



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.24

(21) Номер заявки
201491526

(22) Дата подачи заявки
2013.02.11

(51) Int. Cl. **C12N 5/076** (2010.01)
A61K 35/52 (2006.01)
C12N 15/873 (2010.01)
C12N 5/071 (2010.01)

**(54) СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БЫЧЬИХ И СВИНЫХ СПЕРМАТОГОНИАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК БЕЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КЛЕТОК-ФИДЕРОВ**

(31) **61/598,437**

(32) **2012.02.14**

(33) **US**

(43) **2014.12.30**

(86) **PCT/US2013/025537**

(87) **WO 2013/122864 2013.08.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ВАШИНГТОН СТЕЙТ
ЮНИВЕРСИТИ (US)**

(72) Изобретатель:
**Оатли Джон Майкл, Оатли Мелисса
Джоан (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) M. KANATSU-SHINOHARA: "Long-Term Culture of Mouse Male Germline Stem Cells Under Serum-or Feeder-Free Conditions", *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, vol. 72, no. 4, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 985-991, XP055061726, ISSN: 0006-3363, DOI: 10.1095/biolreprod.104.036400 the whole document, page 986; MATERIALS AND METHODS: Transplantation and Analysis/Microinsemination

M. KANATSU-SHINOHARA ET AL.: "Serum-and Feeder-Free Culture of Mouse Germline Stem Cells", *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, vol. 84, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 97-105, XP055061727, ISSN: 0006-3363, DOI: 10.1095/biolreprod.110.086462 MATERIALS AND METHODS: Cell Culture

J.J. LIM ET AL.: "Long-term proliferation and characterization of human spermatogonial stem cells obtained from obstructive and non-obstructive azoospermia under exogenous feeder-free culture conditions", *CELL PROLIFERATION*, vol. 43, no. 4, 1 August 2010 (2010-08-01), pages 405-417, XP055061728,

ISSN: 0960-7722, DOI: 10.1111/j.1365-2184.2010.00691.x Materials and methods: Isolation and in vitro culture of SSCs BAHADORANI M. ET AL.: "Short-term in-vitro culture of goat enriched spermatogonial stem cells using different serum concentrations", *JOURNAL OF ASSISTED REPRODUCTION AND GENETICS*, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS- PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 29, no. 1, 11 December 2011 (2011-12-11), pages 39-46, XP019998629, ISSN: 1573-7330, DOI: 10.1007/S10815-011-9687-5 the whole document

GOEL S. ET AL.: "Spermatogonia-specific proteins expressed in prepubertal buffalo (*Bubalus bubalis*) testis and their utilization for isolation and in vitro cultivation of spermatogonia", *THERIOGENOLOGY*, LOS ALTOS, CA, US, vol. 74, no. 7, 15 October 2010 (2010-10-15), pages 1221-1232, XP027300689, ISSN: 0093-691X [retrieved on 2010-08-12] page 1233, 2.3 Isolation of spermatogonia

P. MAPONTE ET AL.: "Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro", *REPRODUCTION*, vol. 136, no. 5, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 543-557, XP055061730, ISSN: 1470-1626, DOI: 10.1530/ REP-07-0419, page 554, Materials and Methods: Cell isolation and purification, page 556, Materials and Methods: Long-term culture

JINLONG YIN ET AL.: "In vitro myogenic and adipogenic differentiation model of genetically engineered bovine embryonic fibroblast cell lines", *BIOTECHNOLOGY LETTERS*, SPRINGER NETHERLANDS, DORDRECHT, vol. 32, no. 2, 16 October 2009 (2009-10-16), pages 195-202, XP019766786, ISSN: 1573-6776 the whole document

NEIL C. TALBOT ET AL.: "Establishment of a bovine blastocyst-derived cell line collection for the comparative analysis of embryos created in vivo and by in vitro fertilization, somatic cell nuclear transfer, or parthenogenetic activation", *IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY - ANIMAL*, vol. 43, no. 2, 5 April 2007 (2007-04-05), pages 59-71, XP055061731, ISSN: 1071-2690, DOI: 10.1007/s11626-007-9013-9 the whole document

(57) Изобретение относится к производству и культивированию недифференцированных сперматогониальных стволовых клеток, которые можно поддерживать длительное время и которые являются лишенными фидера. Конечные свободные от фидера популяции можно применять в любом количестве протоколов, включая создание потомства быков. Настоящее изобретение включает новые способы, требуемые для успешного обогащения бычьих сперматогониальных стволовых клеток, новых линий клеток и других компонентов, применяемых для той же цели, так же как и конечные композиции стволовых клеток.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В данной заявке испрашивается приоритет по 35 U.S.C. § 119 предварительной заявке с серийным № 61/598437, поданной 14 февраля 2012, включенной в данную заявку во всей полноте посредством ссылки.

Предоставленная ссылка

Это изобретение создано при поддержке государства по контракту № 117232-001, выданному Министерством сельского хозяйства Соединенных Штатов. Государство имеет абсолютные права на изобретение.

Уровень техники, к которой относится изобретение

Стволовые клетки представляют собой недифференцированные клетки, которые обладают двумя отличительными свойствами; самообновлением и способностью дифференцироваться в одну или более последовательностей клеточного поколения. Процесс самообновления включает саморепликацию стволовой клетки для обеспечения репродукции и распространения, где стволовая клетка остается в недифференцированном виде. Клетки-предшественники также являются недифференцированными клетками, которые обладают способностью к дифференцировке в одну или более последовательностей клеточных поколений, но имеют ограниченную способность или не имеют способности к самообновлению. При поддержании в культуре недифференцированные клетки, такие как стволовые или клетки-предшественники, могут подвергаться спонтанной дифференцировке, таким образом теряя желаемый недифференцированный клеточный фенотип. Таким образом, необходимы методы культивирования для минимизирования спонтанной дифференцировки с целью поддержания недифференцированного состояния стволовых клеток или клеток-предшественников.

Поддержание недифференцированных клеток в недифференцированном состоянии является критическим для их применения, например, в промышленности и медицине, поскольку главная научная и терапевтическая польза этих клеток выражается в их способности разрастаться в гомогенные популяции, которые могут дополнительно пролиферировать или дифференцировать в зрелые клетки, как необходимо, например, в научных исследованиях или для восстановления повреждения клеток или тканей пациента. Как только они спонтанно дифференцируются в клеточной культуре, клетки становятся менее пролиферирующими и менее способными к дифференцировке в различные типы клеток, как необходимо. Гомогенную культуру недифференцированных стволовых клеток, таким образом, интенсивно ищут после нереализованной цели в исследованиях ученых и в производстве.

Текущие методы культивирования недифференцированных клеток (например, различных типов стволовых клеток) пытаются минимизировать такую спонтанную дифференцировку путем ежедневной доставки фактора роста фибробластов-2 (FGF2, ФРФ2) клеточным культурам или более редкой доставки, чем каждый день, что известно как "кормление". Для ФРФ2 показано стимулирование самообновления стволовых клеток путем ингибирования дифференцировки стволовой клетки; тем не менее, это ингибирование является неполным, и культуры стволовых клеток имеют тенденцию к постепенной дифференцировке, таким образом, сводя на нет пользу культуры стволовых клеток. Более того, стволовые клетки, такие как эмбриональные или сперматогониальные стволовые клетки, которые обычно должны выращиваться на питающих клетках фибробласта эмбриона мыши (MEF). Это громоздкая стадия, которую желательно исключить, приводящая к популяции стволовых клеток, насыщенных клетками-фидерами, которые нельзя применять в различных протоколах оплодотворения и продукции гамет.

Способность условно индуцировать развитие линий стволовых клеток путем процесса сперматогенеза *in vitro* для продуцирования гамет предоставит долгожданную технологию для биомедицинского исследования и, в частности, для разведения животных, если такие протоколы утвердят для различных видов. Отмечается, что наибольший успех достигнут только на мышах и крысах, что оставляет более крупных животных, таких как быки, без таких преимуществ.

Открытие того, что стволовые клетки, содержащиеся в фракциях диссоциированных клетках яичек мышей и крыс, сохраняют свою способность восстанавливать сперматогенез в семенниках мышей-реципиентов, является основным для обеспечения таких культур (см. Brinster с соавт., Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:11303-11307; Brinster с соавт., Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:11298-11302; Clothier с соавт., Nature 1996; 381:418-421; Kanatsu-Shinohara с соавт., Biol Reprod 2003; 69:612-616 и Nagano с соавт., Tissue Cell 1998; 30:389-397. Способность выделять и экспериментально манипулировать этими стволовыми клетками открыла двери для исследования развития сперматозоида, вспомогательной репродукции, клеточной терапии и генетики (см. Nagano с соавт., Biol Reprod 1999; 60:1429-1436; Mahanoy с соавт., Endocrinology 2000; 141:1273-1276; Mahato с соавт., Mol Cell Endocrinol 2001; 178:57-63; Ogawa с соавт., Nat Med 2000; 6:29-34; Shinohara с соавт., Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103:13624-13628; Zhang с соавт., J Cell Physiol 2007; 211:149-158; Kazuki с соавт., Gene Ther 2008; 15:617-624; Kanatsu-Shinohara с соавт., Cell 2004; 119:1001-1012; Kanatsu-Shinohara с соавт., Proc Acad Sci USA 2006; 103:8018-8023 и Nagano с соавт., Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:13090-13095. В свете этого потенциала установили протоколы выделения, репродукции и генетического модифицирования полностью функциональных сперматогониальных стволовых клеток крысы и мыши в культуре (см. Ryu с соавт., Dev Biol 2004; 274:158-170; Hamra с соавт., Dev Biol 2004; 269:393-410; Hamra с соавт., Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:14931-14936;

Hamra с соавт., *Methods Mol Biol* 2008; 450:163-179; Hamra с соавт., *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:17430-17435; Ryu с соавт., *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:14302-14307; Orwig с соавт. *Biol Reprod* 2002; 67:874-879 и Kanatsu-Shinohara с соавт., *Biol Reprod* 2008. Мышей и крыс выбирают в качестве видов для этих исследований, поскольку они являются популярными моделями лабораторных животных для исследования человеческого здоровья и заболеваний и из-за недостатка протоколов для генетического модифицирования зародышевой линии крыс при помощи клонально расширенных стволовых клеток из культуры (см. Hamra с соавт., *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:14931-14936). Учитывая множество потенциальных применений лабораторной крысы в качестве исследовательской модели, в этом исследовании ищут эффективность и экономию, а также легкость приготовления культуральной среды для получения и продолжения пролиферации первичных линий стволовых клеток крыс *in vitro*.

