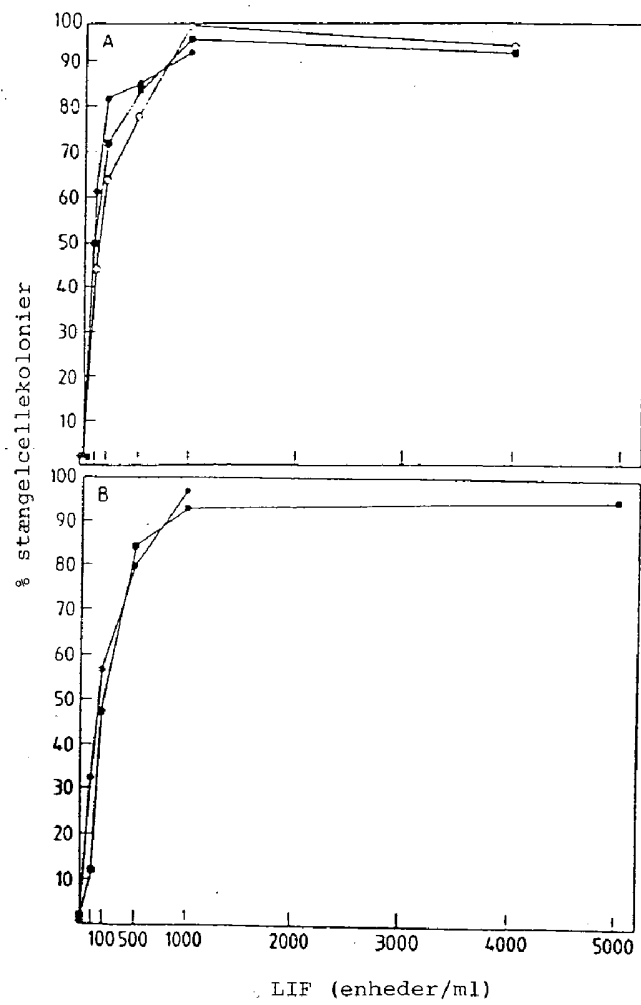




Patent- og  
Varemærkestyrelsen

- 
- (51) Int.Cl.<sup>®</sup>: **C 12 N 5/06 (2006.01)**                      **A 01 K 67/027 (2006.01)**                      *C 12 N 5/08 (2006.01)*
- (21) Patentansøgning nr: **PA 1991 00170**
- (22) Indleveringsdag: **1991-01-31**
- (24) Løbedag: **1989-08-03**
- (41) Alm. tilgængelig: **1991-04-04**
- (45) Patentets meddelelse bkg. den: **2007-04-10**
- (86) International ansøgning nr: **PCT/AU89/00330**
- (86) International indleveringsdag: **1989-08-03**
- (85) Videreførelsesdag: **1991-01-31**
- (30) Prioritet: **1988-08-04 AU 9644/88**
- (73) Patenthaver: **Amrad Corporation Limited, a corporation of the State of Victoria, 17-27 Cotham Road, Kew, Victoria, 3101, Australien**
- (72) Opfinder: **Robert Lindsay Williams, 28 Wattleblossom Road, Warrandyte, Victoria, 3133, Australien**  
**Nicholas Martin Gough, 20 Rangeview Grove, North Balwyn, Victoria, 3103, Australien**  
**Douglas James Hilton, 8 West End Road, Warrandyte, Victoria, 3133, Australien**
- (74) Fuldmægtig: **Zacco Denmark A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark**
- 

- (54) Benævnelse: **In vitro isolering og opretholdelse af embryo stængelceller, (ES)-celler, samt fremgangsmåde til fremstilling af et non-humant kimmært dyr**
- (56) Fremdragne publikationer:  
**Ingen**
- (57) Sammendrag:
- Den foreliggende opfindelse angår anvendelse af leukæmihæmmende faktor (LIF) til opretholdelse og afledning af embryo stængel (ES)-celler i kultur. ES-cellerne opretholdes og/eller afledes fra dyreembryoer ved at dyrke cellerne eller embryoerne i et dyrkningsmedium indeholdende en effektiv mængde af LIF i et tidsrum og under betingelser, som er tilstrækkelige til at opretholde og/eller aflede ES-cellerne. ES-cellerne kan føres videre i LIF og anvendes til at fremstille kimmære dyr.

*Fig.1.*

Nærværende opfindelse angår anvendelse af et tidligere opdaget og karakteriseret molekyle, leukæmihæmmende faktor (LIF), til isolering og formering af embryone stængelceller in vitro.

5

Embryone stængel (ES)-celler, som er de flerpotente udvækster af blastocytter, kan dyrkes og manipuleres in vitro og derpå returneres til det embryone miljø for at bidrage normalt til alt væv, herunder kimlinien (for redegørelse, jvf. Robertson, E.J. (1986) Trends in Genetics 2:9-13). ES-celler, der er formeret in vitro, kan ikke alene bidrage effektivt til dannelse af kimærer, herunder kimlinie kimærer, men endvidere kan disse celler manupuleres in vitro uden at tabe deres evne til at frembringe kimlinie kimærer (Robertson, E.J. et. al. (1986) Nature 323:445:447).

10  
15

ES-celler tilvejebringer således en vej til frembringelse af transgene dyr, såsom transgene mus, en vej, som har en række vigtige fordele i sammenligning med mere traditionelle metoder, såsom zygote injektion og viral infektion (Wagner og Stewart (1986), i Experimental Approaches to Embryonic Development. J. Rossant og A. Pedersen, red., Cambridge: Cambridge University Press) til indføring af nyt gentisk materiale i disse dyr. For det første kan genet af interesse indføres og dets integrering og ekspression kan karakteriseres in vitro. For det andet kan virkningen af det indførte gen på ES-celle-  
vækst undersøges in vitro. For det tredje kan de karakteriserede ES-celler, som omfatter et nyt indført gen,  
30

- effektivt indføres i embryoner ved blastocystinjektion eller embryoaggregering, og det indførte gens virkninger på udvikling af de resulterede transgene kimærer kan overvåges under præ- eller postnatal levetid. For
- 5 det fjerde kan det sted i ES-cellegenomet, hvorved det indførte gen integreres, manipuleres, hvorved der åbnes mulighed for genmålmarkning og generstatning (Thomas, K.R. og Capecchi, M.R. (1987) Cell 51:503-512).
- 10 Det er imidlertid kendt, at ES-celler og visse EC (embryonale carcinoma)-cellelinier kun vil beholde stængelcellefænotypen in vitro, når de dyrkes på et næringslag af fibroblaster (såsom murine STO-celler, f.eks. Martin, G.R. og Evans, M.J. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
- 15 72:1441-1445) eller når de dyrkes i et medium, som er konditioneret med visse celler (f.eks. Koopman, P. og Cotton, R.G.H. (1984) Exp. Cell Res. 154:233-242; Smidth, A.G. og Hooper, M.L. (1987) Devel.Biol. 121:1-91). Uden tilstedeværelse af næringsceller eller konditioneret medium differentierer ES-cellerne spontant til
- 20 en lang række celletyper, der ligner de, som findes under embryogenese og i det udvoksne dyr. De faktorer, som er ansvarlig for opretholdelse af ES-cellers flerpotens har imidlertid været dårligt karakteriseret.
- 25 Ved arbejde, som har ført til den foreliggende opfindelse, har det vist sig, at LIF har evnen til at erstatte eller sættes til næringslag (eller konditioneret medium) til understøttelse af flerpotente ES-cellers oprethol-
- 30 delse in vitro.

