проводят скрининг таких клеток для идентификации клеток демонстрирующих желаемый фенотип, то есть нейросферы. Нейросферы больше, чем 20 мкм, предпочтительно больше чем 50 мкм, были выбраны и собраны для дальнейшего выращивания.

В другом аспекте данного изобретения, предложена популяция нейральных стволовых клеток, произведенная любым из вышеперечисленных способов. Предпочтительно, чтобы популяция нейральных стволовых клеток была пациент-специфичной, то есть происходила из соматических клеток, полученных от больного человека. В другом варианте осуществления указанная популяция стволовых клеток получена от здорового человека. Нейральные стволовые клетки могут расти бесконечно. Культивирование является легким и хорошо охарактеризовано. Аликвоты нейральных стволовых клеток возможно воспроизводимо замораживать и оттаивать.

Полученные от пациента нейральные стволовые клетки представляют *in vitro* модель соответствующего заболевания для изучения патофизиологии болезней ЦНС. Конверсия пациент-специфичных соматических клеток напрямую в нейральные стволовые клетки представляет легко доступную и воспроизводимую технологию для формирования БиоБанков пациент-специфичных нейральных стволовых клеток. Следовательно, дополнительным предпочтительным аспектом изобретения предусматривается БиоБанк, охватывающий пациент-специфичные нейральные стволовые клетки. В другом варианте осуществления, создается БиоБанк, включающий различные популяции нейральных стволовых клеток, полученных от здоровых людей.

Используемый здесь термин «БиоБанк» подразумевает библиотеку биологических образцов, полученных от различных людей или видов. Архивная коллекция образцов

с сопроводительными данными предназначена для исследовательских задач с целью изучения неврологических заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хорея Хантингтона, боковой амиотрофический склероз (ALS/болезнь Лу Герига) и травм спинного мозга, или для лечения вышеуказанных неврологических заболеваний.

Еще одним аспектом изобретения является применение нейральных стволовых клеток, полученных с помощью данного способа. В предпочтительном воплощении, нейральные стволовые клетки, полученные с помощью данного способа, применяются в качестве модели для изучения *in vitro* патофизиологии заболеваний ЦНС. Например, полученные с помощью способа данного изобретения нейральные стволовые клетки могут быть использованы для скрининга соединений, которые вызывают обратное развитие, ингибируют или предотвращают неврологические заболевания.

Дополнительно, они могут применяться для скрининга соединений, которые вызывают обратное развитие, ингибируют или предотвращают нейральные побочные эффекты медикаментов, например, лекарств от диабета. Предпочтительно, чтобы полученные с помощью вышеописанного способа изобретения нейральные стволовые клетки происходили от больного человека.

В другом аспекте изобретения предложена терапевтическая композиция, содержащая произведенные любым из вышеупомянутых способов клетки, или содержащая любые из вышеупомянутых клеточных популяций. Предпочтительно, терапевтическая композиция дополнительно включает физиологически совместимый раствор, включая, например, искусственную спинномозговую жидкость или фосфатно-солевой буфер.

Данная терапевтическая композиция может быть использована для лечения, предотвращения, или стабилизации неврологических заболеваний, таких как, например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хорея Хантингтона, или ALS, болезнь лизосомального накопления, рассеянный склероз, или травмы спинного мозга.

Например, фибробласты, кератиноциты или адипоциты могут быть получены с помощью биопсии кожи от человека, нуждающегося в лечении, или от здорового человека, и репрограммированы в нейральные стволовые клетки с помощью способа данного изобретения. В одном варианте изобретения нейральные стволовые клетки собираются и вводятся человеку для лечения заболевания. В другом варианте вышеуказанные нейральные стволовые клетки до введения человеку культивируются в условиях, подходящих для дифференцировки в нейроны, олигодендроциты или астроциты, и могут быть использованы для замены или для помощи в функционировании больной или поврежденной ткани. Большим преимуществом данного изобретения является то, что оно обеспечивает практически неограниченный источник пациент-специфичных человеческих нейральных стволовых клеток или совместимых нейральных стволовых клеток от здоровых людей с одинаковым HLA-типом, пригодным для трансплантации. Использование аутологичных и/или совместимых клеток в клеточной терапии является основным преимуществом по сравнению с использованием неаутологичных клеток, которые являются вероятной причиной иммунологического отторжения. В противоположность, маловероятно, что аутологичные клетки повлекут существенные иммунологические ответы.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является применение биобанков нейральных стволовых клеток для лечения неврологических заболеваний. Биобанки предпочтительно включают нейральные стволовые клетки, полученные от пациентов, или от здоровых людей с несколькими HLA-типами. Трансплантация нуждающемуся в лечении человеку полученных от здорового донора клеток с совместимым HLA-типом

позволяет избежать значительных проблем реакций отторжения, обычно связанных с гетерологичными клеточными трансплантатами

Традиционно, отторжение предотвращается или снижается назначением иммуносуппрессантов или препаратов против отторжения, таких как циклоспорин.

Однако, подобные препараты обладают существенными неблагоприятными побочными эффектами, такими как угнетение иммунитета, канцерогенные свойства, почечная токсичность, а также являются очень дорогими. Настоящее изобретение должно устранить, или по меньшей мере, сильно снизить необходимость в препаратах против отторжения, таких как циклоспорин, имулан, FK-506, глюкокортикоиды, и рапамицин, и их производных.

В отношении способов лечения изобретения, предполагается, что применение нейральных стволовых клеток на млекопитающих не ограничено определенным способом введения, дозой, частотой дозирования; настоящее изобретение предусматривает все способы введения, включая внутримышечный, внутривенный, внутрисуставной, в место повреждения, подкожный, или любой другой способ доставки, подходящий для предоставления дозы, достаточной для предотвращения или лечения заболевания. Нейральные стволовые клетки могут быть введены млекопитающим за один прием, или многократными дозами. Когда применяется многократная дозировка, дозы могут быть отделены одна от другой периодом, например, одна неделя, один месяц, один год, или десять лет. Один или более ростовых факторов, гормонов, интерлейкинов, цитокинов, малых молекул или других клеток также могут вводиться до, во время, или после введения клеток для дополнительного направления их к определенному клеточному типу.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1: Схематическое изображение способа конвертации человеческих фибробластов в ирНСК. День 0: человеческие фибробласты были трипсинизированы и трансфицированы в небольшом объеме комбинацией генов и нестинным GFP репортером с использованием среды для индукции (N2B27 с FGF, EGF 30 нг/мл; BDNF 20 нг/мл; фасудил 10 мкМ, полибрен 4 мкг/мл). Фибробласты были посеяны в нормальной плашке для культивирования в концентрации 10000-30000 клеток/см². День 1: Среда заменена свежей средой для индукции. GFP/нестин позитивные (GFP+) ирНСК начали появляться с очень низкой частотой (~50 ирНСК GFP+ из 100000). День 2: GFP+ ирНСК увеличились в числе и начали двигаться друг к другу, формируя клеточные кластеры. День 3: Клеточные кластеры организовались в четкие сферические структуры, которые оторвались и начали плавать как GFP+ нейросферы. Нейросферы больше, чем 20 мкм были посчитаны и собраны для дальнейшего выращивания.

Фиг. 2: Схематическое изображение репортерного лентивируса с человеческим нестином и GFP. Флуоресцентный белок сорGFP и селектирующий маркер зеоцин были клонированы под контролем экспрессии фрагмента энхансера в 1,8 тыс. оснований из интрона 2 человеческого нестина, соединенного с минимальным CMV промотером.

Фигура 3: ирНСК в день 1 способа индукции репрограммирования. Верхняя панель: человеческие нетрансформированные фибробласты зародышевого легкого IMR90 (фазовый контраст). Нижняя панель: генерация ирНСК GFP+ клеток (фазовый контраст и GFP канал).

Фигура 4: ирНСК в день 2 способа индукции репрограммирования. Клетки проявляют тенденцию к миграции друг к другу и начинают формировать сферическую структуру с ядром из ирНСК GFP+ (фазовый контраст и GFP канал).

Фигура 5: ирНСК в день 3 способа индукции репрограммирования. Сфероидные

структуры, сформировавшиеся на день 2 теперь полностью созрели и представляют собой нейросферы, плавающие в среде. Нейросферы имеют размер в диапазоне 20-100 мкм с высокой плотностью клеток. ИрНСК помечены экспрессией нестина GFP и могут быть обнаружены практически во всех нейросферах, хотя не все нейросферы имеют

5 одинаковую пропорцию ирНСК GFP+ (фазовый контраст и GFP канал).

Фигура 6: Число нейросфер, образовавшихся при различных комбинациях генов.

Фигура 7: Прикрепленные нейросферы после трансдукции Sox2-Vmi1. Прикрепленные нейросферы демонстрируют типичную морфологию удлинённых биполярных клеток. Нижняя панель: ирНСК GFP+ нейросферы под сильным увеличением.

10 Фигура 8: Дифференцированные клетки через 1 неделю после удаления EGF и FGF. ИрНСК из-за удаления пролиферативных ростовых факторов вырастают в клетки с очень тонкими отростками, позитивно окрашенными нейральным маркером tuji1.

Фигура 9: Получение партии нейросфер ирНСК для дальнейшего выращивания и характеристики. 3,6 миллиона человеческих фибробластов IMR90 были

15 трипсинизированы и инфицированы в небольшом объеме репортером с Sox2, Vmi1, нестином GFP с использованием среды для индукции (N2B27 с FGF, EGF 30 нг/мл BDNF 20 нг/мл) с добавлением фасудила 10 мкМ и полибрена 4 мкг/мл. От дня 4 до дня 8: GFP+ нейросферы, большие, чем 50 мкм, были собраны и в дальнейшем использованы для выращивания. Половина нейросфер была выращена с использованием среды для

20 роста (N2B27 с FGF, EGF 30 нг/мл BDNF 20 нг/мл) с фасудилом, а другая половина без фасудила. День 15: Нейросферы, выращенные на среде для роста с фасудилом, обладают лучшей морфологией и чистыми и четкими границами (отличительный признак хорошо сформированных нейросфер, панель В); без фасудила нейросферы имеют неясные границы (панель А).

25 Фигура 10: Иммуноцитохимическая характеристика ирНСК нейросфер для экспрессии маркеров НСК Sox2 и нестина. На день 15 ирНСК нейросферы, выращенные с фасудилом, были посеяны на плашки, покрытые PO/Lam, и через 48 часов покрашены на экспрессию Sox2 и нестина. Прикрепленные ирНСК нейросферы и ирНСК, распространяющиеся из сфер. ирНСК имели типичную морфологию НСК и были Sox2

30 и нестин позитивны. Панель А: Объединенные и отдельные каналы DAPI, Sox2, нестин; увеличение 20x; Панель В: Объединенные каналы DAPI, Sox2, нестин; увеличение 10x.

Фигура 11: Сравнение стимуляции производства ирНСК нейросфер с помощью фасудила и баланоолоподобного-324 соединения. Человеческие фибробласты IMR90 были трипсинизированы и инфицированы в небольшом объеме репортером с Sox2,

35 Vmi1, нестином GFP, с использованием среды для индукции (NeuroCult® NS-A Proliferation Kit (Human, StemCells Technologies) с FGF, EGF BDNF 20 нг/мл; гепарином 2 мкг/мл; полибренном 4 мкг/мл) с добавлением фасудила 10 мкМ (заштрихованный столбец), или баланоолоподобного-324 соединения 2 мкМ (черный столбец). Фибробласты были посеяны на нормальной плашке для культур тканей в концентрации 10000-30000 клеток/

40 см². День 1: Среда заменена свежей средой для индукции. День 4: Нейросферы GFP+ большие, чем 50 мкм были подсчитаны. Баланоолоподобное-324 малое соединение увеличивает эффективность генерации нейросфер приблизительно вдвое (1,9) и обладает большей воспроизводимостью (STDEV, n=3).

45 Фигура 12: Предобработка человеческих фибробластов вальпроевой кислотой (VPA) увеличивает выход GFP+ ирНСК нейросфер. Человеческие фибробласты IMR90 были предварительно обработаны в течение 48 часов с или без ингибитором HDAC вальпроевой кислотой (мононатриевая соль 2-пропил-пентановой кислоты) (1 мМ) перед инфекцией репортером с Sox2, Vmi1, нестином GFP. Среда для индукции

(NeuroCult® NS-A Proliferation Kit (Human, StemCells Technologies) с FGF, EGF BDNF 20 нг/мл; гепарином 2 мкг/мл; баланоолоподобным-324 соединением 2 мкМ). День 7: Нейросферы большие, чем 50 мкм, подсчитали (Панель А) и представили среднее количество клеток GFP+ ирНСК на нейросферу (Панель В). Типичные изображения произведенных с предобработкой VPA ирНСК нейросфер (Панель С). Предобработка VPA существенно не влияет на число нейросфер ко дню 7; хотя обработка VPA увеличивает (в 2,1 раза) число GFP+ ирНСК (STDEV, n=3).

