



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **335780**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
C12N 5/0735 (2010.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20024200	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.03.02 PCT/US2001/06912
(22)	Inng.dag	2002.09.03	(85)	Videreføringsdag	2002.09.03
(24)	Løpedag	2001.03.02	(30)	Prioritet	2000.03.09, US, 522030
(41)	Alm.tilgj	2002.09.03			
(45)	Meddelt	2015.02.16			
(73)	Innehaver	Wisconsin Alumini Research Foundation, P O Box 2113, Madison, WI 53707-7365, USA			
(72)	Oppfinner	James A Thomson, 1807 Regent Street, US-WI53705 MADISON, USA			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Dyrkningssystem for å dyrke primate embryonale stamceller			
(56)	Anførte publikasjoner	DE 19756864 C1 ISTKOVITZ-ELDOR, J. et al., Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers, Molecular Medicine, februar 2000, Vol.6, Nr.2, sider 88-95. THOMSON, J.A. et al, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, Science, 1998, Vol.282, side 1145-1147. WO 9920740 A2 US 5405772 A US 5750376 A WO 9830679 A1 MUMMERY, CL et al, Fibroblast growth factor-mediated growth regulation and receptor expression in embryonal carcinoma and embryonic stem cells and human germ cell tumors, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, vol.191, nr.1, side 188-195.			
(57)	Sammendrag				

Fremgangsmåte for å dyrke primate embryonale stamceller. Disse celler dyrkes på en langtids og stabil basis i nærvær av eksogent tilført fibroblast vekstfaktor og i fravær av dyreserum. Fortrinnsvis er det også et fibroblastnæringslag. Det beskrives også et dyrkingsmedium inneholdende fibroblastnæringslag og fibroblastvekstfaktor.

OPPFINNELSENS BAKGRUNN

Foreliggende oppfinnelse angår et dyrkningssystem for å dyrke primate embryonale stamceller.

5

Primate (for eksempel ape og menneske) pluripotente embryonale stamceller er avledet fra preimplantasjonsembryoer. Se U.S. patent 5 843 780 og J. Thomson et al., 282 Science 1145-1147 (1998). Til tross for langvarig dyrking opprettholder disse celler et stabilt utviklingspotensiale for å danne utviklede derivater av alle de tre embryonale

10

kimlag.

Primate (i særdeleshet humane) ES-cellelinjer har bred anvendelse i forbindelse med human utviklingsbiologi, nye medikamenter, medikamentutprøving og transplantasjonsmedisin. Nåtidens kunnskap om det humane post-implantasjonsembryo

15

er hovedsakelig basert på et begrenset antall av statiske histologiske snitt. På grunn av etiske betraktninger er fortsatt de underliggende mekanismer som kontrollerer utviklingsmessige beslutningsprosesser hos et humant embryo i tidlig stadium i hovedsak ikke utforsket.

20

Selv om mus er støttespiller ved eksperimentell pattedyrutviklingsbiologi, og selv om mange av de fundamentale mekanismer som kontrollerer utviklingen er konserverert mellom mus og menneske, finnes det betydelig forskjeller mellom den tidlige utviklingen hos mus og menneske. Primate/humane ES-celler bør derfor gi viktig ny innsikt i deres differensiering og funksjon.

25

Differensierte derivater av primate ES-celler kan anvendes for å identifisere genmål for nye medikamenter, til å teste toksikologi eller teratogenisitet av nye forbindelser, og ved transplantasjon for å erstatte cellepopulasjoner ved sykdom. Potensielle tilstander som kan behandles ved transplantasjon av ES-cellederiverte celler inkluderer Parkinsons

30

sykdom, hjerteinfarkt, juvenil diabetes mellitus og leukemi. Se for eksempel J. Rossant et al. 17 Nature Biotechnology 23-4 (1999) og J. Gearhart, 282 Science 1061-2 (1998).

