

R U 2 0 1 2 1 2 7 8 1 0 A



(19) RU⁽¹¹⁾ 2012 127 810⁽¹³⁾ A
(51) МПК
C12N 5/00 (2006.01)

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2012127810/10, 03.12.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
04.12.2009 US 61/266,939;
17.09.2010 US 61/384,165

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2014 Бюл. № 1

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 04.07.2012

(86) Заявка РСТ:
US 2010/058990 (03.12.2010)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/069127 (09.06.2011)

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

(71) Заявитель(и):

СТЕМ СЕЛЛ ЭНД РИДЖЕНЕРЭЙТИВ
МЕДСИН ИНТЕРНЭШНЛ, ИНК. (US)

(72) Автор(ы):

ЛИ Фэн (US),
ЛЮ Си-Цзян (US)

(54) КРУПНОМАСШТАБНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ МЕГАКАРИОЦИТОВ И
ТРОМБОЦИТОВ ИЗ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В
БЕССТРОМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

(57) Формула изобретения

1. Способ получения мегакариоцитов, включающий:
получение гемангиобластов; и
культивирование гемангиобластов с дифференциацией в мегакариоциты (МК).
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что гемангиобласты дифференцируют *in vitro*
из плюрипотентных стволовых клеток.
3. Способ по п.2, отличающийся тем, что плюрипотентные стволовые клетки являются
человеческими эмбриональными стволовыми клетками (чЭСК).
4. Способ по п.2, отличающийся тем, что плюрипотентные стволовые клетки являются
индивидуированными плюрипотентными стволовыми клетками (иПСК).
5. Способ по п.2, отличающийся тем, что дифференциация плюрипотентных стволовых
клеток включает диссоциацию плюрипотентных стволовых клеток и культивирование
плюрипотентных стволовых клеток со средой, содержащей фактор роста или цитокин,
выбранный из группы, состоящей из BMP-4, VEGF, bFGF, TPO, Flt3-лиганд, SCF и их
комбинаций, для получения эмбриоидных телец (ЭТ).
6. Способ по п.5, отличающийся тем, что среда содержит BMP-4 и VEGF, а
культивирование плюрипотентных стволовых клеток проводят в течение около 48 ч
до образования ЭТ.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что концентрация BMP-4 равна 50 нг/мл и концентрация VEGF равна 50 нг/мл.

8. Способ по п.5, отличающийся тем, что сформированные ЭТ подвергают химической и/или механической диссоциации и по меньшей мере часть питательной среды замещают средой, содержащей фактор роста или цитокин, выбранный из группы, состоящей из BMP-4, VEGF, bFGF, TPO, Flt3-лиганд, SCF и их комбинаций, для получения гемангиобластов.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что концентрация BFGF равна 20 нг/мл, концентрация ТРО равна 50-100 нг/мл, лиганда Flt3 - 50 нг/мл и SCF - 50 нг/мл.

10. Способ по п.8, отличающийся тем, что диссоциированные ЭТ культивируют в среде для роста колоний бластов в течение приблизительно 3-4 дней для получения гемангиобластов.

11. Способ по п.8, отличающийся тем, что среда дополнительно содержит IL6, эстрадиол, витамин В3, один или более белков внеклеточного матрикса и их комбинации.

12. Способ по п.4, отличающийся тем, что иПСК индуцированы из соматических клеток человеческого происхождения.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что соматические клетки происходят из взрослой ткани.

14. Способ по п.12, отличающийся тем, что соматические клетки происходят из фетальной ткани.

15. Способ по п.5, отличающийся тем, что среда является средой Stemline II.

16. Способ по п.1, отличающийся тем, что дифференциация гемангиобластов в МК включает культивирование в среде, содержащей фактор роста или цитокин, выбранный из группы, состоящей из ТРО, SCF, IL11 и их комбинаций, в течение около 2-8 дней.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что концентрация ТРО равна 50 нг/мл, концентрация ТРО равна 20 нг/мл и концентрация IL11 равна 20 нг/мл.

