

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392792** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.01.15

(51) Int. Cl. *C12N 5/00* (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.05.11

(54) **КЛЕТОЧНЫЕ МИКРОКОМПАРТМЕНТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ КЛЕТКИ, ГЕНОМНАЯ ЦЕЛОСТНОСТЬ КОТОРЫХ ПОДДЕРЖИВАЕТСЯ ПОСЛЕ АМПЛИФИКАЦИИ, И СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

(31) **FR2104988**

(32) **2021.05.11**

(33) **FR**

(86) **PCT/EP2022/062792**

(87) **WO 2022/238485 2022.11.17**

(71) Заявитель:

ТРИФРОГ ТЕРАПЬЮТИКС (FR)

(72) Изобретатель:

**Фейе Максим, Коэн Филипп Джозеф
Режис (FR)**

(74) Представитель:

Нагорных И.М. (RU)

(57) Изобретение относится к трехмерному клеточному микрокомпарменту или к узлу трехмерных клеточных микрокомпарментов, содержащих по меньшей мере один внешний гидрогелевый слой, а внутри упомянутого внешнего слоя - по меньшей мере один слой клеток и/или по меньшей мере один клеточный основной слой, причем менее 20% общей популяции клеток, присутствующих в микрокомпарменте или в узле микрокомпарментов, представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию. Изобретение также относится к способу производства такого микрокомпармента или узла микрокомпарментов.

202392792

A1

A1

202392792

Клеточные микрокомпартменты, содержащие клетки, геномная целостность которых поддерживается после амплификации, и способ их получения

Область техники

Изобретение относится к поддержанию геномной целостности клеток во время их деления *ex vivo* в течение нескольких циклов клеточного деления, в частности в контексте трехмерного культивирования клеток.

Предшествующий уровень техники

Культивирование клеток *ex vivo* представляет собой область науки, которая вызывает все больший интерес. Культивируемые клетки могут быть любого типа. Они могут включать как дифференцированные клетки с разными фенотипами, так и клетки-предшественники и стволовые клетки. Значительным достижением в методах культивирования клеток является внедрение трехмерных систем культивирования. Трехмерные культуры действительно ближе к естественным системам *in vivo* и имеют много способов применения, в частности при разработке видов терапии. Однако клеточная терапия и тканевая инженерия зависят от доступности клеток в промышленных количествах, что вызывает необходимость выполнения размножения клеток в больших объемах и, следовательно, осуществления большого количества клеточных делений в течение короткого времени. В большинстве современных систем культивирования клеток это размножение приводит к появлению и закреплению мутаций, в частности вредных геномных и/или эпигенетических функциональных мутаций, при каждом делении многочисленной популяции клеток во время увеличения культуры, что, таким образом, ставит под угрозу их применение, в частности, в терапии. Мутации могут представлять собой точечные мутации генетической последовательности (кодирующие или некодирующие, молчащие или нет с точки зрения пептидной последовательности), структурные варианты, эпигенетические модификации или даже модификации митохондриальной ДНК. Только мутантные клетки, несущие одну или более функциональных или потенциально функциональных мутаций, являются проблематичными для применения клеток в терапии, то есть любая передаваемая генетическая или эпигенетическая модификация, которая приводит к усилению, или потере функции, или к потенциальной потере функции культивируемых клеток. В частности, это может быть усиление роста, снижение предрасположенности к гибели клеток, модификация генов, участвующих в онкогенезе, или подавление онкогенеза. Наиболее влиятельными мутациями являются те, которые обеспечивают возможность клональной экспансии клеток, которые становятся доминантными в культуре.

Примеры наиболее частых генетических мутаций описаны, в частности, в Y. Avior, K. Eggan, N. Benvenisty, Cancer-Related Mutations Identified in Primed and Naive Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 25, 456–461 (2019). Среди наиболее известных можно назвать, в частности, мутации гена P53 (F. T. Merkle, S. Ghosh, N. Kamitaki, J. Mitchell, Y. Avior, C. Mello, S. Kashin, S. Mekhoubad, D. Ilic, M. Charlton, G. Saphier, R. E. Handsaker, G. Genovese, S. Bar, N. Benvenisty, S. A. McCarroll, K. Eggan, Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. *Nature*. 545, 229–233 (2017)) и мутации вследствие амплификации хромосомной области 20q11 (N. Lefort, M. Feyeux, C. Bas, O. Féraud, A. Bennaceur-Griscelli, G. Tachdjian, M. Peschanski, A. L. Perrier, Human

embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nature Biotechnology*. 26, 1364–1366 (2008)).

Проблема генетической стабильности и целостности культивируемых клеток известна и, в частности, широко изучалась в контексте плюрипотентных стволовых клеток, что описано в таких источниках,

- 5 как, например: S. Attwood, M. Edel, iPS-Cell Technology and the Problem of Genetic Instability—Can It Ever Be Safe for Clinical Use? *Journal of Clinical Medicine*. 8, 288 (2019); или также P. Andrews, Human pluripotent stem cells: genetic instability; or stability; *Regenerative medicine*, vol. 16, No 2, March 2, 2021. Также известно, что мутагенез представляет собой весьма актуальную проблему для культивирования стволовых клеток, возникающую сразу после их репрограммирования, как описано в Ji, S. Ng, V. Sharma, D. Necut, S. Human, M. Sam, Q. Trinh, G. M. Church, J. D. McPherson, A. Nagy, N. N. Batada, Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 30, 435–440 (2012) и в V. Turinetto, L. Orlando, C. Giachino, Induced pluripotent stem cells: Advances in the quest for genetic stability during reprogramming process. *International Journal of Molecular Sciences*. 18 (2017), doi:10.3390/ijms18091952.

- 15 Эта генетическая нестабильность оказывает сильное негативное влияние на развитие клеточной терапии и, в частности, на клиническое применение стволовых клеток (Yamanaka, Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. *Cell stem cell*. 27, 523–531 (2020); S. E. Peterson, J. F. Loring, Genomic instability in pluripotent stem cells: Implications for clinical applications. *Journal of Biological Chemistry*. 289, 4578–4584 (2014); K. Garber, RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*. 33, 890–891 (2015)).

Следовательно, существует значительная потребность в решении задачи по поддержанию генетической целостности клеток при их культивировании, в частности для обеспечения крупномасштабного производства клеток для клеточной терапии.

- 25 Следовательно, целью настоящего изобретения является удовлетворение всех этих потребностей и преодоление недостатков и ограничений предшествующего уровня техники.

Изложение сущности изобретения

Занимаясь разработкой клеточных микрокомпарментов для 3D-культуры клеток, авторы изобретения разработали систему, позволяющую культивировать клеточную массу, поддерживая

- 30 геномную целостность данных клеток.

В соответствии с данной целью объектом изобретения является трехмерный клеточный микрокомпармент, содержащий по меньшей мере один внешний гидрогелевый слой, а внутри упомянутого внешнего слоя — по меньшей мере один слой клеток и/или по меньшей мере один клеточный основной слой, причем менее 20% общей популяции клеток, присутствующих в

- 35 микрокомпарменте, представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию, предпочтительно от 0 до 10%, еще более предпочтительно от 0 до 5%, предпочтительно от 0 до 3%, даже после нескольких клеточных делений.

Согласно другому объекту, изобретение относится к узлу по меньшей мере двух трехмерных клеточных микрокомпарментов, предпочтительно в жидкой суспензии, причем каждый компармент

- 40 содержит по меньшей мере один внешний гидрогелевый слой, а внутри упомянутого внешнего

слоя — по меньшей мере один слой клеток и/или по меньшей мере один клеточный основной слой, в котором менее 20% общей популяции клеток, присутствующих во всех микрокомпартаментах, представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию, предпочтительно от 0 до 10%, еще более предпочтительно от 0 до 5%, в частности от 0 до 2%.

- 5 Преимущество данной системы состоит в том, что в ней уровень мутантных клеток ниже, чем в существующих системах культивирования клеток. Например, определенные исследования показывают, что в традиционной системе 2D-культуры стволовых клеток эффект инактивирующей мутации гена P53 выражается в селективном преимуществе до $\times 1,9$ за пассаж (iPS-Cell Technology and the Problem of Genetic Instability—Can It Ever Be Safe for Clinical Use? Attwood & Edel) + Merkle, F.T.;
- 10 Ghosh, S.; Kamitaki, N.; Mitchell, J.; Avior, Y.; Mello, C.; Kashin, S.; Mekhoubad, S.; Ilic, D.; Charlton, M.; et al. Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. Nature 2017, 545, 229–233.). Это подразумевает 97%-ю вероятность прикрепления после возникновения этой мутации (Haldane, J. B. S. A Mathematical Theory of Natural and Artificial Selection, Part V: Selection and Mutation. Math. Proc. Camb. Philos. Soc. 1927, 23, 838–844.)

- 15 Поддержание геномной целостности клеток позволяет применять микрокомпарменты с клеточными культурами согласно изобретению для различных целей и, в частности, для профилактики и/или лечения патологий.

Клеточные микрокомпарменты согласно изобретению могут быть получены, в частности, посредством реализации специального способа получения, включающего следующие этапы:

- 20 - (a) получение суспензии клеток, содержащей отдельные клетки и/или по меньшей мере один кластер клеток в изотонической среде, предпочтительно культуральной среде, содержащей ингибитор апоптоза;
- (b) инкапсулирование клеточной суспензии в гидрогелевый слой;
- (c) культивирование полученных микрокомпарментов в изотоническом растворе, предпочтительно
- 25 в культуральной среде, содержащей ингибитор апоптоза;
- (d) предпочтительно промывание микрокомпарментов для удаления ингибитора апоптоза;
- (e) культивирование микрокомпарментов в течение по меньшей мере двух циклов клеточного деления (амплификация); и
- (f) необязательно извлечение полученных клеточных микрокомпарментов;

- 30 причем способ характеризуется тем, что объем всех клеток, первоначально инкапсулированных на этапе (b) (во время инкапсуляции), составляет менее 50% объема микрокомпартамента, в котором они инкапсулированы.

Данный способ позволяет получить микрокомпарменты согласно изобретению с популяцией клеток, геномная целостность которых сохранена и стабилизирована.

- 35 Изобретение также направлено на применение клеточного микрокомпартамента и/или данного способа для поддержания геномной целостности клеток во время их амплификации.

Другие признаки и преимущества станут очевидными из подробного описания изобретения и последующих примеров.

- 40 **Краткое описание фигур**

- На Фиг. 1 представлен обзор трех экспериментальных групп «2D-культура», «Биореакторные (клеточные) агрегаты» и «Изобретение», а также нумерация и хронология выполненных пассажей (указаны в прямоугольниках: Д4 = день 4, Д8 = день 8 и т. п.). Везде культивирование останавливали в последний день (Д28) для детального генетического сравнения.
- 5 - На Фиг. 2а представлено изображение фазово-контрастной микроскопии, показывающее результаты по экспериментальной группе «2D-культура» в последний день (28-й) перед окончательным отбором образцов. Масштабная линейка 500 мкм.
- На Фиг. 2b представлено изображение фазово-контрастной микроскопии, показывающее результаты по экспериментальной группе «Биореакторные (клеточные) агрегаты» в последний день (28-й) перед
- 10 окончательным отбором образцов. Показанные агрегаты были удалены из их культуры в суспензии и временно помещены в чашку Петри для проведения микроскопического наблюдения. Масштабная линейка 500 мкм.
- На Фиг. 2с представлено изображение фазово-контрастной микроскопии, показывающее результаты по экспериментальной группе «Изобретение» в последний день 28 перед окончательным отбором
- 15 образцов. Показанные микрокомпарменты были удалены из их культуры в суспензии и временно помещены в чашку Петри для проведения микроскопического наблюдения. Масштабная линейка 500 мкм.
- На Фиг. 3 представлено отображение видимого роста клеток в течение времени культивирования, рассчитанного путем подсчета клеток до и после каждого пассажа. Кумулятивный теоретический
- 20 коэффициент амплификации представлен в зависимости от времени; ось ординат (амплификация) показана в логарифмическом масштабе. Показанные точки данных соответствуют всем подсчетам, которые выполняли во время пассажей.
- На Фиг. 4 представлено отображение результатов фенотипической оценки стволовых клеток посредством проточной цитометрии. Диссоциированные клетки фиксируют и метят для обнаружения
- 25 маркеров плюрипотентности OCT4 и NANOG. Представлен процент дважды положительных клеток по этим 2 маркерам во время последовательных пассажей в течение 28 дней (среднее значение и стандартное отклонение).
- На Фиг. 5 представлен кариотип, полученный с высоким разрешением посредством чипа Cytoscan HD array SNP для сравнительного анализа исходного образца 0-го дня и 3 экспериментальных
- 30 групп: «2D-культура», «Биореакторные (клеточные) агрегаты» и «Изобретение» через 28 дней. С помощью CytoScan® HD Array Affymetrix, поставляемого ThermoFisher, подсчитывают среднее количество копий на клетку для 2,67 миллионов зондов, распределенных по геному. Обведенные области сосредоточены на хромосоме 20.
- На Фиг. 6 показаны результаты оценки посредством цифровой ПЦР среднего количества копий
- 35 хромосомной области 20q11 в течение 28 дней культивирования для 3 экспериментальных групп (анализ выполнен с помощью зондового теста iPS ddPCR 24 от компании Stemogenomics). Слева — количество копий 20q11 в зависимости от количества дней культивирования. Справа — отношение количества копий 20q11 к кумулятивной теоретической амплификации с течением времени. Точки данных соответствуют выборкам, выполненным во время различных пассажей:
- 40 квадраты = «Биореакторные (клеточные) агрегаты», круги = «2D-культура» и

треугольники = «Изобретение». Связанные с этими группами кривые соответствуют соответствующим регрессиям. Следует отметить, что стандартные отклонения для этих измеренных значений составляют в среднем 0,12 (подсчет количества копий 20q11), звездочки указывают на измеренные значения, которые значительно увеличены.

- 5 - На Фиг. 7 показаны сводные данные о процентном содержании мутировавших клеток в течение 28 дней культивирования для групп «2D-культура», «Биореакторные (клеточные) агрегаты» и «Изобретение» по примеру 1.
- На Фиг. 8 показан полученный посредством цифровой ПЦР кариотип двух клеточных линий (GHE и AAVS1_GFP), использованных в примере 2.
- 10 - На Фиг. 9 представлен обзор двух экспериментальных групп «Биореакторные (клеточные) агрегаты» и «Изобретение», а также нумерация и хронология выполненных пассажей (указаны в прямоугольниках: д4 = день 4, д8 = день 8 и т. п.).
- На Фиг. 10А и 10В представлены изображения фазово-контрастной микроскопии, показывающие результаты экспериментальных групп А: «Биореакторные (клеточные) агрегаты» и В: «Изобретение»
- 15 на день 19 для «Биореакторных (клеточных) агрегатов» и на день 21 для «Изобретения». Агрегаты, а также показанные микрокомпарменты были удалены из их культуры в суспензии и временно помещены в чашку Петри для проведения микроскопического наблюдения. Масштабная линейка 500 мкм.
- На Фиг. 11 представлено отображение видимого роста клеток в течение времени культивирования, рассчитанного путем подсчета клеток до и после каждого пассажа. Кумулятивный теоретический коэффициент амплификации представлен в зависимости от времени; ось ординат (амплификация) показана в логарифмическом масштабе. Показанные точки данных соответствуют всем подсчетам, которые выполняли во время пассажей.
- 20 - На Фиг. 12 представлено отображение результатов фенотипической оценки стволовых клеток посредством проточной цитометрии. Диссоциированные клетки фиксируют и метят для обнаружения маркеров плюрипотентности OCT4 и NANOG. Представлен процент дважды положительных клеток по этим 2 маркерам во время последовательных пассажей в течение 28 дней (среднее значение и стандартное отклонение).
- 25 - На Фиг. 13 показаны результаты оценки посредством цифровой ПЦР процентного содержания клеток GFP- (iPSC-GHE) и GFP+ (iPSC-AAVS1) в течение 21 дня культивирования для 2 экспериментальных групп. Слева — процент клеток GFP- и GFP+ в зависимости от количества дней культивирования. Справа — процент клеток GFP- и GFP+ относительно кумулятивной теоретической амплификации с течением времени. Точки данных соответствуют выборкам, выполненным во время различных пассажей: квадраты = «Биореакторные (клеточные) агрегаты» и
- 30 треугольники = «Изобретение».
- На Фиг. 14 показаны результаты оценки посредством цифровой ПЦР среднего количества копий хромосомных областей 7q и 20q в течение 28 дней культивирования для 2 экспериментальных групп (анализ выполнен с помощью зондового теста iPS ddPCR 24 от компании Stemogenomics). Слева — количество копий 7q и 20q в зависимости от количества дней культивирования. Справа — отношение
- 40 количества копий 7q и 20q к кумулятивной теоретической амплификации с течением времени. Точки

данных соответствуют выборкам, выполненным во время различных пассажей:

квадраты = «Биореакторные (клеточные) агрегаты» и треугольники = «Изобретение».

- На Фиг. 15 показаны сводные данные о процентном содержании мутировавших клеток в течение 28 дней культивирования для «Биореакторных (клеточных) агрегатов» и «Изобретения» для групп по

5 примеру 2.

Подробное описание изобретения

Определения

10 В контексте изобретения «альгинат» означает линейные полисахариды, образованные из β -D-маннуроната и α -L-гулулоната, их солей и производных.

В контексте изобретения «гидрогелевая капсула» означает трехмерную структуру, образованную из матрицы полимерных цепей, набухшей с помощью жидкости, предпочтительно воды.