LIF er et protein, som tidligere er blevet oprenset, klonet og fremstillet i store mængder i oprenset rekombinant form fra både Escherichia coli og gærceller (international patentansøgning nr. PCT/AU88/00093, indleveret 31. marts 1988). LIF er blevet defineret som en faktor vis egenskaber omfatter:

1. Den besidder evnen til at undertrykke proliferering af myeloide leukæmiceller, såsom M1-celler, med associeret differentiering af leukæmicellerne, og

2. den vil konkurrere med et molekyle, som besidder den definerede sekvens af murin LIF eller muman LIF (defineret i international patentansøgning nr. PCT/AU88/00093) om binding til specifikke cellulære receptorer på M1-celler eller murine eller humane makrofager. Udover de tidligere beskrevne biologiske egenskaber for murin og human LIF har LIF også vist sig at besidde følgende egenskaber:

(a) Den tillader afledning og opretholdelse uden nærvær af næringsceller af den flerpotentielle fænotype af ES-celler in vitro.

25

(b) Den tillader, at førnævnte ES-celler efter overførsel in vitro i nærvær af LIF bidrager til somatisk og kimlinie cellevæv hos kimære dyre, såsom mus, når de genindføres i det embryone miljø.

30

(c) Den viser selektiv binding til højaffinitetsreceptorer på murine ES (EKcs-1 (tidligere kendt som CS1) og D3) og EC (PCC3-3A og F9)-celler,

- 5 (d) Specifik binding af  $^{125}$ I-LIF til højaffinitetsreceptorer konkurrerer ikke med insulin, IGF-I, IGF-II, sur og basisk FGF, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , NGF, PDGF, EGF, IL-1, IL-2, IL-4, GM-CSF, G-CSF, multi-CSF eller erythropoietin, men konkurrerer med murin og human LIF.

10

Ifølge et første aspekt ved den foreliggende opfindelse angår den en fremgangsmåde til isolering af embryone stængel (ES)-celler fra non-humane dyreembryoer in vitro, hvilken fremgangsmåde omfatter dyrkning af embryonerne i dyrkningsmediet, hvilket dyrkningsmedium indeholder en effektiv mængde af leukæmihæmmende faktor (LIF) samt udtagning af ES-celler fra embryonerne. De embryoner, der anvendes, kan være isoleret fra dyr, heriblandt men ikke begrænset til en række dyrearter, såsom

15 fugle, (f.eks. kyllinger) mus, får, grise, kvæg, geder

20 og fisk.

Et andet aspekt af den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til opretholdelse af embryone dyrestængel (ES)-celler in vitro, samtidig med at de bevarer deres

25 flerpotentielle fænotype, hvilken fremgangsmåde omfatter dyrkning af cellerne i et dyrkningsmedium, som indeholder en effektiv mængde af leukæmihæmmende faktor (LIF) under betingelser, som er tilstrækkelige til at opretholde cellerne. ES-cellerne ifølge dette aspekt af op-

30

findelsen omfatter celler fra mus, fugle (f.eks. kyllinger), får, grise, kvæg, geder og fisk.

Det LIF, som anvendes i dyrkningsmediet, er fortrinsvis rekombinant LIF, som f.eks. er fremstillet i henhold til fremgangsmåderne beskrevet i international patentansøgning nr. PCT/AU88/00093. Ifølge den foreliggende opfindelse har det vist sig, at rekombinant LIF og navnlig rekombinant human og murin LIF er effektive erstatninger for eller additiver til næringslag eller konditioneret medium til opretholdelse af ES-celler in vitro. Til formålene ifølge den foreliggende beskrivelse er rekombinant LIF produceret i E. coli og gær under anvendelse af fremgangsmåderne beskrevet i international patentansøgning nr. PCT/AU88/00093, men det ligger imidlertid indenfor den foreliggende opfindelses rækkevidde at omfatte rekombinant LIF, som er produceret i andre værter, herunder pattedyrsceller og insektceller og syntetisk LIF.

20

I et tredje aspekt angår opfindelsen en fremgangsmåde til fremstilling af et non-humant kimært dyr, som er ejendommeligt ved, at den omfatter indføring af dyre-ES celler, som er blevet isoleret eller dyrket ved en fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-13 i præimplantations-embryo-stadiet i dyret. ES-celler kan hidrøre fra dyreembryoer ved passage i et dyrkningsmedium indeholdende LIF, som kan omfatte yderligere genetisk materiale indføjet deri og til non-humane kimære dyr, såsom kimære mus eller transgene afkom af disse dyr, kan

30

frembringes ved kendte metoder under anvendelse af ES-celler, som er blevet opretholdt in vitro i et LIF-holdigt dyrkningsmedium.

5 Opfindelsen angår således isolering og opretholdelse af ES-celler fra mus, fugle (f.eks. kyllinger), får, grise, kvæg, geder og fisk og frembringelse af non-humane transgene kimære dyr og deres transgene afkom under anvendelse af ES-cellerne isoleret fra dyrearter, såsom  
10 mus, fugle (f.eks. kyllinger), får, grise, kvæg, geder og fisk. LIF kan anvendes i dyrkningsmedium for at modulere overlevelsen og væksten af dyrearter, såsom kvæg-kimceller og embryone celler, f.eks. til anvendelse ved in vitro befrugtning og andre procedurer.

15

Den foreliggende opfindelse kan også beskrives under henvisning til følgende tegning:

Figur 1 er en graf, som viser virkningen af forskellige  
20 LIF-koncentrationer på ES-celler.

Figur 2 er et billede, som viser ES-cellemorfologi i nærvær og uden tilstedeværelse af LIF.

25 Figur 3 viser en graf (A og C) og billed (B) afbildning, som viser binding af <sup>125</sup>I-LIF til ES-celler (EKcs-1) og EC-celler (F9 og PCC3-A).

