



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113840** (13) **C2**  
(51) МПК

**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 5/074** (2010.01)  
**C12N 5/0789** (2010.01)  
**C12N 5/0797** (2010.01)  
**C12N 5/0735** (2010.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2013 09671</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Дейшер Тереза Д. (US)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>03.01.2012</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>АВМ БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ЛЛС,</b> 1749 Dexter Ave N, Seattle, WA 98109-3022, United States of America (US)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>27.03.2017</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Кістерський Арсеній Леонідович, реєстр. №177</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/429,409, 61/431,376</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Qian W. Adenoviral vector-mediated human hepatocyte growth factor gene transfection for its high expression in rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells / W. Qian [et al.] // Journal of southern medical university. - 2007. - Vol. 27. - No. 11. - P. 1627-1630. Himes B. T. Transplants of cells genetically modified to express neurotrophin-3 rescue axotomized Clarke's nucleus neurons after spinal cord hemisection in adult rats / B.T. Himes [et. al.] // Journal Neuroscience Research. - 2001. - Vol. 65. P. 549-564. WO 2006061416 A1, 15.06.2006 US 2007155011 A1, 05.07.2007 WO 2009151207 A1, 17.12.2009 WO 2007081631 A2, 19.07.2007
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>03.01.2011, 10.01.2011</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US, US</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>11.11.2013, Бюл.№ 21</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>27.03.2017, Бюл.№ 6</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/US2012/020084, 03.01.2012</b>	

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ВИДІЛЕНОГО ТЕРАПЕВТИЧНОГО РЕКОМБІНАНТНОГО БІОЛОГІЧНОГО ПОЛІПЕПТИДУ**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується одержання виділеного терапевтичного рекомбінантного біологічного поліпептиду або білка для лікування захворювання, який включає трансфікування штучно одержаної плюріпотентної стовбурової клітини (spPSC) нуклеїновою кислотою, яка кодує вказаний терапевтичний рекомбінантний біологічний поліпептид або білок, експресію та виділення вказаного поліпептиду або білка з вказаної spPSC, де вказана spPSC одержана з клітини тварини.

UA 113840 C2



[0001] Дана заявка претендує на пріоритет попередньої заявки на патент США № 61/429409, поданої 3 січня 2011 р.; попередньої заявки на патент США № 61/431376, поданої 10 січня 2011 р. Усі попередні заявки в повному обсязі включені до даного опису шляхом посилань.

#### ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВІНАХОДУ

5 [0002] На даний час існує багато рекомбінантних поліпептидів та протеїнів, які застосовують при терапевтичному лікуванні ряду захворювань. Усі ці рекомбінантні поліпептиди і протеїни одержують комерційним шляхом з використанням первинних постійних ліній людських або нелюдських диплоїдних клітин. Наприклад, деякі з них одержують з використанням бактерій, таких як *E. coli*, а інші одержують з використанням дріжджів або різних ліній оваріальних клітин тваринного походження. Бактерії є непридатними для одержання деяких поліпептидів і

10 протеїнів, зокрема, якщо профілі глікозилювання або інші протеїнові модифікації є важливими для активності зв'язування з біологічними рецепторами, біологічної активності, біорозподілу або фармакокінетики біопрепарату або для імінологічного розпізнавання реципієнтом. Оскільки глікозилювання є важливим, то оваріальна клітина китайського хом'яка на даний час є однією з загально застосовуваних клітинних ліній для біологічного виробництва.

15 [0003] На жаль, необхідність використовувати рекомбінантний поліпептид або протеїн протягом тривалого часу або для довготривалої терапії може призвести до продукування у пацієнта нейтралізуючих антитіл до продукту, що робить пацієнта менш чутливим або нечутливим до даного лікарського засобу. У деяких випадках пацієнт може перейти на інший

20 лікарський засіб того самого класу, такого як анти-TNF біопрепарати, такі як Енбрел, також відомий як Етанерцепт; Ремікаїд, також відомий як Інфліксимаб; Цертолізумаб та Хуміра, також відомий як D2E7, які застосовують для лікування захворювань, таких як ревматоїдний артрит, ювеніальний ревматоїдний артрит, псоріаз, псоріатичний артрит, анкілозуючий спондилоартрит, виразковий коліт та хвороба Крона. Однак, продукування нейтралізуючих антитіл до одного

25 конкретного анти-TNF біопрепарату зазвичай призводить до того, що у пацієнта також продукуються нейтралізуючі антитіла до другого анти-TNF продукту. У ряді випадків не існує альтернативного лікування пацієнта, а тому утворення цих нейтралізуючих антитіл залишає пацієнта без варіантів лікування. Навіть у тому випадку, коли існують підходящі варіанти лікування, схильність до продукування нейтралізуючих антитіл до інших лікарських засобів того

30 ж самого класу в кінцевому рахунку означає, що пацієнт може залишитись без варіантів лікування.

[0004] Інші біологічні продукти, які можуть нейтралізуватись антитілами людини, включають: Наталізумаб або Тисабрі, що являє собою інноваційний засіб для лікування розсіяного склерозу, і Денозумаб - повністю людське моноклональне антитіло до ліганда рецептора активатора ядерного фактора каппа-В (RANKL), дозволене для лікування остеопорозу та індукованих хіміотерапією переломів кісток з потенціалом використання для лікування раку

35 молочної залози, викликаного ГЗТ і гормональними контрацептивами. Абатецепт є гібридним білком CTLA-4, дозволеним для використання при ревматоїдному артриті у пацієнтів, які стали несприйнятливими до лікування анти-TNF засобами. Хоча його почали застосовувати досить

40 недавно, щоб уже були відомості про індуковані Абатецептом нейтралізуючі антитіла, також існує можливість того, що він може індукувати відповідь нейтралізуючих антитіл людини.

[0005] Було показано, що інші поліпептиди та протеїни, окрім засобів на основі антитіл та гібридних білків, також викликають імунну відповідь при тривалому лікуванні. Наприклад, рекомбінантний людський еритропоєтин викликає утворення нейтралізуючих антитіл, що

45 знижують його ефективність і можуть призвести до синдрому аплазії. Також антитіла до засобів на основі факторів згортання крові продукуються у 25-30 % пацієнтів, хворих на гемофілію. Це є основною проблемою факторів згортання крові. Терапія раку та гепатиту В з використанням рекомбінантного інтерферону альфа 2а також ускладнюється генеруванням нейтралізуючих антитіл до лікування. Іншою проблемою є несприйнятливості дітей малого зросту до тривалої

50 терапії гормонами росту. Відомо про утворення нейтралізуючих антитіл до деяких інсулінових продуктів.

[0006] Інші біологічні лікарські засоби, що мають здатність викликати утворення нейтралізуючих антитіл, включають цільну кров, сироватку, пули плазми та інші первинні джерела біологічних речовин, наприклад, людський альбумін, інгібітор альфа 1-протеїнази

55 людини, комплекс антигемофільного фактора і фактора Віллебранда людини, внутрішньовенний протиботулінічний імуноглобулін BabyBig, інгібітор естерази C1, фібриносилант, фібриноген, імуноглобулін внутрішньовенний, імуноглобулін підшкірний, концентрат білка С, імуноглобулін внутрішньовенний Rho(D), тромбін, комплекс фактор Віллебранда/фактор VIII згортання крові.

[0007] Рекombінантні поліпептиди і протеїни викликають імунні відповіді та продукування нейтралізуючих антитіл, що обумовлено рядом характеристик, які включають: термін біологічного лікування, інтервал повторного введення, амінокислотний склад біопрепарату та модифікації біологічного препарату, такі як глікозилювання, метилювання, нітросилація, сіалування, фосфорилювання, сульфатування, пренілювання, селенування, убіквітинування, вітамінозалежні модифікації, асоціації зв'язування з білком, ацилювання, глікування, тривимірні конфігурації та надспіралізація. Таким чином, існує потреба в способах одержання поліпептидних та протеїнових продуктів, що мають знижені рівні антигенності у тварин, що підлягають лікуванню даним біологічним продуктом.

[0008] Зміст усіх джерел, що цитуються в даному документі, повністю включений до даного документа шляхом посилань.

#### ОПИС ВИНАХОДУ

[0009] Даний винахід задовольняє цю потребу шляхом забезпечення способів одержання біопрепаратів, таких як поліпептиди або протеїни, нуклеїнові кислоти, віруси і вакцини, за допомогою трансфікування або трансформування штучно одержаних плюрипотентних стовбурових клітин (spPSC) або ендogenous плюрипотентних стовбурових клітин (ePSC). Ці клітини одержують від видів, що підлягають лікуванню, і трансфікують векторами, які експресують бажаний біопрепарат та індують експресію біологічного продукту трансфікованою або трансформованою spPSC або ePSC.

[0010] Також даний винахід забезпечує спосіб одержання рекombінантного поліпептиду або протеїну, що включає одержання spPSC із зрілих клітин або виділення ePSC тварини та трансфікування або трансформування вказаних spPSC або ePSC нуклеїновою кислотою, яка кодує вказаний поліпептид або протеїн, за умов, при яких поліпептид або протеїн експресуються вказаною стовбуровою клітиною.

[0011] У альтернативному варіанті втілення даного винаходу spPSC продукуються або ePSC виділяються з клітин тієї етнічної групи, до якої належить індивід, який підлягає введенню рекombінантного поліпептиду або протеїну. Різні етнічні групи можуть мати відмінні профілі глікозилювання та поліморфізм. Етнічні групи - це групи, що мають однакові типи крові та тканин. Таким чином, відповідно до даного винаходу рекombінантні поліпептиди та протеїни продукуються з spPSC або ePSC, де ePSC або spPSC продукуються з клітин, виділених з тієї етнічної групи, до якої належить індивід, який підлягає введенню рекombінантного поліпептиду або протеїну. Індивіду буде введений рекombінантний поліпептид або протеїн, що продукується spPSC або ePSC, де spPSC виробляється або ePSC виділяється з клітини, яка належить етнічній групі, до якої належить індивід.

[0012] Також даний винахід забезпечує спосіб введення поліпептиду або протеїну індивіду-тварині, що включає одержання spPSC, таких як індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (iPSC), з вказаних клітин вказаної тварини або виділення ePSC та трансфікування або трансформування вказаних spPSC або ePSC нуклеїновою кислотою, яка кодує вказаний поліпептид або протеїн, за умов, при яких поліпептид або протеїн експресуються вказаною плюрипотентною стовбуровою клітиною, виділення вказаного поліпептиду або протеїну з вказаної індукованої плюрипотентної стовбурової клітини та введення вказаного виділеного поліпептиду або протеїну вказаному індивіду.

[0013] У даному винаході запропонований спосіб персоналізованого одержання терапевтичних поліпептидів або протеїнів, що забезпечує комерційну доступність та корисність spPSC або ePSC. Даний винахід належить до способів створення пацієнт-специфічних spPSC або ePSC для виробництва пацієнт-специфічних поліпептидів або протеїнів з метою усунення проблеми утворення нейтралізуючих антитіл, яка, як правило, існує у поліпептидів та протеїнів для довготривалого або постійного застосування. Пацієнтом може бути будь-яка тварина, переважно ссавець та більш переважно людина. Даний винахід також забезпечує спосіб одержання нуклеїнових кислот або вірусів, що включає трансфікування або трансформування spPSC або ePSC вектором за умов, при яких продукуються бажана нуклеїнова кислота або вірус.

