



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2012149102/10, 19.04.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

20.04.2010 US 61/326,084;

18.05.2010 US 61/345,949

(43) Дата публикации заявки: 27.05.2014 Бюл. № 15

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 20.11.2012

(86) Заявка РСТ:

US 2011/033122 (19.04.2011)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2011/133599 (27.10.2011)

Адрес для переписки:

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

(71) Заявитель(и):

**ИНТЕРНЭШНЛ СТЕМ СЕЛЛ
КОРПОРЕЙШН (US)**

(72) Автор(ы):

**ТУРОВЕЦ Николай (US),
СЕМЕЧКИН Андрей (US),
АГАПОВА Лариса (US),
ЯНУС Джеффри (US)**(54) **ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ВЫДЕЛЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ВЫСОКОЙ ЧИСТОТЫ**

(57) Формула изобретения

1. Способ выделения чистой или обогащенной популяции дифференцированных клеток, полученных из стволовых клеток, включающий дифференцировку популяции стволовых клеток и миграцию дифференцированных клеток через пористую мембрану в устройстве для дифференцировки для выделения чистой или обогащенной популяции дифференцированных клеток.

2. Способ по п. 1, где дифференцировка клеток приводит к эпителиально-мезенхимальному переходу (EMT) или мезенхимально-эпителиальному переходу (MET).

3. Способ по п. 1, где миграция клеток включает хемотаксическую миграцию или миграцию индукцией посредством структурных свойств или расположения компонентов в устройстве для дифференцировки.

4. Способ по п. 1, где дифференцированные клетки используются для терапевтических или исследовательских целей.

5. Способ по п. 4, где терапевтическое применение включает лечение диабета, заболеваний почек, сердца или печени.

6. Способ по п. 1, где стволовые клетки выбраны из группы, состоящей из эмбриональных стволовых клеток, партеногенетических стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, зародышевых стволовых клеток, полученных из бластомера стволовых клеток, взрослых стволовых клеток, выделенных

из органов и тканей, стволовых клеток, выделенных из пуповинной крови, стволовых клеток, выделенных из тканей плодов, стволовых клеток, выделенных из волосяных фолликулов, мезенхимальных стволовых клеток, нейрональных стволовых клеток и раковых стволовых клеток.

7. Способ по п. 1, где стволовые клетки являются стволовыми клетками млекопитающих.

8. Способ по п. 1, где дифференцированные клетки являются первичными клетками, включающими клетки, полученные из эндодермы; клетки, полученные из эктодермы, или клетки, полученные из мезодермы.

9. Способ по п. 8, где клетки, полученные из эндодермы, включают железистые клетки, включающие секреторные эпителиальные клетки экзокринных желез, клетки, секретирующие гормоны, и/или реснитчатые клетки с движущей функцией; клетки, полученные из эктодермы, включают клетки из покровной системы, включающие кератинизированные эпителиальные клетки или эпителиальные клетки, выстилающие влажные слоистые барьерные поверхности, клетки, полученные из нервной системы, включающие сенсорные клетки-трансдукторы, клетки вегетативной нервной системы, клетки органов чувств и периферические нейрональные поддерживающие клетки, нейроны центральной нервной системы и глиальные клетки или клетки хрусталика и клетки, полученные из мезодермы, включают клетки обмена веществ и накопления, клетки с барьерной функцией, включающие клетки легких, пищеварительного тракта, экзокринных желез и мочеполового тракта, включая клетки почек, секреторные клетки внеклеточного матрикса, сокращающиеся клетки, клетки крови и иммунной системы, пигментные клетки, зародышевые клетки, питающие клетки или интерстициальные клетки.

10. Способ по п. 1, где пористая мембрана необязательно содержит любое из скэффолда с большой площадью поверхности, включающего одну или более пористых двумерных или трехмерных мембран или губки, состоящие из поликарбоната, полиэтилена, тефлона или карбоната кальция; внеклеточный матрикс, содержащий коллагены человека или животного, отличного от человека, ламинины, фибронектины, эластины, протеогликаны, включающие гепарина сульфат, хондроитина сульфат, кератина сульфат, полисахариды, не относящиеся к протеогликанам, включающие гиалуроновую кислоту, вещества, полученные рекомбинантными технологиями или синтетическими технологиями, или полученные из встречающихся в природе веществ от людей, животных, растений или прокариотов; волокнистые структуры и волокна; губки; клеточный матрикс, выделенный из клеток человека, включающий матрикс, выделенный из культивированных фибробластов человека; сетки, включающие двух- или трехмерные сетки; сито; молекулы ростовых факторов или их фрагменты, включающие белки семейства TGF, активин А, различные FGF, различные BMP, HGF, KGF, OSM или различные типы прикрепившихся живых клеток, расположенных на устройстве для дифференцировки в двумерном или трехмерном паттернах, или их комбинаций.

