

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393220 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.03.29

(51) Int. Cl. C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01)
A61L 27/20 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.06.16

(54) КРУПНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ МИКРОКОМПАРТМЕНТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ МНОЖЕСТВО ЦИСТ

(31) FR2106403; FR2114709

(32) 2021.06.16; 2021.12.31

(33) FR

(86) PCT/EP2022/066498

(87) WO 2022/263601 2022.12.22

(71) Заявитель:

ТРИФРОГ ТЕРАПЬЮТИКС (FR)

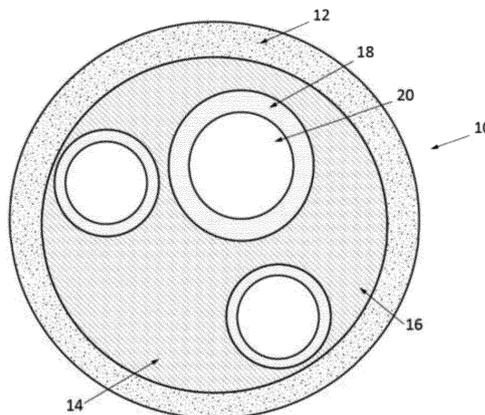
(72) Изобретатель:

Фейе Максим, Леонард Андреа, Коэн
Филипп (FR)

(74) Представитель:

Нагорных И.М. (RU)

(57) Изобретение относится к трехмерному клеточному микрокомпарменту или узлу трехмерных клеточных микрокомпарментов овоидальной, цилиндрической, сфероидальной или сферической формы или по существу овоидальной, цилиндрической, сфероидальной или сферической формы, содержащему внешний гидрогелевый слой, образующий внутреннюю часть (14), причем упомянутая внутренняя часть содержит по меньшей мере элементы внеклеточного матрикса и по меньшей мере две цисты, причем каждая циста образована по меньшей мере одним слоем клеток человека или животного, организованных трехмерно вокруг просвета, при этом наименьший радиус или средний радиус внутренней части составляет по меньшей мере 100 мкм. Изобретение также относится к способу производства такого микрокомпармента или узла микрокомпарментов.



A1

202393220

202393220

A1

Крупные клеточные микрокомпартменты, содержащие множество цист

Область техники

Изобретение относится к трехмерной культуре клеток эпителиального типа, таких как плюрипотентные стволовые клетки.

5 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 дифференцированные клетки с разными фенотипами, клетки-предшественники и стволовые клетки. Значительным достижением в методах культивирования клеток является внедрение трехмерных систем культивирования.

10

Действительно, трехмерные культуры ближе к естественным системам *in vivo*, что является преимуществом, и имеют много способов применения, в частности при разработке видов терапии. Особенно подходящая технология описана в заявке WO2018/096277 и состоит из трехмерных клеточных микрокомпартментов для культивирования стволовых клеток.

15

Тем не менее, несмотря на их эффективность, существующие 3D-системы культивирования все еще имеют ограничения с точки зрения выхода и темпа роста клеток, не позволяющие приблизиться к скоростям экспансии и продолжительностям цикла *in vivo* при сохранении стабильного эпителиального фенотипа.

20

Цель настоящего изобретения состоит в том, чтобы предложить раствор трехмерной клеточной культуры, удовлетворяющий всем этим потребностям и преодолевающий недостатки и ограничения предшествующего уровня техники с получением более большой в количественном отношении и вместе с тем по меньшей мере равной в качественном отношении культуры.

Изложение сущности изобретения

25

В процессе разработки клеточных микрокомпартментов для 3D-культуры эпителиальных клеток или клеток, имеющих морфологию эпителиального типа и способных образовывать цисты, таких как плюрипотентные стволовые клетки, авторы изобретения разработали систему, которая позволяет увеличивать максимальное количество клеток, содержащихся в микрокомпартменте, образованном вокруг просвета (цисты), при сохранении эпителиального фенотипа

30

В соответствии с изобретением поддержание слабого высева клеток делает возможным увеличение коэффициента амплификации между высевом клеток в микрокомпартменте и сбором в микрокомпартменте, содержащем амплифицированные клетки. В существующих системах микрокомпартменты, содержащие несколько клеток во время высева (в частности, от 1 до 3), начинают или перезапускают свой рост с показателем задержки, который неблагоприятно сказывается на выходе культуры и увеличивает необходимое время культивирования с инкапсуляцией.

В соответствии с изобретением эти проблемы связаны, в частности, с микрокомпартаментами, размер которых слишком мал, и, в частности, с микрокомпартаментами, в которых объем внутренней части слишком мал.

5 Таким образом, изобретение относится к трехмерному клеточному микрокомпарменту с внешним слоем и внутренней частью, причем его внутренняя часть имеет достаточно большие размеры, чтобы обеспечивать высокий темп роста и большое количество клеток на момент сбора в микрокомпарменте, начиная с низкого начального высева клеток.

10 В частности, изобретение нацелено на трехмерный микрокомпармент овоидальной, цилиндрической, сфероидальной или сферической формы или по существу овоидальной, цилиндрической, сфероидальной или сферической формы, содержащий внешний гидрогелевый слой, образующий внутреннюю часть, причем упомянутая внутренняя часть содержит по меньшей мере:

- элементы внеклеточного матрикса и

- по меньшей мере две цисты, при этом каждая циста образована по меньшей мере одним слоем клеток, организованных трехмерно вокруг просвета,

15 причем наименьший радиус внутренней части микрокомпармента составляет по меньшей мере 100 мкм, предпочтительно по меньшей мере 200 мкм.

Клетки каждого слоя клеток, организованных трехмерно вокруг просвета, представляют собой клетки, способные образовывать цисту, т. е. поляризованные клетки с базальной поверхностью, способной образовывать плотные соединения и экспрессировать подокаликсин на апикальной поверхности (обращенной к просвету цисты). Они находятся в конкретных эпителиальных клетках или клетках, имеющих морфологию эпителиального типа человека или животного. Клетки каждого слоя клеток, организованных трехмерно вокруг просвета, предпочтительно выбраны из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) и следующих клеток: клеток железистого эпителия (например, молочной железы или слюнной железы), почечных эпителиальных клеток, эпителиальных клеток кишечника (энтероцитов), эпителиальных клеток кожи (кератиноцитов), клеток пигментного эпителия сетчатки, эпикардиальных клеток и эндокардиальных клеток.

Преимуществом является то, что такая система, в частности наличие по меньшей мере двух цист, позволяет увеличивать максимальное количество клеток, содержащихся в микрокомпарменте, при сохранении эпителиального фенотипа вокруг просвета (цисты). Размер микрокомпармента согласно изобретению выбран таким образом, чтобы обеспечивать рост нескольких цист при сохранении расстояния диффузии, совместимого с физиологией клеток.

Изобретение также относится к трехмерному узлу клеточных микрокомпарментов, содержащему по меньшей мере один клеточный микрокомпармент согласно изобретению, предпочтительно в жидкой суспензии в биореакторе.

35 Микрокомпарменты согласно изобретению могут быть полезны для различных способов применения и, в частности, для профилактики и/или лечения патологий.

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

- (а) инкубацию клеток в культуральной среде, предпочтительно в культуральной среде, содержащей по меньшей мере один цитопротекторный фактор, в частности ингибитор апоптоза и/или киназ Rho/A,
- 5 - (b) смешивание клеток с этапа (а) с элементами внеклеточного матрикса, в частности биологического или синтетического внеклеточного матрикса,
- (с) инкапсуляцию суспензии клеток в гидрогелевом слое для образования микрокомпартмента овоидальной, цилиндрической, сфероидальной или сферической формы или по существу овоидальной, цилиндрической, сфероидальной или сферической формы, содержащего внешний гидрогелевый слой,
- 10 образующий внутреннюю часть, причем наименьший радиус упомянутой внутренней части составляет по меньшей мере 100 мкм;
- (d) культивирование полученных микрокомпартментов в изотоническом промывочном буфере, предпочтительно в течение менее 30 минут, затем в культуральной среде, предпочтительно в культуральной среде, содержащей по меньшей мере один цитопротекторный фактор, в частности
- 15 ингибитор апоптоза и/или киназ Rho/A;
- (е) предпочтительно промывание микрокомпартментов для удаления цитопротекторного фактора (ингибитора апоптоза и/или киназ Rho/A), предпочтительно в течение 48 часов после инкапсуляции, еще более предпочтительно в течение 24 часов;
- (f) культивирование микрокомпартментов в течение по меньшей мере двух циклов клеточного
- 20 деления (амплификации), предпочтительно от 1 до 60 дней, от 1 до 30 дней, от 1 до 20 дней, еще более предпочтительно от 2 до 30 дней, от 2 до 20 дней, от 3 до 30 дней, от 3 до 20 дней, в частности от 4 до 7 дней, в частности от 5 до 7 дней, в культуральной среде без цитопротекторного фактора и
- (g) необязательно извлечение полученных клеточных микрокомпартментов.

Способ согласно изобретению позволяет получать микрокомпартменты согласно изобретению с по

25 меньшей мере двумя цистами.

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

Краткое описание фигур

[Фиг. 1a] представляет собой схему микрокомпартмента согласно изобретению, содержащего

30 несколько цист индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Эта схема представляет собой изображение микрокомпартмента, показанного на фотографии на Фиг. 1b.

[Фиг. 1b] представляет собой полученное посредством фазово-контрастной микроскопии изображение микрокомпартмента согласно изобретению.

[Фиг. 2a] представляет собой схему серии микрокомпартментов согласно изобретению.

35 [Фиг. 2b] представляет собой полученное посредством фазово-контрастной микроскопии изображение микрокомпартментов согласно изобретению.

[Фиг. 3a] представляет собой схему биореактора, содержащего серию микрокомпарментов согласно изобретению.

[Фиг. 3b] представляет собой изображение биореактора, содержащего серию микрокомпарментов согласно изобретению.

5 [Фиг. 4a] представляет собой схему слияния двух цист в микрокомпарменте согласно изобретению.

[Фиг. 4b] представляет собой изображение слияния двух цист в микрокомпарменте согласно изобретению.

[Фиг. 5] представляет собой отображение результатов тестов амплификации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в микрокомпарментах согласно изобретению.

10 Подробное описание изобретения

Определения

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

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

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 «эпителиальные клетки» или «клетки эпителиального типа» означают клетки человека или животного, связанные друг с другом межклеточными соединениями, структурирующими одиночный эпителий (кубовидный, призматический, плоский или псевдостратифицированный, т. е. слой близко расположенных клеток или смежных клеток, большинство которых контактирует с апикальной поверхностью и базолатеральной поверхностью слоя).

