



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2718422 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/09 (2010.01)
G01N 33/50 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21) Translation Published 2018.01.22

(80) Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent 2017.09.06

(86) European Application Nr. 12729741.4

(86) European Filing Date 2012.06.11

(87) The European Application's Publication Date 2014.04.16

(30) Priority 2011.06.30, GB, 201111244
2011.06.10, US, 201161520569 P
2011.06.30, US, 201161571663 P
2011.07.29, US, 201113194866
2011.07.29, US, 201161513461 P
2012.02.02, US, 201261594295 P

(84) Designated Contracting States: AL ; 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 ; RS ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR

Designated Extension States: BA ME

(73) Proprietor Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (KNAW), Hubrecht Institute Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, NL-Nederland

(72) Inventor CLEVERS, Johannes Carolus, c/o Hubrecht Institute Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, NL-Nederland
SATO, Toshiro, c/o Hubrecht Institute Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, NL-Nederland
HUCH ORTEGA, Meritxell, c/o Hubrecht Institute Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, NL-Nederland
KARTHAUS, Wouter Richard, c/o Hubrecht Institute Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, NL-Nederland

(74) Agent or Attorney Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, Norge

(54) Title **CULTURE MEDIA FOR STEM CELLS**

(56) References Cited: TOSHIRO SATO ET AL: "Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER,

PHILADELPHIA, PA, vol. 141, no. 5, 27 July 2011 (2011-07-27) , pages 1762-1772, XP028325676, ISSN: 0016-5085, DOI: 10.1053/J.GASTRO.2011.07.050 [retrieved on 2011-09-02], SAIYONG ZHU ET AL: "Chemical Strategies for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine", ANNUAL REVIEW OF BIOMEDICAL ENGINEERING, vol. 13, no. 1, 20 April 2011 (2011-04-20) , pages 73-90, XP055047409, ISSN: 1523-9829, DOI: 10.1146/annurev-bioeng-071910-124715, WO-A2-2012/014076, WO-A2-2010/090513

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/>

P a t e n t k r a v

1. Dyrkningsmedium for utvidelse av en populasjon av voksne epiteliale stamceller, hvor nevnte dyrkningsmedium omfatter et basalmedium til hvilket det er tilsatt:
 - i. en agonist for Lgr5;
 - ii. en BMP-inhibitor og
 - iii. En eller flere TGF-beta inhibitorer som binder til og reduserer aktiviteten av ALK5, ALK4 og/eller ALK7.
2. Dyrkningsmedium ifølge krav 1, hvor den ene eller flere TGF-beta-inhibitorene er valgt fra gruppen bestående av A83-01, SB-431542, SB-505124, SB-525334, SD-208, LY-36494 og SJN-2511.
3. Dyrkningsmedium ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor TGF-beta-inhibitoren er tilsatt ved en konsentrasjon på mellom 1 nM og 100 µM, mellom 10 nM og 100 µM, mellom 100 nM og 10 µM eller for eksempel omkring 1 µM, hvor den totale konsentrasjonen av den ene eller flere inhibitorer er mellom 10 nM og 100 µM, mellom 100 nM og 10 µM eller omkring 1 µM.
4. Dyrkningsmedium ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor agonisten av Lgr5 er enhver av Respondin 1-4.
5. Dyrkningsmedium ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor dyrkningsmediet omfatter en eller flere ytterligere komponenter valgt fra:
 - en ytterligere Wnt-agonist, for eksempel valgt fra gruppen bestående av Wnt-3a, en GSK-inhibitor så som CHIR99021, Wnt 5, Wnt-6a, Norrin eller ethvert annet Wnt-familie-protein;
 - en reseptor tyrosin-kinase-ligand for eksempel valgt fra en familie av vekstfaktorer bestående av epidermal vekstfaktor (EGF), Transformerende vekstfaktor alfa (TGF-alfa), basisk Fibroblast Vekstfaktor (bFGF), hjerne-avledet neurotrofisk faktor (BDNF), Hepatocyt vevstfaktor (HGF) og Keratinocyt vevstfaktor (KGF),
 - nikotinamid;
 - en p38-inhibitor, for eksempel valgt fra gruppen bestående av SB-202190, SB-203580, VX-702, VX-745, PD-169316, RO-4402257 og RIRB-796;
 - en Rock-inhibitor for eksempel valgt fra gruppen bestående av R-(+)-trans-4-(1-aminoetyl)-N-(4-pyridyl)cykloheksankarboksamid-dihydroklorid-monohydrat(Y-27632), 5-(1,4-diazepan-1-ylsulfonyl) isoquinolin (fasudil eller HA1071) og (S)-(+)-2-metyl-1-[(4-metyl-5-isoquinoliny) sulfonyl]-heksahydro-1H-1,4-diazepin-hydroklorid (H-1 152);
 - gastrin;
 - en aktivator av prostaglandin signal-reaksjonsveien for eksempel PGE2 og/eller AA; samt testosteron for eksempel dihydrotestosteron.
6. Dyrkningsmedium ifølge krav 5, hvor dyrkningsmediet er for dyrkning av humane intestinale stamceller, humane tynntarmskryper eller humane tykktarmskryper og hvor dyrkningsmediet omfatter et basalmedium og ytterligere omfatter en BMP-inhibitor, Respondin, en TGF-beta-inhibitor, en ytterligere Wnt-agonist, EGF, en p38-inhibitor, gastrin og nikotinamid.