11. Способ по п. 10, где пористый двух- или трехмерный скэффолд, или губка, или внеклеточный матрикс, или любой другой компонент устройства для дифференцировки покрыт на любой стороне молекулами, которые обладают биологической активностью, включающими молекулы, которые стимулируют/способствуют дифференцировке клеток; стимулируют/способствуют созреванию клеток; стимулируют/способствуют миграции клеток; поддерживают миграцию клеток; стимулируют/способствуют ЕМТ или МТЕ; активные молекулы, которые стимулируют пролиферацию, или активные молекулы, которые поддерживают дифференцированную стадию/статус клеток или любую их комбинацию.

12. Способ по п. 1, где пористая мембрана, или другие компоненты устройства для дифференцировки обладают ингибирующими свойствами в отношении клеточной адгезии.
13. Способ по п. 1, где пористая мембрана, или губка, или сетка, или сито, или волокнистые структуры, или любые другие компоненты устройства для дифференцировки имеют поры с размером от 0,1 мкм до 1000 мкм.
14. Способ по п. 1, где пористая мембрана имеет поры с любым размером от 5 мкм до 12 мкм.
15. Способ по п. 1, где пористая мембрана имеет форму пор, включающую круг, овал, прямоугольник, треугольник, квадрат, щель/трещину/бороздку или любую их комбинацию.
16. Способ по п. 1, где любой или все компоненты устройства для дифференцировки являются биodeградируемыми.
17. Способ по п. 1, где внеклеточный матрикс или любой другой компонент устройства, включая пористые мембраны, губки, сетки, сита, волокна и волокнистые структуры, имеют гомогенную структуру, или гетерогенную структуру, или градиентную структуру, или слоистую структуру.
18. Способ по п. 1, где устройство для дифференцировки погружено в клеточную культуральную среду или буфер.
19. Способ по п. 18, где культуральная среда является стационарной или нагнетается насосом через устройство для дифференцировки.
20. Способ по п. 1, где стволовые клетки высеваются в верхней части, и/или в нижней части, и/или в середине, или в различных других ориентациях в устройстве для дифференцировки.
21. Способ по п. 1, где стволовые клетки предварительно смешивают с клеточным матриксом и затем высевают на или в устройство для дифференцировки.
22. Способ по п. 1, где выделение чистой или обогащенной популяции дифференцированных клеток включает обработку химическими реагентами и/или ферментными реагентами, которые разрушают и/или переваривают внеклеточный матрикс и/или любой другой компонент устройства для дифференцировки.
23. Способ по п. 1, где условия для дифференцировки применяют до, и/или во время, и/или после посева клеток в и/или на устройство для дифференцировки.
24. Способ по п. 1, где миграция клеток происходит непосредственно через пористые структуры, включающие пористые мембраны, губки, волокнистые структуры, сетки, сита или непосредственно во внеклеточный матрикс.
25. Способ по п. 1, где миграция клеток происходит на поверхности двумерной или трехмерной системы.
26. Способ по п. 1, где миграция клеток происходит внутри капилляров, каналов или трубок.
27. По существу очищенные или обогащенные дифференцированные клетки, полученные из стволовых клеток, приготовленные способом по п. 1.
28. Способ по п. 1, где способ является способом выделения чистой или обогащенной популяции дефинитивной эндодермы высокой чистоты (DE) из популяции плюрипотентных стволовых клеток в условиях *in vitro*, включающий контактирование популяции плюрипотентных стволовых клеток с одним или более сигналами к дифференцировке; дифференцировку контактировавших клеток обеспечением возможности подвергаться эпителиально-мезенхимальному переходу (EMT) с получением клеток, имеющих мезенхимальный фенотип; обеспечение миграции дифференцированных клеток с мезенхимальным фенотипом через пористую мембрану в трехмерный внеклеточный матрикс (ECM) и обеспечение дифференцировки

мигрировавших клеток в трехмерном ЕСМ для дифференцировки в DE высокой чистоты.

29. Способ по п. 28, где DE высокой чистоты выделяют с чистотой выше, чем 90%.

30. Способ по п. 28, где DE высокой чистоты оценивают по экспрессии OCT4 или SOX2 с использованием иммуноцитохимического анализа и проточной цитометрии.