18. Способ по п.16, отличающийся тем, что дополнительно включает замену по меньшей мере части питательной среды средой, содержащей фактор роста или цитокин, выбранный из группы, состоящей из ТРО, SCF, IL11 и их комбинаций, каждые 2-3 дня для дифференциации гемангиобластов в МК.

19. Способ по п.16, отличающийся тем, что среда является средой Stemline II.

20. Мегакариоциты, полученные по любому из способов по пп.1-19.

21. Способ получения тромбоцитов, включающий:

получение мегакариоцитов (МК); и

культтивирование МК с дифференциацией в тромбоциты.

22. Способ по п.21, отличающийся тем, что МК дифференцируют из гемангиобластов.

23. Способ по п.22, отличающийся тем, что дифференциация гемангиобластов в МК включает культивирование в среде, содержащей фактор роста или цитокин, выбранный из группы, состоящей из ТРО, SCF, IL11 и их комбинаций, в течение около 2-8 дней.

24. Способ по п.23, отличающийся тем, что концентрация ТРО равна 50 нг/мл, концентрация ТРО равна 20 нг/мл и концентрация IL11 равна 20 нг/мл.

25. Способ по п.23, отличающийся тем, что дополнительно включает замену по меньшей мере части питательной среды средой, содержащей фактор роста или цитокин, выбранный из группы, состоящей из ТРО, SCF, IL11 и их комбинаций, каждые 2-3 дня для дифференциации гемангиобластов в МК.

26. Способ по п.23, отличающийся тем, что среда является средой Stemline II.

27. Способ по п.22, отличающийся тем, что гемангиобlastы дифференцируют *in vitro* из плорипотентных стволовых клеток.

28. Способ по п.27, отличающийся тем, что плорипотентные стволовые клетки являются эмбриональными человеческими стволовыми клетками (эЧСК).

29. Способ по п.27, отличающийся тем, что плюрипотентные стволовые клетки являются индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (иПСК).

30. Способ по п.27, отличающийся тем, что дифференциация плюрипотентных стволовых клеток включает диссоциацию плюрипотентных стволовых клеток и культивирование плюрипотентных стволовых клеток со средой, содержащей фактор роста или цитокин, выбранный из группы, состоящей из BMP-4, VEGF, bFGF, TPO, Flt3-лиганда, SCF и их комбинаций, для получения эмбриоидных телец (ЭТ).

31. Способ по п.30, отличающийся тем, что среда содержит BMP-4 и VEGF, а культивирование плюрипотентных стволовых клеток выполняют в течение около 48 ч до образования ЭТ.

32. Способ по п.31, отличающийся тем, что концентрация BMP-4 равна 50 нг/мл и концентрация VEGF равна 50 нг/мл.

33. Способ по п.30, отличающийся тем, что сформированные ЭТ подвергают химической и/или механической диссоциации и по меньшей мере часть питательной среды замещают средой, содержащей фактор роста или цитокин, выбранный из группы, состоящей из BMP-4, VEGF, bFGF, TPO, Flt3-лиганды, SCF и их комбинаций, для получения гемангиобластов.

34. Способ по п.33, отличающийся тем, что концентрация bFGF равна 20 нг/мл, концентрация ТРО равна 50-100 нг/мл, лиганда Flt3 - 50 нг/мл и SCF - 50 нг/мл.

35. Способ по п.33, отличающийся тем, что диссоциированные ЭТ культивируют в среде для роста колоний бластов в течение приблизительно 3-4 дней для получения гемангиобластов.

36. Способ по п.33, отличающийся тем, что среда дополнительно содержит IL6, эстрадиол, витамин В3, один или более белков внеклеточного матрикса и их комбинации.

37. Способ по п.29, отличающийся тем, что иПСК индуцируют из соматических клеток человеческого происхождения.

38. Способ по п.37, отличающийся тем, что соматические клетки происходят из взрослой ткани.

39. Способ по п.37, отличающийся тем, что соматические клетки происходят из фетальной ткани.