7. Dyrkningsmedium ifølge krav 5, hvor dyrkningsmediet er for dyrkning av pankreatiske stamceller og hvor dyrkningsmediet omfatter et basalmedium, enhver av Respondin 1-4, Noggin, en TGF-beta-inhibitor, EGF, FGF10, gastrin og foretrukket eksendin 4 og Wnt-3a.
8. Dyrkningsmedium ifølge krav 5, hvor dyrkningsmediet er for dyrking av prostataceller og hvor dyrkningsmediet omfatter et basalmedium, enhver av Respondin 1-4, Noggin, en TGF-beta-inhibitor, nikotinamid, EGF, testosteron og foretrukket Wnt-3a samt FGF10.
9. Dyrkningsmedium ifølge krav 5, hvor dyrkningsmediet er for dyrkning av gastriske celler og hvor dyrkningsmediet omfatter et basalmedium, Noggin, enhver av Respondin 1-4, en TGF-beta-inhibitor, Wnt-3a, EGF, gastrin, nikotinamid, FGF-10 og foretrukket en p38-inhibitor.
10. Dyrkningsmedium ifølge et hvilket som helst av kravene 6 til 9, hvor dyrkningsmediet er for dyrkning av kreftceller og hvor en eller flere av de følgende er ekskludert fra mediet: Wnt-3a, EGF, Noggin, Respondin, TGF-beta-inhibitor, p38-inhibitor, nikotinamid, gastrin, FGF10 og HGF.
11. Sammensetning omfattende et dyrkningsmedium ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10 samt en ekstracellulær matrise eller en 3D-matrise som etteraper den ekstracellulære matrise ved sin interaksjon med cellemembranproteiner så som integriner, for eksempel en laminin-inneholdende ekstracellulær matrise.
12. Hermetisk forseglet beholder inneholdende et dyrkningsmedium eller sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav.
13. Anvendelse av et dyrkningsmedium ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10 for ekspansjon av en epitelial stamcelle eller populasjon av epiteliale stamceller.
14. Fremgangsmåte for ekspansjon av en enkelt epitelial stamcelle eller populasjon av epitelial stamceller for å danne et pattedyr-organoid, hvor fremgangsmåten omfatter å dyrke den enkle epitelial stamcelle, populasjon av epitelial stamceller eller et vevsfragment omfattende nevnte epitelial stamceller i et dyrkningsmedium ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10.
15. Fremgangsmåte ifølge krav 14, hvor fremgangsmåten omfatter:
 - å fremskaffe en epitelial stamcelle, en populasjon av epitelial stamceller eller et isolert vevsfragment;
 - å fremskaffe dyrkningsmediet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11,
 - å sette de epiteliale stamceller, populasjonen av epiteliale stamceller eller vevsfragmentet i kontakt med dyrkningsmediet og
 - dyrke cellene under passende betingelser.
16. Fremgangsmåte ifølge krav 15, hvor nevnte fremgangsmåte omfatter å bringe den epiteliale stamcelle, populasjonen av epiteliale stamceller eller det