31. Способ по п. 28, где DE высокой чистоты выделяют без загрязнения OCT4-позитивными клетками.

32. Способ по п. 28, где DE высокой чистоты содержит до 80% CXCR4- или SOX17-позитивных клеток.

33. Способ по п. 28, где плюрипотентные стволовые клетки являются плюрипотентными стволовыми клетками человека.

34. Способ по п. 33, где плюрипотентные стволовые клетки человека являются эмбриональными стволовыми клетками человека (hESC), партеногенетическими стволовыми клетками человека (hpSC) или индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками человека (hiPSC).

35. Способ по п. 34, где hESC представляет клеточную линию WA09 и hpSC представляет клеточную линию phESC-1, phESC-3, phESC-5 или hpSC-Nhom-1.

36. Способ по п. 28, где сигнал дифференцировки представляет растворимый фактор роста.

37. Способ по п. 36, где сигнал к дифференцировке представляет сигнальный путь активина А или сигнальный путь Wnt3a на высоком уровне, который напоминает сигнальный путь TGF- β и Wnt, получаемый клетками во время ингрессии в первичной полоске.

38. Способ по п. 28, где пористая мембрана имеет поры с диаметром от примерно 6 мкм до примерно 10 мкм.

39. Способ по п. 38, где пористая мембрана имеет поры с диаметром от примерно 7 мкм до примерно 9 мкм.

40. Способ по п. 39, где пористая мембрана имеет поры с диаметром примерно 8 мкм.

41. Способ по п. 28, где трехмерный ЕСМ содержит коллаген I и/или фибронектин.

42. Способ по п. 28, дополнительно включающий стадию дифференцировки высокоочищенной DE в гепатоциты или эндокринные клетки поджелудочной железы.

43. Способ по п. 42, где стадия дифференцировки высокоочищенной DE в гепатоциты включает обработку DE FGF4, BMP2, фактором роста гепатоцитов (HGF), онкостатином М и дексаметазоном.

44. Способ по п. 28, где немигрирующие недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки выделяют из DE высокой чистоты.

45. Способ по п. 7 или 32, где клетки являются человеческими клетками.

46. Устройство для дифференцировки для выделения чистой или обогащенной популяции дифференцированных клеток, полученных из стволовых клеток, где устройство содержит пористую мембрану и внеклеточный матрикс.

47. Устройство для дифференцировки по п. 46, где миграция клеток происходит через пористую мембрану.

48. Устройство для дифференцировки по п. 46, где миграция клеток включает хемотаксическую миграцию или миграцию индукцией посредством структурных свойств или расположения компонентов в устройстве для дифференцировки.

49. Устройство для дифференцировки по п. 46, где стволовые клетки выбраны из группы, состоящей из эмбриональных стволовых клеток, партеногенетических стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, зародышевых стволовых клеток, полученных из бластомера стволовых клеток; взрослых стволовых клеток, выделенных из органов и тканей, стволовых клеток, выделенных из пуповинной

крови, стволовых клеток, выделенных из тканей плодов, стволовых клеток, выделенных из волосяных фолликулов, мезенхимальных стволовых клеток или нейрональных стволовых клеток и раковых стволовых клеток.

50. Устройство для дифференцировки по п. 46, где стволовые клетки являются стволовыми клетками млекопитающих.

51. Устройство для дифференцировки по п. 46, где дифференцированные клетки являются первичными клетками, включающими клетки, полученные из эндодермы; клетки, полученные из эктодермы, или клетки, полученные из мезодермы.

52. Устройство для дифференцировки по п. 46, где пористая мембрана необязательно содержит любое из скэффолда с большой площадью поверхности, включающего одну или более пористых двумерных, или трехмерных мембран, или губки, состоящие из поликарбоната, полиэтилена, тефлона или карбоната кальция; внеклеточный матрикс, содержащий коллагены человека или животного, отличного от человека, ламинины, фибронектины, эластины, протеогликаны, включающие гепарина сульфат, хондроитина сульфат, кератина сульфат, полисахариды, не относящиеся к протеогликанам, включающие гиалуроновую кислоту, вещества, полученные рекомбинантными технологиями или синтетическими технологиями, или полученные из встречающихся в природе веществ от людей, животных, растений или прокариотов; волокнистые структуры и волокна; губки; клеточный матрикс, выделенный из клеток человека, включающий матрикс, выделенный из культивированных фибробластов человека; сетки, включающие двух- или трехмерные сетки; сито; молекулы ростовых факторов или их фрагменты, включающие белки семейства TGF, активин А, различные FGF, различные BMP, HGF, KGF, OSM или различные типы прикрепившихся живых клеток, расположенных на устройстве для дифференцировки в двумерном или трехмерном паттернах, или их комбинаций.

