



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(52) СПК  
C12N 5/0677 (2024.08); A01N 1/0284 (2024.08)

(21)(22) Заявка: 2020111055, 11.09.2018  
(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
11.09.2018  
Дата регистрации:  
05.11.2024  
Приоритет(ы):  
(30) Конвенционный приоритет:  
11.09.2017 EP 17190412.1  
(43) Дата публикации заявки: 17.09.2021 Бюл. № 26  
(45) Опубликовано: 05.11.2024 Бюл. № 31  
(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 17.03.2020  
(86) Заявка РСТ:  
EP 2018/074390 (11.09.2018)  
(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2019/048690 (14.03.2019)  
Адрес для переписки:  
197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-  
ПАТЕНТ", М.В. Хмара

(72) Автор(ы):  
**КИРКЕГОРД, Жаннетт, Схлихтинг (DK)**  
(73) Патентообладатель(и):  
**НОВО НОРДИСК А/С (DK)**  
(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: AMERI JACQUELINE et al. Efficient  
generation of glucose-responsive beta cells from  
isolated GP2+ Human Pancreatic Progenitors,  
Cell Reports, 04.04.2017, 19, 36-49, doi:10.1016/  
j.celrep.2017.03.032. ANGELA J CHURCHILL  
et al. Genetic evidence that Nkx2.2 acts primarily  
downstream of Neurog3 in pancreatic endocrine  
lineage development, 10.01.2017, (см. прод.)

**(54) ОБОГАЩЕНИЕ КЛЕТКАМИ, СОВМЕСТНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИМИ НКХ6.1 И С-ПЕПТИД, ПОЛУЧЕННЫМИ IN VITRO ИЗ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

(57) Реферат:  
Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к способу обогащения агрегатов эндокринных клеток, полученных in vitro из стволовых клеток, эндокринными клетками, совместно экспрессирующими НКХ6.1 и С-пептид, или эндокринными клетками-предшественниками, совместно экспрессирующими НКХ2.2 и НКХ6.1. Указанный способ предусматривает обеспечение диссоциации вышеуказанных агрегатов эндокринных клеток на отдельные клетки, обработку указанных отдельных клеток средой для криоконсервации

и снижение температуры с получением криоконсервированных эндокринных клеток, оттаивание вышеуказанных криоконсервированных эндокринных клеток и обеспечение повторной агрегации указанных эндокринных клеток, полученных после оттаивания. Изобретение эффективно для обогащения агрегатов эндокринных клеток, полученных in vitro из стволовых клеток, эндокринными клетками, совместно экспрессирующими НКХ6.1 и С-пептид, или эндокринными клетками-предшественниками,

(56) (продолжение):

doi: 10.7554/eLife.20010. RU 2569834 C1, 27.11.2015. TOYODA TARO. Cell aggregation optimizes the differentiation of human ESCs and iPSCs into pancreatic bud-like progenitor cells, Stem Cell Research, Vol. 14, Issue 2, 2015, pp. 185-197, doi.:10.1016/j.scr.2015.01.007. КОПИЧ Ю.И. и др. Влияние низкотемпературного хранения трансплантатов поджелудочной железы на уровень глюкозы в крови и репаративные процессы в организме реципиентов (экспериментальное исследование), Клеточные технологии, тканевая инженерия и регенеративная медицина, 2016, т. 18, No. S, с. 197.

R U 2 8 2 9 7 7 7 C 2

R U 2 8 2 9 7 7 7 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12N 5/071* (2010.01)  
*A01N 1/02* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*C12N 5/0677 (2024.08); A01N 1/0284 (2024.08)*

(21)(22) Application: **2020111055, 11.09.2018**

(24) Effective date for property rights:  
**11.09.2018**

Registration date:  
**05.11.2024**

Priority:

(30) Convention priority:  
**11.09.2017 EP 17190412.1**

(43) Application published: **17.09.2021 Bull. № 26**

(45) Date of publication: **05.11.2024 Bull. № 31**

(85) Commencement of national phase: **17.03.2020**

(86) PCT application:  
**EP 2018/074390 (11.09.2018)**

(87) PCT publication:  
**WO 2019/048690 (14.03.2019)**

Mail address:  
**197101, Sankt-Peterburg, a/ya 128, "ARS-PATENT", M.V. Khmara**

(72) Inventor(s):  
**KIRKEGORD, Zhannett, Skhlikhting (DK)**

(73) Proprietor(s):  
**NOVO NORDISK A/S (DK)**

(54) **ENRICHMENT WITH CELLS CO-EXPRESSING NKX6.1 AND C-PEPTIDE OBTAINED IN VITRO FROM STEM CELLS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, namely to a method of enriching endocrine cell aggregates obtained in vitro from stem cells with endocrine cells co-expressing NKX6.1 and C-peptide, or endocrine precursor cells co-expressing NKX2.2 and NKX6.1. Said method provides dissociation of said aggregates of endocrine cells into separate cells, treatment of said individual cells with a cryopreservation medium and lowering the temperature

to obtain cryopreserved endocrine cells, thawing said cryopreserved endocrine cells and providing re-aggregation of said endocrine cells obtained after thawing.

EFFECT: invention is effective for enrichment of endocrine cell aggregates obtained in vitro from stem cells with endocrine cells co-expressing NKX6.1 and C-peptide, or endocrine precursor cells co-expressing NKX2.2 and NKX6.1.

10 cl, 6 dwg, 4 ex

RU 2 829 777 C2

RU 2 829 777 C2

## Область техники

Настоящее изобретение относится к способам обогащения эндокринными клетками – клетками, экспрессирующими NKX2.2 и NKX6.1 или NKX6.1 и С-пептид, которые были получены *in vitro* из стволовых клеток и их криоконсервирования.

## 5 Предпосылки изобретения

Хотя инсулинотерапия является жизненно необходимой, достижение стабильной гликемии с помощью экзогенного инсулина может представлять собой трудности, и серьезные осложнения состояния на поздних стадиях ассоциированы с неудовлетворительным контролем (Nathan, D.M., 2014. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. *Diabetes care*, 37(1), pp. 9–16). Хороший результат показала трансплантация панкреатических островков, выделенных у доноров-людей, пациентам с диабетом 1 типа, при этом некоторые пациенты стали полностью независимыми от инсулина (Barton F.V. et al., 2012. Improvement in Outcomes of Clinical Islet Transplantation: 1999–2010. *Diabetes Care*, 35(7), pp. 1436–1445). Несмотря на такие успехи, одной из основных проблем в случае трансплантации островков является ограниченная доступность донорских островков. Нехватку этого донорского материала можно преодолеть путем получения функциональных инсулин-секретирующих клеток *in vitro* посредством дифференцировки человеческих эмбриональных стволовых клеток. Протоколы получения функциональных 10 инсулин-секретирующих клеток *in vitro* из стволовых клеток постоянно усовершенствуются (Pagliuca F.W. et al. 2014. Generation of Functional Human Pancreatic  $\beta$  Cells *In vitro*. *Cell*, 159(2), pp. 428–439; Rezanian A et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived *in vitro* from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 32(11), pp. 1121–1133); WO2012175633; WO2014033322; WO2015028614).

Хотя эти протоколы являются впечатляющими, они позволяют получить несколько популяций клеток, и соотношение таких популяций варьирует от партии к партии. Способ криоконсервирования клеток в крупном масштабе позволяет осуществлять исследования контроля качества в отношении каждой партии клеток до трансплантации и дополнительно упрощает логистику при трансплантации. Кроме того, любой способ 15 обогащения популяций эндокринных клеток в конечном продукте продуман таким образом, чтобы обеспечивать улучшение эффективности и безопасности трансплантации.

Следовательно, существует необходимость в способе обогащения и консервирования популяций эндокринных клеток, полученных *in vitro* с помощью стволовых клеток, в крупном масштабе, который позволял бы не только улучшить фенотип и 20 функционирование, но также позволял бы хранить и поддерживать клетки в течение осуществления исследований при выпуске партии до трансплантации этих клеток субъекту.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что способ, включающий стадии обеспечения диссоциации, криоконсервирования и обеспечения повторной агрегации 25 эндокринных клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид, или эндокринных клеток-предшественников, совместно экспрессирующих NKX2.2 и NKX6.1, обеспечивает возможность:

- осуществить обогащение агрегатов клеток эндокринными клетками, совместно экспрессирующими NKX6.1 и С-пептид;
- 45 - уменьшить количество клеток, отличных от эндокринных (т.е. клеток, отрицательных по NKX6.1/С-пеп./Glu), в агрегатах клеток;
- уменьшить степень гетерогенности кластера и размер кластера, что обеспечивает уменьшение варьирования *in vivo*;

- уменьшить и контролировать варьирование от партии к партии;
  - хранить и поддерживать эндокринные клетки и эндокринные клетки-предшественники;
  - отделить стадии получения клеток от трансплантации, обеспечивая осуществление
- 5 испытаний партий.

#### Краткое описание настоящего изобретения

Настоящее изобретение предусматривает способы обогащения агрегатов клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид, полученных *in vitro* из стволовых клеток, в крупном масштабе. Данный способ обеспечивает обогащение агрегатов

10 клеток, полученных *in vitro* из стволовых клеток, эндокринными клетками, совместно экспрессирующими NKX6.1 и С-пептид или совместно экспрессирующими NKX2.2 и NKX6.1.

Настоящее изобретение предусматривает способы криоконсервирования эндокринных клеток-предшественников поджелудочной железы, полученных *in vitro* из стволовых

15 клеток, включающие стадии (i) обеспечения диссоциации агрегатов клеток на отдельные клетки; и (ii) криоконсервирования отдельных клеток. Настоящее изобретение направлено на способы криоконсервирования отдельных эндокринных клеток-предшественников, совместно экспрессирующих NKX2.2 и NKX6.1, или отдельных эндокринных клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид, полученных *in*

20 *vitro* из стволовых клеток.

Настоящее изобретение дополнительно относится к медицинскому применению криоконсервированных эндокринных клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид, и/или эндокринных клеток-предшественников, совместно экспрессирующих

25 NKX2.2 и NKX6.1, и в том числе после криоконсервации в лечении диабета I типа.

Настоящее изобретение дополнительно относится к оттаиванию и обеспечению повторной агрегации криоконсервированных клеток с получением агрегатов клеток, обогащенных клетками, совместно экспрессирующими NKX6.1 и С-пептид.

Настоящее изобретение дополнительно относится к медицинскому применению подвергнутых повторной агрегации эндокринных клеток, совместно экспрессирующих

30 NKX6.1 и С-пептид, или эндокринных клеток-предшественников, совместно экспрессирующих NKX2.2 и NKX6.1, в том числе в лечении диабета I типа.

Настоящее изобретение предусматривает способы обогащения агрегатов клеток, полученных *in vitro* из стволовых клеток, клетками, совместно экспрессирующими

35 NKX6.1 и С-пептид, при одновременном снижении степени гетерогенности, размера кластера и варьирования от партии к партии.

Настоящее изобретение также может обеспечить решение дополнительных задач, которые будут очевидны из раскрытия иллюстративных вариантов осуществления.

#### Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Обзор способа: обогащение агрегатов клеток, совместно экспрессирующих

40 NKX6.1 и С-пептид.

Обеспечивают дифференцировку человеческих эмбриональных стволовых клеток (hESC) *in vitro* в эндокринные клетки-предшественники, совместно экспрессирующие NKX2.2 и NKX6.1, или эндокринные клетки, совместно экспрессирующие NKX6.1 и С-пептид, с применением опубликованных протоколов (WO2015/028614 и WO2017/144695

45 соответственно). На любой стадии обеспечивают диссоциацию агрегатов клеток с применением ферментативного или неферментативного расщепления. После диссоциации клетки подвергают криоконсервации, например, путем погружения клеток в среду для криоконсервации и медленного снижения температуры до  $-80^{\circ}\text{C}$  с получением

криоконсервированных клеток. Такие криоконсервированные клетки быстро оттаивают и подвергают повторной агрегации с получением клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид.

5 Фиг. 2. Диссоциация, криоконсервация и повторная агрегация эндокринных клеток-предшественников, совместно экспрессирующих NKX2.2 и NKX6.1: эффекты в отношении эндокринного фенотипа *in vitro*.

А) Обогащение эндокринными клетками после криоконсервации, оттаивания и повторной агрегации на стадии эндокринного предшественника.

10 Обеспечивали дифференцировку hESC в бета-подобные клетки и анализировали в отношении распределения популяций эндокринных клеток и клеток, отличных от эндокринных. В случае каждого эксперимента обеспечивали дифференцировку клеток из одной и той же партии либо с применением протокола без стадии обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации (контроли), либо с таковыми.

15 В) Верхняя панель: численность популяции эндокринных клеток измеряли по присутствию совместной экспрессии NKX6.1 и С-пептида с применением проточной цитометрии. Результаты представлены в виде % изменения по сравнению с контролями.

