



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2018116647, 18.12.2013

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
31.12.2012 US 61/747,662(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2015131835 30.07.2015(43) Дата публикации заявки: 24.10.2018 Бюл. №
30

Адрес для переписки:

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

(71) Заявитель(и):

ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Автор(ы):

РЕЗАНИЯ Алиреза (US)

(54) КУЛЬТИВАЦИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В ВОЗДУШНО-ЖИДКОСТНОЙ ЗОНЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ЦЕЛЬЮ ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В ПАНКРЕАТИЧЕСКИЕ ЭНДОКРИННЫЕ КЛЕТКИ

(57) Формула изобретения

1. Клеточная культура in vitro для дифференцировки клеток в воздушно-жидкостной зоне взаимодействия, включающая:

- а. культивационный сосуд;
- б. объем дифференцировочной среды внутри указанного сосуда, достаточный для заполнения только части объема указанного сосуда;
- с. воздух внутри указанного сосуда, который заполняет часть указанного сосуда, свободную от указанной среды;
- д. пористый субстрат, расположенный в зоне взаимодействия между указанной средой и указанным воздухом; и
- е. клетки, на поверхности указанного субстрата, расположенные таким образом, что указанная среда контактирует только с частью поверхности указанных клеток, где указанные клетки представляют собой клетки, которые экспрессируют маркеры, характерные для клеток энтодермы передней кишки, клетки, которые экспрессируют маркеры, характерные для панкреатических клеток-предшественников передней кишки, клетки, которые экспрессируют маркеры, характерные для панкреатических энтодермальных клеток, или клетки, которые экспрессируют маркеры, характерные для панкреатических эндокринных клеток-предшественников.

2. Клеточная культура по п.1, в которой клетки представляют собой клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для клеток энтодермы передней кишки.

3. Клеточная культура по п.1, в которой клетки экспрессируют по меньшей мере

один из следующих маркеров: PDX1, FOXA2, CDX2, SOX2 и HNF4α.

4. Клеточная культура по п.2 или 3, в которой клетки представляют собой клетки человека.

5. Клеточная культура по п.1, в которой клетки представляют собой клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для панкреатических клеток-предшественников передней кишки.

6. Клеточная культура по п.5, в которой клетки экспрессируют по меньшей мере один из следующих маркеров: PDX1, NKX6.1, HNF6, NGN3, SOX9, PAX4, PAX6, ISL1, гастрин, FOXA2, PTF1α, PROX1 и HNF4α.

7. Клеточная культура по п.5 или 6, где клетки представляют собой клетки человека.

8. Клеточная культура по п.1, в которой клетки представляют собой клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для клеток панкреатических энтодермальных клеток.

9. Клеточная культура по п.8, в которой клетки экспрессируют по меньшей мере один из следующих маркеров: PDX1, NKX6.1, HNF1β, PTF1α, HNF6, HNF4α, SOX9, NGN3, гастрин, HB9 и PROX1.

10. Клеточная культура по п.7 или 8, в которой клетки представляют собой клетки человека.

11. Клеточная культура по п.1, в которой клетки представляют собой клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для панкреатических эндокринных клеток-предшественников.

12. Клеточная культура по п.11, в которой клетки экспрессируют по меньшей мере один из следующих маркеров: NGN3, NKX2.2, NeuroD1, ISL1, PAX4, PAX6 и ARX.

13. Клеточная культура по п.10 или 11, в которой клетки представляют собой клетки человека.

14. Клеточная культура по п.1, где указанная дифференцировочная среда содержит ростовую среду, обогащенную ингибитором ALK5 или гормоном щитовидной железы, выбранным из трийодтиронина, тироксина, аналогов трийодтиронина, аналогов тироксина и их смесей, или обогащенную одновременно ингибитором ALK5 и гормоном щитовидной железы.

15. Клеточная культура по п.1, где ростовая среда представляет собой среду MCDB131.

16. Клеточная культура по п.1, где ростовая среда представляет собой среду BLAR.

17. Клеточная культура по п.1, где ростовая среда обогащена трийодтиронином и ингибитором ALK5 II.

18. Клеточная культура по п.14, где указанная дифференцировочная среда дополнительно обогащена фактором роста, выбранным из FGF7, FGF10 и их смеси, активатором PKC, выбранным из TPB, PDBu, PMA и ILV, и ингибитором рецептора BMP, выбранного из LDN-193189, Noggin и Chordin.