Фигура 13: Определение минимального набора генов в комбинации с Sox2 и Bmi1 для эффективной индукции ирНСК нейросфер. Человеческие фибробласты IMR90 были предварительно обработаны VPA (1 мМ) в течение 48 часов перед инфекцией репортером с Sox2, Bmi1, нестином GFP, плюс различные гены-кандидаты для усиления их синергитического действия. Среда для индукции: NeuroCult® NS-A Proliferation Kit (Human, StemCells Technologies) с FGF, EGF BDNF 20 нг/мл; гепарином 2 мкг/мл и баланоолоподобным-324 соединением 2 мкМ. Определение количества ирНСК нейросфер, больших чем 50 мкм, на день 7. Mash1, Emx2, Foxg1, Pax6 и Sox11 действуют синергично с Bmi1 и Sox2 на генерацию ирНСК нейросфер.

Фигура 14: Формирование ирНСК нейросфер из взрослых человеческих фибробластов кожи (HDFa). Взрослые человеческие кожные фибробласты предоставлены GIBCO (Кат. номер: C-013-5C). Взрослые человеческие фибробласты кожи были трипсинизированы и инфицированы в небольшом объеме репортером с Sox2, Bmi1, нестином GFP, с использованием среды для индукции (NeuroCult® NS-A Proliferation Kit (Human, StemCells Technologies) с FGF, EGF BDNF 20 нг/мл; гепарином 2 мкг/мл) с добавлением фасудила 10 мкМ. День 8: Обнаружены ирНСК нейросферы (типичные изображения при 2,5 и 10х увеличении).

Фигура 15: Выращивание ирНСК нейросфер с использованием аскорбиновой кислоты, сигнального белка Sonic Hedgehog (Shh), Jagged1, DLL4 и FGF8 для получения монослойной культуры ирНСК GFP+. Человеческие фибробласты IMR90 инфицировали репортером с Sox2, Bmi1, нестином GFP с использованием среды для индукции (NeuroCult® NS-A Proliferation Kit (Human, StemCells Technologies) с FGF, EGF BDNF 20 нг/мл; гепарином 2 мкг/мл; баланоолоподобным-324 соединением 2 мкМ). День 7: Нейросферы больше, чем 50 мкм, собрали и далее выращивали на среде для роста (NeuroCult® NS-A Proliferation Kit (Human, StemCells Technologies) с FGF, EGF BDNF 20 нг/мл; гепарином 2 мкг/мл; баланоолоподобным-324 соединением 2 мкМ; аскорбиновой кислотой 0,2 мМ, SHH (рекомбинантный человеческий сигнальный белок Sonic Hedgehog, каталожный номер: 1845SH) 500 нг/мл, FGF8 (рекомбинантный человеческий FGF8a изоформа, каталожный номер: 4745F8) 100 нг/мл, DLL4 (рекомбинантный человеческий DLL4, каталожный номер: 1506D4) 500 нг/мл, Jagged1 (рекомбинантный человеческий Jagged1 Fc химера, каталожный номер: 1277JG) 500 нг/мл, 1/10 кондиционированной среды от НСК, происходящих от чЭСК, культивированных в течение двух дней на NeuroCult® NS-A Proliferation Kit (Human, StemCells Technologies) с FGF, EGF BDNF 20 нг/мл; гепарином 2 мкг/мл. Типичное изображение ирНСК нейросфер на день 14, выращенных на среде для роста, как описано выше (Панель А). Нейросферы имеют определенные границы, и возможно наблюдать выпячивание отростков из нейросфер (Панель В, увеличено). На день 21 выращенные ирНСК нейросферы были диссоциированы и посеяны на плашки с покрытием PO/Lam для получения гомогенной монослойной культуры ирНСК GFP+ (Панель С, фазовый контраст и GFP канал ирНСК монослоя после 4 дней культивирования в монослое).

Фигура 16: Иммуноцитохимическая характеристика ирНСК нейросфер в отношении

экспрессии маркера НСК нестина и раннего нейрального маркера Tuj1. На день 21 ирНСК нейросферы, полученные как описано на Рисунке 15, были диссоциированы и посеяны в условиях для самоподдержания НСК (NeuroCult® NS-A Proliferation Kit (Человеческий, StemCells Technologies) с FGF, EGF BDNF 20 нг/мл; гепарин 2 мкг/мл) для оценки экспрессии маркера нестина (Панель А после 48 часов, все клетки являются нестин+ и Tuj1-), или посеяны в условиях для дифференцировки (NeuroCult® NS-A differentiation Kit (Человеческий, StemCells Technologies) с BDNF 20 нг/мл) и покрашены на Tuj1 и нестин на день 7 (Панель В, все клетки являются Tuj1+, и некоторые клетки нестин+).

Примеры

Способ может быть иллюстрирован имеющейся здесь ссылкой на Фигуру 1, которая изображает способ согласно настоящему изобретению, используемый для превращения человеческих фибробластов в нейральные стволовые клетки (НСК). В этом способе человеческие фибробласты на день 0 были трипсинизированы, подсчитаны, и была определена их жизнеспособность. Затем 1.0×10^5 - 3.0×10^5 трипсинизированных фибробластов было ресуспендировано в среде для индукции, и в виде лентивирусов была доставлена комбинация генов. Для увеличения эффективности лентивирусной трансдукции в среду для индукции был добавлен полибрен (гексадиметрин бромид). Инфицирование проводили за 15 минут в пробирках эппендорфах. В комбинации с генами был использован человеческий репортер нестин GFP. Нестин является хорошо известным маркером, специфично экспрессирующимся в НСК. В нестин репортере экспрессия флуоресцентного белка GFP находится под контролем промотера нестина человека (Фигура 2), с помощью него, таким образом, можно легко отследить индуцированные репрограммированные нейральные стволовые клетки (ирНСК) GFP+.

Инфицированные клетки были посеяны в плашки для культур тканей в концентрации 10000-30000 клеток/см² в соответствующем объеме среды для индукции. На день 1 вся среда для индукции была заменена. Было возможно идентифицировать некоторые ирНСК GFP+ (Фигура 3) по четкой смене морфологии по сравнению с человеческими фибробластами. ИрНСК GFP+ приобретали биполярную удлиненную морфологию с более конденсированной цитоплазмой, типичной для НСК. Более того, ирНСК растут в насыщенной монослойной культуре, напоминая типичные взаимодействия клетка-к-клетке, приобретаемые традиционными культурами НСК для активации пролиферативного сигнала пути Notch. На день 2 ирНСК GFP+ были в более зрелом состоянии и начали формировать достаточно плотные кластеры клеток. Такие кластеры ирНСК начали формировать сфероидные структуры с плотным ядром, содержащим ирНСК GFP+ (Фигура 4). На день 3 сфероидные структуры были полностью сформированы и начали отрываться от культуральной плашки, плавая в среде как нейросферы. Нейросферы обладают размерами примерно 20-100 мкм с четкими границами и ядром с высокой плотностью клеток, которые возможно отождествлять с ирНСК GFP+ (Фигура 5).

Чтобы достигнуть изобретательского прорыва, было необходимо использовать специфическую комбинацию генов. Следующий список генов, вовлеченных в поддержание характеристик НСК *in vivo* и *in vitro*, был получен из литературных данных: Sox2 (Sox транскрипционный фактор и важный маркер НСК), Brn2 (POU домен белка известен, что связывается с белком Sox. Репортер, связывающий Sox2 и Brn2 с промотером нестина. Мыши, нокаутные по Brn2, обладают нарушением развития ЦНС), Vmi1 (Белок вовлечен в регуляцию клеточного цикла, вероятно, усиливает экспрессию p21 и p27 - ингибиторов комплекса циклинE/cdk2. Ингибирование циклинE/

cdk2 устанавливает потерю белком ретинобластомы контроля над клеточным циклом, что влечет быстрый клеточный цикл во время состояния самовоспроизводства НСК), Mash1 (предполагаемый важный регулятор пролиферации нейральных предшественников *in vivo*), Sox11 (описано, что белок Sox экспрессируется в субгранулярной зоне SGZ *in vivo*), NCam (НСК маркер для проточной цитометрии и экспрессирующийся в различных районах ЦНС), Kpna1 (более известный как импортин альфа5, ответственный вместе с импортин бета за ядерный транспорт белков в тканях - производных эктодермы).

Все гены были клонированы как кДНК в лентивирусных плазидах, и впоследствии упакованы в лентивирусы. Упакованные лентивирусные частицы с Sox2, Bmi1, Mash1, Sox11, NCam, Kpna1, нестин GFP репортером были трансдуцированы напрямую в человеческие фибробласты. В описанном выше способе были протестированы различные комбинации генов. На день 3 было возможно оценить успешность продукции ирНСК с помощью подсчета образовавшихся нейросфер. Подсчету подлежали только нейросферы, большие чем 50 мкм.

Как представлено на Фигуре 6, трансдукция лентивируса с нестин репортером без добавления в среду для индукции фасудила не репрограммировала человеческие фибробласты в ирНСК. С добавлением фасудила в среду для индукции отмечалось образование нейросфер (около 50 мкм), и более мелких (около 20 мкм, не подсчитывались).

Нейросферы, образованные с помощью нашего инновационного способа с использованием комбинации генов Sox2-Bmi1 собирались на день 3 и дальше выращивались 14 дней. Выращивание ирНСК нейросфер было критической стадией. Нейросферы культивировались с использованием среды N2B27 с добавлением FGF, EGF, BDNF в специальных ультратонких неадгезивных плашках (Corning). Для получения гомогенной популяции ирНСК GFP+ нейросфер каждые 2-3 дня проводилась процедура очистки. В течение 14 дней выращивания некоторые нейросферы с низкой плотностью ирНСК GFP+ были не способны пролиферировать надлежащим образом, в основном, вероятно, вследствие контаминации неконвертированными фибробластами. Подобные контаминированные нейросферы разваливались на отдельные клетки, которые было необходимо удалять. На день 14 нейросферы проверялись на: прикрепление к плашкам, покрытым полиорнитин/ламинином и генерацию нейроно-подобных клеток. Для прикрепления, 20-40 нейросфер/см² были посеяны на покрытые полиорнитин/ламинином плашки в среде для роста с добавлением фасудила 10 мкМ для усиления клеточной адгезии и распластания. На день 1 культивирования можно было увидеть прикрепление и распластывание нейросфер (Фигура 7). В центре распластывающейся нейросферы мы идентифицировали ирНСК GFP+ с типичной морфологией НСК. Нейросферы выращивались дополнительно три дня, и тогда только BDNF был добавлен к N2B27 (условия для дифференцировки в нервную ткань). Из-за избытка EGF и FGF ирНСК меняли морфологию. Они становились более вытянутыми и начинали формировать аксоноподобные клеточные отростки. На день 7 в условиях дифференцировки клетки были зафиксированы и окрашены на нейрональный маркер tuJ1 (Фигура 8).

Нейросферы, выращенные с фасудилом, обладают лучшей морфологией и чистыми и четкими границами (отличительный признак правильно сформированной нейросферы, Фигура 9, панель В); без фасудила нейросферы имеют неясные границы (Фигура 9, панель А). ИрНСК обладают типичной морфологией НСК и были Sox2 и нестин позитивны (Фигура 10).

Фигура 11 демонстрирует, что ингибитор Rock киназы баланолоподобное-324

соединение увеличивает выход GFP+ нейросфер.

Данные свидетельства демонстрируют, что с помощью способа по настоящему изобретению возможно конвертировать человеческие фибробласты в ирНСК, основываясь на связанных стадиях трансдукции генов (лучшие комбинации: Sox2-Bmi1, Sox2-Bmi1-Mash1, Sox2-Bmi1-Sox11, Sox2-Bmi1-Emx2, Sox2-Bmi1-Foxg1 и Sox2-Bmi1-Rax6, также см. Фигуру 13) и индукции средой определенного химического состава.

Чтобы увеличить выход ирНСК, человеческие фибробласты были предварительно обработаны с или без ингибитора HDAC вальпроевой кислоты (VPA, моносодиевая соль 2-пропил-пентановой кислоты). С этой целью человеческие фибробласты инкубировались в DMEM/F12 с добавлением FBS 10% и L-глутамина с добавлением 1 мМ VPA перед инфицированием (Фигура 12).