15 В контексте изобретения «клетка, экспрессирующая ген» означает клетку, которая содержит по меньшей мере в 5 раз больше копий РНК, транскрибируемой на базе последовательности ДНК рассматриваемого гена, по сравнению с плюрипотентной клеткой; предпочтительно в 10 раз больше копий, предпочтительно в 20 раз больше копий, предпочтительно в 100 раз больше копий.

В контексте изобретения «дифференцированные» клетки означают клетки, которые имеют определенный фенотип в отличие от плюрипотентных стволовых клеток, которые не дифференцируются, или клеток-предшественников, которые подвергаются дифференцировке.

20 В контексте изобретения «человеческие клетки» означают клетки человека или иммунологически гуманизированные клетки млекопитающих, отличных от человека. Даже если это специально не указано, клетки, стволовые клетки, клетки-предшественники и ткани согласно изобретению представляют собой человеческие клетки или иммунологически гуманизированные клетки млекопитающих, отличных от человека, или получены из этих клеток.

25 В контексте изобретения термин «мутантная клетка» относится к клетке, несущей по меньшей мере одну мутацию.

В контексте изобретения «клетка-предшественник» означает стволовую клетку, которая уже участвует в клеточной дифференцировке, но которая еще не дифференцировалась.

30 В контексте изобретения «эмбриональная стволовая клетка» означает плюрипотентную стволовую клетку клеток, полученную из внутренней клеточной массы бластоцисты. Плюрипотентность эмбриональных стволовых клеток можно оценить по наличию таких маркеров, как транскрипционные факторы OCT4, NANOG и SOX2, и поверхностных маркеров, таких как SSEA3/4, Тра-1-60 и Тра-1-81. Эмбриональные стволовые клетки, используемые в контексте изобретения, получают без разрушения эмбриона, из которого они происходят, например с использованием метода, описанного в Chang et al. (Cell Stem Cell, 2008, 2(2): 113–117). Необязательно человеческие эмбриональные стволовые клетки могут быть исключены из изобретения, и в этом случае объект изобретения исключает человеческие эмбриональные стволовые клетки.

40 В контексте изобретения «плюрипотентная стволовая клетка» или «плюрипотентная клетка» означает клетку, которая обладает способностью образовывать все ткани, присутствующие во всем организме определенного вида, но не способна образовывать целый организм как таковой. В настоящей заявке

человеческие плюрипотентные стволовые клетки могут называться hPSC. В частности, это могут быть индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC или hiPSC для человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток), эмбриональные стволовые клетки или клетки MUSE («мультилинейно-дифференцирующиеся, устойчивые к стрессу»).

- 5 В контексте изобретения «индуцированная плюрипотентная стволовая клетка» означает плюрипотентную стволовую клетку, индуцированную для превращения в плюрипотентную посредством генетического репрограммирования дифференцированных соматических клеток. Эти клетки, в частности, положительны по отношению к маркерам плюрипотентности, таким как окрашивание на щелочную фосфатазу и экспрессия белков NANOG, SOX2, OCT4 и SSEA3/4.
- 10 Примеры способов получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток описаны в статьях Yu et al. (Science 2007, 318 (5858): 1917-1920), Takahashi et al (Cell, 2007, 131(5): 861-872) и Nakagawa et al (Nat Biotechnol, 2008, 26(1): 101-106).
- «Диаметр Фере» по отношению к микрокомпарменту согласно изобретению означает расстояние «d» между двумя касательными к упомянутому микрокомпарменту, причем эти две касательные
- 15 параллельны, так что вся проекция упомянутого микрокомпармента находится между этими двумя параллельными касательными.
- В контексте изобретения «переменная толщина» внутреннего слоя человеческих клеток, подвергающихся клеточной дифференцировке, означает, что в одном и том же микрокомпарменте внутренний слой не имеет одинаковой толщины по всей площади.
- 20 В контексте изобретения «микрокомпармент» или «капсула» означает частично или полностью закрытую трехмерную структуру, содержащую несколько клеток.
- В контексте изобретения «конвективная культуральная среда» означает культуральную среду, перемешиваемую внутренними перемещениями.
- В контексте изобретения термин «мутация» означает генетическую или эпигенетическую мутацию,
- 25 предпочтительно функциональную мутацию. В частности, данный термин может включать точечную модификацию генетической последовательности, структурный вариант, эпигенетическую модификацию или модификацию митохондриальной ДНК. Он может включать мутацию вследствие амплификации хромосомной области, такую как, например, мутация вследствие амплификации хромосомной области 20q, в частности 20q11 или альтернативно 7q.
- 30 Термин «функциональная мутация» в контексте изобретения относится к передаваемой генетической или эпигенетической модификации, которая приводит к потенциальному усилению, или потере функции, или потере потенциальной функции соответствующей мутантной клетки. Предпочтительно он включает мутацию, вызывающую модификацию фенотипа измененной мутантной клетки. Более предпочтительно он включает изменение геномной и/или эпигеномной последовательности, которое
- 35 изменяет терапевтический потенциал популяции клеток или посредством увеличения риска, связанного с проводимой терапией, или посредством уменьшения пользы, обеспечиваемой проводимой терапией.
- В контексте изобретения под «наибольшим размером» микрокомпармента, или кластера клеток, или слоя клеток, или клеточного основного слоя понимают значение наибольшего диаметра Фере
- 40 упомянутого микрокомпармента.

В контексте изобретения под «наименьшим размером» микрокомпартамента, или кластера клеток, или слоя клеток, или клеточного основного слоя понимают значение наименьшего диаметра Фере упомянутого микрокомпартамента.

- 5 В контексте изобретения «ткань» или «биологическая ткань» имеют стандартное значение для ткани в биологии, то есть это промежуточный уровень биологической организации между клеткой и органом. Ткань представляет собой совокупность одинаковых клеток одного и того же происхождения (чаще всего происходящих из общей клеточной линии, хотя они могут возникать в результате ассоциации различных клеточных линий), сгруппированных в кластер, сеть или пучок (волокно). Ткань образует функциональное объединение, то есть ее клетки выполняют одну и ту же
- 10 функцию. Биологические ткани регулярно регенерируются и объединяются с образованием органов. В контексте изобретения «полость» означает объем водного раствора, топологически окруженный клетками. Предпочтительно его содержимое не находится в диффузионном равновесии с объемом конвективной жидкости, присутствующей вне микрокомпартамента.

Клеточные микрокомпарменты

- 15 Объектом изобретения является трехмерный клеточный микрокомпармент, содержащий по меньшей мере один внешний гидрогелевый слой, а внутри упомянутого внешнего слоя — по меньшей мере один слой клеток и/или по меньшей мере один клеточный основной слой, причем менее 20% общей популяции присутствующих клеток представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию.
- 20 Микрокомпармент содержит внешний гидрогелевый слой. Предпочтительно используемый гидрогель является биосовместимым, то есть нетоксичным для клеток. Гидрогелевый слой должен обеспечивать диффузию кислорода и питательных веществ, чтобы снабжать клетки, содержащиеся в микрокомпарменте, и обеспечивать им выживаемость. Согласно одному варианту осуществления, внешний гидрогелевый слой содержит по меньшей мере альгинат. Он может состоять исключительно
- 25 из альгината. Альгинат может, в частности, представлять собой альгинат натрия, состоящий на 80% из α -L-гулуроната и на 20% из β -D-маннуроната, со средней молекулярной массой от 100 до 400 кДа и общей массовой концентрацией от 0,5 до 5%. Гидрогелевый слой не содержит клеток. Гидрогелевый слой позволяет, в частности, защитить клетки от внешней среды и ограничить неконтролируемую пролиферацию клеток.
- 30 Микрокомпармент согласно изобретению содержит по меньшей мере один слой клеток и/или по меньшей мере один клеточный основной слой. Этот или эти слой (-и) клеток и/или клеточный (-ые) основной (-ые) слой (-и) организован (-ы) в виде трехмерной структуры в микрокомпарменте. Микрокомпармент может, в частности, содержать:
- 35 - один или более слоев клеток и/или один или более клеточных основных слоев, организованных в виде трехмерной структуры, или
- один или более слоев клеток и/или один или более один или более клеточных основных слоев, организованных в виде трехмерной структуры, и клетки в суспензии в микрокомпарменте. Клетки, присутствующие в микрокомпарменте, могут быть клетками любого типа. Предпочтительно клетки представляют собой клетки человека или животного.

В конкретном варианте осуществления микрокомпаратмент содержит плюрипотентные стволовые клетки. «Плюрипотентная стволовая клетка» или «плюрипотентная клетка» относится к клетке, которая обладает способностью образовывать все ткани, присутствующие во всем организме определенного вида, но не способна образовывать целый организм как таковой. Плюрипотентные

5 стволовые клетки могут, в частности, представлять собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (IPS), клетки MUSE («мультилинейно- дифференцирующиеся, устойчивые к стрессу»), которые обнаруживаются в коже и костном мозге взрослых млекопитающих, или эмбриональные стволовые клетки (ES).

Согласно особенно подходящему варианту осуществления изобретения, микрокомпаратмент согласно

10 изобретению содержит индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека или животного. В другом конкретном варианте осуществления микрокомпаратмент согласно изобретению содержит мультипотентные клетки человека или животного и/или клетки-предшественники человека или животного, полученные из этих мультипотентных клеток. Мультипотентные клетки и/или клетки-предшественники предпочтительно получали из плюрипотентных стволовых клеток, в частности

15 человеческих плюрипотентных стволовых клеток, или необязательно из неплюрипотентных человеческих клеток, транскрипционный профиль которых был искусственно модифицирован для соответствия профилю специфических мультипотентных клеток и/или клеток-предшественников, как правило, посредством принудительной экспрессии транскрипционных факторов, специфических для целевого клеточного фенотипа. Предпочтительно мультипотентные клетки и/или клетки-

20 предшественники получали из плюрипотентных стволовых клеток после приведения их в контакт с раствором, способным инициировать дифференцировку упомянутых стволовых клеток.

Согласно другому варианту осуществления, микрокомпаратмент согласно изобретению содержит дифференцированные клетки человека или животного. Дифференцированные клетки предпочтительно получали из плюрипотентных стволовых клеток или клеток-предшественников, в

25 частности человеческих плюрипотентных стволовых клеток или человеческих клеток-предшественников, или необязательно из неплюрипотентных человеческих клеток, чей транскрипционный профиль был искусственно модифицирован для соответствия профилю конкретных дифференцированных клеток, как правило, посредством принудительной экспрессии транскрипционных факторов, специфических для целевого клеточного фенотипа. Предпочтительно

30 дифференцированные клетки получали из плюрипотентных или мультипотентных стволовых клеток или стволовых клеток-предшественников после приведения в контакт с раствором, способным инициировать дифференцировку упомянутых стволовых клеток. Согласно одному варианту осуществления, клеточное содержимое микрокомпаратмента включает в себя однородные клетки или клетки разных типов.

35 В микрокомпаратменте дифференцированные клетки могут, в частности, находиться в форме трехмерной ткани или микроткани либо в форме множества тканей или микротканей. Это может быть плотная ткань или микроткань.

Микрокомпаратмент согласно изобретению может содержать несколько типов клеток. В частности, микрокомпаратмент согласно изобретению может содержать, например, стволовые клетки с

индуцированной плюрипотентностью, и/или мультипотентные клетки, и/или клетки-предшественники, и/или дифференцированные клетки.

Если клетки, инкапсулированные в микрокомпартмент, предназначены для применения в клеточной терапии людей, данные клетки могут быть иммуносовместимы с человеком, который будет их
5 получать, чтобы предотвратить любой риск отторжения.

Клетки, присутствующие в микрокомпартменте, несут мало функциональных мутаций или даже не несут их вовсе. Согласно изобретению, менее 20% общей популяции присутствующих клеток представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию, в частности по меньшей мере одну функциональную, генетическую или эпигенетическую мутацию.

10 Изобретение относится, в частности, к микрокомпартментам, в которых менее 20% общей популяции присутствующих клеток представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну функциональную мутацию, предпочтительно к микрокомпартментам, в которых менее 20% общей популяции присутствующих клеток представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию, приводящую к модификации фенотипа соответствующей мутантной клетки.

15 Изобретение также относится к микрокомпартментам, в которых менее 20% общей популяции присутствующих клеток представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию, обеспечивающую возможность клональной экспансии клеток, которые становятся доминантными в культуре.

Согласно особенно подходящему варианту осуществления, изобретение относится к
20 микрокомпартменту, в котором менее 20% общей присутствующей популяции клеток представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию, выбранную из онкогенных мутаций. По меньшей мере одна мутация представляет собой онкогенную мутацию.

Согласно варианту осуществления, изобретение относится к микрокомпартменту, в котором менее
25 20% общей присутствующей популяции клеток представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию гена и/или мутацию вследствие амплификации хромосомной области.

В одном варианте осуществления изобретения менее 20% общей популяции клеток, присутствующих
в микрокомпартменте, представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию гена P53 и/или амплификацию хромосомной области 20q и/или 7q (мутация вследствие амплификации хромосомной области 20q и/или 7q), в частности амплификацию хромосомной области 20q11
30 (мутация вследствие амплификации хромосомной области 20q11).

Предпочтительно клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию согласно одному из вариантов осуществления изобретения, составляют от 0 до 15% общей популяции клеток, присутствующих в микрокомпартменте, в частности от 0 до 14%, от 0 до 12%, в частности от 0 до 10%, еще более предпочтительно от 0 до 8%, от 0 до 5%, от 0 до 2%.

35 Процент мутантных клеток среди популяции клеток можно измерить различными способами, известными специалисту в данной области. Для обнаружения точечных мутаций предпочтительны способы секвенирования с высокой глубиной прочтения (полногеномное секвенирование, секвенирование экзона, амплитудное и т. п.). Для обнаружения структурных вариантов предпочтительны способы с высоким разрешением (массив однонуклеотидных полиморфизмов (SNP)
40 с высоким разрешением, оптическое картирование генома компании Bionano, цифровая ПЦР и т. п.).

Для обнаружения эпигенетических вариантов можно рассмотреть несколько инструментов (бисульфитное секвенирование с уменьшенной репрезентативностью (RRBS) по массивам метилирования, бисульфитное секвенирование / пиросеквенирование и т. п.).

- Преимущество состоит в том, что микрокомпарменты согласно изобретению имеют очень низкий уровень мутантных клеток и это сохраняется после нескольких циклов клеточного деления. Клетки согласно изобретению действительно представляют собой клетки, полученные посредством амплификации из по меньшей мере одной клетки.
- Фактически клетки, присутствующие в микрокомпарменте согласно изобретению, были получены после по меньшей мере двух циклов клеточного деления после инкапсуляции во внешний гидрогелевый слой по меньшей мере одной клетки.
- Предпочтительно, чтобы клетки, присутствующие в микрокомпарменте согласно изобретению, были получены по меньшей мере после 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 28, 30 циклов клеточного деления после инкапсуляции во внешний гидрогелевый слой по меньшей мере 1 клетки, предпочтительно от 1 до 5, от 1 до 10, от 1 до 15, от 1 до 20, от 1 до 30, от 1 до 40, от 1 до 50, от 1 до 60, от 1 до 100 клеток. Например, клетки, присутствующие в микрокомпарменте, были получены после по меньшей мере шести циклов клеточного деления после инкапсуляции во внешний гидрогелевый слой по меньшей мере 1 клетки, предпочтительно от 1 до 50 клеток.
- Предпочтительно микрокомпармент получают после по меньшей мере 2 пассажей после инкапсуляции, более предпочтительно после по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 пассажей.
- Каждый пассаж может длиться, например, от 2 до 15 дней, в частности от 3 до 10 дней.
- Предпочтительно микрокомпармент получают после по меньшей мере одной реинкапсуляции, более предпочтительно после от 1 до 14 реинкапсуляций, в частности после от 2 до 7 реинкапсуляций.
- Очень предпочтительно реинкапсуляция соответствует новому пассажи, и каждый цикл инкапсуляции соответствует пассажи.
- Предпочтительно объем всех клеток, первоначально инкапсулированных в микрокомпармент перед первым циклом клеточного деления, составляет менее 50% объема микрокомпармента, в котором они инкапсулированы, более предпочтительно менее 40%, 30%, 20%, 10% объема микрокомпармента, в котором они инкапсулированы.
- Таким образом, согласно одному варианту осуществления, клетки, присутствующие в микрокомпарменте согласно изобретению, были получены по меньшей мере после 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 28, 30 циклов клеточного деления после инкапсуляции во внешний гидрогелевый слой клетки (клеток) объемом менее 50% объема микрокомпармента, в котором она (они) инкапсулирована (-ы), более предпочтительно менее 40%, 30%, 20%, 10% объема микрокомпармента, в котором она (они) инкапсулирована (-ы).
- Предпочтительно в микрокомпарменте согласно изобретению объем клеток составляет более 50% относительно объема микрокомпармента, еще более предпочтительно более 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% относительно объема микрокомпармента.
- Микрокомпармент согласно изобретению содержит несколько клеток, предпочтительно по меньшей мере 20 клеток, еще более предпочтительно по меньшей мере 100, по меньшей мере 500, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 10 000.

Дополнительно к внешнему слою и клеткам микрокомпармент согласно изобретению может содержать другие элементы, в частности:

- культуральную среду и/или

- по меньшей мере один промежуточный слой, состоящий из изотонического водного раствора и/или элементов внеклеточного матрикса.

Культуральная среда представляет собой среду, подходящую для клеток, присутствующих в микрокомпарменте, в соответствии с информацией, которая известна специалистам в данной области.

