



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(51) Int Cl⁷

(11) **319494**

C 12 N 5/10, 5/08, 5/02, A 61 K 35/38

(13) **B1**

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19971757	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	
(22)	Inng.dag	1997.04.17	(85)	Videreføringsdag	
(24)	Løpedag	1997.04.17	(30)	Prioritet	1996.04.19, EP, 96201064
(41)	Alm.tilgj	1997.10.20			
(45)	Meddelt	2005.08.22			
(73)	Innehaver	Société des Produits Nestlé SA, Case postale 353, 1800 Vevey, CH			
(72)	Oppfinner	Stéphanie Blum, Lausanne, CH			
(74)	Fullmektig	Ellen Holm - Bryns Zacco AS, Postboks 765 Sentrum, 0106 Oslo, NO			
(54)	Benevnelse	Kulturmedium, fremgangsmåte for udødeliggjøring av epitelceller i human tykktarm, udødeliggjort cellelinje, in vitro fremgangsmåte for identifisering av stoffers påvirkning på tarmceller, diagnostisk sett og anvendelse av cellelinjen i nevnte fremgangsmåte og for fremstilling av et farmasøytisk middel.			
(56)	Anførte publikasjoner	BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 57, 1988, s. 287-289, XP000604782, Berry R.D. et al GASTROENTEROLOGY, vol. 108, nr. 4, 1995, s. A321 XP002014543, Moyer M.P. et al. US 5 032 399			
(57)	Sammendrag				

Human epitelial tarm udødeliggjort cellelinje som ikke uttrykker tumormarkører og som uttrykker metabolske markører spesifikke for ikke-udødeliggjort human epitelialceller og metabolske differensieringsmarkører spesifikke for ikke-udødeliggjorte epitelialceller fra human tarm, og som har evne til å adherere in vitro til stammen av melkesyrebakterien CNCM-1225. Serum-fritt kulturmedium kjennetegnet ved at det omfatter sporelementer, vitaminer bestående av vitamin C og retinoisk syre, og hormoner bestående av trijodtyrocin, deksametason, hydrokortison, bovin hypofysekjertelektstrakt, insulin, EGF og transferin er beskrevet. Fremgangsmåter for udødeliggjøring av epitelialcellene i human tarm, hvor en kultur av primære epitelialceller avledet fra den humane tarmen blir fremstilt, kulturen blir infisert med et rekombinant virus, udødeliggjorte celler blir dyrket i serum-fritt kulturmedium er også beskrevet. Det er også beskrevet en fremgangsmåte for identifisering av mutagen, toksisk eller fordelaktig effekt til et middel på metabolismen av cellene i tarmkanalen, hvor (1) et middel antatt å være et mutagenisk, toksisk eller fordelaktig middel for metabolisme av cellene i tarmkanalen blir omsatt, dyrket eller bragt i kontakt med en kultur omfattende en cellelinje ifølge oppfinnelsen, og (2) effektene av nevnte middel på nevnte cellelinje blir bestemt eller målt, samt anvendelse av cellene ifølge oppfinnelsen som et aktivt farmasøytisk middel.

Foreliggende oppfinnelse angår et serumfritt kulturmedium egnet for dyrking og udødeliggjøring av epitelceller fra human tykktarm. Oppfinnelsen angår også en fremgangsmåte for å udødeliggjøre slike epitelceller og en human udødeliggjort kolonepitelcellelinje. Oppfinnelsen angår videre en fremgangsmåte for identifisering av ulike stoffers påvirkning på tarmceller, et diagnostisk sett og anvendelse av cellelinjen i nevnte fremgangsmåte og for fremstilling av et farmasøytisk middel.

I mange år har det vært forsøkt å utvikle humane cellelinjer som er tilpasset for studering av humane sykdommer, så som infeksjoner, betennelser eller cancerformer. Blant celler som ofte er involvert i begynnelsen av sykdommer er epitelceller, spesielt epitelceller i tarmkanalen som er følsomme for omgivelsene til det humane legemet, og spesielt har betingelser i dietten.

Epitelceller er forskjellige fra andre celler i det humane legemet når det gjelder ekspresjon av forbindelser eller strukturer som hovedsakelig finnes i epitelcellene, sånn som for eksempel cytokeratiner (Moll et al., Cell, 31, 11-24, 1982), koblinger mellom celler (Gumbine et al., Cell, 69, 385-387, 1992), alkalisk fosfatase som er spesifikke for tarmen (Dudeja et al., Gastroenterology, 105, 357-366m 1993), cytokromer P 450 (Mercurio et al., Biochem. Biophys. Research Communications, 210, No. 2, 350-355, 1995; McKinnon et al., Gut, 36, 259-267, 1995), enzymer involvert i cellulært oksidasjonsforsvar (Cu/Zn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase og catalase; Albers et al., Toxicology and Applied Pharmacology, 109, 507-513, 1991) og/eller i detoksifisering av elektrofiler (glutathion-S-transferase og quinon reductase; Chenevix-Trench et al., Karsinogenesis, 16, No. 7, 1655-1657, 1995) og vimentin (Richard et al., Arch. Dermatol. Res. 282, 512-515, 1990).

I tillegg har epitelcellene i human tarmkanal evnen til å adherere til melkesyrebakterier in vitro (Bernet et al., Gut, 35, 483-489, 1994; US 5, 032, 399).

Epitelcellene i human tarm er også forskjellige fra andre humane epitelceller i ekspresjon av forbindelser eller strukturer som finnes hovedsakelig i epitelcellene i den humane tarmen, som for eksempel, overflatevilli (Friedrich et al., Bioassays, 12, No. 9, 403-408, 1990), sucrose isomaltase (Gibson et al., Gut, 35, 791-797, 1994; Paul et al., Am. Physiol. Soc., C266-C278, 1993), visse klasser II vevsforlikelighetsantigener (Mayer et al., Gastroenterology, 100, 3-12, 1991) og dipeptidylapeptidase IV (DPPIV; Hauri et al., J. Cell. Biol., 101, 836-851, 1985).

Fremstilling av en epitelcellelinje i human tarm kan bli utført ved seleksjon av humane cancerceller. Stauffer et al. har følgelig beskrevet seleksjon av to linjer NCM356 og NCM425 som omfatter p53 mutasjon og som uttrykker spesielt tumorantigen CEA (The American journal of surgery, 169, 190-196, 1995). Disse cellene representerer et
 5 tumorigen transformasjonsstadium, og er av interesse for studering av utviklingen til tumorigen transformasjon av epitelcellene.