[0014] Крім того, в даному винаході запропоновані способи одержання пацієнт-специфічної та орган- або клітинспецифічної клітинної лінії для одержання ретельно підібраних посттранскрипційно модифікованих біопрепаратів для терапевтичного застосування. Пацієнт-специфічні клітинні лінії можуть бути одержані, застосовуючи SCNT, індуковане перепрограмування, партеногенез або способи ANT-OAR перепрограмування, або вони можуть бути виділені з пацієнта-мішені. Таким чином, отримані або виділені плюрипотентні стовбурові клітини для експресування відповідних терапевтичних засобів можуть бути генетично модифіковані, застосовуючи стандартні процедури молекулярної біотехнології, наприклад,

застосовуючи інсерційні або епісомальні вектори експресії або способи гомологічної рекомбінації. Генетично модифікована клітинна лінія може бути розмножена в культурі та збережена для періодичного біологічного масового виробництва, що планується на основі терміну зберігання біопрепарату, що виробляється (Приклад 2). У альтернативному варіанті отримані пацієнт-специфічні клітинні лінії можуть бути диференційовані до клітинного типу, який нормально експресує підвищені рівні бажаного терапевтичного протеїну, а потім використані для біологічного виробництва. Диференціювання може проводитись для кожного виробничого циклу або може здійснюватись у великому масштабі, а диференційовані пацієнт-специфічні клітинні лінії зберігатись для наступних виробничих циклів, базуючись на терміні зберігання терапевтичного засобу, який виробляється (Приклад 3).

[0015] Додатково, оскільки відомо, що тканини та клітинні типи відрізняються за профілями глікозилування та іншими посттрансляційними модифікаціями, то лінії пацієнт-специфічних стовбурових клітин можуть бути приготовані зі зрілих або соматичних клітин, виділених з органу або ряду клітинних типів, що експресують біопрепарат. Як, наприклад, SCNT, PGA, ANT-OAR або методи перепрограмування потім можуть бути застосовані для одержання лінії плюрипотентних клітин для біологічного продукування. Таким чином, отримані або виділені плюрипотентні стовбурові клітини для експресування відповідного терапевтичного засобу можуть бути генетично модифіковані, застосовуючи стандартні процедури молекулярної біотехнології. Генетично модифікована клітинна лінія може бути розмножена в культурі та збережена для періодичного біологічного масового виробництва, що планується на основі терміну зберігання біопрепарату, що виробляється (див. Приклад 4). Розвиваючи переваги властивостей "пам'яті" перепрограмованих клітин (iPS клітини), пацієнт- та тканино- або клітиносpezifічні iPS клітини можуть бути індуковані для диференціювання назад до типу клітин, з якого вони походять, для максимально повного створення клітинної лінії, що піддається ендогенній посттрансляційній модифікації. Для експресування відповідного терапевтичного засобу клітини iPS можуть бути генетично модифіковані перед редиференціюванням до початково виділеного клітинного типу або після редиференціювання до початково виділеного клітинного типу (див. Приклад 5).

[0016] Наприклад, гормон росту зазвичай інтенсивніше продукується соматотропними клітинами в передній долі гіпофізу, а також інтенсивно експресується в клітинах всередині плаценти (тромбобласти) та язика і вульви або анальної шкіри. Експресія протеїну фактора VIII є високою в клітинах ниркових каналців, але він помірно експресується рядом тканин та типів клітин відповідно до Атласу протеїнів людини. Антитіла зазвичай продукуються В-клітинами, що дозрівають в зародкових центрах селезінки та інших лімфоїдних органах. Терапевтичне одержання антитіл з високими рівнями антитілозалежної клітинно-опосередкованої токсичності (ADCC) визначають за рівнем присутньої в продукуючій клітинній лінії GDP-D-манозо-4,6-дегідрогенази (GMD), що може розміщувати N-ацетилглюкозамін (GlcNac) в місці розсічення IgG1 підтипу антитіл (JBiol Chem., Vol. 273, pp. 14582-14587, 1998 and BMC Biotechnol., 7:84-97 (2007)). Одержання антитіл з високою активністю ADCC не завжди є оптимальним при використанні CHO продукуючої клітинної лінії (J Biol Chem. 278: 3466-3473, 2003). У даному винаході запропоновані нові клітинні лінії ссавців для оптимальної активності ADCC вироблених антитіл, злитих протеїнів та клітинних цитотоксичних біопрепаратів.

[0017] Відомо, що фактори транскрипції, асоційовані з високими рівнями біологічного продукування, можуть бути котрансфектовані відповідним геном для оптимізації рівнів експресії з пацієнт-специфічної клітинної лінії. Наприклад, високі рівні експресії Pit-I можуть викликати інтенсивну експресію пролактину в клітинному типі, одночасно блокуючи або попереджаючи експресію гормону росту (Genes Dev, 3: 946-958 1989).

[0018] Одержання моноклональних антитіл може бути підвищене шляхом оптимізації генного кодону, застосовуючи системи, такі як ті, що розроблені Sino Biological Inc, Peoples Republic of China, морфогенез (Proc Natl Acad Sci, 103: 3557-3562, 2006) або інші стандартні біотехнологічні способи.

Продукування штучно одержаних плюрипотентних стовбурових клітин

[0019] Для одержання персоналізованих біопрепаратів згідно з даним винаходом може бути використаний будь-який тип синтетично виробленої плюрипотентної стовбурові клітини. Індукують або перепрограмують дві основні категорії - плюрипотентні стовбурові клітини (iPSC) та стовбурові клітини, що продукуються за допомогою перенесення ядер (SCNT), ANT-OAR та партеногенезу.

[0020] Перенесення ядер соматичних клітин (SCNT) є технічним прийомом, при якому яйце ін'єкують ядрами зрілих соматичних клітин та імплантують до підготованої матки-реципієнта з одержанням живонароджених, що дають повні ядерні клони. Додатково, плюрипотентні

стовбурові клітини одержують в культурі згідно зі способами SCNT (Cell Reprogram. /2:105-113, 2010 and Genome Res., 19: 2193-2201, 2009).

[0021] Перенесення змінених ядер, перепрограмування за допомогою ооциту (ANT-OAR) є технічним прийомом, подібним до SCNT, проте, донорські ядра генетично змінюють перед введенням до яйця-реципієнта, тим самим попереджаючи диференціювання ANT-ооциту та утворення цілого організму (Genome Res. 19: 2193-2201, 2009).

[0022] Партеногенез (PGA) також застосовують для генерування плюрипотентних стовбурових клітин, використовуючи такі технічні прийоми як перенесення ядер, звільнених від вітелінового шару, активацію партеногенезу та технології клонування, такі як SCNT, також партеногенез (PGA) застосовують для генерування перепрограмованих плюрипотентних стовбурових клітин (Cell Reprogram., 12: 105-113, 2010 and Nature, 450:497-502 2007).

[0023] Ці плюрипотентні стовбурові клітини можуть підтримуватись в культурі протягом відносно тривалих невизначених періодів, що робить їх потенційним джерелом для біологічного виробництва, наприклад, рекомбінантних протеїнів, ДНК та вірусів.

15 Індуковані або перепрограмовані spPSC

[0024] Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини подібні до природних плюрипотентних стовбурових клітин, таких як ембріональні стовбурові клітини (ES), у багатьох аспектах, таких як експресування генів вказаних стовбурових клітин та протеїнів, профілі метилювання хроматину, час подвоєння, утворення ембріодних тілець, утворення тератоми, утворення життєздатної химери, потенція та здатність до диференціювання.

[0025] Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини, зазвичай скорочені як iPSC клітини або iPSC, є типом плюрипотентних стовбурових клітин, штучно отриманих з неплюрипотентних клітин, зазвичай зрілої соматичної клітини, шляхом індукування "примусової" експресії специфічних генів (Nature Reports Stem Cells. 2007).

25 [0026] Продукують індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (iPSC) шляхом трансфікування вказаних асоційованих із стовбуровими клітинами генів до неплюрипотентних клітин. Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини зазвичай отримують шляхом трансфікування вказаних асоційованих із стовбуровими клітинами генів до таких неплюрипотентних клітин, як зрілі фібробласти. Як правило, трансфекція досягається за допомогою вірусних векторів, таких як ретровіруси, або ретротранспозонів. Трансфіковані гени включають основні регулятори транскрипції Oct-3/4 (Pou5f1) та Sox2, хоча передбачається, що інші гени підвищують ефективність індукції. Через 3-4 тижні невеликі кількості трансфікованих клітин починають ставати морфологічно та біохімічно схожими на плюрипотентні стовбурові клітини, зазвичай їх виділяють за допомогою морфологічної селекції, часу подвоєння або за допомогою гена-репортера та антибіотичної селекції.

35 [0027] Ембріональні стовбурові клітини, отримані з фібробластів, зрілих фібробластів та інших клітин, перепрограмовують до плюрипотентного стану шляхом злиття з ембріональними стовбуровими клітинами (Cell. 126:652-655, 2006 and Stem Cell Rev, 2: 331-340, 2006), шляхом додавання 4 генів, застосовуючи методи ретровірусної трансфекції (Cell. 126:663-676, 2006), за допомогою одинарної касети або способів біцистронної лентивірусної трансфекції [Stem Cells., 27:543-549, 2009, and Stem Cells., 27:1042-1049, 2009), та шляхом ендогенної стимуляції плюрипотентності відповідних факторів транскрипції (Stem Cells, 27:3053-3062, 2009). Індукція плюрипотентності також може бути досягнута шляхом модифікації режиму метилювання або поліаденілювання геному (PLoS One., 4:e8419, 2009), за допомогою мікроПНК (Dev Biol., 344:16-25, 2010), низькомолекулярних активаторів відповідних факторів транскрипції, епігенетичного перепрограмування (Regen Med, 2:795-816, 2007), за допомогою протеїнового перепрограмування (Blood 116: 386-395, 2010), додаванням супернатанту культури клітин або клітинних екстрактів з плюрипотентних клітин при культивуванні, за допомогою хімічних, радіаційних або інших засобів генної мутації для реактивації плюрипотентних генів, та шляхом додавання факторів росту або цитокінів, або агентів клітинної сигналізації, які індукують або підтримують ендогенні плюрипотентні стани.

50 [0028] При застосуванні ретровірусів для перепрограмування клітин до плюрипотентних станів існує небезпека відкликання досліджень генної терапії імунodefіциту. Для видалення ретровірусів після завершення перепрограмування застосовують такі ексцизійні методи, як Cre-lox, а способи з застосуванням транспозону piggyBac повністю виключають потребу в ретровірусах (Curr Opin Biotechnol., 20:516-521, 2009).

60 [0029] Людські iPSC продукують шляхом трансформування людських фібробластів до плюрипотентних стовбурових клітин, застосовуючи чотири основні гени: Oct3/4, Sox2, Klf4 та c-Myc з ретровірусною системою. Продукують людські iPSC, також застосовуючи OCT4, SOX2, NANOG та диферентний ген LIN28, використовуючи лентивірусну систему. Для перенесення

необхідних чотирьох генів до ДНК шкіри та клітини печінки також застосовують аденовірус, що приводить до клітин, ідентичних ембріональним стовбуровим клітинам (Science 322(5903):945-949, 2008). Перепрограмування зрілої клітини до iPSC також може виконуватись за допомогою плазмиди без будь-якої вірусної трансфекційної системи взагалі (Science 322(5903):949-953, 2008). IPSC продукують з використанням системи транспозона piggyBac, мініциклічної технології, перепрограмування, стимульованого протеїном або кондиційованим середовищем.