19. Клеточная культура по любому из пп.14-16, где ростовая среда обогащена FGF7, TPB и LDN-193189.

20. Клеточная культура по любому из пп.14-16, где указанная дифференцировочная среда содержит ростовую среду, обогащенную ингибитором ALK5 и ингибитором BMP, выбранным из группы, состоящей из LDN-193189, Noggin или Chordin.

21. Клеточная культура по п.20, где ростовая среда обогащена LDN-193189 и ингибитором ALK5 II.

22. Клеточная культура по любому из пп.14-16, где ростовая среда обогащена трийодтиронином и ингибитором ALK5 II.

23. Клеточная культура по п.22, где ростовая среда дополнительно обогащена одним или несколькими из следующих компонентов:

RU 2018116647 A

RU 2018116647 A

- (a) сглаженный ингибитор рецептора, выбранный из MRT10 или циклопамина;
- (b) антагонист пути передачи сигналов SHH, выбранный из SANT-1 или HPI-1;
- (c) ингибитор рецептора BMP, выбранный из LDN-193189, Noggin или Chordin;
- (d) активатор PKC, выбранный из TPB, PDBu, PMA и ILV;
- (e) фактор роста фибробластов, выбранный из FGF7 или FGF10;
- (f) ретиноевая кислота;
- (g) аскорбиновая кислота;
- (h) гепарин; и
- (i) сульфат цинка.

24. Клеточная культура по п.1, где указанная дифференцировочная среда содержит ростовую среду, обогащенную гормоном щитовидной железы, выбранным из трийодтиронина, тироксина, аналогов трийодтиронина, аналогов тироксина и их смесей, и среда дополнительно обогащена одним или несколькими из следующих компонентов:

- (a) сглаженный ингибитор рецептора, выбранный из MRT10 или циклопамина;
- (b) антагонист пути передачи сигналов SHH, выбранный из SANT-1 или HPI-1;
- (c) ингибитор рецептора BMP, выбранный из LDN-193189, Noggin или Chordin;
- (d) активатор PKC, выбранный из TPB, PDBu, PMA и ILV;
- (e) фактор роста фибробластов, выбранный из FGF7 или FGF10;
- (f) ретиноевая кислота;
- (g) аскорбиновая кислота;
- (h) гепарин; и
- (i) сульфат цинка.

25. Клеточная культура по п.24, где указанная ростовая среда представляет собой среду MCDB131 или среду BLAR.

26. Клеточная культура по п.5 или 6, где указанная дифференцировочная среда содержит ростовую среду, обогащенную ингибитором ALK5 или гормоном щитовидной железы, выбранным из группы, состоящей из трийодтиронина, тироксина, аналогов трийодтиронина, аналогов тироксина и их смесей, или обогащенную одновременно ингибитором ALK5 и гормоном щитовидной железы, и среда дополнительно обогащена ретиноевой кислотой, аскорбиновой кислотой, сульфатом цинка, LDN-193189 и гепарином.

27. Клеточная культура по п.26, где ростовая среда представляет собой среду MCDB131.

28. Клеточная культура по п.26, где ростовая среда представляет собой среду BLAR.

29. Клеточная культура по пп.8, 9, 11 или 12, указанная дифференцировочная среда содержит ростовую среду, обогащенную ингибитором ALK5 или гормоном щитовидной железы, выбранным из группы, состоящей из трийодтиронина, тироксина, аналогов трийодтиронина, аналогов тироксина и их смесей, или обогащенную одновременно ингибитором ALK5 и гормоном щитовидной железы, и среда дополнительно обогащена ретиноевой кислотой, аскорбиновой кислотой, сульфатом цинка, LDN-193189 и гепарином.

30. Клеточная культура по п.26, где ростовая среда представляет собой среду MCDB131.

31. Клеточная культура по п.26, где ростовая среда представляет собой среду BLAR.

32. Клеточная культура по п.1, в которой по меньшей мере около тридцати процентов полученных клеток экспрессируют NKX6.1 и инсулин.

33. Клеточная культура по п.1, в которой по меньшей мере около тридцати процентов полученных клеток экспрессируют NKX6.1 и хромогранин-А.

34. Клеточная культура по п.1, где пористый субстрат не имеет покрытия.

35. Клеточная культура по п.1, где пористый субстрат имеет размер пор от 0,3 до 0,8 мкм.

36. Клеточная культура по п. 1 или 35, где пористый субстрат имеет плотность пор от 50 до 120 миллионов пор/см².

RU 20181169110 A

RU 2018116647 A