Andre humane tarmepitelcellelinjer isolert fra et humant tarm adenom er også kjent, som for eksempel linjen CaCO-2 (ATCC HTB37; Fogh et al., J. Natl. Cancer Inst., 58, 209-214, 1997) og HT29 (ATCC HTB38; Fogh et al., Human tumour Cells In Vitro, 145-159, 1975).
 10

Det er også mulig å udødeliggjøre normale celler, dvs. gjøre dem i stand til å formere seg i det uendelige. Normale celler overlever derimot ikke mer enn 10 passasjer. Teknikker
 15 for transfeksjon av celler, ved hjelp av spesielt tilpassede vektorer, sånn som SV40 vektoren omfatter en sekvens av T-antigen (R.D. Berry et al., Br.J. Cancer, 57, 287-289, 1988) eller en vektor omfattende DNA-sekvenser av human papillomavirus (US 5,376,542) blir generelt anvendt.

20 Sanderson et al. har følgelig udødeliggjort normale celler fra føtal tynntarm (Int. Arch. Allergy Immunol., 107, 396-397, 1995). Disse cellene er derimot fortsatt fysiologisk forskjellig fra normale voksne celler.

Moyer et al., Gastroenterology, vol. 108, nr. 4, 1995 beskriver normale og pre-neoplastiske/neoplastiske tykktarmsceller. Moyer et al., beskriver også de kjente genetiske og biokjemiske trekk ved flere udødeliggjorte cellelinjer og beskriver videre isolering og karakterisering av ikke-transformerte kolonepitelceller, og i særdeleshet en CM4660 (N3)-linjen som uttrykker visse epitelmarkører. Moyer et al., beskriver utvelgelse av to cellelinjer som begge omfatter P53-mutasjonen og som spesielt
 25 uttrykker tumorantigenet CAE. Disse celler er på et preliminært stadium i forhold til cancertransformasjon og er av verdi for å studere utvikling av cancertransformasjon av epitelceller.
 30

Berry et al., British Journal of Cancer, vol 57, 1988 side 287-289 beskriver
 35 udødeliggjøring av føtale kolonceller ved hjelp av et SV40-virus, med den effekt at en hvilken som helst celle som oppnås vil mer eller mindre fremvise føtale egenskaper, men ikke egenskaper tilhørende normale epitelceller. Cellene som var oppnådd

uttrykker kun en differensieringsmarkør og har ikke evne til å adherere melkesyrebakterier. Cellelinjen beskrives å medføre "knuter" hos mottakerdyret, hvilket indikerer en tumorigen adferd.

- 5 US patent 5 032 399 beskriver en ren bakteriekulturstamme av arten *Lactobacillus acidophilus* som kan adherere til slimhinne celler i human tynntarm.

Frem til nå er det ikke blitt rapportert udødeliggjøring av normale epitelceller fra voksen human tarm. Til tross for at udødeliggjøring av teknikker er kjent er det fortsatt meget
10 vanskelig å finne optimale tilstander for udødeliggjøring av en human celle slik at den beholder sine opprinnelige karaktertrekk og uten å vise tegn på en tumorigen transformasjon.

En av tilstandene for å propagere udødeliggjorte celler er deres vekst i et spesielt
15 dyrkningsmedium. Kulturmediet beskrevet i litteraturen er alle spesifikke for en celletype og kan vanskelig anvendes på andre celletyper. Som eksempel kan nevnes at serumfritt medium beskrevet av Gibson et al. (*Gut*, 35, 791-797, 1991), Pfeifer et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 5123-5127, 1993) og Kulkani et al. (*Carcinogenesis*, 16, No. 10, 2515-2521, 1995).

20 Formålet ifølge oppfinnelsen er å tilveiebringe nye humane tarm epitel cellelinjer som er genetiske og fysiologiske relatert til normale epitelceller i human tarm i den grad det er vanskelig å skille disse. Disse cellelinjene uttrykker ikke tumormarkører. Disse linjene uttrykker, i tillegg, mange spesifikke markører som er til stede i normale epitelceller i
25 human tarm.

Foreliggende oppfinnelse angår således serumfritt kulturmedium egnet for dyrking og udødeliggjøring av epitelcellene i human tykktarm, omfattende uorganiske salter, glukose, natrium pyruvat, aminosyrer, BSA, etanolamin, fosforetanolamin, vitaminer og
30 hormoner, kjennetegnet ved at mediet omfatter sporelementer, vitaminer bestående av vitamin C og retinoisk styre, og hormoner bestående av trijodtyrocin, deksametason, hydrokortison, bovint hypofysekjertelektstrakt, insulin, EGF og transferrin.

Et aspekt av oppfinnelsen angår kulturmedium, kjennetegnet ved at mediet omfatter 1-
35 100 nM sporelementer, 10-1000 nM retinoisk syre, 10-1000 nM trijodtyrocin, 0.1-50 nM deksametason, 1-100 nM hydrokortison, 1-100 µg/ml vitamin C, 1-100 µg/ml

bovint hypofysekjertelekstrakt, 0.1-50 µg/ml insulin, 0.1-50 ng/ml EGF og 0.1-100 µg/ml transferrin.

5 Et annet aspekt av oppfinnelsen angår kulturmedium kjennetegnet ved at de uorganiske saltene blir valgt fra gruppen bestående av natriumklorat, kaliumklorat, kaliumsulfat, kalsiumklorat, dibasisk natriumfosfat, natrium bikarbonat, jernnitritt, ammonium metevanadat, ammonium molybdat, kobbersulfat, magnesiumklorat, manganklorat, nikkelsulfat, natriumacetat, natriumpyruvat, natriumselenitt, natrium-silikat, tinnklorat og sinksulfat.

10 Et annet aspekt av oppfinnelsen angår kulturmedium kjennetegnet ved at vitaminene blir valgt fra gruppen dannet av kalsium D-pantotenat, kolinklorat, folinsyre, inositol, nikotinamid, pyridoksin, riboflavin, tiamin, biotin og cyano-kobalamin.

15 Et annet aspekt av oppfinnelsen angår kulturmedium kjennetegnet ved at mediet omfatter mindre enn 8 µM kalsium.

Et annet aspekt av oppfinnelsen angår kulturmedium kjennetegnet ved at det har sammensetningen B50 definert i tabell 1.