Фигура 14 демонстрирует генерацию ирНСК нейросфер из взрослых человеческих фибробластов кожи (HDFa).

Фигура 15 демонстрирует выращивание ирНСК нейросфер с использованием комбинации аскорбиновой кислоты, сигнального белка Sonic Hedgehog (Shh), Jagged1, DLL4 и FGF8. Фигура 16 демонстрирует иммуноцитохимическую характеристику ирНСК нейросфер в отношении экспрессии маркера НСК нестина и раннего нейрального маркера TuJ1.

Материалы и методы

Культуры клеток:

Среда для индукции: N2B27 (N2B27 является смесью 1:1 DMEM/F12 (Gibco, Paisley, Великобритания) с добавлением N2 и B27 (обе от Gibco) с добавлением человеческого EGF (Peprotech) 30 нг/мл, человеческого FGF2 30 нг/мл (Peprotech), человеческого BDNF (Roche) 20 нг/мл и фасудила (Calbiochem) 10 мкМ или баланоолоподобного-324 соединения (N-((3R,4R)-4-[4-(2-фтор-6-гидрокси-3-метокси-бензоил)-бензоиламино]-азепан-3-ил)-4-гидрокси-3,5-диметилбензамид) 2 мкМ.

Среда для роста: N2B27 с добавлением человеческого EGF (Peprotech) 30 нг/мл, человеческого FGF2 30 нг/мл (Peprotech), человеческого BDNF (Roche) 20 нг/мл, или NeuroCult® NS-A Proliferation Kit (Человеческий, StemCells Technologies) с FGF, EGF BDNF 20 нг/мл; гепарином 2 мкг/мл; баланоолоподобное-324 2 мкМ; аскорбиновой кислотой 0.2 мМ, SHH (Рекомбинантный человеческий Sonic Hedgehog, Каталожный номер: 1845SH) 500 нг/мл, FGF8 (Рекомбинантный человеческий FGF8a изоформа, Каталожный номер: 4745F8) 100 нг/мл, DLL4 (Рекомбинантный человеческий DLL4, Каталожный номер: 1506D4) 500 нг/мл, Jagged1 (Рекомбинантный человеческий Jagged1 Fc химера, Каталожный номер: 1277JG) 500 нг/мл.

Среда для дифференциации: N2B27 с добавлением человеческого BDNF (Roche) 20 нг/мл, ламинина 2 мкг/мл (Invitrogen).

Человеческие фибробласты: IMR90 зародышевые фибробласты легкого (ATCC номер партии 580229699) или взрослые фибробласты кожи (GIBCO, каталожный номер: C-013-5C).

Лентивирусы: предварительно упакованные, готовые к использованию частицы вирусов были получены от Sigma (Stemgent репрограммирующий человеческий лентивирус Sox2, каталожный No. ST070012), Genescopeia (человеческий Bmi1 Lentifect лентивирусные частицы, каталожный Nr. LP-B0015-Lv105; Sox11 Lentifect лентивирусные частицы, каталожный Nr. LP-MO425-LV105; Mash1 Lentifect лентивирусные частицы, каталожный Nr. LP-Z0740-LV105; человеческий Kpna1 Lentifect лентивирусные частицы, каталожный Nr. LP-U1286-Lv105; NCam1 Lentifect лентивирусные частицы, каталожный Nr. LP-Z2645-Lv105) и SBI Systems Biosciences (нестин GFP репортер: pGreenZeo™-hNestin

транскрипционный репортерный вирус, SR10035VA-1)

Титры NestinGFP $1.45 \cdot 10^5$ /мкл, BMI1 $4.3 \cdot 10^5$ /мкл, Sox2 $1.07 \cdot 10^4$ /мкл, Sox11 $3.2 \cdot 10^6$ /мкл, Mash1 $4.7 \cdot 10^6$ /мкл, NCam $3.3 \cdot 10^4$ /мкл, Kpna1 $1.8 \cdot 10^5$ /мкл.

5 Протоколы:

1. Генерация ирНСК:

10 - 200.000 человеческих фибробластов IMR90 инфицировали лентивирусами с различными комбинациями генов (мультиплектность инфицирования (М.И.), использованная для каждого отдельного лентивируса 30) и репортерного нестин GFP лентивируса (использована М.И. 10) в эппендорфе с 300 мкл среды для индукции с полибреном (гексадиметрин бромид, Sigma) 4 мкг/мл.

15 - Инкубировать при комнатной температуре 15 мин.

10 - Рассеять 300 мкл в 1,7 мл среды для индукции в лунке 6-луночной плашки для культивирования с модифицированной поверхностью

15 - День 1, заменить 2 мл среды для индукции/каждая лунка

15 - День 3, собрать нейросферы, тщательно отбирая 2 мл с плавающими сферами

15 - Вырастить нейросферы

2. Выращивание нейросфер:

20 - Собрать среду с плавающими нейросферами из 3 лунок 6-луночной плашки в 15 мл пробирки

20 - Дать сферам осесть в течение 10 минут

20 - Очень аккуратно удалить супернатант (отдельные клетки не оседают вниз и аспирируются вместе с супернатантом)

25 - Ресуспендировать сферы в 4 мл конечного объема среды для роста

25 - Посеять в ультранизкие адгезивные плашки В6 (Corning)

25 - Инкубировать 2-3 дня

25 - Повторять процедуру выращивания каждые 2-3 дня до 14 дня с момента генерации ирНСК

3. Дифференцировка нейросфер:

30 - На день 14 с момента генерации ирНСК и после процедуры выращивания выбрать под стерео микроскопом круглые нейросферы с чистыми границами, которые богаты ирНСК GFP+

35 - Поместить 40 нейросфер в лунку 24-луночной плашки, предварительно покрытой полиорнитинном/ламинином, используя среду для роста с добавлением фасудила 10 мкМ или баланолоподобного-324 соединения 2 мкМ.

35 - Через день поменять среду на среду для роста без фасудила/баланолоподобного-324 соединения 2 мкМ.

35 - Инкубировать в течение трех дней

35 - Удалить среду для роста и добавить среду для дифференцировки

40 - Обновить среду для дифференцировки после 3-4 дней

40 - Инкубировать 3-4 дня

40 - Зафиксировать клетки PFA 4% и выполнить иммуноокрашивание

45 Протокол окрашивания ирНСК нейросфер: Нейросферы на день 15 были окрашены для характеристики следующими антителами: мышинными к нестину и кроличьими к Sox2 O/N, и затем вторичными анти-мышинными 488 и анти-кроличьими 555 в течение 1 часа.

45 Первичные антитела:

45 Мышиные к нестину, моноклональные, разведение 1/500 (MAB5326 Millipore)

45 Кроличьи к Sox2, поликлональные, разведение 1/500 (AB5603MI Millipore)

Вторичные антитела:

Alexa fluor 488, IgG, разведение 1/1 000, Козьи анти-мышинные (A11029 Invitrogen)

Alexa fluor 555, IgG, разведение 1/1 000, Козьи анти-кроличьи (A21429 Invitrogen)

Формула изобретения

5

1. In vitro способ получения нейральных стволовых клеток (НСК), включающий:

а) получение соматических клеток, выбранных из группы фибробластов, кератиноцитов или адипоцитов, и

10

б) репрограммирование указанных соматических клеток в НСК с помощью введения в указанные соматические клетки по меньшей мере двух генов, *Vmi1* и *Sox2*; и культивирования указанных соматических клеток в питательной среде, содержащей ростовые факторы, выбранные из группы FGF2, EGF и BDNF и малой молекулы ингибитора ROCK.

15

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий

в) инкубацию продуктов стадии б) в условиях, подходящих для пролиферации НСК.

3. Способ по п. 1, где соматические клетки млекопитающего стадии а) являются клетками человека.

4. Способ по п. 1, где факторы роста и малая молекула стадии б) являются добавками в питательную среду с химически определенным составом.

20

5. Способ по п. 4, где питательная среда с химически определенным составом является бессывороточной средой с добавлением инсулина, трансферрина и прогестерона.

6. Способ по п. 5, где по меньшей мере два гена стадии б) дополнительно включают по меньшей мере один ген, выбранный из группы *Mash1*, *Sox11*, *Emx2*, *Foxg1* и *Rax6*.

25

7. Способ по п. 6, где по меньшей мере один дополнительный ген стадии б) представляет собой *Mash1*.

30

8. Способ по п. 1, где ингибитор ROCK выбран из группы 1-(5-изокинолинсульфонил)гомопиперазина, N-бензил-2-(пиримидин-4-иламино)тиазол-4-карбоксамид, (+)-(R)-транс-4-(1-аминоэтил)-N-(4-пиридил)циклогексанкарбоксамид дигидрохлорида и N-{(3R,4R)-4-[4-(2-фтор-6-гидрокси-3-метокси-бензоил)-бензоиламино]-азепан-3-ил}-4-гидрокси-3,5-диметилбензамида.

9. Способ по п. 1, где соматические клетки предварительно обработаны ингибитором деацетилазы гистонов (HDAC).

10. Способ по п. 1, где указанные по меньшей мере два гена *Vmi1* и *Sox2* доставляются в соматические клетки с помощью лентивируса.

35

11. Рекомбинантные пациент-специфические нейральные стволовые клетки для применения в регенеративной медицине, содержащие гены *Vmi1* и *Sox2*, полученные способом по любому из пп. 1-10.

12. Применение нейральных стволовых клеток по п. 11 в качестве in vitro модели заболеваний ЦНС.

40

13. Терапевтическая композиция для применения в регенеративной медицине, включающая нейральные стволовые клетки по п. 11 и физиологически приемлемый носитель.

14. Терапевтическая композиция по п. 13, где нейральные стволовые клетки дифференцируются в нейроны или клетки глии.

45

15. Биобанк для применения в регенеративной медицине, содержащий пациент-специфические рекомбинантные нейральные стволовые клетки, содержащие гены *Vmi1* и *Sox2*, полученные от пациентов или здоровых лиц с несколькими типами HLA с помощью способа по любому из пп. 1-10.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> F. Hoffmann - La Roche AG

<120> Conversion of somatic cells to induced reprogrammed Neural Stem Cells (irNSCs)

<130> 26845 WO

<150> EP10173455.6

<151> 2010-08-19

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 954

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1
atgtacaaca tgatggagac ggagctgaag ccgccgggcc cgcagcaaac ttcggggggc
60
ggcggcggca actccaccgc ggcggcggcc ggcggcaacc agaaaaacag cccggaccgc
120
gtcaagcggc ccatgaatgc cttcatggtg tggccccgcg ggcagcggcg caagatggcc
180
caggagaacc ccaagatgca caactcggag atcagcaagc gcctggggcg cgagtggaaa
240
cttttgtcgg agacggagaa gcggccgttc atcgacgagg ctaagcggct gcgagcgtg
300
cacatgaagg agcaccggga ttataaatac cggccccggc ggaaaaccaa gacgctcatg
360
aagaaggata agtacacgct gcccgggcgg ctgctggccc ccggcggcaa tagcatggcg
420
agcggggctg ggggtggcgc cggcctgggc gcgggcgtga accagcgcac ggacagttac
480
gcgcacatga acggctggag caacggcagc tacagcatga tgcaggacca gctgggctac
540
ccgcagcacc cgggcctcaa tgcgcacggc gcagcgcaga tgcagcccat gcaccgctac
600
gacgtgagcg ccctgcagta caactccatg accagctcgc agacctacat gaacggctcg
660
cccacctaca gcatgtccta ctgcagcag ggcaccctg gcatggctct tggctccatg
720
ggttcgggtg tcaagtccga ggccagctcc agccccctg tggttacctc ttctcccac
780

tccagggcgc cctgccaggc cggggacctc cgggacatga tcagcatgta tctccccggc
840

gccgaggtgc cggaaccgc cgtccccagc agacttcaca tgtcccagca ctaccagagc
900

ggcccgggtgc ccggcacggc cattaacggc aactgcccc tctcacacat gtga
954

<210> 2
<211> 1332
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
atggcgaccg cagcgtctaa cactacagc ctgctcacct ccagcgcctc catcgtgcac
60

