



(12) Translation of
european patent specification

(11) NO/EP 2393917 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 5/073 (2010.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2016.08.15
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2016.04.06
(86)	European Application Nr.	10703131.2
(86)	European Filing Date	2010.02.03
(87)	The European Application's Publication Date	2011.12.14
(30)	Priority	2009.02.03, EP, 09151970 2009.09.30, EP, 09171831 2009.02.03, US, 149622 P
(84)	Designated Contracting States:	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
	Designated Extension States:	AL BA RS
(73)	Proprietor	Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Kloveniersburgwal 29, 1011 JV Amsterdam, NL-Nederland
(72)	Inventor	SATO, Toshiro, Langestraat 32a, 1211 GZ Hilversum, NL-Nederland CLEVERS, Johannes, Carolus, Ruysdaellaan 7, 3712 AP Huis ter Heide, NL-Nederland HUCH ORTEGA, Meritxell, Willem Barentszstraat 25II, 3572 PB Utrecht, NL-Nederland
(74)	Agent or Attorney	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua , 0306 OSLO, Norge

(54)	Title	CULTURE MEDIUM FOR EPITHELIAL STEM CELLS AND ORGANOIDS COMPRISING SAID STEM CELLS
(56)	References Cited:	WO-A-2008/101215 ABUD H E ET AL: "Growth of intestinal epithelium in organ culture is dependent on EGF signalling" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, ACADEMIC PRESS, US, vol. 303, no. 2, 15 February 2005 (2005-02-15), pages 252-262, XP004709265 ISSN: 0014-4827 BJERKNES MATTHEW ET AL: "Intestinal epithelial stem cells and progenitors" METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEMIC PRESS INC, SAN DIEGO, CA, US, vol. 419, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 337-383, XP009101698 ISSN: 0076-6879 BOOTH C ET AL: "Maintenance of functional stem cells in isolated and cultured adult intestinal epithelium" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, ACADEMIC PRESS, US, vol. 249, no. 2, 15 June 1999 (1999-06-15), pages 359-366, XP002232585 ISSN: 0014-4827 HARAMIS ANNA-PAVLINA G ET AL: "De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine." SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 303, no. 5664, 12 March 2004 (2004-03-12), pages 1684-1686, XP002529276 ISSN: 0036-8075 KIM K-A ET AL: "Mitogenic Influence of Human R-Spondin1 on the Intestinal Epithelium" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, WASHINGTON, DC, vol. 309, 19 August 2005 (2005-08-19), pages 1256-1259, XP003014398

ISSN: 0036-8075

BARKER N ET AL: "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1038/NATURE06196, vol. 449, 25 October 2007 (2007-10-25), pages 1003-1008, XP002457164 ISSN: 0028-0836

SATO TOSHIRO ET AL: "Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche." NATURE 14 MAY 2009, vol. 459, no. 7244, 14 May 2009 (2009-05-14), pages 262-265, XP002529277 ISSN: 1476-4687

LIU Y ET AL: "A novel chemical-defined medium with bFGF and N2B27 supplements supports undifferentiated growth in human embryonic stem cells", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 346, no. 1, 21 July 2006 (2006-07-21) , pages 131-139, XP024925297, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2006.05.086 [retrieved on 2006-07-21]

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for dyrking av tarm eller tynntarm epiteliale stamceller, eller vevsfragmenter omfattende nevnte epiteliale stamceller, for eksempel isolerte tarmkrypter eller tynntarmkrypter, hvor fremgangsmåten omfatter
 - 5 å fremskaffe en ekstracellulær matrise;
 - å inkubere tarm eller tynntarm epiteliale stamceller eller vevsfragmenter omfattende nevnte epiteliale stamceller, for eksempel isolerte tarm-krypter eller tynntarm-krypter med den ekstracellulære matrise; og
 - dyrke de tarm eller tynntarm epiteliale stamceller eller vevsfragmenter
 - 10 omfattende nevnte epiteliale stamceller, for eksempel isolerte tarmkrypter eller tynntarm-krypter, ved nærvær av et cellekulturmedium omfattende et basalmedium for animalske eller humane celler til hvilket det er tilsatt:
 - en ben-morfogent protein (BMP) inhibitor; og
 - mellom 5 og 500 ngram/ml av mitogen vekstfaktor valgt fra epidermal
 - 15 vekstfaktor (EGF), transformerende vekstfaktor-alfa, basisk fibroblast vekstfaktor, hjerne-avledet nevrotrofisk faktor og keratinocyt vekstfaktor;
 - samt eventuelt en Wnt-agonist.

