



(12) PATENT

(11) 344695

(13) B1

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

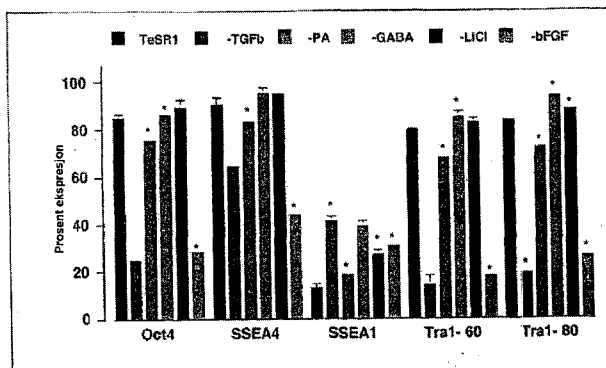
C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20071576	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2005.09.08 PCT/US2005/031838
(22)	Inng.dag	2007.03.26	(85)	Videreføringsdag	2007.03.26
(24)	Løpedag	2005.09.08	(30)	Prioritet	2004.09.08, US, 60/608,040
(41)	Alm.tilgj	2007.03.26			
(45)	Meddelt	2020.03.09			
(73)	Innehaver	Wisconsin Alumni Research Foundation, P O Box 7365, WI53707-7365 MADISON, USA			
(72)	Oppfinner	James A Thomson, 1807 Regent Street, WI53705 MADISON, USA			
		Tenneille Ludwig, 614 West Olin Avenue, WI53715 MADISON, USA			
(74)	Fullmektig	ZACCO NORWAY AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for dyrking av humane embryonale stamceller i en uendifferensiert tilstand, in vitro cellekultur og medium for dyrkning av embryonale stamceller.			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 03020920 A1, WO 2004055155 A2			
(57)	Sammendrag				

Tidligere fremgangsmåter for dyrking av humane embryonale stamceller har krevd enten fibroblastnæringsceller eller et medium som er blitt eksponert for fibroblastnæringsceller for å opprettholde stamcellene i en uendifferensiert tilstand. Det er nå funnet at dersom høye nivåer av fibroblastvekstfaktor, gamma-aminosmørsyre, pipekolinsyre, litium og transonnerende vekstfaktor beta tilsettes til mediet til hvilket stamcellen dyrkes, vil stamcellene bibeholde uendifferensiert tilstand gjennom mange passasjer, selv uten næringsceller eller kondisjonert medium.



OPPFINNELSENS BAKGRUNN

Stamceller er definert som celler som er i stand til å differensiere til mange andre differensierte celletyper. Embryonale stamceller er stamceller fra embryoer som er i stand til å differensiere til de fleste, om ikke alle, differensierte celletyper i en utviklet kropp. Stamceller er betegnet som pluripotente, hvilket beskriver en evne til differensiering til mange celletyper. En kategori pluripotente stamceller av høy interesse for forskningssamfunnet er humane embryonale stamceller, forkortet som humane ES-celler, hvilket er en embryonal stamcelle avledet fra en human embryonal kilde.

Humane embryonale stamceller er av stor vitenskapelig interesse fordi de er i stand til å proliferere uendelig i kultur og følgelig i stand til, i det minste i prinsippet, og tilføre celler og vev som erstatning til sviktende eller defekte humane vev. Tilstedeværelsen i kultur av humane embryonale stamceller gjør det potensielt mulig å frembringe ubegrensede mengder av humane celler og vev for anvendelse innen flere terapeutiske metoder for å fremme human helse. Det antas for fremtidige humane embryonale stamceller at de vil proliferere og dirigeres til å differensiere til spesielle linjer slik at de utvikler de differensierte celler eller vev som kan transplanteres til menneskekroppen for terapeutiske hensikter. Humane embryonale stamceller og differensierte celler som kan avledes fra disse er også viktige vitenskapelige verktøy for studier av humane cellulære systemer og utviklingssystemer.

De grunnleggende teknikker for å etablere og dyrke humane embryonale stamceller er blitt beskrevet. De tidligere rapporterte teknikker virker, men de er begrensede og det er ulemper ved mange av fremgangsmåtene som for tiden anvendes for å dyrke humane embryonale stamceller. En begrensning er av spesiell bekymring. De fleste eksisterende humane embryonale stamcellelinjer har vært, på en eller annen måte, eksponert direkte for museceller eller for et medium der museceller tidligere er blitt dyrket. Det faktum at noen ES-celler fra eksisterende cellelinjer ble funnet å inneha sialinsyreresten Neu5Gc, som normalt ikke lages på humane celler, fikk mye oppmerksomhet i pressen. De opprinnelige teknikker for å generere og dyrke humane embryonale stamceller krevde anvendelse av museembryonale fibroblast (MEF) næringsceller som et næringslag på hvilket humane embryonale stamceller ble dyrket. Fibroblast næringscellene virker, via fortsatt ufullstendig forståtte mekanismer, ved å fremme stamceller til å forbli i en udiffereinsierte tilstand. Senere ble det funnet at det samme fenomen kunne oppnås dersom stamcellene ble eksponert for såkalt kondisjonerte medier. Kondisjonert medium er et stamcelledyrkningsmedium der næringsceller, slik som MEF, tidligere er blitt dyrket. Enten bidrar næringscellene med noen faktor til mediet eller de fjerner noen

faktor fra mediet, men resultatet er at kondisjonert medium kan anvendes til å dyrke stamceller uten differensiering. Begge dyrkningsbetingelser, direkte vekst av humane ES på musenæringsceller, eller anvendelse av kondisjonerte medier, reiser bekymringen om at en eller flere stoffer slik som virus kan overføres fra musecellene til de humane ES-cellene. Dersom en av hensiktene med å dyrke humane embryonale stamceller er å frembringe vev som skal transplanteres til en menneskekropp, er det svært ønskelig at stamcellene aldri er blitt ekspandert for celler fra en annen art eller for medier som er blitt benyttet til å dyrke celler fra andre arter. Følgelig er det av stor interesse å definere kulturbetingelser som vil tillate proliferering og dyrkning av humane embryonale stamceller uten et fibroblastnæringslag i den videre utviklingen av teknikker for langtidsdyrkning av humane embryonale stamceller.