Langtids proliferativ kapasitet, utviklingspotensiale etter langvarig dyrkning og karyotyp stabilitet er nøkkeltrekk med hensyn på anvendbarheten av primate

35

embryonale stamcellekulturer. Kulturer av slike celler (spesielt på fibroblast næringslag) har typisk blitt tilsatt dyreserum (spesielt føtalt bovint serum) for å muliggjøre den ønskede proliferering under slik dyrking.

I U.S. patent 5 453 357, 5 670 372 og 5 690 296 ble for eksempel ulike dyrkingsbetingelser beskrevet, inkludert noen som anvender en type av basiske fibroblastvekstfaktorer sammen med dyreserum. Dessverre har serum tendens til å ha varierende egenskaper fra produksjonsserie til produksjonsserie, som følgelig påvirker
5 dyrkingsegenskapene.

I WO 98/30679 ble det diskutert å frembringe et serumfritt tilskudd som skulle erstatte dyreserum, for å understøtte vekst av visse embryonale stamceller i kulturen. Serumerstatningen inkluderte albuminer eller albuminerstatninger, en eller flere
10 aminosyrer, en eller flere vitaminer, en eller flere transferiner eller transferinerstattere, en eller flere antioksidanter, en eller flere insuliner eller insulinerstattere, en eller flere kollagenforløpere, og et eller flere sporelementer. Det ble bemerkt at denne erstatning ytterligere kunne tilføres leukemiinhiberende faktor, herdefaktor eller ciliar neurotrof faktor. Innen området primate embryonale stamcellekulturer (spesielt de dyrket på
15 fibroblastnæringslag) viste disse kulturmediene dessverre ikke tilfredsstillende resultat.

Innen området nærende serumdyringsmedier (for eksempel føtalt bovint serum) diskuterer WO 99/20741 fordelene ved anvendelse av ulike vekstfaktorer slik som bFGF, ved dyrking av primate stamceller. Dyrkingsmedier uten nærende serum er imidlertid
20 ikke beskrevet.

I U.S. patent 5 405 772 beskrives vekstmedier for hematopoetiske celler og benmargstromaceller. Der antydes anvendelse av fibroblastvekstfaktor i et serumfattig medium for denne hensikt. Betingelsene for vekst av primate embryonale stamceller er
25 imidlertid ikke beskrevet.

Det er derfor fortsatt et behov for teknikker for stabil dyrking av primate embryonale stamceller uten behov for anvendelse av dyreserum.

30 KORT OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Oppfinnelsen tilveiebringer et dyrkningssystem for å dyrke primate embryonale stamceller omfattende: et fibroblastnæringslag; og fra 0,1 ng/ml til 500 ng/ml basisk fibroblastvekstfaktor tilført fra annet enn kun fibroblastnæringslaget; der
35 dyrkningssystemet er fritt for animalsk serum.

Heri beskrevet er en fremgangsmåte for å dyrke primate embryonale stamceller. Stamcellene dyrkes i en kultur hovedsakelig fri for pattedyr føtalt serum (fortrinnsvis også hovedsakelig fritt for et hvilket som helst serum) og i nærvær av fibroblastvekstfaktor som er fremskaffet fra en kilde forskjellig fra bare et fibroblastnæringslag. Kulturen har også et fibroblastnæringslag.

Fibroblastvekstfaktorer er essensielle molekyler for pattedyrutvikling. Det finnes for tiden ni kjente fibroblast vekstfaktorligander og fire signalfibroblast vekstfaktorreseptorer for disse (og deres spleisevarianter). Se generelt D. Ornitz *et al.*, 25 J. Biol. Chem. 15292-7 (1996); U.S. patent 5 453 357. Små variasjoner i disse faktorer er forventet å eksistere mellom arter, og følgelig er betegnelsen fibroblast vekstfaktor ikke artsbegrenset. Det anvendes allikevel fortrinnsvis human basisk fibroblastvekstfaktor, helst human basisk fibroblastvekstfaktor fremstilt fra et rekombinant gen. Denne forbindelse er lett tilgjengelig i mengder fra Gibco BRL-Life Technologies og andre.

Det bør bemerkes at for hensikter ifølge dette patent er kulturen fri for det spesifiserte serum. Poenget er at når serum selv tilsettes oppstår problemer rundt variasjon.