20 Нижняя панель: обеднение по клеткам, отличным от эндокринных, показано посредством уменьшения уровня транскрипции маркеров, отличных от эндокринных: AFP, GHRL, KRT18 и KRT 8, в случае, если клетки получали с применением протокола со стадиями обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации.

Обогащение функциональными эндокринными клетками характеризуется увеличением уровня транскрипции эндокринных маркеров: GIPR, GLP1R и IAPP, в случае, если клетки получали с применением протокола со стадией обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации.

25 С) Уменьшение размера и степени гетерогенности после оттаивания и повторной агрегации.

На верхней левой панели показаны агрегаты эндокринных клеток, полученные с применением протокола без стадии обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации.

30 На нижней левой панели показаны агрегаты эндокринных клеток, полученные со стадией обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации.

На верхней правой и нижней правой панелях (столбчатые диаграммы) показано распределение по размеру кластера, измеренному с применением счетчика островков Bioper®.

35 Фиг. 3. Диссоциация, криоконсервация и повторная агрегация эндокринных клеток-предшественников, совместно экспрессирующих NKX2.2 и NKX6.1: функциональные свойства *in vivo*.

40 А) Эндокринные клетки, полученные после криоконсервации на стадии эндокринного предшественника, секретируют С-пептид в случае нагрузки после трансплантации мышам без диабета .

Обеспечивали дифференцировку hESC из одной и той же партии либо без стадий обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации (контроли), либо с таковыми, и их трансплантировали под почечную капсулу мышей без диабета или не трансплантировали (контроль). Чтобы индуцировать секрецию С-пептида за счет трансплантатов, индуцировали острую инсулиновую резистентность с помощью S961, представляющего собой антагонист рецептора инсулина, через две недели после трансплантации или с помощью пробы на переносимость глюкозы при пероральном введении через семь недель после трансплантации. Содержание С-пептида человека

измеряли через 60 и 120 минут или 20 и 60 минут после нагрузки. Кластер, образованный с применением протокола со стадиями обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации, секретировал С-пептид на более высоких уровнях, чем таковые, полученные с применением протокола без стадии обеспечения диссоциации,  
 5 криоконсервации и повторной агрегации. Данные представлены в виде среднего +/- SEM.

В) Обогащение агрегатов клеток, экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, обеспечивает уменьшение варьирования *in vivo*.

График кратного увеличения содержания С-пептида во время нагрузки с помощью S961 строили для животных, получающих клетки, полученные с применением протокола со стадией обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации или без таковых. Эффективность экспрессии С-пептида увеличивалась при применении протокола с диссоциацией, криоконсервацией и повторной агрегацией, и степень варьирования между животными уменьшалась.

С) Обогащение агрегатов клеток, совместно экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, обеспечивает устранение клеток, отличных от эндокринных, через 8 недель после трансплантации и приводит к тому, что трансплантат становится более гомогенным *in vivo*.

Через 8 недель после трансплантации мышей умерщвляли, и почки с трансплантатами собирали и анализировали посредством иммуноцитохимии. Клетки окрашивали для обнаружения С-пептида, НКХ6.1 и глюкагона. Области клеток, отличных от эндокринных (НКХ6.1-глюкагон-/С-пептид-), обозначенные белыми стрелками, присутствовали в контрольных трансплантатах, содержащих клетки, полученные без стадии обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации (4 из 4 трансплантатов). Этого не наблюдали в случае трансплантата с клетками, полученными с применением протокола со стадией обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации (0 из 4 трансплантатов).

Фиг. 4. Диссоциация, криоконсервация и повторная агрегация эндокринных клеток, совместно экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид: эффекты в отношении фенотипа эндокринных клеток *in vitro*.

А) Обогащение эндокринными клетками, совместно экспрессирующими НКХ6.1 и С-пептид, после диссоциации, криоконсервации, оттаивания и повторной агрегации на стадии эндокринной клетки (т.е. BC03).

Обеспечивали дифференцировку hESC в бета-подобные клетки и анализировали в отношении распределения популяций эндокринных клеток и клеток, отличных от эндокринных. В случае каждого эксперимента обеспечивали дифференцировку клеток из одной и той же партии либо с применением протокола без стадии обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации (контроли), либо с таковыми.

Правая панель: численность популяции эндокринных клеток измеряли по присутствию совместной экспрессии НКХ6.1 и С-пептида с применением проточной цитометрии. Результаты представлены в виде % изменения по сравнению с контролями.

Левая панель: обеднение по клеткам, отличным от эндокринных, показано посредством уменьшения уровня транскрипции маркеров, отличных от эндокринных: AFP, GHRL, KRT18 и KRT 8, в случае, если клетки получали с применением протокола со стадиями обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации.

В) Уменьшение размера и степени гетерогенности после оттаивания и повторной агрегации.

На верхней левой панели показаны агрегаты эндокринных клеток, полученные с

применением протокола без стадии обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации.

На нижней левой панели показаны агрегаты эндокринных клеток, полученные с применением протокола со стадией обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации.

Вверху справа и внизу справа (столбчатые диаграммы) показано распределение по размеру кластера, измеренному с применением счетчика островков Biorep®.

Фиг. 5. Диссоциация, криоконсервация и повторная агрегация с получением агрегатов эндокринных клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид: функциональные свойства *in vivo*.

А) Клетки, подвергнутые диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации на стадии эндокринной клетки (клетки, совместно экспрессирующие NKX6.1 и С-пептид (BC03)), обеспечивали снижение уровня глюкозы в крови после трансплантации мышам линии SCID с врожденным отсутствием естественных клеток-киллеров с диабетом.

Обеспечивали дифференцировку hESC со стадиями обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации, и их трансплантировали под почечную капсулу мышей с диабетом. После трансплантации наблюдается быстрое снижение уровня глюкозы в крови.

В) Клетки, подвергнутые диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации на стадии эндокринной клетки (клетки, совместно экспрессирующие NKX6.1 и С-пептид (BC03)), секретируют С-пептид после трансплантации мышам с диабетом.

Для секреции С-пептида человека на низком уровне через 20 дней после трансплантации показано, что снижение уровня глюкозы в крови коррелирует с секрецией С-пептида человека.

С) Обогащение агрегатов клеток, экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид, обеспечивает уменьшение содержания клеток, отличных от эндокринных, через 10 недель после трансплантации.

Через 10 недель после трансплантации мышей умерщвляли, и почки с трансплантатами собирали и анализировали посредством иммуноцитохимии. Клетки окрашивали для обнаружения С-пептида, NKX6.1 и глюкагона. Области клеток, отличных от эндокринных (NKX6.1-глюкагон-/С-пептид-), обозначенные белыми стрелками, присутствовали в контрольных трансплантатах, содержащих клетки, полученные без стадии обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации (9 из 11 трансплантатов). Этого не наблюдали в случае трансплантата с клеткой, полученной с применением протокола со стадией обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации (1 из 3 трансплантатов).

Фиг. 6. Диссоциация, криоконсервация и повторная агрегация эндокринных клеток непосредственно перед и сразу после экспрессии С-пептида: эффект в отношении восприимчивости к глюкозе.

А) Обзор исследованных моментов времени в ходе дифференцировки, находящихся до и после экспрессии С-пептида, и эффект в отношении восприимчивости к глюкозе.

Диссоциация, криоконсервация и повторная агрегация клеток, подвергнутых криоконсервации в различные моменты времени в ходе клеточной дифференцировки. Клетки подвергали криоконсервации на стадии панкреатической энтодермы (PE) за 1 день до стимуляции экспрессии С-пептида (BC00), через 2 дня после стимуляции экспрессии С-пептида (BC03), через 5 дней после стимуляции экспрессии С-пептида (BC06) и через 8 дней после стимуляции экспрессии С-пептида (BC09), и все они были из одной и той же партии клеток. Обеспечивали оттаивание и дифференцировку клеток

и испытывали их в отношении функциональных свойств через 13 дней после стимуляции экспрессии С-пептида (BC14) по одной и той же схеме.

В) Обогащение клетками с НКХ6.1 и С-пептидом с помощью диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации клеток, криоконсервированных на стадиях BC00, BC03, BC06 и BC09, что соответствует периоду времени от приблизительно 1 дня до и до приблизительно 1-8 дней после стимуляции экспрессии С-пептида.

Уровень экспрессии НКХ6.1 и С-пептида измеряли на стадии BC14 с применением проточной цитометрии. Данные выражены в виде % по сравнению с клетками из одной и той же партии, полученными с применением протокола без стадии обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации. Результаты показывают, что обогащение клетками с НКХ6.1 и С-пептидом является наиболее эффективным в случае клеток, подвергнутых криоконсервации на стадиях BC00 и BC03.

С) Реакция на глюкозу в динамике, в случае, если клетки подвергнуты криоконсервации на стадиях BC00, BC03, BC06 и BC09.

В конце эксперимента функциональные свойства исследовали с применением системы динамической перфузии. Все клетки реагировали на нагрузку с помощью 20 мМ глюкозы и эксендина-4, но наиболее сильную реакцию наблюдали в случае, если клетки подвергали криоконсервации на стадиях BC00 и BC03 соответственно за приблизительно 1 день до и через 2 дня после стимуляции экспрессии С-пептида.

20 Подробное описание

В наиболее широком смысле настоящее изобретение относится к способам обогащения эндокринными клетками поджелудочной железы, полученными *in vitro* из стволовых клеток, и их криоконсервирования.

Настоящее изобретение относится к способу обогащения агрегатов клеток поджелудочной железы эндокринными клетками, совместно экспрессирующими НКХ6.1 и НКХ2.2 или НКХ6.1 и С-пептид, полученными *in vitro* из стволовых клеток, т.е. эмбриональных стволовых клеток или человеческих эмбриональных стволовых клеток.

Настоящее изобретение относится к способу обогащения агрегатов клеток эндокринными клетками после диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации эндокринных клеток-предшественников, совместно экспрессирующих НКХ6.1 и НКХ2.2, или эндокринных клеток, совместно экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, полученных *in vitro* из стволовых клеток.

Настоящее изобретение дополнительно относится к увеличению количества эндокринных клеток-предшественников и инсулин-секретирующих клеток, восприимчивых к глюкозе, полученных *in vitro* из стволовых клеток.

В одном аспекте в данном документе описан способ отбора эндокринных клеток из популяции клеток, содержащей эндокринные клетки и клетки, отличные от эндокринных.

В дополнительном аспекте данный способ обеспечивает возможность отделить получение эндокринных клеток от трансплантации. Например, это позволяет транспортировать клетки или осуществлять исследования качества и безопасности для контроля варьирования от партии к партии перед трансплантацией. В частности, криоконсервированные эндокринные клетки поджелудочной железы, полученные в соответствии со способом, описанным в данном документе, можно хранить между стадиями получения и трансплантации, что позволяет собрать и подвергнуть оттаиванию образцы для осуществления испытания(-ий) на чистоту (например, с помощью проточной цитометрии) и/или испытания(-ий) на функциональные свойства (например, с помощью перфузии статической GSIS).

В дополнительном аспекте данные способы позволяют получать гомогенные

криоконсервированные или подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки, совместно экспрессирующие НКХ6.1 и С-пептид, или эндокринные клетки-предшественники, совместно экспрессирующие НКХ2.2 и НКХ6.1, для применения в трансплантации субъекту-человеку и для применения в лечении диабета.

5 В одном аспекте описан способ криоконсервирования агрегатов эндокринных клеток поджелудочной железы, полученных *in vitro* из стволовых клеток, включающий следующие стадии:

(i) обеспечение диссоциации указанных агрегатов эндокринных клеток на отдельные клетки;

10 (ii) обработка указанных отдельных клеток средой для криоконсервации и снижение температуры, например, до по меньшей мере  $-80^{\circ}\text{C}$ , с получением криоконсервированных отдельных клеток.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу обогащения агрегатов клеток, совместно экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, полученных *in vitro* из стволовых клеток, при этом указанный способ включает следующие стадии:

(i) обеспечение диссоциации агрегатов клеток на отдельные клетки;

(ii) обработка отдельных клеток средой для криоконсервации и снижение температуры, например, до  $-80^{\circ}\text{C}$ , с получением криоконсервированных отдельных клеток;

20 (iii) оттаивание криоконсервированных клеток; и

(iv) получение клеток после оттаивания и повторной агрегации, обогащенных клетками, экспрессирующими НКХ6.1 и С-пептид.