Den foreliggende opfindelse angår fremgangsmåder til  
30 isolering og opretholdelse af embryone stængel (ES)-

celler fra dyreembryoer in vitro, hvilke fremgangsmåder  
omfatter dyrkning eller opretholdelse af ES-cellerne fra  
embryoerne i dyrkningsmedium indeholdende en effektiv  
mængde af leukæmihæmmende faktor (LIF) i et tidsrum og  
5 under betingelser, som er tilstrækkelige til dyrkning  
og/eller opretholdelse af ES-cellerne. Dyreembryoerne  
kan være isoleret fra en række dyrearter, såsom mus,  
fugle (f.eks. kyllinger), får, grise, kvæg, geder og  
fisk. Ved henvisningen heri til "dyreembryoer" omfattes  
10 henvisning til "dyreblastocyster". Den foreliggende op-  
findelse er endvidere eksemplificeret under anvendelse  
af human LIF med murine ES-celler (heterologt system) og  
murin LIF med murine ES-celler (homologt system). Dette  
udføres ud fra den forståelse, at den foreliggende op-  
15 findelse kan overvejes i forbindelse med LIF fra enhver  
dyreart i heterologe eller homologe systemer sammen med  
dyreembryoer fra dyrearter, såsom mus, fugle (f.eks.  
kyllinger), får, grise, kvæg, geder og fisk. Selvom et  
heterologt system under visse omstændigheder vil fungere  
20 effektivt, kan det være at foretrække at anvende homolo-  
ge systemer. Ved hjælp af den heri beskrevne lære vil  
det være rutine for en fagmand inden for området at  
fastlægge, hvorvidt et homologt eller heterologt system  
er påkrævet for at isolere eller opretholde bestemte ES-  
25 dyreceller.

Ved udtrykket "dyrkningsmedium" menes et passende medi-  
um, der er i stand til at understøtte vækst af ES-  
celler. Eksempler på passende dyrkningsmedier, der er  
30 anvendelige til udøvelse af den foreliggende opfindelse,

er Eagles medium eller modifikationer eller ækvivalenter hertil, såsom Dulbeccos eller Glasgows modificerede Eagles medium med tilsætninger, såsom 5-30 % (volumen/volumen) føtalt kalveserum, og hvor nødvendigt 0,01-  
5 1,0 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, men fortrinsvis ca. 0,1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. Dyrkningsmediet kan eller kan ikke indeholde næringsceller og LIF kan anvendes til at erstatte disse næringsceller eller til at sætte til disse næringsceller. Når det er påkrævet, sættes LIF eller nær-  
10 mere bestemt syntetisk eller rekombinant LIF til mediet i en koncentration på ca. 100-1.000.000 enheder/ml og fortrinsvis ca. 100-100.000 enheder/ml og mere fortrinsvis 500-10.000 enheder/ml, hvor 50 enheder defineres som den mængde LIF, som i 1 ml inducerer en 50% reduktion af  
15 klondannelse med murine M1 myeloide celler. Med udtrykket "rekombinant LIF" menes LIF fremstillet ved genmanipuleringsmetoder, såsom f.eks. i henhold til international patentansøgning nr. PCT/AU88/00093, hvor der kan benyttes en række værter, såsom bakterier (f.eks. E. coli)  
20 eller gærceller. Ifølge den foreliggende opfindelse er det effektive afledningstidsrum fra 1 dag til 20 uger og navnlig fra 1 til 8 uger.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til  
25 opretholdelse af ES-dyreceller in vitro, under bevarelse af deres flerpotentielle fænotype, hvilken fremgangsmåde omfatter dyrkning af cellerne i et dyrkningsmedium indeholdende en effektiv mængde LIF under betingelser, som er tilstrækkelige til at opretholde cellerne. ES-  
30 cellerne ifølge dette aspekt af opfindelsen omfatter

celler afledt fra mus, fugle (f.eks. kyllinger), får, grise, kvæg, geder og fisk. Som i forbindelse med isolering af ES-celler fra dyreembryoer er LIF anvendt ved ovennævnte fremgangsmåde fortrinsvis rekombinant LIF.

5 Dyrkningsmediet kan eller kan ikke indeholde næringsceller.

I henhold til den foreliggende opfindelse er "flerpotentielle celler" og "embryone stængelceller" de celler, som bevarer udviklingspotentialiet til at differentiere til alle somatiske cellelinier og kimmecellelinier.

Rekombinant LIF's evne til at opretholde stængelcellefænotypen af ES-celler vises ved at overføre ES-celler D3 og HD5 til normalt celledyrkningsmedium i nærvær af varierende koncentrationer af oprenset gærafledt rekombinant humant LIF (rY-HLIF) eller E. coli-afledt muse LIF (rE-MLIF). Ved koncentrationer på 1.000-5.000 enheder/ml rY-HLIF eller rE-MLIF bevarede mere end 90% af D3 og HD5 ES-cellerne deres stængelcellefænotype. I modsætning hertil differentierede ES-celler, der var opretholdt i normalt dyrkningsmedium, i løbet af 3-6 dage. Andelen af kolonier med stængelcellefænotype var relateret til LIF-koncentrationen i dyrkningsmediumet. Udover at opretholde etablerede ES-cellelinier blev seks nye ES-cellelinier (MBL-1,2,3,4,5 og 6) isoleret fra bastocyster uden tilstedeværelse af næringsceller, når mediet var tilsat 1000 enheder/ml rE-HLIF. Langtidsopretholdelse af ES-cellelinierne D3, HD5 og MBL-1-6 i LIF i op til 22 passager (ca. 100 cellegenerationer eller 10 uger) hindrede

ikke bemærkelsesværdigt vækstkarakteristikken af disse ES-celler eller deres dosisafhængighed af LIF. Disse ES-cellers evne til at differentiere til alle somatiske cellelinier og kimcellelinier blev bekræftet ved genindfø-  
5    føring af D3 og MBL-1 celler i blastocyster. Ca. 50% af det analyserede afkom indeholdt væv hidrørende fra de injicerede ES-celler ved niveauer af åbenlys kimærisme på så meget som 90% i individuelle mus. For at afprøve for kimlinie transmission af ES-afledte celler, blev  
10    han-kimærer parret med C57BL/6J mus. Tre D3 og to MBL-1 C57BL/6J kimærer gav anledning til "aguti"-afkom, hvilket bekræftede, at disse ES-celler kan bidrage til dannelse af kimceller.

15    Den foreliggende opfindelse angår også kimære dyr, frembragt ved kendte metoder under anvendelse af de foreliggende ES-celler. Disse ES-celler kan være isoleret fra dyreembryoer og/eller opretholdt in vitro i henhold til den foreliggende opfindelse. Endvidere kan genetisk ma-  
20    nipulerede ES-celler overføres til LIF og anvendes til at fremstille kimære dyr. Genetisk manipulerede ES-celler indeholdende retrovirus vektor (N-TK527, afledt fra pXT1, C.A. Boulter og E.F. Wagner, (1987) Nucl. Acids Res. 15:7194), som koder for gener for neomycinre-  
25    sistens og c-src<sup>527</sup>, blev formeret i nærvær af LIF, men uden tilstedeværelse af næringsceller i over 20 passager. Disse celler bevarede stadig evnen til at differentiere, vurderet ved dannelsen af normale kimære efter indføring af disse celler i præimplantationsembryoer ved  
30    blastocystinjektion.