20 Foreliggende oppfinnelse angår videre en fremgangsmåte for udødeliggjøring av epitelcellene i human tykktarm, kjennetegnet ved at en kultur av primære epitelceller avledet fra den humane tykktarmen blir fremstilt, kulturen blir infisert med et rekombinant virus, og udødeliggjorte celler blir dyrket i serumfritt kulturmedium ifølge oppfinnelsen.

Et aspekt av oppfinnelsen angår en fremgangsmåte kjennetegnet ved at de primære epitelcellene blir dyrket i serumfritt kulturmedium ifølge oppfinnelsen.

30 Et annet aspekt av oppfinnelsen angår en fremgangsmåte kjennetegnet ved at kulturen blir infisert med et rekombinant SV40 T-Ag-virus inneholdende en del av MuLV-retroviruset.

35 Foreliggende oppfinnelse angår videre humane kolon epitelcellelinjer udødeliggjort ved anvendelse av et rekombinant virus, der cellelinjen

- er i stand til å formere seg i minst 40 påfølgende passasjer,
- mangler tumormarkører,

- uttrykker metabolske markører spesifikke for ikke-udødeliggjorte, humane epitelceller og metabolske differensieringsmarkører spesifikke for ikke-udødeliggjorte, humane kolonepitelceller,
 - er i stand til å adherere, in vitro, til melkesyrebakteriestammen CNCM I-1225,
- 5 og
- er i stand til å frembringes ifølge en fremgangsmåte ifølge kravene 7 til 10, med den forutsetning at dette ekskluderer cellelinjer som er oppnådd ved en fremgangsmåte for å oppnå en hovedsakelig ren, udødeliggjort human epitelcellelinje, som omfatter
- 10
- (a) frembringelse av en primær kultur av humane epitelceller oppnådd ved anvendelse av et fibroblast-samdyrkingssystem omfattende en første populasjon av celler omfattende en kultur av humane fibroblaster på et substrat i et egnet medium, et støttemateriale slik som en membran der støttematerialet er plassert over fibroblastkulturen, og en annen, heterogen populasjon av celler tilført støttematerialet og omfattende humane epitelceller,
 - (b) utsåing av en tredje populasjon av celler omfattende en kultur av humane fibroblaster på et annet substrat i et egnet medium,
 - (c) selektiv løsning av ikke-epiteliale celler fra substratet ved å inkubere
 - 15 samkulturen med et egnet løsrivelsesmiddel for en tidsperiode tilstrekkelig for å løsne ikke-epiteliale celler fra substratet uten å løsne en vesentlig mengde av epitelcellene,
 - (d) plassering av støttematerialet over fibroblastkulturen oppnådd i trinn (b), slik at en hovedsakelig ren epitelcellestamme opprettholdes på støttematerialet, og
 - 20 (e) udødeliggjøring av den hovedsakelige rene epitelcellestammen med minst en retrovirusvektor som har en ekspresjonskassett omfattende et nukleinsyremolekyl som koder for et papillomavirus polypeptid valgt fra gruppen bestående av E6 og E7 og kombinasjoner av disse, og kontrollsekvenser som dirigerer transkripsjonen av nukleinsyremolekylet slik at sekvensen kan
 - 25 transkriberes og translateres i den transfekterte cellelinjen.
 - 30

Et aspekt av oppfinnelsen angår en udødeliggjort linje kjennetegnet ved at den uttrykker, som metabolsk markør spesifikk for ikke-udødeliggjorte humane epitelceller, minst to markører valgt fra gruppen dannet av cytokeratiner, koblinger mellom celler, alkalisk

35 fosfatase, cytokromene P450, en glutation-S-transferase, quinon reduktase, Cu/Zn-superoxid dismutase, glutation peroksidase og en katalase.

Et annet aspekt av oppfinnelsen angår en udødeliggjort linje kjennetegnet ved at den uttrykker, som metabolsk differensieringsmarkør, minst to markører valgt fra gruppen dannet av overflatevilli, sukrose isomaltase, klasse II vevsforlikelighets-komplekset og dipeptidylpeptidase IV.

5

Et annet aspekt av oppfinnelsen angår en udødeliggjort linje kjennetegnet ved at den uttrykker HLA-DR- og HLA-DP-antigener fra klasse II vevsforlikelighetskomplekset, og som ikke uttrykker HLA-DQ-antigenet til nevnte kompleks, i nærvær av human gamma-interferon.

10

Et annet aspekt av oppfinnelsen angår en udødeliggjort linje kjennetegnet ved at den har evnen til å adherere in vitro til melkesyrebakteriestammen CNCM I-1225 i et forhold på minst 80 bakterier pr. 100 tykktarmsepitelceller.

15

Et annet aspekt av oppfinnelsen angår en udødeliggjort linje kjennetegnet ved at den har deponeringsnummer DSM ACC2258.

Oppfinnelsen angår også en fremgangsmåte for identifisering av den mutagene, toksiske eller fordelaktige effekten til et middel på metabolismen til cellene i tarmkanalen, hvor (1) et middel antatt å være et mutagent, toksisk eller fordelaktig middel for metabolisme av cellene i tarmkanalen blir omsatt, dyrket eller brakt i kontakt med en kultur omfattende en cellelinje beskrevet ovenfor, og (2) effekten av nevnte middel på nevnte cellelinje blir bestemt eller målt.

20

25

Oppfinnelsen vedrører også et diagnostisk sett som omfatter de udødeliggjorte epitelcellene til human tarm beskrevet ovenfor, kulturmediet beskrevet ovenfor og reagenser for å bestemme en metabolsk respons i nevnte celler overfor mutagene, toksiske eller fordelaktige midler med hensyn på metabolismen til cellene i tarmkanalen.

30

Oppfinnelsen angår også en hvilken som helst anvendelse av cellelinjene beskrevet ovenfor, i fremgangsmåter for identifikasjon av mutagene, toksiske eller fordelaktige midler for metabolisme av cellene i tarmkanalen, samt en hvilken som helst anvendelse av nevnte linjer som et aktivt farmasøytisk middel.

35

Beskrivelse av figurer.

Figur 1: Vektor pLXSHD+SV40+ anvendt for å udødeliggjøre epitelcellene i human tarm.