25 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.

30 В контексте изобретения «мутантная клетка» означает клетку, несущую по меньшей мере одну мутацию.

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

35 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, Tra-1-60 и Tra-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 эмбриональные стволовые клетки от людей могут
5 быть исключены.

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
10 индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC или hiPSC для человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток), эмбриональные стволовые клетки или клетки MUSE («мультилинейно-дифференцирующиеся, устойчивые к стрессу»).

В контексте изобретения «индуцированная плюрипотентная стволовая клетка» означает плюрипотентную стволовую клетку, индуцированную для превращения в плюрипотентную
15 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. 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
20 Biotechnol, 2008, 26(1): 101-106).

В контексте изобретения «клеточный слой» означает монослой клеток или эпителиальный слой.

В контексте изобретения «циста» означает трехмерную сферическую систему в виде монослоя клеток или в виде эпителиального слоя, окружающего центральный просвет.

«Диаметр Фере» по отношению к микрокомпарменту (или части микрокомпартамента) согласно
25 изобретению означает расстояние «d» между двумя касательными к упомянутому микрокомпарменту (или к упомянутой части), причем эти две касательные параллельны, так что вся проекция упомянутого микрокомпартамента (или упомянутой части) находится между этими двумя параллельными касательными. Диаметр Фере внутренней части микрокомпартамента измеряется между двумя
интерфейсами внутренней части и внешнего слоя микрокомпартамента, т. е. представляет собой
30 расстояние «d» между двумя касательными к упомянутой внутренней части, причем эти две касательные параллельны, так что вся проекция упомянутой внутренней части находится между этими двумя параллельными касательными.

В контексте изобретения «переменная толщина» слоя означает, что в отдельном микрокомпарменте слой не имеет одинаковой толщины по всей площади.

35 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 «мутация» означает генетическую или эпигенетическую мутацию, предпочтительно функциональную мутацию. Это может быть, в частности, точечная модификация генетической последовательности, структурный вариант, эпигенетическая модификация или модификация митохондриальной ДНК.

- 5 В контексте изобретения «функциональная мутация» означает передаваемую генетическую или эпигенетическую модификацию, которая обеспечивает приобретение или потерю функции или потенциальную потерю функции у рассматриваемой мутантной клетки. Это предпочтительно мутация, вызывающая модификацию фенотипа рассматриваемой мутантной клетки. Более предпочтительно это изменение геномной и/или эпигеномной последовательности, которое неблагоприятно влияет на терапевтический потенциал популяции клеток или посредством увеличения риска, связанного с проводимой терапией, или посредством уменьшения пользы, обеспечиваемой проводимой терапией.

В контексте изобретения «наибольший размер» микрокомпартамента, или кластера клеток, или слоя клеток означает значение наибольшего диаметра Фере упомянутого микрокомпартамента.

- 15 В контексте изобретения «наименьший размер» микрокомпартамента или слоя клеток означает значение наименьшего диаметра Фере упомянутого микрокомпартамента.

- В контексте изобретения «ткань» или «биологическая ткань» имеет 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 функцию. Биологические ткани регулярно регенерируются и объединяются с образованием органов.

- 25 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.

«Наименьший радиус» внутренней части микрокомпартамента согласно изобретению означает половину значения наименьшего диаметра Фере внутренней части микрокомпартамента.

- 30 «Средний радиус» внутренней части микрокомпартамента согласно изобретению означает среднее значение радиусов наименьшего компартамента, причем каждый радиус соответствует половине значения диаметра Фере внутренней части микрокомпартамента.

Клеточные микрокомпарменты

- Таким образом, объект изобретения представляет собой трехмерный микрокомпармент 10 овоидальной, цилиндрической, сфероидальной или сферической формы или по существу овоидальной, цилиндрической, сфероидальной или сферической формы, содержащий внешний гидрогелевый слой 12, образующий внутреннюю часть 14, причем упомянутая внутренняя часть 14 содержит по меньшей мере:

- элементы 16 внеклеточного матрикса и

- по меньшей мере две цисты, при этом каждая циста образована по меньшей мере одним слоем клеток 18, организованных трехмерно вокруг просвета 20.

Предпочтительно микрокомпартмент отличается тем, что наименьший радиус внутренней части 14 составляет по меньшей мере 100 мкм, предпочтительно по меньшей мере 200 мкм, в частности от 200 до 400 мкм.

Микрокомпартмент согласно изобретению содержит внешний гидрогелевый слой. Предпочтительно используемый гидрогель является биосовместимым, то есть нетоксичным для клеток. Внешний гидрогелевый слой должен обеспечивать диффузию кислорода и питательных веществ, чтобы снабжать клетки, содержащиеся в микрокомпартменте, и обеспечивать им выживаемость. Согласно одному варианту осуществления, внешний гидрогелевый слой содержит по меньшей мере альгинат. Он может состоять исключительно 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%. Внешний гидрогелевый слой не содержит клеток.

Внешний гидрогелевый слой позволяет, в частности, защитить клетки от внешней среды и ограничить неконтролируемую пролиферацию клеток и их дифференциацию в случае дифференциации.

Средняя толщина внешнего слоя 12 может быть переменной. Она предпочтительно составляет от 5 до 100 мкм, более предпочтительно от 20 до 60 мкм. Соотношение между наименьшим радиусом внутренней части 14 и этой толщиной предпочтительно составляет от 2 до 10.

Наличие внешнего гидрогелевого слоя и элементов внеклеточного матрикса (предпочтительно внеклеточного матрикса) обеспечивает равномерное распределение клеток между микрокомпартментами. Более того, этот внешний гидрогелевый слой позволяет предотвратить слияние микрокомпартментов, причем такие слияния являются основным источником вариативности, которая является неблагоприятной для фенотипической однородности клеток.

Таким образом, внутренняя часть 14 внутри внешнего гидрогелевого слоя содержит по меньшей мере:

- элементы 16 внеклеточного матрикса предпочтительно в форме изотонического раствора, содержащего элементы внеклеточного матрикса, в частности биологического или синтетического внеклеточного матрикса, такого как, например, Matrigel®, и

- по меньшей мере две цисты, причем каждая циста образована по меньшей мере одним слоем клеток 18, организованных трехмерно вокруг просвета 20.

Элементы внеклеточного матрикса предпочтительно содержат пептидные или пептидомиметические последовательности, способные связываться с интегринами. Они предпочтительно расположены в слое между цистами клеток и внешним гидрогелевым слоем 12. Эти элементы внеклеточного матрикса были предпочтительно добавлены во время производства микрокомпартмента, и/или они были добавлены в микрокомпартмент впоследствии, и/или они были секретированы или индуцированы другими компонентами микрокомпартмента.

Элементы внеклеточного матрикса предпочтительно содержат смесь внеклеточных белков и соединений, необходимых для культивирования и амплификации клеток. Предпочтительно элементы внеклеточного матрикса содержат 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 внутренняя часть 14 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. Наличие элементов внеклеточного матрикса способствует адгезии первоначально инкапсулированных клеток и обеспечивает получение и сохранение в микрокомпарменте по меньшей мере двух отдельных источников клеток, которые не встречаются друг с другом, чтобы каждый из них образовал цисту.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления внутренняя часть 14 содержит внеклеточный матрикс.

Если микрокомпармент содержит внеклеточный матрикс во внутренней части 14, это может быть внеклеточный матрикс, секретируемый клетками, присутствующими в микрокомпарменте, и/или внеклеточный матрикс, добавленный во время получения/производства микрокомпармента.

В соответствии с одним вариантом осуществления раствор, содержащий элементы внеклеточного матрикса, в частности, если он представляет собой натуральный (биологический) или синтетический внеклеточный матрикс, может образовывать гель.

На поверхности раствора, содержащего элементы внеклеточного матрикса (предпочтительно натурального или синтетического внеклеточного матрикса) в контакте со слоем клеток, раствор, содержащий элементы внеклеточного матрикса (предпочтительно натурального или синтетического внеклеточного матрикса), может необязательно содержать одну или более клеток.

Предпочтительно раствор, содержащий элементы внеклеточного матрикса (предпочтительно натурального или синтетического внеклеточного матрикса), 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).

Раствор, содержащий элементы внеклеточного матрикса (предпочтительно натурального или синтетического внеклеточного матрикса), с такими значениями модуля Юнга позволяют улучшить поддержание клеточного фенотипа и геномной целостности клеток, содержащихся в данном промежуточном слое, во время клеточных делений.

Кроме того, такие значения модуля Юнга (эластичности) способствуют адгезии первоначально инкапсулированных клеток и обеспечивают получение и сохранение в микрокомпарменте по меньшей мере двух отдельных источников клеток, которые не встречаются друг с другом, чтобы каждый из них образовал цисту. Вязкость раствора, содержащего элементы внеклеточного матрикса (преимущественно натурального или синтетического внеклеточного матрикса), также способствует

адгезии первоначально инкапсулированных клеток и обеспечивает получение и сохранение в микрокомпарменте по меньшей мере двух отдельных источников клеток, которые не встречаются друг с другом, чтобы каждый из них образовал цисту.

5 Внутренняя часть 14 может также содержать жидкие зоны без элементов внеклеточного матрикса. Эти жидкие зоны возникают в результате уравнивания посредством диффузии жидкостей, присутствующих во время культивирования (начального высева и изменения/обновления любой среды). Эта жидкая зона предпочтительно состоит главным образом из культуральной среды. Преимущественно внешний слой микрокомпармента сохраняет (по меньшей мере частично) факторы и элементы, секретлируемые клетками вблизи упомянутых клеток, что усиливает паракринные и аутокринные эффекты внутри микрокомпармента.

10 Внутренняя часть 14 микрокомпармента согласно изобретению содержит по меньшей мере две цисты, причем каждая циста образована по меньшей мере одним слоем клеток 18, организованных трехмерно вокруг просвета 20.

15 Каждая циста образована по меньшей мере одним слоем клеток, организованных трехмерно вокруг просвета, причем эти клетки человека или животного предпочтительно исключают человеческие эмбриональные стволовые клетки. Эти клетки представляют собой клетки, способные образовывать цисту, т. е. поляризованные клетки с базальной поверхностью, способной образовывать плотные соединения и экспрессировать подокаликсин на апикальной поверхности (обращенной к просвету цисты). В предпочтительном варианте осуществления каждая циста образована по меньшей мере

20 одним слоем эпителиальных клеток или клеток, имеющих морфологию эпителиального типа. В предпочтительном варианте осуществления клетки каждого слоя 18 представляют собой эпителиальные клетки или клетки, имеющие морфологию эпителиального типа и способные образовывать цисту.

