



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2773748 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 35/30 (2015.01)
C12N 5/0793 (2010.01)
C12N 5/0797 (2010.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2020.04.27
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.12.25
(86)	European Application Nr.	12846715.6
(86)	European Filing Date	2012.11.02
(87)	The European Application's Publication Date	2014.09.10
(30)	Priority	2011.11.04, US, 201161555828 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
(73)	Proprietor	Memorial Sloan Kettering Cancer Center, 1275 York Avenue, New York, NY 10065, USA
(72)	Inventor	STUDER, Lorenz, 415 E. 68th Street, New York, NY 10065, USA SHIM, Jae-Won, 102-806, 19, Mira 2-gil, Seobuk-gu, Cheonan-si, Chungcheongnam-do 31155, Sør-Korea KRIKS, Sonja, 425 Main Street Apt. 4K, New York, NY 10044, USA
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54) Title **MIDBRAIN DOPAMINE (DA) NEURONS FOR ENGRAFTMENT**

(56) References
Cited:

WO-A2-2010/096496, US-A1- 2003 211 605, WO-A1-03/000868

LIN W ET AL: "Foxa1 and Foxa2 function both upstream of and cooperatively with Lmx1a and Lmx1b in a feedforward loop promoting mesodiencephalic dopaminergic neuron development", DEVELOPMENTAL BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 333, no. 2, 15 September 2009 (2009-09-15), pages 386-396, XP026521024, ISSN: 0012-1606, DOI: 10.1016/J.YDBIO.2009.07.006 [retrieved on 2009-07-14]

STUART M CHAMBERS ET AL: "Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 27, no. 3, 1 March 2009 (2009-03-01), pages 275-280, XP55007827, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.1529

COOPER O ET AL: "Differentiation of human ES and Parkinson's disease iPS cells into ventral midbrain dopaminergic neurons requires a high activity form of SHH, FGF8a and specific regionalization by retinoic acid", MOLECULAR AND CELLULAR NEUROSCIENCES, SAN DIEGO, US, vol. 45, no. 3, 1 November 2010 (2010-11-01), pages 258-266, XP027279153, ISSN: 1044-7431 [retrieved on 2010-07-24]

CHAMBERS, STUART M. ET AL.: 'Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling' NATURE BIOTECHNOLOGY vol. 27, no. 3, 01 March 2009, pages 275 - 280, XP055007827

KRIKS, SONJA ET AL.: 'Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease' NATURE vol. 480, no. 7378, 06 November 2011, pages 547 - 551, XP055152305

FASANO, CHRISTOPHER A. ET AL.: 'Efficient Derivation of Functional Floor Plate Tissue from Human Embryonic Stem Cells' CELL STEM CELL vol. 6, no. 4, 02 April 2010, pages 336 - 347, XP055152302

JOKSIMOVIC M ET AL: "Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis", DEVELOPMENTAL BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 331, no. 2, 15 July 2009 (2009-07-15) , pages 507-508, XP026222727, ISSN: 0012-1606, DOI: 10.1016/J.YDBIO.2009.05.449 [retrieved on 2009-06-24]

Christopher A. Fasano ET AL: "Efficient Derivation of Functional Floor Plate Tissue from Human Embryonic Stem Cells", Cell Stem Cell, vol. 6, no. 4, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 336-347, XP055152302, ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/j.stem.2010.03.001