[0030] Генерування iPS в значній мірі залежить від генів, застосовуваних для індукції. Було визначено, що Oct-3/4 та вказані представники сімейства Sox генів (Sox1, Sox2, Sox3 та Sox15) є ключовими регуляторами транскрипції, що відіграють активну роль в процесі індукції, відсутність яких робить індукцію неможливою. Крім того, було визначено, що додаткові гени, включаючи вказаних представників Klf сімейства (Klf1, Klf2, Klf4 та Klf5), Muc сімейства (C-muc, L-muc та N-muc), Nanog та LIN28, підвищують ефективність індукції.

° Oct-3/4 (Pou5f1) (кДНК, доступна від Bioclone, San Diego CA) (Nucleic Acids Res. 20 (17): 4613-20, 1992): Oct-3/4 - одне з сімейств октамерних факторів транскрипції ("Oct") та відіграє ключову роль в підтриманні плюрипотентності. Відсутність Oct-3/4 в клітинах Oct-3/4<sup>+</sup>, таких як бластомери та ембріональні стовбурові клітини, призводить до спонтанної трофобластної диференціації, а присутність Oct-3/4, відповідно, призводить до виникнення плюрипотентності та здатності ембріональних стовбурових клітин до диференціювання. Ряд інших генів сімейства "Oct", включаючи близьких родичів Oct-3/4-Oct1 та Oct6, не можуть викликати індукцію, тим самим демонструючи ексклюзивність Oct-3/4 для процесу індукції.

° сімейство Sox: сімейство генів Sox пов'язане з підтриманням плюрипотентності подібно до Oct-3/4, хоча воно пов'язане з мультипотентними та уніпотентними стовбуровими клітинами, на відміну від Oct-3/4, який ексклюзивно експресується в плюрипотентних стовбурових клітинах (Dev Biol. 227 (2): 239-55, 2000). Поряд з тим, що Sox2 (кДНК, доступна від Bioclone, San Diego, CA) був початковим геном, застосовуваним для індукції (Mamm. Genome 5 (10): 640-642, 1995), було виявлено, що інші гени в сімействі Sox з тим самим успіхом працюють у індукційному процесі. Sox1 (кДНК, доступна від Bioclone, Inc., San Diego, CA) виробляє iPS клітини з тією самою ефективністю, що й Sox2, а гени Sox3 (людська кДНК, доступна від Bioclone, Inc., San Diego, CA), Sox15 та Sox18 також генерують iPS клітини, хоча і з меншою активністю.

° сімейство Klf: Klf4 сімейства генів Klf є фактором для генерування мишачих iPS клітин. Klf2 (кДНК, доступна від Bioclone, Inc., San Diego, CA) та Klf4 (кДНК, доступна від Bioclone, Inc., San Diego, CA) є факторами, здатними генерувати iPS клітини, а споріднені гени Klf1 (кДНК, доступна від Bioclone, Inc., San Diego, CA) та Klf5 (кДНК, доступна від Bioclone, Inc., San Diego, CA) діють таким же чином, хоча і з меншою активністю.

° сімейство Muc: гени сімейства Muc є протоонкогенами, причетними до раку. C-тус (кДНК, доступна від Bioclone, Inc., San Diego, CA) є фактором, причетним до генерування мишачих iPS клітин. З іншого боку, c-тус не є необхідними для генерування людських iPS клітин. Використання сімейства генів "muc" в індукуванні iPS клітин є перешкодою для можливості клінічної терапії за допомогою iPS клітин, оскільки у 25 % мишей, трансплантованих індукованими c-тус клітинами iPS, розвинулися летальні тератоми. Замість c-тус для індукування з подібною ефективністю були виявлені N-muc (кДНК, доступна від Bioclone, Inc., San Diego, CA) та L-muc.

° Nanog: (кДНК, доступна від Bioclone, Inc., San Diego, CA) Nanog, поряд з Oct-3/4 та Sox2, є необхідним для активації плюрипотентності в ембріональних стовбурових клітинах (Cell 113 (5): 643-55, 2003).

° LIN28: (кДНК, доступна від Bioclone, Inc., San Diego, CA) LIN28 є протеїном, що зв'язує мРНК, експресованим в ембріональних стовбурових клітинах та в ембріональних ракових клітинах, пов'язаних з диференціацією та проліферацією (Dev Biol 258 (2): 432-42, 2003).

Ідентичність штучно одержаних плюрипотентних стовбурових клітин

[0031] Генеровані spPSC дуже схожі з виділеними в природних умовах плюрипотентними стовбуровими клітинами (такими як мишачі або людські ембріональні стовбурові клітини (ESC), mESC та hESC, відповідно) в наступних аспектах, тим самим підтверджуючи ідентичність, аутентичність та плюрипотентність spPSC з виділеними в природних умовах плюрипотентними стовбуровими клітинами: Біологічні властивості клітин:

° Морфологія: iPSC морфологічно подібні до ESC. Кожна клітина має округлу форму, велике ядро та мізерну цитоплазму. Колонії iPSC також подібні до колоній ESC. Людські iPSC утворюють загострені, плоскі, щільно упаковані колонії, подібні до hESC, а мишачі iPSC утворюють колонії, подібні до mESC, менш плоскі та більш агреговані колонії, ніж колонії hESC.

° Рости властивості: в зв'язку з тим, що стовбурові клітини повинні самооновлюватись, то час подвоєння та мітотична активність є фундаментальними елементами ESC як частина їх

визначення. iPSC є мітотично активними, активно самооновлюються, проліферують та діляться зі швидкістю, що дорівнює ESC.

5     ° Маркери стовбурових клітин: iPSC експресують ті самі антигенні маркери клітинної поверхні, що й ESC. Людські iPSC експресують маркери, специфічні до hESC, включаючи SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E та Nanog. Мишачі iPSC експресують SSEA-1, але не SSEA-3 або SSEA-4, подібно до mESC.

° Гени стовбурових клітин: iPSC експресують гени, експресовані в недиференційованих ESC, включаючи Oct-3/4, Sox2, Nanog, GDF3, REX1, FGF4, ESG1, DPPA2, DPPA4 та hTERT.

10    ° Теломеразна активність: теломерази необхідні для підтримання клітинного поділу, необмеженого межею Хейфліка, що дорівнює ~50 клітинним поділам. hESC експресують високу теломеразну активність для підтримання самооновлення та проліферації, iPSC також демонструють високу теломеразну активність та експресують hTERT (зворотна транскриптаза теломерази людини), необхідний компонент в теломеразо-протеїновому комплексі.

15    [0032] Плюрипотентність: до деякої міри iPSC здатні диференціювати, подібно до ESC, до повністю диференційованих тканин:

20    ° Нейральна диференціація: iPSC можуть диференціювати до нейронів, експресуючи βIII-тубулін, тирозингідроксилазу, AADC, DAT, ChAT, LMX1B та MAP2. Присутність катехоламін-зв'язаних ферментів може вказувати на те, що iPSC, подібно до hESC, можуть диференціювати до допамінергічних нейронів. Після диференціації пов'язані зі стовбуровими клітинами гени пригнічуються.

° Кардіальна диференціація: iPSC можуть диференціювати до кардіоміоцитів, що починають спонтанно пульсувати. Кардіоміоцити експресують TnTc, MEF2C, MYL2A, MYH9 та NKX2.5. Після диференціації пов'язані зі стовбуровими клітинами гени пригнічуються.

25    ° Утворення тератоми: iPSC, ін'єктовані в імунодефіцитну мишу, через дев'ять тижнів спонтанно утворюють тератоми. Тератоми - це пухлини, що мають множинне походження і містять тканини, отримані від трьох зародкових листків - ендодерму, мезодерму та ектодерму, вони не схожі на інші пухлини, які зазвичай являють собою лише один тип клітин. Утворення тератоми - це розпізнавальний тест на плюрипотентність.

30    ° Ембріодні тільця: в культурі hESC спонтанно утворюють сфероподібні ембріодні структури, названі "ембріодними тільцями", які складаються з кору мітотично активних та диференціюючих hESC і периферії - повністю диференційованих клітин усіх трьох зародкових шарів. iPSC також утворюють ембріодні тільця та мають периферійні диференційовані клітини.

35    ° Тетраплоїдна комплементация: iPS утворюють мишачі фетальні фібробласти, ін'єктовані в тетраплоїдні бластоцити (що власними силами можуть утворювати тільки екстраембріональні тканини), вони можуть утворювати цілі, не химерні, фертильні миші, хоча і з низьким показником ефективності. Метод тетраплоїдної комплементации - це біологічний метод, при якому клітини двох ссавцевих ембріонів об'єднують для утворення нового ембріону. Його застосовують для конструювання генетично модифікованих організмів для вивчення наслідків вказаних мутацій на ембріональний розвиток та при вивченні плюрипотентних стовбурових клітин.

40    [0033] Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (iPS) генерували з мезентеріальних клітин кишечника (Cell Reprogram., 12:237-241, 2010), ретинальних пігментованих епітеліальних клітин (Stem Cells., 25:1981-1991, 2010), амніотичних клітин (Differentiation., 50:123-129, 2010), фібробластів (J Vis Exp., 5:1553, 2009), зрілих нейральних клітин (Nature., Vol. 454, pp. 646-650, 2008), дентальної пульпи (J Dent Res, Vol. 89, pp. 773-778, 2010), жирових клітин (Cell Transplant., 19:525-536, 2010), оваріальних клітин (J Reprod Dev., 56:481-494, 2010) та багатьох інших клітин з ембріональних, фетальних та зрілих джерел. Теоретично, iPS клітини можуть продукуватись з будь-якого клітинного типу, хоча поки що не всі 220 типів клітин тіла систематично вивчені. Декілька недавніх досліджень продемонстрували, що iPS клітини зберігають "пам'ять" про тип клітин, з якого вони походять. Це розцінюється як перевага iPS клітин виключно швидко редиференціювати в культурі, інколи спонтанно, до типу клітин, з якого вони походять.

Виділення ендогенних стовбурових клітин

55    [0034] Стовбурові клітини, включаючи ендогенні плюрипотентні стовбурові клітини (ePSC), можуть бути охарактеризовані та виділені за допомогою специфічних антигенів, експресованих на їхній поверхні. Плюрипотентні стовбурові клітини можуть бути охарактеризовані експресією стадієспецифічного ембріонального антигена (SSEA), факторів транскрипції Oct4 та Nanog, та інших маркерів поряд із іншими способами. Простий тип ендогенних плюрипотентних стовбурових клітин, виділених на сьогоднішній день, являє собою дуже маленькі ембріоподібні стовбурові клітини (VSEL).



[0035] VSEL - це маленькі (у мишей 3-5 мікронів у діаметрі, у людей 3-7 мікронів у діаметрі) клітини з високим ядерно-цитоплазматичним співвідношенням. VSEL є позитивними відносно SSEA1, Oct4, Nanog, Rex1 та інших маркерів плюрипотентних стовбурових клітин відносно CD133, CD34, AP, cMet, LIF-R та CXCR4 (J Am Coll Cardiol 53(1):10-20, 2009; Stem Cell Rev 4:89-99, 2008). Вони є негативними відносно CD45. VSEL є меншими за розміром, ніж HSC (3-6 проти 6-8 мкм), та мають більш високе ядерно-цитоплазматичне співвідношення. Ядро VSEL велике, містить хроматин відкритого типу та оточене кільцем цитоплазми з чисельними мітохондріями. Відповідно, їх морфологія узгоджується з примітивними PSC.

[0036] Абсолютна кількість циркулюючих VSEL в ПВ є вкрай низькою (від 1 до 2 клітин в 1 мл крові за стаціонарних умов), а тому для їх ідентифікації та виділення застосовують спеціальні проточно-цитометричні протоколи. Фенотипічні маркери, що застосовують для ідентифікації VSEL, включають негативну експресію CD45 (миші та людини), позитивну експресію Sca-1 (миші), CXCR4, CD133 та CD34 (миші та людини), позитивні для прогеніторних стовбурових клітин маркери (іншими словами Oct-4, Nanog та SSEA) та експресію ряду маркерів, що характеризують лінію стовбурових клітин епібласт/зародок.