gccgagccgc ccggcggcat gcagcagggc gcggggggct accgcgaagc gcagagcctg
120

gtgcagggcg actacggcgc tctgcagagc aacggacacc cgctcagcca cgctcaccag
180

tggatcaccg cgctgtccca cggcggcggc ggcgggggcg gtggcggcgg cggggggggc
240

gggggcggcg gcggggggcg cggcgacggc tccccgtggt ccaccagccc cctgggccag
300

ccggacatca agccctcggg ggtggtgcag cagggcggcc gcggagacga gctgcacggg
360

ccaggcggcc tgcagcagca gcatcagcag cagcaacagc aacagcagca gcaacagcag
420

caacagcagc agcagcagca gcaacagcgg ccgccgcac tggtgcacca cgccgctaac
480

caccacccgg gaccgggggc atggcggagc gcggcggctg cagcgcacct cccaccctcc
540

atgggagcgt ccaacggcgg ctgctctac tcgcagccca gcttcacggt gaacggcatg
600

ctgggcgccc gcgggcagcc ggccggtctg caccaccag gcctgcggga cgcgcacgac
660

gagccacacc atgccgacca ccaccgcac ccgcactcgc acccacacca gcagccgccc
720

ccccgcggc ccccgaggg tccgctggc caccaggcg gcaccacga cccgcactcg
780

gacgaggaca cggcgacct ggacgacct gagcagttcg ccaagcagtt caagcagcgg
840

cggatcaaac tgggatttac ccaagcggac gtggggctgg ctctgggcac cctgtatggc
900

RU 2562111 C2

aacgtgttct cgcagaccac catctgcagg tttgaggccc tgcagctgag cttcaagaac
960

atgtgcaagc tgaagccttt gttgaacaag tggttggagg aggcggactc gtcctcgggc
1020

agccccacga gcatagacaa gatcgcagcg caagggcgca agcggaaaaa gcggacctcc
1080

atcgaggatga gcgtcaaggg ggctctggag agccatttcc tcaaatgccc caagccctcg
1140

gcccaggaga tcacctccct cgcggacagc ttacagctgg agaaggaggt ggtgagagtt
1200

tggttttgta acaggagaca gaaagagaaa aggatgacct ctcccggagg gactctgccg
1260

ggcgccgagg atgtgtacgg ggggagtagg gacactccac cacaccacgg ggtgcagacg
1320

cccgccagt ga
1332

<210> 3
<211> 981
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
atgcatcgaa caacgagaat caagatcact gagctaaatc cccacctgat gtgtgtgctt
60

tgtggagggt acttcattga tgccacaacc ataatagaat gtctacattc cttctgtaaa
120

acgtgtattg ttcgttacct ggagaccagc aagtattgtc ctatttgtga tgtccaagtt
180

cacaagacca gaccactact gaatataagg tcagataaaa ctctccaaga tattgtatac
240

aaattagttc cagggccttt caaaaatgaa atgaagagaa gaagggattt ttatgcagct
300

catccttctg ctgatgctgc caatggctct aatgaagata gaggagaggt tgcagatgaa
360

gataagagaa ttataactga tgatgagata ataagcttat ccattgaatt ctttgaccag
420

aacagattgg atcggaaagt aaacaaagac aaagagaaat ctaaggagga ggtgaatgat
480

aaaagatact tacgatgccc agcagcaatg actgtgatgc acttaagaaa gtttctcaga
540

RU 2562111 C2

agtaaaatgg acatacctaa tactttccag attgatgtca tgtatgagga ggaaccttta
600

aaggattatt atacactaat ggatattgcc tacatttata cctggagaag gaatgggtcca
660

cttccattga aatacagagt tcgacctact tgtaaaagaa tgaagatcag tcaccagaga
720

gatggactga caaatgctgg agaactggaa agtgactctg ggagtgacaa ggccaacagc
780

ccagcaggag gtattccctc cacctcttct tgtttgctta gccccagtac tccagtgcag
840

tctcctcatc cacagtttcc tcacatttcc agtactatga atggaaccag caacagcccc
900

agcggtaacc accaatcttc ttttgccaat agacctcgaa aatcatcagt aaatgggtca
960

tcagcaactt cttctggttg a
981

<210> 4

<211> 711

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atggaaagct ctgccaagat ggagagcggc ggcgccggcc agcagcccca gccgcagccc
60

cagcagccct tctgcccgc cgcagcctgt ttctttgcca cggccgcagc cgcggcggcc
120

gcagccgccg cagcggcagc gcagagcgcg cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag
180

cagcagggcg cgcagctgag accggcggcc gacggccagc cctcaggggg cggtcacaag
240

tcagcgccca agcaagtcaa gcgacagcgc tcgtcttcgc ccgaactgat gcgctgcaaa
300

cgccggctca acttcagcgg ctttggttac agcctgccgc agcagcagcc ggccgcccgtg
360

gcgcgccgca acgagcgcga gcgcaaccgc gtcaagttgg tcaacctggg ctttgccacc
420

cttcgggagc acgtcccca cggcgcggcc aacaagaaga tgagtaaggt ggagacactg
480

cgctcggcgg tcgagtacat ccgcgcgctg cagcagctgc tggacgagca tgacgcggtg
540

agcggccct tccaggcagc cgtcctgtcg cccaccatct cccccaacta ctccaacgac
600

RU 2 562 111 C2

ttgaactcca tggccggctc gccggtctca tcctactcgt cggacgaggg ctcttacgac
660

ccgctcagcc ccgaggagca ggagcttctc gacttcacca actggttctg a
711

<210> 5

<211> 1325

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atgggtgcagc aggcggagag cttggaagcg gagagcaacc tgccccggga ggcgctggac
60

acggaggagg gcgaattcat ggcttgcagc ccggtggccc tggacgagag cgaccagac
120

tggtgcaaga cggcgtcggg ccacatcaag cggccgatga acgcgttcat ggtatggtcc
180

aagatcgaac gcaggaagat catggagcag tctccggaca tgcacaacgc cgagatctcc
240

aagaggctgg gcaagcgctg gaaaatgctg aaggacagcg agaagatccc gttcatccgg
300

gaggcggagc ggctgcggtc caagcacatg gccgactacc ccgactaaa gtaccggccc
360

cggaaaaagc ccaaaatgga cccctcggcc aagcccagcg ccagccagag cccagagaag
420

agcgcggccg gcggcggcgg cgggagcgcg ggcggaggcg cgggcgggtc caagacctcc
480

aagggctcca gcaagaaatg cggcaagctc aaggcccccg cggccgcggg cgccaaggcg
540

ggcgcgggca aggcggccca gtccggggac tacgggggcg cgggcgacga ctacgtgctg
600

ggcagcctgc gcgtgagcgg ctccggcggc ggcggcgcgg gcaagacggt caagtgcgtg
660

tttctggatg aggacgacga cgacgacgac gacgacgac agctgcagct gcagatcaaa
720

caggagcccg acgaggagga cgaggaacca ccgcaccagc agctcctgca gccgcccggg
780

cagcagccgt cgcagctgct gagacgctac aacgtcgcca aagtgcccgc cagccctacg
840

ctgagcagct cggcggagtc ccccgaggga gcgagcctct acgacgaggt gcgggcccggc
900

RU 2562111 C2

gcgacctcgg gcgccggggg cggcagccgc ctctactaca gttcaagaa catcaccaag
960

cagcaccgc gcgcgctcgc gcagcccgc ctgtcgcccg cgtcctcgcg ctcggtgtcc
1020

acctcctcgt ccagcagcag cggcagcagc agcggcagca gcggcgagga gcgcgacgac
1080

ctgatgttcg acctgagctt gaatttctct caaagcgcgc acagcgccag cgagcagcag
1140

ctggggggcg gcgcggcggc cgggaacctg tcctgtcgc tgggggataa ggatttggat
1200

tcgttcagcg agggcagcct gggctcccac ttcgagttcc ccgactactg cagcccgag
1260

ctgagcgaga tgatcgcggg ggactggctg gaggcgaact tctccgacct ggtgttcaca
1320

tattg
1325

<210> 6
<211> 2547
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
atgctgcaaa ctaaggatct catctggact ttgtttttcc tgggaactgc agtttctctg
60

caggtggata ttgttcccag ccagggggag atcagcgttg gagagtccaa attcttctta
120

tgccaagtgg caggagatgc caaagataaa gacatctcct ggttctcccc caatggagaa
180

aagctcacc caaaccagca gcggatctca gtgggtgtgga atgatgattc ctccctcacc
240

ctcaccatct ataacgcca catcgcgac gccggcattt acaagtgtgt ggttacaggc
300

gaggatggca gtgagtcaga ggccaccgtc aacgtgaaga tctttcagaa gctcatgttc
360

aagaatgcbc caaccccaca ggagttccgg gagggggaag atgccgtgat tgtgtgtgat
420

gtggtcagct cctcccacc aaccatcctc tggaacaca aaggccgaga tgtcatcctg
480

aaaaaagatg tccgattcat agtctgtcc aacaactacc tgcagatccg gggcatcaag
540

aaaacagatg agggcactta tcgctgtgag ggcagaatcc tggcacgggg ggagatcaac
600

ttcaaggaca ttcaggatcat tgtgaatgtg ccacctacca tccaggccag gcagaatatt
660

gtgaatgcc a cgcacaacct cggccagtcc gtcaccctgg tgtgcatgac cgaaggcttc
720

ccagagccca ccatgagctg gacaaaggat ggggaacaga tagagcaaga ggaagacgat
780

gagaagtaca tcttcagcga cgatagttcc cagctgacca tcaaaaagggt ggataagaac
840

gacgaggctg agtacatctg cattgctgag aacaaggctg gcgagcagga tgcgaccatc
900

cacctcaaag tctttgcaaa acccaaaatc acatatgtag agaaccagac tgccatggaa
960

ttagaggagc aggtcactct tacctgtgaa gcctccggag accccattcc ctccatcacc
1020

tggaggactt ctaccggaa catcagcagc gaagaaaaga ctctggatgg gcacatggtg
1080

gtgcgtagcc atgcccgtgt gtcgctgctg accctgaaga gcatccagta cactgatgcc
1140

ggagagtaca tctgcaccgc cagcaacacc atcggccagg actcccagtc catgtacctt
1200

gaagtgcaat atgccccaaa gctacagggc cctgtggctg tgtacacttg ggaggggaac
1260

caggtgaaca tcacctgca ggtatctgcc tatcccagtg ccacgatctc atggtttcgg
1320

gatggccagc tgctgccaag ctccaattac agcaatatca agatctacaa cccccctct
1380

gccagctatc tggaggtgac cccagactct gagaatgatt ttgggaacta caactgtact
1440

gcagtgaacc gcattgggca ggagtccttg gaattcatcc ttgttcaagc agacaccccc
1500

tcttcacat ccatcgacca ggtggagcca tactccagca cagcccaggt gcagtttgat
1560

gaaccagagg ccacaggtgg ggtgcccac ctcaaataca aagctgagtg gagagcagtt
1620

ggtgaagaag tatggcattc caagtggat gatgccaagg aagccagcat ggagggcatc
1680

gtcaccatcg tgggcctgaa gcccgaaaca acgtacgccg taaggctggc ggcgctcaat
1740

ggcaaagggc tgggtgagat cagcgcggcc tccgagttca agacgcagcc agtccaaggg
1800

RU 2562111 C2

gaaccagtg cacctaagct cgaagggcag atgggagagg atggaaactc tattaaagtg
1860

aacctgatca agcaggatga cggcggctcc cccatcagac actatctggt caggtaccga
1920

gcgctctcct ccgagtggaa accagagatc aggctcccgt ctggcagtga ccacgtcatg
1980

ctgaagtccc tggactggaa tgctgagtat gaggctctacg tggtggtgga gaaccagcaa
2040

ggaaaatcca aggcggctca ttttgtgttc aggacctcgg cccagcccac agccatccca
2100

gccaacggca gccccacctc aggcttgagc accggggcca tcgtgggcat cctcatcgtc
2160

atcttcgtcc tgctcctggt gtttgtggac atcacctgct acttcctgaa caagtgtggc
2220

ctgttcatgt gcattgcggt caacctgtgt ggaaaagccg ggcccggggc caagggcaag
2280

gacatggagg agggcaaggc cgccttctcg aaagatgagt ccaaggagcc catcgtggag
2340

gttcgaacgg aggaggagag gaccccaaac catgatggag ggaaacacac agagcccaac
2400

gagaccacgc cactgacgga gcccgagaag ggccccgtag aagcaaagcc agagtgccag
2460

gagacagaaa cgaagccagc gccagccgaa gtcaagacgg tcccacatga cgccacacag
2520

acaaaggaga acgagagcaa agcatga
2547

<210> 7

<211> 1617

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atgaccaccc caggaaaaga gaactttcgc ctgaaaagtt acaagaacaa atctctgaat
60