25 Предпочтительно каждая циста образована по меньшей мере одним слоем клеток человека или животного, организованных трехмерно вокруг просвета, выбранных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) и следующих клеток: клеток железистого эпителия (например, молочной железы или слюнной железы), почечных эпителиальных клеток, эпителиальных клеток кишечника (энтероцитов), эпителиальных клеток кожи (кератиноцитов), клеток пигментного эпителия сетчатки, эпикардиальных клеток и эндокардиальных клеток.

30 «Плюрипотентная стволовая клетка» или «плюрипотентная клетка» относится к клетке, которая обладает способностью образовывать все ткани, присутствующие во всем организме определенного вида, однако не способна образовывать целый организм как таковой. Плюрипотентные стволовые клетки могут, в частности, представлять собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS), клетки MUSE («мультилинейно-дифференцирующиеся, устойчивые к стрессу»), которые

35 обнаруживаются в коже и костном мозге взрослых млекопитающих, или эмбриональные стволовые клетки (ES).

Предпочтительно клетки, составляющие каждую цисту, поляризованы. Полярность этих клеток внутри каждой цисты может быть продемонстрирована посредством белков TJP-1 или ZO-1, оба из которых

расположены на внутренней/апикальной поверхности слоя плюрипотентных клеток, который примыкает к просвету.

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.

Микрокомпартмент согласно изобретению может содержать по меньшей мере 80, предпочтительно по меньшей мере 800, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 5000, в частности, по меньшей мере
10 8000 клеток, причем эти клетки организованы в форме по меньшей мере двух цист.

Каждая циста, образованная по меньшей мере одним слоем клеток в пределах микрокомпартмента, является полый, т. е. содержит отверстие или просвет. Просвет предпочтительно генерируется в момент образования цисты посредством секреции клетками подокаликсина.

Полость каждой цисты может содержать жидкость, в частности культуральную среду и/или жидкость, секретируемую клетками. Преимущество состоит в том, что наличие этой полый части позволяет
15 клеткам иметь небольшой диффузионный объем, состав которого они могут контролировать, что способствует клеточной коммуникации. Более того, внутренняя часть 14 находится в равновесии с окружающей средой, внешней по отношению к микрокомпартменту, но может быть обогащена посредством действия метаболитических и/или секретируемых элементов на клетках, что является
20 преимуществом.

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

Преимущественно наличие нескольких цист в одном и том же микрокомпартменте позволяет улучшить воспроизводимость процесса инкапсуляции и, таким образом, воспроизводимость партий клеток, улучшает выживаемость при инкапсуляции и улучшает амплификацию на единицу времени.

30 Микрокомпартмент также может содержать, в дополнение к цистам, клетки в суспензии в микрокомпартменте.

В соответствии с одним вариантом осуществления каждая циста, присутствующая в микрокомпартменте, была получена посредством инкапсуляции во внутренней части 14 микрокомпартментов: от 1 до 30 клеток, предпочтительно от 1 до 10, в частности от 2 до 30 или от 3 до
35 30, в частности от 2 до 10 или от 3 до 10, более предпочтительно от 1 до 5, еще более предпочтительно от 2 до 5 или от 3 до 5, предпочтительно по меньшей мере 4 клеток, а наименьший радиус внутренней части 14 составляет по меньшей мере 100 мкм, предпочтительно по меньшей мере 200 мкм.

Инкапсуляция контролируемой концентрации клеток в большой капсуле (с наименьшим радиусом внутренней части микрокомпартамента по меньшей мере 100 мкм) способствует получению по меньшей мере двух цист в микрокомпарменте. Сложно получить две цисты с отдельной клеткой, и предпочтительно инкапсулировать по меньшей мере 2 клетки, предпочтительно по меньшей мере 3, еще более предпочтительно по меньшей мере 4, во внутренней части 14 микрокомпарментов. Инкапсуляция начального количества клеток более 30 является возможной, но менее благоприятной, поскольку сложно или даже невозможно (вероятность снижается) получить две цисты с более чем 20/25% объема клеток во внутренней части во время инкапсуляции, в частности, поскольку это ограничивает способность амплификации в 4 раза, что является неблагоприятным для производства партий клеток. В соответствии с настоящим изобретением предпочтительно наличие по меньшей мере двух отдельных источников клеток, которые не встречаются друг с другом, чтобы каждый из них образовал цисту.

Клетки, присутствующие в микрокомпарменте согласно изобретению, были предпочтительно 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 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 предпочтительно по меньшей мере 2 клеток, предпочтительно по меньшей мере 3, еще более предпочтительно по меньшей мере 4, в частности от 2 до 30 клеток. Например, клетки, присутствующие в микрокомпарменте, были получены после по меньшей мере шести циклов клеточного деления после инкапсуляции клеток во внешний гидрогелевый слой.

Предпочтительно количество клеточных делений для реализации способа согласно изобретению составляет менее 300, еще более предпочтительно менее 200.

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 микрокомпартамента, в котором они инкапсулированы, более предпочтительно менее 40%, 30%, 20%, 10% объема микрокомпартамента, в котором они инкапсулированы.

Таким образом, согласно одному варианту осуществления, клетки, присутствующие в микрокомпарменте 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 клетки (клеток) объемом менее 50% объема микрокомпартамента, в котором она (они) инкапсулирована (-ы), более предпочтительно менее 40%, 30%, 20%, 10% объема микрокомпартамента, в котором она (они) инкапсулирована (-ы).

5 Предпочтительно в микрокомпартаменте согласно изобретению объем клеток составляет более 50% относительно объема микрокомпартамента, еще более предпочтительно более 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% относительно объема микрокомпартамента.

В микрокомпартаменте согласно изобретению объем внутренней части 14 предпочтительно составляет по меньшей мере 20% от общего объема микрокомпартамента, предпочтительно по меньшей мере 40%. Это позволяет размещать больше клеток после амплификации, следовательно, получать больше цист и/или более крупные цисты.

Толщина слоя клеток, образующих каждую цисту, предпочтительно составляет от 6 до 200 мкм, более предпочтительно от 6 до 60 мкм.

В соответствии с вариантом осуществления, показанным на Фиг. 4а и Фиг. 4б, по меньшей мере две цисты могут сливаться друг с другом. В этом случае микрокомпартамент согласно изобретению 15 содержит по меньшей мере одну цисту, образующуюся в результате слияния двух цист.

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

20 Микрокомпартамент согласно изобретению может иметь любую трехмерную форму, то есть он может иметь форму любого объекта в пространстве. Микрокомпартамент может иметь любую форму, совместимую с инкапсуляцией клеток. Предпочтительно микрокомпартамент согласно изобретению имеет сферическую или удлиненную либо по существу сферическую или удлиненную форму. Он может иметь форму овоида, цилиндра, сфероида или сферы либо по существу такую форму.

25 Именно внешний слой микрокомпартамента, то есть гидрогелевый слой, придает размер и форму микрокомпартамента согласно изобретению. Предпочтительно наименьший размер микрокомпартамента согласно изобретению составляет от 202 мкм до 1 мм, предпочтительно от 202 мкм до 700 мкм, еще более предпочтительно от 202 мкм до 600 мкм, в частности от 202 мкм до 500 мкм.

30 Его наибольший размер предпочтительно составляет более 202 мкм, более предпочтительно от 202 мкм до 1 м, еще более предпочтительно от 202 мкм до 50 см.

Изобретение также относится ко множеству микрокомпартаментов, собранных вместе.

Изобретение также относится к узлу или серии микрокомпартаментов, содержащим по меньшей мере два трехмерных клеточных микрокомпартамента, характеризующихся тем, что по меньшей мере один микрокомпартамент представляет собой микрокомпартамент согласно изобретению.

35 Предпочтительно серия микрокомпартаментов согласно изобретению находится в культуральной среде, в частности по меньшей мере частично в конвективной культуральной среде. Можно использовать любую культуральную среду, подходящую для культивирования клеток, и, в частности, фосфатно-

солевой буферный раствор, такой как, например, «модифицированная по способу Дульбекко среда Игла» или «среда Мемориального института Роуэлла Парка», при условии, что концентрация растворенных солей совместима с поддержанием поперечного сшивания альгината посредством двухвалентных катионов.

- 5 Согласно особенно подходящему варианту осуществления, объектом изобретения является серия клеточных микрокомпарментов в закрытой камере, такой как биореактор, предпочтительно в культуральной среде в закрытой камере, такой как биореактор. Таким образом, предпочтительно, чтобы микрокомпарменты располагались в культуральной среде в закрытом биореакторе.

Узел или серия микрокомпарментов согласно изобретению предпочтительно содержит от 2 до 10^{16} микрокомпарментов.

Микрокомпарменты согласно изобретению можно применять для всех целей, в частности в качестве лекарственного средства при клеточной терапии у людей или животных.

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

15 Способ получения микрокомпарментов согласно изобретению

Изобретение также относится к способу получения микрокомпарментов согласно изобретению.

Способ получения микрокомпармента или узла микрокомпарментов согласно изобретению может включать следующие этапы:

- 20 - (a) инкубацию клеток человека или животного в культуральной среде, содержащей по меньшей мере один цитопротекторный фактор, в частности ингибитор апоптоза и/или киназ Rho/A,
- (b) смешивание клеток с этапа (a) с элементами внеклеточного матрикса, в частности биологического или синтетического внеклеточного матрикса,
- 25 - (c) инкапсуляцию суспензии клеток в гидрогелевом слое с образованием микрокомпармента овоидальной, цилиндрической, сфероидальной или сферической формы или по существу овоидальной, цилиндрической, сфероидальной или сферической формы, содержащего внешний гидрогелевый слой, образующий внутреннюю часть, причем наименьший радиус или средний радиус упомянутой внутренней части составляет по меньшей мере 100 мкм;
- 30 - (d) культивирование полученных микрокомпарментов в изотоническом промывочном буфере, предпочтительно в течение менее 30 минут, затем в культуральной среде, предпочтительно в культуральной среде, содержащей по меньшей мере один цитопротекторный фактор, в частности ингибитор апоптоза и/или киназ Rho/A;
- (e) предпочтительно промывание микрокомпарментов для удаления цитопротекторного фактора (ингибитора апоптоза и/или киназ Rho/A), предпочтительно в течение 48 часов после инкапсуляции, еще более предпочтительно в течение 24 часов;
- 35 - (f) культивирование микрокомпарментов в течение по меньшей мере двух циклов клеточного деления (амплификации), предпочтительно от 1 до 20 дней, еще более предпочтительно от 2 до 10 дней,

в частности от 5 до 7 дней, в культуральной среде без цитопротекторного фактора (ингибитора апоптоза и/или киназ Rho/A) и

- (g) необязательно извлечение полученных клеточных микрокомпартментов.