De primate embryonale stamceller som kan dyrkes ved anvendelse av denne fremgangsmåte er humane embryonale stamceller som er sanne ES-cellelinjer ved at de: (i) er i stand til uendelig proliferering *in vitro* i en udifferensiert tilstand; (ii) er i stand til differensiering til derivater av alle tre embryonale kimlag (endoderm, mesoderm og ektoderm) selv etter lagvarig dyrking; og (iii) opprettholder en normal karyotype gjennom langvarig dyrking. De betegnes derfor pluripotente.

Dyrkingen tillater de embryonale stamceller å proliferere stabilt i kultur i over en måned (fortrinnsvis over seks måneder; mer foretrukket over tolv måneder) samtidig som stamcellenes potensiale til å differensiere til derivater av endoderm-, mesoderm- og ektodermvev opprettholdes, og stamcellenes karyotype opprettholdes.

En annen fremgangsmåte for å dyrke primate embryonale stamceller er også beskrevet. Stamcellene dyrkes i en kultur hovedsakelig fri for føtalt pattedyr serum (fortrinnsvis også hovedsakelig fritt for et hvilket som helst dyreserum) og i nærvær av en vekstfaktor som er i stand til å aktivere en fibroblast vekstfaktors signalreseptor, der vekstfaktoren er tilført fra en kilde forskjellig fra kun et fibroblastnæringslag. Mens vekstfaktoren fortrinnsvis er en fibroblastvekstfaktor kan den også være andre substanser slik som visse syntetiske små peptider (for eksempel fremstilt ved

rekombinante DNA-varianter eller mutanter) utformet for å aktivere fibroblastvekstfaktorreseptorer. Se generelt T.Yamaguchi *et al.*, 152 Dev. Biol. 75-88 (1992) (signalreseptorer).

- 5 Oppfinnelsen tilveiebringer et kultursystem for dyrking av primate embryonale stamceller. Det har et fibroblast nærlingslag og human basisk fibroblastvekstfaktor i en konsentrasjon på fra 0,1 ng/ml til 500 ng/ml tilsatt fra annet enn kun fibroblastnæringslaget. Dyrkingssystemet er fritt for dyreserum.
- 10 Det er også beskrevet cellelinjer (fortrinnsvis klonede cellelinjer) derivert ved anvendelse av fremgangsmåten ovenfor. "Derivert" anvendes i sin bredeste betydning for å dekke direkte eller indirekte deriverte linjer.

15 Variasjoner i resultater på grunn av forskjeller mellom produksjonsseriene av dyreserum unngås således. Videre er det funnet at ved å unngå anvendelse av dyreserum mens det anvendes fibroblastvekstfaktor kan effektiviteten av kloningen økes.

Det er derfor en fordel ifølge foreliggende oppfinnelse å frembringe dyrkingsbetingelser for primate embryonale stamcellelinjer, der betingelsene er mindre variable og tillater
20 mer effektiv kloning. Andre fordeler ifølge foreliggende oppfinnelse vil bli tydelige etter studering av beskrivelsen og kravene.

DETALJERT BESKRIVELSE AV FORETRUKNE UTFØRELSESFORMER

25 I de følgende referanseeksperimenter anvendes fremgangsmåtene beskrevet heri og dyrkingssystemene ifølge oppfinnelsen for å dyrke humane ES-cellelinjer. To klonalt avledete humane ES-cellelinjer prolifererte i over åtte måneder etter klonal derivering og opprettholdt evnen til å differensiere til utviklede derivater av alle tre embryonale kimlag.