Несмотря на эти преимущества, даже у крыс, процедура остается сложной и в большом количестве случаев не успешной. Например, среды для длительной пролиферации сперматогониальных стволовых клеток грызунов *in vitro* являются относительно сложными, дорогими, затратными по времени изготовления, плюс они являются наиболее эффективными при применении в комбинации с питающими слоями фибробластов.

Как видно, существует необходимость поиска методов культивирования сперматогониальных стволовых клеток, в частности, для более крупных млекопитающих, таких как быков.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение включает композиции и методы культивирования сперматогониальных стволовых клеток. В соответствии с изобретением заявители усовершенствовали культуральную систему, свободную от фидера, что позволяет культивируемым сперматогониальным стволовым клеткам оставаться в недифференцированном состоянии и оставаться жизнеспособными в культуре в течение длительных периодов времени. Дополнительные аспекты изобретения включают процедуры для выделения недифференцированных сперматогоний из ткани семенников, идентификации специфичной среды, свободной от сыворотки, что поддерживает выживаемость недифференцированных сперматогоний *in vitro*, субстраты для покрытия пластиковой лунки для культивирования, к которой адгезируются недифференцированные сперматогонии, и наконец заявители определили специфические факторы роста для поддержания кондиционированной среды питающей клетки, которая обеспечивает поддержание и рост бычьих недифференцированных сперматогоний. В то время как методы и примеры раскрывают бычьи клетки изобретение не является настолько ограничивающим и применяется ко всем видам домашнего скота, включая свиней.

В соответствии с изобретением заявители определили специфические собственные линии клеток, включая линии бычьих эмбриональных фибробластов и линии бычьих соматических клеток, полученных из бычьих семенников. Эти специфические линии клеток применяют в качестве клеток питательной поддержки для кондиционированной культуральной среды перед культивированием любых сперматогониальных стволовых клеток (SSC). Техника предварительного культивирования позволяет культивировать без фидера, обеспечивая поколение чистых популяций предполагаемых бычьих SSC для трансплантации и других применений. Культивируемые заявителями клетки свободны от примесей других линий питающих клеток и их вредных воздействий, включая иммунный ответ хозяина, ограниченную способность к колонизации и конечную дифференцировку в течение длительного времени.

В варианте осуществления настоящее изобретение характеризует метод выделения недифференцированных сперматогоний, в которых сперматогониальные стволовые клетки (SSC) являются компонентом из ткани семенника, содержащей по меньшей мере одну SSC. Метод включает получение бычьей ткани семенника, которая включает по меньшей мере одну SSC, содержащую указанную ткань с коллагеназой, разделяющей семенные каналы с клетками других типов, и таким образом, контактирование указанных семенных каналов с трипсином для получения суспензии клеток, обогащенной сперматогониями клетками Сертоли. Метод можно также применять к SSC, полученным из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток или даже эмбриональных стволовых клеток, которыми манипулировали для их превращения в SSC.

В другом варианте осуществления изобретение характеризует метод обогащения и сохранения чистой культуры недифференцированных сперматогониальных клеток, содержащих по меньшей мере одну SSC, где метод включает предоставление специфической свободной от сыворотки среды с замещением сыворотки, что дополнительно обеспечивает лунки для адгезии, предварительно покрытые Matrigel, а также добавление специфического нейротрофного фактора глиальных клеток (GDNF), фактора роста фибробластов-2 (FGF2), фактора стромы-1 (SDF-1) и колоний стимулирующего фактора-1 (CSF-1) в предварительно кондиционированную среду, что все вместе обеспечивает на первое время свободную от фидера культуру сперматогониальных клеток, предпочтительно бычьих сперматогониальных стволовых клеток.

В варианте осуществления изобретение также характеризует предполагаемую популяцию сперматогониальных стволовых клеток, которые остаются недифференцированными и сохраняют способность к самообновлению и дифференцировке, которая жизнеспособна в культуре и является фактически чистой, а именно свободной от фидера.

В другом варианте осуществления изобретение включает новые поддерживающие линии клеток, которые усовершенствованы и позволяют предварительно кондиционировать среду для предоставления метода культивирования без фидера. Линии клеток включают линию клеток бычьих эмбриональных фибробластов 1 (или BEF1, ранее BEF), полученных из плода Holstein возраста 35 дней, и второе, линии клеток бычьих соматических клеток 1 (или BSC1, ранее BSC), полученных из соматических клеток, выделенных из семенника четырехмесячного быка Holstein. Вместе эти линии клеток можно применять для предварительного инкубирования культуральной среды, что предоставит необходимые секретируемые растворимые факторы для выживания и пролиферации SSC без добавления питающих клеток после введения SSC. В соответствии с изобретением среду сначала предварительно кондиционируют этими клетками и через достаточный период времени предварительно кондиционирующие клетки-фидеры удаляют, чтобы затем можно было культивировать SSC клетки.

В одном аспекте изобретения SSC представляют собой бычьи SSC. В другом аспекте SSC получают из организма, выбираемого из группы, состоящей из мыши, крысы, обезьяны, павиана, человека, свиньи и собаки.

В другом аспекте изобретения клетки получают из любого источника сперматогониальных стволовых клеток, включая источник, выбираемый из группы, состоящей из семенника взрослого дикого типа, семенника теленка или щенка, семенника новорожденного и семенника взрослого с крипторхизмом.

В другом аспекте изобретения клетки получают из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток или эмбриональных стволовых клеток для их превращения в сперматогониальные стволовые клетки, которые затем могут стать таким же источником, применяемым в соответствии с изобретением.

В другом варианте осуществления изобретение относится к системе культивирования, свободной от фидера, для поддержки состояния SSC, системе, включающей обогащенные SSC, свободной от сыворотки среде определенного состава и среде, предварительно кондиционированной клетками-фидерами. В другом варианте осуществления изобретение относится к свободной от фидера системе культивирования для поддержки пролиферации SSC, включающей по меньшей мере одну SSC, свободной от сыворотки среде определенного состава с добавлением заместителя сыворотки (StemPro), которая была предварительно кондиционирована патентованной линией клеток фибробластов BEF1 и патентованными клетками-фидерами BSC1.

В одном аспекте изобретения система культивирования дополнительно включает факторы роста GDNF, FGF2, SDF-1 и CSF-1. В другом аспекте культуральная среда включает по меньшей мере одну среду, выбираемую из группы, состоящей из модифицированной по методу Дульбекко среды Игла (MEM): питательной смеси Хэма F-12 (DMEM/F12) и добавленного заместителя сыворотки StemPro.

В другом аспекте изобретения система культивирования дополнительно включает пластиковые лунки для культивирования роста, которые предварительно покрывают имеющимся в продаже матриксом, таким как Matrigel (ослабленная версия фактора роста). Без этого покрытия клетки не прикрепляются к пластиковой лунке и не могут храниться в культуре длительное время.

В другом варианте осуществления изобретение характеризует композицию, включающую популяцию чистых обогащенных SSC, где обогащенная популяция SSC свободна от эмбриональных фибробластов или других типов клеток-фидеров.

В другом варианте осуществления изобретение характеризует композицию, включающую популяцию обогащенных SSC, которые экспрессируют специфический маркер недифференцированных сперматогоний и имеют морфологию, сходную с таковой у культивируемых SSC клеток. В одном аспекте популяция SSC является практически гомогенной по SSC.

В еще одном варианте осуществления изобретение характеризует метод создания по меньшей мере одного потомства млекопитающего, включающий введение популяции SSC без фидера в семенники млекопитающего-реципиента мужского пола, что позволяет обогащенным SSC создавать колонию сперматогенеза в млекопитающем-реципиенте, а также спаривание млекопитающего-реципиента с самкой млекопитающего того же вида, что и млекопитающее-реципиент. В одном аспекте популяцию обогащенных SSC вводят в просвет семенных канальцев млекопитающего-реципиента. В другом аспекте млекопитающее-реципиент является бесплодным.

В варианте осуществления изобретения млекопитающее-реципиент выбирают из группы, состоящей из грызуна, примата, собаки, быка, свиньи и человека. В другом варианте осуществления грызуна выбирают из группы, состоящей из мыши и крысы. В еще одном аспекте приматом является павиан.

В другом варианте осуществления изобретение характеризует набор для сохранения по меньшей мере одной SSC в культуральной среде, свободной от фидера. Набор включает систему культивирования, включающую свободную от сыворотки культуральную среду с определенным составом, собственные BSC1 и BEF1 клетки для предварительного кондиционирования культуральной среды (или среду, которая уже была предварительно кондиционирована таким же образом), аппликатор, учебный материал, где учебный материал включает инструкции для применения набора для сохранения по меньшей мере одной SSC в культуральной среде, свободной от фидера.