Количество клеток, инкапсулированных в каждом микрокомпартменте на этапе с), предпочтительно составляет от 1 до 30 клеток, в частности от 2 до 30 или от 3 до 30, предпочтительно от 1 до 10, в частности от 2 до 10 или от 3 до 10, более предпочтительно от 1 до 5, еще более предпочтительно от 2 до 5 или от 3 до 5, предпочтительно по меньшей мере 4 клетки. Инкапсуляция контролируемой концентрации клеток в большой капсуле (с наименьшим радиусом внутренней части микрокомпартмента по меньшей мере 100 мкм) способствует получению по меньшей мере двух цист в микрокомпартменте. Сложно получить две цисты с отдельной клеткой, и предпочтительно инкапсулировать по меньшей мере 2 клетки, предпочтительно по меньшей мере 3, еще более предпочтительно по меньшей мере 4, во внутренней части 14 микрокомпартментов. Инкапсуляция начального количества клеток более 30 является возможной, но менее благоприятной, поскольку сложно или даже невозможно (вероятность снижается) получить две цисты с более чем 20/25% объема клеток во внутренней части во время инкапсуляции, в частности, поскольку это ограничивает способность амплификации в 4 раза, что является неблагоприятным для производства партий клеток. В соответствии с настоящим изобретением предпочтительно наличие по меньшей мере двух отдельных источников клеток, которые не встречаются друг с другом, чтобы каждый из них образовал цисту.

Может быть использована любая культуральная среда, подходящая для культивирования клеток, в частности плюрипотентных стволовых клеток, и, в частности, фосфатно-солевой буферный раствор, такой как, например, «среда Мемориального института Роуэлла Парка», или Mtestr1, или E8 Essential.

Цитопротекторный фактор может, например, представлять собой один или более ингибиторов сигнальных путей RHO/ROCK («Rho-ассоциированная протеинкиназа»), и/или ингибитор апоптоза, известный специалисту в данной области, или любой другой цитопротекторный фактор, известный специалисту в данной области. Цитопротекторный фактор должен способствовать выживанию клеток, а в случае наличия внеклеточного матрикса, адгезии клеток к внеклеточному матриксу во время формирования внешнего гидрогелевого слоя вокруг упомянутого внеклеточного матрикса.

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

Способ согласно изобретению может включать до осуществления этапа а) или б) этап диссоциации клеток посредством химической, ферментативной или механической диссоциации. Этот этап наиболее предпочтительно необходим, поскольку клетки эпителиального типа, в частности стволовые клетки, являются адгезивными клетками.

Инкапсулированные клетки суспендируют в форме отдельных клеток и/или кластеров или узла (узлов) из по меньшей мере двух клеток («кластер (-ы)»). Предпочтительно при наличии по меньшей мере 3 клеток количество отдельной (-ых) клетки (-ок) составляет менее 50% количества всех клеток,

первоначально инкапсулированных на этапе (b). Действительно, предпочтительно инкапсулировать кластеры клеток, поскольку это уменьшает деформации при сегрегации хромосом и неправильные сегрегации хромосом и, следовательно, уменьшает возникновение новых мутагенов и способствует поддержанию геномной целостности клеток, поскольку выделенные клетки подвержены риску смерти в результате отсутствия взаимодействия клеток, а полная диссоциация клеток приводит к повышению частоты генетических аномалий.

Предпочтительно каждый кластер клеток, первоначально инкапсулированный на этапе (c), имеет наибольший размер, составляющий менее 20% наибольшего размера микрокомпартамента, в котором он инкапсулирован, еще более предпочтительно менее 10%. Действительно, 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 преждевременной клеточной конфлюэнтности в капсуле; такая преждевременная конфлюэнтность всей или части капсул может привести к увеличению внутриклеточного давления и привести к клеточному стрессу, влияющему на клеточный рост, а также на хромосомную сегрегацию.

Способ согласно изобретению включает этап b) смешивания клеток с внеклеточным матриксом между этапом a) и этапом c). В соответствии с одним вариантом осуществления этот этап b) может быть необязательно реализован до этапа (a) или в противном случае одновременно с инкапсуляцией на этапе (c).

Этап инкапсуляции c) осуществляется в соответствии с методиками, известными специалисту в данной области. Действительно, любой способ получения клеточных микрокомпарментов, содержащих внеклеточный матрикс и клетки внутри гидрогелевой капсулы, может быть использован для реализации способа получения согласно изобретению. В частности, можно получать микрокомпарменты посредством адаптации способа и микрожидкостного устройства, описанного в Alessandri *et al.*, 2016 (“*A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC)*”, Lab on a Chip, 2016, vol. 16, no. 9, pp. 1593–1604), в соответствии с этапами, описанными ниже.

Предпочтительно этап c) реализуется в устройстве, способном генерировать гидрогелевые капсулы с помощью микрожидкостного чипа. Например, устройство может содержать шприцевые насосы для нескольких растворов, которые концентрически вводят с помощью микрожидкостного инжектора, что позволяет сформировать струю, которая разбивается на капли, которые затем собирают в кальциевой бане. В соответствии с особенно подходящим вариантом осуществления два или три раствора загружают в два или три шприцевых насоса:

- раствор гидрогеля, например альгинат,
- необязательно изотонический промежуточный раствор, предпочтительно изотонический раствор, не содержащий двухвалентных катионов, таких как Ca^{2+} или Mg^{2+} , во избежание чрезмерно преждевременного поперечного сшивания гидрогеля в инжекторе, такой как, например, раствор сорбитола,

раствор, поступающий с этапа b), содержащий клетки, культуральную среду и внеклеточный матрикс.

Три раствора совместно вводят (одновременно вводят) концентрически посредством микрожидкостного инжектора или микрожидкостного чипа, что позволяет сформировать струю, которая разбивается на капли, внешний слой которых представляет собой раствор гидрогеля и сердцевина которых представляет собой раствор с этапа b), содержащий клетки; эти капли собирают в кальциевой бане, что обеспечивает поперечное сшивание и/или преобразование раствора альгината в гель с образованием оболочки.

Для улучшения монодисперсности клеточных микрокомпарментов раствор гидрогеля предпочтительно заряжается постоянным током (от 1 до 10 кВ). Кольцо заземления может быть необязательно расположено на расстоянии от 1 мм до 20 см от наконечника, предпочтительно от 3 мм до 10 см, еще более предпочтительно от 1 см до 5 см от наконечника, в плоскости, перпендикулярной оси струи, выходящей из микрожидкостного инжектора (коэкструзионного чипа), для создания электрического поля.

Предпочтительно раствор выдерживают при температуре ниже 4 °С перед введением, чтобы предотвратить гелеобразование раствора из-за наличия элементов внеклеточного матрикса.

Согласно изобретению необходимо генерировать капсулы, внутренняя часть которых имеет средний радиус или меньший радиус по меньшей мере 100 мкм. Для генерирования капсул с такими размерами с помощью коэкструзионного чипа (микрожидкостного инжектора или микрожидкостного чипа) изобретение, в частности, предлагает модификацию скорости потока коэкструдированных растворов и конечного отверстия коэкструзионного чипа. «Скорость потока» означает скорость потока каждого раствора, поступающего в инжектор. «Конечное отверстие коэкструзионного чипа» означает внутреннее отверстие выпускного канала чипа.

- Для скорости потока: способ предпочтительно включает, для каждого коэкструдированного раствора для стандартных размеров капсул, известных из предшествующего уровня техники, от значения между 20 и 40 мл/ч до значения между 45 и 150 мл/ч, предпочтительно между 45 и 110 мл в час, для варианта изобретения.

- Для диаметра конечного отверстия коэкструзионного чипа (микрожидкостного инжектора): способ включает от значения предпочтительно между 50 и 120 мкм для стандартных размеров капсул, известных из предшествующего уровня техники, до значения диаметра между 150 и 300 мкм, предпочтительно между 180 и 240 мкм.

Таким образом, в соответствии с конкретным вариантом осуществления этап инкапсуляции (с) выполняют с использованием микрожидкостного инжектора, диаметр конечного отверстия которого составляет от 150 до 300 мкм, предпочтительно от 180 до 240 мкм, а скорость потока каждого из 3 растворов составляет от 45 до 150 мл/ч, предпочтительно от 45 до 110 мл/ч. В соответствии с одним вариантом осуществления эту инкапсуляцию выполняют посредством совместной инъекции трех растворов:

- раствора гидрогеля,
- промежуточного изотонического раствора, например раствора сорбитола,

- раствора, поступающего с этапа b), содержащего клетки, культуральную среду и внеклеточный матрикс,

концентрически через микрожидкостный инжектор, что позволяет сформировать на выходе инжектора струю, состоящую из смеси трех растворов, причем упомянутая струя разбивается на капли, при этом
 5 упомянутые капли собирают в кальциевой бане, которая придает жесткость раствору гидрогеля, с образованием внешнего слоя каждого микрокомпартамента, причем внутренняя часть каждой капли состоит из раствора, поступающего с этапа (b), содержащего клетки, культуральную среду и внеклеточный матрикс.

Очень предпочтительно, чтобы этапы (d), (e) и (f) выполняли при непрерывном или последовательном
 10 перемешивании. Это перемешивание важно, поскольку оно поддерживает гомогенность культуральной среды и предотвращает образование диффузионного градиента. Например, оно позволяет контролировать равномерный уровень клеточной оксигенации, избегая таким образом явлений некроза, связанного с гипоксией, или окислительного стресса, связанного с гипероксией. За счет предотвращения увеличения клеточной смертности и/или окислительного стресса перемешивание
 15 способствует поддержанию генетической целостности клеток.

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

Количество циклов клеточного деления на этапе (f) 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 способ согласно изобретению включает по меньшей мере одну
 25 реинкапсуляцию клеток после этапа (f), т.е. по меньшей мере два цикла инкапсуляции. Предпочтительно каждый цикл инкапсуляции соответствует пассажи. В этом варианте осуществления 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.