В одном аспекте данный способ относится к способу обогащения агрегатов эндокринных клеток, полученных *in vitro* из стволовых клеток, эндокринными клетками, совместно экспрессирующими НКХ6.1 и С-пептид, или агрегатов эндокринных клеток-предшественников, совместно экспрессирующих НКХ2.2 и НКХ6.1, при этом указанный способ включает следующие стадии:

(i) обеспечение диссоциации указанных агрегатов эндокринных клеток на отдельные клетки;

30 (ii) криоконсервирование указанных отдельных клеток путем обработки указанных отдельных клеток средой для криоконсервации и снижения температуры, например, до по меньшей мере  $-80^{\circ}\text{C}$ , с получением криоконсервированных отдельных клеток,

(iii) оттаивание указанных криоконсервированных эндокринных клеток; и

35 (iv) обеспечение повторной агрегации указанных эндокринных клеток, полученных после оттаивания.

В конкретном варианте осуществления указанные эндокринные клетки из стадии (i) способов, описанных в данном документе, представляют собой эндокринные клетки, совместно экспрессирующие НКХ6.1 и С-пептид, или эндокринные клетки-предшественники, совместно экспрессирующие НКХ2.2 и НКХ6.1. В предпочтительном варианте осуществления указанные эндокринные клетки, совместно экспрессирующие НКХ6.1 и С-пептид, представляют собой эндокринные клетки, где экспрессию С-пептида стимулировали в течение не более 7 дней, в течение не более 6 дней, в течение не более 5 дней, в течение не более 4 дней, в течение не более 3 дней или в течение не более 2 дней, предпочтительно в течение не более 2 дней.

45 В предпочтительном варианте осуществления в случае, если эндокринные клетки из стадии (i) представляют собой агрегаты эндокринных клеток-предшественников, совместно экспрессирующих НКХ2.2 и НКХ6.1, указанный способ дополнительно включает стадию (v) обеспечения дифференцировки указанных эндокринных клеток-

предшественников, совместно экспрессирующих NKX2.2 и NKX6.1, с получением агрегатов эндокринных клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид.

В частности, стадия обеспечения диссоциации (1) позволяет осуществить обогащение агрегатов клеток эндокринными клетками, поскольку, как оказалось, отдельные клетки, отличные от эндокринных, являются менее устойчивыми к криоконсервации. Кроме того, данные способы обеспечивают снижение варьирования при воспроизведении *in vivo* путем снижения степени гетерогенности кластера и размера кластера.

Другим объектом настоящего изобретения являются подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки (т.е. агрегаты клеток, полученные после диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации), предусматривающие по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% эндокринных клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид.

Популяции клеток, состоящие из подвергнутых повторной агрегации клеток, можно выявлять и подвергать измерению с помощью методик, известных специалисту в данной области техники, путем выявления маркеров, NKX2.2, NKX6.1 и С-пептида, с применением методики, такой как FACS.

Используемые в данном документе термины «эндокринные клетки» или «эндокринные клетки поджелудочной железы» в данном документе относятся к «клеткам, совместно экспрессирующим NKX6.1 и С-пептид», или «клеткам, совместно экспрессирующим NKX2.2 и NKX6.1», или к эндокринным клеткам, отобранным в период от 3 дней до и до не более 7 дней после стимуляции экспрессии С-пептида. Преимущественно эндокринные клетки, описанные в данном документе, получены в период от 2 дней до и до не более 5 дней после стимуляции экспрессии С-пептида или от 1 дня до и до не более 2 дней после стимуляции экспрессии С-пептида.

Используемый в данном документе термин «клетки или агрегаты клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид» относится к инсулин-секретирующим эндокринным клеткам, восприимчивым к глюкозе, или к эндокринным клеткам, в которых экспрессию С-пептида стимулировали в течение не более 7 дней, не более 6 дней, не более 5 дней, не более 4 дней, не более 3 дней или не более 2 дней, предпочтительно в течение не более 2 дней.

«Инсулин-секретирующие клетки, восприимчивые к глюкозе» или «клетки, совместно экспрессирующие NKX6.1 и С-пептид» относятся к клеткам, которые заключены в небольшие кластеры клеток или агрегаты клеток, называемые островками Лангерганса, в поджелудочной железе. Бета-клетки отвечают на высокие уровни глюкозы в крови путем секретирования пептидного гормона инсулина, который действует на другие ткани, способствуя захвату глюкозы из крови, например в печени, где он способствует сохранению энергии путем синтеза гликогена. Используемый в данном документе термин «агрегат клеток» относится к островкоподобному агрегату клеток, полученному после диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации эндокринных клеток.

Используемый в данном документе термин «клетки, совместно экспрессирующие NKX2.2 и NKX6.1» относится к эндокринным клеткам-предшественникам, совместно экспрессирующим NKX2.2 и NKX6.1, но не экспрессирующим С-пептид или инсулин. Преимущественно термин «клетки, совместно экспрессирующие NKX2.2 и NKX6.1» относится к клеткам, полученным за не более чем 3 дня до экспрессии С-пептида, предпочтительно за не более чем 2 дня до экспрессии С-пептида, более предпочтительно за не более чем 1 день до экспрессии С-пептида.

Используемый в данном документе термин «клетки или агрегаты клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид» относится к инсулин-секретирующим

эндокринным клеткам, восприимчивым к глюкозе, или к эндокринным клеткам, в которых экспрессию С-пептида стимулировали в течение не более 7 дней, не более 6 дней, не более 5 дней, не более 4 дней, не более 3 дней или не более 2 дней, предпочтительно в течение не более 2 дней.

5 В одном аспекте популяцию клеток, содержащую клетки, совместно экспрессирующие NKX6.1 и С-пептид или NKX2.2 и NKX6.1, получают из популяции соматических клеток.

В другом аспекте у популяции соматических клеток индуцировали обратную дифференцировку в стволовую клетку, подобную эмбриональной (ES, например, плюрипотентную). Такие клетки, полученные в результате обратной дифференцировки, также называют индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (iPSC).

В одном варианте осуществления обеспечивают диссоциацию агрегатов клеток с помощью ферментов или реагентов, отличных от ферментов.

Используемый в данном документе термин «фермент» относится к ферменту, подходящему для обеспечения диссоциации агрегатов эндокринных клеток, полученных *in vitro* из стволовых клеток.

В предпочтительном варианте осуществления ферменты или смесь ферментов выбраны из группы, состоящей из протеазы, смесей протеаз, трипсина, коллагеназы и эластазы или их смесей. Предпочтительно фермент по данному способу выбран из смеси ферментов; предпочтительно смесь ферментов представляет собой аккутазу.

20 В предпочтительном варианте осуществления обеспечивают диссоциацию агрегатов клеток с помощью реагентов, отличных от ферментов, таких как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) или этиленгликоль-бис(β-аминоэтилэфир) -N,N,N',N'-тетрауксусная кислота (EGTA), предпочтительно реагенты, отличные от ферментов, представляют собой EDTA.

25 В дополнительном аспекте популяцию клеток, содержащую эндокринные клетки, совместно экспрессирующие NKX6.1 и С-пептид или NKX2.2 и NKX6.1, получают из эмбриональных стволовых клеток (ES, например плюрипотентных). В некоторых аспектах популяция клеток, содержащая эндокринные клетки, совместно экспрессирующие NKX6.1 и С-пептид или NKX2.2 и NKX6.1, представляет собой

30 плюрипотентные клетки, такие как клетки, подобные ES. В дополнительном аспекте популяцию клеток, предусматривающую NKX6.1 и С-пептид или NKX2.2 и NKX6.1, получают путем дифференцировки из эмбриональных стволовых (ES или плюрипотентных) клеток, предпочтительно из человеческих эмбриональных стволовых клеток.

35 В дополнительном аспекте популяция клеток представляет собой популяцию стволовых клеток. В некоторых аспектах популяция клеток представляет собой популяцию стволовых клеток, дифференцированных в линию эндокринных предшественников. В некоторых аспектах популяция клеток представляет собой популяцию стволовых клеток, дифференцированных в инсулин-секретирующие клетки, восприимчивые к глюкозе.

Протоколы дифференцировки для обеспечения дифференцировки стволовых клеток в эндокринные клетки-предшественники и инсулин-секретирующие клетки, восприимчивые к глюкозе, известны из уровня техники (WO2015/028614 и WO/2017/144695 соответственно).

45 Один объект настоящего изобретения представляет собой криоконсервированные отдельные клетки, совместно экспрессирующие NKX2.2 и NKX6.1 или совместно экспрессирующие NKX6.1 и С-пептид, полученные в результате диссоциации агрегатов эндокринных клеток. В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к

криоконсервированным эндокринным клеткам поджелудочной железы, полученным в соответствии со способом, включающим стадии:

(i) обеспечения диссоциации агрегатов эндокринных клеток поджелудочной железы на отдельные клетки;

5 (ii) обработки указанных отдельных клеток средой для криоконсервации и снижения температуры, например, до по меньшей мере  $-80^{\circ}\text{C}$ , с получением криоконсервированных отдельных клеток.

Используемый в данном документе термин «снижение температуры с получением криоконсервированных эндокринных клеток» относится к стадии охлаждения клеток до очень низких температур в течение определенного периода времени, т.е. от  $-70^{\circ}\text{C}$  до  $-196^{\circ}\text{C}$ , предпочтительно до по меньшей мере  $-80^{\circ}\text{C}$  для предотвращения любой ферментативной или химической активности, которая может вызывать повреждение отдельных эндокринных клеток, представляющих интерес.

В одном варианте осуществления температура на стадии (ii) находится в диапазоне от  $-70^{\circ}\text{C}$  до  $-196^{\circ}\text{C}$ , от  $-80^{\circ}\text{C}$  до  $-160^{\circ}\text{C}$  или от  $-80^{\circ}\text{C}$  до  $-120^{\circ}\text{C}$ , предпочтительно температура на стадии (ii) составляет по меньшей мере  $-80^{\circ}\text{C}$ . В одном варианте осуществления для получения криоконсервированных клеток температуру понижают за один скачок или постепенно, предпочтительно температуру понижают за один скачок.

Используемый в данном документе термин «криоконсервированные клетки» или «криоконсервированные отдельные клетки» относится к клеткам, которые были получены после того, как агрегаты клеток подвергли диссоциации на отдельные клетки, обработали средой для криоконсервации и подвергли криоконсервации путем снижения температуры до очень низкой температуры, например от  $-70^{\circ}\text{C}$  до  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Используемый в данном документе термин «среда для криоконсервации» относится к среде, которая является подходящей для поддержания целостности эндокринных клеток или эндокринных клеток-предшественников во время стадии обеспечения криоконсервации. Большинство сред для криоконсервации содержат DMSO, сыворотку крови или синтетические заменители сыворотки крови и забуферены для достижения определенного значения pH с применением, например, HEPES или бикарбоната натрия.

В одном варианте осуществления среда для криоконсервации содержит соединения, выбранные из диметилсульфоксида (DMSO), сыворотки крови, синтетических заменителей сыворотки крови или глицерина.

В соответствии с настоящим изобретением криоконсервированные клетки, описанные в данном документе, можно хранить в течение по меньшей мере одного часа, по меньшей мере одного дня, по меньшей мере одной недели, по меньшей мере одного месяца, по меньшей мере двух месяцев, по меньшей мере трех месяцев, по меньшей мере одного года или любого периода времени в пределах любых моментов времени, предусмотренных в данном диапазоне.

В одном варианте осуществления криоконсервированные клетки или подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки, описанные в данном документе, можно применять в лечении диабета, например, путем имплантации пациенту, нуждающемуся в таком лечении.

Стволовые клетки представляют собой недифференцированные клетки, характеризующиеся их способностью на уровне отдельной клетки как к самовоспроизведению, так и к дифференцировке с получением потомства клетки, включающего самовоспроизводящиеся предшественники, невоспроизводящиеся предшественники и окончательно дифференцированные клетки. Стволовые клетки

также характеризуются их способностью дифференцироваться *in vitro* в функциональные клетки разных клеточных линий из нескольких зародышевых листков (энтодермы, мезодермы и эктодермы), а также давать начало тканям нескольких зародышевых листков после трансплантации.

5 В зависимости от их дифференцировочного потенциала стволовые клетки относят к (1) тотипотентным, то есть способным давать начало всем эмбриональным и экстраэмбриональным типам клеток; (2) плюрипотентным, то есть способным давать начало всем эмбриональным типам клеток; (3) мультипотентным, то есть способным давать начало подмножеству клеточных линий, которые, однако, находятся в пределах  
10 конкретной ткани, органа или физиологической системы (например, гемопоэтические стволовые клетки (HSC) могут давать потомство, которое включает HSC (самовоспроизведение), олигопотентные предшественники, ограничивающиеся клетками крови, и все типы клеток и элементы (например, тромбоциты), которые являются нормальными компонентами крови); (4) олигопотентным, то есть способным давать  
15 начало более ограниченному подмножеству клеточных линий, чем мультипотентные стволовые клетки; и (5) унипотентным, то есть способным давать начало отдельным клеточным линиям (например, сперматогенным стволовым клеткам).