В варианте осуществления изобретения изобретение относится к потомству животных, произведенному в соответствии с методом изобретения. В другом варианте осуществления изобретение относится к потомству,

произведенному в соответствии с методом изобретения, где обогащенные SSC, применяющиеся для создания потомства животных, содержат по меньшей мере одну генетическую мутацию. В одном аспекте генетическую мутацию создают при помощи рекомбинантной технологии.

Заявленное изобретение включает, помимо прочего, применение конкретных полученных естественным путем или генетически модифицированных ("генетических") стерильных быков мужского пола в качестве реципиентов для донорских сперматогониальных стволовых клеток, с которыми животные также иммуносовместимы. Соответственно трансплантированные сперматогониальные стволовые клетки свободно развиваются в функционирующие сперматозоиды и оплодотворяют самок в отсутствие конкуренции со спермой, которая бы также вырабатывалась, если бы мужская особь была фертильной. Таким образом, 100%-ной передачи гаплотипа зародышевой линии донорской клетки можно достигнуть при относительно низком количестве трансплантируемых спермальных стволовых клеток.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом настоящего изобретения методология предоставлена для влияния на перенос зародышевой линии донорского гаплотипа. Изобретенный метод включает стадии (А) предоставления клеток сперматогониальной линии стволовых клеток, которые получены из семенников млекопитающих, из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток или эмбриональных стволовых клеток, чьи линии клеток воплощают predetermined генетический фон, и далее (В) трансплантации одной или более клеток стерильному реципиенту мужского пола, так что трансплантированные клетки развиваются в компетентные для оплодотворения клетки, гаплоидные мужские гаметы.

В соответствии с другим аспектом изобретения библиотеку предоставляют клетки сперматогониальной линии клеток, которые получены из семенников млекопитающих, или из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток или эмбриональных стволовых клеток. Библиотека изобретения содержит множество нокаутов гена или "нокин" мутантных стволовых клеток.

Описание чертежа

Чертеж показывает сохранение бычьих недифференцированных сперматогоний в культуре, свободной от фидера. Левое изображение представляет собой представительство группы зародышевых клеток, образующейся во время культивирования без фидера на покрытых Matrigel лунках для культивирования с BEF1 кондиционированной средой. Среднее изображение представляет собой группы, обработанные DAPI, для обозначения ядер отдельных клеток. Правое изображение представляет собой иммуноокрашивание для недифференцированного сперматогониального маркера PLZF.

Подробное описание изобретения

Если не определено иное, научные и технические термины, применяемые в связи с изобретением, будут иметь значения, под которыми их обычно понимают специалисты в области техники. Дополнительно, если другого не требует контекст, термины в единственном числе будут включать множественное число, а термины во множественном числе будут включать единственное число. В целом, номенклатура, используемая в связи с этим, и технологии биохимии, энзимологии, молекулярной и клеточной биологии, микробиологии, генетики и химии протеинов и аминокислот, а также гибридизации, описанные здесь, являются хорошо известными и применяемыми в области техники. Методы и технологии в целом осуществляют в соответствии с традиционными методами, хорошо известными в области техники, и как описано в различных и более специфических ссылках, которые включены и обсуждаются в настоящей инструкции, если не указано иное (см., например, Sambrook с соавт., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y. (1989); Ausubel с соавт., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992, и дополнения 2002); Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y. (1990); Taylor и Drickamer, *Introduction to Glycobiology*, Oxford Univ. Press (2003); Worthington Enzyme Manual, Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J.; *Handbook of Biochemistry: Section A Proteins*, Vol. I, CRC Press (1976); *Handbook of Biochemistry: Section A Proteins*, Vol. II, CRC Press (1976); *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1999)).

Следующие термины, если не указано иного, следует понимать в следующих значениях:

Фраза "сперматогониальные стволовые клетки" в этом описании подразумевает стволовые клетки, как выделенные из семенников, так и созданные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, из эмбриональных стволовых клеток или любым другим методом для получения этих клеток. Например, индуцированные плюрипотентные клетки млекопитающих, полученные из кожных клеток, применяют для создания зародышевых клеток (см. Easley CA 4th с соавт., *Cell Rep.* 2012 Sep 27; 2 (3): 440-6, "Direct differentiation of human pluripotent stem cells into haploid spermatogonial cells"). Сперматогониальные стволовые клетки обладают способностью к оплодотворению яйцеклетки, но могут дать толчок к развитию клеткам, которые развиваются в сперматозоиды, и, таким образом, производят жизнеспособное потомство. Полученные сперматогониальные стволовые клетки можно культивировать в течение длительного периода времени без потери их свойств, и описана возможность эффективного восстановления популяции в семенниках подходящего реципиента мужского пола, например, у Oatley J.M. с соавт., *Methods Enzymol.* 419:259 (2006).

Слова, находящиеся здесь в единственном числе, применяют для названия одного или более одного (то есть по меньшей мере одного) грамматического объекта статьи. Например, "элемент" обозначает

один элемент или более чем один элемент.

Как используют здесь, термин "ген" и "рекомбинантный ген" относится к молекулам аминокислоты, включающим открытую рамку считывания, кодирующую полипептид. Такие вариации натуральных аллелей могут обычно привести к 1-5% различий в нуклеотидной последовательности данного гена. Альтернативные аллели можно определить путем секвенирования интересующего гена у некоторых различных индивидов. Это можно без промедления провести при помощи гибридизационных проб для определения такого же локуса гена у множества индивидов. Любые такие вариации нуклеотидов, а также полиморфизм и вариации конечных аминокислот, которые являются результатом вариаций натуральных аллелей и которые не изменяют функциональную активность, должны находиться в объеме изобретения.

Более того, молекулы аминокислот, кодирующие протеины других видов (гомологи), которые имеют последовательность нуклеотидов, которая отличается от такой у протеинов, описанных здесь, находятся в объеме изобретения. Молекулы нуклеиновых кислот, соответствующие вариантам натуральных аллелей и гомологам кДНК изобретения, можно получить на основании их идентичности молекулам нуклеиновых кислот при помощи человеческих кДНК или их части, в качестве гибридизационной пробы в соответствии со стандартными технологиями гибридизации под строгими гибридизационными условиями.

Как применяется здесь, этот термин "модулирование" биологического процесса относится к изменению нормального течения биологического процесса. Например, модулирование активности сперматогониальной стволовой клетки может быть повышением активности клетки. Альтернативно модулирование активности сперматогониальной стволовой клетки может быть снижением активности клетки.

"Обогащение" в качестве используемого здесь термина относится к процессу, при помощи которого увеличиваются концентрация, число или активность чего-либо по сравнению с изначальным состоянием. Например, популяция из 100 сперматогониальных стволовых клеток считается "обогащенной" сперматогониальными стволовыми клетками, если до того популяция содержала только 50 сперматогониальных стволовых клеток. Сходным образом, популяция из 100 сперматогониальных стволовых клеток также считается "обогащенной" сперматогониальными стволовыми клетками, если до того популяция содержала 99 сперматогониальных стволовых клеток. Также популяция из 100 сперматогониальных стволовых клеток считается "обогащенной" сперматогониальными стволовыми клетками, даже если популяция до того не содержала сперматогониальных стволовых клеток.

Применяемый здесь термин "популяция" относится к двум или более клеткам.

Применяемые здесь термины "практически отделенный от" или "практически отделяемый" относятся к характеристикам популяции первых веществ, которые удалили из-за близости ко вторым веществам, где популяция первых веществ не обязательно свободна от вторых веществ, и популяция вторых веществ не обязательно свободна от первых веществ. Тем не менее, популяция первых веществ, которая "практически отделена от" популяции вторых веществ, имеет значительно более низкое содержание вторых веществ по сравнению с неразделенной смесью первых и вторых веществ.

В одном аспекте первое вещество практически отделено от второго вещества, если соотношение концентрации первого вещества к концентрации второго вещества превышает единицу. В другом аспекте первое вещество практически отделено от второго вещества, если соотношение концентрации первого вещества к концентрации второго вещества превышает 2. В еще одном аспекте первое вещество практически отделено от второго вещества, если соотношение концентрации первого вещества к концентрации второго вещества превышает приблизительно 5. В другом аспекте первое вещество практически отделено от второго вещества, если соотношение концентрации первого вещества к концентрации второго вещества превышает приблизительно 10. В еще одном аспекте первое вещество практически отделено от второго вещества, если соотношение концентрации первого вещества к концентрации второго вещества превышает приблизительно 50. В другом аспекте первое вещество практически отделено от второго вещества, если соотношение концентрации первого вещества к концентрации второго вещества превышает приблизительно 100. В еще одном аспекте первое вещество практически отделено от второго вещества, если не определяется уровень второго вещества в композиции, содержащей первое вещество.

"Практически гомогенный", как применяемый здесь термин, относится к популяции вещества, которое включено первично в вещество, примеси которого минимизированы.

"Поддержание" клетки или популяции клеток относится к состоянию, в котором живая клетка или популяция живых клеток не увеличивается и не снижается по общему числу клеток в культуре. Альтернативно "пролиферация" клетки или популяции клеток, как применяемый здесь термин, относится к состоянию, в котором число живых клеток увеличивается как функция времени по отношению к исходному числу клеток в культуре.

"Культуральная среда с определенным составом", как применяемый здесь термин, относится к среде культуры клеток с известной композицией.

Термин "апликатор", как применяемый здесь, обозначает любой прибор, включающий, но не ограниченный подкожным шприцем, пипеткой, бронхоскопом, небулайзером и т.п., для введения композиции изобретения млекопитающему.