Промежуточный слой, состоящий из изотонического водного раствора, предпочтительно содержит

элементы внеклеточного матрикса, такие как пептидные или пептидомиметические последовательности, способные связываться с интегринами. «Изотонический водный раствор» означает водный раствор, имеющий осмолярность от 200 до 400 мОсм/л. Этот слой предпочтительно расположен между (а) слоем (-ями) клеток и/или клеточным (-и) основным (-и) слоем (-ями) и (b) внешним гидрогелевым слоем.

Промежуточный слой может состоять из элементов, которые были добавлены во время производства микрокомпармента, и/или элементов, добавленных в микрокомпармент, и/или элементов, секретируемых или индуцируемых другими компонентами микрокомпармента.

Промежуточный слой может, в частности, содержать внеклеточный матрикс и/или культуральную среду или состоять из них. Если он содержит внеклеточный матрикс, это может быть внеклеточный

матрикс, секретируемый клетками внутреннего слоя, и/или внеклеточный матрикс, добавленный во время получения/производства микрокомпармента.

Промежуточный слой предпочтительно содержит смесь белков и внеклеточных соединений, необходимых для культивирования клеток, подвергающихся дифференцировке. Предпочтительно промежуточный слой содержит структурные белки, такие как коллаген, ламинины, энтактин,

витронектин, и факторы роста, такие как трансформирующий фактор роста бета (TGF-бета) и/или эпидермальный фактор роста (EGF). Согласно одному варианту осуществления, промежуточный слой может состоять из Matrigel®, и/или Geltrex®, и/или матрикса гидрогелевого типа растительного происхождения, такого как модифицированные альгинаты, или синтетического происхождения, или сополимера поли(N-изопропилакриламида) и поли(этиленгликоля) (PNIPAAm-PEG) типа Mebiol®

или содержать их.

Согласно одному варианту осуществления, промежуточный слой может образовывать гель.

На поверхности промежуточного слоя, контактирующей с внутренним слоем подвергающихся дифференцировке человеческих клеток, промежуточный слой может необязательно содержать одну или более клеток.

Предпочтительно промежуточный слой имеет модуль Юнга от 0,05 до 3 кДа. Модуль Юнга можно измерить любым способом, известным специалисту в данной области, в частности посредством измерения реологических свойств гелей того же состава, что и промежуточный слой, или же посредством АСМ (атомно-силовой микроскопии).

Такие значения модуля Юнга промежуточного слоя, состоящего из изотонического водного раствора и/или содержащего элементы внеклеточного матрикса, предпочтительно промежуточного слоя,

состоящего из внеклеточного матрикса, позволяют улучшить поддержание клеточного фенотипа и геномной целостности клеток, содержащихся в данном промежуточном слое во время клеточных делений.

Согласно конкретному варианту осуществления изобретения, микрокомпартмент также содержит по меньшей мере одно отверстие или одну полость. Предпочтительно микрокомпартмент содержит внутреннюю полость. Микрокомпартмент согласно изобретению может также содержать несколько полостей. Полость (полости) может (могут) содержать жидкость, в частности культуральную среду и/или жидкость, секретируемую клетками. Преимущество состоит в том, что наличие этой полостей части позволяет клеткам иметь небольшой диффузионный объем, состав которого они могут контролировать, что способствует клеточной коммуникации.

В одном варианте осуществления изобретения микрокомпартмент последовательно содержит следующие компоненты, расположенные вокруг полости:

- по меньшей мере один слой клеток и/или по меньшей мере один клеточный основной слой, предпочтительно эпителиальных клеток, в частности стволовых клеток и, в частности, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека или животного.
- промежуточный слой, состоящий из изотонического водного раствора и/или элементов внеклеточного матрикса, предпочтительно слой внеклеточного матрикса;
- внешний гидрогелевый слой.

В данном варианте осуществления внутренний слой клеток в пределах микрокомпартмента согласно изобретению является полым. Это трехмерное расположение в однослойном или сферическом эпителиальном основании, окружающем центральную полость, также можно назвать цистой. Полость (полости) предпочтительно формируется (-ются) во время образования цисты клетками, которые размножаются и развиваются на слое внеклеточного матрикса.

Цистообразная конформация позволяет снизить давление, испытываемое стволовыми клетками, по сравнению с 2D-культурами или агрегатами. Данная конфигурация снижает смертность клеток, увеличивая коэффициент амплификации в культуре. Следовательно, это дает возможность уменьшить количество необходимых пассажей и диссоциаций для сокращения времени культивирования, необходимого для достижения необходимого конечного количества клеток. В совокупности эти улучшения также способствуют поддержанию генетической целостности стволовых клеток в микрокомпартментах.

Клеточный микрокомпартмент согласно изобретению является закрытым или частично закрытым, то есть внешний слой закрыт или частично закрыт. Предпочтительно микрокомпартмент является закрытым.

Микрокомпартмент согласно изобретению может иметь любую трехмерную форму, то есть он может иметь форму любого объекта в пространстве. Микрокомпартмент может иметь любую форму, совместимую с инкапсуляцией клеток. Предпочтительно микрокомпартмент согласно изобретению имеет сферическую или удлиненную форму. Он может иметь форму овоида, цилиндра, сфероида или сферы. В частности, он может иметь форму полого сфероида, полого овоида, полого цилиндра или полой сферы.

Именно внешний слой микрокомпартамента, то есть гидрогелевый слой, придает размер и форму микрокомпарменту согласно изобретению. Предпочтительно наименьший размер микрокомпартамента согласно изобретению составляет от 10 мкм до 1 мм, предпочтительно от 100 мкм до 700 мкм. Он может составлять от 10 мкм до 600 мкм, в частности от 10 мкм до 500 мкм.

5 Его наибольший размер предпочтительно составляет более 10 мкм, более предпочтительно от 10 мкм до 1 м, еще более предпочтительно от 10 мкм до 50 см.

Микрокомпармент согласно изобретению содержит клетки, геномная целостность которых была сохранена и/или поддержана, причем очень небольшой процент клеток, присутствующих в микрокомпарменте, являются носителями мутаций. Его можно применять для любых целей, в частности в качестве лекарственного средства при клеточной терапии людей или животных.

10 Микрокомпармент согласно изобретению необязательно может быть заморожен для хранения. Затем перед применением его нужно будет разморозить.

Изобретение также относится ко множеству микрокомпарментов, собранных вместе.

Таким образом, как описано выше, изобретение также относится к узлу или серии клеточных

15 микрокомпарментов, содержащим по меньшей мере два клеточных микрокомпартамента согласно изобретению.

Изобретение также относится к узлу или серии микрокомпарментов, состоящим по меньшей мере из двух трехмерных клеточных микрокомпарментов, причем каждый микрокомпармент содержит по меньшей мере один внешний гидрогелевый слой, а внутри упомянутого внешнего слоя — по меньшей мере один слой клеток и/или по меньшей мере один клеточный основной слой, при этом по меньшей мере один микрокомпармент представляет собой микрокомпармент согласно изобретению.

25 Другим конкретным объектом изобретения является узел или серия из по меньшей мере двух трехмерных клеточных микрокомпарментов, причем каждый микрокомпармент содержит по меньшей мере один внешний гидрогелевый слой, а внутри упомянутого внешнего слоя — по меньшей мере один слой клеток и/или по меньшей мере один клеточный основной слой, при этом менее 20% общей популяции клеток, присутствующих во всех микрокомпарментах узла, представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию. Предпочтительно клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию, составляют от 0 до 15% общей популяции клеток, присутствующих во всех микрокомпарментах, в частности от 0 до 14%, от 0 до 12%, в частности от 0 до 10%, еще более предпочтительно от 0 до 8%, от 0 до 5%, от 0 до 2%. Предпочтительно по меньшей мере один микрокомпармент представляет собой микрокомпармент согласно изобретению.

30 Таким образом, один или более микрокомпарментов серии могут содержать более 20% мутантных клеток относительно количества клеток, присутствующих в упомянутом (-ых) микрокомпарменте (-ах), но относительно всех микрокомпарментов, образующих узел микрокомпарментов согласно изобретению, менее 20% общей популяции клеток, присутствующих во всех микрокомпарментах узла, представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию, в частности по меньшей мере одну функциональную, генетическую или эпигенетическую мутацию. Предпочтительно по меньшей мере один микрокомпармент представляет собой микрокомпармент согласно изобретению.

40

- Изобретение относится, в частности, к узлу микрокомпарментов, в котором менее 20% общей популяции клеток, присутствующих в узле, представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну функциональную мутацию, предпочтительно к узлу микрокомпарментов, в котором менее 20% общей популяции клеток, присутствующих в узле, представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию, вызывающую модификацию фенотипа соответствующей мутантной клетки
- 5 Изобретение также относится к узлу микрокомпарментов, в котором менее 20% общей популяции клеток, присутствующих в узле, представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию, обеспечивающую возможность клональной экспансии клеток, которые становятся доминантными в культуре.
- 10 Согласно особенно подходящему варианту осуществления, изобретение относится к узлу микрокомпарментов, в котором менее 20% общей популяции клеток, присутствующих в узле, представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию, выбранную из онкогенных мутаций. По меньшей мере одна мутация представляет собой онкогенную мутацию.
- 15 Согласно одному варианту осуществления, изобретение относится к узлу микрокомпарментов, в котором менее 20% общей популяции клеток, присутствующих в узле, представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию гена и/или мутацию вследствие амплификации хромосомной области.
- В одном варианте осуществления изобретения менее 20% общей популяции клеток, присутствующих в узле микрокомпарментов, представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию гена P53 и/или амплификацию хромосомной области 20q и/или 7q (мутация вследствие амплификации хромосомной области 20q и/или 7q), в частности амплификацию хромосомной области 20q11 (мутация вследствие амплификации хромосомной области 20q11).
- 20 Предпочтительно клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию согласно одному из вариантов осуществления изобретения, составляют от 0 до 15% общей популяции клеток, присутствующих в узле микрокомпарментов, в частности от 0 до 14%, от 0 до 12%, в частности от 0 до 10%, еще более предпочтительно от 0 до 8%, от 0 до 5%, от 0 до 2%.
- Предпочтительно, чтобы клетки, присутствующие в микрокомпарментах узла микрокомпарментов согласно изобретению, были получены после по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 28, 30 циклов клеточного деления после инкапсуляции во внешний гидрогелевый слой по меньшей мере 1 клетки в каждом микрокомпарменте. Микрокомпармент (-ы), присутствующий (-ие) в узле микрокомпарментов, может (могут) иметь одну или более характеристик микрокомпармента согласно изобретению (размер, форма, количество клеток, объем клеток, промежуточный слой, полость и т. п.).
- 30 Узел микрокомпарментов согласно изобретению предпочтительно содержит от 2 до 10^{16} микрокомпарментов.
- Предпочтительно серия микрокомпарментов согласно изобретению находится в культуральной среде, в частности по меньшей мере частично в конвективной культуральной среде.
- Согласно особенно подходящему варианту осуществления, объектом изобретения является серия клеточных микрокомпарментов, как описано выше, в закрытой камере, такой как биореактор,
- 40 предпочтительно в культуральной среде в закрытой камере, такой как биореактор.

Наличие внешнего гидрогелевого слоя и, возможно, промежуточного слоя, состоящего из изотонического водного раствора, обеспечивает равномерное распределение клеток между микрокомпартаментами. Более того, этот гидрогелевый слой позволяет предотвратить слияние микрокомпарментов, причем такие слияния являются основным источником варибельности, которая является неблагоприятной для фенотипической однородности клеток.

Способ получения микрокомпартамента согласно изобретению

Изобретение также относится к способу получения микрокомпарментов согласно изобретению. Способ получения микрокомпартамента или узла микрокомпарментов согласно изобретению может включать по меньшей мере реализацию этапов, которые состоят из следующего:

- 10 - (a) получение суспензии клеток, содержащей отдельные клетки и/или по меньшей мере одно скопление клеток в изотонической среде, предпочтительно культуральной среде, содержащей ингибитор апоптоза;
- (b) инкапсулирование клеточной суспензии в гидрогелевый слой;
- (c) предпочтительно культивирование полученных микрокомпарментов в изотоническом растворе, предпочтительно в культуральной среде, содержащей ингибитор апоптоза;
- 15 - (d) предпочтительно промывание микрокомпарментов для удаления ингибитора апоптоза;
- (e) культивирование микрокомпарментов в изотоническом растворе, предпочтительно в культуральной среде, в течение по меньшей мере двух циклов клеточного деления; и
- (f) необязательно извлечение полученных клеточных микрокомпарментов.

20 Изобретение также направлено на применение данного способа для поддержания геномной целостности инкапсулированных клеток.

В способе согласно изобретению объем всех клеток, первоначально инкапсулированных на этапе (b), составляет менее 50% объема микрокомпартамента, в котором они инкапсулированы, более предпочтительно менее 40%, 30%, 20%, 10% объема микрокомпартамента, в котором они

25 инкапсулированы.

Ингибитор апоптоза может, например, представлять собой один или более ингибиторов сигнальных путей RHO/ROCK (RHO-ассоциированная протеинкиназа) или любой другой ингибитор апоптоза, известный специалисту в данной области. Ингибитор апоптоза должен способствовать выживанию клеток, а в случае наличия внеклеточного матрикса способствовать адгезии клеток к внеклеточному

30 матриксу во время формирования внешнего гидрогелевого слоя вокруг упомянутого внеклеточного матрикса.

Способ согласно изобретению может включать до осуществления этапа (a) или одновременно с ним этап диссоциации клеток посредством химической, ферментативной или механической диссоциации. Этот этап особенно важен в случае наличия адгезивных клеток.

35 Инкапсулированные клетки суспендируют в форме отдельных клеток и/или кластера (-ов) или скопления (-й) по меньшей мере из двух клеток («кластер (-ы)»). Предпочтительно количество отдельных клеток составляет менее 50% количества всех клеток, первоначально инкапсулированных на этапе (b). Действительно, предпочтительно инкапсулировать кластеры клеток, поскольку это уменьшает хромосомную десегрегацию, и, следовательно, уменьшает появление новых мутаций, и

40 способствует поддержанию геномной целостности клеток.

Предпочтительно каждый кластер клеток, первоначально инкапсулированный на этапе (b), имеет наибольший размер, составляющий менее 20% наибольшего размера микрокомпартамента, в котором он инкапсулирован, еще более предпочтительно менее 10%. Фактически кластеры клеток не должны иметь слишком большой размер по сравнению с размером микрокомпартамента, поскольку слишком большой размер этих исходных кластеров клеток может привести во время клеточных делений к слишком ранней клеточной конфлюэнтности в капсуле; такая слишком ранняя конфлюэнтность всей или части капсул может привести к увеличению внутриклеточного давления и привести к клеточному стрессу, влияющему, в частности, на хромосомную сегрегацию.

5 Согласно одному варианту осуществления, способ согласно изобретению может включать этап смешивания клеток с внеклеточным матриксом либо между этапом (a) и этапом (b), либо одновременно с инкапсуляцией на этапе (b).

Очень предпочтительно, чтобы этапы (c), (d) и (e) выполняли при непрерывном или последовательном перемешивании. Это перемешивание важно, поскольку оно поддерживает гомогенность культуральной среды и предотвращает образование диффузионного градиента.

15 Например, оно позволяет контролировать равномерный уровень клеточной оксигенации, предотвращая таким образом связанные с гипоксией некроза или связанные с гипероксией явления окислительного стресса. За счет предотвращения увеличения клеточной смертности и/или окислительного стресса, перемешивание способствует поддержанию генетической целостности.

Способ согласно изобретению предпочтительно реализуют с использованием закрытой камеры, такой как закрытый биореактор.

20 Количество клеточных делений на этапе (e) составляет по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 циклов клеточного деления.

Предпочтительно микрокомпаратмент получают после по меньшей мере 2 пассажей (в настоящем документе «пассаж» соответствует полному циклу этапов (a), (b) и (e), необязательно (c) и (d)), более предпочтительно после по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 пассажей. Каждый пассаж может длиться, например, от 2 до 15 дней, в частности от 3 до 8 дней.

В предпочтительном варианте осуществления способ согласно изобретению включает по меньшей мере одну реинкапсуляцию клеток после этапа (e), то есть по меньшей мере два цикла инкапсуляции.

Предпочтительно каждый цикл инкапсуляции соответствует пассажи. В этом варианте осуществления 30 способа (по меньшей мере одна реинкапсуляция клеток после этапа (e)) количество клеточных делений по всему способу (за все пассажи) составляет по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 циклов клеточного деления.

Способ согласно изобретению может включать несколько реинкапсуляций, предпочтительно от 1 до 100, в частности от 1 до 10 реинкапсуляций.

35 Каждая реинкапсуляция может включать:

- этап, который заключается в диссоциации микрокомпартамента или серии микрокомпарментов для получения суспензии клеток или суспензии кластеров клеток; внешний гидрогелевый слой может быть удален, в частности, посредством гидролиза, растворения, прокалывания и/или разрушения любыми биосовместимыми средствами, то есть средствами, которые не токсичны для клеток.

40 Например, удаление может быть осуществлено с использованием фосфатно-солевого буферного

раствора, хелатора двухвалентных ионов, фермента, такого как альгинатлиаза, если гидрогель содержит альгинат, и/или лазерной микродиссекции; и

- этап реинкапсулирования всех или части клеток или кластеров клеток в гидрогелевую капсулу.

5 Реинкапсуляция является средством, подходящим для увеличения клеточной амплификации в результате прохождения этапа плюрипотентности, а также для снижения риска возникновения мутаций.