Yderligere detaljer for anvendelse af LIF ifølge den foreliggende opfindelse vil fremgå af nedenstående eksempler.

5

#### Eksempel 1

Dette eksempel beskriver de trin, der anvendes til at opretholde ES-celle in vitro i LIF og til at frembringe kimære mus under anvendelse af sådanne ES-celler.

10

#### Trin 1: Formering in vitro:

De anvendte ES-celler var D3- (Doetschman, T.C. et al. (1985) J.Embryol. Exp. Morphol. 87:27-45), EKcs-1- (tidligere kendt som CS1) (Wagner, E.F. et al, (1985) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:691-700) og HD5 (C. Stewart, ikke publiceret)-ES-cellelinier isoleret fra 129 SV He blastocyster og CBL63 (R. Kemler, ikke publiceret)-ES-celler isoleret fra C57BL/6J blastocyster. Før dyrkning i LIF blev D3- og CBL63-cellerne opretholdt i Dulbeccos modificerede Eagles-medium med 15% (volumen/volumen) føtalt kalveserum på et næringslag af primært embryofibroblaster, og EKcs-1- og HD5-ES-cellerne blev opretholdt i Eagles-medium med 15% (volumen/volumen) føtalt kalveserum og 0,1 mM  $\beta$ -mercapto-ethanol i nærvær af medium konditioneret med blærecarcinomacellelinien 5637 (ATCC nr. HTB9).

25

Rekombinant LIF's evne til at opretholde ES-cellernes stængelcelle-fænotype blev vist ved at overføre ES-celler af linierne D3 og HD5 til normalt celledyrkningsmedium i nærvær af varierende koncentrationer af oprenset gærafledt rekombinant humant LIF (i det følgende omtalt som rY-HLIF) eller *E. coli* afledt rekombinant muse LIF (rE-MLIF) (tidligere beskrevet i international patentansøgning nr. PCT/AU88/00093). Resultaterne er vist i figurerne 1 og 2. I figur 1A blev HD5-celler, som forudgående var opretholdt i 80% 5637 konditioneret medium i otte passager, overført til dyrkningsmedium indeholdende 0-5.000 enheder/ml oprenset; rekombinant gærafledt human-LIF (H-LIF, se nedenfor) (■-■) eller oprenset, rekombinant *E. coli*-afledt muse-LIF (M-LIF, se nedenfor) (○-○). HD5-celler opretholdt i medium indeholdende 1.000 enheder/ml H-LIF i yderligere 13 passager blev derpå overført til 0-1.000 enheder/ml<sup>-1</sup> M-LIF (●-●). I figur 1B blev D3-celler, der var opretholdt på museembryofibroblaster i 10 passager, overført til medium indeholdende 1.000-5.000 enheder/ml<sup>-1</sup> H-LIF og efter yderligere 7 eller 15 passager blev cellerne overført til medium indeholdende 0-5.000 enheder/ml<sup>-1</sup> H-LIF (■-■) eller henholdsvis 0-1.000 enheder/ml<sup>-1</sup> M-LIF (●-●). Figur 2 viser ES-celle morfologi i nærvær af rekombinant LIF. HD5 ES-celler dyrket i nærvær af 80% 5637 konditioneret medium blev analyseret for oprenset rekombinant LIF's evne til at opretholde stængelcellefænotypen ved overførelse til medium indeholdende 1.000 enheder/ml<sup>-1</sup> M-LIF (A) eller til normalt dyrkningsmedium (B). Efter 7 dage blev kolonierne farvet med Giemsa. Sammenhængende stængelcellekolonier kunne skelnes fra diffuse differentierede kolonier. D3-celler opretholdt i H-LIF i 15 passager blev analyseret for evnen til at differentiere ved overførelse til medium indeholdende 1.000 enheder/ml<sup>-1</sup> M-LIF (C) eller normalt dyrkningsmedium (D). Immunofluorescens af cellerne i de to D3-kolonytyper blev udført under anvendelse af ECMA-7 monoklonalt antistof, som genkendt et stængelcellespecifikt celleoverfladeantigen. Celleoverfladespecifik immunofluorescens blev påvist

på over 90% af cellerne opretholdt i medium indeholdende 1.000 enheder/ml<sup>-1</sup> rekombinant LIF (E), men på mindre end 1% af cellerne opretholdt i normalt dyrkningsmedium (F). Synsfeltet vist i (F) indeholder 21 celler.

5

Figureerne 1 og 2 antyder, at over 90% af ES-cellerne opretholdt i 1.000-5.000 enheder/ml rY-HLIF eller rE-MLIF bevarede deres stængelcellefænotype. I modsætning hertil differentieredes ES-celler opretholdt i normal dyrkningsmedium i løbet af 3-6 dage. De forskellige anvendte koncentrationer af rY-HLIF eller rE-MLIF resulterede ikke i nogen bemærkelsesværdig ændring i celleantal efter 6 dage i kultur, hvilket antyder, at der ikke er udvælgelse af en specifik underpopulation, som er i stand til at vokse i LIF. Tilsvarende resultater er blevet opnået under anvendelse af gæraflødt rMLIF, som også er beskrevet i international patentansøgning nr. PCT/AU88/00093. Resultaterne fra figur 1 antyder, at human LIF virker på muse ES-celler, som tidligere beskrevet for virkningen af human LIF på M1 myeloide leukæmiceller (Gough, N.M. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2623-2627). Resultaterne i figur 1 tyder også på, at LIF's virkning på ES-celler er uafhængig af glycosylering, som tidligere beskrevet for virkningen af LIF på M1 myeloide leukæmiceller.

Fire ES-cellelinier, D3, EKcs-1, CBL63 og HD5, blev opretholdt i medium indeholdende 1.000-5.000 enheder/ml rY-HLIF i op til 22 passager (10 uger eller ca. 100 generationer). Langtidsopretholdelse af ES-cellerne i rY-HLIF ændrede ikke bemærkelsesværdigt cellernes vækstegenskaber. Mindskelse eller fjernelse af LIF fra dyrkningsmediet resulterede endvidere i differentiering af ES-cellerne med tilsvarende kinetik, som de, der er eksplanteret direkte fra blære-carcinoma 5637 konditioneret medium eller et næringslag af musefibroblaster (f.eks., jvf. figureerne 1 og 2). Stængelcellefænotypen af ES-celler dyrket i flere passager i nærvær af LIF blev bekræftet ved immunofluorescens med ECMA-7-antistof, som genkender et stængelcelle specifikt celleoverfladeantigen (Kemler, R. i "Progress in Developmental Biology", Bind 26, Sauer, H.W. red., side 175, Fisher, Stuttgart, 1980); ES-celler dyrket i nærvær af LIF udtrykte stængelcellemarkøren, hvorimod mindre end 1% udtrykte den uden tilstedeværelse af LIF (figur 2).