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. *In vitro* fremgangsmåte for å differensiere pluripotente celler i mellomhjernegulvplateforløpere, hvor fremgangsmåten omfatter å eksponere et antall pluripotente celler for: (a) minst en hemmer av Small Mothers Against Decapentaplegic (SMAD) signalering, (b) minst en aktivator av Sonic hedgehog (SHH) signalering og (c) minst en aktivator av vingeløs (Wnt) signalering, hvor:
- eksponering for minst en hemmer av SMAD-signalering begynner på dag 0;
- nevnte pluripotente celler eksponeres for den minst ene aktivatoren av Wnt-signalering 3 dager etter initiering av eksponering for den minst ene hemmeren av SMAD-signalering;
- nevnte pluripotente celler blir eksponert for den minst ene hemmeren av SMAD-signalering, den minst ene aktivatoren av SHH-signalering, og den minst ene aktivatoren av Wnt-signalering i mengder som er effektive for å produsere et antall mellomhjernegulvplateforløperceller, minst 10 % av disse uttrykker både gaffelboksprotein A2 (FOXA2) og LIM homeoboks transkripsjonsfaktor 1 alfa (LMX1A); og
- eventuelt ytterligere å utsette nevnte flertall av differensierte mellomhjernegulvplateforløperceller for forhold som favoriserer modning av mellomhjernegulvplateforløperceller til dopaminnevroner.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor nevnte pluripotente celler er valgt fra gruppen bestående av humane, ikke-menneskelige primater eller gnagere, ikke-embryonale stamceller, embryonale stamceller, induserte ikke-embryonale pluripotente celler og konstruerte pluripotente celler.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, omfattende å bringe pluripotente celler i kontakt med minst en av purmorfamin og/eller CHIR99021.
4. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor nevnte dopamin-nevroner som uttrykker FOXA2 og LMX1A videre uttrykker minst en ytterligere markør valgt fra gruppen bestående av tyrosinhydroksylase (TH), ortodontikkelhomoboks 2 (OTX2), nukleær reseptor relatert 1 protein (NURR1), nevron-spesifikk klasse III beta-tubulin (Tuj1), Trefoil-faktor familie 3 (TTF3), parlignende homeodomain 3 (PITX3), achaete-scute complex (ASCL), tidlig B-celle faktor 1 (EBF-1), tidlig B-celle faktor 3 (EBF-3), transthyretin (TTR), synapsin, dopamintransportør (DAT) og G-protein koblet, innvendig utbedrende

kaliumkanal (Kir3.2/GIRK2), CD142, DCSM1, CD63 og CD99.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor en eller flere av følgende gjelder:

- 5 a. nevnte pluripotente celler er differensiert til nevronceller som uttrykker både gaffelboksprotein A2 (FOXA2) og LIM homeoboks transkripsjonsfaktor 1 alfa (LMX1A) innen 11 dager etter igangsetting av kontakt med minst to hemmere av SMAD-signalering, nevnte minst en aktivator av SHH signalering, og nevnte minst en aktivator av Wnt signalering; eller
- 10 b. nevnte pluripotente celler er differensiert i nevnte dopamin-nevroner senest 25 dager etter initiering av kontakt med minst to hemmere av SMAD-signalering, nevnte minst en aktivator av SHH-signalering, og nevnte minst en aktivator av Wnt-signalering.

- 15 6. Fremgangsmåte ifølge krav 4, hvor minst 20% av nevnte dopamin-nevroner uttrykker FOXA2 og LMX1A og videre uttrykker minst en markør for humane A9-subtype mellomhjernedopamin-nevroner valgt fra gruppen bestående av Girk2, CD142 og DCSM1.

- 20 7. Fremgangsmåte ifølge krav 4, videre omfattende å velge en populasjon av dopamin-nevroner som uttrykker CD142 eller DCM1 eller begge.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor en eller flere av følgende gjelder:

- 25 a. nevnte minst en hemmer av SMAD-signalering er valgt fra gruppen bestående av LDN-193189, SB431542, Noggin, dorsomorfin og kombinasjoner av to eller flere av de foregående;
- b. nevnte minst en aktivator av SHH-signalering er valgt fra gruppen bestående av purmorfamin, rekombinant SHH, rensset SHH, glattede agonister (SAG) og kombinasjoner av to eller flere av de foregående;
- 30 c. nevnte minst en aktivator av Wnt-signalering er valgt fra gruppen bestående av CHIR99021, Wnt3A og Wntl og kombinasjoner av to eller flere av de foregående.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor nevnte differensierte forløperceller i mellomhjernegulvplateforløperceller som uttrykker FOXA2 og LMX1A ikke uttrykker minst en markør valgt fra gruppen bestående av PAX6, HES5, EMX2 og LHX2.

35

10. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor forholdene som favoriserer modning av mellomhjernegulvplateforløpere til dopamin-nevroner, omfatter å bringe

mellomhjernegulvplateforløpere i kontakt med N2-medium, hjerneavledet nevrotrofisk faktor (BDNF), askorbinsyre (AA), glialcelle line-avledet nevrotrofisk faktor (GDNF), dibutyryl cAMP (dbcAMP) og transformerende vekstfaktortype $\beta 3$ (TGF $\beta 3$).

- 5 11. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor den minst ene inhibatoren av Small Mothers Against Decapentaplegic (SMAD) signalering omfatter minst en inhibitor av TGF β /Activin-Nodal signalering og minst en inhibitor av signal fra beinmorfogenetisk protein (BMP).
- 10 12. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor den minst ene aktivatoren for vingeløs (Wnt) signalering omfattende en inhibitor av glykogensyntasekinase 3 β (GSK3 β) signalering.