cccgatgaga tgcgcaggag gagggaggaa gaaggactgc agttacgaaa gcagaaaaga
120

gaagagcagt tattcaagcg gagaaatggt gctacagcag aagaagaac agaagaagaa
180

gttatgtcag atggaggctt tcatgaggct cagattagta acatggagat ggcaccaggt
240

RU 2562111 C2

ggtgtcatca cttctgacat gattgaaatg atattttcca aaagcccaga gcaacagctt
 300
 tcagcaacac agaaattcag gaagctgctt tcaaaagaac ctaaccctcc tattgatgaa
 360
 gttatcagca caccaggagt agtggccagg tttgtggagt tcctcaaacg aaaagagaat
 420
 tgtacactgc agtttgaatc agcttgggta ctgacaaata ttgcttcagg aaattctctt
 480
 cagacccgaa ttgtgattca ggcaggagct gtgcccatct tcatagagtt gctcagctca
 540
 gagtttgaag atgtccagga acaggcagtc tgggctcttg gcaacattgc tggagatagt
 600
 accatgtgca gggactatgt cttagactgc aatataccttc cccctctttt gcagttattt
 660
 tcaaagcaaa accgcctgac catgaccggg aatgcagtat gggctttgtc taatctctgt
 720
 agagggaaaa gtccacctcc agaatttgca aaggtttctc catgtctgaa tgtgctttcc
 780
 tggttgctgt ttgtcagtga cactgatgta ctggctgatg cctgctgggc cctctcatat
 840
 ctatcagatg gaccaatga taaaattcaa gcggtcatcg atgcgggagt atgtaggaga
 900
 cttgtggaac tgctgatgca taatgattat aaagtggttt ctctgcttt gcgagctgtg
 960
 ggaaacattg tcacagggga tgatattcag acacaggtaa ttctgaattg ctcagctctg
 1020
 cagagtttat tgcatttgct gagtagccca aaggaatcta tcaaaaagga agcatgttgg
 1080
 acgatatcta atattacagc tggaaatagg gcacagatcc agactgtgat agatgccaac
 1140
 attttcccag ccctcattag tattttacaa actgctgaat ttcggacaag aaaagaagca
 1200
 gcttgggcca tcacaaatgc aacttctgga ggatcagctg aacagatcaa gtacctagta
 1260
 gaactggggt gtatcaagcc gctctgtgat ctctcacgg tcatggactc taagattgta
 1320
 caggttgccc taaatggctt ggaaaatata ctgaggcttg gagaacagga agccaaaagg
 1380
 aatggcactg gcattaacco ttactgtgct ttgattgaag aagcttatgg tctggataaa
 1440

attgagttct tacagagtca tgaaaaccag gagatctacc aaaaggcctt tgatcttatt
1500

gagcattact tcgggaccga agatgaagac agcagcattg caccccaggt tgaccttaac
1560

cagcagcagt acatcttcca acagtgtgag gctcctatgg aaggtttcca gctttga
1617

<210> 8

<211> 1470

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

atgctggaca tgggagatag gaaagaggtg aaaatgatcc ccaagtcctc gttcagcatc
60

aacagcctgg tgcccaggc ggtccagaac gacaaccacc acgcgagcca cggccaccac
120

aacagccacc acccccagca ccaccaccac caccaccacc atcaccacca cccgcccgcg
180

cccgccccgc aaccgcccgc gccgcccag cagcagcagc cgccgcccgc gccgccccgc
240

gcaccgcagc cccccagac ggggggcgcc ccggcccgcg acgacgacaa gggccccag
300

cagctgctgc tcccgccgc gccaccgcca ccaccggccg ccgccctgga cggggctaaa
360

gcgacgggc tgggcggcaa gggcgagccg ggcggcgggc cgggggagct ggcgccgctc
420

gggccggacg agaaggagaa gggcgcccgc gccggggggg aggagaagaa gggggcgggc
480

gagggcggca aggacgggga ggggggcaag gagggcgaga agaagaacgg caagtacgag
540

aagccgccgt tcagctacaa cgcgctcatc atgatggcca tccggcagag ccccgagaag
600

cggtcacgc tcaacggcat ctacgagttc atcatgaaga acttcctta ctaccgcgag
660

aacaagcag gctggcagaa ctccatccgc cacaatctgt ccctcaacaa gtgcttcgtg
720

aaggtgccgc gccactacga cgacccgggc aagggaact actggatgct ggacccgctc
780

agcgacgacg tgttcatcgg cggcaccacg ggcaagctgc ggcgccgctc caccacctcg
840

cgggccaagc tggccttcaa gcgcgggtgc gcctcacct ccaccggcct caccttcag
900

RU 2562111 C2

gaccgcgccc gctccctcta ctggcccatg tcgcccttcc tgtccctgca ccacccccgc
960

gccagcagca ctttgagtta caacggcacc acgtcggcct accccagcca ccccatgccc
1020

tacagctccg tgttgactca gaactcgtctg ggcaacaacc actccttctc caccgccaac
1080

ggcctgagcg tggaccggct ggtcaacggg gagatcccgt acgccacgca ccacctcacg
1140

gccgccggc tagccgcctc ggtgcctgctc ggctgtcgg tgccctgctc tgggacctac
1200

tcctcaacc cctgctccgt caacctgctc gcgggccaga ccagttactt tttccccac
1260

gtccccgacc cgtcaatgac ttcgcagagc agcacgtcca tgagcgccag ggccgcgtcc
1320

tcctccacgt cgccgcaggc ccctcgcacc ctgccctgtg agtctttaag accctctttg
1380

ccaagtttta cgacgggact gtctggggga ctgtctgatt atttcacaca tcaaaatcag
1440

gggtcttctt ccaacccttt aatacattaa
1470

- <210> 9
- <211> 2908
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

<400> 9
cgggcgccgc aggagcgagt gagctgggag cgaggggcca aggcgaggag aagcccggcc
60

gcccgggtggg cggcagaagg ctcagccgag gcggcggcgc cgactccggt ccaactctcg
120

cccggatcca ggcctccggg ttcccaggcg ctcacctccc tctgacgcac tttaaagagt
180

ctccccctt ccacctcagg gcgagtaata gcgaccaatc atcaagccat ttaccaggct
240

tcggaggaag ctgtttatgt gatccccgca ctaattaggc tcatgaacta acaaatcggt
300

tgcacaactt gtgaagaagc gaacacttcc atggattgtc cttggactta gggcgccttg
360

ccgcctttt gcagaggaga aaaaactttt tttttttttt gcctccccg agaactttcc
420

RU 2562111 C2

cccttctcc tccctgcctc taactccgat ccccccacgc catctcgcca aaaaaaaaaa
 480
 aaaaaaaaaa aaagaaaaaa aaagaaaaaa aaagaaaaaa aattaccca atccacgcct
 540
 gcaaattctt ctggaaggat tttccccct ctcttcaggt tgggcgcggt tggtgcaaga
 600
 ttctcgggat cctcggcttt gcctctcct ctccctccc cctcctttcc tttttccttt
 660
 cttttccttt cttttcttct ttccttccc ccacccccac cccaccca aacaaacgag
 720
 tccccaatc tegtccgtc tgcgcgggg cagcggggcg cgaggcagc gtgcggcggt
 780
 cgccaggagc tgggagccca gggcgcccgc tcctcggcgc agcatgttcc agccggcgcc
 840
 caagcgtgc ttcaccatcg agtcgctggt ggccaaggac agtcccctgc ccgcctcgcg
 900
 ctccgaggac cccatccgtc ccgcggcact cagctacgt aactccagcc ccataaatcc
 960
 gttcctcaac ggcttccact cggccgccgc cgccgccgc ggtagggcg tctactcaa
 1020
 cccggacttg gtgttcgccg aggcgggtct gcacccgcc aaccccgcc tgccagtgca
 1080
 cccggtgccg ccgcccacg ccctggccgc ccacccccta cctcctcgc actcgccaca
 1140
 cccctattc gcctcgcagc agcgggatcc gtccacctc taccctggc tcatccaccg
 1200
 ctaccgatat ctgggtcatc gcttccaagg gaacgacact agccccgaga gtttccttt
 1260
 gcacaacgcg ctggcccga aagcccaagc gatccgaacc gccttctccc cgtcccagct
 1320
 tctaaggctg gaacacgcct ttgagaagaa tctactcgtg gtgggcgccg aaaggaagca
 1380
 gctggcacac agcctcagcc tcacggaaac tcaggtaaaa gtatggtttc agaaccgaag
 1440
 aacaaagttc aaaaggcaga agctggagga agaaggctca gattcgcaac aaaagaaaaa
 1500
 agggacgcac catattaacc ggtggagaat cgccaccaag caggcgagtc cggaggaaat
 1560
 agacgtgacc tcagatgatt aaaaacataa acctaacccc acagaaacgg acaacatgga
 1620

RU 2562111 C2

gcaaaagaga cagggagagg tggagaagga aaaaacccta caaaacaaaa acaaaccgca
1680

tacacgttca ccgagaaagg gagagggaaat cggaggggagc agcgggaatgc ggcgaagact
1740

ctggacagcg agggcacagg gtcccaaacc gaggccgcgc caagatggca gaggatggag
1800

gctccttcat caacaagcga ccctcgtcta aagaggcagc tgagtgagag acacagagag
1860

aaggagaaag agggagggag agagagaaag agagagaaag agagagagag agagagagag
1920

agaaagctga acgtgcactc tgacaagggg agctgtcaat caaacaccaa accgggggaga
1980

caagatgatt ggcaggtatt ccgtttatca cagtccactt aaaaaatgat gatgatgata
2040

aaaaccacga cccaaccagg cacaggactt ttttgttttt tgcacttcgc tgtgtttccc
2100

cccatcttt aaaaataatt agtaataaaa acaaaaaatt ccatatctag ccccatccca
2160

cacctgtttc aaatccttga aatgcatgta gcagttggtg ggcgaatggt gtttaaagac
2220

cgaaaatgaa ttgtaatfff cttttccttt taaagacagg ttctgtgtgc tttttatfff
2280

gatttttttt cccaagaaat gtgcagtctg taaacacttt ttgatacctt ctgatgtcaa
2340

agtgattgtg caagctaaat gaagtaggct cagcgatagt ggtcctctta cagagaaacg
2400

gggagcagga cgacgggggg gctggggggtg gcgggggagg gtgccacaaa aaagaatcag
2460

gacttgact gggaaaaaaaa ccctaaatt aattatattt cttggacatt ccctttccta
2520

acatcctgag gcttaaaacc ctgatgcaaa cttctccttt cagtggttgg agaaattggc
2580

cgagttcaac cattcactgc aatgcctatt ccaaacttta aatctatcta ttgcaaaacc
2640

tgaaggactg tagttagcgg ggatgatggt aagtgtggcc aagcgcacgg cggcaagttt
2700

tcaagcactg agtttctatt ccaagatcat agacttacta aagagagtga caaatgcttc
2760

cttaatgtct tctataccag aatgtaaata tttttgtggt ttgtgttaat ttgttagaat
2820

tctaacacac tatatacttc caagaagtat gtcaatgtca atatTTTgtc aataaagatt
2880

tatcaatatg ccctcaaaaa aaaaaaaaa
2908

<210> 10
<211> 2191
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
gcgacgaaag agaggatgcc tcttaaaggc agaagacttt aactaggggc gggcgagcag
60