2. Fremgangsmåte for fremstilling av et organoid og/eller dyrking av tarm eller tynntarm epiteliale stamceller eller vevsfragmenter omfattende nevnte epiteliale
 - 20 stamceller, for eksempel isolerte tarmkrypter eller tynntarmkrypter, ifølge krav 1, hvor:
 - tarm eller tynntarm epiteliale stamceller eller vevsfragmenter omfattende nevnte epiteliale stamceller, for eksempel isolerte tarmkrypter eller tynntarmkrypter, dyrkes i kontakt med en ekstracellulær matrise i et medium
 - 25 omfattende Noggin og EGF samt eventuelt R-spondin 1 og/eller Wnt-3 som Wnt-agonist.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller krav 2, hvor tarm- eller tynntarm epitelial stamcellene er normale epitelialceller eller adenom-celler hvorved en Wnt-agonist tilsettes dersom normale epitelialceller blir dyrket.

- 30 4. Fremgangsmåte ifølge krav 1 til 3, hvor:
 - a) nevnte BMP-inhibitor er valgt fra Noggin, DAN og DAN-liknende proteiner innbefattende Cerberus og Gremlin; og/eller
 - b) nevnte Wnt-agonist er valgt fra én eller flere av Wnt, enhver av R-spondin 1-4, Norrin og en GSK-inhibitor; og/eller

- c) nevnte Wnt-agonist omfatter enhver av R-spondin 1-4 og/eller Wnt-3a; og/eller
- d) nevnte mitogene vekstfaktor er EGF.

5. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 til 4:

- 5 a) hvor BMP-inhibitoren er Noggin, den mitogene vekstfaktor er epidermal vekstfaktor og Wnt-agonisten er enhver av R-spondin 1-4; og/eller
- b) hvor nevnte dyrkingsmedium ytterligere omfatter en Rock (Rho-kinase)-inhibitor valgt fra Y-27632, Fasudil og H-1152; og/eller
- c) hvor nevnte dyrkingsmedium ytterligere omfatter en notch-agonist.

- 10 **6.** Fremgangsmåte for å oppnå et organoid ved å dyrke tarm- eller tynntarm epiteliale stamceller eller vevsfragmenter omfattende nevnte epiteliale stamceller, for eksempel isolerte tarmkrypter eller tynntarmkrypter, ved å anvende en fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 til 5, hvor nevnte tarm eller tynntarm epiteliale stamceller eller vevsfragmenter omfattende nevnte epiteliale stamceller,
- 15 for eksempel isolerte tarmkrypter eller tynntarmkrypter, dyrkes i kontakt med en ekstracellulær matrise i et medium omfattende Noggin, EGF og R-spondin 1 og/eller Wnt-3 som Wnt-agonist, supplementert med B27, N2 og N-acetylcystein.

- 7.** Tredimensjonalt tynntarm-organoid omfattende krypt-liknende domener som omslutter et sentralt lumen kledd med villus-liknende epitelial-domener og fylt
- 20 med apoptotiske cellelegemer og inneholdende intestinale stamceller som er polarisert og som ligger i basis av strukturene som kan aktivt dele seg og gi opphav til alle hoved-differensierte cellelinjer som er til stede i tarmen og hvor nevnte organoid kan fremskaffes ved en fremgangsmåte som definert i ethvert av kravene 1 til 6.

- 25 **8.** Samling av flere enn 10 krypt-villus organoider hvor hvert organoid omslutter et sentralt lumen kledd med et villus-liknende epitel, hvor lumen er fylt med apoptotiske cellelegemer og hvor cellene i krypt-villus organoidet er polariserte hvor stamcellene oppholder seg i basis av strukturene og hvor nevnte organoid kan fremskaffes ved en fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 til 6.

- 30 **9.** Tre-dimensjonalt organoid omfattende krypt-liknende domener som omgir et sentralt lumen kledd med villus-liknende domener som er epitelial-domener omfattende differensierte celletyper og hvor ikke-epitelial-celler er fraværende fra

nevnte organoid og hvor nevnte organoid kan fremskaffes ved en fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 til 6.

- 5 **10.** Tre-dimensjonalt organoid ifølge krav 7 eller krav 9, hvor organoidet er avledet fra én eller flere adenom-celler og har en ballong-liknende struktur hvor cellene er tilfeldig orientert mot enten periferien eller det sentrale lumen.
- 11.** Anvendelse av organoid ifølge krav 7, 9 eller 10 i en medikament-oppdagende utvelgelse, toksisitets-assay eller i regenerativ medisin.