Figur 2: Ekspresjon av tarmalkalisk fosfatase aktivitet i forskjellige cellelinjer avledet fra epitelcellene i human tarm.

- 5 Figur 3: Prosentandel av udødeliggjorte epitel celler ifølge oppfinnelsen som uttrykker klasse II MHC (HLA) antigener i nærvær av gamma-interferon som en funksjon av tiden.

10 Innenfor foreliggende oppfinnelse angir uttrykkene “normale celler”, “primære celler” eller “ikke-udødeliggjorte celler” epitelcellene i human tarm som kan bli samlet fra tarmen til en frisk voksen som ikke har fysiologiske eller genetiske mangler, og som kan bli dyrket i en begrenset tid uten å miste sine opprinnelige differensieringskaraktertrekk.

15 Uttrykket “udødeliggjorte celler” angir celler som har gjennomgått en genetisk manipulasjon ved hjelp av en DNA konstruksjon som gjør at de har evne til å formere seg uendelig, dvs. i mer en 60 passasjer. Cancercellene valgt av Stauffer et al., eller linjene CaCO-2 og HT29 blir følgelig ikke betraktet som celler som er blitt udødeliggjort ifølge foreliggende oppfinnelse.

20 Ordet “passasje” angir prosessen bestående av å ta en alikvot av en konfluent kultur av en cellelinje, inokulere dette i et friskt medium og dyrking av linjen helt til konfluens eller metning blir oppnådd. Cellelinjene blir følgelig tradisjonelt dyrket ved suksessive overpassasjer til friskt medium. Cellelinjene kan miste deres opprinnelige differensierings-karaktertrekk etter flere påfølgende passasjer. Det er derfor ekstremt
25 fordelaktig å kunne oppnå en linje hvor karaktertrekkene blir konserverert selv etter mangfoldige passasjer, fortrinnsvis minst 60 passasjer.

30 Uttrykket “opprinnelige differensieringskaraktertrekk” angir både markører som finnes spesifikt på humane epitelceller og differensieringsmarkører som finnes spesifikt på humane tarm epitelceller.

Human tarmepitel udødeliggjort cellelinje ifølge oppfinnelsen uttrykker ikke tumormarkører, dvs. har ikke karsinogene mutasjoner eller uttrykker ikke budbringer RNA (mRNA) eller differensierte cellulær struktur og/eller proteiner karakteristiske for
35 transformasjon av cellene til tumorceller. Tilstedeværelse av disse markører kan bli detektert ved hybridisering eller RT-PCR av mRNA med spesifikke radiomerkede prober. Tilstedeværelse av en markør i en celle betyr ikke at nevnte celle har evne til å

utvise en cancerform etter noen få måneder på en mus uten immunforsvar, men reflekterer derimot en tumorigen transformert tilstand i cellene sammenlignet med de opprinnelige cellene som de er avledet fra.

- 5 Linjene ifølge foreliggende oppfinnelse har ikke p53 mutasjonen (Lavigne et al., Mol. Cell. Biol., 9, 3982-3991, 1989) Donehower et al., Natur, 356, 215-221, 1992) karsinomembryonalt antigen (CEA; Stauffer et al.) og/eller mutasjon i APC-genet (adenomatous polyposis coli; Hargest et al., Gut, 37, 826-829, 1995).
- 10 Epitelcellelinjer ifølge oppfinnelsen uttrykker derimot metabolske markører spesifikke for normale humane epitel celler. Disse markørene kan være en budbringer RNA (mRNA), et protein og/eller en differensiert cellulær struktur som generelt finnes bare i de fleste humane epitelcellene, med evne til å bli avledet fra huden, øyet, tarmkanalen eller leveren for eksempel. Humane epitelceller ifølge oppfinnelsen kan derfor uttrykke
- 15 minst to markører som finnes i forskjellige typer av epitelceller. Cellene ifølge oppfinnelsen uttrykker følgende nevnte markører valgt fra gruppen dannet av i det minste cytokeratiner, koblinger mellom cellene (også betegnet "tight junction"), tarmalkalisk fosfatase, cytokromene P450, glutation-transferase (GST), quinon reduktase (QR), Cu/Zn-superoksid dismutase (SOD), glutation perioksidase (GP) og catalase (CA).
- 20 Linjene ifølge oppfinnelsen kan derfor uttrykke enzymer som er involvert i cellulær oksidasjon (SOD, GP og CA) og/eller detoksifisering av elektrofiler (GST og QR). Disse linjene er følgelig spesielt tilpasset for studering av fenomenet betennelser eller irritasjoner i slimhinnemembranene til den humane tarm.
- 25 Cellelinjene ifølge oppfinnelsen uttrykker også metabolske differensieringsmarkører som er spesifikke for ikke-udødeliggjorte epitelceller i human tarm. Disse markørene kan være et mRNA, et protein, eller en differensiert cellulær struktur som bare finnes i epitelcellene i tarmen. Linjene ifølge oppfinnelsen uttrykker fortrinnsvis, som
- 30 metabolske differensieringsmarkører, minst to markører valgt fra gruppen dannet av overflatevilli, sukrose isomaltase, klasse II vevsforlikelighetskomplekser som er spesifikke for tarm epitelcellene og dipeptidylpeptidase IV.
- 35 Linjene ifølge oppfinnelsen uttrykker fortrinnsvis HLA-DR og HLA-DR antigener av klasse II vevsforlikelighetskomplekser (MHC II) og uttrykker ikke HLA-DQ antigen, i nærvær av human gamma-interferon (ekspressjon av HLA-DQ er blitt assosiert med tumorgenisitet).