Согласно одному варианту осуществления реинкапсуляция включает следующие этапы:

- (i) удаление внешнего гидрогелевого слоя,

10 - (ii) ресуспендирование клеток, которые содержались в микрокомпарimente, для получения отдельных клеток и/или по меньшей мере одного скопления или кластера клеток в изотонической среде, предпочтительно культуральной среде, содержащей ингибитор апоптоза,

- (iii) инкапсулирование клеточной суспензии в гидрогелевый слой,

15 - (iv) предпочтительно культивирование полученных микрокомпариментов в изотоническом растворе, содержащем ингибитор апоптоза, предпочтительно в культуральной среде, содержащей ингибитор апоптоза;

- (v) предпочтительно промывание микрокомпариментов для удаления ингибитора апоптоза;

- (vi) культивирование микрокомпариментов в изотоническом растворе, предпочтительно в культуральной среде, в течение по меньшей мере одного цикла клеточного деления; и

- (vii) необязательно извлечение полученных клеточных микрокомпариментов.

20 Компариментализация в микрокомпариментах позволяет исключить микрокомпарименты, содержащие еще больше мутировавших клеток, чем в других капсулах. Даже если мутировавшие клетки будут быстро расти, они достигнут конfluenceнтности в капсуле, что ограничит их размножение. Компариментализация также позволяет не загрязнять всю популяцию клеток, а также удалять капсулы, содержащие мутантные клетки, в любое время, в частности перед этапом

25 реинкапсулирования. Эту сортировку можно осуществлять либо посредством встроенного анализа, либо, например, посредством удаления заполненных капсул быстрее, чем других. Таким образом, способ согласно изобретению может включать один или более этапов удаления микрокомпариментов, содержащих мутантные клетки, в частности микрокомпариментов, содержащих более 20% мутантных клеток.

30 Согласно одному варианту осуществления изобретения, клетки представляют собой плюрипотентные стволовые клетки, организованные в цисты, состоящие непосредственно из плюрипотентных стволовых клеток или из дифференцированных клеток, которые будут репрограммированы в плюрипотентные клетки внутри гидрогелевой капсулы во время формирования микрокомпариментов. Инкубацию на этапах (a) и/или (ii) предпочтительно выполняют в течение от нескольких минут до 35 нескольких часов, предпочтительно от 2 минут до 2 часов, более предпочтительно от 10 минут до 1 часа.

Этап (c) и/или (iv) культивирования с ингибитором апоптоза выполняют в течение от 2 до 72 часов, предпочтительно в течение от 6 до 48 часов, более предпочтительно в течение от 24 до 48 часов.

40 Этап промывки может быть выполнен путем одной или более операций промывок в последовательных культуральных средах, не содержащих ингибиторов сигнального пути RHO/ROCK,

спустя менее 96 часов, предпочтительно менее 72 часов, более предпочтительно от 24 до 48 часов, после начала этапов (с) и/или (iv).

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из этапов (предпочтительно все этапы) выполняют при температуре, подходящей для выживания клеток, в диапазоне от 4 до 42 °С.

- 5 Температура во время пролиферации клеток предпочтительно должна составлять от 32 до 37 °С для предотвращения возникновения мутаций из-за снижения эффективности ферментов репарации. Аналогичным образом температура предпочтительно должна быть низкой (в идеале примерно 4 °С), чтобы клетки выдерживали стресс на этапе (b).

- Согласно одному варианту осуществления, репрограммирующие клетки агенты можно добавлять на
- 10 этапе (a), и/или (b), и/или (c), и/или (ii), и/или (iii), и/или (iv). Предпочтительно они представляют собой репрограммирующие клетки агенты, которые не проникают в гидрогелевый слой. Добавление репрограммирующих агентов особенно актуально, когда первоначально инкапсулированные клетки представляют собой дифференцированные клетки, которые должны быть дедифференцированы, в частности, до уровня плюрипотентности. Специалист в данной области знает, как репрограммировать
- 15 дифференцированную клетку в стволовую клетку посредством реактивации экспрессии генов, связанных с эмбриональной стадией, с помощью специфических факторов, обозначенных в настоящем изобретении как «репрограммирующие агенты». В качестве примеров можно привести способы, описанные ниже: Takahashi *et al.*, 2006 (“Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors” *Cell*, 2006 Vol 126, pages 663–676), Ban *et al.*,
- 20 2009 (“Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome” *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2009; 85(8):348-62) и международная заявка WO2010/105311 с названием “Production of reprogrammed pluripotent cells”. Преимущество состоит в том, что репрограммирующие агенты инкапсулируют вместе с дифференцированными клетками, чтобы сконцентрировать продукт и обеспечить их контакт
- 25 со всеми клетками. В случае, когда репрограммирующие агенты проникают в гидрогелевый слой, можно добавлять упомянутые агенты в культуральную среду после этапа инкапсулирования. Репрограммирующие агенты позволяют вызвать в клетках последовательность фенотипических изменений до достижения уровня плюрипотентности. Преимущество состоит в том, что этап репрограммирования выполняют с использованием специфических культуральных сред,
- 30 способствующих этим фенотипическим изменениям. Например, клетки культивируют в первой среде, содержащей 10% человеческой или бычьей сыворотки, в минимальной эссенциальной среде Игла (DMEM), дополненной ингибитором рецептора серин/треониновой протеинкиназы (таким как препарат SB-431542 (C₂₂H₁₆N₄O₃)), одним или более ингибиторами сигнального пути RHO/ROCK (RHO-ассоциированная протеинкиназа), такими как тиазолин и/или Y-27632, факторами роста
- 35 фибробластов, такими как FGF-2, аскорбиновой кислотой и антибиотиками, такими как трихстан А (C₁₇H₂₂N₂O₃). Затем культуральную среду заменяют средой, способствующей размножению плюрипотентных клеток, такой как среда mTeSR®1.

На любой стадии способ согласно изобретению может включать этап, состоящий в проверке фенотипа клеток, содержащихся в микрокомпарменте. Эту проверку можно выполнять посредством

идентификации экспрессии по меньшей мере части клеток, содержащихся в микрокомпарменте, по меньшей мере одного гена, специфичного для искомого фенотипа.

Клеточные микрокомпарменты, полученные согласно способам изобретения, можно затем заморозить перед любым применением. Замораживание предпочтительно выполняют при температуре от $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Оттаивание можно выполнять на теплой водяной бане (предпочтительно $37\text{ }^{\circ}\text{C}$), чтобы клетки оттаивали достаточно быстро. Микрокомпарменты согласно изобретению перед их применением можно хранить при температуре более $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение ограниченного времени перед их применением, предпочтительно от $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $38\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Способ согласно изобретению, благодаря его особым признакам, обеспечивает возможность поддержания геномной целостности клеток во время их культивирования, причем конечные микрокомпарменты содержат клетки, несущие мало мутаций или не несущие мутаций вовсе. В частности, 3-мерная структура клеток в микрокомпарменте и низкий процент или даже нулевой процент клеток, изолированных во время инкапсуляции (большая часть клеток инкапсулируется в виде кластера клеток), уменьшают хромосомную десегрегацию и, следовательно, уменьшают появление новых мутаций.

Изобретение также способствует амплификации с высоким коэффициентом амплификации, что, следовательно, уменьшает время культивирования и количество делений при получении очень большого количества клеток и, следовательно, ограничивает мутагенез.

Защита клеток, благодаря внешнему слою и наличию элементов внеклеточного матрикса, когда он присутствует, уменьшает хромосомную десегрегацию и ограничивает механический стресс, воздействующий на клетки, и, следовательно, уменьшает появление новых мутаций.

Контроль параметров культуры в биореакторе также снижает окислительный стресс, что способствует уменьшению появления новых мутаций.

Также объектом изобретения также является применение способа согласно изобретению для поддержания геномной целостности клеток во время их амплификации.

Объектом изобретения также является применение трехмерного микрокомпармента, предпочтительно закрытого, предпочтительно сферической или вытянутой формы, содержащего по меньшей мере один внешний гидрогелевый слой, определяющий форму внутренней части, для поддержания геномной целостности клеток во время их амплификации. Предпочтительно объект изобретения включает применение клеточного микрокомпармента согласно различным вариантам осуществления изобретения, как описано в настоящей заявке. Изобретение также направлено на применение узла данных микрокомпарментов, предпочтительно в закрытом биореакторе, для поддержания геномной целостности клеток во время их амплификации, еще более предпочтительно узла микрокомпарментов в соответствии со всеми вариантами осуществления согласно изобретению и как описано в настоящей заявке.

Ниже изобретение проиллюстрировано двумя примерами и сравнительными результатами.

Эти примеры относятся к культуре человеческих плюрипотентных стволовых клеток и, более конкретно, человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS).

Пример 1

40 **Протокол**

Используемая в настоящем документе клеточная линия под названием iPS-IMGINE005 ранее была описана в публикации: *E. Quelennec, C. Banal, M. Hamlin, D. Clémantine, M. Michael, N. Lefort, Generation of two induced pluripotent stem cell lines IMAGINi004-A and IMAGINi005-A from healthy donors. Stem Cell Research, 101959 (2020).*

- 5 Линия iPS была сгенерирована согласно обычным стандартам культуры iPS в 2 измерениях. Чтобы отслеживать практически неизбежное возникновение мутаций во время длительного культивирования этой линии, регулярно (каждые 5–10 пассажей) выполняется отслеживание кариотипа. Начальной точкой эксперимента, проводимого для настоящего документа, является образец, представляющий собой замороженные iPS-клетки, прошедшие репрограммирование 23 (2D-пассаж).
- 10 На этой стадии культивирования и для этого образца тесты кариотипа с высоким разрешением не обнаружили амплификацию хромосомной области 20q11, но было замечено, что кратковременное культивирование (менее 10 2D-пассажей) этого образца приводит к возникновению мутации вследствие амплификации хромосомной области 20q11. Эта начальная точка клеток особенно актуальна для тестирования положительной селекции с
- 15 течением времени мутантного клона в популяции клеток в культуре. Действительно, мутация вследствие амплификации хромосомной области 20q11 дает мутантному клону преимущество в росте; чем больше давление селекции в системе культивирования, тем выше риск того, что этот клон быстро получит преимущество и станет преобладающим. Инкапсулированную систему культивирования в перемешиваемой суспензии (далее именуемую
- 20 «Изобретение») сравнивали с двумя системами культивирования, являющимися стандартными в области производства плюрипотентных стволовых клеток: 2-мерная культура (далее именуемая «2D-культура») и культура в незащищенной перемешиваемой суспензии в виде агрегатов (далее именуемая «Биореакторные (клеточные) агрегаты»).
- Исходный образец (ранее описанный и культивированный в 2D-культуре) использовали для
- 25 параллельного инициирования 3 экспериментальных групп, связанных с 3 системами культивирования, причем это было осуществлено в течение 28 дней. При каждом пассаже и для каждой экспериментальной группы отбирают образцы клеток для проведения генетических тестов (см. раздел «Результаты»). В частности, частоту мутации вследствие амплификации хромосомной области 20q11 оценивают в начале и в конце этого длительного 28-дневного культивирования.
- 30 Скорость пассажей для каждой системы культивирования максимально соответствует оптимальным рекомендациям в соответствии с условиями культивирования. Таким образом, 2D-культуры пассируют каждые 4–5 дней, когда уровень конфлюэнтности составляет от 70 до 90%; агрегатные культуры пассируют каждые 5 дней, согласно рекомендациям поставщика (Minibio, ABLE® Bioreactor Systems); инкапсулированные культуры пассируют каждые 7 дней, когда средний уровень
- 35 конфлюэнтности в капсуле составляет от 50 до 100%. Все описанные ниже виды культивирования выполняют с использованием культуральной среды mTeSR 1 («Stemcell Technologies»). Обработка с помощью 10 мкМ Rock-ингибитора начинается в течение первых 24 часов после пассажа.
- Все культуры («2D», «Биореакторные (клеточные) агрегаты» и «Изобретение») выдерживают в
- 40 инкубаторе для клеточной культуры при 37 °C и 5% CO₂.

В 2 экспериментальных группах при культивировании стволовых клеток в суспензиях «Биореакторные (клеточные) агрегаты» и «Изобретение» используют мини-биореакторы Minibio, ABLE® Bioreactor Systems, объемом 30 мл; постоянную скорость перемешивания устанавливали на уровне 35 оборотов в минуту от момента посева до момента сбора клеток.

- 5 В 2 экспериментальных группах при культивировании стволовых клеток в трехмерных клеточных структурах в суспензиях «Биореакторные (клеточные) агрегаты» и «Изобретение» для последовательных пассажей используют ферментативную диссоциацию: агрегаты с одной стороны и инкапсулированные цисты с другой подвергаются диссоциации с использованием водяной бани с TgurlE в течение 20 минут при 37 °С. Клетки и небольшие скопления (кластеры) клеток, полученные
- 10 в результате этой диссоциации, затем используют для инокуляции новой культуры.

Для культивирования с использованием внеклеточного матрикса используют Matrigel (Corning). Таким образом, для 2D-культур колбы (T-Flak T75) предварительно покрывают матриксом Matrigel; для инкапсуляций или реинкапсуляций клетки смешивают с матриксом Matrigel перед введением в центральный микрожидкостный канал, причем для культур в агрегатах не требуется применение

- 15 внеклеточного матрикса.

Культивирование в «2D-культуре» проводят в колбах (T-Flask T75), предварительно покрытых матриксом Matrigel®, причем концентрация клеточного посева составляет от 10 000 до 30 000 клеток на см². Пассажи выполняют способом, включающим применение небольших агрегатов, с кратковременным использованием (менее 5 минут) хелатора кальция RelesR (Stem cell technologies).

- 20 Культуральную среду полностью заменяют (при сохранении постоянного объема) в день 1 для исключения воздействия Rock-ингибитора, а затем ежедневно.

Культуру «Биореакторные (клеточные) агрегаты» инициируют той же суспензией клеток, используемой при засеве культур «2D-культура» и «Изобретение», но с исходной концентрацией 175

- 25 заменяют (при сохранении постоянного объема) в день 1 для исключения воздействия Rock-ингибитора, затем 75% среды обновляют ежедневно (постоянный объем составляет 20 мл).

Культивирование hiPSC согласно изобретению (инкапсуляция согласно изобретению)

Перед инкапсуляцией 2D-колонии стволовых клеток разделяли с использованием ReLeSR в течение 1

- 30 смешивали с матриксом Matrigel в объемном соотношении 50/50 при 4 °С для поддержания суспензии

в жидком состоянии. Таким образом, конечная концентрация клеток в растворе клетки/матрикс составляла от 0,4 до $1,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл, что обозначается термином «плотность

инкапсуляции». Трубки из этилен-тетрафторэтилена (ETFE) соединяют с тремя входными

- 35 ламинарным потоком. Микрокапиллярный наконечник, изготовленный из экструдированного и

полированного стекла (с диаметром сопла примерно 100 мкм для большинства экспериментов или с диаметром сопла 150 мкм), прикреплен к выходному отверстию сопла для лучшего контроля потока.

Суспензия клетки/матрикс загружается во внутренний канал 3-поточного устройства, который находится в охлажденном состоянии с помощью встроенной системы охлаждения, чтобы

- 40 предотвратить преждевременное гелеобразование матрикса Matrigel. Раствор альгината натрия

(Novamatrix Pronova SLG100, 0,25 г при 2% в дистиллированной воде) вводят во внешний канал. Для предотвращения в микрожидкостном устройстве гелеобразования альгината из-за высвобождения кальция находящимися в суспензии клетками в промежуточном канале коэкструзионного чипа используют лишенный кальция раствор (Sorbitol 300 mM, Sigma-Aldrich) в качестве барьера против диффузии кальция. Скорости потока 3 растворов были порядка 120 мл/ч по трем каналам (раствор альгината, раствор сорбитола и суспензия клетки + матрикс). При этих скоростях потока раствор композиции образует жидкую струю, которая фрагментируется на капли (приблизительно вдвое больше размера сопла) из-за спонтанно возникающей неустойчивости Рэлея — Плато. Для предотвращения последующей коалесценции потока капель часть устройства с альгинатным наполнителем и медное кольцо соединены с генератором высокого напряжения (2000 В). Когда капли композиции вступают в контакт с ванной для сбора кальция (при 100 mM), внешний альгинатный слой переходит в гелеобразное состояние. Следовательно, внутренний раствор клетки/матрикс остается «захваченным» внутри закрытого, сферического и проницаемого микрокомпартамента. В течение нескольких минут после инкапсуляции капсулы промывают средой (DMEM) для снижения базальной концентрации кальция. В конце они переносятся в культуральную среду в виде суспензии. Пассажи экспериментальной группы «Изобретение» соответствуют реинкапсуляциям. Эти реинкапсуляции выполняют посредством растворения альгинатных капсул с использованием кратковременного промывания реагентом ReleSR с последующей клеточной диссоциацией с использованием TrypLE (способствующий диссоциации фермент на основе трипсина, ThermoFisher) в течение 20 минут при 37 °C. Затем полученные клетки обрабатывали в соответствии с протоколом инкапсуляции согласно изобретению.

Результаты

Осуществляли 4 последовательные инкапсуляции с продолжительностью 7 дней каждая. 6 последовательных пассажей выполняли для группы «Биореакторные (клеточные) агрегаты» и 7 последовательных пассажей выполняли для группы «2D-культура». Отбор образцов клеток при каждом пассаже и на 28-й день позволил осуществить сравнительную оценку 3 групп культур с течением времени (Фиг. 1).