Как применяют здесь, термин "учебный материал" включает публикацию, запись, диаграмму или

любое другое средство выражения, которое можно применять для передачи полезности метода и/или композиции изобретения в наборе для сохранения, пролиферирования или введения любой композиции, переписанной здесь. Учебный материал из набора изобретения может, например, быть прикреплен к контейнеру, который содержит композицию изобретения или может быть доставлен вместе с контейнером, который содержит композицию. Альтернативно учебный материал можно доставить отдельно от контейнера с изобретением так, что учебный материал и вещество реципиент можно применять совместно.

Как применяется здесь, клетка считается "устраненной" из популяции клеток или из культуральной среды, когда клетка более не оказывает один или более эффектов - физический, биологический или химический - на популяцию клеток или культуральную среду. Например, клетка может быть устранена из культуральной среды путем физического удаления клетки при помощи FACS или при помощи использования антител, специфических к маркеру на поверхности клетки, уникальному для этой клетки. Клетку также можно устранить из культуральной среды путем изменения биологической активности клетки на инертную, так, например, как при применении нейтрализующего антитела, которое является специфичным для этой клетки.

Клетка является "практически устраненной" из популяции клеток или из культуральной среды, когда большая часть, но не все клетки от общего числа более не оказывают один или более эффектов - физический, биологический или химический - на популяцию клеток или культуральную среду. Например, конкретный тип клеток можно практически устранить из культуральной среды, если по меньшей мере 75% клеток этого типа удалены из культуральной среды при помощи применения антитела, специфического для маркера на клеточной поверхности, уникального для этой клетки. Более предпочтительно по меньшей мере 80% клеток устранены из культуральной среды, еще более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 95% клеток устранены из культуральной среды.

Клетка является "полученной из семенника", как применяют здесь, если клетка получена из семенника. В виде неограниченного примера полученные из семенников клетки включают сперматогониальные стволовые клетки, соматические клетки и зародышевые клетки.

Методы обогащения сперматогониальных стволовых клеток.

Настоящее изобретение относится к методу обогащения сперматогониальных стволовых клеток (SSC). Здесь впервые показано, что SSC можно культивировать по свободному от фидера протоколу с длительной выживаемостью популяции клеток. В одном варианте осуществления изобретения SSC получены от быка. Обогащение стволовых клеток является полезным для различных целей в области медицинского лечения, диагностики и исследований, включая основанную на стволовых клетках терапию для восстановления популяции клеток в организме, а также для лабораторного исследования факторов роста, ответственных за контролирование поддержания пролиферации стволовых клеток, а также за искусственное оплодотворение.

Настоящее изобретение включает композиции и методы культивирования сперматогониальных стволовых клеток. В соответствии с изобретением заявители усовершенствовали культуральную систему, свободную от фидера, что позволяет выделенным (или полученным другим методом) бычьим сперматогониальным стволовым клеткам оставаться в недифференцированном состоянии и сохранять жизнеспособность в культуре в течение длительного периода времени. Можно применять также индуцированные плюрипотентные стволовые клетки или эмбриональные стволовые клетки. Дополнительные аспекты изобретения включают процедуры для выделения недифференцированных сперматогоний из ткани семенников быка, идентификации специфической свободной от сыворотки среды, которая поддерживает выживание бычьих недифференцированных сперматогоний *in vitro*, субстраты для покрытия пластиковых лунок для культивирования, к которым происходит адгезия недифференцированных бычьих сперматогоний, и наконец заявители определили специфические факторы роста для обогащения кондиционированной среды клеток-фидеров, что обеспечивает поддержание и рост бычьих недифференцированных сперматогоний.

В соответствии с изобретением заявители определили специфические собственные линии клеток, включая фибробласты быков эмбриональной линии клеток, и соматические линии клеток быков, выделенные из семенников или полученные другим методом. Эти специфические линии клеток применяют в качестве поддерживающих клеток-фидеров для кондиционирования культуральной среды до культивирования любых SSC. Техника предварительного культивирования позволяет культивированию без фидера обеспечить поколение чистых популяций бычьих сперматогониальных SSC для трансплантата или других применений без примешивания других линий клеток-фидеров и их вредного воздействия, включая потенциальный иммунный ответ хозяина, ограничение колонизационной способности SSC.

В варианте осуществления настоящее изобретение относится к методу выделения сперматогониальных стволовых клеток (SSC) из ткани семенников быка, содержащей по меньшей мере одну SSC. Метод включает получение бычьей ткани семенников, которая включает по меньшей мере одну SSC, контактирование указанной ткани с коллагеназой, разделение семенных канальцев от клеток других типов и, таким образом, контактирование указанных семенных канальцев с трипсином для получения клеточной суспензии, обогащенной сперматогониями и клетками Сертоли.

В другом варианте осуществления изобретение относится к методу обогащения и поддержания чистой культуры сперматогониальных стволовых клеток (SSC) из популяции полученных из семенников, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток или эмбриональных стволовых клеток, содержащих по меньшей мере одну SSC, где метод включает предоставление специфической свободной от сыворотки среды с замещением сыворотки, дополнительное предоставление лунок для культивирования клеток, которые предварительно покрыты Matrigel, а также добавление специфических факторов роста GDNF, FGF2, SDF-1 и CSF-1 в предварительно кондиционированную среду, что все вместе обеспечивает на первое время свободную от фидера культуру сперматогониальных клеток, предпочтительно бычьих сперматогониальных стволовых клеток.

В варианте осуществления изобретение также относится к популяции сперматогониальных стволовых клеток, которые остаются недифференцированными и сохраняют способность к самообновлению и дифференцировке, которая жизнеспособна в культуре и является фактически чистой, а именно свободной от фидера.

В другом варианте осуществления изобретение включает новые поддерживающие линии клеток, которые усовершенствованы и которые позволяют предварительно кондиционировать среду для обеспечения метода культивирования, свободного от фидера. Линии клеток включают линию клеток BEF1, полученные от плода Holstein 35 дней от роду, и вторые линии клеток BSC1, полученные от соматических клеток, выделенных из семенников 4-месячного быка Holstein. Вместе эти линии клеток можно применять для предварительного инкубирования культуральной среды, что предоставит необходимые факторы секреции для выживания и пролиферации SSC без добавления клеток фидеров к инкубируемому SSC.

В одном аспекте изобретения SSC представляет собой бычью SSC. В другом аспекте SSC получают из организма, выбираемого из группы, состоящей из мыши, крысы, обезьяны, павиана, человека, свиньи и собаки.

В другом аспекте изобретения клетки получают из источника, выбираемого из группы, состоящей из взрослого семенника дикого типа, семенника щенка, семенника новорожденного и/или семенника взрослого с крипторхизмом.

В варианте осуществления изобретение относится к свободной от сыворотки культуральной системе для поддержки сохранности SSC, системе, включающей обогащенные SSC, свободную от сыворотки культуральную среду определенного состава, и среду, предварительно кондиционированную клетками-фидерами. В другом варианте осуществления изобретение относится к свободной от сыворотки культуральной системе для поддержания пролиферации SSC, включающей по меньшей мере одну SSC, свободную от сыворотки культуральную среду с определенным составом с замещением сыворотки на обогащающую (StemPro), и которую предварительно кондиционируют собственной клеточной линией фибробластов BEF1 и собственными BSC1 клетками-фидерами.

В одном аспекте изобретения культуральная система дополнительно включает факторы роста GDNF, FGF2, SDF-1 и CSF-1. В другом аспекте культуральная среда включает по меньшей мере среду, выбираемую из группы, состоящей из модифицированной по методу Дульбекко среды Игла (MEM): питательной смеси Хэма F-12 (DMEM/F12) и добавленного заместителя сыворотки StemPro.

В другом аспекте изобретения культуральная система дополнительно включает лунки для культивирования и роста, которые предварительно покрыты имеющимся в продаже матриксом, таким как Matrigel (ослабленная версия фактора роста). Без этого покрытия клетки не прикрепляются к пластиковой лунке и не могут храниться в культуре длительное время.

В другом варианте осуществления изобретение характеризует композицию, включающую популяцию чистых обогащенных SSC, где обогащенная популяция SSC свободна от эмбриональных фибробластов или других типов клеток-фидеров.

В другом варианте осуществления изобретение характеризует композицию, включающую популяцию обогащенных SSC, которые экспрессируют специфический маркер недифференцированных сперматогоний и имеют морфологию, сходную с таковой у культивируемых SSC клеток. В одном аспекте популяция SSC является практически гомогенной по SSC.

В еще одном варианте осуществления изобретение характеризует метод создания по меньшей мере одного потомства млекопитающего, включающий введение популяции SSC без фидера в семенники млекопитающего-реципиента мужского пола, что позволяет обогащенным SSC создавать колонию сперматогенеза в млекопитающем-реципиенте, а также спаривание млекопитающего-реципиента с самкой млекопитающего того же вида, что и млекопитающее-реципиент. В одном аспекте популяцию обогащенных SSC вводят в просвет семенных канальцев млекопитающего-реципиента. В другом аспекте млекопитающее-реципиент является бесплодным.

В варианте осуществления изобретения млекопитающее-реципиент выбирают из группы, состоящей из грызуна, примата, собаки, быка, свиньи и человека. В другом варианте осуществления грызуна выбирают из группы, состоящей из мыши и крысы. В еще одном аспекте приматом является павиан.

В еще одном варианте осуществления изобретение характеризует метод создания по меньшей мере одного потомства млекопитающего, включающий введение популяции SSC без фидера в семенники млекопитающего-реципиента мужского пола, что позволяет обогащенным SSC создавать колонию сперма-

тогенеза в млекопитающем-реципиенте, а также спаривание млекопитающего-реципиента с самкой млекопитающего того же вида, что и млекопитающее-реципиент.