[0037] Застосовуючи тільки клітинний сортер з активацією флюоресценції, що сортує усі VSEL, присутні в 100 мл UCB, виділення VSEL може бути завершене за 4 робочі дні. Більш ефективний та економічний протокол трьохступінчатого виділення дозволяє одержати 60 % вихід від початкової кількості Lin-/CD45-/CD133<sup>+</sup> UCB-VSEL. Протокол включає лізис еритроцитів у гіпотонічному розчині хлориду амонію, селекцію клітин CD133<sup>+</sup> за допомогою імуномагнітних кульок та сортування Lin-/CD45-/CD133<sup>+</sup> клітин за допомогою FACS з контрольними маркерами розміру кульок. Виділені клітини значно збагачені Oct-4<sup>+</sup> та SSEA-4<sup>+</sup> популяцією маленьких, дуже примітивних Lin-/CD45-/CD133<sup>+</sup> клітин.

[0038] Інші способи для сортування VSEL базуються на присутності декількох поверхневих маркерів та діаметрі клітин. Якщо коротко, перший крок - це лізис еритроцитів, щоби одержати фракцію ядровмісних клітин. Буфер для лізису еритроцитів застосовують замість центрифугування з фіколом, тому що другий прогон може виснажити популяцію дуже маленьких клітин. Потім клітини фарбують з антитілами проти Sca-1 (мишачі VSEL) або CD133 (людські VSEL), пангемопоетичного антигена (CD45), маркерів ростків кровоутворення (lin) та CXCR4 і сортують, застосовуючи мультипараметричні системи сортигу живих стерильних клітин (MoFlo, Beckman Coulter; FACS Aria, Beckton Dickinson). Цей метод використовує "розтягнуті лімфоцитні ворота", щоб охопити об'єкти діаметром 2-1.0 мкм, які включають приблизно 95 % VSEL.

[0039] Ендогенні стовбурові клітини можуть міститися в моноклеарній клітинній фракції з кісткового мозку, цільної крові, пуповинної крові або інших джерел або можуть бути очищені шляхом селекції за CD34, CD133, CD105, CD117, SSEA1-4, виключенням барвника або іншими специфічними стовбуровоклітинними антигенами. Стовбурові клітини можуть бути виділені з цільної крові, кісткового мозку, пуповинної крові, жирової тканини, тканинних зіскобів з нейроепітелію та інших джерел стовбурових клітин, що можуть бути розділені на суспензії окремих клітин, наприклад, тканини пуповини, центрифугуванням в градієнті щільності, застосовуючи фікол-гіпак або інші комерційно доступні градієнти. У результаті таких процедур стовбурові клітини можуть бути виділені з моноклеарної фракції. У альтернативному варіанті стовбурові клітини можуть бути виявлені в інших фракціях після центрифугування в градієнті щільності (Stem Cells Dev. 2011 [Epub ahead of print]). Наприклад, пуповинна кров може бути розведена 1:1 в PBS, обережно розлита в Histopaque 1077 (Sigma) та відцентрифугована при 1500 обертів за хвилину при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Отримані шари, як зображено на Фігурі, можуть бути далі оброблені для виділення стовбурових клітин. Шар 1 - це шар тромбоцитів, шар 2 - лейкоцитарна плівка, що містить моноклеарні клітини, шар 3 - шар фіколу, а шар 4 - таблетка з червоних кров'яних тілець, що також містить VSEL. Шари 1, 2 та 3 збирають, розводять придатним середовищем, таким як DMEM F12 з або без FBS, та знову центрифугують, щоб отримати клітинну таблетку. Шар 4 розводять придатним середовищем, таким як DMEM F12, та центрифугують при 800 обертів за хвилину протягом 15 хвилин при кімнатній температурі на стандартній настільній центрифугі. Стовбурові клітини переважно відновлюють з шару 2 (лейкоцитарна плівка) та шару 4 (таблетка RBC), виходячи з проточно-цитометричних способів, вказаних вище. На Фігурі 1 показаний звичайний вигляд шарів, одержаних з цільної крові після центрифугування в градієнті. 1 показує тромбоцити; 2 - лейкоцитарну плівку з MNC та стовбуровими клітинами; 3 - фікол, а 4 - таблетку RBC та стовбурових клітин.

[0040] Додатково, оскільки різні тканини та типи клітин можуть відрізнятися за профілями глікозилювання та іншими посттрансляційними модифікаціями, то лінії пацієнт-специфічних стовбурових клітин готують із зрілих або соматичних клітин, виділених з органу чи ряду клітин, що ендогенно експресують біопрепарат. Див. Rajpert-De Meyts E, et al. "Changes in the profile of

simple mucin-type O-glycans and polypeptide GalNAc-transferases in human testis and testicular neoplasms are associated with germ cell maturation and tumour differentiation", Virchows Arch, Vol. 457:805-814 (2007). Див. Pevalova M., et al. "Post-translational modifications of tau protein". Bratisl Lek Listy, 107:346-353 (2006).

5        ДОКЛАДНИЙ ОПИС ПЕРЕВАЖНОГО ВАРІАНТУ ЗДІЙСНЕННЯ ВИНАХОДУ  
          Одержання іморталізованих spPSC та ePSC

[0041] У переважному варіанті здійснення даного винаходу spPSC та ePSC іморталізують, переважно шляхом невірусної індукції великого Т-антигену, зазвичай із застосуванням поліомавірусу ефіопського вірусу 40 (SV40). Див. Rose, M.R. et al., (1983). "Expression of the Large T Protein of Polyoma Virus Promotes the Establishment in Culture of "Normal" Rodent Fibroblast Cell Lines". PNAS 80: 4354-4358 (1983); та Hofmann, M.C. et al. "Immortalization of germinal cells and somatic testicular cells using the SV40 large T antigen" Experimental Cell Research, 207:417-435 (1992).

15        Огляд варіанту здійснення винаходу з використанням штучно одержаних, переважно індукованих, плюрипотентних стовбурових клітин або, більш переважно, виділених ендегенних плюрипотентних стовбурових клітин

[0042] У переважному варіанті здійснення винаходу:

1. Виділяють ендегенні плюрипотентні стовбурові клітини;
2. ePSC іморталізують;
- 20        3. Іморталізовані ePSC трансфікують відповідним геном, вірусом або нуклеїновою кислотою, застосовуючи невірусну технологію;
4. Потім трансфіковані, іморталізовані ePSC індукують для диференціації до лінії зародкових клітин, переважно клітин яєчника, для того, щоб експресувати нуклеїновокислий продукт більш ефективним способом;
- 25        5. Тепер диференційовану клітину індукують, щоб експресувати відповідний нуклеїновокислий продукт з попередньо трансфікованого вектора, що містить відповідні нуклеїнові кислоти.

[0043] У іншому варіанті здійснення винаходу:

1. Виділяють соматичні клітини;
- 30        2. Соматичні клітини трансформують в індуквані плюрипотентні стовбурові клітини (iPS клітини);
3. iPS клітини іморталізують;
4. Іморталізовані iPS клітини трансфікують відповідним геном, вірусом або нуклеїновою кислотою;
- 35        5. Потім трансфіковані, іморталізовані iPS клітини індукують для редиференціації до соматичних клітин для того, щоб експресувати протеїн більш ефективним способом;
6. Тепер редиференційовану клітину індукують, щоб експресувати відповідний протеїн з попередньо трансфікованого вектора, що містить відповідний ген.

[0044] У ще більш переважному варіанті здійснення винаходу:

- 40        1. Виділяють ендегенні плюрипотентні стовбурові клітини;
2. Іморталізовані ePSC трансфікують відповідним геном, вірусом або нуклеїновою кислотою, застосовуючи невірусну технологію;
3. Потім трансфіковані, іморталізовані ePSC індукують для диференціації до лінії зародкових клітин, переважно клітин яєчника, для того, щоб експресувати нуклеїновокислий продукт більш ефективним способом;
- 45        4. Тепер диференційовану клітину індукують, щоб експресувати відповідний нуклеїновокислий продукт з попередньо трансфікованого вектора, що містить відповідні нуклеїнові кислоти.

50        [0045] Способи виконання переважних варіантів здійснення цього винаходу добре відомі фахівцям у цій галузі техніки.

[0046] У альтернативних варіантах здійснення винаходу перед іморталізацією ePSC або spPSC трансфікують вектором, що містить відповідні нуклеїнові кислоти. Див. Du C. et al. "Generation of Variable and Fixed Length siRNA from a novel siRNA Expression Vector", Biomed. & Biophys. Res. Comm. 345:99-105 (2006); York Zhu, патентна заявка США № 12/313.554. подана 21 листопада 2008 г. Або ePSC чи spPSC індукують для редиференціації. потім іморталізують, а іморталізовані редиференційовані клітини трансфікують вектором, що містить відповідні нуклеїнові кислоти. Друга можливість полягає в тому, що ePSC або spPSC клітини індукують для редиференціації, редиференційовані клітини трансфікують відповідними нуклеїновими кислотами, а редиференційовані трансфіковані клітини іморталізують.

[0047] Переважно ePSC або spPSC клітини вирощувати в культурі перед редиференціацією. переважно в середовищі для культивування клітин, яке містить аутологічну сироватку людини та фактор стовбурових клітин або фактор інгібування лейкемії.

[0048] Продукований поліпептид або протеїн може бути будь-яким поліпептидом або протеїном. Особливий інтерес становлять поліпептиди або протеїни, вибрані з групи, що складається з еритропоєтину, фактора VIII, фактора IX, тромбіну, антитіла або фрагмента антитіла, альфа-інтерферону, альфа-інтерферону 2A та 2B (див. патенти США №№ 4,810,645 та 4,874,702), бета-інтерферону (див. патент США № 4,738,931), консенсусного інтерферону (див. патент США № 5,661,009), гормону росту, антигемофілічного фактора, G-CSF, GM-CSF, розчинного рецептора, злитих протеїнів, таких як розчинний рецептор, злитий до константної ділянки імуоглобуліну (Ig) (див. патент США № 5,155,027), TGF- $\beta$ , кісткових морфогенетичних білків (BMP), трансформуючої ростового фактора альфа (ТФР- $\alpha$ ), інтерлейкіну 2,  $\beta$ -глюкоцереброзидази або їх аналогів, інгібітора альфа І-протеїнази, фібрину, фібриногену, фактора Віллебранда, іміглюцерази, бета-агалзидази, ларонідази, альфа-ал глюкозидами, альфа-тмротропіну і а альфа-тимозину.

[0049] Будь-яке антитіло або фрагмент антитіла можуть бути одержані згідно зі способом за даним винаходом. Особливий інтерес становлять ті антитіла або фрагменти антитіл, які зв'язують мішень, де вказану мішень вибирають із групи, що складається з молекули фактора некрозу пухлин (TNF), рецептора фактора росту, молекули фактора росту ендотелію судин (VCGF), інтерлейкіну 1, інтерлейкіну 4, інтерлейкіну 6, інтерлейкіну 11, інтерлейкіну 12, гамма-інтерферону, активатора фактора ліганду ядерного фактора каппа-В (RANKL) та Blys.

Індукція диференціації стовбурових клітин

[0050] Для он тимізації одержання відповідного протеїну трансфіковані ePSC або spPSC клітини треба індукувати для диференціації до соматичної клітини.