Trin 2; Isolering af ES-cellelinie:

Museblastocyster blev isoleret fra 129 Sv He-mus på udviklingens 4. dag (dag 1 = "plug"-dag) i enten Dulbeccos eller Glasgows modificerede Eagle-medium med 15% (volumen/volumen) føtalt kalveserum, 0,1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol og 1.000 enheder/ml oprenset rE-HLIF. ES-cellelinier blev derpå isoleret ved to forskellige metoder.

Ved den første metode fik blastocysterne lov til at fæstnes til dyrkningsskålen og ca. 7 dage senere blev den udvoksende indre cellemasse opsamlet, behandlet med trypsin og overført til en anden dyrkningsskål i samme dyrkningsmedium. ES-cellekolonierne fremkom 2-3 uger senere med 5-7 individuelle kolonier ud fra hver eksplanteret indre cellemasse. ES-cellelinierne fik derpå lov til at udvikle sig med henblik på yderligere analyse. Den anden fremgangsmåde til isolering af ES-cellelinier er at anvende den immunooperative metode (beskrevet af Martin, G.R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:7634-7638), hvor de trophectoderme celler ødelægges under anvendelse af anti-musantistoffer, før eksplantation af den indre cellemasse. Virkeevnen for ES-celleliniernes isolering er vist i tabel 1.

Trin 3: Udvikling af kimære mus:

Alle de ES-cellelinier, der var dyrket uden tilstedeværelse af næringsceller, men i nærvær af LIF (omtalt under trin 1) eller direkte isoleret ved hjælp af dyrkningsmedium indeholdende LIF (omtalt under trin 2), bevarede evnen til at differentiere til flere celletyper efter fjernelse af LIF, hvilket antyder, at disse celler har bevaret deres flerpotentielle fænotype. For at bekræfte deres udviklingmæssige potentiale blev D3 ES-celler, der var opretholdt i LIF i 7-22 passager og MBL-1 ES-celler, der var opretholdt i LIF i 14-17 passager, genindført i det embryone miljø ved blastocystinjektion (som beskrevet af Williams et al., (1988) Cell 52:121-131). Blastocyster blev isoleret fra den udavlede ICR-mussestamme eller indavlede C57BL/6J mus. De ekspanderede blastocyster blev opretholdt i oliedråbekultur ved 4°C i 10 minutter før dyrkning. ES-cellerne blev fremstillet ved at optage individuelle kolonier, som derpå blev inkuberet i fosfatpufferet saltopløsning, 0,5 mM EGTA i 5

minutter; en enkelt cellesuspension blev fremstillet ved inkubation i en trypsin-EDTA-opløsning indeholdende 1% (volumen/volumen) kyllingeserum i yderligere 5 minutter ved 4°C. Fem til tyve ES-celler (i Dulbeccos modificerede Eagle medium med 10% (volumen/volumen) føtalt kalveserum og 3.000 enheder/ml DNAase 1 bufferet i 10 mM HEPES [pH8]) blev injiceret i hver blastocyst. Blastocyster blev overført til pseudogravide modtagere og fik lov til at udvikles normalt. Kimære mus blev identificeret ved belægningsmarkør (Hogan et al., (1986) Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor, New York). Analyse af de efterfølgende kimære mus afslørede, at op til ca. 50% af afkommet indeholdte væv afledt fra de injicerede celler (tabel 2) med niveauer af åbenbar kimærisme på så højt som 90% i individuelle mus. Endvidere bekræftede analyse af organerne fra fire D3-kimærer, at ES-cellerne opretholdt i LIF kunne bidrage omfattende til udvikling af alt det somatiske væv (tabel 3).

Hankimærer blev afprøvet for kimlinietransmission af ES-afledte celler ved parring med ICR eller C57BL/6J hunvæsen. Tre ud af fire af D3-C57BL/6J-kimærene og to ud af seks af MBL-1-C57BL/6J kimærene gav anledning til "aguti-afkom" hidrørende fra ES-cellerne dyrket i LIF (tabel 4).

For at afprøve hvorvidt genetisk ændrede ES-celler kunne opretholdes i dyrkningsmedium indeholdende LIF, blev D3 ES-celle inficeret med en retrovirusvektor (N-TK527), som udtrykker neomycinresistensgenet og en c-src-genmutant (c-src<sup>527</sup>) (infektionsprotokol er beskrevet af Williams et al., (1988) Cell 52: 121-131). De isolerede ES-cellekloner blev opretholdt i dyrkningsmedium indeholdende LIF i over 20 passager. Disse genetisk modificerede ES-celler bevarede evnen til at danne kimære mus efter genindføring i det embryone miljø ved blastocystinjektion (tabel 2).

Tabel 1

Isolering af 129 Sv He ES-cellelinier i medium indeholdende rE-HLIF.

5	Metode	Blastocyst	ICM- udvækst	Antal afledte ES-cellelinier
	Eksplanteret	9	9	4
10	Immunkirurgi	11	3	0
	<u>Immunkirurgi</u>	<u>7</u>	<u>5</u>	<u>2</u>

15 Murine blastocyster blev isoleret fra 129 Sv He mus på udviklingens fjerde dag (dag 1 = "plug"-dag) i enten Dulbeccos eller Glasgows modificerede Eagle-medium med 15% (volumen/volumen) føtalt kalveserum, 0,1 mM  $\beta$ -marcaptoethanol og 1.000 enheder/ml oprenset rE-HLIF. Blastocysterne blev derpå eksplanteret i det samme medium og fik lov til at fæstnes til dyrkningsskålen, og den udtagne indre cellemasse blev dissociert i phosphat-pufret saltopløsning, 0,5 mM EGTA i 5 minutter; en enkeltcellesuspension blev fremstillet ved 20 inkubation i en trypsin-EDTA-opløsning indeholdende 1% (volumen/volumen) kyllingeserum og cellerne blev genupladet i ovennævnte celledyrkningsmedium. De karakteristiske ES-cellekolonier fremkom 25 inden for 1-3 uger.