Каждая реинкапсуляция может включать:

- этап, который заключается в диссоциации микрокомпартамента или серии микрокомпартамента для получения суспензии клеток или суспензии кластеров клеток; внешний гидрогелевый слой может быть
 35 удален, в частности, посредством гидролиза, растворения, прокалывания и/или разрушения любыми биосовместимыми средствами, то есть средствами, которые не токсичны для клеток. 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 реинкапсуляции всех или части клеток или кластеров клеток в гидрогелевую капсулу. Реинкапсуляция является средством, подходящим для увеличения клеточной амплификации в результате прохождения этапа плюрипотентности, а также для снижения риска возникновения мутаций.

Реинкапсуляция заключается в удалении внешнего гидрогелевого слоя, предпочтительно в ресуспендировании, с частичной или полной диссоциацией клеток, которые находились в форме цист в микрокомпартаментах, и в повторной реализации этапов способа.

10 Согласно одному варианту осуществления реинкапсуляция включает следующие этапы:

- (i) удаление внешнего гидрогелевого слоя,

- (ii) ресуспендирование клеток, которые содержались в микрокомпарменте, для получения отдельных клеток и/или по меньшей мере одного узла или кластера клеток в культуральной среде, содержащей по меньшей мере один цитопротекторный фактор,

15 - (iii) смешивание клеток, поступающих с этапа (a), с элементами внеклеточного матрикса,

- (iv) инкапсуляция раствора клеток в гидрогелевом слое с образованием микрокомпартамента овоидальной, цилиндрической, сфероидальной или сферической формы или по существу овоидальной, цилиндрической, сфероидальной или сферической формы, содержащего внешний гидрогелевый слой, образующий внутреннюю часть, причем наименьший радиус или средний радиус упомянутой

20 внутренней части составляет по меньшей мере 100 мкм;

- (v) культивирование полученных микрокомпарментов в культуральной среде, содержащей по меньшей мере один цитопротекторный фактор, в частности ингибитор апоптоза и/или киназ Rho/A,

- (vi) предпочтительно промывание микрокомпарментов для удаления цитопротекторного фактора;

- (vii) культивирование микрокомпарментов в культуральной среде без цитопротекторного фактора для по меньшей мере одного цикла клеточного деления и

25

- (viii) необязательно извлечение полученных клеточных микрокомпарментов.

Компартментализация в микрокомпарменты позволяет удалить микрокомпарменты, содержащие больше мутировавших клеток, чем в других капсулах. Даже если мутировавшие клетки будут быстро расти, они достигнут конфлюэнтности в капсуле, что ограничит их размножение.

30 Компартментализация также позволяет не загрязнять всю популяцию клеток, а также удалять капсулы, содержащие мутантные клетки, в любое время, в частности перед этапом реинкапсуляции. Эту сортировку можно осуществлять, например, либо посредством встроенного анализа, либо посредством удаления капсул, которые заполняются быстрее, чем другие.

Согласно одному варианту изобретения инкапсулированные клетки представляют собой

35 дифференцированные клетки, которые репрограммированы в плюрипотентные клетки внутри гидрогелевой капсулы во время образования микрокомпарментов. Согласно одному варианту

репрограммирующие клетки агенты можно добавлять на этапе (a), и/или (b), и/или (c), и/или (d), и/или (ii), и/или (iii), и/или (iv), и/или (v). 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, обратно до стадии плюрипотентности. Специалист в данной области знает, как репрограммировать 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.*, 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”. Репрограммирующие агенты преимущественно инкапсулируют вместе с дифференцированными клетками, чтобы сконцентрировать продукт и обеспечить их контакт со всеми клетками. В случае, когда репрограммирующие агенты проникают в гидрогелевый слой, можно добавлять упомянутые агенты в культуральную среду после этапа инкапсуляции. Репрограммирующие агенты позволяют вызвать в клетках последовательность фенотипических изменений обратно до стадии плюрипотентности. Преимущество состоит в том, что этап репрограммирования выполняют с использованием специфических культуральных сред, 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 таизовивин и/или Y-27632, факторами роста фибробластов, такими как FGF-2, аскорбиновой кислотой и антибиотиками, такими как трихостатин А (C₁₇H₂₂N₂O₃). Затем культуральную среду заменяют средой, способствующей размножению плюрипотентных клеток, такой как среда mTeSR®1. Инкубацию на этапах (a) и/или (ii) выполняют предпочтительно в течение от нескольких минут до нескольких часов, предпочтительно от 2 минут до 2 часов, более предпочтительно от 10 минут до 1 часа.

Этап (d) и/или (v) культивирования с цитопротекторным фактором выполняют в течение от 2 до 48 часов, предпочтительно в течение от 6 до 24 часов, более предпочтительно в течение от 12 до 18 часов.

Этап промывки может быть выполнен посредством одной или более операций промывок в последовательных культуральных средах, не содержащих ингибиторов сигнального пути RHO/ROCK, спустя менее 48 часов, предпочтительно менее 24 часов, более предпочтительно от 12 до 18 часов, после начала этапа (d) и/или (v).

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. Температура во время пролиферации клеток предпочтительно должна составлять от 32 до 37 °С для предотвращения возникновения мутаций из-за снижения эффективности ферментов репарации.

5 Аналогичным образом предпочтительно температура должна быть низкой (в идеале примерно 4 °С), чтобы клетки выдерживали стресс на этапе (с).

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 некоторыми клетками, содержащимися 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 °С до -80 °С. Оттаивание можно выполнять на теплой водяной бане (предпочтительно 37 градусов), чтобы клетки оттаивали достаточно быстро. Микрокомпарменты согласно изобретению перед их применением можно хранить при температуре более 4 °С в течение ограниченного времени перед их применением, предпочтительно от 4 °С до 38 °С.

Вариант реализации способа согласно изобретению позволяет получать микрокомпарменты, содержащие по меньшей мере 80, предпочтительно по меньшей мере 800, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 5000, в частности по меньшей мере 8000 клеток, причем эти клетки организованы в форме по меньшей мере двух цист.

Преимущественно 3-мерная структура клеток в микрокомпарменте и низкий или даже нулевой процент клеток, изолированных во время инкапсуляции (большая часть клеток инкапсулируется в виде кластера клеток), уменьшают хромосомную десегрегацию и, следовательно, уменьшают новый мутагенез.

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

Защита клеток благодаря внешнему слою и наличию элементов внеклеточного матрикса уменьшает хромосомную десегрегацию и ограничивает механический стресс, воздействующий на клетки, и, следовательно, уменьшает новый мутагенез.

Преимущественно наличие нескольких цист в каждом микрокомпарменте также позволяет стимулировать начальную выживаемость клеток и сглаживает асинхронный рост.

Настоящее изобретение далее будет проиллюстрировано с использованием примера и результатов

На Фиг. 1a и 1b показаны полые гидрогелевые капсулы, обеспечивающие рост нескольких цист плюрипотентных стволовых клеток человека в центральном микрокомпарменте.

На Фиг. 2a и 2b показано изображение микроскопии в день 6,5 после инкапсуляции, демонстрирующее множество полых альгинатных капсул, содержащих плюрипотентные стволовые клетки человека.

Деление масштабной полоски соответствует 500 мкм. Микрокомпарменты согласно изобретению содержат несколько 3D колоний стволовых клеток. Все эти колонии имеют гомогенную конфигурацию цист со средним диаметром 170 мкм. В среднем на этой стадии культивирования наблюдались 2,6 колонии (цисты) на капсулу.

- 5 На Фиг. 3a и 3b показано множество состоящих из нескольких цист капсул, культивируемых в суспензии в биореакторе.

Ключевые параметры и результаты примера инкапсуляции согласно изобретению в биореакторе объемом 10 литров приведены в таблице 1 ниже.

[Таблица 1]

	Биореактор 10 л — тест 1	Биореактор 10 л — тест 2
Целевой порог кислорода	20% растворенного кислорода	20% растворенного кислорода
Максимальный объем	10,2 л	9,7 л
Мин. объем капсулы в %	4,5–15%	От 3,9 до 14%
Макс. количество клеток/мл капсулы	33,92 млн/мл	33,80 млн/мл
Количество засеянных hiPSC	56 миллионов	51 миллион
Количество полученных hiPSC	15,2 миллиарда	14,52 миллиарда
Коэффициент амплификации (AF)	X271/6,59 дня	X282/6,69 дня
Время удвоения (PDT)	19,4 часа	19,73 часа
Количество циклов (PDL)	8,14	8,08
Конечная жизнеспособность	99,5%	99,7%
Конечный OCT4+	92,0%	96,7%
Конечный SOX2+	99,6%	99,7%
Конечный NANOG+	97,0%	98,4%

10

Инкапсуляцию hiPSC и культивирование в суспензии выполняли в течение 2 отдельных циклов. Целевой уровень кислорода 20% растворенного кислорода описан как гипоксическое состояние (в отличие от биореакторов с уровнем растворенного кислорода 100%, которые описываются как нормоксические). Применялась стратегия «подпитываемой партии», то есть обновление культуральной среды посредством удаления/добавления среды с регулярными интервалами, что приводило к

15

увеличению рабочего объема и снижению концентрации капсул по отношению к общему объему. Плотность клеток может быть выражена в миллионах клеток на миллилитр капсул. Объем собранной капсулы измеряют в градуированном стеклянном цилиндре. Измеренное количество клеток можно соотнести с этим ранее измеренным объемом капсулы, чтобы на его основе вывести концентрацию

5 клеток на объем капсулы. Коэффициент амплификации (AF) определяется таким образом, что $AF = N(t_0 + Dt) / N(t_0)$, где $N(t_0)$ и $N(t_0 + Dt)$ представляют собой количество исходных клеток в t_0 и $t_0 + Dt$ соответственно. Уровень удвоения популяции (PDL) определяется как $PDL(t) = \ln(AF) / \ln(2)$. Время удвоения популяции (PDT) определяется таким образом, что $PDT(t) = Dt / PDL$, где Dt представляет собой время культивирования.

10 Жизнеспособность оценивали с помощью Nucleocounter NC-3000 (Chemometech). Декапсулированные и диссоциированные клетки фиксировали и окрашивали для OCT4, SOX2 и NANOG и анализировали посредством проточной цитометрии с помощью цитометра BD Accuri C6 Plus. Результаты, касающиеся коэффициента амплификации, также представлены на Фиг. 5.

На Фиг. 4b представлена серия фотографий, полученных по результатам видеомикроскопии капсулы, содержащей несколько цист согласно изобретению.