[0051] У альтернативному варіанті здійснення винаходу популяцію ePSC або spPSC клітин розмножують, індукують диференціацію, а диференційовані клітини трансфікують відповідною нуклеїновою кислотою. Стовбурові клітини індукують для диференціації в напрямку до типів соматичних клітин в культурі шляхом додавання до неї різних факторів росту (Blood., 55:2414-2421, 1995), змінюючи поживні речовини в культуральному середовищі, маніпулюючи умовами культивування, такими як тиск кисню (BMC Cell Biol., 11:94, 2010) або температура, або шляхом культивування стовбурових клітин на різних позаклітинних матриксах, поряд з іншими способами, відомими фахівцю в галузі клітинної біології та клітинної диференціації. Наприклад, ретиноева кислота, TGF- $\beta$ , кісткові морфогенетичні білки (BMP), аскорбінова кислота та бета-гліцерофосфат призводять до продукування остеобластів; індометацин, IBMX (3-ізобутил-1-метилксантин), інсулін та трийодотиронін (Т3) призводять до продукування адипоцитів; aFGF, rFGF, вітамін D3, TNF- $\beta$  та ретиноева кислота призводять до продукування міоцитів (CARDIAC-DERIVED STEM CELLS. (WO/1999/049015) березень 1998). Зародкові клітини генерують із плюрипотентних стовбурових клітин, застосовуючи моношарову культуру, утворення ембріодних тілець (EB), коагрегацію з BMP4-продукуючим і клітинами та використання кондиційованого тестікулярними або оваріальними клітинами середовища або утворення EB з кістковими морфогенетичними білками людини (BMP) fPLoS One. 2009;4(4):e5338). Маркерні гени зародкових клітин включають домен PR, що містить 1, з доменом ZNF (PRDM1, також відомий як BLIMP1), домен PR, що містить 14 (PRDM14), протеїнаргінінметилпротеази 5 (PRMT5), DPPA3, IFITM3, GDF3, c-KIT, хемокінний (C-X-C мотив) рецептор 4 (CXCR4), NANOS1-3, DAZL, VASA, PIWI сімейство генів (PIWIL1 та PIWIL2, відомі як HIWI та HILI у людей відповідно), Mut-L гомолог-1 (MLH1), протеїн 1 синаптонемного комплексу 1 (SCP1) та SCP3. Отримані лінії зародкових клітин модифікують для експресії відповідних генних або протеїнових продуктів, аналогічно використанню клітин яєчника китайського хом'яка (CHO) та інших використовуваних на даний час продукуючих клітинних ліній. Стратегії диференціації для одержання різних ліній соматичних клітин зі стовбурових клітин на різних стадіях добре відомі фахівцям в галузі біології стовбурових клітин.

[0052] Відомо, що фактори транскрипції, асоційовані з високими рівнями біологічного продукування, котрансфікують відповідним геном для оптимізації рівнів експресії з пацієнт-специфічної клітинної лінії. Наприклад, високі рівні експресії Pit-1 можуть призводити до інтенсивної експресії пролактину в клітинному типі, одночасно блокуючи або попереджаючи експресію гормону росту (Genes Dev, 3:946-958, 1989).

[0053] Одержання моноклональних антитіл підвищують шляхом оптимізації генного кодону, застосовуючи системи, такі як ті, що розроблені Sino Biological Inc, морфогенез або інші стандартні біотехнологічні способи.

[0054] Відповідно до даного винаходу рекомбінантні поліпептиди та протеїни продукуються в ePSC та spPSC, де spPSC та ePSC вироблені або виділені з клітин специфічної породи або етнічної групи, оскільки деякі породи або етнічні групи специфічних видів тварин мають різні профілі глікозилювання в поліпептидах або протеїнах, продукуваних специфічною породою або етнічною групою. Відповідно до даного винаходу етнічна група - це група, представники якої ототожнюються за загальними спадковими ознаками, що часто складаються з загального родоходу або ендегамії (практика одружень в межах специфічної групи, наприклад, ашкенази). Як правило, це біологічно вельми незмінна група. Приклади етнічних груп, які можуть мати різні профілі глікозилювання в поліпептидах та протеїнах, продемонстровані в Levinson, David (1998), Ethnic Groups Worldwide: A Ready Reference Handbook, Greenwood Publishing Group.

#### СПОСОБИ ТА СИСТЕМИ ДЛЯ ТЕРАПІЇ СТОVBУРОВИМИ КЛІТИНАМИ

[0055] Даний винахід також включає спосіб стимулювання терапії стовбуровими клітинами без утворення тератом. Даний винахід стосується практичних порад та інструкцій, як успішно використовувати "пам'ять" перепрограмованих соматичних клітин, названих у даній заявці вищевказаними синтетично виробленими плюрипотентними стовбуровими клітинами (spPSC), для більш сприятливого терапевтичного ефекту. Пам'ять spPSC, що надає переваги редиференціювання в напрямку типу клітин, з яких вони походять, до перепрограмування, забезпечує засоби для підвищення безпеки та терапевтичної корисності spPSC для регенеративної медицини.) сновні кроки

[0056] Даний винахід включає:

1. Виділення відповідних соматичних клітин, особливо соматичних клітин, які бажано регенерувати;
2. Трансформацію соматичних клітин в штучно одержані плюрипотентні стовбурові клітини (spPSC), особливо індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (iPSC), як описано вище;
3. Розмноження популяції spPSC, де spPSC зберігають оригінальну епігенетичну пам'ять соматичних клітин;
4. Редиференціацію spPSC в культурі до соматичних клітин, що мають оригінальний тип соматичних клітин; і
5. Введення або доставки редиференційованих соматичних клітин до ділянки тіла, де бажаним є цей клітинний тип.

[0057] Ряд недавніх досліджень продемонстрував, що spPSC клітини зберігають "пам'ять" про тип клітин, з якого вони походять (Stem Cells. 28: 1981-1991, 2010), (Nature, 467(7313):285-90, 2010), (Nat Biotechnol, 28,: 848-855, 2010) та (Mol Hum Reprod., 16:880-885, 2010). Це виявляється в тому, що spPSC клітини виключно швидко редиференціюють в культурі, іноді спонтанно, до типу клітин, з якого вони походять. Вчені та клініцисти рішуче зосередили увагу на плюрипотентних стовбурових клітинах, які можуть бути корисними для клінічної терапії, пошуку нових ліків, моделювання хвороб або усунення токсичності (Curr Opin Biotechnol., 20: 516-521, 2009), випускаючи з уваги те, що аспект пам'яті плюрипотентних стовбурових клітин забезпечує безпечну терапію людини. Більше того, вчені, що опублікували дані про аспекти пам'яті перепрограмованих плюрипотентних стовбурових клітин, зосередили увагу на обмеженнях, які ця властивість spPSC клітин створює для терапії, та упустили важливість цієї властивості для забезпечення терапевтичної корисності цих клітин.

[0058] Аспект пам'яті spPSC спостерігається від соматичних клітин множинного походження. Наприклад, первинні фетальні ретинальні епітеліальні клітини були перепрограмовані до iPSC, застосовуючи лентивірусну експресію OCT4, SOX2, LIN28 та Nanog (Stem Cells. 28: 1981-1991, 2010), та пройшли стандартне тестування на плюрипотентність; вони утворювали тератоми та експресували маркери плюрипотентних стовбурових клітин. Після видалення основного FGF з поживного середовища декілька ліній ретинальних spPSC спонтанно редиференціювали назад до ретинальної епітеліальної клітинної лінії диференціювання. Приблизно 60 % клітин, що спонтанно диференціювали від фетальних ретинальних епітеліальних spPSC клітин людини, являють собою ретинальні епітеліальні клітини, у порівнянні з 5-16 % ретинальних епітеліальних клітин з spPSC від фетальних легеневи фібробластів людини або ESC клітин людини. Разом з тим, одній з трьох spPSC клітин від фетальних ретинальних епітеліальних клітин людини не вдалось диференціювати до ретинальних епітеліальних клітин взагалі. Kim et al. перепрограмували прогеніторні клітини кісткового мозку та дермальні фібробласти від старих мишей, застосовуючи ретровірусне введення Oct4, Sox2, Klf4 та Myc (Nature, 467(7313):285-90, 2010). Усі отримані лінії стовбурових клітин демонстрували плюрипотентність з використанням критеріїв, зазвичай застосовуваних до людських зразків. Наступна редиференціація їх перепрограмованих плюрипотентних стовбурових клітин продемонструвала, що гемопоетичні джерела редиференціюють до гемопоетичних ліній більш охоче, ніж фібробластні джерела, і,

подібним чином, фібробластні джерела редиференціюють до мезинхімальних ліній більш охоче, ніж гемопоетичні джерела. Автори також показали, що ця схильність редиференціювати переважно до лінії, з якої походять клітини, може бути частково подолана диференціацією до гемопоетичної лінії з наступним новим раундом плюрипотентного перепрограмування, а потім

додатковою диференціацією. Наприклад, перепрограмовані клітини, отримані від нервових прогеніторних клітин, були диференційовані до гемопоетичних ліній, потім перепрограмовані до плюрипотентності та показали більш високе утворення гемопоетичних колоній, ніж попередники нервових клітин, що були диференційовані до гемопоетичних клітин.

[0059] Подібні дослідження переваги перепрограмованих клітин редиференціювати до клітинних типів, з яких вони походять, були виконані з використанням невірусного перепрограмування фетальних нервових прогеніторних клітин людини (PLoS One., 4: e7076-e7088, 2009). Отримані перепрограмовані клітини експресували ряд маркерів плюрипотентності, маркери усіх трьох зародкових шарів, ембріодні тільця в культурі та тератоми; застосовуючи GeneChip-аналіз, автори продемонстрували, що перепрограмовані нервові прогеніторні клітини зберегли деяку експресію генів нервових стовбурових клітин. Polo et al. (Nat Biotechnol, 28,: 848-855, 2010), отримані плюрипотентні перепрограмовані клітини з кінчика хвоста миші продукували фібробласти, В-клітини селезінки, гранулоцити кісткового мозку та прекурсори скелетних м'язів. Автономні дослідження диференціації показали, що В-клітина селезінки та гранулоцит кісткового мозку перепрограмовують spPSC клітини утворювати гемопоетичні прогенітори більш ефективно, ніж spPSC клітини, що походять від фібробласта або скелетного м'яза. Цікаво, що серійне пасирування цих різних spPSC клітинних ліній веде до зникнення генетичних відмінностей та різниці в метилуванні до 16 пасажу, після цього клітини також демонстрували еквівалентні ефективності диференціації, на відміну від 4 пасажу згідно з попередніми результатами. Цікаво, що цей феномен неоднакового потенціалу диференціації не обмежувався перепрограмованими соматичними клітинами, а також спостерігався для ліній ембріональних стовбурових клітин, що виявляли відмінні генетичні сигнатури та спонтанну перевагу для диференціації до певних клітинних ліній (Nat Biotechnol., 26: 313-315, 2008) (Hum Reprod Update., 13: 103-120, 2007) (Dev Biol., 307:446-459, 2007) (BMC Cell Biol, 10:44, 2009).