Et kjennetegnende trekk på humane embryonale stamceller i kultur er at dersom betingelsene er mindre enn ideelle, har cellene en tendens til å differensiere. Det er enkelt å indusere differensiering av humane ES-celler, samtidig som det er krevende å opprettholde de humane ES-cellene i udifferensiert tilstand i kultur. De fleste kulturbetingelser vil resultere i noen grad av uønsket differensiering, spesielt rundt periferien av den voksende ES-cellekolonien. Mens ES-cellene kan dyrkes med noen grad av uønsket differensiering, er hensikten å definere en kulturbetingelse som tillater dyrkning for å bibeholde en så udifferensiert tilstand som mulig, det vil si med så få differensierte celler som mulig. Vi tror at vi har anvendt særlig stringente standarder for å definere betingelser som vil støtte en ubegrenset kultur av udifferensierte ES-cellekulturer.

Flere mediumformuleringer vil muliggjøre at humane ES-celler forblir udifferensierte over noe tid, men den tilstanden vil ofte ikke opprettholde seg selv. I særdeleshet defineres vekten av humane ES-celler fra en initiell såkultur i dyrkningskaret til konfluens i det samme dyrkningskaret som en "passasje". Vi har funnet flere mediumformuleringer som muliggjør dyrking av humane ES-celler i en eller flere passasjer uten kraftig differensiering, men deretter differensierer cellene raskt ved påfølgende passasjer. De antar nå at for at et medium virkelig skal bistå uendelig proliferering av humane ES-celler uten differensiering, uten kondisjonert medium eller fibroblastnæringsceller, må mediet vises å bistå dyrkning av humane ES-celler i en vesentlig uniform og udifferensiert tilstand i minst fem passasjer. Det er også viktig at kulturene forblir relativt homogene og udifferensierte gjennom dyrkningsperioden og bibeholder alle de viktige egenskapene til humane ES-celler.

Differensieringsstadiet til en stamcellekultur kan vurderes enklest ved å vurdere de morfologiske egenskapene til cellene. Udifferensierte stamceller har en karakteristisk morfologi, det vil si små og kompakte celler med tydelig definerte cellegrenser, en morfologi som enkelt kan sees ved undersøkelse av stamcellekulturen under mikroskop.

- 5 I motsetning er celler som er differensiert større og mer diffuse, med uklar cellegrense. Mens noen differensierte celler kan, og normalt vil, opptre på grensen av koloniene av udifferensierte celler, er den optimale stamcellekultur en som prolifererer i dyrkningskaret med kun et minimalt antall av celler i utkanten av kulturen som synes å være differensierte. Med erfaring kan man vurdere differensieringsstadiet og
- 10 helsetilstanden til humane ES-cellekulturer visuelt med god nøyaktighet. En biokjemisk markør som anvendes for å følge tilstanden til ES-cellene som udifferensierte er tilstedeværelse av transkripsjonsfaktoren Oct4, som er blitt ansett som den mest pålitelige markør for udifferensiert stadium av ES-celler, og som er en av de første markører som blir borte når udifferensierte celler begynner å differensiere.

- 15 WO 03020920A1 beskriver et system for dyrking av humane embryonale stamceller. WO 2004055155A2 beskriver også en metode for å dyrke og opprettholde humane embryonale stamcellelinjer i en udifferensiert, pluripotent og proliferativ tilstand i en kultur som er fri for xenokontaminanter og næringsceller.

20

KORT OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

- Foreliggende oppfinnelsen er rettet mot en fremgangsmåte for å dyrke humane embryonale stamceller i en udifferensiert tilstand på en matriks uten behov for
- 25 næringsceller eller kondisjonert medium, der fremgangsmåten omfatter trinnet for dyrking av de humane embryonale stamceller i et medium i fravær av næringsceller og kondisjonert medium, der mediet inkluderer salter, vitaminer, aminosyrer, glukose, en fibroblastvekstfaktor, transformerende vekstfaktor beta, og minst to av gamma-aminosmørsyre, pipekolinsyre, litium eller en litiumerstatning som stimulerer Wnt-
- 30 reaksjonsveien i tilstrekkelige mengder til å opprettholde de humane embryonale stamcellene i en udifferensiert tilstand gjennom flere påfølgende dyrkningspassasjer.

- Foreliggende oppfinnelse er også rettet mot en *in vitro* cellekultur, der dyrkningskaret omfatter humane embryonale stamceller; en matriks på hvilke stamcellene kan vokse;
- 35 og et kulturmedium der kulturmediet omfatter salter, vitaminer, aminosyrer, glukose, en fibroblastvekstfaktor, transformerende vekstfaktor beta og minst to av gamma-aminosmørsyre, pipekolinsyre og litium eller en litiumerstatning som stimulerer Wnt-reaksjonsveien i tilstrekkelige mengder for å opprettholde de humane embryonale

stamcellene i en uddifferensiert tilstand gjennom flere dyrkningspassasjer, der mediet er fritt for næringsceller og aldri er blitt eksponert for næringsceller.

- En utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter en cellekultur der de humane
5 embryonale stamcellene er minst 90% positive for transkripsjonsfaktoren Oct4 gjennom flere dyrkningspassasjer.