В другом варианте осуществления изобретение характеризует набор для сохранения по меньшей мере одной SSC в культуральной среде, свободной от фидера. Набор включает систему культивирования, включающую свободную от сыворотки культуральную среду с определенным составом, собственные BSC1 и BEF1 клетки для предварительного кондиционирования культуральной среды, аппликатор, учебный материал, где учебный материал включает инструкции для применения набора для сохранения по меньшей мере одной SSC в культуральной среде, свободной от фидера.

В варианте осуществления изобретение характеризует потомство животных, произведенное в соответствии с методом изобретения. В другом варианте осуществления изобретение характеризует потомство, произведенное в соответствии с методом изобретения, где обогащенные SSC, применяющиеся для создания потомства животных, содержат по меньшей мере одну генетическую мутацию. В одном аспекте генетическую мутацию создают при помощи рекомбинантной технологии.

Заявленное изобретение включает, помимо прочего, применение конкретных полученных естественным путем или генетически модифицированных ("генетических") стерильных быков мужского пола в качестве реципиентов для донорских сперматогонимальных стволовых клеток, с которыми животные также иммуносовместимы. Сперматогенез у таких животных тяжело нарушен. Соответственно трансплантированные сперматогонимальные стволовые клетки свободно развиваются в функционирующие сперматозоиды и оплодотворяют самок в отсутствие конкуренции со спермой, которая бы также вырабатывалась, если бы мужская особь была фертильной. Таким образом, 100% передачи гаплотипа зародышевой линии донорской клетки можно достигнуть при относительно низком количестве трансплантируемых спермальных стволовых клеток.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом настоящего изобретения методология предоставлена для влияния на перенос зародышевой линии донорского гаплотипа. Изобретенный метод включает стадии (А) предоставления клеток сперматогонимальной линии стволовых клеток, которые получены из семенников млекопитающих, из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток или эмбриональных стволовых клеток, чьи линии клеток воплощают predetermined генетический фон, и далее (В) трансплантации одной или более клеток стерильному реципиенту мужского пола, так что трансплантированные клетки развиваются в компетентные для оплодотворения клетки, гаплоидные мужские гаметы.

В соответствии с другим аспектом изобретения библиотеку предоставляют клетки сперматогонимальной линии клеток, которые получены из семенников млекопитающих, или из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, или эмбриональных стволовых клеток. Библиотека изобретения содержит множество нокаутов гена или "нокин" мутантных стволовых клеток.

В соответствии с добавочным аспектом изобретения предоставляют среду для выращивания сперматогонимальных стволовых клеток в дополнение к методам культивирования сперматогонимальных стволовых клеток.

Свободная от фидера культуральная система сперматогонимальных стволовых клеток.

Настоящее изобретение относится к свободной от фидера культуральной среде для *in vitro* поддержания и пролиферации SSC. Это происходит, поскольку, как показано здесь на первый раз, что бычьи недифференцированные сперматогонии, в которых SSC являются компонентами, могут поддерживаться и пролиферировать в среде, которая была предварительно кондиционирована фидерами, но которая не содержит клеток-фидеров *in vitro*. При помощи настоящего изобретения утверждают культуральную систему, имеющую минимальные определенные условия, для *in vitro* культивирования бычьих SSC, чья система предоставляет возможность исследовать биологию SSC в определенном виде, а также и способность определять индивидуальные факторы, необходимые для поддержания и разрастания SSC. В предпочтительном варианте осуществления свободный от фидера метод культивирования позволяет создавать популяцию SSC клеток, которые свободны от включения клеток-фидеров, для применения в оплодотворении *in vitro* и в других аспектах промышленного бычьего производства.

В одном варианте осуществления изобретения свободная от фидера культуральная система включает предварительно кондиционированную питающую среду. В одном аспекте изобретения предварительно кондиционирующие клетки-фидеры представляют собственные линии клеток заявителей, включающие бычьи эмбриональные линии BEF1 и линию бычьих соматических клеток BSC1. В другом аспекте изобретения клетки-фидеры для предварительного кондиционирования могут включать, но не ограничиваются элементами, полученными из этих линий, включая клетки, их компоненты и т.п.

Заявители определяют критическую среду для культивирования SSC. Это в одном аспекте изобретения представляет собой среду для культивирования и предварительного кондиционирования, которая является свободной от сыворотки средой с определенным составом, включающей минимальную поддерживающую среду-α (MEM). В другом аспекте изобретения свободная от сыворотки среда с определенным составом включает культуральную среду Ham F10. В еще одном варианте осуществления свободная от сыворотки среда с определенным составом представляет собой модифицированную по методу Дульбекко среду Игла (MEM): питательную смесь Хэма F-12 (DMEM/F12). Как понимают специалисты в данной области техники, вооруженные настоящим раскрытием, свободная от сыворотки среда с опреде-

ленным составом настоящего изобретения также включает смесь из двух или более сред, где одной из которых является DMEM/F12.

Таким образом, настоящее изобретение включает композицию, включающую определенную среду, которая предварительно кондиционирована одной или более линиями клеток-фидеров для поддержания или пролиферации SSC. Как следует понимать на основании раскрытия, излагаемого в данном документе, культуральная система изобретения является полезной для поддержания или разрастания SSC. В одном аспекте изобретения SSC, полезные в культуральной среде, представляют собой SSC, обогащенные при помощи методов или композиций настоящего изобретения. В другом аспекте SSC, полезные в культуральной среде, представляют собой SSC, которые не были предварительно обогащены в соответствии с методами или композициями настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления свободная от фидера среда с определенным составом дополнительно включает SSC. Специалист в данной области поймет в свете настоящего раскрытия, что SSC из любого источника можно поддержать или разрастить при помощи свободной от фидера культуральной системы изобретения. Так SSC, полученные из популяции клеток, полученных из семенников, можно получить из клеток семенников любого млекопитающего, включая, но не ограничиваясь человеческими семенниками, семенниками крыс, семенниками мышей и предпочтительно семенниками коровы и быка. Источники SSC дополнительно включают взрослые семенники дикого типа, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки, взрослые семенники с одной или более генетическими мутациями, ювенильные семенники, семенники новорожденного и/или семенники взрослого с крипторхизмом. Методы внесения генетических мутаций в ДНК клетки, такие как SSC, хорошо известны в области техники и не обсуждаются здесь дополнительно.

Также следует понимать на основании раскрытия, излагаемого в данном документе, что стерильный самец также может быть источником SSC. Таким образом, другой аспект изобретения включает стерильного самца в качестве источника SSC настоящего изобретения.

Как подробно описано здесь, базовая свободная от фидера среда с определенным составом настоящего изобретения может дополнительно включать любые компоненты, известные специалистам в области техники, для пользы в применении в культивировании клеток. В одном варианте осуществления свободная от фидера среда с определенным составом включает по меньшей мере один фактор роста. Факторы роста, полезные в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются фактором стволовых клеток (включая мышинный SCF), нейротрофным фактором глиальных клеток (GDNF), рецептором семейства GDNF (включая GFR.alpha.1), фактором, ингибирующим лейкоз (LIF), основным фактором роста фибробластов (включая человеческий bFGF), кислотным фактором роста фибробластов (aFGF), колониестимулирующим фактором (CSF), фактором стромы 1 (SDF-1), эпидермальным фактором роста (EGF), инсулиноподобным фактором роста (включая IGF-1), фактором роста тромбоцитов (PDGF) и трансформирующим фактором роста (включая TGF- β I-III, а также TGF β , суперсемейство BMP-1-12, GDF 1-8, dpp 60A, BIP, OF). В предпочтительном варианте осуществления факторы роста включают GDNF, FGF2 и CSF-1.

Настоящее изобретение, таким образом, также включает методы поддержания или пролиферации SSC в культуральной среде с определенным составом, свободной от фидера. В одном варианте осуществления изобретение относится к методу поддержания SSC в культуральной системе, свободной от фидера. Метод включает предоставление по меньшей мере одной SSC в культуральной среде, свободной от фидера, как определено в деталях здесь.

SSC можно идентифицировать как "поддерживаемые" в культуральной системе с определенным составом, свободной от фидера, путем оценивания активности SSC в различные отрезки времени в культуральной среде, а также путем сравнения активности с активностью SSC в начале периода культивирования. Как понимают специалисты в данной области техники, небольшая активность или отсутствие ее изменения являются показателем, что SSC поддерживаются в культуре. Методы измерения активности SSC описаны в деталях здесь.

В другом варианте осуществления изобретение характеризует метод пролиферирования SSC в культуральной среде, свободной от фидера. Метод включает предоставление по меньшей мере одной SSC в культуральной системе, свободной от фидера, как определено в деталях здесь. SSC можно идентифицировать как "пролиферирующие" в культуральной среде, свободной от фидера, путем оценивания активности SSC в различные отрезки времени в процессе культивирования и сравнения активности с активностью SSC в начале периода культивирования. Повышение активности между началом периода культивирования и любой более поздней временной точкой является показателем того, что SSC пролиферируют. Методы измерения активности SSC описаны в деталях здесь. SSC, которые могут пролиферировать в соответствии с настоящим изобретением, включают, но не ограничиваются бычьими SSC, человеческими SSC, мышинными SSC и крысиными SSC.

В дополнение степень пролиферации SSC в культуральной среде, свободной от фидера, настоящего изобретения можно оценивать путем подсчета числа клеток, присутствующих в конкретный момент времени во время культивирования SSC клеток и путем сравнения значения с числом клеток, присутствующих в начале периода культивирования. На основании раскрытия, описанного здесь, специалисты в

данной области техники понимают, что также можно применять другие методы оценки поддержания и пролиферации SSC. Эти методы включают, но не ограничиваются, FACS и MACS.