[0060] Стовбурові клітини можуть бути охарактеризовані та виділені за допомогою специфічних антигенів, експресованих на їхній поверхні. Плюрипотентні стовбурові клітини можуть бути охарактеризовані експресією стадієспецифічного ембріонального антигена (SSEA), факторів транскрипції Oct4 та Nanog та інших маркерів поряд із іншими способами. Ембріональну стовбурову клітину, одержану з фібробластів та зрілих фібробластів та інших клітин, перепрограмовують до стану плюрипотентності шляхом злиття з ембріональними стовбуровими клітинами (Cell 126: 652-655, 2006 and Stem Cell Rev, 2: 331-340, 2006), шляхом додавання 4 генів, застосовуючи методи ретровірусної трансфекції (Cell 126: 663-676, 2006), за допомогою одинарної касети або способів біцетронної лентивірусної трансфекції (Stem Cells 27: 543-549, 2009 and Stem Cells 27: 1042-1049, 2009), та шляхом ендогенної стимуляції плюрипотентності відповідних факторів транскрипції Stem Cells 27: 3053-3062, 2009. Індукція плюрипотентності також може бути досягнута шляхом модифікації режиму метилування або поліаденілювання геному (PLoS One 4: e8419, 2009), за допомогою мікроPHK (Dev Biol. 344: 16-25, 2010), низькомолекулярних активаторів відповідних факторів транскрипції, епігенетичного перепрограмування (Regen Med. 2: 795-816, 2007 за допомогою протеїнового перепрограмування (Blood 116: 386-395, 2010), додаванням супернатанту культури клітин або клітинних екстрактів з плюрипотентних клітин при культивуванні, за допомогою хімічних, радіаційних або інших засобів генної мутації для реактивації плюрипотентних генів та шляхом додавання факторів росту або цитокінів, або агентів клітинної сигналізації, які індукують або підтримують ендогенні плюрипотентні стани. При застосуванні ретровірусів для перепрограмування клітин до плюрипотентних станів існує небезпека відкликання досліджень генної терапії імунодіфіциту. Ексцизійні методи, такі як Cre-lox, або способи з застосуванням транспозону piggyBac застосовують для видалення ретровірусів після завершення перепрограмування (Curr Opt Biotechnol. 20: 516-521, 2009). Способи клонування, такі як SCNT, та партеногенез (PGA) (Cell Reprogram. 12: 105-113, 2010) також застосовують для генерування перепрограмованих плюрипотентних стовбурових клітин (Nature 450:497-502, 2007).

[0061] Значна кількість ресурсів - економічних, інтелектуальних та трудових - була інвестована для виявлення різних джерел плюрипотентних стовбурових клітин, в першу чергу в надії на те, що ці стовбурові клітини будуть придатними для регенеративної медичної терапії людини. На жаль, за виключенням зрілих VSEL (Stem Cell Rev 4:89-99, 2008), всі плюрипотентні стовбурові клітини, виділені на сьогоднішній день, є неприйнятними через проблеми з утворенням тератом, пухлин і навіть неопластичних властивостей. Тому необхідно якимось

застосовувати ці плюрипотентні клітини для того, щоб виправдати економічні, інтелектуальні та трудові інвестиції, здійснені за останні 15 років або близько цього.

Стовбурові клітини можуть бути індуковані для диференціації у напрямку до типів соматичних клітин в культурі шляхом додавання до неї різних факторів росту (Blood 85:2414-2421, 1995), змінюючи поживні речовини в культуральному середовищі, маніпулюючи умовами культивування, такими як тиск кисню (BMC Cell Biol. 11:94, 2010 або температура, або шляхом культивування стовбурових клітин на різних позаклітинних матриксах, поряд із іншими способами, відомими фахівцям в галузі клітинної біології та клітинної диференціації. Наприклад, ретиноева кислота, TGF- $\beta$ , кісткові морфогенетичні білки (BMP), аскорбінова кислота та бета-гліцерофосфат призводять до продукування остеобластів; індометацин, IBMX (3-ізобутил-1-метилксантин), інсулін та трийодотиронін (T3) призводять до продукування адипоцитів; aFGF, PDGF, вітамін D3, TNF- $\beta$  та ретиноева кислота призводять до продукування мієоцитів (WO/1999/049015, березень 1998). Стратегії диференціації для одержання різних ліній соматичних клітин з стовбурових клітин на різних стадіях добре відомі фахівцям в галузі біології стовбурових клітин.

[0062] Терапія стовбуровими клітинами досліджується та удосконалюється для лікування багатьох захворювань людини. Інформація про клінічні випробовування, що міститься на NIH веб-сайті [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), нараховує більше 3000 досліджень стовбурових клітин. Апробовані захворювання включають: гематологічні злоякісні пухлини, лейкомії, лімфоми, рак, остеопороз, апластичну анемію та цитопенії, серповидно-клітинну хворобу та таласемію, дефіцит лімбальних стовбурових клітин, рак молочної залози, гострий інфаркт міокарду, хворобу коронарних артерій, хворобу периферичних судин, серцеву недостатність, цукровий діабет 1 типу, цукровий діабет 2 типу, інсульт, ураження спинного мозку, нейробластоми, розсіяний склероз, системний склероз, червоний вовчак, хронічне заживлення ран, опіки, заживлення переломів, відновлення хрящів, пухлини ЦНС, остеоартрит, ниркову недостатність, хворобу Паркінсона, мієломи, діабетичну стопу, цироз печінки та біліарний цироз печінки, дилатаційну кардіоміопатію, анемію, пігментну дистрофію сітківки, хворобу Крона, діабетичну нейропатію, мастоцитоз, рак яєчників, епілепсію, міастенію гравіс, аутоімунні захворювання, гранулематозну хворобу, остеонекроз, печінкову недостатність, тазову м'язову дистрофію, ліподистрофію, демієлінізуюче захворювання, дефекти хрящів, захворювання сітківки ока, вовчаковий нефрит, хворобу Альцгеймера, травматичне ураження мозку, саркому, міозити, гіперглікемію, макулярну дистрофію, виразковий коліт, м'язову дегенерацію та інші.

[0063] Стовбурові клітини можуть бути виділені з застосуванням різноманітних маркерів, відомих фахівцям у даній галузі техніки. Наприклад, перелік загальновідомих маркерів стовбурових клітин можна знайти на <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/appendix.asp#eii>. Нервові стовбурові клітини можна виділити за допомогою CD133; мезенхімальні стовбурові та прогеніторні клітини - з використанням рецептора кісткового морфогенетичного білка (BMPR); гемопоетичні клітини - за допомогою CD34, мезенхімальні стовбурові клітини - за допомогою комбінації маркерів CD34+Scal+Lin; гемопоетичні та мезенхімальні стовбурові клітини - за допомогою ckit, Strol або Thyl; нервові та панкреатичні прогенітори - за допомогою нестину; ектодермні, нервові та панкреатичні прогенітори - за допомогою віментину; та інших маркерів.

[0064] Даний винахід додатково забезпечує способи безпечного перепрограмування та редиференціювання соматичних клітин для регенеративної медицини. Корисні соматичні клітини можуть включати повністю диференційовані соматичні клітини, прогеніторні клітини або більш примітивні стовбурові клітини. Залежно від органу, що потребує регенеративної терапії, більш примітивні стовбурові клітини можуть бути більш або менш доступними шляхом пункції органу, біопсії, зіскобів або хірургічного доступу. Використання більш примітивних стовбурових клітин є переважним, коли є можливим доступ до цих клітин. Менш переважним є використання прогеніторних клітин, але більш переважним, ніж використання повністю диференційованих соматичних клітин.

[0065] Виділення соматичних клітин із специфічного органу, наміченого для лікування, перепрограмування цих соматичних клітин, короткочасне розмноження в культурі, яке гарантує збереження вродженої "пам'яті" spPSC, наступна редиференціація в культурі до типу клітин, з якого вони походять, з наступним терапевтичним застосуванням дозволяють способам на основі плюрипотентних стовбурових клітин бути використаними для лікування пацієнтів із зниженою небезпекою утворення пухлини або тератоми.

[0066] Перепрограмовані соматичні клітини застосовують між пасажами 1 та 12, більш переважно на пасажі 4. Перепрограмовані соматичні клітини диференціюють до клітинного типу для бажаної регенерації згідно зі стандартними способами клітинної біології та диференціації. Отриману терапевтичну клітину можна вводити внутрішньовенно, внутрішньоартеріально,

внутрішньом'язово або іншими ін'єкційними способами, застосовуючи стандартні ін'єкційні засоби, що можуть включати катетери, такі як NOGAStar або MyoStar ін'єкційні катетери, або інший придатний катетерний ін'єкційний пристрій. У альтернативному варіанті терапевтичні клітини можна вводити до тканини-мішені мінімально інвазивними або менш інвазивними хірургічними способами. Терапевтичні клітини можна вводити в буферній композиції, що містить 0-15 % аутологічного сироваткового альбуміну людини, більш переважно 5 %. Для лікування захворювань центральної нервової системи переважним буде забуферити терапевтичні клітини, застосовуючи аутологічну спинномозкову рідину. Терапевтичні клітини також можна вводити за допомогою підложки, такої як колаген, фібриноген, або іншого екстрацелюлярного матриксу або комбінації екстрацелюлярних матриксів, або за допомогою волокна, наприклад, створеного на основі альгінату або інших стандартних способів для утримання клітин на місці та збереження контакту з органом, що потребує регенеративного відновлення.

[0067] У переважному варіанті вводять мінімум 500 терапевтичних клітин, зазвичай в клітинній терапії використовують від 15 мільйонів до 500 мільйонів клітин. Більш переважно, від 15 мільйонів до 100 мільйонів клітин вводять для забезпечення максимальної користі.

[0068] Для прикладу, для клітинної терапії неврологічних захворювань, таких як хвороба Альцгеймера, Паркінсона, інсульт, хвороба Хантингтона, розсіяний склероз, параліч та інші захворювання центральної нервової (ЦНС), переважним буде виділяти нейроепітелію, застосовуючи жорсткі ендоскопи, як опубліковано (J Spinal Cord Med. 29:191-203, 2006). Нервові стовбурові та прогеніторні клітини або обкладинкові нейроепітеліальні клітини виділяють із нейроепітелію згідно зі способами, добре відомими фахівцям, що практикують в галузі регенеративної медицини. У альтернативному варіанті стовбурові клітини нервового валіка можуть бути виділені з волосяних фолікулів людини (Folia Biol. 56:149-157, 2010). У переважному варіанті нервові стовбурові клітини перепрограмовують шляхом додавання певних факторів, розмножують та пасирують протягом 4 пасажів, редиференціюють до специфічних типів клітин центральної нервової системи шляхом додавання певних факторів, а потім вводять пацієнту для регенеративної терапії.

[0069] Винахід забезпечує способи безпечного перепрограмування та редиференціювання соматичних клітин для регенеративної медицини. Корисні соматичні клітини можуть включати повністю диференційовані соматичні клітини, прогеніторні клітини або більш примітивні стовбурові клітини. Залежно від органу, що потребує регенеративної терапії, більш примітивні стовбурові клітини можуть бути більш або менш доступними шляхом пункції органу, біопсії, зіскобів або хірургічного доступу. Використання більш примітивних стовбурових клітин є переважним, коли можливий доступ до цих клітин. Менш переважним є використання прогеніторних клітин, але більш переважним, ніж використання повністю диференційованих соматичних клітин.

[0070] Для відновлення спінальних уражень нейроепітелію виділяють за допомогою жорсткого ендоскопа, нервові стовбурові клітини виділяють, застосовуючи нейросферний аналіз, вперше описаний у 1992 Reynolds та Weiss (Science, 255:1707-1710, 1992), епідермальний фактор росту (EGF) та основний фактор росту фібробластів (bFGF) додають до клітин, які декілька днів зберігалися в культурі нейроепітелію, для стимулювання росту нейросфер, нервові стовбурові клітини здатні відновлюватися в культурі протягом 7-10 днів. Отримані нервові стовбурові клітини перепрограмовують додаванням епісомальних векторів для доставки OCT4 та NANOG з гігromіциновою селекцією протягом 5-7 днів. Клітини пасирують та розмножують до пасажу 4 для одержання неінтегрованих колоній, а потім диференціюють до обкладинкових нейроепітеліальних та стовбуроподібних нервових прогеніторних клітин, застосовуючи аутологічну спинномозкову рідину або певні фактори. Уражений спинний мозок піддають хірургічному втручанню, застосовуючи стандартний серединний розріз та задню серединну мієлотомію, тканину рубця видаляють наскільки це можливо, терапевтичні клітини забуфоруєть аутологічною спинномозковою рідиною, висівають до біоактивної підложки та наносять безпосередньо на ушкоджений спинний мозок.