- Linjene ifølge oppfinnelsen har også evne til å adherere in vitro lactobacillus gonsonistamme CNCM-1225. En kultur av melkesyrebakterier kan følgelig bli spredt over en konfluent kultur av en linje ifølge oppfinnelsen, hvorpå den konfluente kulturen vaskes og deretter blir antall bakterier som adhererer til villi på nevnte linjer målt. En
- 5 linje ifølge oppfinnelsen har evne til å adherere in vitro stammen av melkesyrebakteriestammen CNCM-1225 i et omfang på minst 80 bakterier pr. 100 tarmceller ifølge oppfinnelsen, spesielt 80-200.
- Linjene ifølge oppfinnelsen skal også kunne adherere in vitro til *Clostridium diffisil* og/eller til andre adherente melkebakterier, som bifidobakterier, spesielt
- 10 bifidobakteriene beskrevet i Applied Env. Microb., 59, 4121-4128, 1993 og EP577904 (Nestlé), som er blitt deponert til Pasteur Institut, Paris, Frankrike, hvor de ble tildelt deponeringsnumrene CNCM 1-1226, CNCM 1-1227 og CNCM 1-1228.
- 15 Linjene ifølge oppfinnelsen skal også kunne uttrykke mange cytokiner etter å ha vært i kontakt med et inflammasjonsmiddel, dvs. cytokinene IL-1 β , IL-1Ra, TNF, IL-6 og IL-8.
- Oppfinnelsen vedrører også spesielt en udødeliggjort linje ifølge oppfinnelsen som er
- 20 blitt deponert til Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Tyskland, 16. April 1996, med deponeringsnummer DSM ACC2258.
- Human tarm epitellinjer ifølge oppfinnelsen har fordelaktig konserverert deres
- 25 opprinnelige differensieringskaraktertrekk selv etter mange passasjer, spesielt minst 40-80 passasjer. Det kan imidlertid etter 40 passasjer, og til og med før, sees en forandring i de karyotypen til linjene på grunn av tap av fragmenter av kromosomer. Disse linjene har imidlertid bevart det samme intakte sett av hvert kromosompar og dette muliggjør at de også har konserverert ekspresjon av deres opprinnelige differensieringskaraktertrekk.
- 30 Et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse vedrører et serumfritt kulturmedium tilpasset til dyrking og udødeliggjøring av epitelcellene i human tarm ifølge oppfinnelsen. Dette kulturmediet er spesielt tilpasset for å opprettholde i det uendelige, under suksessive passasjer, de opprinnelige differensieringskaraktertrekkene til linjene
- 35 ifølge oppfinnelsen. Dersom andre kulturmedier blir anvendt vil linjene ifølge oppfinnelsen tape sine opprinnelige differensieringskaraktertrekk etter noen få

etterfølgende passeringer, for eksempel 5-10 passasjer. Dette mediet er også essensielt for vellykket udødeliggjøring av linjene ifølge oppfinnelsen. Suppresjon av et av dets karakteristiske bestanddeler fører følgelig generelt til mangel på udødeliggjøring av epitelcellene i tarmen ifølge oppfinnelsen.

5

Dette mediet kan omfatte alle bestanddeler som vanligvis finnes i serumfrie dyrecelle-kulturmedier, dvs. uorganiske salter, glukose, en buffer (HEPES, for eksempel: Biofluider), natriumpyruvat, aminosyrer, BSA, fosfoetanolamin, etanolamin, vitaminer og hormoner, for eksempel. Kommersielle kulturmedier så som DMEM-medium

10 (Biofluids Inc., USA) kan følgelig virke som grunnlag for tilberedning av dette mediet.

Nyheten til mediet ifølge oppfinnelsen ligger i en ny kombinasjon av noen av dets bestanddeler, mens de andre forbindelsene varierer noen ganger innenfor grensene kjent for personer innenfor dette fagområdet. Disse essensielle bestanddelene er

15 sporelementer, vitaminer bestående av vitamin C og retinoisk syre, og hormoner bestående av triiodotyrodin, dexametason, hydrokortison, bovint hypofysekjertelektstrakt, insulin, EGF og transferrin.

Dette kulturmediet kan følgelig omfatte 1-100 nM sporelementer, 10-100 nM retinoisk
20 syre, 10-1000 nM triiodotyrodin (T3), 0.1-50 nM dexametason, 1-100 nM hydrokortison, 1-100 µg/ml vitamin C, 1-100 µg/ml bovin hypofysekjertelektstrakt, 0.1-50 µg/ml insulin, 0.1-50 µg/ml EGF og 0.1-100 µg/ml transferrin.

Blant sporelementene kan det velges forbindelser valgt fra gruppen dannet av selen,
25 mangan, silikat, molybden, vanadium, nikkel, tinn og saltene derav.

Blant uorganiske salter som vanligvis blir inkludert i mediet kan det bli valgt salter fra gruppen dannet av natriumklorat, kalsiumklorat, kalsiumsulfat, kaliumklorat, dibasisk natriumfosfat, natriumbikarbonat, jernnitritt, ammonium metevanadat, ammonium
30 molybdat, kobbersulfat, magnesiumklorat, manganklorat, nikkelsulfat, natriumasetat, natriumpyruvat, natriumselenitt, natriumsilikat, tinnklorat og sinksulfat.

Mediumet må inneholde mindre enn 80 µM eller kalsium i form av uorganiske salter for å inhibere utviklingen av kontaminerende fibroblaster. Kalsiumkonsentrasjonen kan
35 imidlertid økes til 1 mM, som er nødvendig i noen eksperimenter (polarisering, ekspresjon av "tight junction"-proteiner osv.) Etter flere passasjer er det ikke ytterligere

risiko for formering av fibroblaster som kan være tidlige kontaminanter forårsaket av prosessering av primære celler.

- 5 Blant andre vitaminer som vanligvis er inkludert i mediet kan det bli valgt andre vitaminer valgt fra gruppen dannet av kalsium D-pantotenat, cholinklorat, folinsyre, inositol, nikotinamid, pyridoksin, riboflavin, tiamin, biotin og cyanokobalamin.

10 Et kulturmedium som gjør det mulig å oppnå linjer ifølge oppfinnelsen har fortrinnsvis sammensetningen B50 definert i tabell 1 nedenfor.

Et annet aspekt av oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for udødeliggjøring av epitelcellene i human tarm hvor en kultur av primære epitelceller avleder fra human tarm blir dannet, kulturen blir infisert med en rekombinant virus, udødeliggjorte celler blir dyrket i serumfritt kulturmedium beskrevet ovenfor.

15 Før dette blir følgende trinn fortrinnsvis anvendt:

1. en prøve av epitelvev fra en human tarm blir oppnådd;
2. denne prøven blir tilberedt for dyrkning in vitro;
- 20 3. epitelcellene blir inokulert i et serumfritt kulturmedium og på kulturskåler omfattende et belegg som letter festing av cellene og deres vekst;
4. mediet blir skiftet så mange ganger som det er behov for å optimalisere konfluentvekst;
5. cellene blir infisert med et rekombinant virus;
- 25 6. og udødeliggjorte celler blir dyrket i det serumfrie kulturmedium beskrevet ovenfor.