isolerte vevsfragment samt dyrkningsmediet i kontakt med en ekstracellulær matrise eller en 3D-matrise som etteraper den ekstracellulære matrise ved sin interaksjon med de cellulære membran-proteiner så som integriner, for eksempel en laminin-inneholdende ekstracellulær matrise..

17. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 14 til 16, hvor fremgangsmåten omfatter:

å dyrke epitelial stamcellen, populasjonen av epiteliale stamceller eller vevsfragment i et første ekspansjonsmedium;

fortsette dyrkning av epitelial stamcellen, populasjonen av epitelial stamceller eller vevsfragmentet og friske opp mediet med et differensieringsmedium hvor differensieringsmediet ikke omfatter en eller flere av, fortrinnsvis alle av faktorene valgt fra: en TGF-beta-inhibitor, en p38-inhibitor, nikotinamid og Wnt.

18. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 14 til 17, hvor en Rock-inhibitor tilsettes dyrkningsmediet i de første 1, 2, 3, 4, 5, 6 eller 7 dager, eventuelt annen hver dag.

19. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 15 til 18, hvor organoidet er et humant organoid.

20. Humant organoid som kan fremstilles ved fremgangsmåten ifølge krav 19, hvor organoidet opprettholder sin struktur etter minst tre måneders dyrkning.

21. Organoid ifølge krav 20, hvor organoidet:

har vært dyrket i minst tre måneder, for eksempel i minst 4 måneder, minst 5 måneder, minst 6 måneder, minst 7 måneder, minst 9 måneder eller minst 12 måneder eller mer;

ekspanderer ved en hastighet på minst 3 ganger, minst 4 ganger, minst 5 ganger, minst 6 ganger, minst 7 ganger, minst 8 ganger, minst 9 ganger eller minst 10 ganger per uke og/eller

som er frossen og lagret under -5°C , under -10°C , under -20°C , under -40°C , under -60°C , under -80°C , under -100°C eller under -150°C , for eksempel ved omkring -180°C .

22. Sammensetning omfattende:

i) et eller flere organoider ifølge et hvilket som helst av kravene 20 til 21 og

ii) et dyrkningsmedium ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10 og/eller en ekstracellulær matrise.

23. Organoid ifølge et hvilket som helst av kravene 20 til 21 eller sammensetning ifølge krav 11 eller krav 22, for anvendelse i medisin, for eksempel personalisert medisin eller regenerativ medisin.

24. Organoid eller sammensetning for anvendelse ifølge krav 23, hvor den regenerative medisin eller personifiserte medisin omfatter transplantasjon av nevnte organoid eller sammensetning inn i et pattedyr, fortrinnsvis inn i et menneske.

25. Anvendelse av organoid ifølge et hvilket som helst av kravene 20 til 21 eller sammensetning ifølge krav 11 eller krav 22 i medikament-utvelgelse, målvalidering, mål-oppdagelse, toksikologi, toksikologi-undersøkelser eller *ex vivo* celle/organmodeller, for eksempel for anvendelse som en sykdomsmodell.

26. Fremgangsmåte for undersøkelse av et terapeutisk eller profylaktisk medikament eller kosmetikum, hvor fremgangsmåten omfatter:

å dyrke et organoid ifølge et hvilket som helst av kravene 20 til 21, for eksempel med et dyrkningsmedium ifølge kravene 1 til 10;

å eksponere nevnte organoid for et eller et bibliotek av kandidat-molekyler;

å evaluere nevnte organoid for en hvilken som helst effekt, for eksempel enhver forandring i en celle så som en reduksjon eller tap av proliferasjon, en morfologisk endring og/eller celledød og

å identifisere kandidatmolekylet som forårsaker nevnte effekter som et potensielt medikament eller kosmetikum.