- Foreliggende oppfinnelse er også rettet mot et medium for dyrkning av embryonale stamceller, der mediet omfatter salter, vitaminer, aminosyrer, glukose, en
10 fibroblastvekstfaktor, transformerende vekstfaktor beta og minst to av gamma-aminosmørsyre, pipekolinsyre og litium eller en litiumerstatning som stimulerer Wnt-reaksjonsveien i tilstrekkelig mengder for å opprettholde at stamcellene vokser i mediet i en uddifferensiert tilstand gjennom flere dyrkningspassasjer.

- 15 Det er et aspekt ifølge oppfinnelsen å definere langtidskulturbetingelser for humane embryonale stamceller som unngår anvendelse eller eksponering for dyreceller og dyreproteiner, enten disse er fra næringsceller eller fra kondisjonert medium der stamceller dyrkes.

- 20 Det er en annen hensikt ifølge oppfinnelsen å definere kulturbetingelser for humane embryonale stamceller som er så definert som mulig samtidig som den maksimale andel celler i kulturen som mulig opprettholdes i en uddifferensiert tilstand.

- Andre hensikter, trekk og fordeler ved foreliggende oppfinnelse vil bli tydeligere ut i fra
25 den følgende beskrivelse.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

- Fig. 1 presenterer data fra eksperimentelt arbeid som beskrives i beskrivelsen nedenfor
30 og viser at komponentene i mediet reduserer andelen differensierte celler i kulturen av humane ES-celler som dyrkes i dette.

- Fig. 2 viser en grafisk fremstilling av data som viser at medium med humane matriksproteiner resulterer i dyrkede humane ES-celler som ikke har en sialinsyrerest av
35 ikke-human opprinnelse.

Fig. 3 er en grafisk fremstilling av data som viser det høye nivå av uendifferensierte celler i den humane stamcellekulturen.

Fig. 4 er en grafisk fremstilling av data som viser at mediet beskrevet her i dokumentet resulterer i en sterk vekst av stamcellekulturer.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Vi har identifisert flere dyrkningsbetingelser og medier som muliggjør en uendelig kultur og kraftig proliferering av humane embryonale stamceller i en uendifferensiert tilstand og også i fravær av både næringsceller og kondisjonert medium. Utviklingen av disse mediene og kulturbetingelsene gjør det mulig å avlede og opprettholde humane ES-cellelinjer i definerte og kontrollerte betingelser uten direkte eller indirekte eksponering for dyreceller av noen type. Disse mediene er vist og støtte uendifferensiert ES-celleproliferering gjennom flere passasjer, minst fem, som er sterke bevis på at disse medier vil støtte slike uendelige kulturer.

Et definert og humanisert medium for dyrkning og proliferering av humane ES-celler inkluderer typisk salter, vitaminer, en glukosekilde, mineraler og aminosyrer. For å supplere med det og tilføre betingelser som støtter cellevekst, inkluderte stamcellemedier opprinnelig serum fra en eller annen kilde. Tidligere ble det også rapportert at tilsetning av fibroblastvekstfaktor pluss en serumerstatning vil muliggjøre dyrkning av humane ES-celler uten serum. Serumerstatningen kan være et kommersielt tilgjengelig produkt solgt i den hensikt eller det kan være en formulert blanding av protein, slik som serumalbumin, vitaminer, salter, mineraler, et transferrin eller en transferrinerstatning, og insulin eller en insulinerstatning. Denne serumerstatningskomponenten kan også tilsettes selen. Det er foretrukket her at en definert serumerstatning anvendes i stedet for serum fra hvilke som helst kilde ved dyrking av humane ES-celler, for å unngå variasjon i serumbestanddeler og for å anvende medier som er så definerte som mulig. Vi har definert et tilfredsstillende medium, og alle komponentene i mediet som beskrives her er beskrevet i tabell 1 nedenfor, som lister opp alle komponenter i vårt medium, betegnet TeSR1, ved konsentrasjoner av bestanddelene. TeSR1-mediet omfatter en DMEM/DF12-base, tilsatt humant serumalbumin, vitaminer, antioksidanter, spormineraler, spesielle lipider og klonede vekstfaktorer.

For å unngå behovet for et fibroblastnæringslag, hvilket tidligere ble ansett som nødvendig for å opprettholde humane ES-celler i en udifferensiert tilstand, rapporteres det her at kombinasjon av anvendelse av høyere konsentrasjoner av FGF (10 til 1000 ng/ml) sammen med anvendelse av GABA (gamma-aminosmørsyre), pipekolinsyre (PA), litium (LiCl) og transformerende vekstfaktor beta (TGF β), vil frembringe et medium som støtter vekst av udifferensierte stamceller. Kombinasjonen av disse additivene er funnet å være tilstrekkelig for å opprettholde kulturen av humane ES-celler i en udifferensiert tilstand uendelig uten eksponering for verken næringsceller eller kondisjonerte medier. Disse additivene er vist å være tilstrekkelige. Imidlertid trenger ikke nødvendigvis alle å være tilstede i hver mediumformulering. Ved selektiv utelatelse av disse additiver, kan en eller flere av disse komponentene utelates, hvilket resulterer i humane ES-cellekulturer som fortsatt vil vokse med et tap av renhet i forhold til udifferensiert tilstand i kulturen. Slike kulturer kan eller trenger ikke fortsette å være stabile gjennom mange passasjer. Imidlertid er det tydelig at kombinasjonen er tilstrekkelig for å lage flere medier som vil støtte langtidskulturer og proliferering av udifferensierte humane ES-celler gjennom et uendelig antall passasjer uten næringsceller eller kondisjonert medium.