Трансплантация сперматогонимальных стволовых клеток.

В одном аспекте настоящего изобретения одну или более SSC можно трансплантировать в семенник реципиента. Методы трансплантации в целом известны специалистам в данной области техники и не будут обсуждаться здесь в дальнейших деталях. Для изучения общих методов трансплантации клеток, вовлекающих семенники, см. Kanatsu-Shinohara с соавт. (PNAS, 99:1383-1388 (2002), Brinster (I) (патент US 6215039) и Brinster (II) (патент US 5858354), обе из которых включены в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки. Brinster (I) и (II) демонстрируют, в частности, что трансплантированные SSC от донора к иммунологически толерантной мыши или другому совместимому реципиенту реплицируются и поддерживаются у реципиента. Система, свободная от фидера, имеет огромное преимущество по сравнению с традиционными системами с фидером, которое заключается в том, что для трансплантации следует удалить клетки-фидеры. Культура заявителя, будучи свободной от фидера, не требует этой напряженной и трудной стадии.

В варианте осуществления изобретения одну или более SSC вводят в каналцы семенника. Например, после анестезии млекопитающего-реципиента мужского пола осуществляют хирургический доступ к семеннику (или семенникам). В одном варианте осуществления при применении микроманипуляционных методов тонкую стеклянную иглу вводят в выделенные каналцы один за другим, и в каждый каналец вводят раствор, содержащий эмбриональные клетки, применяемые для колонизации в каналце. В другом варианте осуществления одну или более SSC также можно вводить путем введения их в другие части каналцевой системы, например в просвет и сеть семенников. Как понимают специалисты в данной области техники, доступны методы введения, которые минимизируют число инъекций и повышают эффективность введения SSC реципиенту мужского пола.

Суспензия клеток из одной или более SSC для инъекции может включать инъекционную среду и по меньшей мере одну SSC в подходящей концентрации. В виде не ограничивающего примера инъекционная среда может включать один или более из веществ NaCl, Na₂HPO₄, KCl, KH₂PO₄, ЭДТК, пируват, лактат, глутамин, глюкозу, бычий сывороточный альбумин и ДНКазу I. pH инъекционной среды подходящим образом находится в диапазоне 7,0-7,7, но как понимают специалисты в данной области техники, ее можно адаптировать в сторону более основной или более кислотной в зависимости от среды композиции, типа клеток и/или концентрации, а также микросреды в области инъекции реципиента.

В другом варианте осуществления изобретения другие системы можно применять для введения одной или более SSC реципиенту мужского пола. Они включают введение в семявыносящий проток и придаток яичка или манипуляции с семенниками плода или ювенальными семенниками, технологии для выделения семенных каналцев в покрове семенника с минимальной травмой, что позволяет вводимым клеткам проникать через концы каналцев. Альтернативно можно применять семенник (или семенники) новорожденных, которые все еще претерпевают изменения.

Как указано здесь, SSC, попадающие в семенной каналец, обычно защищены от разрушения иммунологически привилегированной средой внутреннего просвета каналца. Клетки, которые выпадают из просвета, обычно уничтожаются иммунной системой хозяина, поскольку клетки являются чужеродными для животного.

В другом варианте осуществления применяют линии животных от различных видов для обеспечения донорскими клетками (ксеногенный перенос). Источники SSC включают, но не ограничиваются человеком, грызунами, включая крыс и мышей, приматами, включая павиана, коровами и собаками.

Настоящее изобретение применимо к любым видам животных, включая людей, у которых представители мужского пола имеют семенники, включая, но не ограничиваясь нечеловекоподобными трансгенными животными. Изобретение также не является ограниченным по видам млекопитающих. Его можно применять для обеспечения животных и линий животных различных типов единичными или множественными новыми генетическими модификациями или новыми свойствами. Животные, для которых можно применять изобретение, включают людей, не человекообразных приматов (например, мартышек, бабуинов), лабораторных животных, таких как грызуны (например, мышей, крыс и т.п.), домашних животных (например, собак, кошек), птиц (таких как куриц и индеек), диких животных (например, быков, волков), животных под угрозой исчезновения (например, слонов, леопардов) и видов из зоопарка (таких как тигров, зебр, львов, панд, жирафов, белых медведей, обезьян, морских выдр и т.д.), которые можно модифицировать для разрешения их применения в клеточной диагностике или оценке. Настоящее изобретение также можно с пользой применять к сельскохозяйственным животным, включая одомашненных жвачных животных и домашних птиц (например, скот, кур, индеек, лошадей, свиней и т.д.) для надления этих животных преимущественной(ыми) генетической(ими) модификацией(ями) или свойством(ами).

В другом варианте осуществления изобретения донор и реципиент млекопитающих может быть одним и тем же млекопитающим. В одном аспекте популяция клеток, включающих SSC, собирают у млекопитающего до разрушения популяции зародышевых клеток и далее вводят повторно. Этот вариант осуществления сохранит способность млекопитающих к репродукции после лучевой терапии, на-

пример, что может быть необходимо во время лечения рака. Альтернативно сперматогониальные стволовые клетки можно собирать у млекопитающего и хранить в культуре или замороженными. В этом аспекте изобретения, когда требуется потомство, стволовые клетки трансплантируют в семенники реципиента. Донорскую яйцеклетку млекопитающих можно далее оплодотворить при помощи развившихся сперматозоидов в семенниках реципиента. Для данной процедуры не существует временных ограничений, поскольку стволовые клетки длительно подвергаются самообновлению.

Методы оплодотворения яйцеклеток и потомства известны в области техники и не будут обсуждаться здесь в деталях. В виде неограничивающего примера методы оплодотворения яйцеклеток включают, но не ограничиваются введением сперматозоида в цитоплазму ооцита (ИКСИ/ICSI), кругового введения сперматиды (ROSI) и т.п. В дополнение в виде неограничивающего примера методы оплодотворения поколения включают, но не ограничиваются ИКСИ, ROSI и т.п.

После достижения оплодотворения и фертильности конечного потомства линию млекопитающих с ее новой генетической модификацией или свойством утверждают там, где новая генетическая модификация или свойство присутствуют как у потомства женского, так и мужского рода. Так в соответствии с изобретением млекопитающее можно воспроизвести путем удерживания только в его семенниках биологически функциональной эмбриональной клетки, которая не является родной этому млекопитающему, путем повторного восстановления популяции его семенных канальцев. Это (родительское) млекопитающее может производить потомство. Каждая клетка в потомстве является генетически не родной по сравнению с млекопитающим-родителем.

Млекопитающее-родитель и его потомство, предоставленные настоящим изобретением, имеют множество различных применений, включая, но не ограничиваясь применением в сельском хозяйстве и биомедицине, включая человеческую генную терапию.

Демонстрационное сельскохозяйственное применение настоящего изобретения относится к повышению потенциала разведения ценных заводских животных. В другом аспекте настоящего изобретения предоставляются гибридные животные, полезные как в биомедицине, так и в сельском хозяйстве. Как понимают специалисты в данной области техники, при наличии настоящей заявки настоящее изобретение предоставляет преимущественную комплементацию к существующим трансгенным животным технологиям.

Настоящее изобретение облегчает имеющуюся дороговизну эмбриональной трансгенной работы. В одном варианте осуществления настоящего изобретения сперматогониальные стволовые клетки можно генетически модифицировать и далее перенести в семенники реципиента. Ценные генетические признаки в конечных зародышевых клетках можно передать (трансгенному) поколению заводских животных-реципиентов. Это конкретное применение настоящего изобретения является важным для генной инженерии крупных сельскохозяйственных животных.

Как указано здесь, настоящее изобретение также имеет применения в генной терапии, включая человеческую генную терапию. В виде неограничивающего примера пациенту с вредным генетическим признаком может проводиться биопсия семенников. Стволовые клетки можно генетически модифицировать для коррекции вредного признака. Далее пациенту проводится лечение для удаления оставшихся зародышевых клеток из его семенников, например, при помощи специфического облучения семенников. Его семенники (теперь уже свободные от зародышевых клеток) можно далее повторно заселять его собственными генетически скорректированными стволовыми клетками. Пациент далее может стать отцом поколения без боязни передать генетическое заболевание своему поколению. Альтернативно стволовые клетки со скорректированным геном можно трансплантировать мышам, и получившуюся сперму применять для оплодотворения яйцеклеток при помощи вышеупомянутой необходимости реимплантации стволовых клеток в исходный человеческий семенник.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение также может применяться в утверждении и восстановлении или, другими словами, усилении фертильности в млекопитающих мужского пола, включая, но не ограничиваясь людьми. В виде неограничивающего примера пациент, имеющий заболевание или расстройство, излечиваемое при помощи радиоизотопной терапии, химиотерапии или обоих методов, является донором одной или более SSC. После прохождения пациентом лечения при помощи радиоизотопной терапии, химиотерапии или обоих методов пациент может быть приведен к состоянию, свободному от SSC, или, другими словами, может считаться бесплодным. Путем применения, изготовления или трансплантации одного или более SSC пациента в соответствии с настоящим изобретением фертильность пациента может быть утверждена, восстановлена или, другими словами, усилена.

Комплементация стерильных семенников.