Используемый в данном документе термин «дифференцирует» или «дифференцировка» относится к процессу, при котором клетки развиваются от  
20 недифференцированного состояния до дифференцированного состояния, от незрелого состояния до менее незрелого состояния или от незрелого состояния до зрелого состояния. Например, ранние недифференцированные эмбриональные клетки поджелудочной железы способны пролиферировать и экспрессировать характеристические маркеры, такие как PDX1, NKX6.1 и PTF1a. Зрелые или  
25 дифференцированные клетки поджелудочной железы не пролиферируют и секретируют высокие уровни эндокринных гормонов поджелудочной железы или пищеварительных ферментов, например, полностью дифференцированные бета-клетки секретируют инсулин на высоких уровнях в ответ на глюкозу. Изменения во взаимодействии и созревании клеток происходят, когда клетки теряют маркеры недифференцированных  
30 клеток или приобретают маркеры дифференцированных клеток. Потеря или приобретение отдельного маркера может указывать на то, что клетка «созрела или полностью дифференцировалась». Термин «фактор дифференцировки» относится к соединению, добавляемому к клеткам поджелудочной железы для повышения степени их дифференцировки в зрелые эндокринные клетки, также включающие инсулин-  
35 продуцирующие бета-клетки. Иллюстративные факторы дифференцировки включают фактор роста гепатоцитов, фактор роста кератиноцитов, эксендин-4, основной фактор роста фибробластов, инсулиноподобный фактор роста-1, фактор роста нервов, эпидермальный фактор роста, тромбоцитарный фактор роста и глюкагоноподобный пептид 1. В некоторых аспектах обеспечение дифференцировки клеток предусматривает  
40 культивирование клеток в среде, содержащей один или более факторов дифференцировки.

Зрелые или дифференцированные клетки поджелудочной железы не пролиферируют и секретируют высокие уровни эндокринных гормонов поджелудочной железы или пищеварительных ферментов, например, полностью дифференцированные бета-клетки  
45 секретируют инсулин на высоких уровнях в ответ на глюкозу. Изменения во взаимодействии и созревании клеток происходят, когда клетки теряют маркеры недифференцированных клеток или приобретают маркеры дифференцированных клеток. Потеря или приобретение отдельного маркера может указывать на то, что клетка

«созрела или полностью дифференцировалась».

Термин «фактор дифференцировки» относится к соединению, добавляемому к ES-клеткам или клеткам-предшественникам поджелудочной железы для повышения степени их дифференцировки в EP-клетки. Факторы дифференцировки могут также приводить к дальнейшей дифференцировке в зрелые бета-клетки.

Иллюстративные факторы дифференцировки включают фактор роста гепатоцитов, фактор роста кератиноцитов, эксендин-4, основной фактор роста фибробластов, инсулиноподобный фактор роста-1, фактор роста нервов, эпидермальный фактор роста, тромбоцитарный фактор роста, глюкагоноподобный пептид 1, индолактамы V, IDE1&2 и ретиноевую кислоту.

В некоторых аспектах обеспечение дифференцировки клеток предусматривает культивирование клеток в среде, содержащей один или более факторов дифференцировки.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу обеспечения эндокринной функции поджелудочной железы у млекопитающего с дефицитом продуцирования ею по меньшей мере одного гормона поджелудочной железы, при этом способ включает стадии осуществления имплантации эндокринных клеток, полученных любым из способов по настоящему изобретению, в количестве, достаточном для продуцирования измеримого количества по меньшей мере одного указанного гормона поджелудочной железы у указанного млекопитающего.

Используемый в данном документе термин «человеческие плюрипотентные стволовые (hPS) клетки» относится к клеткам, которые могут быть получены из любого источника, и которые способны, при подходящих условиях, обеспечить получение потомства, состоящего из различных типов клеток, которые являются производными всех из 3-х зародышевых листков (энтодермы, мезодермы и эктодермы), в организме человека. hPS-клетки обладают способностью образовывать тератому у мышей линии SCID возрастом 8–12 недель и/или способностью образовывать выявляемые клетки всех трех зародышевых листков в культуре ткани. Включенными в определение человеческих плюрипотентных стволовых клеток являются эмбриональные клетки разных типов, в том числе полученные из бластоцисты человека стволовые (hBS) клетки, в литературе часто обозначаемые как человеческие эмбриональные стволовые (hES) клетки.

В одном аспекте в данном документе описан способ криоконсервации агрегатов эндокринных клеток, полученных *in vitro* из стволовых клеток, включающий следующие стадии:

(i) обеспечение диссоциации указанных агрегатов эндокринных клеток на отдельные клетки;

(ii) криоконсервирование указанных отдельных клеток,

где эндокринные клетки представляют собой эндокринные клетки-предшественники, совместно экспрессирующие NKX6.1 и NKX2.2, или эндокринные клетки, совместно экспрессирующие NKX6.1 и C-пептид, где экспрессию C-пептида стимулировали в течение не более 7 дней, не более 6 дней, не более 5 дней, не более 4 дней, не более 3 дней или не более 2 дней, предпочтительно в течение не более 2 дней.

В другом аспекте в данном документе описан способ обогащения агрегатов клеток эндокринными клетками, совместно экспрессирующими NKX6.1 и C-пептид, или эндокринными клетками-предшественниками, совместно экспрессирующими NKX2.2 и NKX6.1, полученными *in vitro* из стволовых клеток, при этом указанный способ включает следующие стадии:

(i) обеспечение диссоциации указанных агрегатов клеток на отдельные клетки;

- (ii) криоконсервирование указанных отдельных клеток;
- (iii) оттаивание указанных криоконсервированных отдельных клеток; и
- (iv) получение клеток после оттаивания и повторной агрегации, обогащенных клетками, экспрессирующими НКХ6.1 и С-пептид;

5 при этом эндокринные клетки представляют собой эндокринные клетки-предшественники, совместно экспрессирующие НКХ2.2 и НКХ6.1, или эндокринные клетки, совместно экспрессирующие НКХ6.1 и С-пептид, где экспрессию С-пептида эндокринными клетками стимулировали в течение не более 7 дней, не более 6 дней, не более 5 дней, не более 4 дней, не более 3 дней, не более 2 дней, предпочтительно в  
10 течение не более 2 дней.

В одном аспекте в данном документе описаны подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки, совместно экспрессирующие НКХ6.1 и С-пептид или НКХ2.2 и НКХ6.1, полученные в соответствии со способом по настоящему изобретению.

15 В одном аспекте в данном документе описаны подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки, предусматривающие по меньшей мере 50% эндокринных клеток, совместно экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, и/или эндокринных клеток-предшественников, совместно экспрессирующих НКХ2.2 и НКХ6.1.

В одном варианте осуществления в данном документе описаны подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки, предусматривающие по меньшей мере 60%  
20 эндокринных клеток, совместно экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, или эндокринных клеток-предшественников, совместно экспрессирующих НКХ2.2 и НКХ6.1.

В одном варианте осуществления в данном документе описаны подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки, предусматривающие по меньшей мере 70%  
25 эндокринных клеток, совместно экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, или эндокринных клеток-предшественников, совместно экспрессирующих НКХ2.2 и НКХ6.1.

В одном варианте осуществления в данном документе описаны подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки, предусматривающие по меньшей мере 80%  
30 эндокринных клеток, совместно экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, или эндокринных клеток-предшественников, совместно экспрессирующих НКХ2.2 и НКХ6.1.

В одном аспекте подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки, описанные в данном документе, применяют в качестве лекарственного препарата.

В одном аспекте подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки, описанные в данном документе, применяют в лечении диабета.

Кроме того, композицию, содержащую подвергнутые повторной агрегации  
35 эндокринные клетки, совместно экспрессирующие НКХ6.1 и С-пептид, или совместно экспрессирующие НКХ2.2 и НКХ6.1, описанные в данном документе, применяют в лечении диабета.

В дополнительном аспекте в данном документе описан лекарственный препарат, содержащий агрегаты клеток, обогащенные эндокринными клетками в соответствии  
40 с данным описанием. В предпочтительном варианте осуществления лекарственный препарат, описанный в данном документе, содержит подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки, совместно экспрессирующие НКХ6.1 и С-пептид, и/или совместно экспрессирующие НКХ2.2 и НКХ6.1, как описано в данном документе.

В дополнительном аспекте в данном документе описаны устройство, содержащее  
45 криоконсервированные эндокринные клетки или подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки, или композиция, содержащая подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки или агрегаты клеток, или лекарственный препарат, как описано в данном документе.

Для разных способов и других вариантов осуществления, описанных в данном документе, могут быть необходимы hPS-клетки из разнообразных источников, или они могут в них применяться. Например, hPS-клетки, подходящие для применения, могут быть получены из развивающихся эмбрионов. Дополнительно или в качестве альтернативы подходящие hPS-клетки могут быть получены из установившихся клеточных линий и/или человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых (hiPS) клеток.

Используемый в данном документе термин «hiPS-клетки» относится к человеческим индуцированным плюрипотентным стволовым клеткам.

Используемый в данном документе термин «стволовая клетка, полученная из бластоцисты» обозначается как BS-клетка, а человеческую форму называют «hBS-клетки». В литературе такие клетки часто именуется эмбриональными стволовыми клетками и более конкретно человеческими эмбриональными стволовыми клетками (hESC). В свою очередь, плюрипотентные стволовые клетки, применяемые в настоящем изобретении, могут таким образом представлять собой эмбриональные стволовые клетки, полученные из бластоцист, описанные, например, в WO 03/055992 и WO 2007/042225, или представлять собой коммерчески доступные hBS-клетки или клеточные линии. Однако дополнительно предусмотрено, что любую человеческую плюрипотентную стволовую клетку, в свою очередь, можно применять в настоящем изобретении, в том числе дифференцированные зрелые клетки, которые перепрограммированы в плюрипотентные клетки путем, например, обработки зрелых клеток с помощью определенных факторов транскрипции, таких как OCT4, SOX2, NANOG и LIN28.

Используемый в данном документе термин «жизнеспособность» клетки или «жизнеспособная клетка» относится к способности к нормальному росту и развитию после криоконсервации, оттаивания и/или повторной агрегации. В одном аспекте по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% подвергнутых повторной агрегации эндокринных клеток являются жизнеспособными.

Настоящее изобретение может также обеспечивать решение дополнительных задач, которые будут очевидными из раскрытия иллюстративных вариантов осуществления.

Если в описании не указано иное, термины, представленные в форме единственного числа, также включают случаи множественного числа.

Все ссылки, в том числе публикации, заявки на патенты и патенты, цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и в той же степени, как если бы каждая ссылка была отдельно и конкретно указана как включенная посредством ссылки и была изложена в полном объеме в данном документе (в максимальной степени, разрешенной законодательством).

Все заголовки и подзаголовки используются в данном документе только в целях удобства и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение каким-либо образом.

Использование всех возможных примеров или фразы перед примером (например, «такой как»), предусмотренных в данном документе, предназначено только для лучшего освещения настоящего изобретения и не предполагает ограничения объема настоящего изобретения, если не указано иное. Ни одну фразу в настоящем описании не следует толковать как указывающую на какой-либо незаявляемый элемент, как на важный для осуществления настоящего изобретения на практике.

Хотя определенные признаки настоящего изобретения были проиллюстрированы и описаны в данном документе, обычным специалистам в данной области техники

будут очевидны много модификаций, замен, изменений и эквивалентов. Следовательно, следует понимать, что прилагаемая формула изобретения предназначена для охвата всех таких модификаций и изменений, которые находятся в пределах истинной сущности настоящего изобретения.

5       Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения

Вариант осуществления 1. Способ обогащения агрегатов клеток, экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, полученных *in vitro* из стволовых клеток, при этом указанный способ включает следующие стадии:

- (i) обеспечение диссоциации агрегатов клеток на отдельные клетки;
- 10       (ii) обработка отдельных клеток средой для криоконсервации и снижение температуры, например, до  $-80^{\circ}\text{C}$ , с получением криоконсервированных клеток;
- (iii) оттаивание криоконсервированных клеток; и
- (iv) получение клеток после оттаивания и повторной агрегации, обогащенных клетками, совместно экспрессирующими НКХ6.1 и С-пептид.

15       Вариант осуществления 2. Способ по варианту осуществления 1, где агрегаты клеток, экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, представляют собой эндокринные клетки-предшественники или инсулин-секретирующие клетки, восприимчивые к глюкозе, при этом предпочтительно указанные агрегаты клеток, экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, представляют собой эндокринные клетки, которые экспрессировали С-пептид  
20       в течение не более 7 дней, не более 6 дней, не более 5 дней, не более 4 дней, не более 3 дней, не более 2 дней, предпочтительно в течение не более 2 дней.

Вариант осуществления 3. Способ по варианту осуществления 2, где эндокринные клетки-предшественники совместно экспрессируют НКХ2.2 и НКХ6.1.