Vår første hensikt var screening av disse individuelle vekstfaktorer, valgt på grunnlag av reseptorene som uttrykkes av humane ES-celler, identifiserte flere faktorer som har positive effekter på udifferensiert proliferering. Av disse ble bFGF, LiCl, γ -aminosmørsyre (GABA), pipekolinsyre og TGF β til slutt inkludert i TeSR1. For hver av de fire undersøkte cellelinjene var prolifereringshastigheten og prosentandelen celler som bibeholder ekspresjon av særegne humane ES-cellemarkører høyere i TeSR1 enn i kontrollceller dyrket i fibroblastkondisjonert medium, og utelatelse av noen av disse fem faktorene reduserte kulturens yteevne. Noen av disse dataene er illustrert i fig. 1, som viser at kulturer dyrket i medier der hvilke som helst av disse bestanddeler er utelatt har en mindre prosentandel celler som bibeholdes udifferensiert sammenlignet med kulturer der alle disse fire mediebestanddelene er inkludert. Merk at Oct4, SSEA-1, SSEA-4, Tral-60 og Tral-80 er alle celleoverflatemarkører eller transkripsjonsfaktorer (Oct4) som anvendes for å undersøke differensieringstilstanden til stamceller. Fig. 4 illustrerer tilsvarende studier der det ble vist at veksthastigheten til kulturene gjennom mange passasjer var høyest når alle disse bestanddelene sammen var tilstede i kulturmediet.

Det er også nyttig å inkludere i cellekulturtilbetingelsene for humane ES-celler en biologisk matriks i dyrkningskaret. Et slikt stoff som er blitt anvendt er "MatrigelTM",

som er en kunstig basalmembran av musecelleopprinnelse, som tilsettes som et kommersielt produkt fritt for museceller. Et annet stoff av human opprinnelse nå også kjent for å fungere på samme måte er fibronectin, et humant glykoprotein som anvendes i sin uløselige form for å danne en fibermatriks som også fungerer som en

5 basalmembran for ES-cellekultur. Hos oss var en matriks av fibronectin alene ikke tilstrekkelig. Imidlertid er det også nå funnet at et humant matriksmateriale kan lages av en kombinasjon av de humane matriksproteiner kollagen IV, fibronectin, laminin og vitronectin og denne matriksen er tilstrekkelig for å støtte humane ES-celler uendelig i en uddifferensiert tilstand i TeSR1-mediet.

10 Etter metodologisk testing av mer enn 80 individuelle vekstfaktorer, kom man fram til listen ovenfor for medieadditiver. Selv om noen av additivene synes, i alle fall for noen passasjer, og støtte veksten av en ES-celler i kultur, var det mange som ikke lyktes over senere passasjer å opprettholde ES-cellene i en uddifferensiert tilstand. De identifiserte

15 ikke andre kombinasjoner av disse faktorene som ga resultatene til mediet additivene beskrevet i eksemplene nedenfor. Dette betyr ikke at bestanddelene ikke er utsatt for variasjon. For eksempel ble LiCl anvendt i mediet fordi dette stimulerer Wnt-reaksjonsveien. Wnts eller andre stimulatorer av denne reaksjonsveien slik som aktivin kunne erstattes som ekvivalenter til LiCl, selv om LiCl sannsynligvis er det mest

20 økonomiske stoffet for denne hensikt. Tilsvarende antas GABA å interagere med GABA-reseptoren, og vitenskapelig litteratur inkluderer identifisering av flere molekyler som er agonister til den samme reseptoren og kan substitueres for GABA i mediet som en ekvivalent. Det antas også at PA interagerer med GABA-reseptoren. Mens både PA og GABA ble funnet å være nyttige i mediet ved konsentrasjonene

25 anvendt her, er det også antatt at en eller flere av disse bestanddelene kunne økes dramatisk i konsentrasjon for å unngå behov for den andre.

Fibroblastvekstfaktoren i høyere konsentrasjoner (40 til 100 ng/ml) synes å oppveie behovet for næringsceller. Den foretrukne FGF er basisk FGF, også betegnet bFGF og

30 FGF2, men andre FGF inkludert minst FGF4, FGF9, FGF17 og FGF18 vil også gjøre nytten i denne hensikt. Andre FGF kan også fungere, selv ved høyere konsentrasjoner.

Observasjonen om at humane embryonale stam (ES)-cellekulturer tidligere er blitt opprettholdt i en uddifferensiert tilstand kun når den dyrkes i nærvær av

35 fibroblastnæringsceller eller i kondisjonert medium har ført til spekulasjoner om at fibroblastene frigir en faktor til mediet som virker ved å inhibere differensiering av ES-cellene. Uansett hvilken effekt som medieres av fibroblastnæringscellene til mediet er

det imidlertid nå klart at mediet beskrevet nedenfor vil erstatte den effekten. De tre medier definert nedenfor inneholder ingen dyreceller og tillater en langtidsdyrking av udifferensierte humane ES-celler i en udifferensiert tilstand. Et eksempel presenteres også på et medium der alle proteinene i mediet er humane, har et "humanisert" medium og dyrkningsbetingelser som unngår alle bekymringer om subcellulære produkter fra dyreopprinnelse.

EKSEMPEL

Bestanddelene i TeSR1 mediet, som ble anvendt for alle dyrkningene beskrevet her med unntak av de der dette er antydnet, vises i tabell 1 nedenfor. Våre primære eksperimenter antyder at udifferensierte humane ES-celleprolifisering var optimal ved en pH på 7,2, en osmolaritet på 350 mOsmol og en atmosfære på 10%CO₂/5%O₂. Disse betingelsene ble anvendt i alle dyrkningene som her beskrives.

Celler fra humane ES-linjer H1, H7, H9 og H14 prolifererer kraftig i TeSR1 i henholdsvis 11, 7, 25 og 17 passasjer (2-6 mnd). Karyotypene ble bekreftet å være normale for cellelinjen H14 etter 7 passasjer og H9 etter 8 og 21 passasjer. Teratomadannelse ble bekreftet for H1 og H9 etter 11 og 20 passasjer.