Andre blastocyster blev behandlet ved immunokirurgi (som beskrevet af Martin, G.R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:7634-7638). Blastocysterne fik lov til at udklækkes fra zona pelucida og blev 30 derpå behandlet med anti-mus antistoffer og ødelagt ved tilsætning af komplement. Den blottede indre cellemasse fik derpå lov til at fæstnes til en vævsdyrkningsskål og blev igen behandlet med anti-musantistoffer og komplement. I løbet af nogle få dage fremkom 35 flerpotentielle stængelcellekolonier og de blev dissociert og trypsinbehandlet som beskrevet ovenfor.

Tabel 2

Kimære mus afledt fra ES-celler dyrket i LIF.

ES-celler	Overførte blastocyster	Fødte unger	Kimærer
D3	142	60 (42%)	33 (55%)
MBL-1	51	33 (65%)	16 (48%)
D3 N-TK527	42	22 (52%)	12 (54%)

Tabel 3

Procentvis vævsfordeling i individuelle kimære D3 mus

Kimærer	Necropsi							
	alder	C	Bl	Sp	P	Li	T	H
D3-1	13d	35	0	35	20	10	20	40
D3-2	14d	40	15	35	30	45	30	50
D3-3	11d	90	50	50	35	50	40	60
D3-4	11d	50	50	50	30	40	40	40

Kimærer	Necropsi						
	alder	Lu	G	K	M	B	Sa
D3-1	13d	30	10	35	30	35	20
D3-2	14d	35	20	30	50	50	25
D3-3	11d	45	50	50	70	50	55
D3-4	11d	50	35	50	50	20	30

Tabel 4

Kimærdemonstrering af kimlinietransmission af ES-afledte celler.

5	Passage nr. af D3-celler			Afkom		
	Mus	Kimærisme	på næringscelle i LIF	129 Sv He	C57	
	775-3	75%	10	16	9	24
	778-1	70%	10	22	5	33
10	778-2	50%	10	22	2	36
	778-3	55%	10	22	0	0

Nedenstående angår tabellerne 2, 3 og 4:

15 D3 og MBI-1 ES-celler afledt fra 129 SV He mus (indavlet "aguti", homozygot for glucosephosphatisomerase 1<sup>a</sup> allel). D3 ES-cellerne blev oprindeligt dyrket på primære embryofibroblaster i 10 passager og derpå overført til 1.000-5.000 enheder/ml rekombinant LIF i 7-22 passager. MBI-1 ES-cellerne blev isoleret uden tilstedeværelse af næringsceller, men i nærvær af rE-HLIF blev disse celler dyrket i 20 14-17 passager. ES-cellerne blev derpå injiceret i ICR (udavlet, albino) eller C57BL/6J (indavlet, sorte) blastocyster, som derpå blev overført til pseudogravide fostermødre. Både ICR- og C57BL/6J-musene er homozygote for glucosephosphatisomerase 1<sup>b</sup> allelen.

25 Kimærer unger blev identificeret ved belægningspigmentering (kun fostermødre, som blev gravide, blev talt ved vurdering af antallet af afkom). Vævskimærisme blev vurderet under anvendelse af forskelle i glyosephosphatisomerasefarvning. Omfanget af vævskimærisme blev vurderet i to D3-ICR- (nr. 1 og 2) og to D3-C57BL/6J kimærer (nr. 3 og 4). Analyseret væv: C, pels; Bl, blod, Sp, milt, P, bugspytkirtel, Li, lever, T, tymus, H, hjerte, Lu, lunger, G, gonader, K, 30 nyrer, M, muskler, B, hjerne, Sa, spytkirtel. Hankimærer blev parret med ICR- eller C57BL/6J-mus og afkommet blev identificeret ved belægningspigmentering.

35

#### Eksempel 2

Dette eksempel beskriver de trin, som anvendes til at dokumentere specifikke højaffinitetsreceptorer på ES- og EC-celler. Tilhørende

figur 3 viser binding af  $^{125}\text{I}$ -LIF til ES-celler EKcs-1 og EC-celler F9 og PCC3-A (Jakob, J. et al., (1973) Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 124B:269-282). I forbindelse med figur 3, viser (A) Scatchard-analyse af  $^{125}\text{I}$ -mærket LIF-binding til F9 ( $\square$ ), EKcs-1 ( $\bullet$ ), PCC3A-1 ( $\blacksquare$ ) og M1 (O)-celler. Måtningskurver for binding blev analyseret ved Scatchard-metoden ved afbildning af den specifikt bundne LIF-mængde (defineret som forskellen mellem binding uden tilstedeværelse og i nærvær af overskud af umærket LIF) mod forholdet mellem bundet og frit LIF. Frie LIF-værdier blev justeret for procentdelen af  $^{125}\text{I}$ -mærket LIF, som er i stand til at binde specifikt til LIF-receptorer, i dette forsøg vurderet til at være 75%. Den tilsyneladende dissociationskonstant for vekselvirkningen mellem LIF og dens receptor blev vurderet ud fra kurvernes hældning og receptortallet ud fra deres skæring med ordinaten. Resultaterne i (A) blev standardiseret til  $5 \times 10^6$ -celler pr. punkt og gennemsnittet af dobbelte punkter er vist og kurverne blev tilpasset til anvendelse til Ligand-programmet. (B), Autoradiografi af F9 EC-celler mærket med  $^{125}\text{I}$ -mærket LIF. (C), Kvantificering af sølvkorn på F9 EC-celler efter binding af  $^{125}\text{I}$ -mærket LIF.

Oprensat rekombinant (gærafledt) human LIF (rY-HLIF) blev mærket radioaktivt på tyrosin enheder, som tidligere beskrevet (Hilton, D.J. et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5971-5975) til frembringelse af  $^{125}\text{I}$ -LIF med en specifik radioaktivitet på ca.  $1,2 \times 10^7$  cpm/pmol.  $^{125}\text{I}$ -LIF ( $2 \times 10^3 - 5 \times 10^5$  cpm) blev inkuberet med  $1-4 \times 10^6$  målceller med og uden mindst et ti ganges molært overskud af umærket LIF i et samlet volumen på  $100 \mu\text{l}$  i 4 timer på is. Celleassocieret og frit  $^{125}\text{I}$ -LIF blev fraskilt ved centrifugering gennem føtalt kalveserum (Nicola, N.A. og Metcalf, (1986) D. J. Cell Physiol. 128:160-188). Specifikt celleassocieret  $^{125}\text{I}$ -LIF blev bestemt ved "kuldekonkurrence".

Figur 3 viser den specifikke måtningsbare og højaffinitetsbinding af  $^{125}\text{I}$ -LIF til ES-cellerne EKcs-1 og EC-cellerne PCC3-A og F9. Antallet af LIF-receptorer pr. celle afledt fra disse Scatchard-afbildninger var 295, 190 henholdsvis 330 med tilsyneladende dissociationskonstanter ved  $4^\circ\text{C}$  på ca.  $90 \text{ pM}$ . Dette sammenlignes med M1 cellelinien, som er en LIF-responderende monocytisk leukæmi, som udviser 50-200 LIF receptorer/celle med en tilsyneladende

dissociationskonstant på 50-150 pM. Alle andre afprøvede ES- og EC-celler - D3, NG2, PC13 og P19 - bandt tilsvarende niveauer af LIF (resultater ikke vist).