atgtgtgaga tcttctattc aaagagtgga catatagccc agttttcaga gccacgtatt
120

cgagccccgt gggatccgga ggctgccaac cagctccagc atgcagaaca gtcacagcgg
180

agtgaatcag cttggtggtg tctttgtcaa cgggcggcca ctgccggact ccaccggca
240

gaagatcgta gagctagctc acagcggggc ccggccgtgc gacatttccc gaattctgca
300

ggtgtccaac ggatgtgtga gtaaaattct gggcaggtat tacgagactg gtcctatcag
360

accagggca atcggaggca gtaagccaag agtggcgact ccagaagttg taagcaaaat
420

agcccagtat aaacgggagt gcccgccat ctttgcttgg gaaatccgag acagattact
480

ctccgagggg gtctgtacca acgacaatat acccagtgtg tcatcaataa acagagttct
540

tcgcaacctg gctagcgaag agcaacagat gggcgagac ggcattgtat ataaactaag
600

gatgctgaac ggacagaccg gaagctgggg caccgcctt ggttggtatc ccgggacgtc
660

agtaccaggg caaccacgc aagacggctg ccagcaacag gaaggacagg gagaaaacac
720

caactccatc agctccaatg gagaagactc ggatgaggct caaatgcggc tgcagctgaa
780

gcggaagctg cagagaaata gaacatcttt taccaggag cagattgagg ctctggagaa
840

agagtttgag aggaccatt atccagatgt gtttgcccgg gaaagactag cagccaaaat
900

agatctacct gaagcaagga tacaggtgtg gttttctaac cgaagggcca agtggagaag
960

RU 2562111 C2

agaagaaaaa ctgaggaacc agagaagaca ggccagcaac accccgagtc acatccctat
1020

cagcagcagt ttcagtagca gtgtctacca gccaatcca cagcccacca cacctgtctc
1080

ctcctttaca tcgggtcca tgttgggccc cacagacacc gccctacca acacgtacag
1140

tgctttgccg ccgatgcca gcttcacat ggcaaataac ctgcctatgc aacccccagt
1200

cccagtcag acctcctcgt actcctgcat gctgcccacc agcccttcag tgaatgggccc
1260

gagttatgat acctacacc ctccgcacat gcaaacacac atgaacagtc agcccatggg
1320

cacctcggga accacttcaa caggactcat ttcacctgga gtgtcagttc ccgtccaagt
1380

tcccggaagt gaacctgaca tgtctcagta ctggcctcga ttacagtaaa gagagagaaa
1440

gagagagaat gtgatcgaga gggggattgt gttcactcag ccaatgacta tgtggacaca
1500

gcggttgggt attcaggaaa gaaagagaaa tggctgttag aagcacttca ctttacaact
1560

gtgtcctata ctggagcccg ggaatggact agaaaccagg acctttgcgt acagaaggca
1620

cggtatcagt tggaacaaat cttcattttg gtatccaaac ttttattcat tttgggtgat
1680

tatttgtaaa tgggcatttg tatgttataa tgaagaaaag aacaacacag gctgttggat
1740

cttgatctg tgttggtcca tgtgggtgtt taaaggaaac catgatcgac aagatttgcc
1800

atggatttaa gagttttatc aagatatatc gaatacttct acctatctgt tcatagttta
1860

tggactgatg ttccaagttt gtatcattcc tttgcatata attaaacatg gaacaacata
1920

cactagatat atgtaaaaaa tatctgttgg tttttccaaa ggttggttaac agataaagtt
1980

tatgtgcaaa aaagggttag atatgaattc gaggagaagt tgatagctaa aaggtagagt
2040

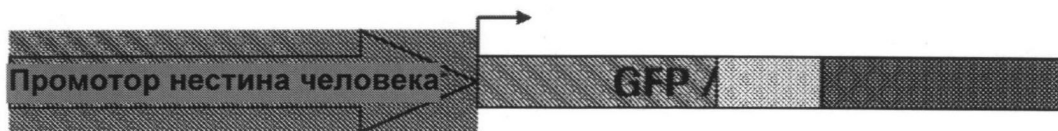
gtgtcttcga tataatccaa tttgttttat gtcaaaatgt aagtatttgt cttccctaga
2100

aatcctcaga atgatttcta taataaagtt aatttcattt atatttgaaa aaaaaaaaaa
2160

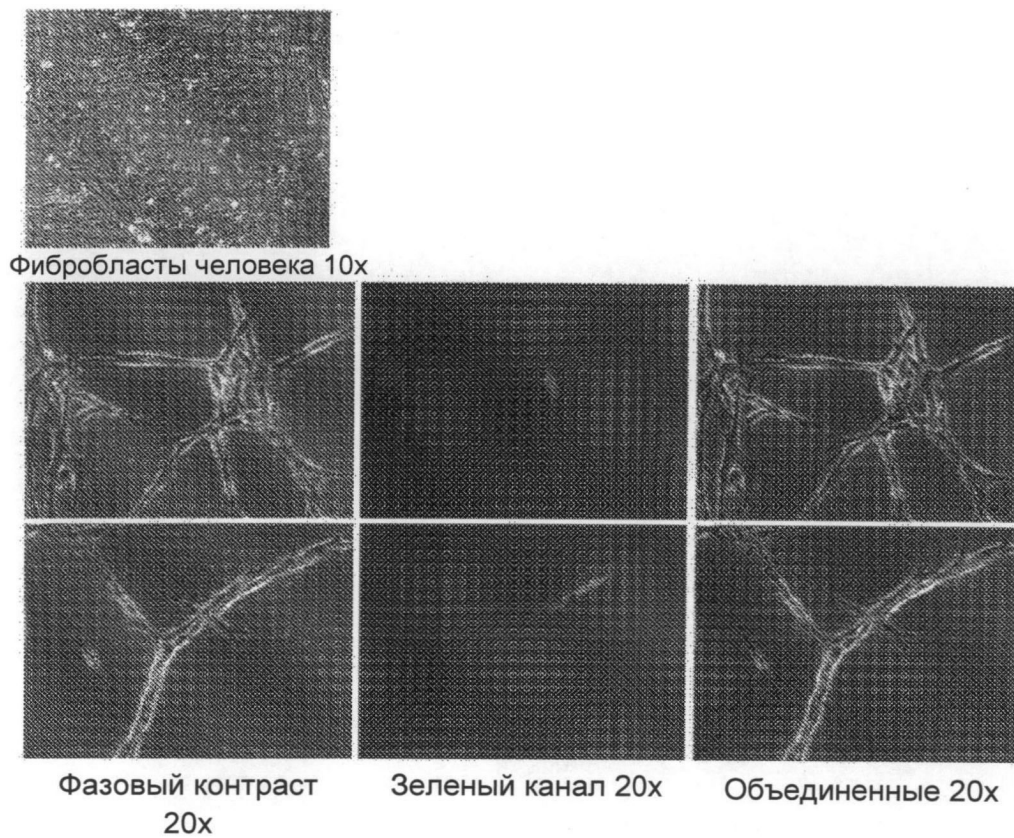
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a
2191