Det er blitt antydnet at tidligere ES-cellekulturer er mindre enn optimale på grunn av tilstedeværelsen av Neu5Gc, en sialinsyre som ikke laget av mennesker. Fordi de humane matrikskomponentene fibronectin, laminin og vitronectin eliminerer det endelige animalske produkt fra TeSR1-kulturbetingelsene for human ES-celler, testet vi om Neu5Gc ble eliminert fra eksisterende human ES-cellelinjer under dyrking i dette mediet. Vi bekreftet tilstedeværelse av Neu5Gc på humane ES-celler dyrket i fibroblastkondisjonert medium, påviste en redusert men påvisbar mengde av celler dyrket i TeSR1 på Matrigel og kunne ikke påvise noen Neu5Gc på ES-celler dyrket i TeSR1 ved anvendelse av de fire humane matrikskomponentene. Disse dataene er illustrert i fig 2. Følgelig har ikke ES-celler dyrket på TeSR1 og en matriks av humane proteiner noen ikke-humane sialinsyrerester som finnes i celler dyrket på musenæringsceller.

For å undersøke betingelsene for ES-cellekoloniene og egnethet for langtidskultur for opprettholdelse av humane ES-celler, ble TeSR1-mediet sammenlignet med de beste tidligere kjente mediebetingelser, som for oss er anvendelse av kondisjonert medium. Det ble funnet at TeSR1-mediet var i stand til å opprettholde de humane ES-cellene i en

slik udifferensiert tilstand at over 90% av cellene fortsatte å teste positivt for Oct4 selv etter langtidsdyrking. Resultatene fra denne undersøkelsen er presentert i kurven i fig. 3. Dette viser for første gang at næringscellefritt og ukondisjonert medium har opprettholdt et nivå av udifferensiert vekst av humane ES-celler i et slikt omfang at mer enn 90% av cellene i kulturen fortsatt er udifferensierte ved alle stadier.

Vekstkurven og FACS analysene av H1-celler dyrket i 3 passasjer ble målt i TeSR1-medium og i TeSR-medium fra hvilket hver av de følgende komponentene ble utelatt: TFG β , PA, LiCl, GABA og bFGF. For å starte dyrkingen ble 3×10^5 celler fra hver cellelinje sådd ut på dag 0 av passasje 1. Celleantallet ble telt i triplikate brønner for å vurdere festing (dag 2-3) og endelig celletall ved passasje (dag 6-7). Initiell utsåingstetthet og prøvetidspunkt ble gjentatt, om mulig for 5 passasjer. Cellene ble analysert på dag 6 av passasje 3 ved FACS for celleoverflatemarkørene SSEA4, SSEA4, Tra 1-60 og Tra 1-81 og for transkripsjonsfaktoren Oct4. Disse dataene er presentert grafisk i fig. 1. Disse dataene viser at humane ES-celler kan dyrkes i mediet som mangler hver av disse komponentene dog på bekostning av noe uønsket differensiering av celler i kulturen, og at det høyeste nivå av udifferensiert kultur kun kunne oppnås ved å anvende alle disse komponentene. Tilsvarende resultater ble oppnådd med andre cellelinjer.

20

Pluripotentegenskapen til humane ES-cellelinjer opprettholdt i TeSR1-medium ble undersøkt. Celler fra nylig initierte cellelinjer WA01 og WA09, dyrket i TeSR1-medium på Matrigel matris i henholdsvis 11 og 20 passasjer ble injisert til et SCID-beige mus. Teratomer som har kompleks differensiering ble utviklet hos musene 6-8 uker etter inokulering.

25

Referanseeksempel**Tabell 1 Fullstendig formulering for TeSR1-medium**

UORGANISKE SALTER	mM	AMINOSYRER	mM
Kalsiumklorid (vannfri)	0,8232	L-Alanin	0,1392
HEPES	11,76	L-Arginin hydroklorid	0,5488
Magnesiumklorid (vannfri)	0,2352	L-Asparagin-H ₂ O	0,1392
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	0,319088	L-Asparginsyre	0,1392
Kaliumklorid (KCl)	3,26144	L-Cystein-HCl-H ₂ O	0,0784
Natriumbikarbonat (NaHCO ₃)	11,2112	L-Cystin 2HCl	0,0784
Natriumklorid (NaCl)	94,55824	L-Glutaminsyre	0,1392
Natriumfosfat, dibas (vannfri)	0,392	L-Glutamin	2,96
Natriumfosfat, mono (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)	0,355152	Glycin	0,296
		L-Histidin-HCl-H ₂ O	0,1176
SPORMINERALER		L-Isoleucin	0,326144
Jernnitrat (Fe(NO ₃) ₃ -9H ₂ O)	0,00009408	L-Leucin	0,353584
Jernsulfat (FeSO ₄ -7H ₂ O)	0,001176	L-Lysinhydroklorid	0,391216
Kobbersulfat (CuSO ₄ -5H ₂ O)	4,0768E-06	L-Metionin	0,090944
Sinksulfat (ZnSO ₄ -7H ₂ O)	0,001176	L-Fenylalanin	0,16856
Ammoniummetavanadat (NH ₄ VO ₃)	0,000056	L-Prolin	0,2176
Mangansulfat Mn SO ₄ H ₂ O	1,00592E-05	L-Serin	0,296
Ammoniummolybdat	1,00404E-05	L-Treonin	0,352016
NiSO ₄ 6H ₂ O	4,94861E-06	L-Tryptofan	0,0346528
Natriummetasilikat Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	0,004926108	L-Tyrosin 2Na 2H ₂ O	0,167776
SnCl ₂	5,32544E-06	L-Valin	0,354368
CdCl ₂	6,21931E-05		
CrCl ₃	9,41176E-06	VITAMINER	
Ag No ₃	5,00293E-06	Askorbinsyre	0,375
AlCl ₃ 6H ₂ O	2,4855E-05	Biotin	1,12112E-05
Ba (C ₂ H ₃ O ₂) ₂	4,99217E-05	Kolinklorid	0,0502544
CoCl ₂ 6H ₂ O	5,0021E-05	D-kalsiumpantotenat	0,0036064
GeO ₂	2,5337E-05	Folinsyre	0,004704