В последнее время конкретные причины бесплодия у мужчин остаются невыясненными в 40-60% случаев (см. Bhasin с соавт., J Clin Endocrinol Metab 79, 1525-9 (1994); Sadeghi-Nejad с соавт., Urol J 4, 192-206 (2007) и Matzuk с соавт., Nat Med 14, 1197-213 (2008)). Всего >5% мужской популяции являются бесплодными, и >1% всех мужчин имеют тяжелое нарушение выработки спермы, которое называется азооспермией (см. Chasin с соавт., J Clin Endocrinol Metab 79, 1525-9 (1994); Sadeghi-Nejad с соавт., Urol J 4, 192-206 (2007); Barthold с соавт. J Urol 170, 2396-401 (2003) и Bleyer, W.A. CA Cancer J Clin 40, 355-67 (1990)). В основном поскольку азооспермия приводит к неспособности к репродукции естественным

путем, кажется загадочным, почему это заболевание остается таким распространенным в человеческой популяции. Такая эпидемиологическая тенденция четко указывает на существование сильных факторов среды, которые нарушают процесс выработки спермы (то есть сперматогенез), или на значительное число мутаций *de novo*, которые могут появляться во время жизни для оставления особи стерильной, но в остальном здоровой (см. Bhasin с соавт., *J Clin Endocrinol Metab* 79, 1525-9 (1994); Bleyer, W.A., *CA Cancer O Clin* 40, 335-67 (1990); Reijo, R. с соавт., *Nat Genet.* 10, 383-93 (1995); Oates с соавт., *Hum Reprod* 17, 2813-24 (2002)). На самом деле это правда в некоторых случаях, поскольку такие мутации *de novo* характерны для нескольких типов бесплодия по мужскому типу, которые определены на генетическом уровне, а растущее число мужчин остаются бесплодными в детстве из-за химиотерапии рака (см. Sadeghi-Nejad с соавт., *Urol J* 4, 192-206 (2007); Reijo с соавт. *Nat Genet.* 10, 383-93 (1995); Bleyer с соавт., *CA Cancer J Clin* 40, 355-67 (1990); Oates с соавт., *Hum Reprod* 17, 2813-24 (2002); Bhasin, S., *J Clin Endocrinol Metab* 92, 1995-2004 (2007) и Geens, M. с соавт., *Hum Reprod Update* 14, 121-30 (2008)). Как новая надежда для многих бесплодных мужчин с азооспермией, передовой прорыв в биологии стволовых клеток, который установил сильные связи между репродуктивной биологией и генетическим исследованием, представляет собой открытие, что семенники мышей содержат сперматогониальные стволовые клетки, способные вырабатывать полностью функциональную сперму после выделения и трансплантации в семенники другой мыши (см. Brinster & Zimmermann, *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 11298-302 (1994)). Похожие эксперименты вскоре последовали с крысами, и выделенные у мышей сперматогонии, как оказалось, сохраняют свой потенциал к регенерации через месяцы в культуре (см. Clouthier с соавт., *Nature* 381, 418-21 (1996); Nagano с соавт., *Tissue Cell* 30, 389-97 (1998)). Составлена новая культуральная среда, поддерживающая длительную пролиферацию сперматогониальных линий у крыс *in vitro*, и ученые сейчас находятся на пороге утверждения условий, требуемых для культивирования человеческих сперматогониальных линий из биоптатов семенников (см. Kanatsu-Shinohara с соавт., *Biol Reprod* 69, 612-6 (2003); Hamra, F.K. с соавт., *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 17430-5 (2005); Conrad, S. с соавт. *Nature* (2008) и Kossack, N. с соавт. "Isolation and Characterization of Pluripotent Human Spermatogonial Stem Cell-Derived Cells." *Stem Cells* (2008)). По-видимому, способность к репродукции сперматогониальных линий в культуре до применения их для продуцирования функциональных сперматозоидов путем трансплантации их обратно в семенники донора представляет ясную стратегию для лечения многих существующих типов мужского бесплодия. Из-за во многом мультипотентной природы зародышевых стволовых клеток, тем не менее, до того, как эти прорывы будут переведены на практику, обязательно сначала строго оценивать доклинические детали таких клеточных терапий в более запущенных нечеловеческих реципиентах по медицинской значимости (см. Geens, M. с соавт., *Hum Reprod Update* 14, 121-30 (2008); Conrad S. с соавт. "Generation of pluripotent stem cells from adult human testis." *Nature* (2008); Kossack, N. с соавт. "Isolation and Characterization of Pluripotent Human Spermatogonial Stem Cell-Derived Cells." *Stem Cells* (2008); Hermann, B.P. с соавт., *Stem Cells* 25, 2330-8 (2007) и Zhang с соавт., *J Cell Physiol* 211, 149-58 (2007)).

Наборы.

Изобретение включает различные наборы, которые включают культуральную систему, свободную от фидера, для поддержания или пролиферации по меньшей мере одной SSC. Хотя типичные наборы описаны ниже, содержимое других полезных наборов будет очевидно специалисту в области техники в свете настоящего раскрытия. Каждый из этих наборов включен в изобретение.

В одном аспекте изобретение относится к набору для поддержания по меньшей мере одной SSC в культуральной системе, свободной от фидера, включающей культуральную систему, включающую культуральную среду определенного состава, свободную от сыворотки, а также предварительно кондиционированные клетки-фидеры из одной или более собственных клеточных линий, включая клетку в BEF1 и линию клеток BSC1, аппликатор, учебный материал, где учебный материал включает инструкции для применения набора для поддержания по меньшей мере одной SSC в культуральной среде, свободной от фидера. В другом аспекте изобретение относится к набору для пролиферирования по меньшей мере одной SSC в культуральной системе, свободной от фидера, включающей культуральную систему, включающую культуральную среду определенного состава, свободную от сыворотки, а также предварительно кондиционированные клетки-фидеры, или среду, которая уже предварительно кондиционирована, аппликатор, учебный материал, где учебный материал включает инструкции для применения набора для пролиферирования по меньшей мере одной SSC в культуральной среде, свободной от фидера.

Изобретение также относится к набору для введения популяции обогащенный SSC млекопитающему, включающему культуральную систему, включающую культуральную среду с определенным составом, свободную от фидера, предварительно кондиционированную клетками-фидерами, аппликатор, учебный материал, где учебный материал включает инструкции для применения набора для поддержания по меньшей мере одной SSC в культуральной среде, свободной от фидера, а также для введения при помощи аппликатора обогащенных SSC млекопитающему.

Конкретный аппликатор включен в набор в зависимости от, например, метода и/или композиции, применяемых для введения популяции обогащенных SSC в клетку. Такие аппликаторы хорошо известны в области техники и могут включать, среди других, мембрану, имплант, шприц и т.п. Более того, набор включает учебный материал для применения набора. Эти инструкции просто излагают предоставленное

здесь раскрытие.

Набор также может включать фармакологически приемлемый носитель. Композиция предоставлена в подходящем количестве, как указано здесь. Дополнительно путь введения включает, но не ограничивается, прямым контактом с желаемой областью введения, а также контактом с клеткой и тканью, прилежащими к желаемой области введения.

Композиции и методы выделения, очищения, обогащения, пролиферации и поддержания SSC, охваченные наборами изобретения, описаны здесь в деталях.

Изобретение дополнительно описано в деталях посредством ссылки на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры предоставлены только с демонстрационной целью и не имеют тенденции к ограничению, если не указано иного. Таким образом, изобретение ни в коей мере не должно считаться ограниченным следующими примерами, но, более того, его следует интерпретировать как охватывающее любые и все варианты, которые очевидны в качестве результатов предоставленного здесь обучения.

Примеры

Выделение и культивирование бычьих или свиных недифференцированных сперматогоний.

1. Приготовить инкубационный раствор с коллагеназой/ДНКазой (1-5 мг/мл коллагеназы, Worthington Biological и 5-10 мг/мл ДНКазы, Sigma-Aldrich).

2. Вручную разделить 100-200 мг разделенной паренхимы бычьих или свиных семенников при помощи микропинцета и поместить в дигестивный раствор коллагеназы/ДНКазы.

3. Инкубировать при 37°C, аккуратно и периодически перемешивая до разделения семенных канальцев.

4. Дать фрагментам семенных канальцев осесть на лед, удалите надосадочную жидкость и промойте в сбалансированном солевом растворе Хенкса, имеющемся у Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA 92008 США (HBSS), или в подходящем физиологическом буфере. Повторить процедуру до того, как надосадочная жидкость станет относительно чистой.

6. После последней инкубации осадка удалить надосадочную жидкость и повторно суспендировать канальцы в дигестивном буфере трипсина/ДНКазы (Invitrogen).

7. Инкубировать при 37°C и далее добавить больше раствора ДНКазы, отмеряя пипеткой, чтобы создать суспензию клеток, состоящую из зародышевых клеток и клеток Сертоли.

8. Добавить фетальную бычью сыворотку или другой подходящий источник протеина для остановки переваривания трипсина и прохождения суспензии клеток через подходящий клеточный фильтр для удаления фрагментов тканей с оставлением, таким образом, только клеточной суспензии.

9. Центрифугировать при 600×g в течение 7 мин при 4°C для осаждения клеток.

10. Аспирировать надосадочную жидкость и повторно суспендировать клетки в DPBS-S (фосфатно-солевом буфере с 1% FBS, 10 ммоль Непес, 1 ммоль пирувата, 1 мг/мл глюкозы, 1×10⁴ ед/мл пенициллина, 1×10⁴ мкг/мл стрептомицина) или другой подходящий физиологический буфер.

11. Переложить клеточную суспензию в 30%-ный раствор перколла при плотности 2 мл раствора перколла на 5 мл клеточной суспензии. Другие объемы и соотношения перколла и клеточной суспензии также могут быть подходящими.

12. Центрифугировать при 600×g в течение 8 мин при 4°C.

13. Удалить надосадочную жидкость для восстановления осаждения клеток и повторно суспендировать в DPBS-S или другой подходящий буфер.

14. Центрифугировать при 600×g в течение 7 мин при 4°C.