40. Способ по п.30, отличающийся тем, что среда является средой Stemline II.

41. Способ по п.21, отличающийся тем, что МК ресуспендированы и культивированы по меньшей мере 4 дня в среде, содержащей фактор роста или цитокин, выбранный из группы, состоящей из ТРО, SCF, гепарина натрия, IL11 и их комбинаций, для дифференциации в тромбоциты.

42. Способ по п.41, отличающийся тем, что концентрация ТРО равна 100 нг/мл, концентрация ТРО равна 50 нг/мл, концентрация гепарина натрия равна 25 ед/мл и концентрация IL11 равна 20 нг/мл.

43. Способ по п.41, отличающийся тем, что дополнительно включает добавление GM 6001 или IL3 спустя по меньшей мере 4 дня культивирования МК.

44. Способ по п.41, отличающийся тем, что дополнительно включает замену по меньшей мере части питательной среды средой, содержащей фактор роста или цитокин, выбранный из группы, состоящей из ТРО, SCF, гепарина натрия, IL11 и их комбинаций, по меньшей мере каждые два дня.

45. Способ по п.41, отличающийся тем, что среда является средой IMDM.

46. Способ по п.21, отличающийся тем, что МК диссоциируют и культивируют на митотически задержанном фидерном слое по меньшей мере 4 дня в среде, содержащей фактор роста или цитокин, выбранный из группы, состоящей из ТРО, SCF, гепарина натрия, IL11 и их комбинаций, для дифференциации в тромбоциты.

47. Способ по п.46, отличающийся тем, что фидерный слой содержит клетки OP9.

48. Способ по п.46, отличающийся тем, что фидерный слой содержит клетки С3Н 10T1/2.

49. Способ по п.46, отличающийся тем, что дополнительно включает добавление GM 6001 или IL3 спустя по меньшей мере 4 дня культивирования МК.

50. Способ по п.46, отличающийся тем, что дополнительно включает замену по меньшей мере части питательной среды средой, содержащей фактор роста или цитокин, выбранный из группы, состоящей из ТРО, SCF, гепарина натрия, IL11 и их комбинаций, по меньшей мере каждые два дня.

51. Способ по п.46, отличающийся тем, что среда является средой IMDM.

52. Тромбоциты, полученные по любому из способов по пп.21-51.

53. Тромбоциты по п.52, отличающиеся тем, что они сохраняются в растворе, который не участвует в HLA-аллоиммуногенном ответе у субъекта при введении тромбоцитов.

54. Тромбоциты по п.52, отличающиеся тем, что они не активируются в присутствии апиразы и/или ЭДТА.

55. Способ скрининга модулятора клеточной дифференциации, включающий:
получение определенного количества мегакариоцитов (МК);
контактирование МК с тестируемым веществом; и
определение наличия или отсутствия функционального эффекта при контакте МК и тестируемого вещества,

причем наличие функционального эффекта свидетельствует о том, что тестируемое вещество является мегакариопоэтическим, тромбоцитопоэтическим и/или гемопоэтическим фактором, модулирующим клеточную дифференциацию, а отсутствие функционального эффекта свидетельствует о том, что тестируемое вещество не является мегакариопоэтическим, тромбоцитопоэтическим или гемопоэтическим фактором, модулирующим клеточную дифференциацию.

56. Способ лечения субъекта, нуждающегося в переливании тромбоцитов, включающий:

получение определенного количества гемангиобластов;
культивирование гемангиобластов с дифференциацией в мегакариоциты (МК);

культивирование МК *in vitro* с дифференциацией в тромбоциты;

получение определенного количества дифференцированных *in vitro* тромбоцитов; и
введение определенного количества дифференцированных *in vitro* тромбоцитов субъекту, нуждающемуся в переливании тромбоцитов, осуществляя терапию субъекта, нуждающегося в переливании тромбоцитов.

57. Способ по п.56, отличающийся тем, что дифференцированные *in vitro* гемангиобласти подбирают для субъекта для уменьшения или устранения иммунитет-опосредованной реакции организма.