11

KBr	5,04202E-06	i-Inositol	0,05488
KI	5,12048E-06	Niacinamid	0,012936
NaF	0,000500119	Pyridoksinhydroklorid	0,0076048
RbCl	5,00414E-05	Riboflavin	0,0004704
ZrOC12 8H2O	9,03834E-05	Tiaminhydroklorid	0,02460217
		Vitamin B12	0,000392
VEKSTFAKTORER			
GABA	0,979	ENERGISUBSTRATER	
Pipekolinsyre	0,000984	D-glukose	13,72784
bFGF	5,80E-06	Natriumpyruvat	0,392
LiCl	0,979		
TGF beta 1	2,35E-08	PROTEINER	
		Human insulin	0,0034438
LIPIDER		Human Holo-transferrin	0,14
Linolsyre	0,0070976	Human Serum Albumin	199,7
Liposyre	0,00039984		
Arakidonsyre	0,001312	ANDRE KOMPONENTER	
Kolesterol	0,0113798	Glutation (redusert)	0,00592996
DL-alfatokoferolacetat	0,02962	Hypoksantin Na	0,01176
Linoleinsyre	0,007184	Fenolrød	0,0159936
Myristinsyre	0,008758	Putrecin-2HCl	0,000394352
Oljesyre	0,00708	Tymidin	0,001176
Palmitoleinsyre	0,007862	2-merkaptotanol	0,1
Stearinsyre	0,00703	Selen	0,000177304
		Pluronic F-68	0,238
		Tween 80	0,3358

P a t e n t k r a v

1.
Fremgangsmåte for å dyrke humane embryonale stamceller i en udifferentiert tilstand
5 på en matriks uten behov for næringsceller eller kondisjonert medium, k a r -
a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter trinnet dyrking av
de humane embryonale stamceller i et medium i fravær av næringsceller og
kondisjonert medium, der mediet inkluderer salter, vitaminer, aminosyrer, glukose, en
fibroblastvekstfaktor, transformerende vekstfaktor beta, og minst to av gamma-
10 aminosmørsyre, pipekolinsyre, litium eller en litiumerstatning som stimulerer Wnt-
reaksjonsveien i tilstrekkelige mengder til å opprettholde de humane embryonale
stamcellene i en udifferentiert tilstand gjennom flere påfølgende dyrkningspassasjer.
2.
15 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
mediet inkluderer fibroblastvekstfaktoren i en konsentrasjon på minst 40 ng/ml.
3.
Fremgangsmåte ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at
20 mediet inkluderer fibroblastvekstfaktoren i en konsentrasjon på minst 100 ng/ml.
4.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, 2 eller 3, k a r a k t e r i s e r t
v e d at mediet også omfatter transferrin og insulin.
- 25 5.
In vitro cellekultur, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter i
dyrkningskaret:
humane embryonale stamceller;
30 en matriks på hvilke stamcellene kan vokse; og
et kulturmedium der kulturmediet omfatter salter, vitaminer, aminosyrer, glukose, en
fibroblastvekstfaktor, transformerende vekstfaktor beta og minst to av gamma-
aminosmørsyre, pipekolinsyre og litium eller en litiumerstatning som stimulerer Wnt-
reaksjonsveien i tilstrekkelige mengder for å opprettholde de humane embryonale
35 stamcellene i en udifferentiert tilstand gjennom flere dyrkningspassasjer, der mediet er
fritt for næringsceller og aldri er blitt eksponert for næringsceller.

6.
Cellekultur ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at mediet inkluderer fibroblastvekstfaktor i en konsentrasjon på minst 40 ng/ml.
- 5 7.
Cellekultur ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at mediet inkluderer fibroblastvekstfaktoren i en konsentrasjon på minst 100 ng/ml.
8.
10 Cellekultur ifølge krav 5, 6 eller 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at mediet ytterligere omfatter proteiner utvalgt fra gruppen bestående av albumin, insulin og transferrin.
9.
15 Cellekultur ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at proteinene er humane proteiner.
10.
Cellekultur ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at insulin
20 og transferrin er rekombinante proteiner.
11.
Cellekultur ifølge et hvilket som helst av kravene 5 til 10, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at de humane embryonale stamcellene er minst 90%
25 positive for transkripsjonsfaktoren Oct4 gjennom flere dyrkningspassasjer.
12.
Kultur av humane embryonale stamceller ifølge krav 11, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at cellene ikke viser sialinsyreresten Neu5Gc.
30
13.
Medium for dyrkning av embryonale stamceller, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at mediet omfatter salter, vitaminer, aminosyrer, glukose, en
fibroblastvekstfaktor, transformerende vekstfaktor beta og minst to av gamma-
35 aminosmørsyre, pipekolinsyre og litium eller en litiumerstatning som stimulerer Wnt-
reaksjonsveien i tilstrekkelig mengder for å opprettholde at stamcellene vokser i mediet
i en udifferentiert tilstand gjennom flere dyrkningspassasjer.

14.

Medium ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at mediet
ytterligere omfatter proteiner utvalgt fra gruppen bestående av albumin, insulin og
5 transferrin.