25       Вариант осуществления 4. Способ по любому из вариантов осуществления 1–3, где стволовые клетки представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

Вариант осуществления 5. Способ по любому из вариантов осуществления 1–3, где стволовые клетки представляют собой эмбриональные стволовые клетки.

30       Вариант осуществления 6. Способ по любому из вариантов осуществления 1–3, где стволовые клетки представляют собой человеческие эмбриональные стволовые клетки.

Вариант осуществления 7. Способ по любому из вариантов осуществления 1–6, где агрегаты клеток, экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, получены *in vitro* из стволовых клеток, которые подвергли дифференцировки в дефинитивную энтодерму.

35       Вариант осуществления 8. Способ по любому из вариантов осуществления 1–6, где агрегаты клеток, экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, получены *in vitro* из стволовых клеток, которые подвергли дифференцировки в панкреатическую энтодерму.

Вариант осуществления 9. Способ по любому из вариантов осуществления 1–6, где агрегаты клеток, экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, получены *in vitro* из стволовых клеток, которые подвергли дифференцировки в эндокринные клетки-предшественники.

40       Вариант осуществления 10. Способ по любому из вариантов осуществления 1–6, где агрегаты клеток, экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, получены *in vitro* из стволовых клеток, которые подвергли дифференцировки в эндокринные клетки-предшественники, экспрессирующие НКХ2.2 и НКХ6.1.

45       Вариант осуществления 11. Способ по любому из вариантов осуществления 1–6, где агрегаты клеток, экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, получены *in vitro* из стволовых клеток, которые подвергли дифференцировки в инсулин-секретирующие клетки, восприимчивые к глюкозе.

Вариант осуществления 12. Способ по любому из вариантов осуществления 1–11,

где агрегаты клеток, экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, подвергают диссоциации с помощью ферментов.

5      Вариант осуществления 13. Способ по варианту осуществления 12, где агрегаты клеток, экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, подвергают диссоциации с помощью ферментов, выбранных из группы, состоящей из протеазы или смесей протеаз.

Вариант осуществления 14. Способ по варианту осуществления 12, где агрегаты клеток, экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, подвергают диссоциации с помощью ферментов, выбранных из группы, состоящей из трипсина, коллагеназы и эластазы или их смесей.

10     Вариант осуществления 15. Способ по варианту осуществления 12, где агрегаты клеток, экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, подвергают диссоциации с помощью фермента аккутазы.

Вариант осуществления 16. Способ по варианту осуществления 15, где аккутаза представляет собой смесь протеазы и коллагеназы.

15     Вариант осуществления 17. Способ по любому из вариантов осуществления 1–11, где агрегаты клеток, экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, подвергают диссоциации с помощью реагентов, отличных от ферментов.

20     Вариант осуществления 18. Способ по варианту осуществления 17, где агрегаты клеток, экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид, подвергают диссоциации с помощью реагентов, отличных от ферментов, таких как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) или этиленгликоль-бис(β-аминоэтилэфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота (EGTA).

Вариант осуществления 19. Способ по любому из вариантов осуществления 1–18, где среда для криоконсервации содержит криопротектор.

25     Вариант осуществления 20. Способ по варианту осуществления 19, где криопротектор представляет собой диметилсульфоксид (DMSO).

Вариант осуществления 21. Способ по любому из вариантов осуществления 1–18, где среда для криоконсервации не содержит криопротектора.

30     Вариант осуществления 22. Способ по любому из вариантов осуществления 1–21, где после обработки отдельных клеток средой для криоконсервации температуру понижают до значений от -70°C до -196°C, от -80°C до -160°C или от -80°C до -120°C или до -80°C за один скачок с получением криоконсервированных клеток.

35     Вариант осуществления 23. Способ по любому из вариантов осуществления 1–21, где после обработки отдельных клеток средой для криоконсервации температуру понижают до значений от -70°C до -196°C, от -80°C до -160°C или от -80°C до -120°C или до -80°C постепенно с получением криоконсервированных клеток.

Вариант осуществления 24. Способ по любому из вариантов осуществления 1–21, где после обработки отдельных клеток средой для криоконсервации температуру понижают до -80°C за один скачок с получением криоконсервированных клеток.

40     Вариант осуществления 25. Способ по любому из вариантов осуществления 1–24, где криоконсервированные клетки, полученные с помощью стадий (i) и (ii) варианта осуществления 1, совместно экспрессируют НКХ2.2 и НКХ6.1.

Вариант осуществления 26. Способ по любому из вариантов осуществления 1–24, где по меньшей мере 20% криоконсервированных клеток, полученных с помощью стадий (i) и (ii) варианта осуществления 1, экспрессируют НКХ2.2 и НКХ6.1.

Вариант осуществления 27. Способ по любому из вариантов осуществления 1–24, где по меньшей мере 40% криоконсервированных клеток, полученных с помощью стадий (i) и (ii) варианта осуществления 1, экспрессируют НКХ2.2 и НКХ6.1.



Вариант осуществления 45. Кримоконсервированные клетки, полученные с помощью стадий (i) и (ii) способа по любому из вариантов осуществления 1–39, хранятся в течение по меньшей мере 3 месяцев.

5 Вариант осуществления 46. Кримоконсервированные клетки, полученные с помощью стадий (i) и (ii) способа по любому из вариантов осуществления 1–39, хранятся в течение по меньшей мере 1 года.

Вариант осуществления 47. Кримоконсервированные клетки, полученные с помощью стадий (i) и (ii) способа по любому из вариантов осуществления 1–39, для применения для дальнейшей дифференцировки.

10 Вариант осуществления 48. Кримоконсервированные клетки, полученные с помощью стадий (i) и (ii) способа по любому из вариантов осуществления 1–39, для применения в инкапсуляции.

15 Вариант осуществления 49. Кримоконсервированные клетки, полученные с помощью стадий (i) и (ii) способа по любому из вариантов осуществления 1–39, для применения в инкапсуляции с помещением в устройство.

Вариант осуществления 50. Кримоконсервированные клетки, полученные с помощью стадий (i) и (ii) способа по любому из вариантов осуществления 1–39, для применения для трансплантации субъекту.

20 Вариант осуществления 51. Кримоконсервированные клетки, полученные с помощью стадий (i) и (ii) способа по любому из вариантов осуществления 1–39, для применения для трансплантации млекопитающему.

Вариант осуществления 52. Кримоконсервированные клетки, полученные с помощью стадий (i) и (ii) способа по любому из вариантов осуществления 1–39, для применения для трансплантации человеку.

25 Вариант осуществления 53. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–39, где кримоконсервированные клетки оттаивают в присутствии ингибитора Rock.

Вариант осуществления 54. Способ в соответствии с вариантом осуществления 53, где кримоконсервированные клетки оттаивают в присутствии 10 мкМ ингибитора Rock.

30 Вариант осуществления 55. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–39, где кримоконсервированные клетки оттаивают в отсутствие ингибитора Rock.

35 Вариант осуществления 56. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–39 и 53–55, где клетки, полученные после оттаивания, подвергают повторной агрегации.

Вариант осуществления 57. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–39 и 53–55, где клетки, полученные после оттаивания, подвергают повторной агрегации в течение по меньшей мере 2 дней.

40 Вариант осуществления 58. Подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–39 и 53–57.

Вариант осуществления 59. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–39 и 53–57, где указанные подвергнутые повторной агрегации клетки совместно экспрессируют NKX6.1 и C-пептид.

45 Вариант осуществления 60. Способ в соответствии с вариантом осуществления 59, где по меньшей мере 20% подвергнутых повторной агрегации клеток совместно экспрессируют NKX6.1 и C-пептид.

Вариант осуществления 61. Способ в соответствии с вариантом осуществления 59, где по меньшей мере 40% подвергнутых повторной агрегации клеток совместно

экспрессируют НКХ6.1 и С-пептид.

Вариант осуществления 62. Способ в соответствии с вариантом осуществления 59, где по меньшей мере 60% подвергнутых повторной агрегации клеток совместно экспрессируют НКХ6.1 и С-пептид.

5 Вариант осуществления 63. Способ в соответствии с вариантом осуществления 59, где по меньшей мере 80% подвергнутых повторной агрегации клеток совместно экспрессируют НКХ6.1 и С-пептид.

Вариант осуществления 64. Способ в соответствии с вариантом осуществления 59, где по меньшей мере 20% подвергнутых повторной агрегации клеток представляют собой инсулин-секретирующие клетки, восприимчивые к глюкозе.

10 Вариант осуществления 65. Способ в соответствии с вариантом осуществления 59, где по меньшей мере 40% подвергнутых повторной агрегации клеток представляют собой инсулин-секретирующие клетки, восприимчивые к глюкозе.

Вариант осуществления 66. Способ в соответствии с вариантом осуществления 59, где по меньшей мере 60% подвергнутых повторной агрегации клеток представляют собой инсулин-секретирующие клетки, восприимчивые к глюкозе.

15 Вариант осуществления 67. Способ в соответствии с вариантом осуществления 59, где по меньшей мере 80% подвергнутых повторной агрегации клеток представляют собой инсулин-секретирующие клетки, восприимчивые к глюкозе.

20 Вариант осуществления 68. Подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–39, 53–57 и 59–66, для применения для дальнейшей дифференцировки.

Вариант осуществления 69. Подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–39, 53–57 и 59–66, для применения в инкапсуляции.

Вариант осуществления 70. Подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–39, 53–57 и 59–66, для применения в инкапсуляции с помещением в устройство.

30 Вариант осуществления 71. Подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–39, 53–57 и 59–66, для применения для трансплантации субъекту.

Вариант осуществления 72. Подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–39, 53–57 и 59–66, для применения для трансплантации млекопитающему.

35 Вариант осуществления 73. Подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–39, 53–57 и 59–66, для применения для трансплантации человеку.

Вариант осуществления 74. Способ криоконсервирования агрегатов клеток, совместно экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид или НКХ2.2 и НКХ6.1, полученных *in vitro* из стволовых клеток, при этом указанный способ включает следующие стадии:

(i) обеспечение диссоциации агрегатов клеток на отдельные клетки;

(ii) обработка отдельных клеток средой для криоконсервации и снижение температуры, например, до по меньшей мере  $-80^{\circ}\text{C}$ , с получением криоконсервированных клеток.

45 Вариант осуществления 75: Способ в соответствии с вариантом осуществления 74, где криоконсервированные клетки оттаивают.

Вариант осуществления 76. Способ в соответствии с вариантом осуществления 75, где криоконсервированные клетки, которые были подвергнуты оттаиванию, подвергают

повторной агрегации.

Вариант осуществления 77. Способ в соответствии с вариантом осуществления 76, где криоконсервированные клетки, которые были подвергнуты повторной агрегации, совместно экспрессируют NKX6.1 и С-пептид.

5 Вариант осуществления 78. Способ в соответствии с вариантом осуществления 74, где агрегаты клеток, совместно экспрессирующих NKX2.2 и NKX6.1, представляют собой эндокринные клетки-предшественники.

Вариант осуществления 79. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 74–78, где стволовые клетки представляют собой индуцированные

10 плюрипотентные стволовые клетки.

Вариант осуществления 80. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 74–78, где стволовые клетки представляют собой эмбриональные стволовые клетки.

Вариант осуществления 81. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 74–78, где стволовые клетки представляют собой человеческие

15 эмбриональные стволовые клетки.

Вариант осуществления 82. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 74–81, где агрегаты клеток, совместно экспрессирующих NKX2.2 и NKX6.1, получены *in vitro* из стволовых клеток, которые подвергли дифференцировки

20 в дефинитивную энтодерму.

Вариант осуществления 83. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 74–81, где агрегаты клеток, совместно экспрессирующих NKX2.2 и NKX6.1, получены *in vitro* из стволовых клеток, которые подвергли дифференцировки в панкреатическую энтодерму, т.е. совместно экспрессирующую PDX-1/NKX6.1.

Вариант осуществления 84. Способ по любому из вариантов осуществления 74–81, где агрегаты клеток, совместно экспрессирующих NKX2.2 и NKX6.1, получены *in vitro* из стволовых клеток, которые подвергли дифференцировки в эндокринные

25 предшественники.

Вариант осуществления 85. Способ по любому из вариантов осуществления 74–84, где агрегаты клеток, совместно экспрессирующих NKX2.2 и NKX6.1, подвергают

30 диссоциации с помощью ферментов.

Вариант осуществления 86. Способ по варианту осуществления 85, где указанные ферменты выбраны из группы, состоящей из протеазы, или смесей протеаз, или смесей протеаз и коллагеназ.

Вариант осуществления 87. Способ по варианту осуществления 85, где указанные ферменты выбраны из группы, состоящей из трипсина, коллагеназы и эластазы или их

35 смесей.

Вариант осуществления 88. Способ по варианту осуществления 85, где указанные ферменты представляют собой фермент аккутазу.

Вариант осуществления 89. Способ по варианту осуществления 88, где аккутаза представляет собой смесь протеазы и коллагеназы.