Оценка посредством фазово-контрастной микроскопии подтверждает успешное образование двумерных колоний, агрегатов и инкапсулированных цист стволовых клеток, как и ожидалось для групп «2D-культура», «Биореакторные (клеточные) агрегаты» и «Изобретение» (Фиг. 2a, 2b, 2c). При каждом пассаже подсчет клеток осуществляется с использованием счетчика клеток (Nucleo Counter NC 3000), который позволяет установить коэффициент клеточной амплификации во время культивирования (Фиг. 3). Величины кумулятивной теоретической амплификации составляют 151 миллион, 71 миллион и 13 330 соответственно для экспериментальных групп «Изобретение», «2D-культура» и «Биореакторные (клеточные) агрегаты». Эти коэффициенты кумулятивной амплификации соответствуют среднему количеству видимых клеточных делений за 28 дней, равному 27,2; 26,2 и 13,7 соответственно для групп культур «Изобретение», «2D-культура» и «Биореакторные (клеточные) агрегаты». Было обнаружено, что конечная амплификация клеток выше в экспериментальной группе «Изобретение» по сравнению с 2 другими экспериментальными группами.

Культивирование по 3 системам было успешно выполнено согласно самым высоким стандартам, о чем свидетельствуют маркеры плюрипотентности OCT4 и NANOG, которые одинаково экспрессируются в 3 сравниваемых системах культивирования (Фиг. 4).

Вначале генетическая оценка выполнялась посредством SNP-чипа очень высокого разрешения (CytoScan® HD Array Affymetrix, ThermoFisher) (Фиг. 5). Было обнаружено появление структурной мутации (хромосомная дупликация, охватывающая область 20q11, и делеция) вблизи 20-й хромосомы, хорошо заметная у конечных образцов (Д28) экспериментальных групп «2D-культура» (примерно 50% мутантных клеток) и «Биореакторные (клеточные) агрегаты» (примерно 50% мутантных клеток). Одинаковые профили перегруппировки 20-й хромосомы для этих 2 образцов указывают на то, что это не связано с воздействием независимых факторов и что эта мутация унаследована от общего предка. Таким образом, даже если данная мутация не обнаруживается при первичном отборе образцов, данный факт убедительно свидетельствует о ее наличии в начальный момент эксперимента в небольшом проценте клеток. Для образца Д28 группы «Изобретение» отмечается меньшее количество копий, что соответствует проценту мутировавших клеток в популяции, составляющему менее 10%.

Также при каждом пассаже для всех экспериментальных групп выполнялись цифровые ПЦР-анализы для обнаружения возможного появления повторных генетических мутаций плюрипотентных стволовых клеток (зонды iCS-digital PSC 24, StemGenomics). В частности, ПЦР-зонд, используемый в данном тесте, позволил подсчитать с течением времени количество копий хромосомной области 20q11 (Фиг. 6). В культуре клеток 3 экспериментальных групп среднее количество копий области 20q11 увеличивается с течением времени. Это увеличение больше и происходит быстрее в группах «2D-культура» и «Биореакторные (клеточные) агрегаты» по сравнению с группой «Изобретение». Учитывая, что количество копий области 20q11 для каждой мутантной клетки равно 3 (сравните: Фиг. 5 — увеличение на 1 копию), среднее количество копий, равное менее 2,2, соответствует проценту мутантных клеток в популяции клеток, который составляет менее 20%.

В целом результаты цифровой ПЦР и анализа на основе SNP-чипа согласуются и свидетельствуют о том, что селекция мутантных клеток в течение 28 дней культивирования была по меньшей мере в 5 раз ниже в группе «Изобретение» по сравнению с группами «2D-культура» и «Биореакторные (клеточные) агрегаты» (Фиг. 7). В частности, система культивирования с инкапсуляцией («Изобретение») позволяла производить в среднем 6,8 клеточных делений за пассаж, сохраняя процент мутантных клеток на уровне менее 20% для каждой инкапсуляции или в совокупности для 4 инкапсуляций.

Пример 2

Протокол

В данном примере используют две клеточные линии: коммерческая линия под названием iPSC-GHE (Gibco) и трансгенная линия, конститутивно экспрессирующая флуоресцентный белок GFP (зеленый флуоресцентный белок), под названием iPSC-AAVS1-GFP (Coriell, Институт клеточных наук Аллена). В начале эксперимента две линии культивируют независимо в 2D-культуре. Кариотипический анализ посредством цифровой ПЦР (зонды iCS-digital PSC 24, StemGenomics) показывает, что линия iPSC-GHE

имеет две кариотипические аномалии с амплификацией хромосомных областей 7q и 20q, тогда как линия iPSC-AAVS1-GFP не имеет каких-либо аномалий в 24 исследованных зонах (Fijack 8).

Использование линии iPSC-GHE, имеющей амплификации хромосомных областей 7q и 20q, особенно актуально для проверки положительной селекции с течением времени мутантного клона в популяции
 5 клеток в культуре. Действительно, мутации вследствие амплификации хромосомных областей 7q и 20q дают мутантному клону преимущество в росте; чем больше давление селекции в системе культивирования, тем выше риск того, что этот клон быстро получит преимущество и станет преобладающим.

Инкапсулированную систему культивирования в перемешиваемой суспензии «Изобретение»

10 сравнивали в течение 21 дня со стандартной системой культивирования в области производства плюрипотентных стволовых клеток: культура в агрегатной форме в незащищенной перемешиваемой суспензии «Биореакторные (клеточные) агрегаты».

Образец, используемый для параллельной инициации 2 экспериментальных групп, связанных с 2 системами культивирования, соответствует смеси линий iPSC-AAVS1-GFP и iPSC-GHE. Данная

15 смесь состоит на 80% из iPSC-AAVS1-GFP и на 20% из iPSC-GHE.

При каждом пассаже и для каждой экспериментальной группы отбирают образцы клеток для проведения цитометрических и генетических тестов (см. раздел «Результаты»). В частности, целью анализа является отслеживание частоты развития кариотипических аномалий в культуре популяции iPSC-GHE.

20 Скорость пассажей для каждой системы культивирования максимально соответствует оптимальным рекомендациям в соответствии с условиями культивирования. Таким образом, культуры в агрегатах пассируют каждые 5 дней согласно рекомендациям поставщика (Minibio, ABLE® Bioreactor Systems), а инкапсулированные культуры пассируют каждые 7 дней, когда средний уровень конфлюэнтности в капсуле составляет от 50 до 100%.

25 Все описанные ниже виды культивирования выполняют с использованием культуральной среды mTeSR1 plus (Stemcell Technologies). Обработка с помощью 10 мкМ Rock-ингибитора начинается в течение первых 24 часов после пассажа.

Все культуры («Биореакторные (клеточные) агрегаты» и «Изобретение») выдерживают в инкубаторе для клеточной культуры при 37 °C и 5% CO₂.

30 В двух экспериментальных группах — «Биореакторные (клеточные) агрегаты» и «Изобретение» — используют мини-биореакторы Minibio, ABLE® Bioreactor Systems, объемом 30 мл; скорость перемешивания постоянна и составляет 55 оборотов в минуту для группы «Биореакторные (клеточные) агрегаты» и 100 оборотов в минуту для группы «Изобретение».

В 2 экспериментальных группах — «Биореакторные (клеточные) агрегаты» и «Изобретение» — для
 35 последовательных пассажей используют ферментативную диссоциацию: агрегаты с одной стороны и инкапсулированные цисты с другой стороны подвергаются диссоциации с использованием водяной бани с TrypLE при 37 °C. Клетки и небольшие скопления (кластеры) клеток, полученные в результате этой диссоциации, затем используют для инокуляции новой культуры.

Для инкапсуляций или реинкапсуляций клетки смешивают с матриксом Matrigel® перед введением в центральный микрожидкостный канал, причем для культур в агрегатах не требуется применения внеклеточного матрикса.

Культуру «Биореакторные (клеточные) агрегаты» иницируют той же суспензией клеток,

- 5 используемой для инокуляции культуры «Изобретение», но с исходной концентрацией 175 000 клеток на мл среды, общий объем которой составляет 10 мл. Культуральную среду полностью заменяют в день 1 для удаления Rock-ингибитора.

Культивирование hiPSC согласно изобретению (инкапсуляция согласно изобретению)

Перед инкапсуляцией 2D-колонии стволовых клеток линий iPSC-GHE и iPSC-AAVS1-GFP

- 10 диссоциировали с использованием Accutase (StemCell Technologies). Затем две линии iPSC смешивали согласно указанным ранее соотношениям (80%–20%) и данную суспензию клеток смешивали в объемном соотношении 50/50 с матриксом Matrigel при 4 °C для поддержания суспензии в жидком состоянии. Таким образом, конечная концентрация клеток в растворе клетки/матрикс составляла от 0,4 до $1,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл, что обозначается термином «плотность инкапсуляции».

- 15 Трубки из этилен-тетрафторэтилена (ETFE) соединяют с тремя входными отверстиями созданного методом 3D-печати микрожидкостного устройства с совместным ламинарным потоком.

Микрокапиллярный наконечник, изготовленный из экструдированного и полированного стекла (с диаметром сопла примерно 100 мкм для большинства экспериментов или с диаметром сопла 150 мкм), прикреплен к выходному отверстию сопла для лучшего контроля потока. Суспензия

- 20 клетки/матрикс загружается во внутренний канал 3-поточного устройства, который находится в охлажденном состоянии с помощью встроенной системы охлаждения, чтобы предотвратить преждевременное гелеобразование матрикса Matrigel. Раствор альгината натрия (Novamatrix Proonova SLG100, 0,25 г при 2% в дистиллированной воде) вводят во внешний канал. Для предотвращения в микрожидкостном устройстве гелеобразования альгината из-за высвобождения кальция

- 25 находящимися в суспензии клетками в промежуточном канале коэкструзионного чипа используют лишенный кальция раствор (Sorbitol 300 mM, Sigma-Aldrich) в качестве барьера против диффузии кальция. Скорости потока 3 растворов были порядка 120 мл/ч по трем каналам (раствор альгината, раствор сорбитола и суспензия клетки + матрикс). При этих скоростях потока раствор композиции образует жидкую струю, которая фрагментируется на капли (приблизительно вдвое больше размера сопла) из-за спонтанно возникающей неустойчивости Рэлея — Плато. Для предотвращения

- 30 последующей коалесценции потока капель часть устройства с альгинатным наполнителем и медное кольцо соединены с генератором высокого напряжения (2000 В). Когда капли композиции вступают в контакт с ванной для сбора кальция (при 100 мМ), внешний альгинатный слой переходит в гелеобразное состояние. Следовательно, внутренний раствор клетки/матрикс остается «захваченным»

- 35 внутри закрытого, сферического и проницаемого микрокомпартамента. В течение нескольких минут после инкапсуляции капсулы промывают средой (DMEM) для снижения базальной концентрации кальция. В конце они переносятся в культуральную среду в виде суспензии.

Пассажи экспериментальной группы «Изобретение» соответствуют реинкапсуляциям. Эти реинкапсуляции выполняют посредством растворения альгинатных капсул с использованием

- 40 кратковременного промывания реагентом ReleSR с последующей клеточной диссоциацией с

использованием Accutase. Затем полученные клетки обрабатывали в соответствии с протоколом инкапсуляции согласно изобретению.

Результаты

Для группы «Биореакторные (клеточные) агрегаты» были осуществлены 3 последовательные инкапсуляции длительностью 7 дней каждая, а также 4 последовательных пассажа. Отбор образцов клеток при каждом пассаже и на 21-й день позволил осуществить сравнительную оценку 2 групп культур с течением времени (Фиг. 9).

Оценка посредством фазово-контрастной микроскопии подтверждает успешное образование агрегатов и инкапсулированных цист стволовых клеток, как и ожидалось для групп «Биореакторные (клеточные) агрегаты» и «Изобретение» (Фиг. 10).

При каждом пассаже подсчет клеток осуществляется с использованием счетчика клеток (Nucleo Counter NC 3000), который позволяет установить коэффициент клеточной амплификации во время культивирования (Фиг. 11). Величины кумулятивной теоретической амплификации составляют 55 776 699 миллионов и 40 481 соответственно для экспериментальных групп «Изобретение» и «Биореакторные (клеточные) агрегаты». Эти коэффициенты кумулятивной амплификации соответствуют среднему количеству видимых клеточных делений за 21 день, равному 25,73 и 15,30 соответственно для групп культур «Изобретение» и «Биореакторные (клеточные) агрегаты». Было обнаружено, что конечная амплификация клеток выше в экспериментальной группе «Изобретение» по сравнению с экспериментальной группой «Биореакторные (клеточные) агрегаты».

Культивирование по 2 системам было успешно выполнено согласно самым высоким стандартам, о чем свидетельствуют маркеры плюрипотентности OCT4 и NANOG, которые одинаково экспрессируются в 2 сравниваемых системах культивирования (Фиг. 12).

Первый анализ методом проточной цитометрии выполняли для отслеживания развития популяции линии iPSC-GHE в клеточной культуре. Клетки iPSC-GHE (GFP-отрицательные) содержат амплификации хромосомных областей 7q и 20q, которые дают селективное преимущество при культивировании hiPSC. Клетки iPSC-AAVS1-GFP (GFP-положительные) не содержат хромосомных аномалий.

Анализ методом проточной цитометрии при каждом пассаже для всех экспериментальных групп позволил оценить с течением времени количество клеток iPSC-GHE и iPSC-AAVS1-GFP (Фиг. 13) и, следовательно, посредством экстраполяции — количество копий хромосомных областей 7q и 20q. Уровень популяции iPSC-GHE (GFP-отрицательные клетки) в клеточной культуре увеличивается с течением времени в группе «Биореакторные (клеточные) агрегаты», но снижается с течением времени в группе «Изобретение».

Результаты анализа методом проточной цитометрии затем были подтверждены анализом методом цифровой ПЦР при обнаружении развития частоты генетических мутаций в популяции плюрипотентных стволовых клеток (зонды iCS-digital PSC 24, StemGenomics). В частности, два ПЦР-зонда этого теста позволили подсчитать с течением времени количество копий хромосомных областей 7q и 20q (Фиг. 14). Среднее количество копий областей 7q и 20q увеличивается с течением времени в культуре группы «Биореакторные (клеточные) агрегаты». В группе «Изобретение» среднее количество копий области 7q с течением времени уменьшается, а среднее количество копий области

20q уменьшается, а затем с течением времени очень незначительно увеличивается, но гораздо менее значительно и менее быстро, чем в группе «Биореакторные (клеточные) агрегаты». Учитывая, что количество копий областей 7q и 20q для каждой мутантной клетки iPSC-GHE равно 3 (сравните: Фиг. 8 — увеличение на 1 копию), среднее количество копий, эквивалентное 2,3, соответствует проценту мутантных клеток в популяции клеток, который равен 30%.

5 В целом результаты проточной цитометрии и цифровой ПЦР согласуются и свидетельствуют о том, что селекция мутантных клеток в течение 21 дня культивирования была по меньшей мере в 14,7 раз ниже в группе «Изобретение» по сравнению с группой «Биореакторные (клеточные) агрегаты» (Фиг. 15). В частности, система культивирования с инкапсуляцией («Изобретение») позволяла

10 производить в среднем 8,6 клеточных делений за пассаж, сохраняя процент мутантных клеток на уровне менее 20% (менее 3%) для каждой инкапсуляции или в совокупности для 4 инкапсуляций.

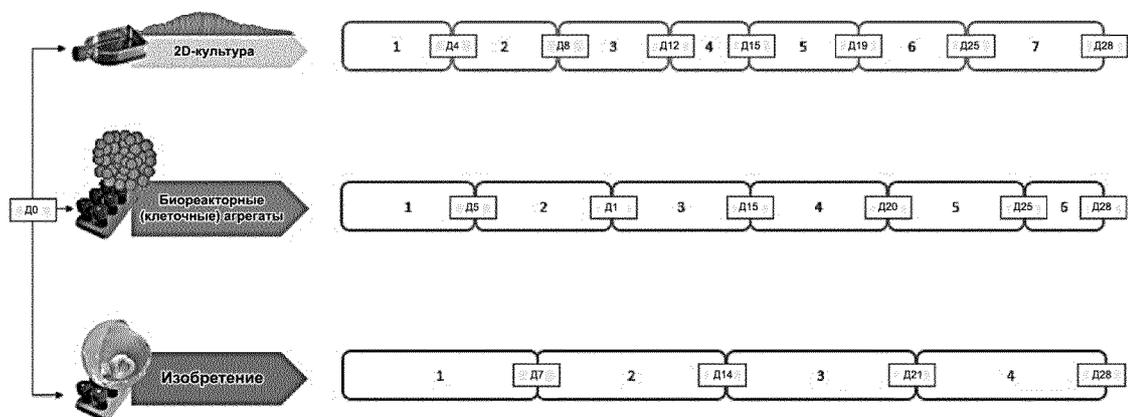
Формула изобретения

1. Трехмерный клеточный микрокомпартмент, содержащий по меньшей мере один внешний гидрогелевый слой, а внутри упомянутого внешнего слоя — по меньшей мере один слой клеток и/или по меньшей мере один клеточный основной слой, причем данный микрокомпартмент характеризуется тем, что менее 20% общей популяции клеток, присутствующих в микрокомпартменте, представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию.
2. Микрокомпартмент по п. 1, **характеризующийся тем, что** объем клеток составляет более 50% относительно объема микрокомпартмента, предпочтительно более 70% относительно объема микрокомпартмента.
3. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что мутация (-и) выбрана (-ы) из генетических мутаций и эпигенетических мутаций.
4. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что мутация (-и) представляет (-ют) собой функциональную (-ые) мутацию (-и).
5. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что по меньшей мере одна мутация представляет собой онкогенную мутацию.
6. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, **что** менее 20% клеток представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию гена P53, и/или по меньшей мере одну мутацию вследствие амплификации хромосомной области 20q, и/или по меньшей мере одну мутацию вследствие амплификации хромосомной области 7q.
7. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что менее 20% клеток представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию вследствие амплификации хромосомной области 20q11.
8. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию, составляют от 0 до 10% общей популяции клеток, присутствующих в микрокомпартменте, предпочтительно от 0 до 5%.
9. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что клетки организованы в форме ткани или микроткани.
10. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что он содержит внутреннюю полость.
11. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что он также содержит между (а) клеточным (-ыми) слоем (-ями) и/или клеточным (-ыми) основным (-ыми) слоем (-ями) и (b) гидрогелевым слоем по меньшей мере один промежуточный слой, состоящий из изотонического водного раствора и/или содержащий элементы внеклеточного матрикса.
12. Микрокомпартмент по предшествующему пункту, характеризующийся тем, что промежуточный слой, состоящий из изотонического водного раствора, представляет собой слой внеклеточного матрикса.
13. Микрокомпартмент по п. 11 или 12, характеризующийся тем, что промежуточный слой, состоящий из изотонического водного раствора, имеет модуль Юнга от 0,05 до 3 кДа.
14. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что клетки представляют собой клетки человека или животного.