1/4

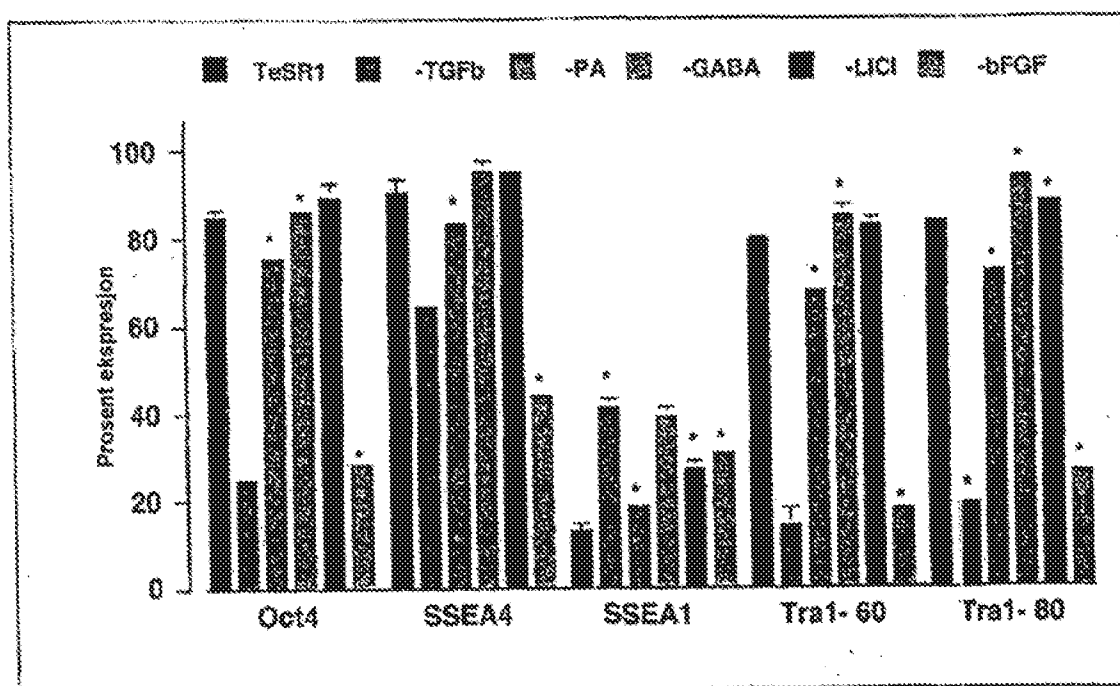


FIG 1

2/4

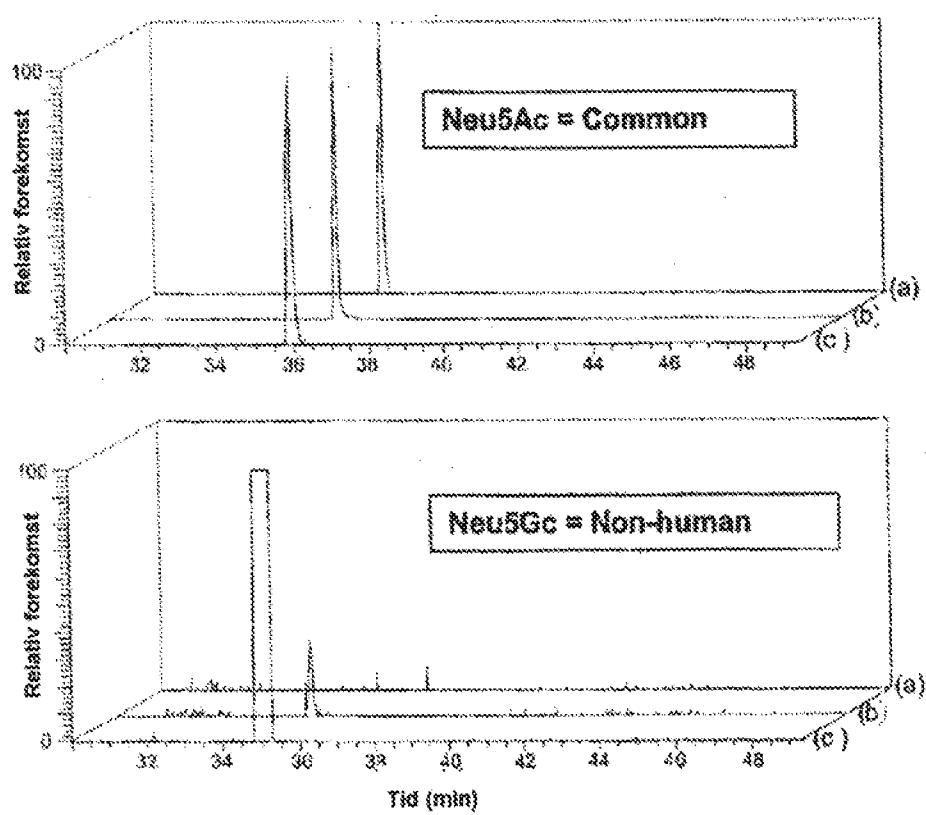


FIG 2