Trinn (1) vedrører oppnåelse av prøver av tarmceller fra normale individer under kirurgiske inngrep i tarmkanalen. I trinn (2) kan prøven bli vasket i kulturmediet, kuttet i stykker og epiteldelen separert fra annet vev ved fysisk og/eller kjemiske metoder. For eksempel kan vevstykket bli plassert i en oppløsning omfattende omtrent 0,5% trypsin og 0,1% EDTA i tilstrekkelig lang tid for å oppnå separering av celler og deretter blir ren trypsininhibitor tilsatt i noen minutter, og til slutt blir kulturmediet som beskrevet ovenfor tilsatt.

35 I trinn (3) kan epitelcellene bli inokulert på skåler i et serumfritt kulturmedium, fortrinnsvis det som er beskrevet ovenfor. Kulturskålene har fortrinnsvis et belegg

bestående av oppløsning av fibronektin, BSA og type I kollagen (se Lechner et al., J. Cult. Meth., 9, 43-48, 1985).

- I trinn (4) blir kulturmediet inneholdende epitelcellene skiftet så mange ganger som
 5 nødvendig for å optimalisere en konfluent vekst. Mediet blir fortrinnsvis erstattet
 annenhver dag. Etter å ha oppnådd konfluens på 90% av tilgjengelig overflateareal, som
 generelt oppstår 10 dager etter inokulasjon, blir cellene separert ved behandlinger i
 oppløsninger av trypsin og EDTA.
- 10 Separerte celler blir overført i trinn (5) til et infeksjonsmedium, for eksempel det som er
 beskrevet ovenfor, på kulturskåler som fortrinnsvis har belegget beskrevet ovenfor.
 Cellene blir deretter infisert på konvensjonell måte med et rekombinant virus. Mange
 transfeksjonsteknikker er tilgjengelige for personer innenfor dette fagområdet. Som
 eksempel kan det nevnes teknikker beskrevet i WO96/07750 av Claudia Chen et al.
 15 (Mol. og Cell. Biol. 7, 2745-2752, 1987) eller av Wilson et al. (Analytical Biochemistry,
226, 212-220, 1995).

- Et rekombinant SV40-virus omfattende T-antigen (T-Ag) et inaktivert virus
 replikasjonsorigo (MuLV retrovirus) og et selekterbart gen blir anvendt. Som eksempel
 20 kan konstruksjonen presentert i figur 1 hvor sekvensen er tilgjengelig i genbank
 databanken (ekspresjonsnr. M64753; Stockshlaeder et al., Human Gen. Therapy, 2, 33-
 39, 1991) bli anvendt.

- Andre hensiktsmessige vektorer kan også lett bli konstruert av fagfolk innen området fra
 25 kommersielt tilgjengelige vektorer omfattende for eksempel genet kodende for T-Ag, et
 selekterbart gen og/eller et humant replikasjons origo. Som eksempel kan det nevnes
 plasmidene ATCC37460 og ATCC37640 som inneholder genet kodende for T-Ag.

- I trinn (6) blir epitelcellene overført til et friskt vekstmedium på kulturskåler fortrinnsvis
 30 omfattende belegget beskrevet ovenfor.

- Med kjennskap til nye og opprinnelige egenskaper til epitelcellelinjene ifølge
 oppfinnelsen kan deres anvendelse bli belyst i immunologiske, patologiske og
 toksikologiske studier.

- 35 Linjene ifølge oppfinnelsen er følgelig spesielt tilpasset for screening av mutagene,
 toksiske eller fordelaktige midler for metabolisme av cellene i tarmkanalen, som for

eksempel i en fremgangsmåte hvor (1) et middel antatt for å være et mutagent, toksisk eller fordelaktig for metabolisme av cellene i tarmkanalen blir omsatt, dyrket eller brakt i kontakt med en kultur som omfatter en cellelinje ifølge oppfinnelsen, og (2) effekten av nevnte middel på nevnte cellelinje blir bestemt eller målt.

5

Det kan også bli fremstilt et diagnostisk sett omfattende epitelcellene ifølge oppfinnelsen, kulturmediet ifølge oppfinnelsen og reagenser for bestemmelse av en metabolsk respons av nevnte celler overfor mutagene, toksiske eller fordelaktige midler.

- 10 Linjene ifølge oppfinnelsen er også tilpasset for ekspresjon av rekombinante proteiner. Fremgangsmåtene for transfeksjon av fremmed DNA er nå velkjent for fagfolk innenfor dette området (se for eksempel WO94/05472).

- 15 Linjene ifølge oppfinnelsen har også en potensiell nytteverdi i genterapi ex vivo. Disse linjene kan utgjøre et egnet redskap for utvikling av rekombinante celler som uttrykker gener av interesse for terapeutiske formål. En fordel er også at linjene ifølge oppfinnelsen ikke blir eksponert for et dyreserum som betraktelig reduserer risikoene for potensielle kontaminasjoner av virusene eller andre patogene midler.

- 20 Foreliggende oppfinnelse er beskrevet i detalj nedenfor og nedenfor følger også eksempler på fremstilling av cellelinjene ifølge oppfinnelsen.

- 25 Disse eksemplene blir etterfulgt av en beskrivelse av det anvendte kulturmediet samt et sammenlignende eksempel. Disse eksemplene illustrerer oppfinnelsen. Cellekulturen, fremstilling av SV40-vektorer, transfeksjon og analyser av ekspresjoner av markører blir dersom ikke annet er angitt utført ifølge fremgangsmåtene beskrevet i manualen til Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989). Prosentandelene er angitt i vekt dersom ikke annet er angitt.

30

Kulturmedium: Tabell 1.