5 Bindingen af  $^{125}\text{I}$ -LIF til M1-celler, EKcs-1 og PCC3-A viste sig også at være i konkurrence med umærket rekombinant og naturligt murint og humant LIF, men ikke med rækken af andre hormoner og faktorer (herunder flere, som virker på embryone celler): insulin, IGF-I, IGF-II, sur og basisk FGF, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , NGF, PDGF, EGF, IL-1, IL-4,  
10 GM-CSF, G-CSF, multi-CSF og erythropoietin.

15

20

25

30

35

Patentkrav:

1. Fremgangsmåde til isolering af embryone stængel (ES)-celler fra non-humane dyreembryoer *in vitro*, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter  
5 dyrkning af embryoerne i et dyrkningsmedium, der indeholder en effektiv mængde af leukæmihæmmende faktor (LIF) samt udtagning af ES celler fra embryoerne.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at embryoerne  
10 dyrkes under tilstedeværelse af LIF fra 1 dag til 20 uger.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at embryoerne dyrkes i tilstedeværelse af LIF fra 1 til 8 uger.
- 15 4. Fremgangsmåde til opretholdelse af embryone non-humane dyrestængel (ES)-celler *in vitro* under bevarelse af deres flerpotentielle fænotype, k e n d e t e g n e t ved, at fremgangsmåden omfatter dyrkning af cellerne i et dyrkningsmedium, der indeholder en effektiv mængde af leukæmihæmmende faktor (LIF) under betingelser, som er tilstrækkelige til at opretholde  
20 cellerne.
5. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-4, k e n d e t e g n e t ved, at dyrkningsmediet er fri for næringsceller.
- 25 6. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-5, k e n d e t e g n e t ved, at dyreembryoerne hidrører fra mus, fugle, får, grise, kvæg, geder eller fisk og hvor de embryone stamceller hidrører fra mus, fugle, får, grise, kvæg, geder eller fisk.
- 30 7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at dyreembryoerne eller dyrestængelcellerne hidrører fra mus.

8. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-7, k e n d e t e g n e t ved, at dyrkningsmediet er Eagles-medium eller modifikationer heraf eller ækvivalenter hertil.
- 5 9. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-8, k e n d e t e g n e t ved, at LIF er rekombinant LIF.
10. Fremgangsmåde ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at LIF er rekombinant human eller murin LIF.
- 10 11. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-10, k e n d e t e g n e t ved, at LIF tilsættes til dyrkningsmediet i en koncentration på 10-1.000.000 enheder/ml.
- 15 12. Fremgangsmåde ifølge krav 11, k e n d e t e g n e t ved, at LIF tilsættes til dyrkningsmediet i en koncentration på 100-100.000 enheder/ml.
13. Fremgangsmåde ifølge krav 12, k e n d e t e g n e t ved, at LIF tilsættes til dyrkningsmediet i en koncentration på 500-10.000 enheder/ml.
- 20 14. Fremgangsmåde til fremstilling af et non-humant kimært dyr, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter indføring af dyre-ES celler som er blevet isoleret eller dyrket ved en fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-13 i præimplantations-embryo-stadiet i dyret.