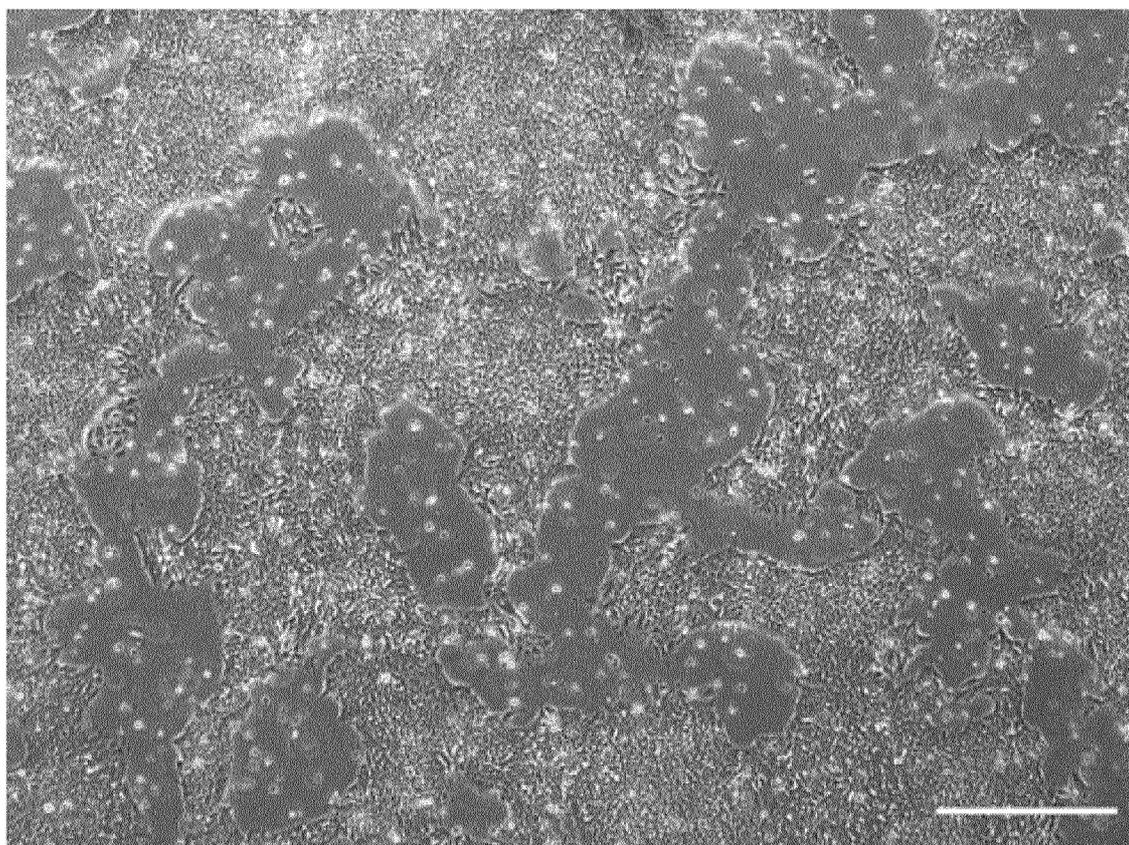
15. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что он содержит последовательно организованные вокруг полости:
- по меньшей мере один слой клеток и/или по меньшей мере один клеточный основной слой;
 - промежуточный слой, состоящий из изотонического водного раствора; и
- 5 - внешний гидрогелевый слой.
16. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что клетки представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) человека или животного, и/или мультипотентные клетки человека или животного, и/или клетки-предшественники человека или животного, и/или дифференцированные клетки человека или животного.
- 10 17. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что он является закрытым.
18. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что внешний слой содержит альгинат.
19. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что он
- 15 имеет форму овоида, цилиндра, сфероида или сферы.
20. Клеточный микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что он содержит по меньшей мере 20 клеток, предпочтительно по меньшей мере 1000 клеток.
21. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что клетки, присутствующие в микрокомпартменте, были получены после по меньшей мере двух циклов
- 20 клеточного деления после инкапсуляции во внешний гидрогелевый слой по меньшей мере одной клетки, предпочтительно от 1 до 50 клеток.
22. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что клетки, присутствующие в микрокомпартменте, были получены после по меньшей мере 5 циклов
- 25 клеточного деления после инкапсуляции во внешний гидрогелевый слой по меньшей мере одной клетки, предпочтительно от одной до пятидесяти клеток.
23. Узел из по меньшей мере двух трехмерных клеточных микрокомпартментов, причем каждый микрокомпартмент содержит по меньшей мере один внешний гидрогелевый слой, а внутри упомянутого внешнего слоя — по меньшей мере один слой клеток и/или по меньшей мере один
- 30 клеточный основной слой, при этом узел характеризуется тем, что менее 20% клеток из общей популяции клеток, присутствующих во всех микрокомпартментах, представляют собой клетки, имеющие по меньшей мере одну мутацию.
24. Узел микрокомпартментов по предшествующему пункту, характеризующийся тем, что по меньшей мере один микрокомпартмент представляет собой микрокомпартмент по одному из пп. 1–21.
25. Узел микрокомпартментов по предшествующему пункту, характеризующийся тем, что
- 35 микрокомпартменты расположены в культуральной среде в закрытом биореакторе.
26. Способ получения клеточного микрокомпартмента по одному из пп. 1–22 или узла клеточных микрокомпартментов по одному из пп. 23–25, включающий следующие этапы:
- (а) получение суспензии клеток, содержащей отдельные клетки и/или по меньшей мере один кластер клеток в изотонической среде, предпочтительно культуральной среде, содержащей ингибитор
- 40 апоптоза;

- (b) инкапсулирование клеточной суспензии в гидрогелевый слой;
 - (c) предпочтительно культивирование полученных микрокомпарментов в изотоническом растворе, содержащем ингибитор апоптоза;
 - (d) предпочтительно промывание микрокомпарментов для удаления ингибитора апоптоза;
 - 5 - (e) культивирование микрокомпарментов в изотоническом растворе в течение по меньшей мере двух циклов клеточного деления, и
 - (f) необязательно извлечение полученных клеточных микрокомпарментов;
- причем упомянутый способ характеризуется тем, что объем всех клеток, первоначально инкапсулированных на этапе (b), составляет менее 50% объема микрокомпармента, в котором они
- 10 инкапсулированы.
27. Способ по предшествующему пункту, характеризующийся тем, что каждый кластер клеток, первоначально инкапсулированный на этапе (b), имеет больший размер, составляющий менее 20% наибольшего размера микрокомпармента, в котором он инкапсулирован.
28. Способ по одному из пп. 26–27, характеризующийся тем, что он включает этап смешивания
- 15 клеток с внеклеточным матриксом либо между этапом (a) и этапом (b), либо одновременно с инкапсуляцией на этапе (b).
29. Способ по одному из пп. 26–28, характеризующийся тем, что этапы (c), (d) и (e) выполняют при непрерывном или последовательном перемешивании.
30. Способ по одному из пп. 26–29, характеризующийся тем, что его реализуют в закрытом
- 20 биореакторе.
31. Способ по одному из пп. 26–30, характеризующийся тем, что он включает по меньшей мере одну реинкапсуляцию клеток после этапа (e).
32. Способ по предшествующему пункту, характеризующийся тем, что он включает от 2 до 15 реинкапсуляций клеток.
- 25 33. Способ по одному из п. 31 или 32, характеризующийся тем, что каждая реинкапсуляция соответствует пассажи.
34. Способ по одному из пп. 31–33, характеризующийся тем, что реинкапсуляция включает следующие этапы:
- (i) удаление внешнего гидрогелевого слоя,
 - 30 - (ii) ресуспендирование клеток, которые содержались в микрокомпарменте, для получения отдельных клеток и/или по меньшей мере одного кластера клеток в изотонической среде, предпочтительно культуральной среде, содержащей ингибитор апоптоза,
 - (iii) инкапсулирование клеточной суспензии в гидрогелевый слой;
 - (iv) предпочтительно культивирование полученных микрокомпарментов в изотоническом растворе,
 - 35 содержащем ингибитор апоптоза;
 - (v) предпочтительно промывание микрокомпарментов для удаления ингибитора апоптоза;
 - (vi) культивирование микрокомпарментов в изотоническом растворе в течение по меньшей мере одного цикла клеточного деления; и
 - (vii) необязательно извлечение полученных клеточных микрокомпарментов.

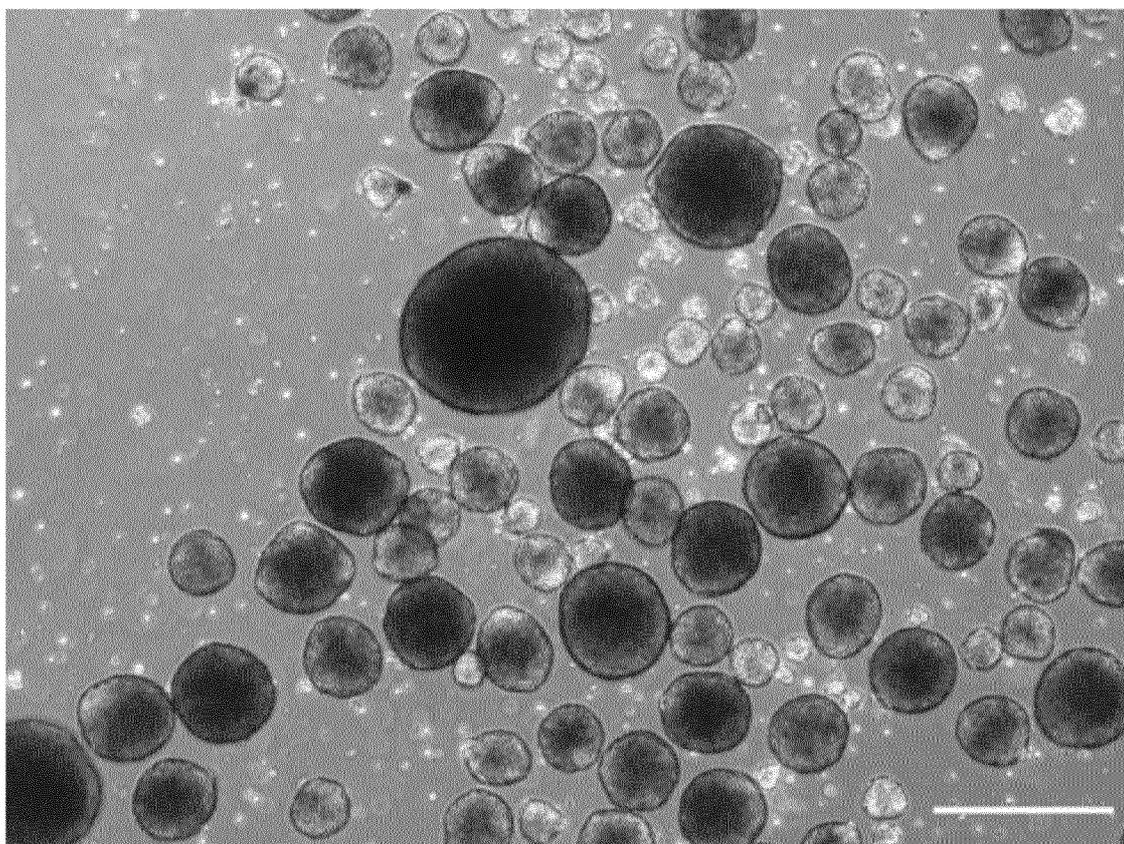
35. Способ по одному из пп. 26–34, **характеризующийся тем, что** в каждом микрокомпарменте отдельные клетки составляют менее 50% количества всех клеток, первоначально инкапсулированных на этапе (b).
36. Способ по одному из пп. 26–35, **характеризующийся тем, что** он включает этап диссоциации 5 клеток посредством химической, ферментативной или механической диссоциации перед или одновременно с этапом (a).
37. Способ по одному из пп. 26–36, **характеризующийся тем, что** он включает один или более этапов удаления микрокомпарментов, содержащих мутантные клетки.
38. Применение способа по одному из пп. 26–37 для поддержания геномной целостности клеток во 10 время их амплификации.
39. Применение микрокомпармента по одному из пп. 1–22 или узла микрокомпарментов по одному из пп. 23–25 для поддержания геномной целостности клеток во время их амплификации.