30

Teknikker for initial derivering, dyrking og karakterisering av den humane ES-cellelinje H9 ble beskrevet i J. Thomson *et al.*, *Scoemce* 1145-1147 (1998). Ved eksperimentene her i dokumentet ble humane ES-celler deretter sådd ut på bestrålte (35 gray gamma-bestråling) museembryonale fibroblaster. Dyrkingsmediet for det foreliggende arbeid
35 bestod av 80% "KnockOut" Dulbeco's modifiserte Eagle's medium (DMEM) (Gibco BRL, Rockville, MD), 1 mM L-Glutamin, =, 1 mM β -merkaptotetanol, og 1% stamløsning av ikke-essensielle aminosyrer (Gibco BRL, Rockville, MD), tilsatt enten

20% føtalt bovint serum (HyClone, Logan, UT) eller 20% KnockOut SR, en serumfri erstatning opprinnelig optimalisert for muse ES-celler (Gibco BRL, Rockville, MD). Bestanddelene i KnockOut SR er de beskrevet for serumerstatningene i WO 98/306789.

- 5 I alternative eksperimenter ble medium tilsatt enten serum eller den tidligere nevnte serumerstatting KnockOut SR, og enten med eller uten human rekombinant basisk fibroblastvekstfaktor (bFGF, 4 ng/ml). Det foretrukne konsentrasjonsområde til bFGF i kulturen er mellom 0,1 ng/ml til 500 ng/ml.
- 10 For å bestemme kloningseffektiviteten under varierende dyrkingsbetingelser ble H-9-kulturer skilt til enkeltceller i 7 minutter ved 0,05% trypsin/0,25% EDTA, vasket ved sentrifugering og sådd ut på mitotisk inaktiverede museembryonale fibroblaster (10^5 ES-celler per brønn av en 6-brønns plate). For å bekrefte vekst fra enkeltceller for
- 15 observasjon under stereomikroskop og overført ved mikropipette til individuelle brønner av en 96-brønns plate inneholdende museembryonale fibroblastceller med medium inneholdende 20% serumerstatting og 4 ng/ml bFGF.

- Kloner ble ekspandert ved rutinemessig passasje hver 5-7 dag med 1 mg/ml kollagenase type IV (Gibco BRL, Rockville, MD). Seks måneder etter derivering hadde H9-cellene
- 20 en normal XX-karyotype ved standard G-båndteknikker (20 kromosomale påføringer analysert). Syv måneder etter derivering hadde imidlertid, i en enkelt karyotype tilberedning, 16/20 kromosomale påføringer en normal XX-karyotype, men 4/20 påføringer viste tilfeldige unormaliteter, inkludert en med en translokasjon til den korte
- 25 armen av kromosom 13, en med et invertert kromosom 20, en med en translokasjon til den korte armen av nr. 4 og en med multippel fragmentering. Deretter ved 8, 10 og 12,75 måneder etter derivering hadde H9-cellene normale karyotyper i alle de 20 undersøkte kromosomale påføringer.

- 30 Det ble observert at kloningseffektiviteten til humane ES-celler ved tidligere beskrevne dyrkingsbetingelser som inkluderte dyreserum var dårlig (uavhengig av tilstedeværelse eller fravær av bFGF). Det ble også observert at ved fravær av dyreserum økte kloningseffektiviteten, og økte enda mer med bFGF.

- 35 Dataene uttrykt nedenfor er det totale antall kolonier som resulterte fra 10^5 enkeltcellede ES-celler utsådd, +/- standardfeil (prosent kolonikloningseffektivitet). Med 20% føtalt serum og uten bFGF var et resultat 240 +/- 28. Med 20% serum og bFGF var resultatet

omtrent det samme, 260 +/- 12. I fravær av serum (med 20% serumerstatte) var resultatet uten bFGF 633 +/- 43 og resultatet med bFGF 826 +/- 61. Følgelig påvirket serum kloningseffektiviteten på en skadelig måte, og tilstedeværelse av bFGF i fravær av serum hadde en tilleggsvise synergistisk fordel med hensyn på kloningseffektivitet.

5

Langtidsdyrking av humane ES-celler i nærvær av serum krever ikke tilsetning av eksogent tilført bFGF, og (som bemerket ovenfor) tilsetning av bFGF til seruminnholdende medium øker ikke betydelig human ES-cellekloningseffektivitet. I serumfritt medium økte imidlertid bFGF den initiale kloningseffektiviteten til humane

10

ES-celler.