3/4

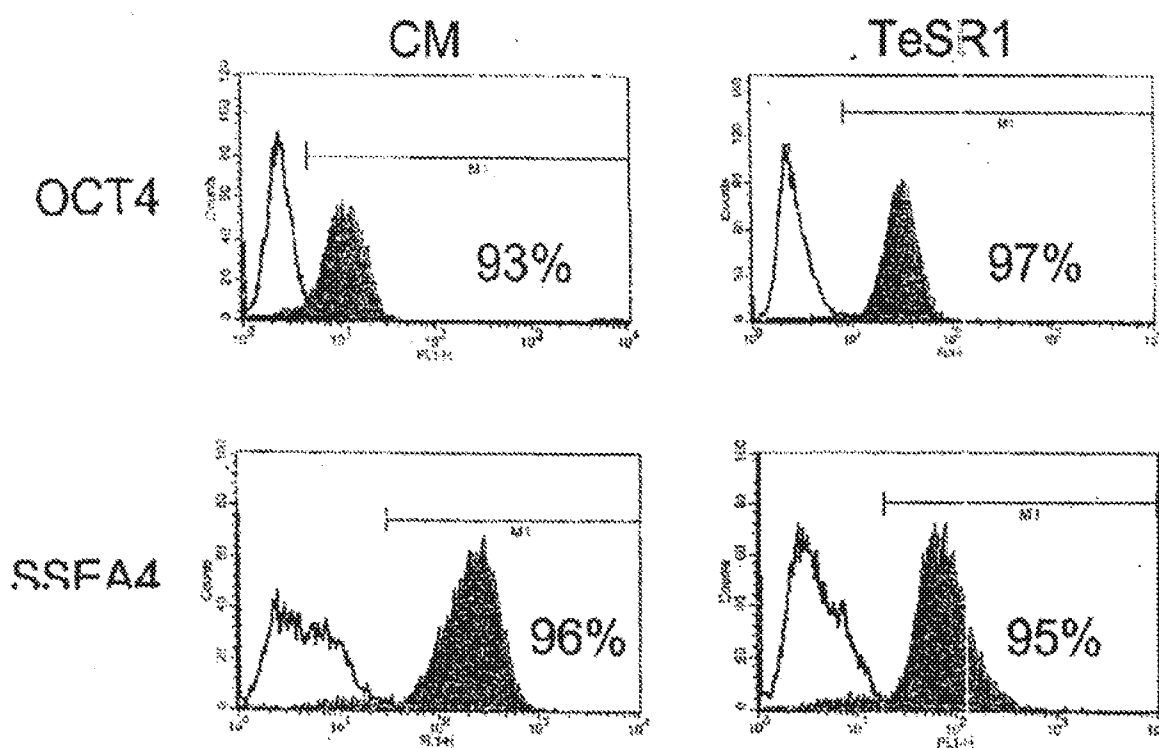


FIG 3

4/4

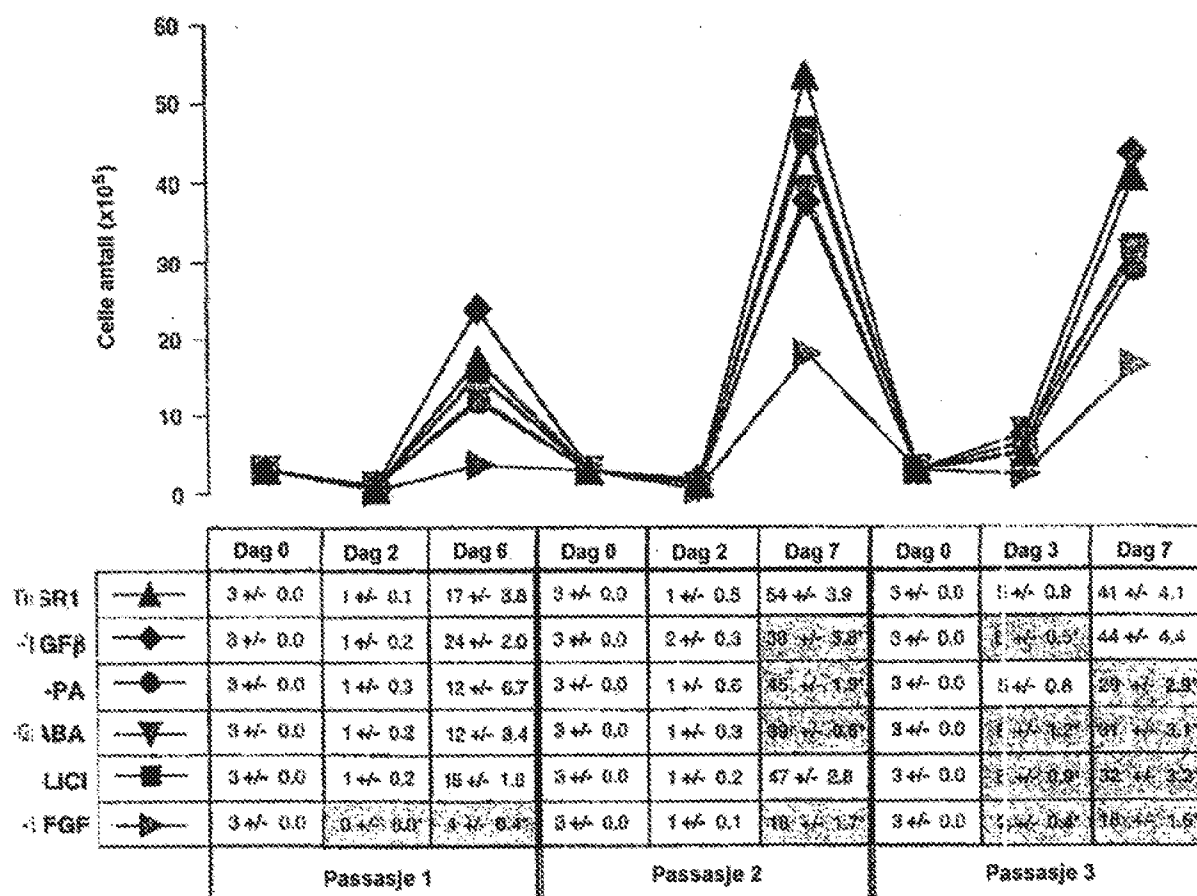


FIG 4