Вариант осуществления 90. Способ по любому из вариантов осуществления 74–84, где агрегаты клеток, совместно экспрессирующих NKX2.2 и NKX6.1, подвергают диссоциации с помощью реагентов, отличных от ферментов.

Вариант осуществления 91. Способ по варианту осуществления 90, где указанные реагенты, отличные от ферментов, выбраны из этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) или этиленгликоль-бис(β-аминоэтилэфир)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (EGTA).

45

Вариант осуществления 92. Способ по любому из вариантов осуществления 74–91, где среда для криоконсервации содержит криопротектор.

Вариант осуществления 93. Способ по варианту осуществления 92, где криопротектор представляет собой диметилсульфоксид (DMSO).

5      Вариант осуществления 94. Способ по любому из вариантов осуществления 74–91, где среда для криоконсервации не содержит криопротектора.

Вариант осуществления 95. Способ по любому из вариантов осуществления 74–94, где после обработки отдельных клеток средой для криоконсервации температуру понижают до значений от  $-70^{\circ}\text{C}$  до  $-196^{\circ}\text{C}$ , от  $-80^{\circ}\text{C}$  до  $-160^{\circ}\text{C}$  или от  $-80^{\circ}\text{C}$  до  $-120^{\circ}\text{C}$   
10     или до  $-80^{\circ}\text{C}$  за один скачок с получением криоконсервированных клеток.

Вариант осуществления 96. Способ по любому из вариантов осуществления 74–94, где после обработки отдельных клеток средой для криоконсервации температуру понижают до значений от  $-70^{\circ}\text{C}$  до  $-196^{\circ}\text{C}$ , от  $-80^{\circ}\text{C}$  до  $-160^{\circ}\text{C}$  или от  $-80^{\circ}\text{C}$  до  $-120^{\circ}\text{C}$  или до  $-80^{\circ}\text{C}$  постепенно с получением криоконсервированных клеток.

15     Вариант осуществления 97. Криоконсервированные клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 74–96.

Вариант осуществления 98. Криоконсервированные клетки в соответствии с вариантом осуществления 97, где криоконсервированные клетки совместно экспрессируют NKX2.2 и NKX6.1.

20     Вариант осуществления 99. Криоконсервированные клетки в соответствии с вариантом осуществления 97, где по меньшей мере 20% криоконсервированных клеток совместно экспрессируют NKX2.2 и NKX6.1.

Вариант осуществления 100. Криоконсервированные клетки в соответствии с вариантом осуществления 97, где по меньшей мере 40% криоконсервированных клеток совместно экспрессируют NKX2.2 и NKX6.1.

25     Вариант осуществления 101. Криоконсервированные клетки в соответствии с вариантом осуществления 97, где по меньшей мере 60% криоконсервированных клеток совместно экспрессируют NKX2.2 и NKX6.1.

30     Вариант осуществления 102. Криоконсервированные клетки в соответствии с вариантом осуществления 97, где по меньшей мере 80% криоконсервированных клеток совместно экспрессируют NKX2.2 и NKX6.1.

Вариант осуществления 103. Криоконсервированные клетки, полученные в соответствии с вариантом осуществления 97, можно хранить в течение по меньшей мере 7 дней.

35     Вариант осуществления 104. Криоконсервированные клетки, полученные в соответствии с вариантом осуществления 97, можно хранить в течение по меньшей мере 14 дней.

Вариант осуществления 105. Криоконсервированные клетки, полученные в соответствии с вариантом осуществления 97, можно хранить в течение по меньшей мере 21 дня.

40     Вариант осуществления 106. Криоконсервированные клетки, полученные в соответствии с вариантом осуществления 97, можно хранить в течение по меньшей мере 1 месяца.

Вариант осуществления 107. Криоконсервированные клетки, полученные в соответствии с вариантом осуществления 97, можно хранить в течение по меньшей мере 2 месяцев.

Вариант осуществления 108. Криоконсервированные клетки, полученные в соответствии с вариантом осуществления 97, можно хранить в течение по меньшей

мере 3 месяцев.

Вариант осуществления 109. Кριοконсервированные клетки, полученные в соответствии с вариантом осуществления 97, можно хранить в течение по меньшей мере 6 месяцев.

5 Вариант осуществления 110. Кριοконсервированные клетки, полученные в соответствии с любым из вариантов осуществления 97–109, для применения для дальнейшей дифференцировки.

Вариант осуществления 111. Кριοконсервированные клетки, полученные в соответствии с любым из вариантов осуществления 97–109, для применения в  
10 инкапсуляции.

Вариант осуществления 112. Кριοконсервированные клетки, полученные в соответствии с любым из вариантов осуществления 97–109, для применения в инкапсуляции с помещением в устройство.

Вариант осуществления 113. Кριοконсервированные клетки, полученные в соответствии с любым из вариантов осуществления 97–109, для применения для  
15 трансплантации субъекту.

Вариант осуществления 114. Кριοконсервированные клетки, полученные в соответствии с любым из вариантов осуществления 97–109, для применения для трансплантации млекопитающему.

20 Вариант осуществления 115. Кριοконсервированные клетки, полученные в соответствии с любым из вариантов осуществления 97–109, для применения для трансплантации человеку.

Вариант осуществления 116. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 74–96, где кριοконсервированные клетки оттаивают в присутствии  
25 ингибитора Rock.

Вариант осуществления 117. Способ по варианту осуществления 116, где кριοконсервированные клетки оттаивают в присутствии 10 мкМ ингибитора Rock.

Вариант осуществления 118. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 74–96, где кριοконсервированные клетки оттаивают в отсутствие  
30 ингибитора Rock.

Вариант осуществления 119. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 74–96, где клетки, полученные после оттаивания, подвергают повторной агрегации.

Вариант осуществления 120. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 74–96, где клетки, полученные после оттаивания, подвергают повторной  
35 агрегации в течение 2 дней.

Вариант осуществления 121. Подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 76–96 и  
116–120.

40 Вариант осуществления 122. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 76–96 и 116–120, где подвергнутые повторной агрегации клетки совместно экспрессируют NKX6.1 и С-пептид.

Вариант осуществления 123. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 76–96 и 116–120, где по меньшей мере 20% подвергнутых повторной  
45 агрегации клеток экспрессируют NKX6.1 и С-пептид.

Вариант осуществления 124. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 76–96 и 116–120, где по меньшей мере 40% подвергнутых повторной агрегации клеток экспрессируют NKX6.1 и С-пептид.

Вариант осуществления 125. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 76–96 и 116–120, где по меньшей мере 60% подвергнутых повторной агрегации клеток экспрессируют НКХ6.1 и С-пептид.

5 Вариант осуществления 126. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 76–96 и 116–120, где по меньшей мере 80% подвергнутых повторной агрегации клеток экспрессируют НКХ6.1 и С-пептид.

Вариант осуществления 127. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 76–96 и 116–120, где по меньшей мере 20% подвергнутых повторной агрегации клеток представляют собой инсулин-секретирующие клетки, восприимчивые  
10 к глюкозе.

Вариант осуществления 128. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 76–96 и 116–120, где по меньшей мере 40% подвергнутых повторной агрегации клеток представляют собой инсулин-секретирующие клетки, восприимчивые к глюкозе.

15 Вариант осуществления 129. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 76–96 и 116–120, где по меньшей мере 60% подвергнутых повторной агрегации клеток представляют собой инсулин-секретирующие клетки, восприимчивые к глюкозе.

Вариант осуществления 130. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 76–96 и 116–120, где по меньшей мере 80% подвергнутых повторной агрегации клеток представляют собой инсулин-секретирующие клетки, восприимчивые к глюкозе.  
20

Вариант осуществления 131. Подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления с любым из вариантов осуществления 76–96 и 116–120, для применения для дальнейшей дифференцировки.  
25

Вариант осуществления 132. Подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 76–96 и 116–120, для применения в инкапсуляции.

30 Вариант осуществления 133. Подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 76–96 и 116–120, для применения в инкапсуляции с помещением в устройство.

Вариант осуществления 134. Подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 76–96 и 116–120, для применения для трансплантации субъекту.  
35

Вариант осуществления 135. Подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 76–96 и 116–120, для применения для трансплантации млекопитающему.

40 Вариант осуществления 136. Подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 76–96 и 116–120, для применения для трансплантации человеку.

Вариант осуществления 137. Подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 76–96 и 116–120, для применения в качестве лекарственного препарата.

45 Вариант осуществления 138. Подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 76–96 и 116–120, для применения в лечении диабета.

Вариант осуществления 139. Подвергнутые повторной агрегации эндокринные

клетки, предусматривающие по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% эндокринных клеток, совместно экспрессирующих НКХ6.1 и С-пептид.

5 Вариант осуществления 140. Подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки, предусматривающие по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% эндокринных клеток-предшественников, совместно экспрессирующих НКХ2.2 и НКХ6.1.

10 Вариант осуществления 141. Подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки, полученные в соответствии со способом обогащения агрегатов эндокринных клеток в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–39, 76–96 и 116–120.

Вариант осуществления 142. Подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки в соответствии с любым из вариантов осуществления 138–140 для применения в качестве лекарственного препарата.

15 Вариант осуществления 143. Подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки в соответствии с любым из вариантов осуществления 138–140 для применения в лечении диабета.

Вариант осуществления 144. Способ получения лекарственного препарата для лечения диабета с применением подвергнутых повторной агрегации клеток в соответствии с любым из вариантов осуществления 68–73 и 131–143.

20 Вариант осуществления 145. Кримоконсервированные отдельные эндокринные клетки, совместно экспрессирующие НКХ2.2 и НКХ6.1, или отдельные эндокринные клетки, совместно экспрессирующие НКХ6.1 и С-пептид.

Вариант осуществления 146. Кримоконсервированные отдельные эндокринные клетки, совместно экспрессирующие НКХ2.2 и НКХ6.1 или совместно экспрессирующие НКХ6.1 и С-пептид, полученные в соответствии со способом кримоконсервирования в соответствии с любым из вариантов осуществления 74–96 и 116–120.

Вариант осуществления 147. Кримоконсервированные отдельные эндокринные клетки в соответствии с любым из вариантов осуществления 145 или 146 для применения в трансплантации субъекту.

30 Вариант осуществления 148. Кримоконсервированные отдельные эндокринные клетки в соответствии с любым из вариантов осуществления 145 или 146 для применения в лечении диабета.

Вариант осуществления 149. Кримоконсервированные отдельные эндокринные клетки в соответствии с любым из вариантов осуществления 145 или 146 для применения в трансплантации субъекту.

35 Вариант осуществления 150. Кримоконсервированные отдельные эндокринные клетки в соответствии с любым из вариантов осуществления 145 или 146 для применения в качестве лекарственного препарата.

40 Вариант осуществления 151. Композиция, содержащая подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–39, 76–96, 116–120 и 122–130, для применения в качестве лекарственного препарата.

Вариант осуществления 152. Композиция, содержащая подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–39, 76–96, 116–120 и 122–130, для применения в лечении диабета.

45 Вариант осуществления 153. Композиция, содержащая подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки в соответствии с вариантом осуществления 131–143, для применения в качестве лекарственного препарата или для применения в лечении

диабета, например диабета I типа.

Вариант осуществления 154. Лекарственный препарат, содержащий подвергнутые повторной агрегации клетки, полученные с помощью способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–39, 76–96, 116–120 и 122–130.

5 Вариант осуществления 155. Лекарственный препарат, содержащий подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки в соответствии с любым из вариантов осуществления 131–143.

10 Вариант осуществления 156. Устройство, содержащее криоконсервированные эндокринные клетки в соответствии с любым из вариантов осуществления 40–52, 97–115 и 145–150, или подвергнутые повторной агрегации эндокринные клетки в соответствии с любым из вариантов осуществления 58, 68–73, 131–143 или 149–153, или композицию в соответствии с вариантом осуществления 151–153, или лекарственный препарат в соответствии с вариантом осуществления 154 или 155.

15 Неожиданно путем осуществления способа по настоящему изобретению получают обогащенную популяцию эндокринных клеток. Обогащенные эндокринные клетки характеризуются гомогенностью и малым размером кластера, что делает их подходящими для трансплантации субъекту.

Примеры

Перечень сокращений:

20 Alk5i II: TGF $\beta$ -активируемая киназа/киназа, подобная рецептору активина.

DAPT: Трет-бутиловый сложный эфир (дифторфенилацетил)аланилфенилглицина.

DMBI: (Z)-3-[4-(Диметиламино)бензилиденил]индолин-2-он.

DZNER: 3-Деазанепланоцин А.

BC: Бета-клетка.

25 DE: Дефинитивная энтодерма.

DNA-Pki: Ингибитор V DNA-ПК.

EP: Эндокринный предшественник.

GABA: Гамма-аминомасляная кислота.

hBS: Полученная из бластоцисты человека стволовая.