Bestanddeler	Medium A50	Medium B50	Bestanddeler	Medium A50	Medium B50
UORGANISKE SALTER			Spor- elementer	—	10 nM
NaCl	6.400 g/l	6.400 g/l	HORMONER		
KCl	0.400 g/l	0.400 g/l	Insulin	0.005 g/l	0.005 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.200 g/l	0.200 g/l	EGF	1 ng/ml	1 ng/ml
CaCl ₂	0.200 g/l	0.200 g/l	Transferrin	0.005 g/l	0.005 g/l
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.13 g/l	0.13 g/l	T3	—	100 nM
NaHCO ₃	3.7 g/l	3.7 g/l	Dexametason	—	1 nM
Fe(NO ₃) ₂ ·9H ₂ O	0.0001 g/l	0.0001 g/l	Hydrokortison	—	10 nM
Andre forbindelser			Bovint hypofyse- ekstrakt		
Glukose	4.50 g/l	4.50 g/l		—	0.038 g/l
Hepes	20 mM	20 mM	ANTI- BAKTERIELL	0.25 µg/ml	0.25 µg/ml
Fenolrødt	0.010 g/l	0.010 g/l	Fungizone	2.5 U/ml	2.5 U/ml
NatriumPyruvat	0.110 g/l	0.110 g/l	Penicillin	5 µg/ml	5 µg/ml
BSA	0.3%	0.3%	Streptomycin	10 µg/ml	10 µg/ml
PE	0.5 µM	0.5 µM	Gentamycin		
AMINOSYRE					
L-Arginin-Hcl	0.0840 g/l	0.0840 g/l			
L-Cystin	0.0480 g/l	0.0480 g/l			
L-Glutamin	—	2 mM			
Glysin	0.0300 g/l	0.0300 g/l			
L-Histidin- HCl·H ₂ O	0.0420 g/l	0.0420 g/l			
L-Isoleucin	0.1048 g/l	0.1048 g/l			
L-Leucin	0.1048 g/l	0.1048 g/l			
L-Lysin-Hcl	0.1462 g/l	0.1462 g/l			
L-Lysin-Hcl	0.1462 g/l	0.1462 g/l			
L-Metionin	0.0300 g/l	0.0300 g/l			
L-Fenylalanin	0.0660 g/l	0.0669 g/l			
L-Serin	0.0420 g/l	0.0420 g/l			
L-Tryptofan	0.0160 g/l	0.0160 g/l			
L-Tyrosin	0.0720 g/l	0.0720 g/l			
L-Valin	0.0936 g/l	0.0936 g/l			
VITAMINER					
D-Ca-Pantotemat	0.004 g/l	0.004 g/l			
Kolinklorid	0.004 g/l	0.004 g/l			
Folinsyre	0.004 g/l	0.004 g/l			
Inositol	0.008 g/l	0.008 g/l			
Nikotinamid	0.004 g/l	0.004 g/l			
Pyridoksin-HCl	0.004 g/l	0.004 g/l			
Riboflavin	0.0004 g/l	0.0004 g/l			
Thiamin-HCl	0.004 g/l	0.004 g/l			
Vitamin C	—	0.030 g/l			
Retinolsyre	10 nM	100 nM			

(PE: blanding av fosforetanolamin og etanolamin)

SAMMENLIGNINGSEKSEMPEL

Vektoren pLXSHD+SV40+ beskrevet av Stockshlaeder et al. (GeneBank, aksesjonsnummer No. M64753; Stockshleder et al., Human Gen. Therapy, 2, 33-39) som er representert i figur 1 og som omfatter genets kodende for stort T-antigen, psi-gen, selekterbar markør histidino dehydrogenase (HSD) og er LTR-promoter, blir anvendt.

SV40-virusene blir fremstilt ifølge en modifisert versjon av Lynch og Miller prosedyren (J. Virol., 65, 3887-3890, 1991). De ekotropiske cellelinjene Psi2 (Mann et al., Cell, 33, 153-159, 1983) og de ampotropiske cellelinjene PA327 (ATCC CRL9078) blir dyrket i DMEM-medium (Dulbecco, USA) omfattende 10% føtalt kalveserum, ved 37°C og under en atmosfære omfattende 5% CO₂. Disse linjene blir konvensjonelt transfektert separat ved anvendelse av 250 mM CaCl₂ og 10 µg vektor pLXSHD+SV40+, og uttatt for å behandling med trypsin etter 48 t inkubasjon, blandet i en lik mengde og det hele blir inkubert ved 37°C under en atmosfære omfattende 5% CO₂. Etter dyrking til 70% konfluens blir virusene høstet i serumfritt medium PC-2 (Ventrex, USA). Etter filtrering (0.45 µm, Micropore), blir mengde virus bestemt på NIH 3T3 celler (ATCC CRL 1658).

Primærcellene i tarmen blir oppnådd etter biopsi av en 69 år gammel kvinne på grunn av forekomst av et sigmoid divertikulum. Prøven blir vasket i DMEM kulturmedium, kuttet i stykker, den epiteliale delen blir separert fra annet vev, epitelceller på skåler blir inokulert i DMEM-medium. Kulturskålene blir preinkubert i en 500 ml oppløsning omfattende 5 mg human fibronectin (Sigma), 5 ml Vitrogen 100 (Collagen Corp. Palo Alto, Ca., USA) 50 ml. Av en 0.1% BSA oppløsning (Biofluids) og gjenværende DMEM-medium. Kulturmediet inneholdende epitelialceller blir skiftet så mange ganger som det er nødvendig for å optimalisere en konfluent vekst. Etter å ha nådd en konfluens i størrelse 90% etter en uke av kulturen blir cellene hensiktsmessig separert ved behandlinger i oppløsninger av trypsin og EDTA. Cellene som blir separert blir overført på kulturskåler som har belegget beskrevet ovenfor og i A50-mediet beskrevet ovenfor.

Kulturene blir deretter infisert i nærvær av 8 µg/ml polybren og et høyt rekombinant SV40 virum titer (10^5 - 10^7 CFU) omfattende T-antigen (T-Ag) fremstilt som beskrevet ovenfor. Etter 2 t inkubasjon blir kulturene vasket i PBS og A 50 friskt vekstmedium blir tilsatt.

Cellene utviser deretter en vekst som er så sakte at det er umulig å selektene en klon som har en vekst som kan sammenlignes med epitelcellene i human tarm.

EKSEMPEL 1

- 5 Epitelcellene i human tarm blir infisert som beskrevet i sammenlignes eksempelet ovenfor og den eneste forskjellen er at A50-mediet blir erstattet med B50-mediet beskrevet i tabell 1 ovenfor.

- 10 Etter 2 t inkubasjon med virus blir kulturene vasket i PBS, B50 friskt vekstmedium blir tilsatt og cellene dyrket ved suksessive passasjer i frist B50-medium og hver passasje blir utført slik at cellene separeres ved en behandling i en oppløsning omfattende 0.02% trypsin, 1% polyvinyl-pyrrolidin og 0.02% etylenglykol i HEPES buffer (Biofluids).