Videre er det funnet at tilførsel av eksogent bFGF er svært viktig for vedvarende uddifferensiert proliferering av primate embryonale stamceller i fravær av dyreserum. I serumfritt medium som mangler eksogent bFGF var humane ES-celler enhetlig

15

differensiert ved 2 ukers dyrking. Tilsetning av andre faktorer slik som LIF (i fravær av bFGF) forhindret ikke differensiering.

De oppnådde resultater er særlig anvendelige for klonede linjer. I denne sammenheng ble kloner for ekspansjon utvalgt ved å plassere celler enkeltvis i brønner av en 96-brønns plate under direkte mikroskopisk observering. Av 192 H-9-celler utsådd til

20

brønner av 96 brønns plater ble to kloner ekspandert med godt resultat (H-9.1 og H-9.2). Begge disse kloner ble deretter dyrket kontinuerlig i mediet tilsatt serumerstatte og bFGF.

25

H9.1- og H9.2-celler bibeholdt begge en normal XX-karyotype selv etter mer enn 8 måneder kontinuerlig dyrking etter kloning. H-9.1- og H-9.2-klonene bibeholdt potensialet til å danne derivater av alle tre embryonale kimlag selv etter langtids dyrking i serumfritt medium. Etter 6 måneders dyrking ble det bekreftet at H9.1- og H9.2-klonene hadde normale karyotyper og ble deretter injisert til SCID-beige mus.

30

Både H9.1- og H9.2-celler dannet teratomer som inneholdt derivater av alle tre embryonale kimlag inkludert tarmepitel (endoderm) embryonal nyre, tverrstripet muskel, glatt muskel, ben, brusk (mesoderm) og nervevev (ektoderm). Differensieringsspekteret observert i teratomene av de høyeste passasjene av H9.1- og H9.2-celler var

35

sammenliknbare med de observert i teratomer dannet ved lavere passasjer av opprinnelige H9-celler.

Det bør forstås av beskrivelsen ovenfor at mens dyreserum understøtter vekst er den en sammensatt blanding som kan inneholde forbindelser både gunstige og ugunstige for humane ES-cellekultur. Videre varierer de ulike serumproduksjonsseriene mye i deres evne til å understøtte kraftig uddifferensiert proliferering av humane ES-celler. Erstatning
5 av serum med en klart definert komponent reduserer variasjonen av resultatene forbundet med dette serums batch-variasjoner, og bør muliggjøre mer omhyggelig definerte differensieringsstudier.

Videre antyder den lavere kloningseffektivitet i medium inneholdende serum nærvær av
10 forbindelser i konvensjonelt anvendt serum som er skadelig for stamcelleoverlevelse, spesielt når cellene er dispergert til enkeltceller. Det å unngå anvendelse av disse forbindelser er derfor svært ønskelig.

Foreliggende oppfinnelse er blitt beskrevet ovenfor med hensyn på dens foretrukne
15 utførelsesformer. For eksempel, selv om rekombinant fremstilt human basisk fibroblastvekstfaktor ble anvendt i ovennevnte eksperimenter bør naturlig isolert fibroblastvekstfaktor også være egnet. Videre bør også disse teknikker vise seg å være egnet for anvendelse på ape og andre primatcellekulturer.

20 Følgelig bør kravene ses på for å vurdere den fullstendige ramme av foreliggende oppfinnelse.

P a t e n t k r a v

1.

Dyrkningssystem for å dyrke primate embryonale stamceller, karakterisert ved at det
5 omfatter:

et fibroblastnæringslag; og

fra 0,1 ng/ml til 500 ng/ml basisk fibroblastvekstfaktor tilført fra annet enn kun
fibroblastnæringslaget;

der dyrkningssystemet er fritt for animalsk serum.

10

2.

Dyrkningssystem ifølge krav 1, der den basiske fibroblastvekstfaktoren er human basisk
fibroblastvekstfaktor som er fremstilt fra et rekombinant gen.

15 3.

Dyrkningssystem ifølge krav 1 eller 2, der de primate embryonale stamcellene er
humane embryonale stamceller.