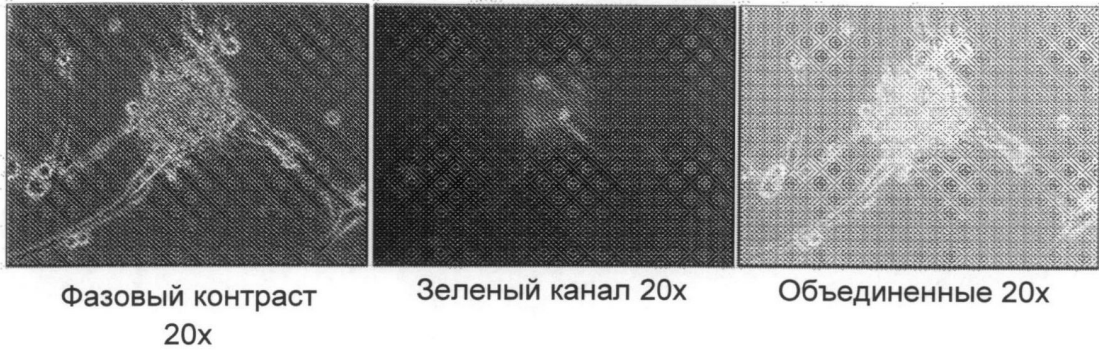
Фиг. 1



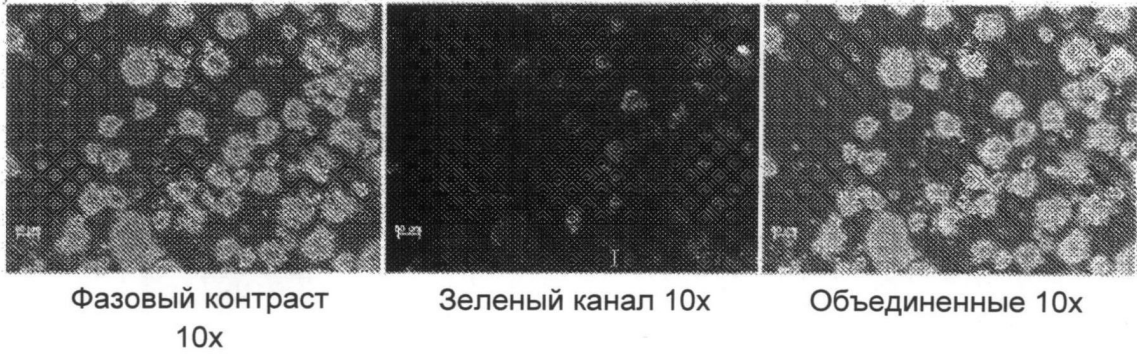
Фиг. 2



Фиг. 3

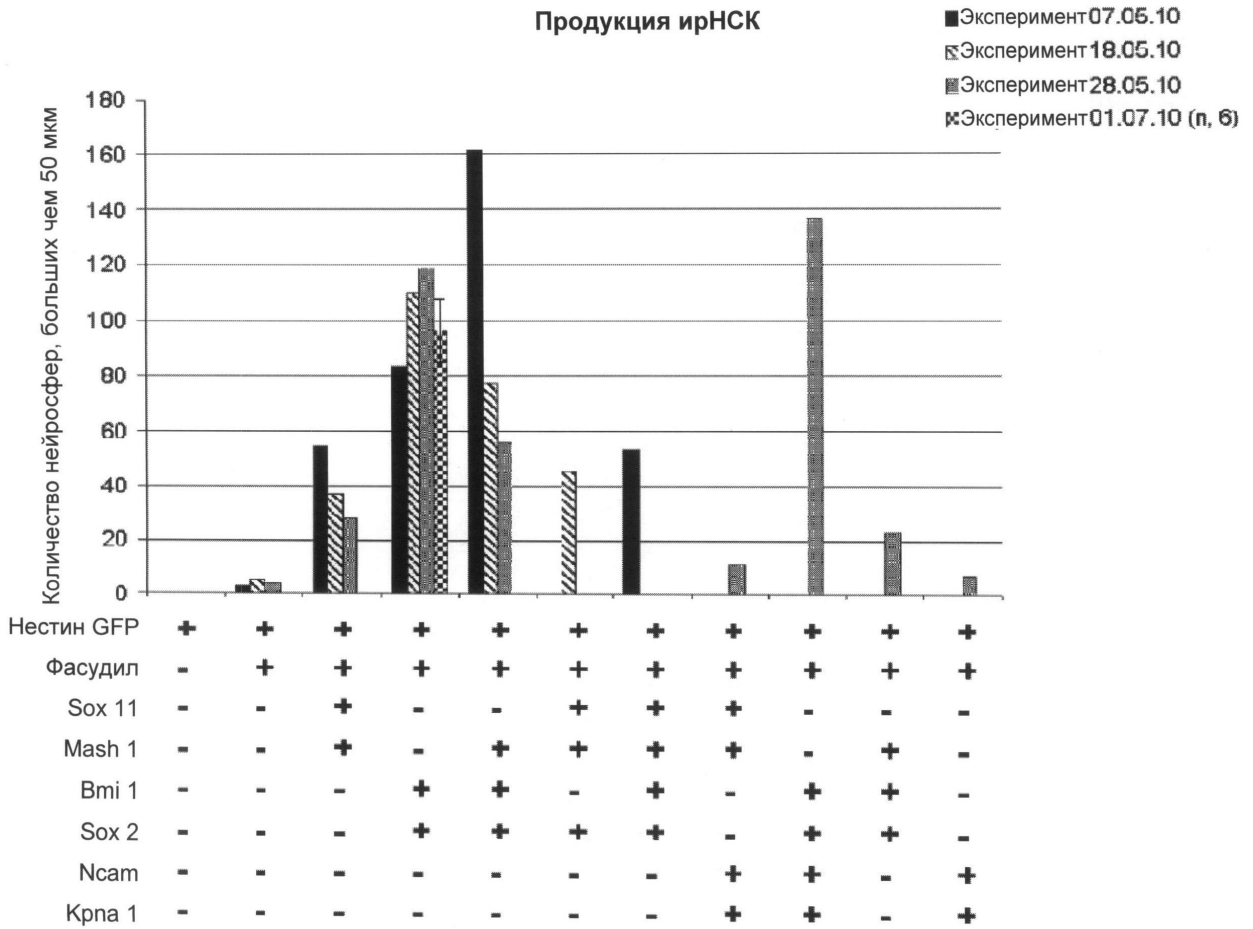


Фиг. 4

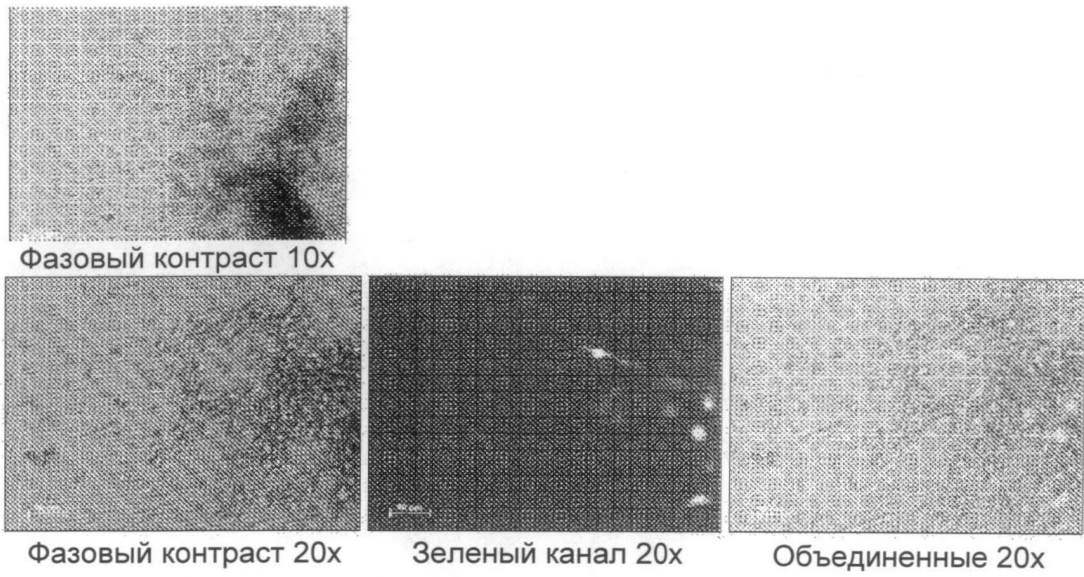


Фиг. 5

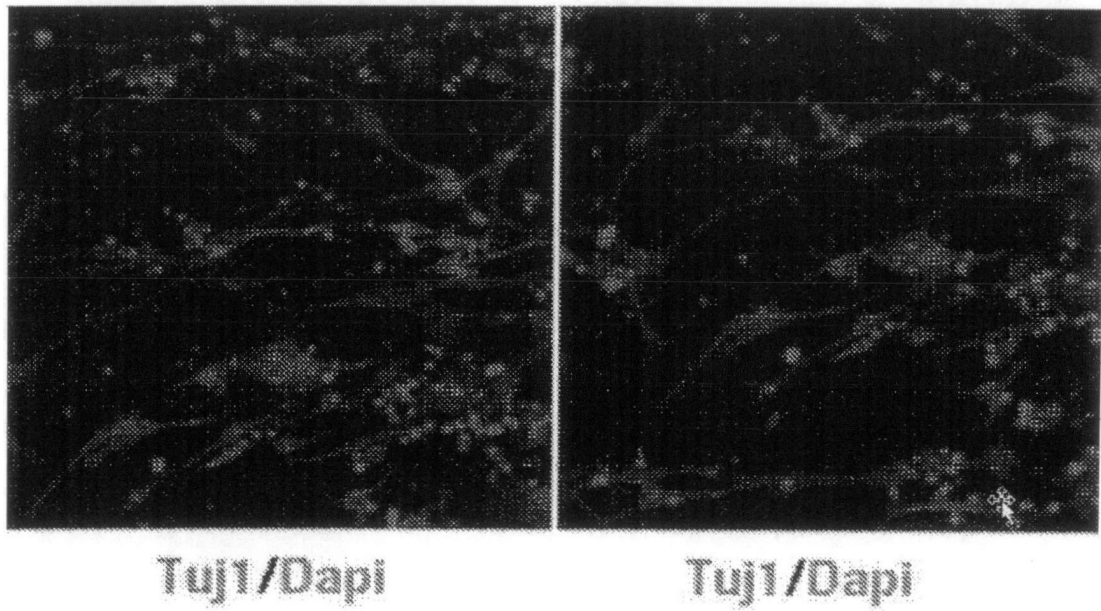
Продукция ирНСК



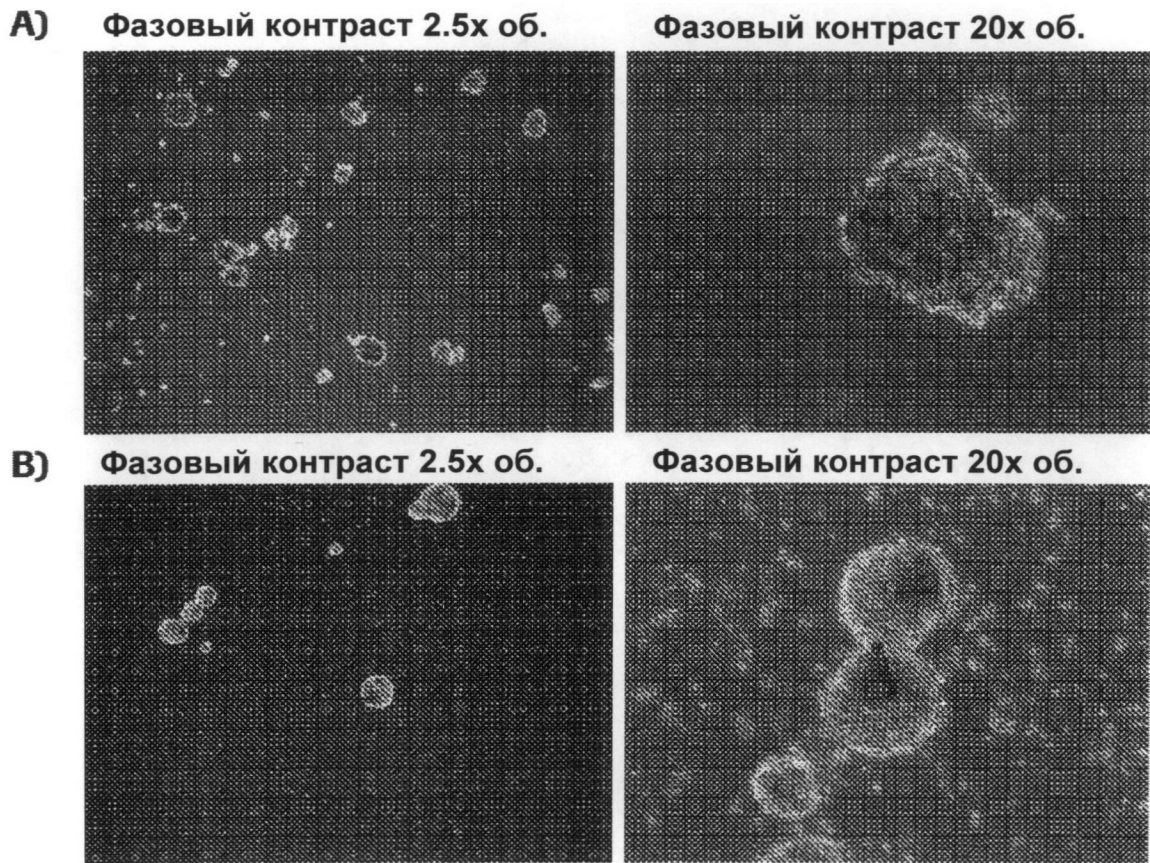
Фиг. 6



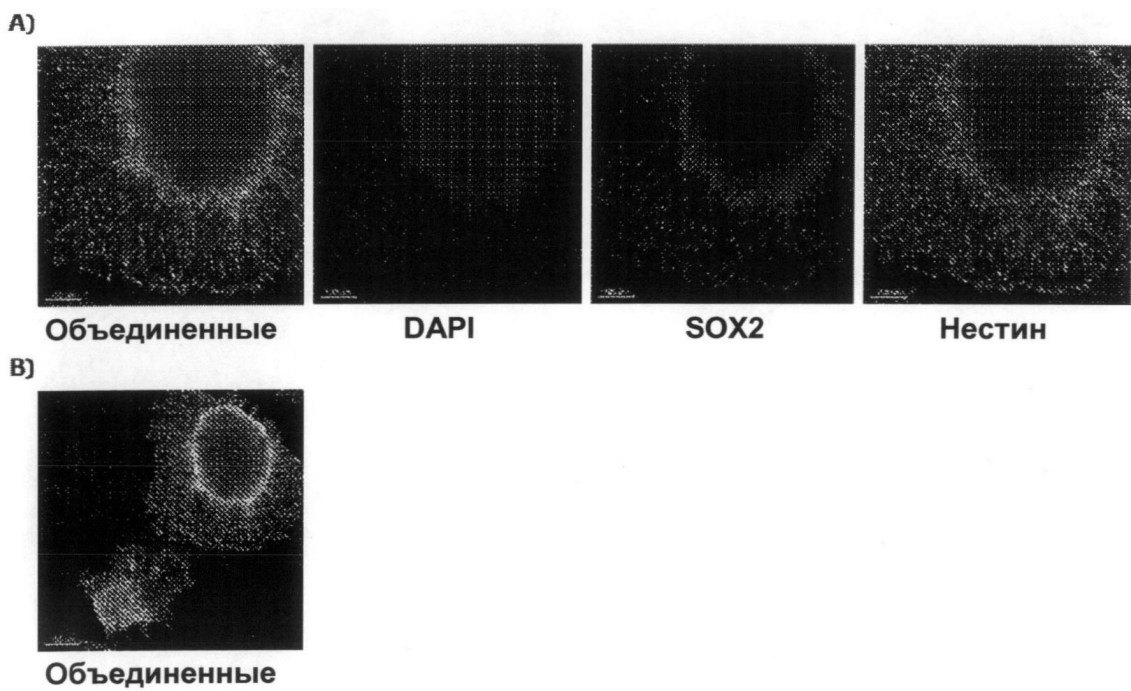
Фиг. 7



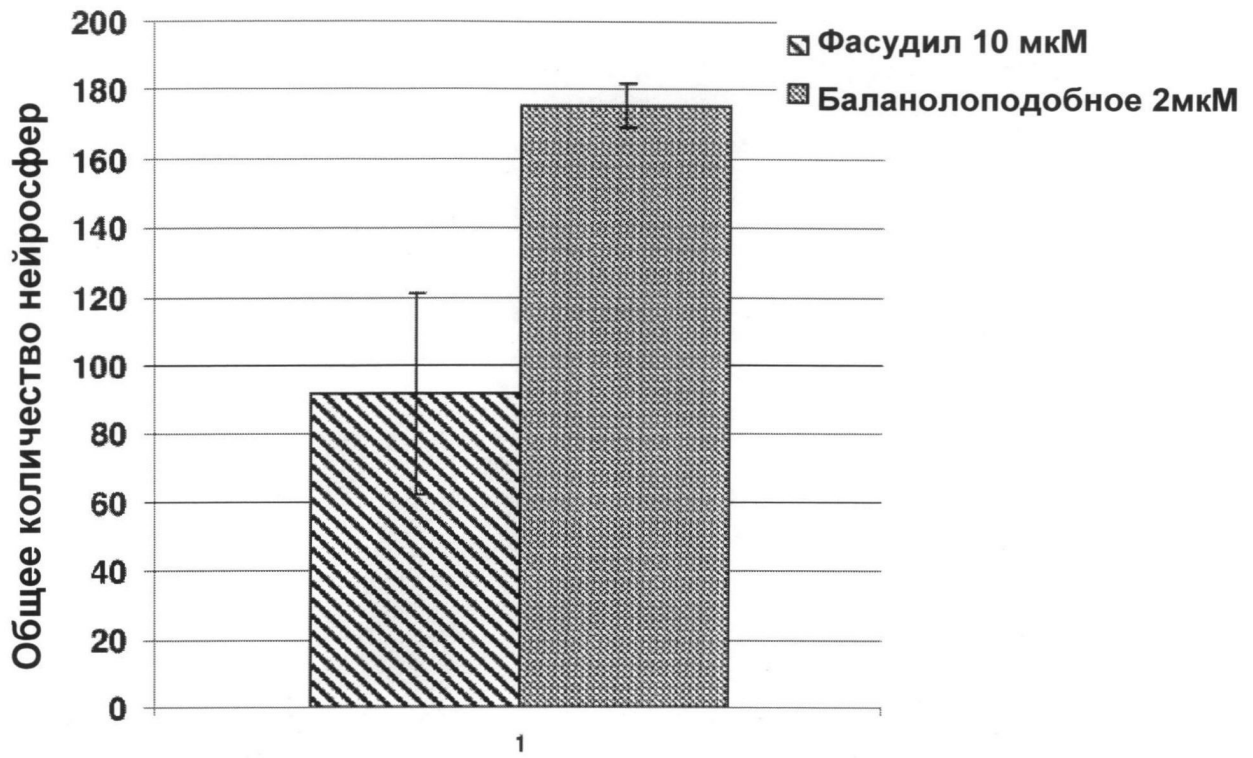
Фиг. 8



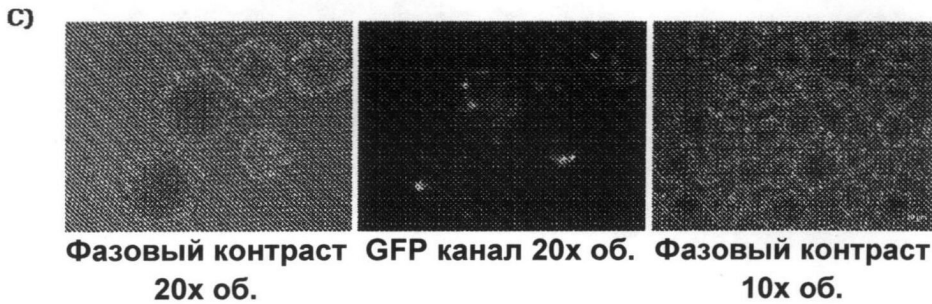
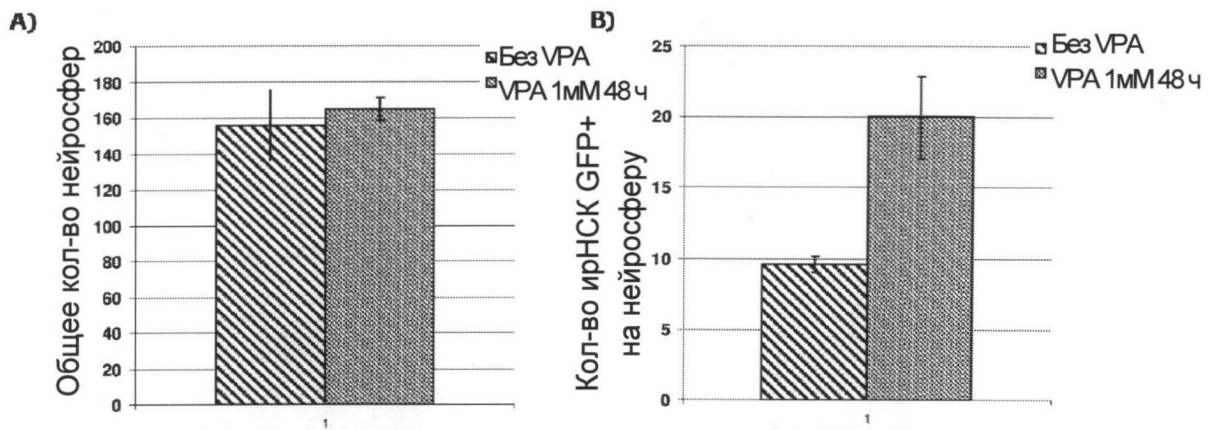
Фиг. 9



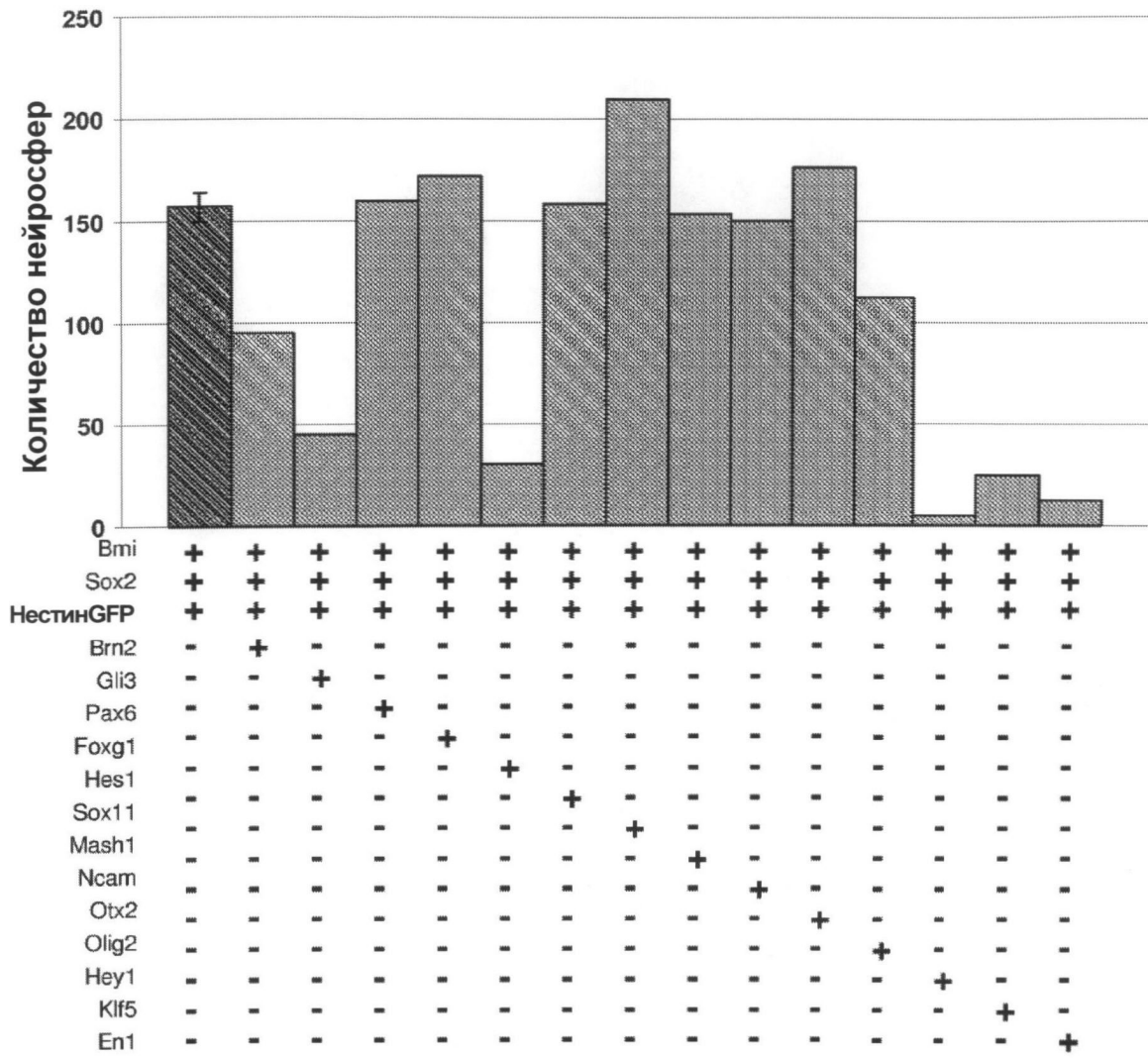
Фиг. 10



Фиг. 11



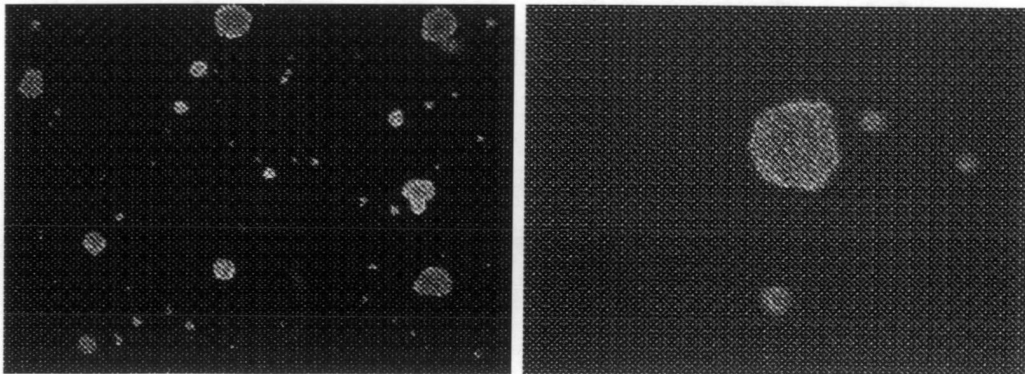
Фиг. 12



Фиг. 13

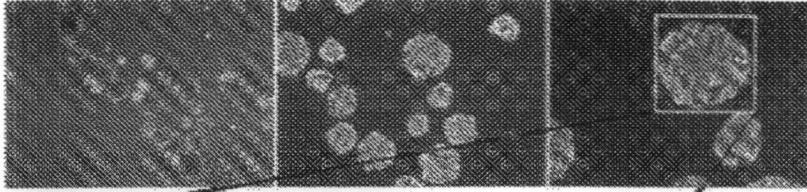