53. Устройство для дифференцировки по п. 46, где пористый двух- или трехмерный скэффолд, или губка, или внеклеточный матрикс, или любой другой компонент устройства для дифференцировки покрыт на любой стороне молекулами, которые обладают биологической активностью, включающими молекулы, которые стимулируют/способствуют дифференцировке клеток; стимулируют/способствуют созреванию клеток; стимулируют/способствуют миграции клеток; поддерживают миграцию клеток; стимулируют/способствуют EMT или MTE; активные молекулы, которые стимулируют пролиферацию, или активные молекулы, которые поддерживают дифференцированную стадию/статус клеток.

54. Устройство для дифференцировки по п. 46, где пористая мембрана или другие компоненты устройства для дифференцировки обладают ингибирующими свойствами в отношении клеточной адгезии.

55. Устройство для дифференцировки по п. 46, где пористая мембрана, или губка, или сетка, или сито, или волокнистые структуры, или любые другие компоненты устройства для дифференцировки имеют поры с любым размером от 0,1 мкм до 1000 мкм.

56. Устройство для дифференцировки по п. 46, где пористая мембрана имеет поры с любым размером от 5 мкм до 12 мкм.

57. Устройство для дифференцировки по п. 46, где пористая мембрана имеет форму пор, включающую круг, овал, прямоугольник, треугольник, квадрат, щель/трещину/бороздку или любую их комбинацию.

58. Устройство для дифференцировки по п. 46, где любой или все компоненты устройства для дифференцировки являются биодеградируемыми.

59. Устройство для дифференцировки по п. 46, где внеклеточный матрикс или любой другой компонент устройства, включая пористые мембраны, губки, сетки, сита, волокна

или волокнистые структуры, имеют гомогенную структуру, или гетерогенную структуру, или градиентную структуру, или слоистую структуру.

60. Устройство для дифференцировки по п. 46, где миграция клеток происходит непосредственно через пористые структуры, включающие пористые мембраны, губки, волокнистые структуры, сетки, сита, или непосредственно во внеклеточный матрикс.

61. Устройство для дифференцировки по п. 46, где миграция клеток происходит на поверхности двумерной или трехмерной системы.

62. Устройство для дифференцировки по п. 46, где миграция клеток происходит внутри капилляров, каналов или трубок.

63. Очищенная или обогащенная популяция дифференцированных клеток, полученных из стволовых клеток, приготовленных устройством для дифференцировки по п. 46.

64. Устройство по п. 46, где с помощью устройства выделяют ДЕ высокой чистоты из популяции плюрипотентных стволовых клеток, где устройство содержит пористую мембрану и трехмерный ЕСМ.

65. Устройство по п. 64, где ДЕ высокой чистоты выделяют с чистотой выше, чем 90%.

66. Устройство по п. 65, где ДЕ высокой чистоты оценивают по экспрессии OCT4 или SOX2 с использованием иммуноцитохимического анализа и проточной цитометрии.

67. Устройство по п. 64, где ДЕ высокой чистоты выделяют без загрязнения OCT4-позитивными клетками.

68. Устройство по п. 64, где ДЕ высокой чистоты содержит до 80% CXCR4- или SOX17-позитивных клеток.

69. Устройство по п. 64, где плюрипотентные стволовые клетки являются плюрипотентными стволовыми клетками человека.

70. Устройство по п. 69, где плюрипотентные стволовые клетки человека являются эмбриональными стволовыми клетками человека (hESC), партеногенетическими стволовыми клетками человека (hpSC) или индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками человека (hiPSC).

71. Устройство по п. 70, где hESC представляет клеточную линию WA09 и hpSC представляет клеточную линию phESC-1, phESC-3, phESC-5 или hpSC-Nhom-1.

72. Устройство по п. 64, где пористая мембрана имеет поры с диаметром от примерно 6 мкм до примерно 10 мкм.

73. Устройство по п. 72, где пористая мембрана имеет поры с диаметром от примерно 7 мкм до примерно 9 мкм.

74. Устройство по п. 73, где пористая мембрана имеет поры с диаметром примерно 8 мкм.

75. Устройство по п. 64, где трехмерный ЕСМ содержит коллаген I и/или фибронектин.

76. Устройство по п. 64, где высокоочищенная ДЕ далее дифференцируется в гепатоциты или эндокринные клетки поджелудочной железы.