#### ПРИКЛАДИ

##### Приклад 1

Генетична модифікація пацієнт-специфічних штучно одержаних плюрипотентних стовбурових клітин для продукування рекомбінантних протеїнів

[0071] Штучно одержані плюрипотентні стовбурові клітини (spPSC), такі як SCNT або PGA, або ANT-OAR, або iPSC, брали від пацієнтів для генетичної модифікації, щоб індукувати біологічне продукування. Одержані методом SCNT стовбурові клітини готували шляхом перенесення ядер клітин пацієнта до підготовленого без'ядерного ооциту. Одержані методом ANT-OAR стовбурові клітин готували шляхом генетичної модифікації ядерних ДНК пацієнта

перед перенесенням модифікованих ядер до підготовленого без'ядерного ооциту. Одержані методом iPSC стовбурові клітини готували шляхом перепрограмування клітин пацієнта, застосовуючи генетичну модифікацію, активатори плюрипотентного фактора транскрипції, епігенетичну модифікацію або інші способи, відомі з рівня техніки, як вказано вище. Отриману

5 пацієнт-специфічну синтетично вироблену лінію стовбурових клітин "зберігали" як головний клітинний банк та робочий банк клітин для наступної генетичної модифікації для біологічного продукування.

[0072] Зародкові клітини генерували з плюрипотентних стовбурових клітин, застосовуючи моношарову культуру, утворення ембріоїдних тілець (EB), коагрегацію з BMP4-продукуючим и

10 клітинами, використання кондиційованого тестикулярними чи оваріальними клітинами середовища або утворення EB з рекомбінантними кістковими морфогенетичними білками (BMP). Зародкові клітини ідентифікували за допомогою експресії маркерних генів, які можуть включати домен PR, що містить 1, з доменом ZNF (PRDM1, також відомий як BLIMP1), домен PR, що містить 14 (PRDM14), протеїнаргінінметилпротеазу 5 (PRMT5), DPPA3, IFITM3, GDF3, c-

15 KIT, хемокінний (C-X-C мотив) рецептор 4 (CXCR4), NANOS1-3, DAZL, VASA, PIWI сімейство генів (PIWIL1 та PIWIL2, відомі як HIWI та HILI у людей відповідно), Mut-L гомолог-1 (MLH1), протеїн 1 синаптомемного комплексу 1 (SCP1) та SCP3. Отримані зародкові клітини трансфікували відповідним геном, таким як Фактор VIII, згідно зі способами, зазвичай використовуваними для виробництва рекомбінантного Фактора VIII.

#### 20 Приклад 2

Генетична модифікація пацієнт-специфічних штучно одержаних плюрипотентних стовбурових клітин для продукування рекомбінантного інсуліну.

[0073] Штучно одержані плюрипотентні стовбурові клітини (spPSC), такі як одержані методами SCNT або PGA, або ANT-OAR, або iPSC стовбурові клітини, брали від пацієнтів для

25 генетичної модифікації, щоб індукувати біологічне продукування. Одержані методом SCNT стовбурові клітини готували шляхом перенесення ядер клітин пацієнта до підготовленого без'ядерного ооциту. Одержані методом ANT-OAR стовбурові клітини готували шляхом генетичної модифікації ядерних ДНК пацієнта перед перенесенням модифікованих ядер до підготовленого без'ядерного ооциту. Одержані методом iPSC стовбурові клітини готували

30 шляхом перепрограмування клітин пацієнта, застосовуючи генетичну модифікацію, активатори плюрипотентного фактора транскрипції, епігенетичну модифікацію або інші способи, відомі з рівня техніки, як вказано вище. Отриману пацієнт-специфічну синтетично вироблену лінію стовбурових клітин "зберігали" як головний клітинний банк та робочий банк клітин для наступної генетичної модифікації для біологічного продукування.

[0074] Експресію інсулінових прекурсорів у пацієнт-специфічних стовбурових

35 клітинах проводили згідно зі способами, зазвичай використовуваними для виробництва інсуліну в *S. cerevisiae*: [Kjeldsen T., et al, "Engineering-enhanced protein secretory expression in yeast with application to insulin". 21, May 2002, J Biol Chem., 277:18245-18248 (May 2002); Zhang B., et al., "Intracellular retention of newly synthesized insulin in yeast is caused by endoproteolytic processing in the Golgi complex"., J Cell Biol., 755:1187-1198 (June 2001); and Kristensen C. et al, "Alanine scanning mutagenesis of insulin"., J Biol Chem., 272:12978-12983 (May 1997)], або *E. coli* [Son Y.J., et al "Effects of beta-mercaptoethanol and hydrogen peroxide on enzymatic conversion of human proinsulin to insulin"., J. Microbiol Biotechnol, 75:983-989 (May 2008)], потім обробляли та очищували згідно зі стандартними способами. Пацієнт-специфічну клітинну лінію, що експресує

40 прекурсори інсуліну, "зберігали" як головний клітинний банк та робочий банк клітин для наступного продукування інсуліну.

#### 45 Приклад 3

Генерування бета-клітин для продукування інсуліну з використанням генетичної модифікації пацієнт-специфічних штучно одержаних плюрипотентних стовбурових клітин.

[0075] Для одержання інсуліну соматичні клітини брали від пацієнтів для генетичної

50 модифікації, щоб виробляти spPSC, та застосовували їх для індукування біологічного виробництва. spPSC стовбурові клітини готували шляхом перепрограмування клітин пацієнта, застосовуючи генетичну модифікацію, активатори плюрипотентного фактора транскрипції, епігенетичну модифікацію або інші способи, відомі з рівня техніки. Отриману пацієнт-специфічну

55 лінію стовбурових клітин "зберігали" як головний клітинний банк та робочий банк клітин для наступної генетичної модифікації для біологічного продукування. Або ендогенні плюрипотентні стовбурові клітини (ePSC) виділяли згідно з методами, описаними вище, та зберігали.

[0076] Експресію інсулінових прекурсорів у пацієнт-специфічних стовбурових клітинах проводили згідно зі способами, зазвичай використовуваними для виробництва інсуліну в *S. cerevisiae* або *E. coli*, як описано вище. Після генної трансфекції підходящими генними

60



конструктами, що кодують інсулін, клітини диференціювали в напрямку бета-клітинного родоходу згідно зі стандартним протоколом, знайденим у [Shi, Y., et. Al. "Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid". *Stem Cells.*, 23:656-662 (2005); або Tateishi, K., et. Al. "Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts"., *J Biol Chem.*, 253:31601-31607 (2008)] of the Beta Cell Biology Consortium, [http://www.protocolonline.org/prot/Cell\\_Biology/Stem\\_Cells/Differentiation\\_of\\_Stem\\_Cell/index.html](http://www.protocolonline.org/prot/Cell_Biology/Stem_Cells/Differentiation_of_Stem_Cell/index.html). Protocol Online. [Online] [Cited: Dec 19, 2010.]

[0077] Отриманий експресований біологічний продукт потім обробляли та очищували згідно зі стандартними способами. Отриману пацієнт-специфічну лінію стовбурових клітин, що експресує інсулінові прекурсори, "зберігали" як головний клітинний банк та робочий банк клітин для наступної генетичної модифікації для біологічного продукування.

[0078] У альтернативному варіанті отримані пацієнт-специфічні стовбурові клітини диференціювали в напрямку бета-клітинного родоходу згідно зі стандартним протоколом, знайденим у Shi et. Al. id. або Tateishi et. Al. id of the Beta Cell Biology Consortium id. Експресію інсулінових прекурсорів у диференційованих пацієнт-специфічних стовбурових клітинах проводили згідно зі способами, зазвичай використовуваними для виробництва інсуліну в *S. cerevisiae*: або *E. coli*, як описано вище. Отриманий експресований біологічний продукт потім обробляли та очищували згідно зі стандартними способами.

#### Приклад 4

Виділення клітин, що продукують зрілі (соматичні) антитіла, для перепрограмування та трансфекції для виробництва терапевтичних засобів на основі антитіл.

[0079] В-клітини, що продукують антитіла, виділяли з периферичної крові, кісткового мозку та інших легкодоступних джерел гемопоетичних клітин з метою генерування пацієнт-специфічних продукуючих клітинних ліній для одержання біопрепаратів на основі антитіл. Виділяли В-клітини, застосовуючи доступні набори CD19 експресії (StemCell Technologies). Для відбору клітин, що продукують максимальні рівні імуноглобуліну (Ig), застосовували методи серійних розведень або клітинного сортування. Після нетривалого розмноження клональну клітину, що продукує високі рівні Ig, перепрограмували до стану плюрипотентної або прогеніторної клітини, застосовуючи стандартні методи перепрограмування. Отримані пацієнт-специфічні стовбурові клітини трансфікували бажаними генними конструктами, що кодують антитіло, застосовуючи стандартні способи та методи молекулярної біології. Отримане експресоване терапевтичне антитіло обробляли та очищували згідно з біотехнологічними способами на найвищому сучасному рівні, загальнодоступними або збереженими на конфіденційній основі власниками композиції сполук для терапевтичного засобу на основі антитіла. Способи одержання бажаного очищеного продукту, що містить антитіло, включають йонообмінну хроматографію.

#### Приклад 5

Виділення клітин, що продукують зрілі (соматичні) антитіла, для перепрограмування та трансфекції для виробництва біологічних терапевтичних засобів на основі антитіл з редиференціацією до клітин, що продукують соматичні антитіла.

[0080] В-клітини, що продукують антитіла, виділяли з периферичної крові, кісткового мозку та інших легкодоступних джерел гемопоетичних клітин з метою генерування пацієнт-специфічних продукуючих клітинних ліній для одержання біопрепаратів на основі антитіл. Для відбору клітин, що продукують максимальні рівні імуноглобуліну (Ig), застосовували методи серійних розведень або клітинного сортування. Після нетривалого розмноження клональну клітину, що продукує високі рівні Ig, перепрограмували до стану плюрипотентної або прогеніторної клітини, застосовуючи стандартні методи перепрограмування. Отримані пацієнт-специфічні стовбурові клітини трансфікували бажаними генними конструктами, що кодують антитіло, застосовуючи стандартні способи та методи. Після генної модифікації лінію плюрипотентних пацієнт-специфічних клітин диференціювали до В-клітин, продукуючих зріле антитіло, шляхом культивування клітин в присутності CD40L, BAFF, активації Toll-подібного рецептора (TLR) [Hayashi E.A., et al. "TLR4 promotes B cell maturation: independence and cooperation with B lymphocyte-activating factor"., *J Immunol.*, 184:4662-4672 (2010), або інших факторів дозрівання В-клітин, відомих з рівня техніки, таких як активація рецептора В-клітин (BCR) та активація сімейства лігандів Notch-рецептора [Palanichamy A. et al. "Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy". 10, May 2009, *J Immunol*, Vol. 182, pp. 5982-5993 (2009); Thomas M.D. et al., "Regulation of peripheral B cell maturation"., *Cell Immunol*, 239:92-102 (2006).