15

Наблюдение выполняли в проходящем свете с помощью биологической станции Nikon IM с объективом 10x. Средний внешний диаметр квазисферической капсулы составляет 288 мкм, на что указывает масштабная линейка 100 мкм. Начальное изображение снимали через 4 дня после инкапсуляции. Последовательность иллюстрирует рост нескольких колоний плюрипотентных

20 стволовых клеток в полый гидрогелевой капсуле. Эти колонии культивируют в закрытом 3D микрокомпарimente, внешне ограниченном поперечношшитым альгинатным слоем. Внутренний компаримент описан как полый в том смысле, что он не содержит поперечношшитого альгината. Внутренний компаримент, содержащий клетки, также содержит внеклеточный матрикс (в данном случае Matgel®), который виден при микроскопии с различной степенью гранулярности для альгината.

25 Во время инкапсуляции 50% объема, вводимого во внутренние микрокомпарименты, поступает из смеси клеток/матрикса и 50% из изомолярного раствора сорбитола (см. способ). Таким образом, внутреннее пространство на по меньшей мере 50% состоит из жидкости.

Изначально 3 колонии имеют гомогенную конфигурацию цист с соответствующими диаметрами 76 мкм, 100 мкм и 78 мкм (нижняя правая циста на изображении). На этой начальной стадии толщина

30 эпителия этих цист составляет соответственно 10 мкм, 13 мкм и 12 мкм. Замечено, что 2 цисты в верхней левой части капсулы постепенно вступают в контакт, и их внутренние просветы сливаются, как и их эпителий. Результат этого представляет собой колонию стволовых клеток большего размера, которая также имеет круглую и симметричную структуру цист.

Через 54 часа после начала наблюдения (изображения справа, предпоследняя строка на Фиг. 4b)

35 2 колонии цист, присутствующие в капсуле, вступили в контакт. На этой стадии диаметры этих цист составляют 232 и 175 мкм. Соответствующие значения толщины клеточного слоя этих цист составляют 36 и 24 мкм соответственно. Замечено, что контакт между этими колониями не сопровождается

слиянием просветов или эпителия. Граница между этими 2 структурами остается четко идентифицируемой на последнем и 12-м изображении (75-й час).

5 Наблюдается смещение наиболее крупной из колоний на 20 мкм влево; эта колония, по-видимому, выталкивается маленькой колонией. Несмотря на незначительное уплощение контактной зоны между 2 колониями, их симметричные структуры цист сохраняются тем не менее для каждой из 2 колоний с гомогенной толщиной клеточного слоя 50 и 40 мкм соответственно. Этому росту инкапсулированных колоний и их очевидной способности отталкивать друг друга во внутреннем капсульном пространстве способствует по меньшей мере частично жидкая природа этого внутреннего полого пространства. Кроме того, использование постепенно разлагаемых внеклеточных матриц, таких как Matrigel, 10 также позволяет клеткам расти в более благоприятной 3D среде, чем во время инкапсуляции в твердой гидрогелевой грануле, что позволяет поддерживать структуру эпителия цист несмотря на нагрузки, создаваемые умножением клеток.

В целом частично жидкое полое внутрикапсулярное пространство этой большой капсулы позволяет 3D колониям стволовых клеток расти, сохраняя при этом стабильный эпителиальный фенотип цист. 15 Стабильность этого фенотипа обеспечивает хорошую фенотипическую гомогенность продуцируемых клеток и робастный/надежный способ биопродуцирования, иллюстрирующий сохранение эпителиального фенотипа во время роста нескольких цист.

На Фиг. 4а показана последовательность слияния множества цист в капсулах:

- 20 - А: самоорганизация и образование просвета 3D колоний стволовых клеток внутри микрокомпартамента. Образование инкапсулированных цист стволовых клеток.
- В: рост цист стволовых клеток: постепенное увеличение диаметра цисты, диаметра просвета и толщины цисты.
- С: цисты входят в контакт.
- D: клеточные слои цист сливаются.
- 25 - E: сливаются также внутренние просветы цист, что приводит к образованию одной цисты большего размера.

Формула изобретения

1. Трехмерный микрокомпартмент (10) овоидальной, цилиндрической, сфероидальной или сферической формы или по существу овоидальной, цилиндрической, сфероидальной или сферической формы, содержащий внешний гидрогелевый слой (12), образующий внутреннюю часть (14), причем
5 упоминаемая внутренняя часть (14) содержит по меньшей мере:
 - элементы внеклеточного матрикса (16) и
 - по меньшей мере две цисты, причем каждая циста образована по меньшей мере одним слоем клеток (18) человека или животного, за исключением человеческих эмбриональных стволовых клеток, организованных трехмерно вокруг просвета (20),
10 при этом наименьший радиус внутренней части (14) составляет по меньшей мере 100 мкм.
2. Микрокомпартмент (10) по предшествующему пункту, характеризующийся тем, что клетки каждого слоя (18) представляют собой эпителиальные клетки или клетки, имеющие морфологию эпителиального типа и способные образовывать цисту.
3. Микрокомпартмент (10) по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что
15 клетки каждого слоя (18) выбраны из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) и следующих клеток: клеток железистого эпителия, почечных эпителиальных клеток, эпителиальных клеток кишечника, эпителиальных клеток кожи, клеток пигментного эпителия сетчатки, эпикардиальных клеток и эндокардиальных клеток.
4. Микрокомпартмент (10) по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что
20 внутренняя часть (14) также содержит жидкие области без элементов внеклеточного матрикса.
5. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что наименьший радиус внутренней части (14) составляет по меньшей мере 200 мкм.
6. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что объем внутренней части (14) составляет по меньшей мере 20% от общего объема микрокомпартмента,
25 предпочтительно по меньшей мере 40%.
7. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что он является закрытым.
8. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что внешний слой содержит альгинат.
9. Клеточный микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем,
30 что по меньшей мере одна циста является результатом слияния двух цист.
10. Микрокомпартмент по одному из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что клетки, присутствующие в микрокомпартменте, были получены посредством инкапсуляции во внутренней части внешнего гидрогелевого слоя от 2 до 30 клеток.
11. Микрокомпартмент по любому из предшествующих пунктов для применения в качестве
35 лекарственного средства.
12. Узел микрокомпартментов, содержащий по меньшей мере два трехмерных клеточных микрокомпартмента, характеризующихся тем, что по меньшей мере один микрокомпартмент представляет собой микрокомпартмент по одному из пп. 1–10.

13. Узел микрокомпарментов по предшествующему пункту, характеризующийся тем, что микрокомпарменты расположены в культуральной среде в биореакторе.

14. Способ получения клеточного микрокомпармента по одному из пп. 1–10 или узла клеточных микрокомпарментов по одному из пп. 12–13, включающий следующие этапы:

- 5 - (а) инкубацию клеток человека или животного в культуральной среде, содержащей по меньшей мере один цитопротекторный фактор,
- (b) смешивание клеток с этапа (а) с элементами внеклеточного матрикса, предпочтительно биологического или синтетического внеклеточного матрикса,
- (с) инкапсуляцию суспензии клеток в гидрогелевом слое с образованием микрокомпармента
- 10 овоидальной, цилиндрической, сфероидальной или сферической формы или по существу овоидальной, цилиндрической, сфероидальной или сферической формы, содержащего внешний гидрогелевый слой, образующий внутреннюю часть, причем наименьший радиус или средний радиус упомянутой внутренней части составляет по меньшей мере 100 мкм;
- (d) культивирование полученных микрокомпарментов в изотоническом промывочном буфере, затем
- 15 в культуральной среде, предпочтительно в культуральной среде, содержащей по меньшей мере один цитопротекторный фактор,
- (е) предпочтительно промывание микрокомпарментов для удаления цитопротекторного фактора;
- (f) культивирование микрокомпарментов в течение по меньшей мере двух циклов клеточного деления (амплификации), предпочтительно от 1 до 20 дней, еще более предпочтительно от 2 до 10 дней,
- 20 в частности от 5 до 7 дней, в культуральной среде без цитопротекторного фактора и
- (g) необязательно извлечение полученных клеточных микрокомпарментов.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что этап с) выполняют посредством совместной инъекции двух или трех растворов:

- раствора гидрогеля,

- 25 - необязательно изотонического промежуточного раствора,

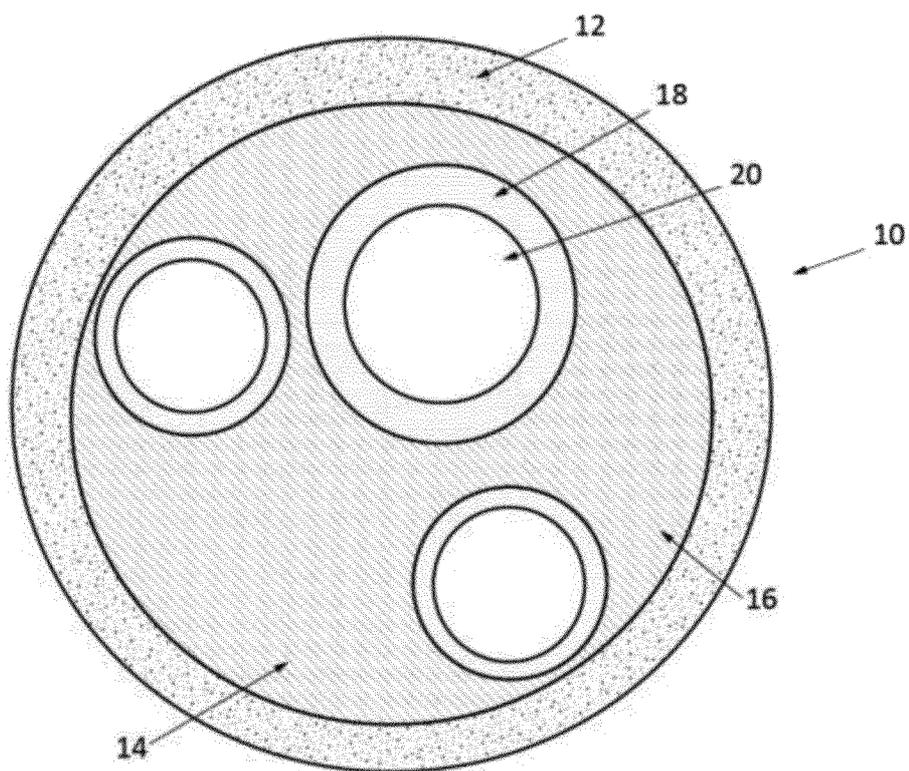
- раствора, поступающего с этапа b), содержащего клетки, культуральную среду и внеклеточный матрикс,

30 концентрически через микрожидкостный инжектор, что позволяет сформировать на выходе инжектора струю, состоящую из смеси растворов, причем упомянутая струя разбивается на капли, при этом упомянутые капли собирают в кальциевой бане, которая придает жесткость раствору гидрогеля, с образованием внешнего слоя каждого микрокомпармента, причем внутренняя часть каждой капли состоит из раствора, поступающего с этапа (b), содержащего клетки, культуральную среду и внеклеточный матрикс.