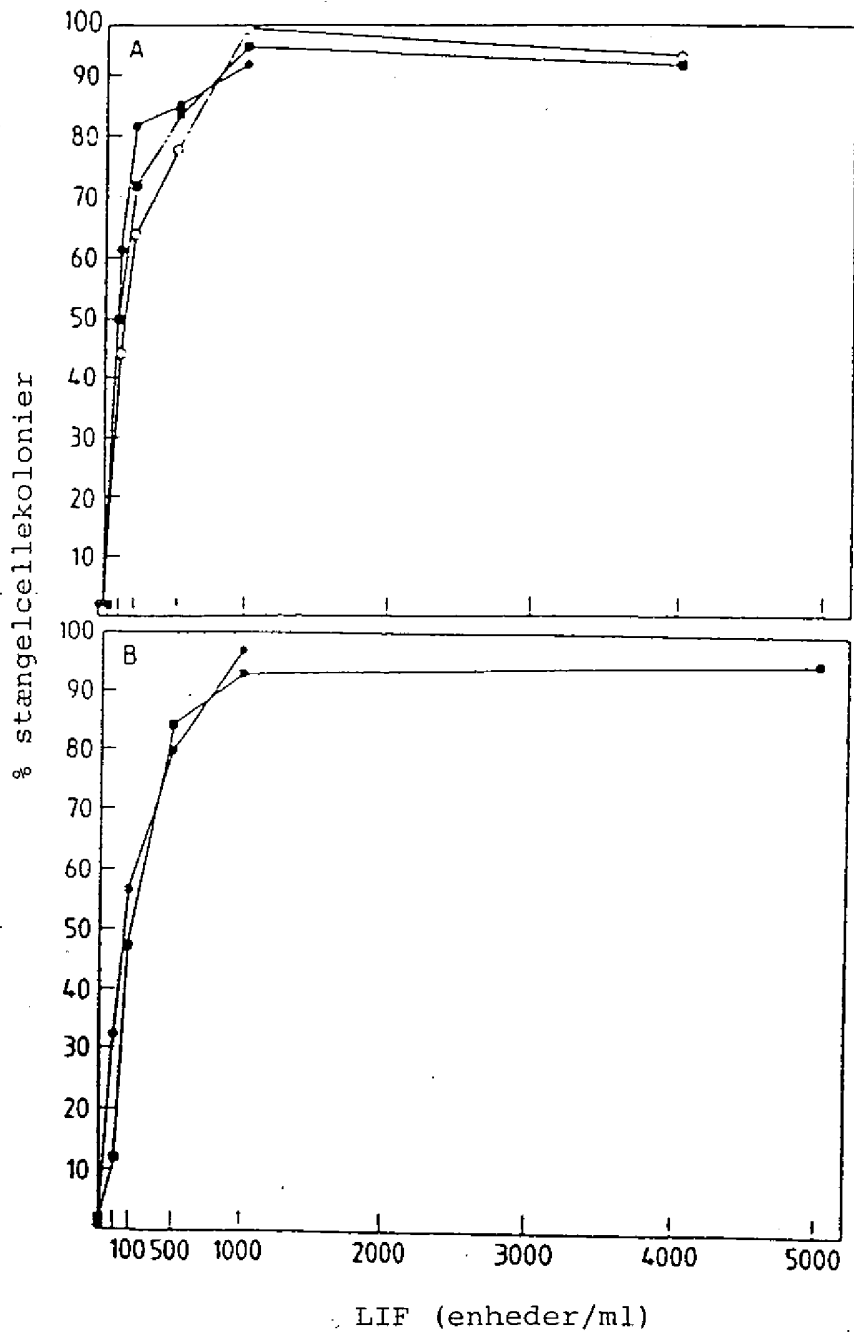
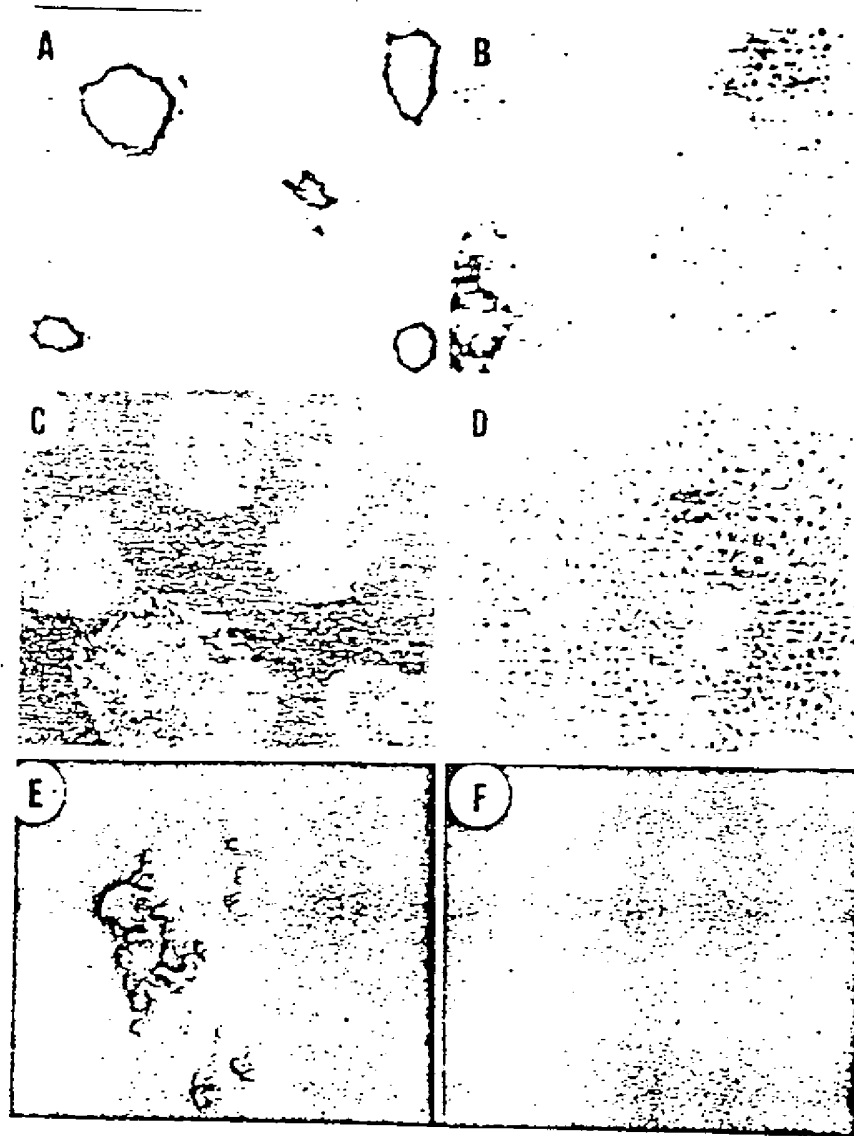
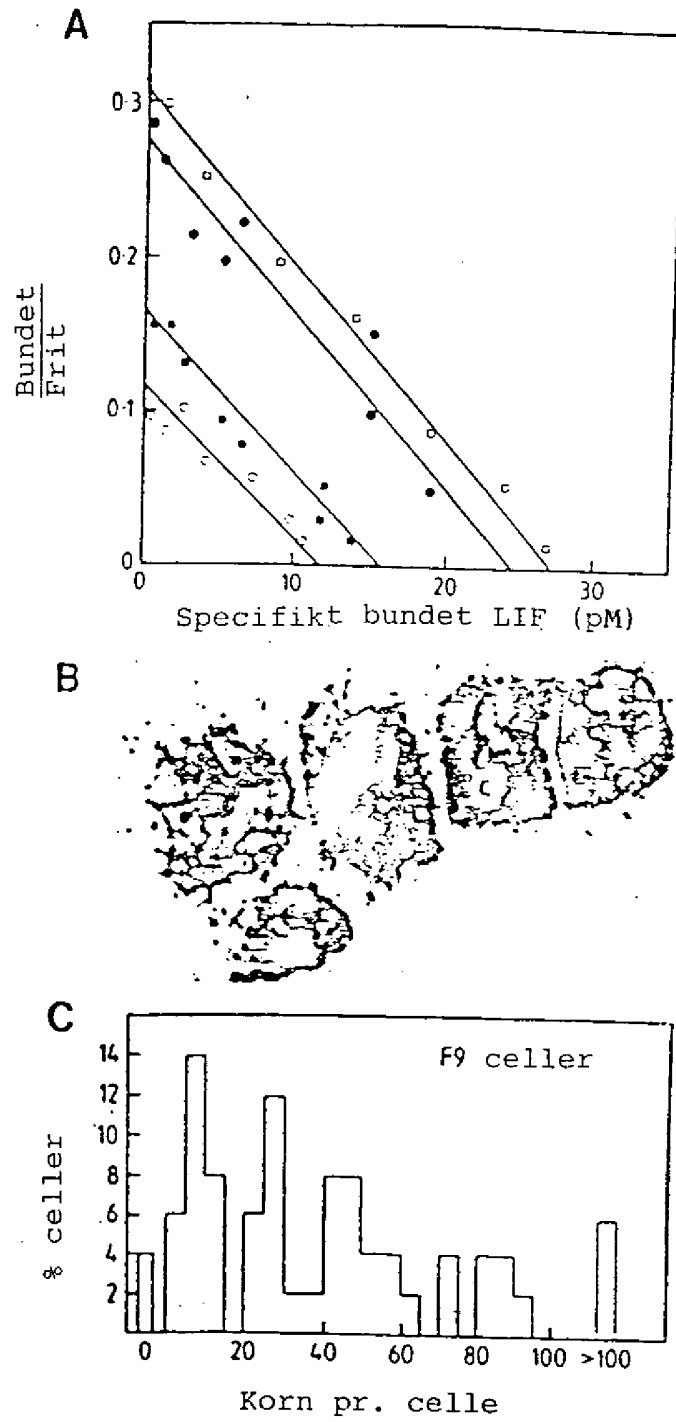


Fig.1.



*Fig.2.*



*Fig.3.*