30 hES: Человеческая эмбриональная стволовая.

hESC: Человеческая эмбриональная стволовая клетка.

hiPS: Человеческая индуцированная плюрипотентная стволовая.

HSC: Гемопоэтическая стволовая клетка.

iPS: Индуцированная плюрипотентная стволовая.

35 iPSC: Индуцированная плюрипотентная стволовая клетка.

KOSR: Заменитель сыворотки крови KnockOut™.

PE: Панкреатическая энтодерма.

Rocki: Ингибитор Rho-киназы.

SC: Стволовая клетка.

40 Примеры

В целом, в рамках способа обогащения клетками, совместно экспрессирующими NKX6.1 и С-пептид, осуществляют разные стадии. Иллюстративный способ обогащения представлен на фиг. 1.

Пример 1. Получение популяции эндокринных клеток

45 Протоколы получения эндокринных клеток-предшественников и инсулин-секретирующих клеток, восприимчивых к глюкозе, были представлены в заявках на патенты WO2015/028614 и WO2017/144695 соответственно.

Пример 2. Обогащение агрегатов клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-

пептид, путем криоконсервирования эндокринных клеток-предшественников, совместно экспрессирующих NKX2.2 и NKX6.1

В отношении агрегатов клеток, совместно экспрессирующих NKX2.2 и NKX6.1, которые были получены *in vitro* из стволовых клеток, осуществляют следующие стадии.

5 (i) Обеспечение диссоциации

Агрегаты клеток, совместно экспрессирующих NKX2.2 и NKX6.1, полученные из стволовых клеток, подвергают диссоциации на отдельные клетки с применением аккутазы (стволовая клетка № 07920). Расщепление останавливают путем добавления среды RPMI1640 (Gibco № 61870-044), дополненной 12% KOSR (Gibco № 10828-0280), и  
10 суспензию фильтруют через фильтр с размером пор 40 мкм для удаления любых остаточных кластеров.

(ii) Обеспечение криоконсервации

После центрифугирования клетки, совместно экспрессирующие NKX2.2 и NKX6.1, ресуспендируют в среде для криоконсервации и консервируют путем последовательного  
15 снижения температуры до -80°C.

(ii) Оттаивание криоконсервированных отдельных клеток

Чтобы вернуть клетки в культуру, клетки, совместно экспрессирующие NKX2.2 и NKX6.1, быстро доводят до 37°C и промывают один раз в предварительно нагретой среде RPMI1640 (Gibco № 61870-044), дополненной 12% KOSR (Gibco № 10828-0280).

20 После подсчета клетки ресуспендируют в конкретной среде в зависимости от стадии, дополненной 50 мкг/мл ДНКазы I (Sigma № 11284932001) и 10 мкМ Rock1 (Sigma № Y27632-Y0503).

(iii) Обеспечение повторной агрегации клеток, полученных после оттаивания

Клетки, совместно экспрессирующие NKX2.2 и NKX6.1, полученные после оттаивания,  
25 подвергаются повторной агрегации в колбах Эрленмейера в уменьшенном объеме при плотности 0,5–2 млн жизнеспособных клеток/мл. Повторную агрегацию проводят при 37°C с горизонтальным встряхиванием при 70 об/мин в течение двух дней и после этого осуществляют замену среды.

30 Среда для эндокринного предшественника: среда RPMI1640 (Gibco № 61870-044), дополненная 12% KOSR (Gibco № 10828-0280), 0,1% P/S (Gibco № 15140-122), 10 мМ никотинамида (Sigma № N0636), 10 мкМ Alk5i II (Enzo № ALX-270-445), 1 мкМ DZNEP (Tocris № 4703), 10 мкг/мл гепарина (Applichem № A3004,0250), 2,5 мкМ DAPT (Calbiochem № 565784) и 1 мкМ T3 (Sigma № T6397).

35 После криоконсервации эндокринные клетки-предшественники, совместно экспрессирующие NKX2.2 и NKX6.1, извлекают при жизнеспособности выше 60%. После повторной агрегации и дифференцировки в эндокринные клетки, совместно экспрессирующие NKX6.1 и С-пептид, указанные эндокринные клетки образуют кластеры, приводящие к получению небольших и более гомогенных агрегатов, что может способствовать повышению гомогенности трансплантатов *in vivo* (размер ~100  
40 мкм, снижение количества NKX6.1/С-пеп./GLU-отрицательных клеток до <50%, увеличение количества NKX6.1-положительных клеток до >50%). Эффекты в отношении фенотипа эндокринных клеток-предшественников, совместно экспрессирующих NKX2.2 и NKX6.1, *in vitro* представлены на фиг. 2А и 2В соответственно.

45 После трансплантации мышам без диабета подвергнутые диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации эндокринные клетки-предшественники, совместно экспрессирующие NKX2.2 и NKX6.1, являются функциональными и секретируют С-пептид человека в случае нагрузки глюкозой или острой инсулиновой резистентности, индуцированной с помощью S961 (фиг. 3А).

Для животных, получающих клетки, полученные с применением протокола со стадиями обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации или без таковых, было показано увеличение содержания С-пептида во время нагрузки с помощью S961. Эти результаты показывают, что при применении протокола с диссоциацией, криоконсервацией и повторной агрегацией эффективность повышалась, а степень варьирования между животными уменьшалась (фиг. 3В).

Результаты иммуногистохимического анализа трансплантатов из почек показали, что наличие стадий обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации приводит к обогащению разными типами эндокринных клеток (инсулин, глюкагон, NKX6.1) и снижению количества разных типов клеток, отличных от эндокринных (фиг. 3С). С помощью этих данных можно также объяснить снижение количества особей, не отвечающих на лечение, через две недели после трансплантации.

Пример 3. Обогащение агрегатов клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид, посредством криоконсервирования клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид

В отношении агрегатов клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид, которые были получены *in vitro* из стволовых клеток, осуществляют следующие стадии.

(i) Обеспечение диссоциации

Агрегаты клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид, полученные из стволовых клеток, подвергают диссоциации на отдельные клетки с применением аккутазы (стволовая клетка № 07920). Расщепление останавливают путем добавления среды RPMI1640 (Gibco № 61870-044), дополненной 12% KOSR (Gibco № 10828-0280), и суспензию фильтруют через фильтр с размером пор 40 мкм для удаления любых остаточных кластеров.

(ii) Обеспечение криоконсервации

После центрифугирования клетки, совместно экспрессирующие NKX6.1 и С-пептид, ресуспендируют в среде для криоконсервации и консервируют путем последовательного снижения температуры до  $-80^{\circ}\text{C}$ .

(iii) Оттаивание криоконсервированных отдельных клеток

Чтобы вернуть клетки в культуру, клетки, совместно экспрессирующие NKX6.1 и С-пептид, быстро доводят до  $37^{\circ}\text{C}$  и промывают один раз в предварительно нагретой среде RPMI1640 (Gibco № 61870-044), дополненной 12% KOSR (Gibco № 10828-0280). После подсчета клетки ресуспендируют в конкретной среде в зависимости от стадии, дополненной 50 мкг/мл ДНКазы I (Sigma № 11284932001) и 10 мкМ Rock1 (Sigma № Y27632-Y0503).

(iv) Обеспечение повторной агрегации клеток, полученных после оттаивания

Клетки, совместно экспрессирующие NKX6.1 и С-пептид, полученные после оттаивания, подвергают повторной агрегации в колбах Эрленмейера в уменьшенном объеме при плотности 0,5–2 млн жизнеспособных клеток/мл. Повторную агрегацию проводят при  $37^{\circ}\text{C}$  с горизонтальным встряхиванием при 70 об/мин в течение двух дней и после этого осуществляют замену среды.

Среда: среда RPMI1640 (Gibco № 61870-044), дополненная 12% KOSR (Gibco № 10828-0280), 0,1% P/S (Gibco № 15140-122), 50 мкМ GABA (TOCRIS № 0344), 10 мкМ Alk5i II (Enzo № ALX-270-445), 1 мкМ DZNER (Toctris № 4703) и 1 мкМ T3 (Sigma № T6397).

После криоконсервации клетки, совместно экспрессирующие NKX6.1 и С-пептид, извлекают при жизнеспособности выше 90%. После повторной агрегации клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид, происходит улучшение в отношении фенотипа инсулин-секретирующих, восприимчивых к глюкозе клеток (размер ~150

мкм, снижение количества NKX6.1/C-пеп./GLU-отрицательных клеток до <25%, увеличение количества NKX6.1-положительных клеток до >25%)(фиг. 4А и 4В).

Показано, что подвергнутые диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации эндокринные клетки, совместно экспрессирующие NKX6.1 и С-пептид, *in vivo* обеспечивают эффективное снижение уровня глюкозы в крови, что коррелировало с высоким уровнем секреции С-пептида человека (фиг. 5А и 5В).

Пример 4. Профиль экспрессии генов после криоконсервации агрегатов клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и NKX2.2, или агрегатов клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид

Диссоциация, криоконсервация и повторная агрегация клеток, которые подвергли криоконсервации в различные моменты времени в ходе клеточной дифференцировки. Клетки подвергали криоконсервации на стадии панкреатической энтодермы (РЕ), за 1 день до начала экспрессии С-пептида (BC00), через 2 дня после начала экспрессии С-пептида (BC03), через 5 дней после начала экспрессии С-пептида (BC06) и через 8 дней после начала экспрессии С-пептида (BC09), и все они были из одной и той же партии клеток. Обеспечивали оттаивание и дифференцировку клеток и испытывали в отношении функциональных свойств через 13 дней после начала экспрессии С-пептида (BC14) по одной и той же схеме. Результаты показывают, что уровень реакции на глюкозу и уровень экспрессии NKX6.1 и С-пептида являются более высокими в случае, если клетки подвергали криоконсервации на стадиях BC00 и BC03 (фиг. 6А).

Уровень экспрессии NKX6.1 и С-пептида измеряли на стадии BC14 с применением проточной цитометрии. Данные выражены в виде % по сравнению с клетками из одной и той же партии, полученными с применением протокола без стадии обеспечения диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации. Результаты показывают, что обогащение клетками с NKX6.1 и С-пептидом является наиболее эффективным в случае клеток, подвергнутых криоконсервации на стадиях BC00 и BC03 (фиг. 6В).

В конце эксперимента функциональные свойства исследовали с применением системы динамической перфузии. Все клетки реагировали на нагрузку с помощью 20 мМ глюкозы и эксендина-4, но наиболее сильную реакцию наблюдали в случае, если клетки подвергали криоконсервации на стадиях BC00 и BC03, соответственно за 1 день до и через 2 дня после стимуляции экспрессии С-пептида (фиг. 6С).

#### (57) Формула изобретения

1. Способ обогащения агрегатов эндокринных клеток, полученных *in vitro* из стволовых клеток, эндокринными клетками, совместно экспрессирующими NKX6.1 и С-пептид, или эндокринными клетками-предшественниками, совместно экспрессирующими NKX2.2 и NKX6.1, при этом указанный способ включает следующие стадии:

(i) обеспечение диссоциации указанных агрегатов эндокринных клеток на отдельные клетки; (ii) обработка указанных отдельных клеток средой для криоконсервации и снижение температуры с получением криоконсервированных эндокринных клеток;

(iii) оттаивание указанных криоконсервированных эндокринных клеток; и (iv) обеспечение повторной агрегации указанных эндокринных клеток, полученных после оттаивания.

2. Способ обогащения агрегатов эндокринных клеток по п. 1, где указанные эндокринные клетки из стадии (i) представляют собой эндокринные клетки, совместно экспрессирующие NKX6.1 и С-пептид, или эндокринные клетки-предшественники, совместно экспрессирующие NKX2.2 и NKX6.1.

3. Способ обогащения агрегатов эндокринных клеток по п. 2, где в случае, если указанные эндокринные клетки из стадии (i) представляют собой эндокринные клетки-предшественники, совместно экспрессирующие NKX2.2 и NKX6.1, указанный способ дополнительно включает стадию (v) обеспечения дифференцировки указанных  
5 эндокринных клеток-предшественников, совместно экспрессирующих NKX2.2 и NKX6.1, с получением агрегатов эндокринных клеток, совместно экспрессирующих NKX6.1 и С-пептид.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где указанные стволовые клетки представляют собой эмбриональные стволовые клетки, предпочтительно человеческие эмбриональные  
10 стволовые клетки.

5. Способ по любому из пп. 1-3, где указанные стволовые клетки представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

6. Способ по п. 1, где агрегаты эндокринных клеток стадии (i) диссоциируют с помощью ферментов или реагентов, отличных от ферментов.

15 7. Способ по п. 6, где агрегаты эндокринных клеток стадии (i) диссоциируют с помощью ферментов, выбранных из группы, состоящей из протеаз или смесей протеаз, трипсина, коллагеназы, эластазы или их смесей.