[0081] Титри та афінність терапевтичного антитіла можуть бути покращені шляхом застосування таких способів, як морфогенетичні методи, як описано в Li J., et al., "Human antibodies for immunotherapy development generated via a human B cell hybridoma technology", Proc Natl Acad Sci, 103:3557-3562 (2006). Отримане експресоване терапевтичне антитіло обробляли та очищували згідно з біотехнологічними способами на найвищому сучасному рівні, загальнодоступними або збереженими на конфіденційній основі власниками композиції сполук для терапевтичного засобу на основі антитіла.

[0082] У альтернативному варіанті лінію плюрипотентних пацієнт-специфічних клітин диференціювали до В-клітин, продукуючих зріле антитіло, шляхом культивування клітин в присутності CD40L, BAFF, активації Toll-подібного рецептора (TLR) (див. Hayashi, et al. id) або інших факторів дозрівання В-клітин, відомих з рівня техніки, таких як активація рецептора В-клітин (BCR) та активація сімейства лігандів Notch-рецептора (див. Palanichamy A. et al. id., and Thomas, M.D. et al. id). Титри та афінність терапевтичного антитіла можуть бути покращені шляхом застосування таких способів, як морфогенетичні методи, як описано (див. Li, et al. id.).

[0083] Отримані пацієнт-специфічні клітини, що продукують антитіло, трансфікували бажаними генними конструктами, що кодують антитіло, застосовуючи стандартні способи та методи. Отримане експресоване терапевтичне антитіло обробляли та очищували згідно з біотехнологічними способами на найвищому сучасному рівні, загальнодоступними або збереженими на конфіденційній основі власниками композиції сполук для терапевтичного засобу на основі антитіла.

#### Приклад 6

Генерування пацієнт-специфічних клітинних ліній для одержання високоактивних ADCC антитіл

[0084] N-ацетилглюкозамінова (GlcNac) посттрансляційна модифікація імуноглобулінів є важливою для антитілозалежної клітинно-опосередкованої токсичності (ADCC), а нефукозильовані GlcNac залишки мають більш високу афінність до Fc гамма-рецепторів Mori K., et al., "Non-fucosylated therapeutic antibodies: the next generation of therapeutic antibodies", Cytotechnology, 55:109-114 (2007).

[0085] Відповідно, коли метою є антитіло з високими рівнями ADCC, то бажаною є пацієнт-специфічна клітинна лінія, здатна переносити GlcNac на належному рівні, та є бажаним залишати нефукозильовані GlcNac. Відомо, що клітини карциноми експресують високі рівні GMD, і оскільки ракові стовбурові клітини та плюрипотентні клітини мають схожі генні сигнатури, то припускається, що й плюрипотентні клітини також можуть експресувати високі рівні GMD - ферменту, що відповідає за посттрансляційне GlcNac зв'язування. Серед нормальних тканин підвищені рівні GMD експресують товста кишка та підшлункова залоза. Дефіцит FUT8, відповідального за ферментт, що фукозилує антитіла, буде бажаним в лінії пацієнт-специфічних стовбурових клітин для одержання терапевтичного антитіла, такого як ритуксимаб або герцептин. ефективність якого залежить від активності ADCC. Наприклад, моноклональні антитіла, що продукуються клітинами гібридами YB2/0 щура, мають у 50 разів більш високу активність ADCC, ніж такі ж антитіла, що продукуються з використанням CHO клітин. Отримані з адипозної тканини стовбурові клітини та зародкові клітинні лінії, так само як і лімфома з В-клітин, експресують більш високі ніж середній рівні FUT8, тоді як гемопоетичні стовбурові клітини (HSC), незрілі В-клітини, нормальні скелетні м'язи експресують більш низькі ніж середній рівні FUT8.

[0086] Гемопоетичні стовбурові клітини виділяли згідно зі стандартними способами з аспіратів кісткового мозку або афереза цільної крові, з або без попередньої обробки агентами, що мобілізують стовбурові клітини. Потім виділені HSC перепрограмували до плюрипотентності, як описано раніше. Отримані пацієнт-специфічні стовбурові клітини трансфікували бажаними генними конструктами, що кодують антитіло, застосовуючи стандартні способи та методи. Після генної трансфекції лінію плюрипотентних пацієнт-специфічних клітин диференціювали до В-клітин, що продукують зріле антитіло, шляхом культивування клітин в присутності CD40L, BAFF, активації Toll-подібного рецептора (див. Hayashi E.A., et al., id.) або інших факторів дозрівання В-клітин, відомих з рівня техніки, таких як активація рецептора В-клітин (BCR) та активація сімейства лігандів Notch-рецептора (див. Palanichamy A. et al. id., and Thomas, M.D. et al. id.). Титри та афінність терапевтичного антитіла можуть бути покращені шляхом застосування таких способів, як морфогенетичні методи, як описано (див. Li, et al. id.). Отримане експресоване терапевтичне антитіло обробляли та очищували згідно з біотехнологічними способами на найвищому сучасному рівні, загальнодоступними або збереженими на конфіденційній основі власниками композиції сполук для терапевтичного засобу на основі антитіла.

[0087] У альтернативному варіанті В-клітини, що продукують антитіла, виділяли з периферичної крові, кісткового мозку та інших легкодоступних джерел гемопоетичних клітин з метою генерування пацієнт-специфічних продукуючих клітинних ліній для одержання біопрепаратів на основі антитіл. Для відбору клітин, що продукують максимальні рівні імунoglobulinу (Ig), застосовували методи серійних розведень або клітинного сортування. Після нетривалого розмноження клональну клітину, що продукує високі рівні Ig, перепрограмували до стану плюрипотентної або прогеніторної клітини, застосовуючи стандартні методи перепрограмування. Отримані пацієнт-специфічні стовбурові клітини трансфікували бажаними генними конструктами, що кодують антитіло, застосовуючи стандартні способи та методи. Після генної модифікації лінію плюрипотентних пацієнт-специфічних клітин диференціювали до HSC, незрілих В-клітин або клітин скелетних м'язів для одержання терапевтичних антитіл, що не мають або мають низький вміст фукози.

[0088] Хоча переважний варіант здійснення винаходу проілюстрований та описаний, як відмічалось вище, може бути здійснений ряд змін без відступу від сутності та об'єму винаходу. Таким чином, об'єм винаходу не обмежується розкриттям переважного варіанта здійснення. Навпаки, винахід цілком повинен визначатись відповідно до наступної формули винаходу.

#### КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

[0089] Переважні та альтернативні приклади даного винаходу докладно описані нижче з посиланням на наступні графічні матеріали.

[0090] На Фігурі 1 зображені шари, отримані в результаті центрифугування цільної крові в градієнті.

#### ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

1. Спосіб одержання виділеного терапевтичного рекомбінантного біологічного поліпептиду або білка для лікування захворювання, який включає трансфікування штучно одержаної плюрипотентної стовбурової клітини (spPSC) нуклеїновою кислотою, яка кодує вказаний терапевтичний рекомбінантний біологічний поліпептид або білок, за умов, при яких вказаний поліпептид або білок експресується вказаною spPSC, причому вказаний поліпептид або білок далі виділяють з вказаної spPSC і вказана spPSC одержана з клітини тварини.

2. Спосіб за п. 1, в якому вказаний поліпептид або білок вибирають із групи, що складається з еритропоєтину, фактора VIII, фактора IX, тромбіну, антитіла або фрагмента антитіла, альфа-інтерферону, альфа-інтерферону 2A та 2B, бета-інтерферону, гормону росту, антигемофільного фактора, Г-КСФ, ГМ-КСФ, розчинного рецептора, трансформуючого ростового фактора бета (ТФР-β), кісткових морфогенетичних білків (BMP), трансформуючого ростового фактора альфа (ТФР-α), інтерлейкіну 2, β-глюкоцереброзидази або її аналога, інгібітора альфа 1-протеїнази, фібрину, фібриногена, фактора Віллебранда, іміглюцерази, агалзидази-бета, ларонідази, глюкозидази-альфа, тиротропіну-альфа та тимозину-альфа.

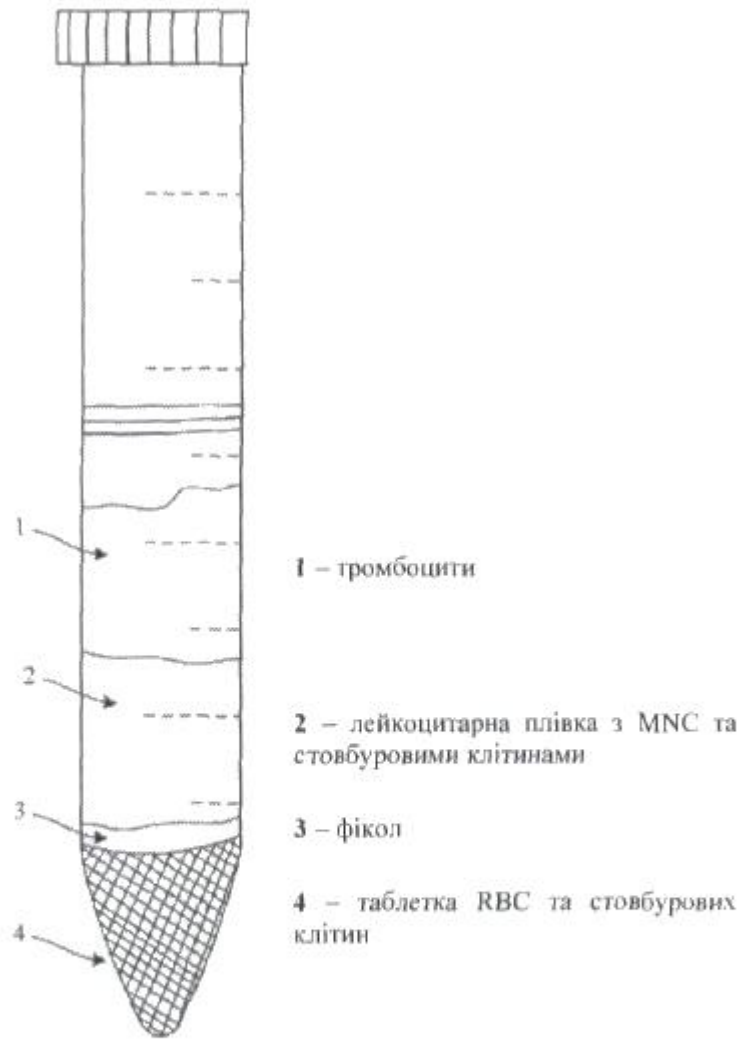
3. Спосіб за п. 1, який додатково включає здійснення іморталізації вказаної трансфікованої spPSC.

4. Спосіб за п. 3, який додатково включає індукування диференціації вказаних трансфікованих, іморталізованих spPSC.

5. Спосіб за п. 1, який додатково включає індукування диференціації трансфікованих spPSC.

6. Спосіб за п. 4, який додатково включає іморталізацію трансфікованих диференційованих клітин.

7. Спосіб за п. 1, в якому вказана spPSC вибрана з групи, що складається з трансфікованих неплюрипотентних клітин, плюрипотентних стовбурових клітин, одержаних шляхом перенесення ядра соматичної клітини (SCNT плюрипотентні стовбурові клітини), плюрипотентних стовбурових клітин, одержаних шляхом перенесення змінених ядер, перепрограмуванням з використанням яйцеклітини (ANT-OAR плюрипотентні стовбурові клітини) та плюрипотентних стовбурових клітин, одержаних шляхом партеногенезу (PGA плюрипотентних).



Шари, отримані центрифугуванням цільної крові в градієнті щільності

**ФІГУРА 1**

---

Комп'ютерна верстка О. Рябко

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601