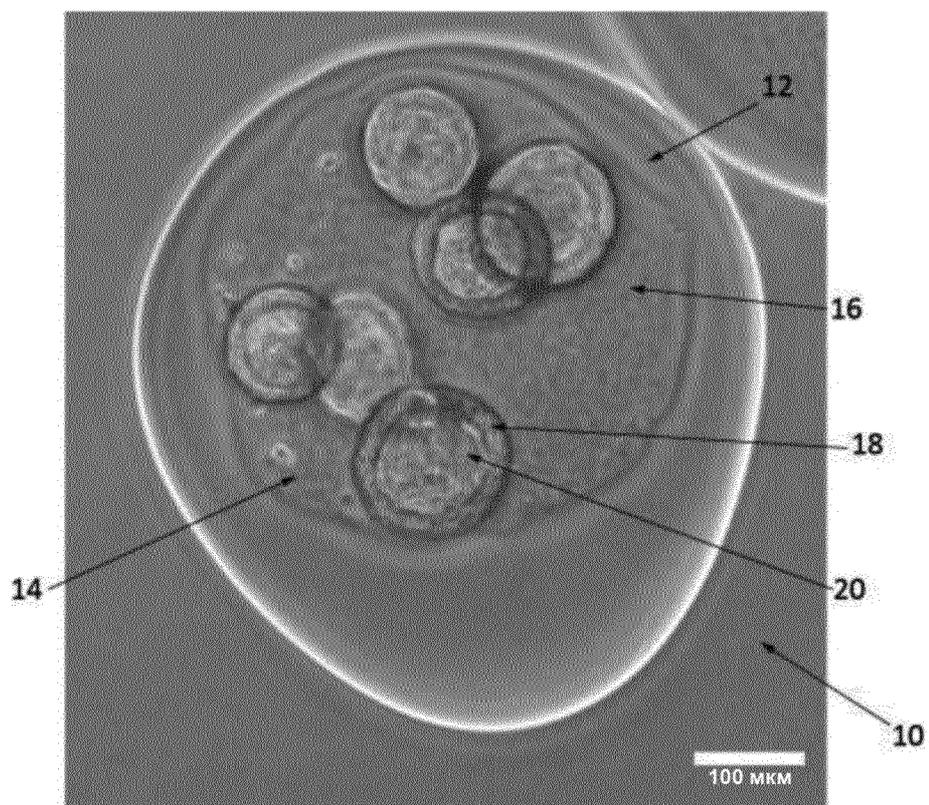
35 16. Способ по п. 15, характеризующийся тем, что диаметр конечного отверстия микрожидкостного инжектора составляет от 150 до 300 мкм, предпочтительно от 180 до 240 мкм, а скорость потока каждого из растворов составляет от 45 до 150 мл/ч, предпочтительно от 45 до 110 мл/ч.

17. Способ по одному из пп. 14–16, характеризующийся тем, что объем всех клеток, первоначально инкапсулированных на этапе (с), составляет менее 50% объема микрокомпармента, в котором они инкапсулированы.

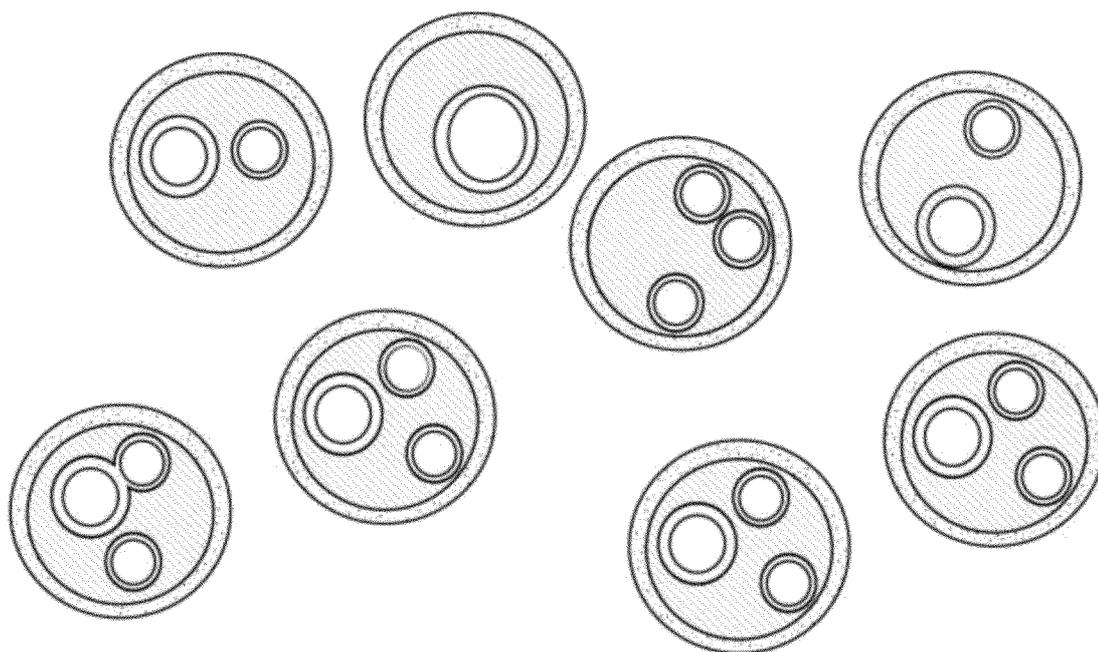
18. Способ по одному из пп. 14–17, характеризующийся тем, что этап b) смешивания клеток с внеклеточным матриксом выполняют либо между этапом (a) и этапом (c), либо одновременно с инкапсуляцией на этапе (c).
19. Способ по одному из пп. 14–18, характеризующийся тем, что этапы (d), (e) и (f) выполняют при непрерывном или последовательном перемешивании.
20. Способ по одному из пп. 14–19, характеризующийся тем, что его реализуют в биореакторе.
21. Способ по одному из пп. 14–20, характеризующийся тем, что он включает этап диссоциации клеток посредством химической, ферментативной или механической диссоциации перед или одновременно с этапом (a).
- 10 22. Способ по одному из пп. 14–21, характеризующийся тем, что он включает по меньшей мере одну реинкапсуляцию клеток после этапа (f).
23. Способ по п. 22, характеризующийся тем, что каждая реинкапсуляция соответствует пассажи.
24. Способ по одному из п. 22 или 23, характеризующийся тем, что каждая реинкапсуляция заключается в удалении внешнего гидрогелевого слоя, предпочтительно в ресуспендировании, с
- 15 частичной или полной диссоциацией клеток, которые находились в форме цист в микрокомпартаментах, и в повторной реализации этапов способа.



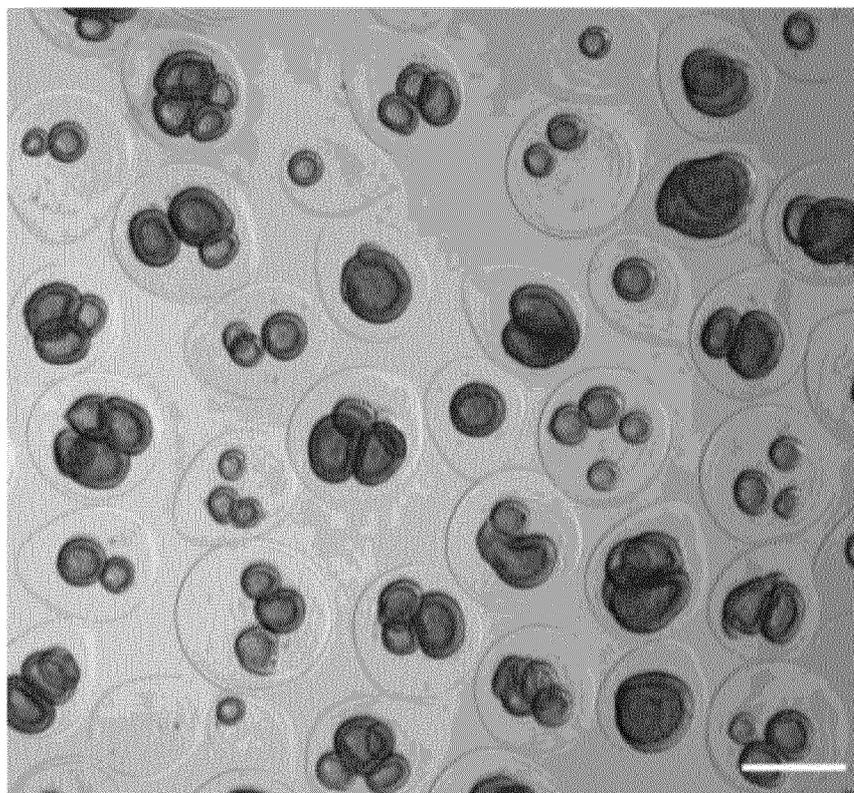
[Фиг. 1а]