8. Способ по п. 6, где агрегаты эндокринных клеток стадии (i) диссоциируют с помощью фермента аккутазы.

20 9. Способ по п. 6, где агрегаты эндокринных клеток стадии (i) диссоциируют с помощью реагентов, отличных от ферментов, выбранных из группы, состоящей из этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) или этиленгликоль-бис(β-аминоэтилэфир) -N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (EGTA).

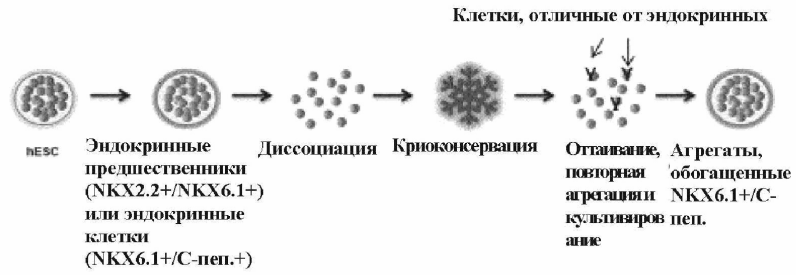
25 10. Способ по п. 1, где после обработки отдельных клеток средой для криоконсервации на стадии (ii) температуру понижают за один скачок или постепенно до от -70°C до -196°C, от -80°C до -160°C или от -80°C до -120°C, или -80°C с получением криоконсервированных клеток.

30

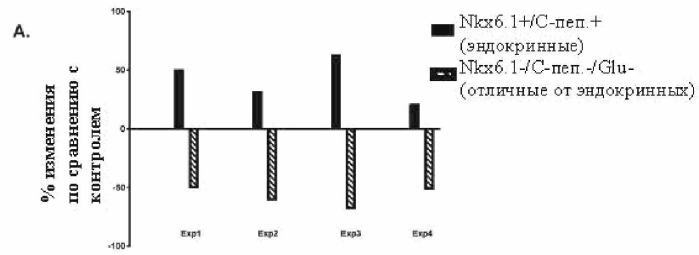
35

40

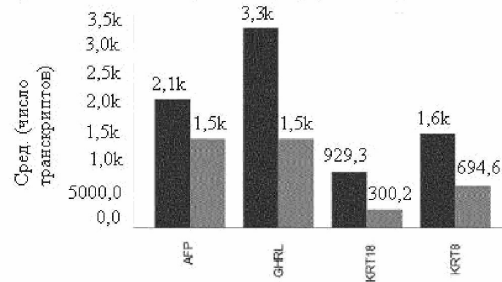
45



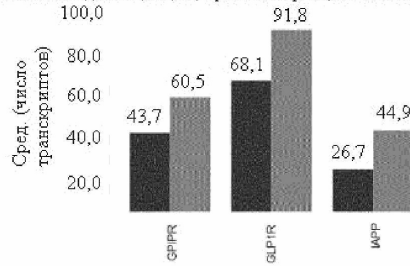
Фигура 1



Транскрипты, отличные от свойственных эндокринным клеткам, количество которых уменьшается после диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации



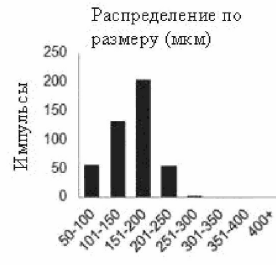
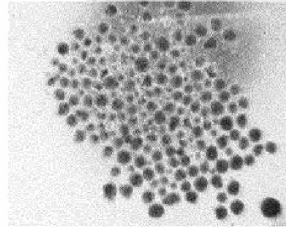
Транскрипты, свойственные эндокринным клеткам, количество которых увеличивается после диссоциации, криоконсервации и повторной агрегации



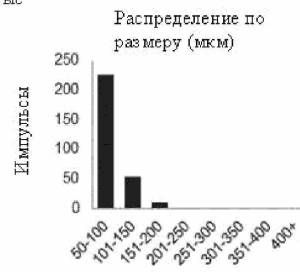
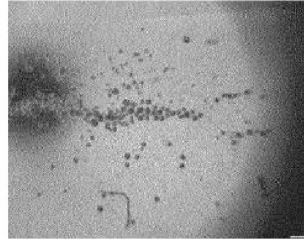
Фигура 2

**В.**

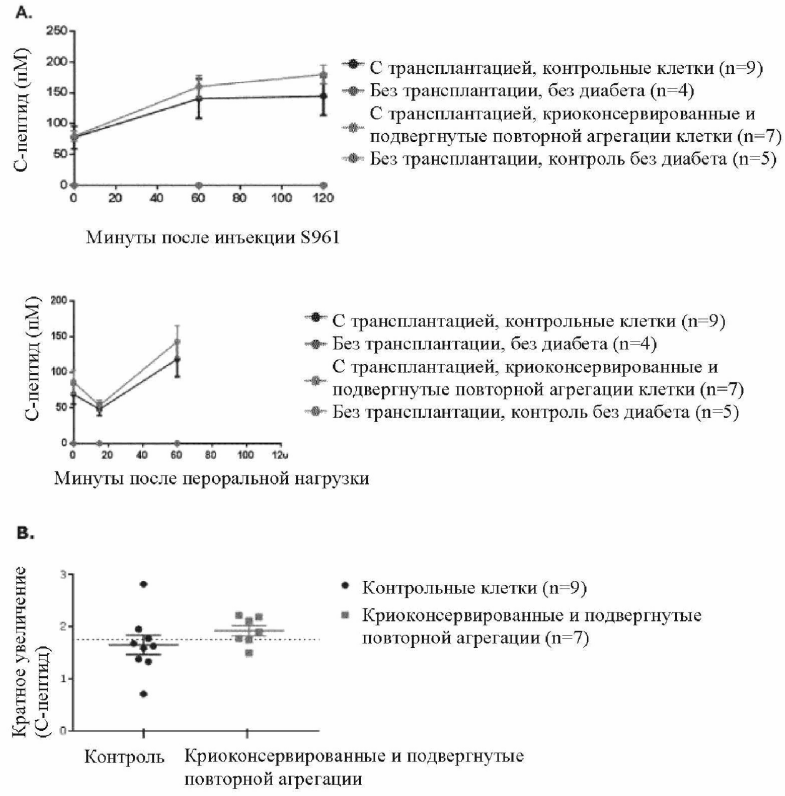
Контроль



Криоконсервированные и подвергнутые повторной агрегации



Фигура 2, продолжение



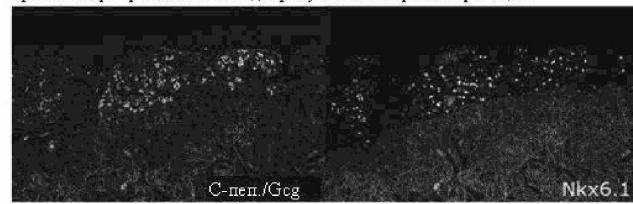
Фигура 3

с.

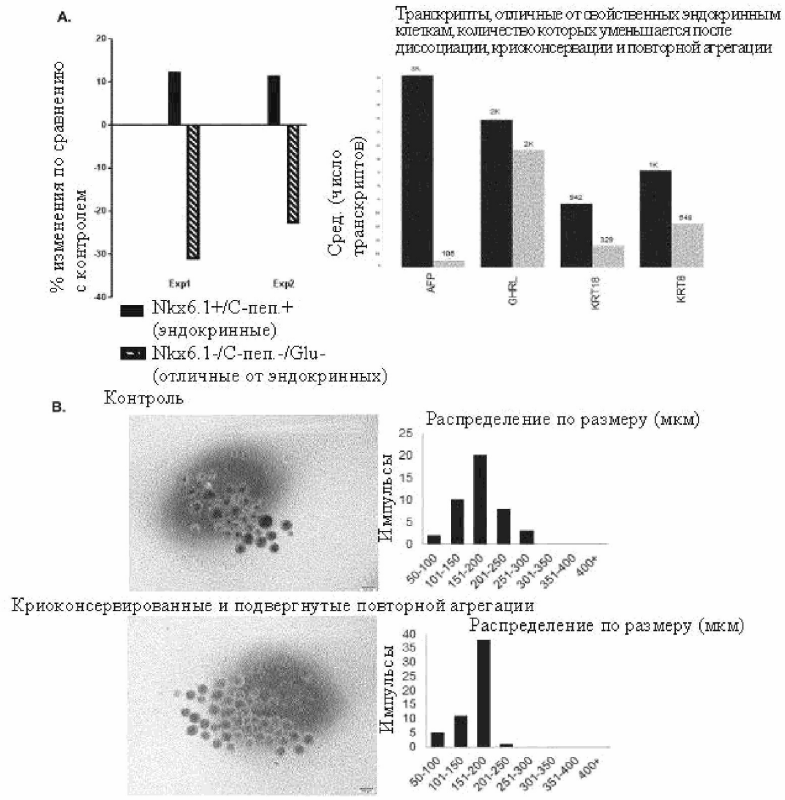
Контроль



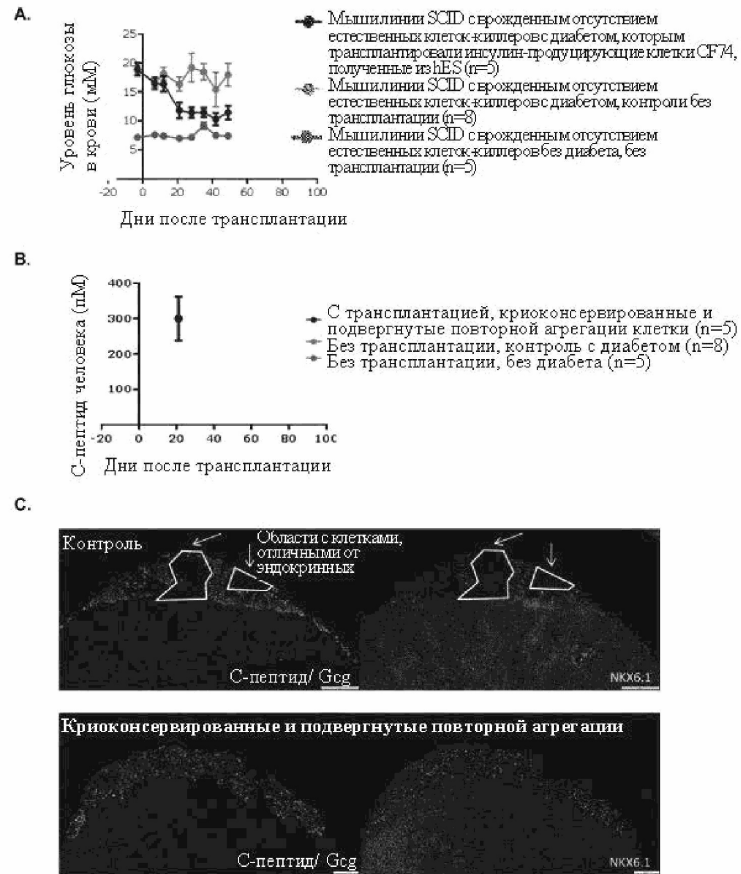
Криоконсервированные и подвергнутые повторной агрегации



Фигура 3, продолжение



Фигура 4

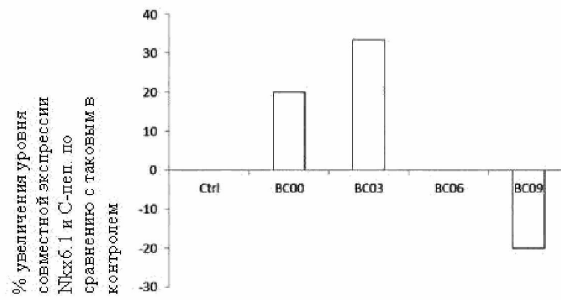


Фигура 5

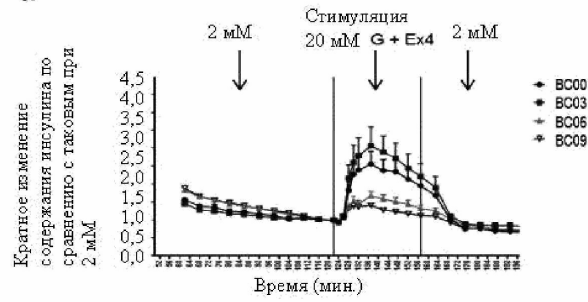
**A.**

День дифференцировки	Препараты/кормовая добавка	Экспрессия	Реакция глюкозы (конечная стадия ВС, день 14)
19	PE	НКХБ 1/ПКХ1	Отсутствует
20	BC00	НКХБ 1/ПКХ2.2	Показатель стимулирования 3,2
23	BC03	НКХБ 1/С-пер	Показатель стимулирования 2,6
26	BC06	НКХБ 1/С-пер	Показатель стимулирования 1,7
29	BC09	НКХБ 1/С-пер	Показатель стимулирования 1,5

**B.**



**C.**



Фигура 6