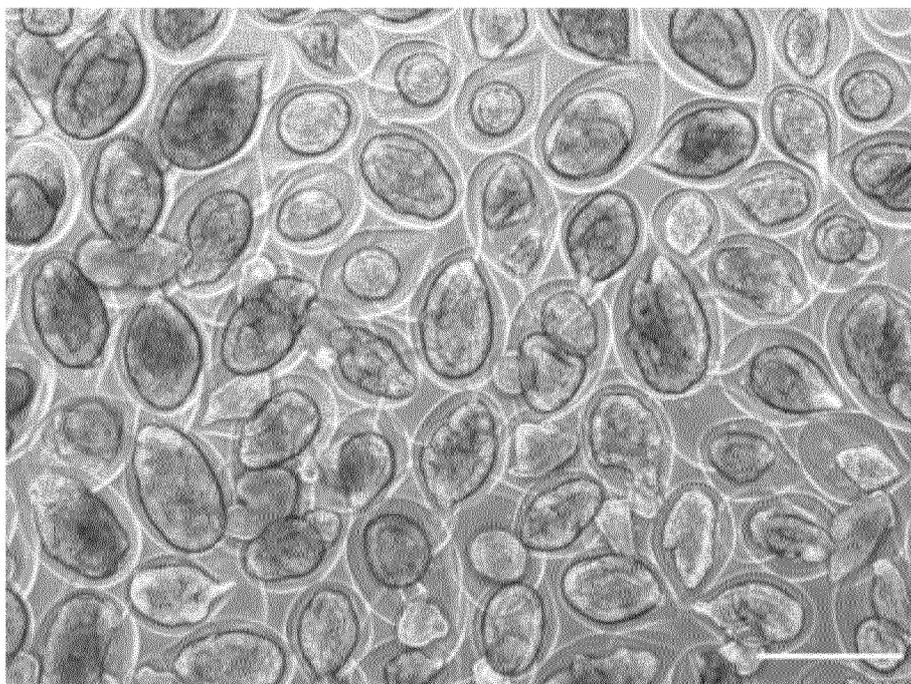
Фиг. 1



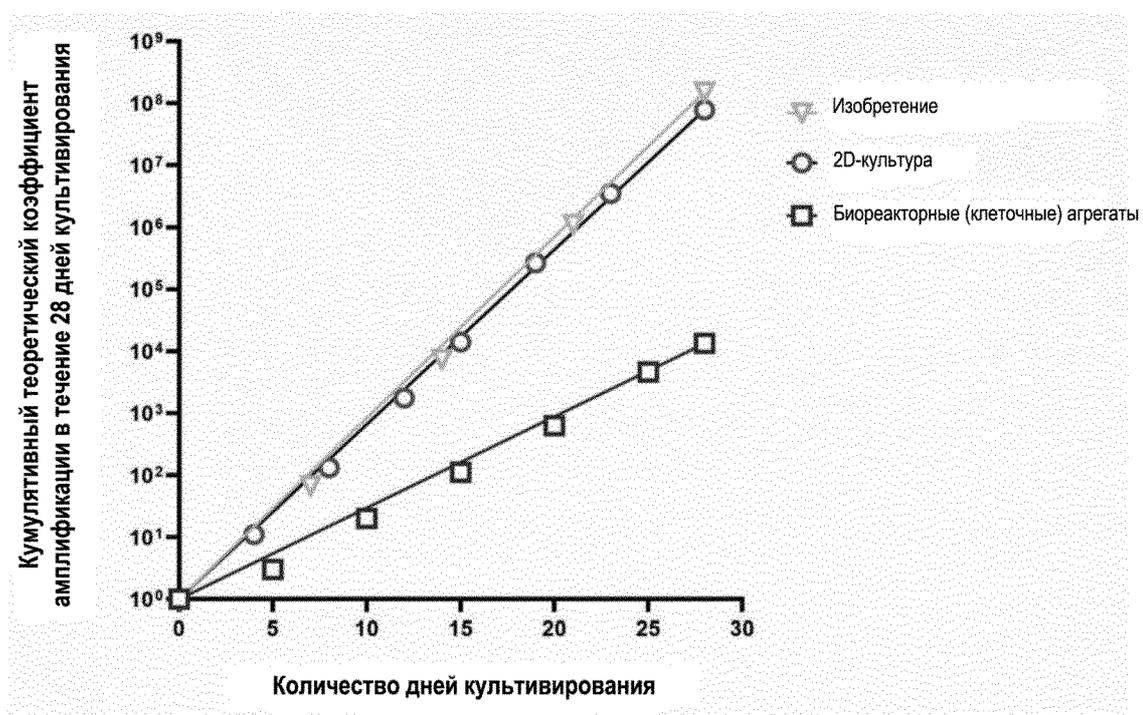
Фиг. 2а



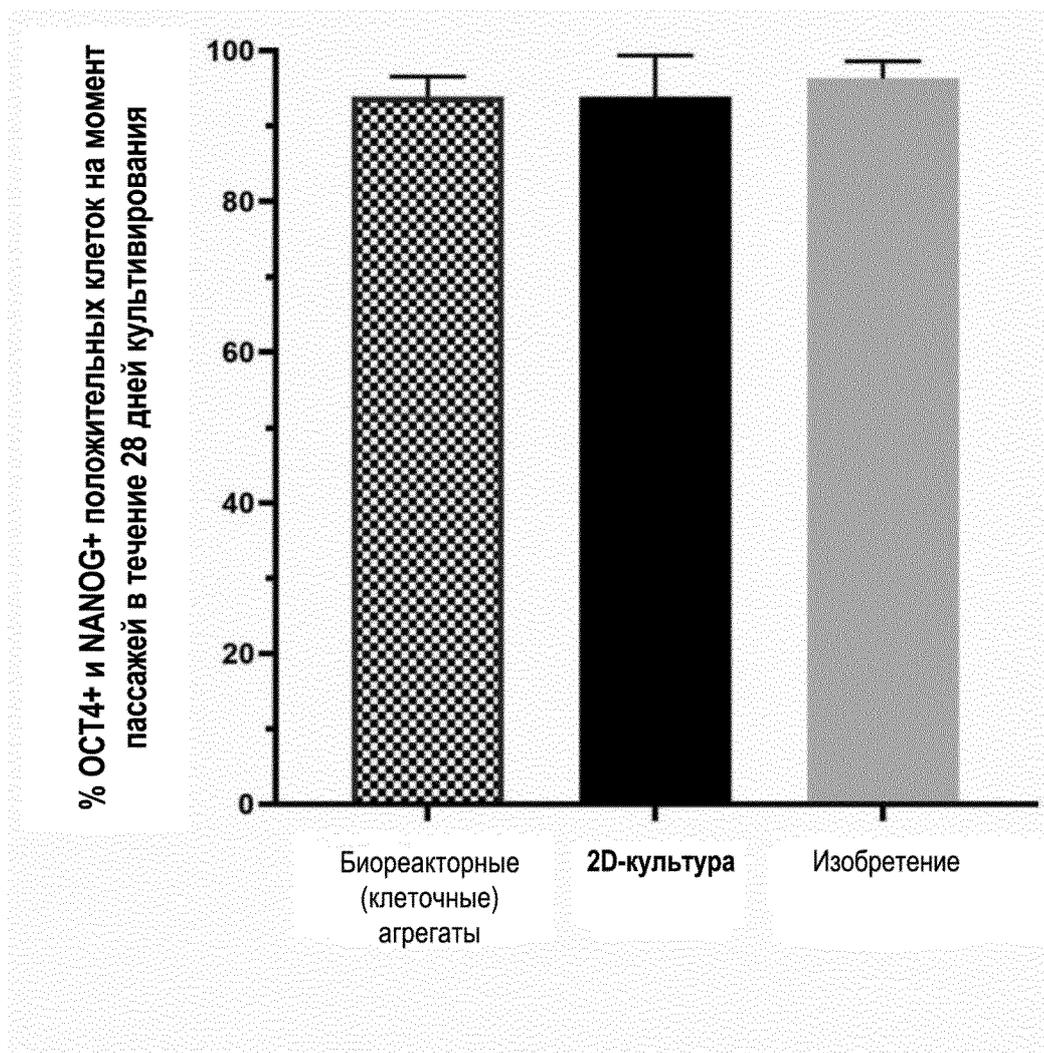
Фиг. 2b



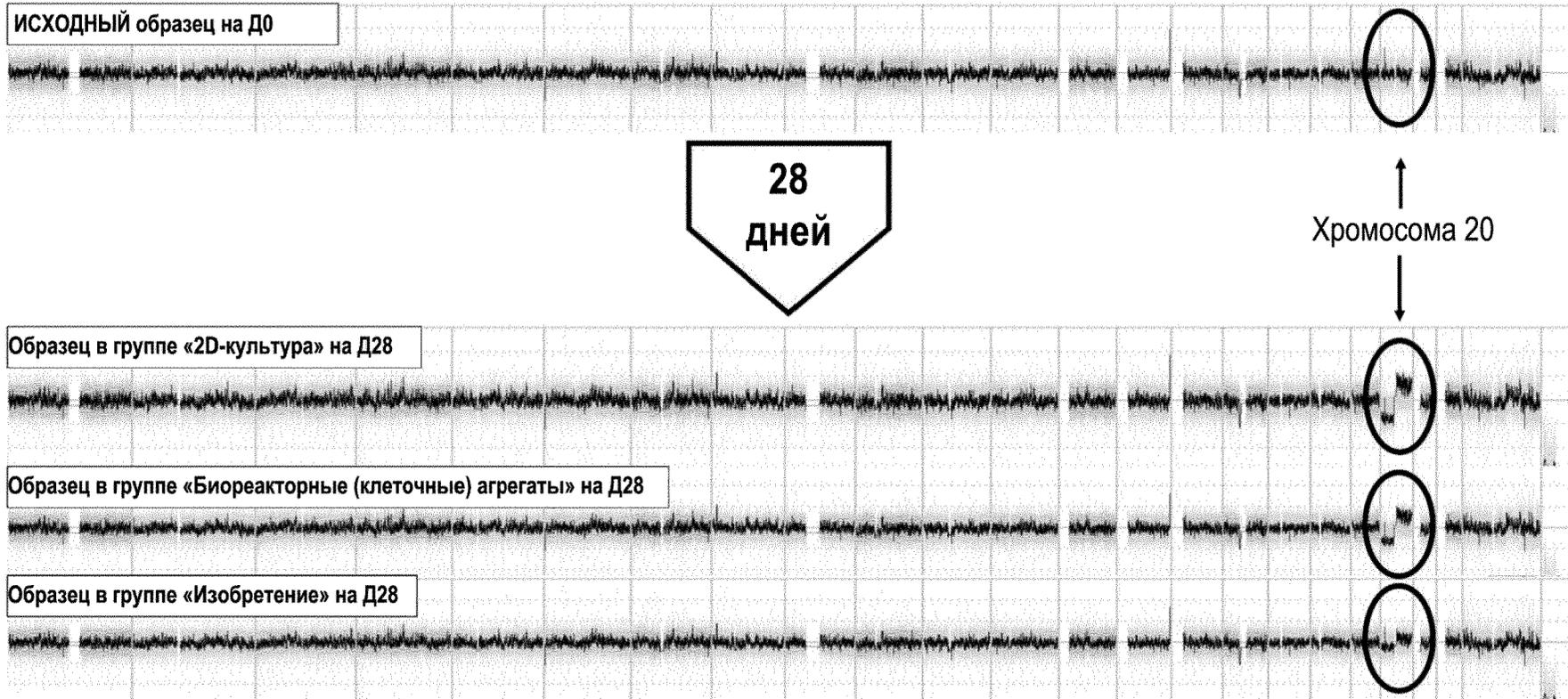
Фиг. 2c

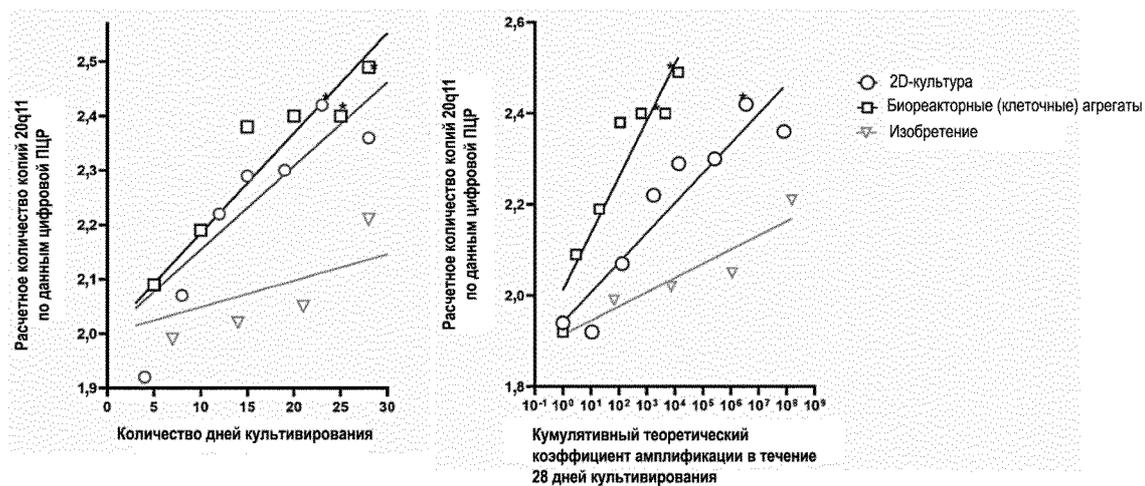


Фиг. 3

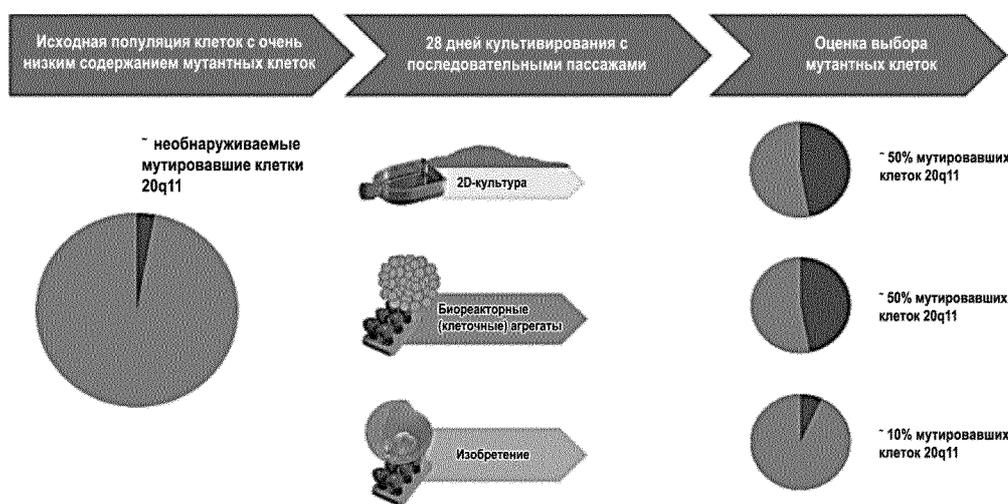


Фиг. 4



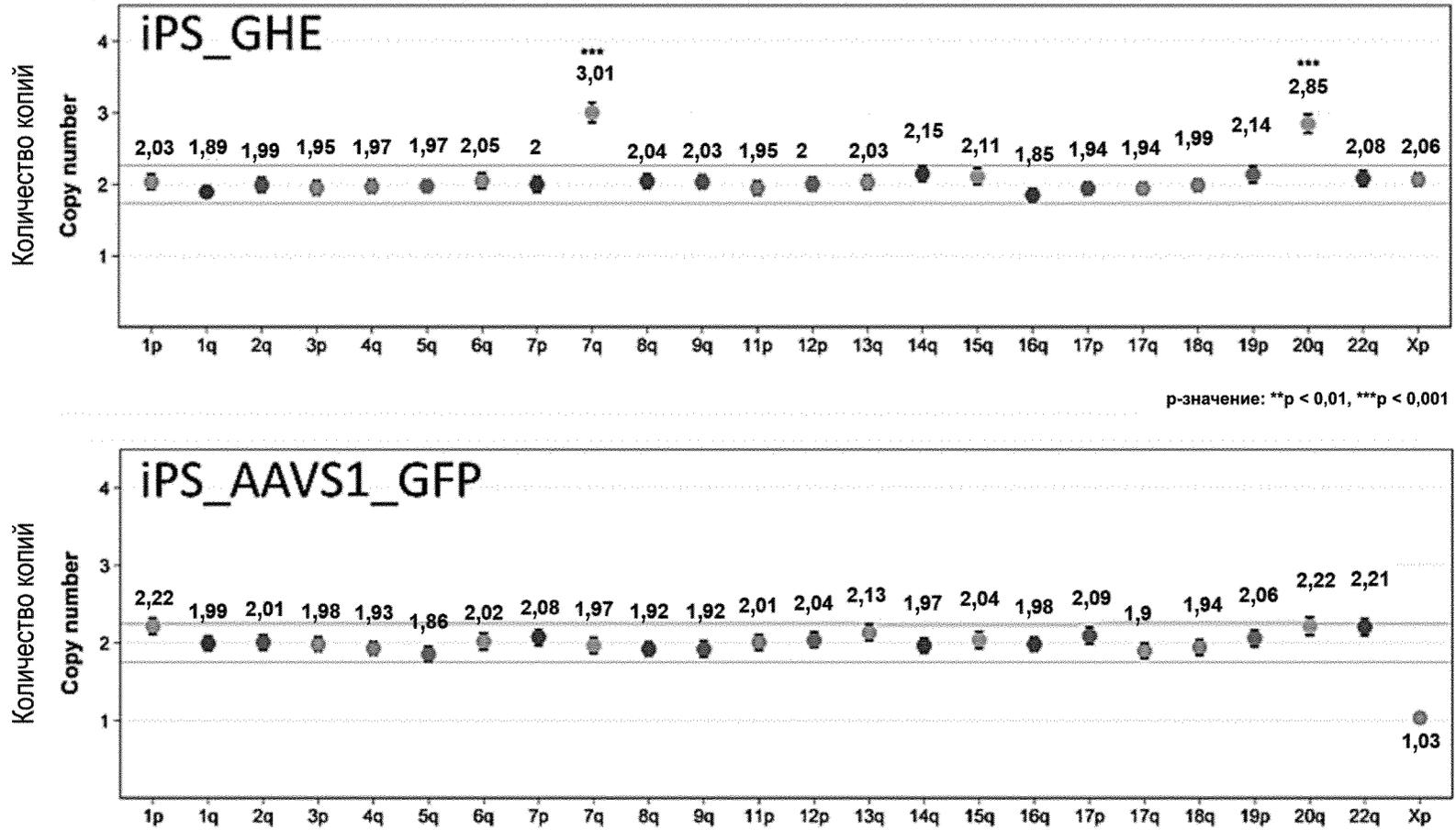


Фиг. 6



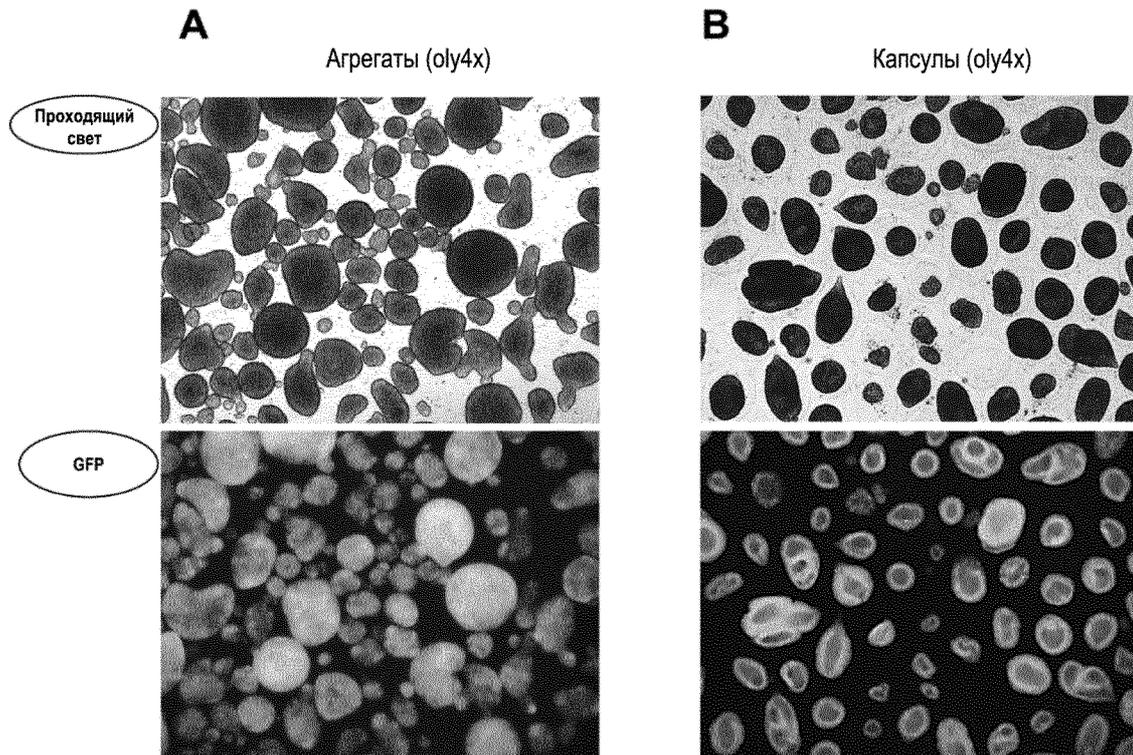
Фиг. 7

ФИГ. 8

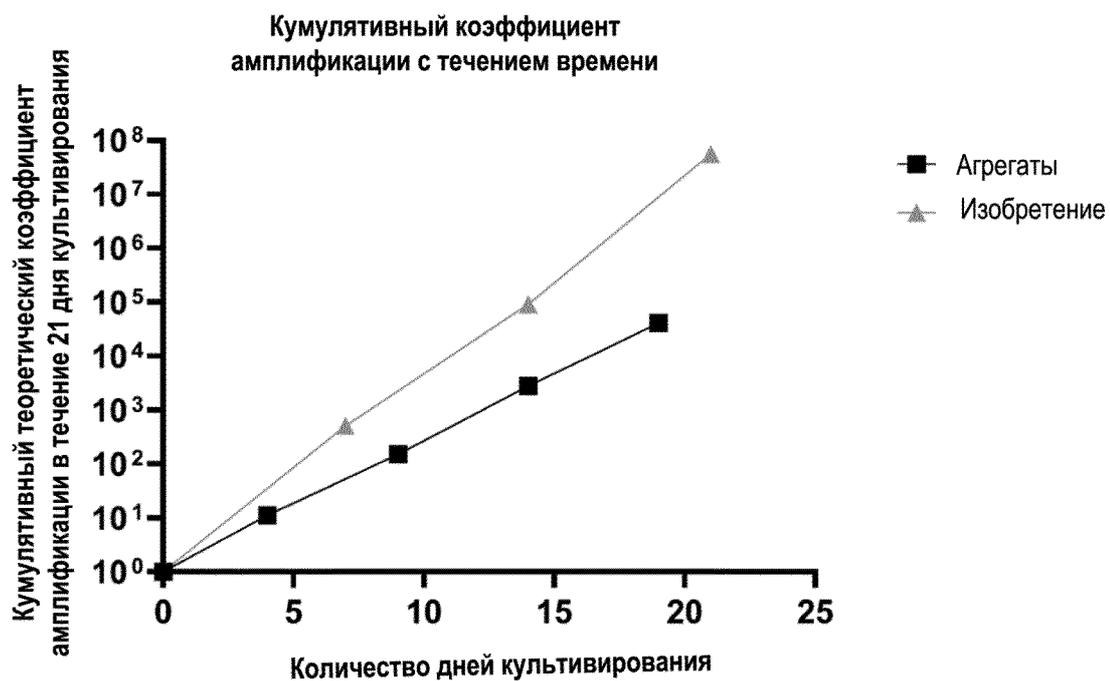




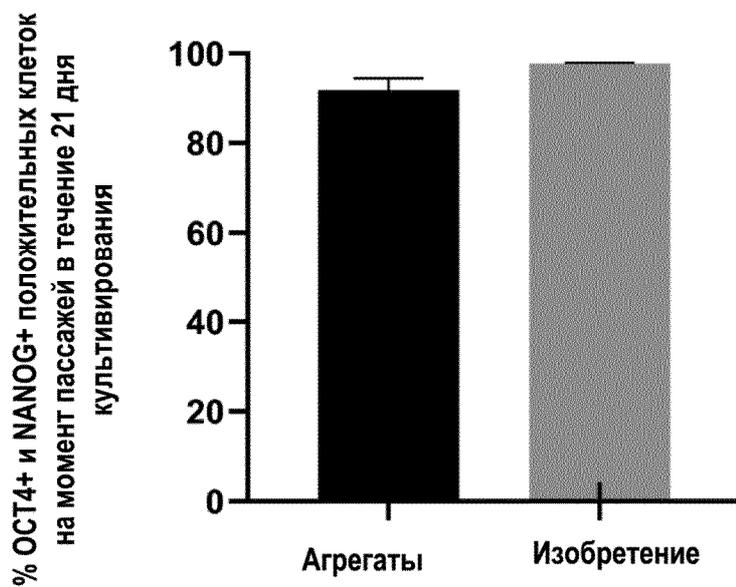
Фиг. 9



Фиг. 10

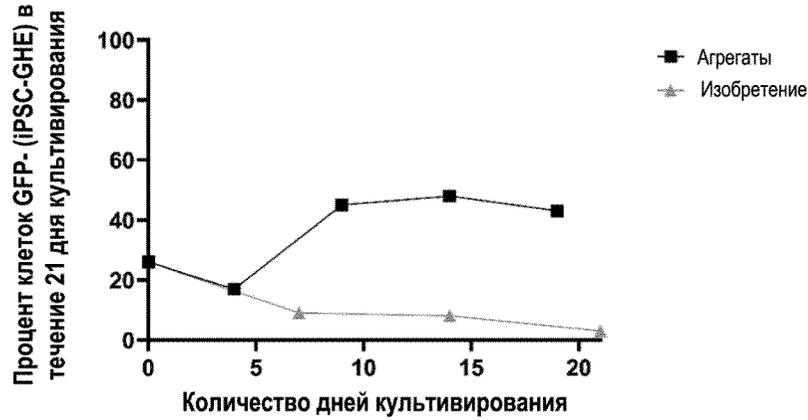