15. Удалить надосадочную жидкость и повторно суспендировать в культуральную среду StemPro (рецепт ниже).

16. Центрифугировать снова и вымыть клетки в StemPro для удаления остаточной фетальной бычьей сыворотки.

17. Повторно суспендировать вымытый осадок клеток в StemPro и добавить смесь из факторов роста (GDNF 40 нг/мл, FGF 10 нг/мл, CSF-1 10 нг/мл, SDF-1 10 нг/мл). Другие концентрации этих факторов роста также могут быть подходящими.

18. Добавить клетки в емкость с 6 лунками для культивирования, предварительно покрытую 0,1% желатином при плотности 2×10⁶ клеток на лунку, и инкубировать при 37°C. Другие форматы лунок для культивирования, концентрации желатина и плотности клеток также могут быть подходящими.

19. На следующий день добавить HBSS или другой подходящий физиологический буфер к каждой лунке и аккуратно пропустить при помощи пипетки через лунку для удаления неприлипших клеток.

20. Собрать суспензию неприлипших клеток, которые обогащены бычьими сперматогониями.

21. Центрифугировать зародышевые клетки при 600×g в течение 7 мин при 4°C, удалить надосадочную жидкость и повторно суспендировать в BEF1 или BSC1 кондиционированной клетками-фидерами среде StemPro и добавить смесь факторов роста.

22. Поместить клетки в емкость с 24 лунками, предварительно покрытыми Matrigel (BD Biosciences). Другие субстраты, такие как ламинин и фибронектин также могут быть подходящими для

покрытия пластиковых лунок для культивирования, а также могут быть подходящими емкостями для культивирования на 96, 48 и 12 лунок.

23. Инкубировать клетки при 37°C в атмосфере 5% CO₂ на воздухе. BEF1 или BSC1 предварительно кондиционированную среду меняют через день, и клетки повторно помещают на новый матрикс покрытых пластиковых лунок для культивирования с периодичностью в 7-10 дней.

Клетки могут поддерживаться в этих условиях в течение более чем 6 месяцев с формированием глыбок с морфологией, показанной на чертеже. В дополнение клетки сохраняют экспрессирование молекулярных маркеров недифференцированных сперматогоний, включая фактор транскрипции PLZF.

Предварительное кондиционирование среды StemPro.

1. Поддержать BEF и BSC фидеров в модифицированной по методу Дульбекко среды Игла (DMEM), питательной среды, имеющейся в продаже от Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA 92008 США, и субкультуры 1:2-1:5 при 80% совпадении.

2. Предварительное кондиционирование StemPro происходит за 24 ч до добавления среды к культивируемым сперматогониям.

3. Удалить DMEM питательную среду и вымыть клетки при помощи HBSS или другого подходящего физиологического буфера и отложить.

4. Добавить среду StemPro к фидерам и инкубировать при 37°C в течение ночи.

5. Собрать предварительно кондиционированную среду StemPro и пропустить через 0,45 мкм фильтр шприца, добавить смесь факторов роста (GDNF, FGF2, CSF-1 и SDF-1).

6. Добавить рысьи сперматогонии, поддерживаемые в пластиковых лунках для культивирования, покрытых Matrigel или другим подходящим матриксом.

Создание фидеров бычьих эмбриональных фибробластов (BEF).

1. Поместить бычий эмбрион 35 дней от роду в PBS.

2. Удалить голову и висцеральные органы, включая гонады.

3. Разрезать эмбрион на небольшие части стерильным лезвием.

4. Переварить ткани в растворе трипсина путем инкубирования при 37°C.

5. Дать тканям осесть на лед, затем тщательно собрать пипеткой.

6. Добавить больше раствора трипсина и инкубировать при 37°C.

7. Дать ткани осесть на лед, собрать надосадочную жидкость и центрифугировать при 300×g в течение 5 мин.

8. Повторно суспендировать осажденные клетки в DMEM питательной среде и поместить в лунки для культивирования.

9. Выращивать клетки при 37°C в атмосфере 5% CO₂ на воздухе.

10. Обессмертить клетки путем трансфектирования с рекомбинантной ДНК, сконструированной для гиперэкспрессии теломеразы.

Создание фидеров бычьих соматических клеток (BSC).

1. Бычьи клетки семенников, которые прилипают к покрытым желатином лункам для культивирования во время процедуры дифференциального чашечного метода для выделения сперматогоний, поддерживаются в DMEM питательной среде после удаления сперматогоний.

2. Эта популяция клеток представляет собой смесь соматических клеток из бычьих семенников, включая клетки Сертоли, клетки Лейдига и фибробласты.

3. Клетки растут при 37°C в атмосфере 5% CO₂ на воздухе и обессмерчиваются путем трансфектирования с рекомбинантной ДНК, сконструированной для гиперэкспрессии теломеразы.

StemPro среда для бычьих недифференцированных сперматогоний Реагент	Конечная конц.	Поставщик
DMEM/F12		Invitrogen
Пенициллин и Стрептомицин	П: 50 Ед/мл С: 50 мкг/мл	Invitrogen

Насыщенный железом трансферрин	10 мкг/мл	Sigma
Na ₂ SeO ₃	3x10 ⁻⁸ моль	Sigma
2-МЕ	50 мкмоль	Sigma
Инсулин	5 мкг/мл	Sigma
Путресцин	60 мкмоль	Sigma
МЕМ Заменяемые аминокислоты	1x	Invitrogen
МЕМ Витамины	1x	Invitrogen
Фетальная бычья сыворотка (FBS)	0,1%	Invitrogen
Глутамин	2 ммоль	Invitrogen
StemPro Добавка	2%	Invitrogen

Депозиты.

Депозит линий клеток BEF1 и BSC1 поддерживается автором изобретения этой заявки с даты подачи этой заявки. Доступ к этому хранению будет доступен во время нахождения заявки на рассмотрении у Комиссара по патентам и товарным знакам, и человека, определенного Комиссаром по запросу. После разрешения любых пунктов формулы изобретения в заявке заявитель(и) сделает хранения доступными для публики без ограничений каждой линии с Американской Коллекцией Типовых Культур (ATCC), Manassas, Virginia, 20110. Клеточные линии, хранящиеся в ATCC, заберут из того же депозита, поддерживаемого авторами изобретения и описанного здесь. В дополнение заявитель(и) удовлетворяет требованиям Свода Федеральных Правил (C.F.R.) §1.801-1.809, включая предоставление показаний жизнеспособности образца при создании депозита. Этот депозит линии клеток BEF1 и BSC1 будет поддерживаться в хранилище ATCC, которое является публичным, в течение 30 лет, или 5 лет после самого последнего запроса, или в течение времени осуществимости образца, каким бы долгим оно не было, и будет замещен, если он станет нежизнеспособным в течение этого периода. Заявитель не встретит ограничений по доступности хранящегося материала со стороны ATCC, тем не менее, заявитель не обладает авторитетом для отклонения каких-либо ограничений, наложенных законом на трансфер биологического материала или его перемещение в торговле.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ кондиционирования минимальной среды для поддержания и обогащения сперматогонимальных стволовых клеток (SSC), включающий:

(а) обеспечение контактирования среды с клетками из линии бычьих или свиных эмбриональных фибробластов и/или бычьих или свиных соматических клеток, выделенных из бычьих или свиных семенников, с размножением указанных клеток в указанной среде; и

(b) удаление указанных в (а) клеток-фидеров и сбор кондиционированной среды.

2. Способ обогащения популяции клеток, полученных из семенников, содержащих по меньшей мере одну SSC, бычьими или свиными сперматогонимальными стволовыми клетками (SSC), где указанный способ включает:

а) получение кондиционированной минимальной среды в соответствии со способом по п.1;

б) обеспечение контактирования указанной популяции клеток с указанной кондиционированной средой в условиях, подходящих для поддержания и обогащения SSC клеток, что приводит к обогащению указанной популяции указанными SSC.

3. Способ по п.2, где указанные SSC представляют собой бычьи клетки.

4. Способ по п.1, где указанная кондиционированная среда представляет собой среду DMEM/F12.

5. Способ по п.1, где в указанную среду добавляют заменитель сыворотки.

6. Способ по п.5, где заменителем сыворотки является StemPro.

7. Способ по п.1, где стадия b) осуществляется в пластиковых лунках для культивирования клеток.

8. Способ по п.7, где указанные пластиковые лунки покрыты Matrigel для адгезии к ним SSC.

9. Способ по п.1, дополнительно содержащий стадию

- с) добавления в указанную кондиционированную среду факторов роста GDNF, FGF2, SDF-1 и CSF-1.
10. Кондиционированная среда для поддержания и обогащения бычьих или свиных сперматогониальных стволовых клеток (SSC), полученная способом по п.1.
11. Популяция клеток обогащенная бычьими или свиными сперматогониальными стволовыми клетками для трансплантации, оплодотворения или генной терапии, полученная способом по п.2.
12. Популяция клеток по п.11, где указанные SSC представляют собой бычьи клетки.
13. Способ получения спермы у млекопитающего-реципиента, где указанный способ включает:
- а) введение SSC-обогащенной популяции, полученной способом по п.2, в семенники млекопитающего-реципиента мужского пола;
 - б) создание колонии сперматогенеза указанными обогащенными SSC в указанном млекопитающем-реципиенте.
14. Способ по п.13, где указанную популяцию SSC вводят в просвет семенных канальцев указанного млекопитающего-реципиента.
15. Способ по п.13, где указанное млекопитающее-реципиент бесплодно.
16. Способ по п.13, где указанное млекопитающее-реципиент выбирают из грызуна, примата, собаки, быка, свиньи и человека.
17. Способ по п.16, где указанное млекопитающее представляет собой быка.