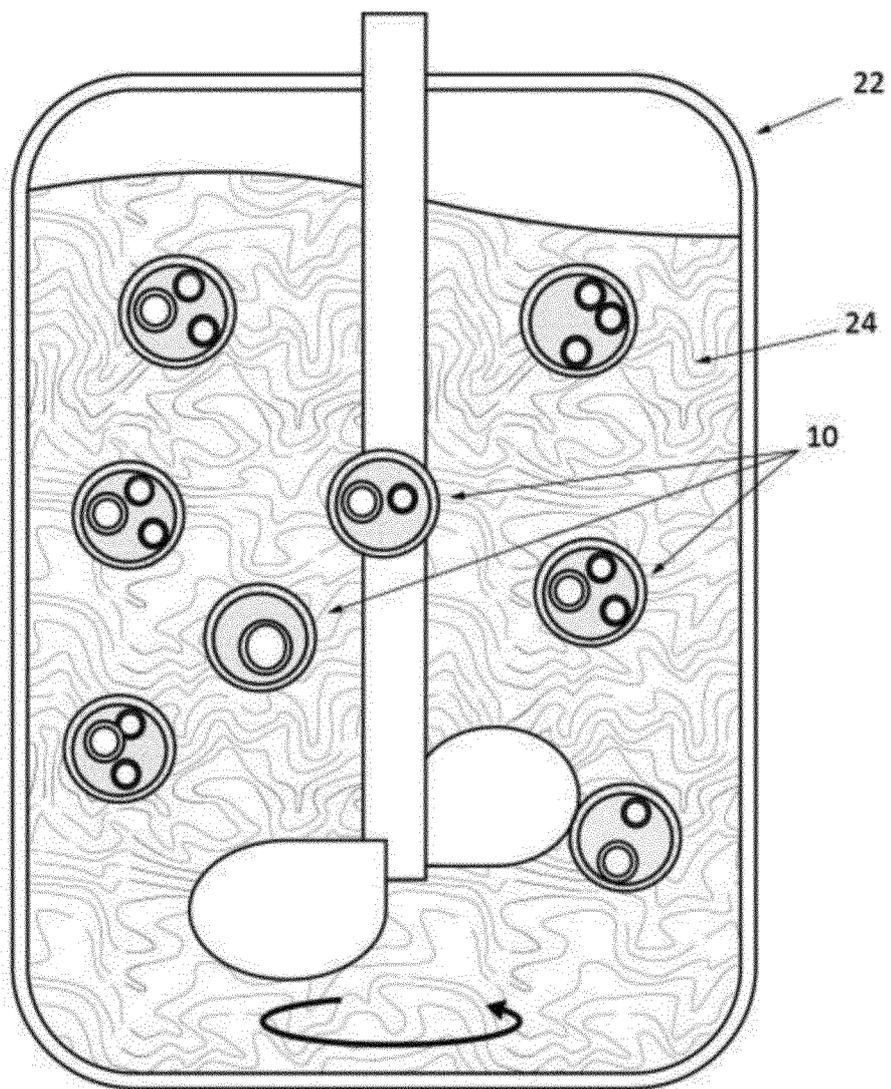
[Фиг. 1b]



[Фиг. 2а]



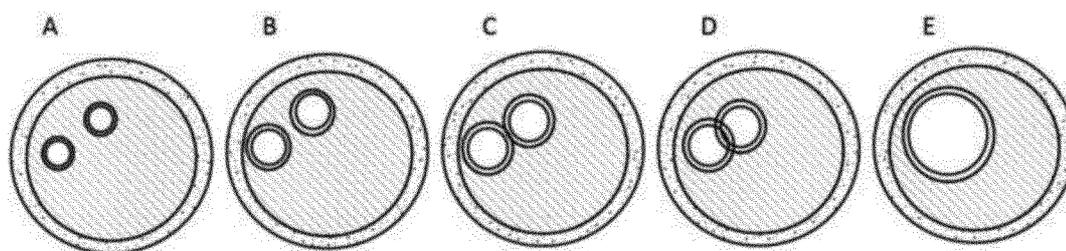
[Фиг. 2б]



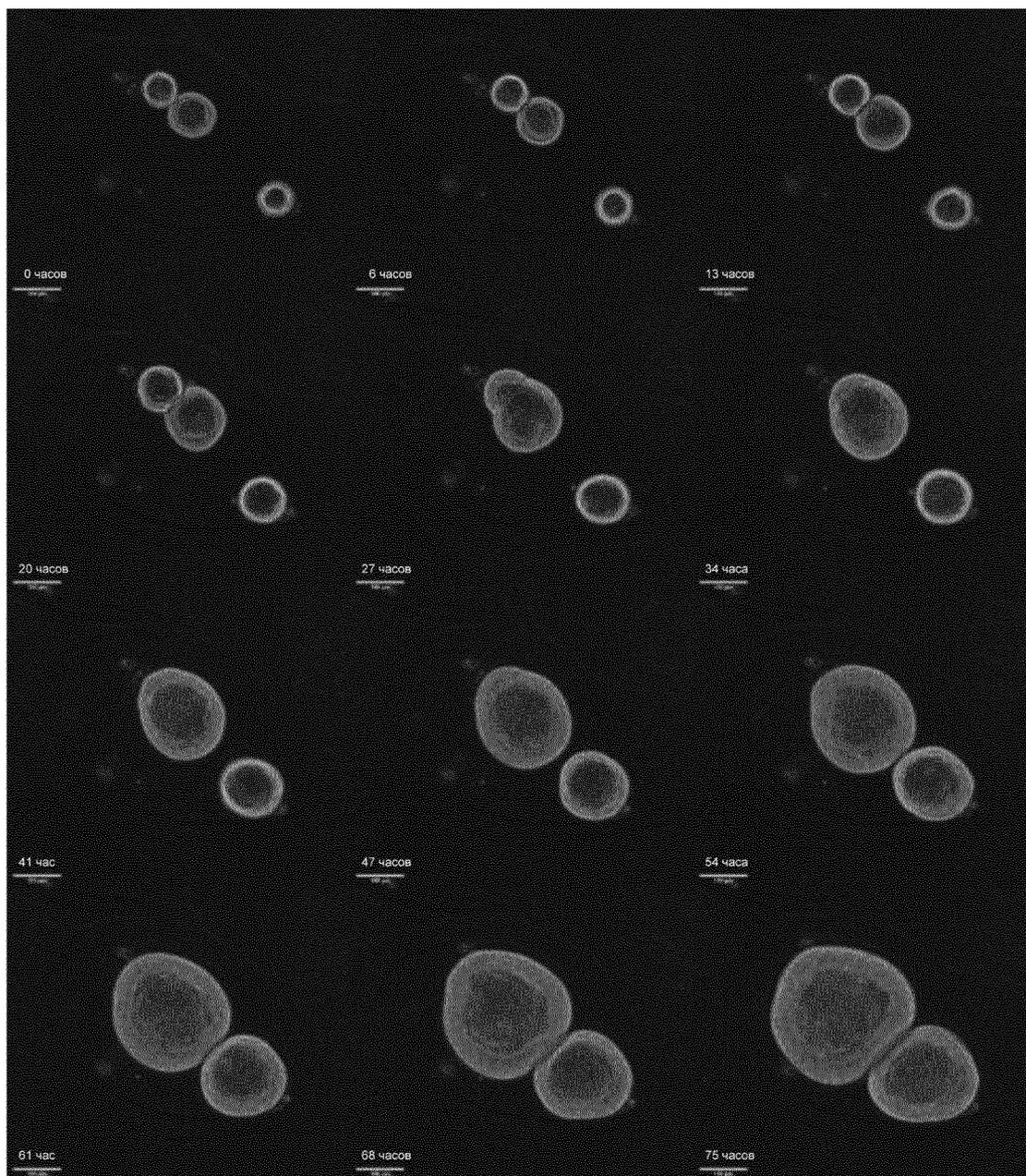
[Фиг. 3а]



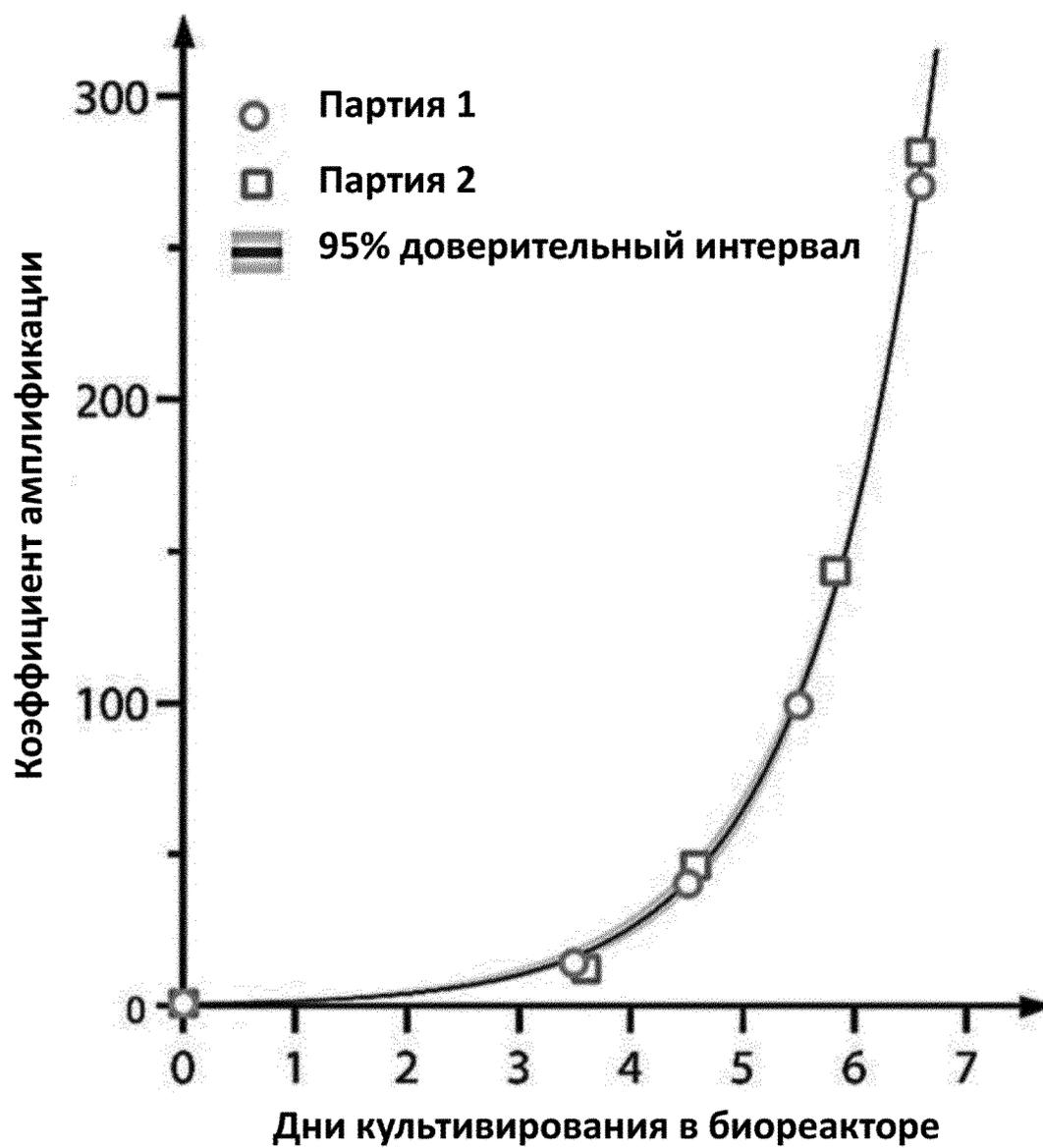
[Фиг. 3b]



[Фиг. 4a]



[Фиг. 4b]



[Фиг. 5]