Фиг. 11

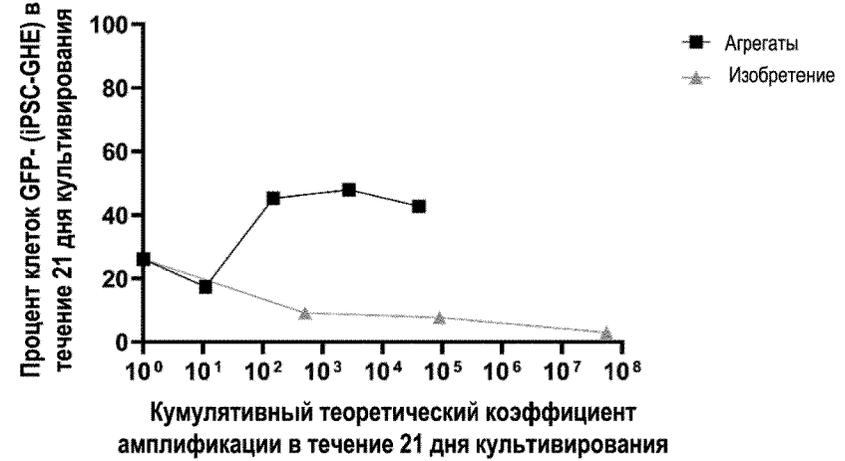


Фиг. 12

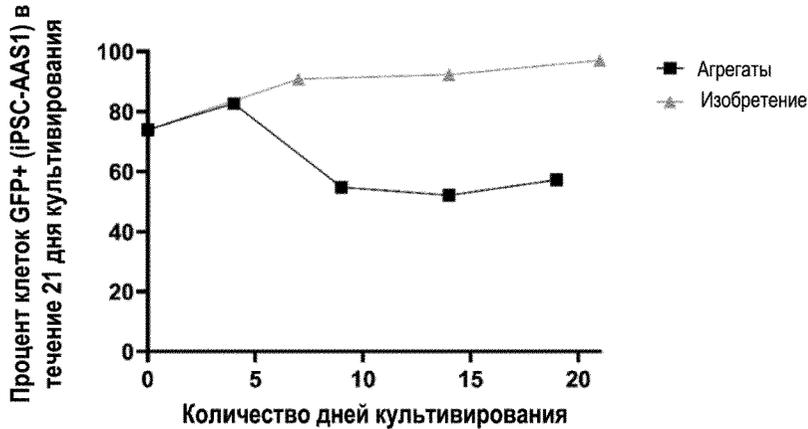
Процент клеток GFP- (iPSC-GHE) с течением времени



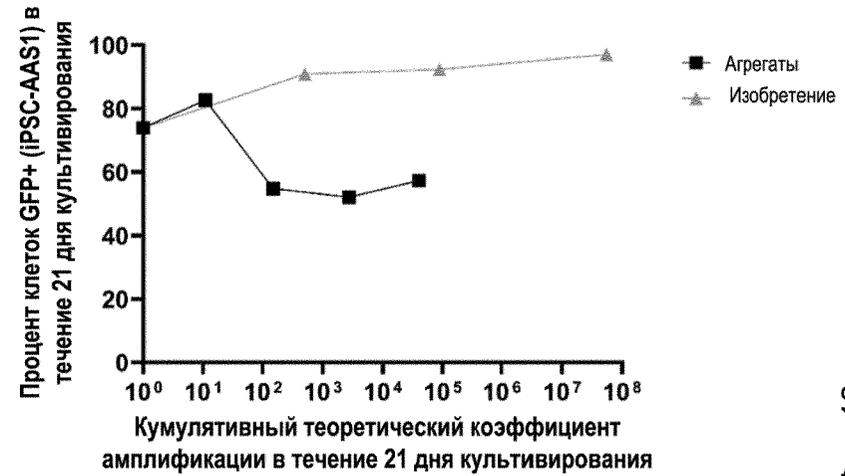
Процент клеток GFP- (iPSC-GHE) с течением времени

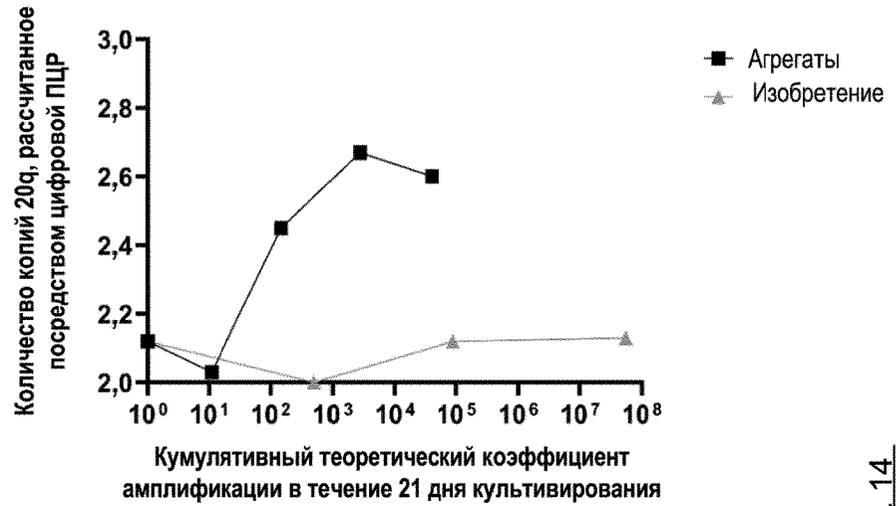
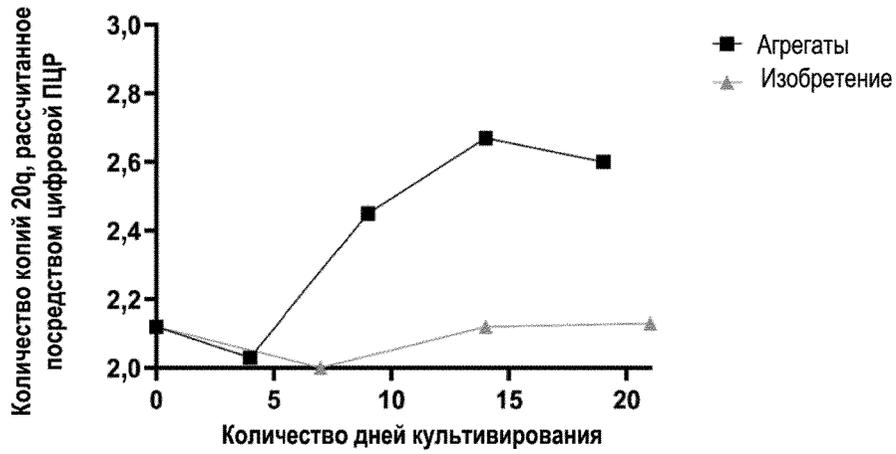
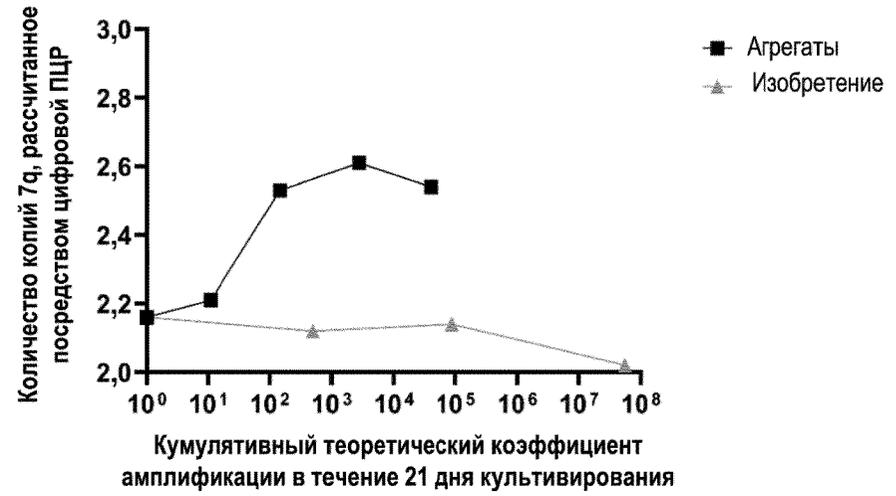
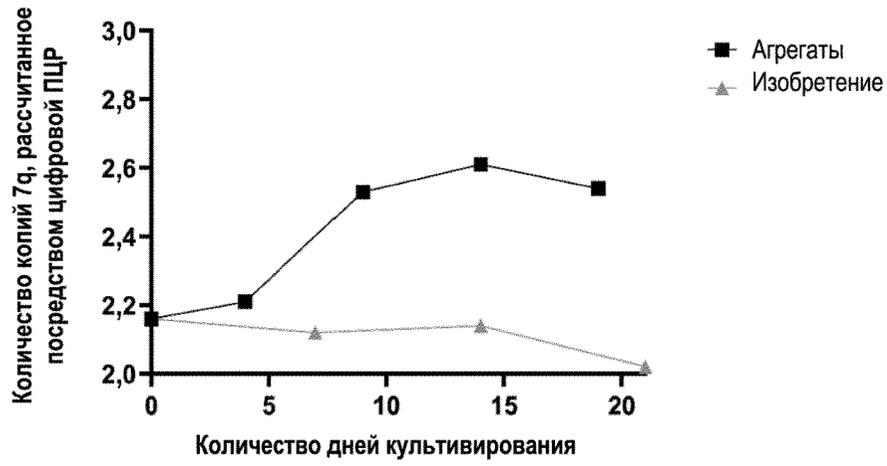


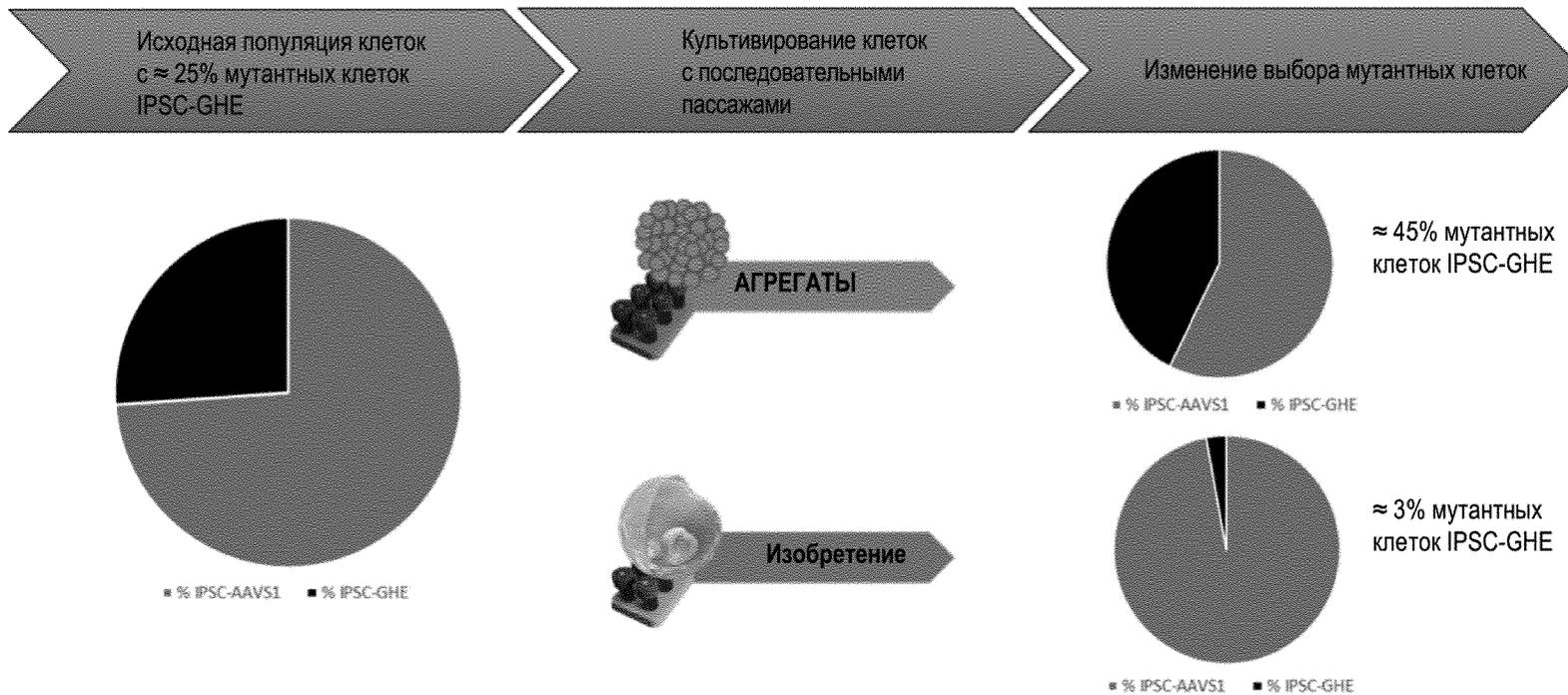
Процент клеток GFP+ (iPSC-AAS1) с течением времени



Процент клеток GFP+ (iPSC-AAS1) с течением времени







Фиг. 15