А) Фазовый контраст 2.5x об.

Фазовый контраст 10x об.

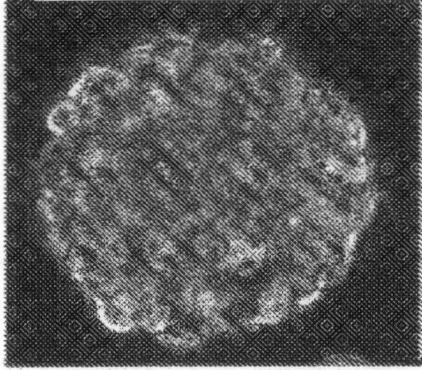


Фиг. 14

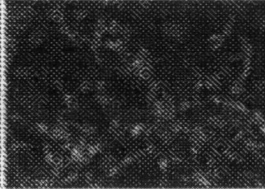
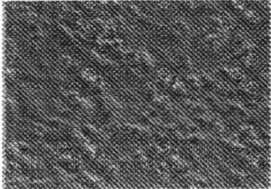
A) Фазовый к-т 2.5x об. Фазовый к-т 2.5x об. Фазовый к-т 2.5x об.



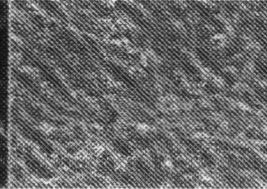
B) Увеличение



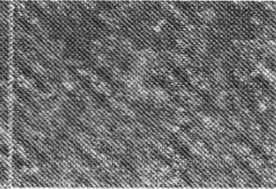
C) Фазовый к-т 20x об. GFP канал



Объединенные

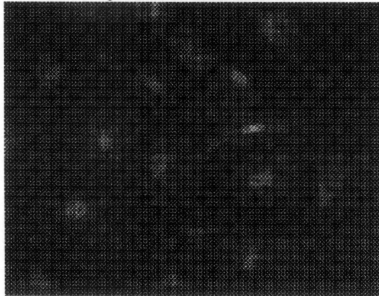


Объединенные 10x об.

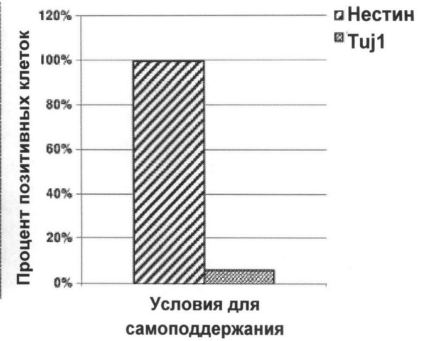
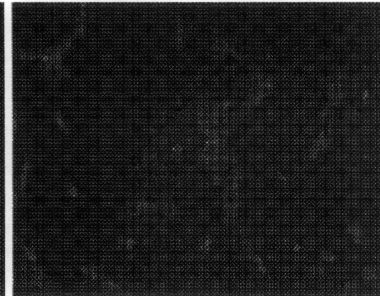


Фиг. 15

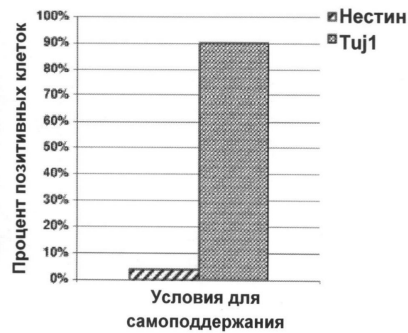
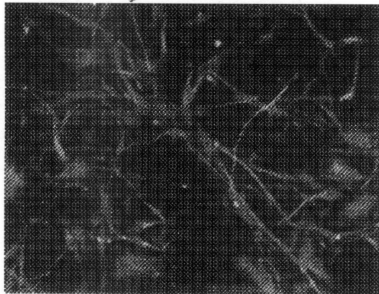
A) DAPI/Tuj1



DAPI/Nestin



B) DAPI/Tuj1



Фиг. 16