- 15 Ved å observere størrelsen på cellekoloniene som utvikles på kulturskålene blir de som blir utviklet hurtig valgt. Det var følgelig mulig å selektene 6 human tarmepitel udødeliggjorte cellelinjer hvor en ble deponert til Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany, 16. April 1996, med deponeringsnummer DSM ACC2258.

- 20 1. Analyse av karyotype til stammen DSM ACC2258.
4 karyotyper av DSM ACC2258-stammen som ble tatt ved passering 40 blir fremstilt (metoden beskrevet i manualen "Human cytogenetics, Edts.: Rooney DE, Czepulkowski BH, IRL Press. Oxford, 1986" inkorporert som referanse). Resultatene viser at 6 forskjellige kromosomer gikk tapt eller var skadet. Linjen konserverer derfor intakt i
25 dets genom et kromosom av hvert par av kromosomer. Kjønnnet til linjen er XO/XX. Det er å bemerke at tap av ett sett kromosom ikke er et tegn på en tumorigen transformasjon av nevnte linje.

2. Tumorigenisitet til stammen DSM ACC2258.
30 10^7 celler av DSM ACC2258 linjen, tatt etter 46. passasje, blir injisert i en mus uten immunforsvar ("naken") ifølge prosdyren beskrevet av Stauffer et al. (ovenfor). Ingen tumordannelse er synlig etter mer enn 8 måneder. Ikke-tumorigenisiteten til linjene er ikke tegn på ikke-tumorigen transformasjon av nevnte linje. NMC456 linjene beskrevet av Stauffer et al. induserer ikke tumorer i nakne mus til tross for at den uttrykker
35 tumormarkører karakteristisk for dets tumorigene transformasjon.

3. Ekspresjon av tumormarkører i DSM ACC2248 linjen.

Den blir bestemt ifølge prosedyren beskrevet av Stauffer et al. om DSM ACC2258 linjen uttrykker følgende tumormarkører: p-53-mutasjon, karsinomembryonalt antigen (CEA) og mutasjon i adenoma colyposis koli (APC)-genet.

5

Resultatene er negative for alle disse markørene som indikerer en tilstand med ikke-tumorigen transformasjon av linjen.

4. Viral kontaminasjon av DSM ACC2258-linjen.

- 10 Det blir bestemt om DSM ACC2258-linjen er kontaminert av hepatitt C-virus (HCV), hepatitt B-virus (HBV) og aids-virus (HIV-1). For analysering av HBV blir DNA ekstrahert fra omtrent 2×10^6 celler ved behandling med fenol og kloroformoppløsninger etterfulgt av en etanolfelling. DNA-prøvene blir deretter utsatt for en PCR-amplifikasjon ved anvendelse av primere spesifikk for pre-kjerne regionen til viruset
- 15 (Lynch et al., J. Virol., 65, 3887-3890). Amplifiseringsproduktene blir deretter separert på en agarosegel, og de blir visualisert under UV i nærvær av etidiumbromid. For sammenligning blir en fortynning av serum inneholdende 10^{-10^5} HBV (Anawa Biomedical Services 6 Product, USA) analysert på samme måte, parallelt.
- 20 For analysering av HIV-1 blir DNA-prøvene beskrevet ovenfor utsatt for PCR-amplifisering ved anvendelse av primere spesifikke for GAG-regionen til viruset. Amplifiseringsproduktene blir deretter separert på en agarosegel og de blir visualisert under UV i nærvær av etidium bromid. For sammenligning blir en fortynning av et serum inneholdende 10^{-10^5} HIV-1 (Anawa Biomedical Services 6 Product, USA)
- 25 analysert på samme måte, parallelt.

For analysering av HCV blir RNA ekstrahert fra omtrent 2×10^6 celler ifølge metoden til Chomczynski et al. (Anal. Biochem., 162, 156-159, 1987). En revers transkripsjon blir hensiktsmessig utført, og komplementært DNA som blir oppnådd blir utsatt for en PCR

30 amplifisering ved anvendelse av primere spesifikke for ikke-kodende 5'-regionen til viruset. Amplifiseringsproduktene blir deretter separert på en agarosegel, og de blir visualisert under UV i nærvær av etidiumbromid. For sammenligning blir en fortynning av et serum inneholdende 10^{-10^5} analysert på samme måte, parallelt.

- 35 Resultatene er negative for tilstedeværelse av 3 virus.

5. Ekspresjon av markører spesifikke for human epitelceller.

5.a. Cytokeratiner: Cellene til en kultur av DSM ACC2258-linjen blir koblet på glass-skåler av en 100% kald metanol oppløsning og deretter blir skålene vasket i en buffer omfattende 0.05M Tris pH 8.6, 1.8% NaCl og 0.2% polyetylenglykol 2000 (TNP buffer).

5 Cellene blir deretter inkubert i 30 min i nærvær av museantistoffer spesifikke for visse cytokeratiner (anti-CH peptide 4, 7, 8, 13, 14, 17, 18, 19, 20, Sigma, USA). Etter 3 vaskinger i TNP-buffer omfattende 0,5% BSA, blir skålene inkubert i 30 min med et geiteanti-muse-IgG-antistoff omfattende en immunfluorescens forbindelse (1:300, FITC geiteanti-mus IgG; Biosys). Etter 3 vaskinger i foregående buffer blir skålene fiksert og
10 de blir analysert ved fluorescens mikroskopi. Alle cellene er positiv for cytokeratinene 7, 8 og 17.

5.b. Vimentin: På samme måte som for analysing av cytokeratiner blir de fikserte cellene beskrevet ovenfor utsatt for et museanti-vimentinantistoff (DAKO, USA) og
15 deretter får geiteanti-muse-IgG-antistoff nevnt ovenfor. Ved fluorescensmikroskopi er alle cellene positive for vimentin.

5.c. Koblinger mellom cellene (tette grenser): Cellene fra DSM ACC2258 blir dyrket på en glasskål helt til de blir konfluente og de blir fiksert ved behandling med en 2,5%
20 glutaraldehyd oppløsning i en 0.1 M fosfatbuffer pH 7.4 i 1 t ved romtemperatur. Etter to vaskinger i samme fosfatbuffer blir cellene på ny fiksert i en 2% OsO₄ oppløsning i samme buffer. Cellene blir deretter dehydrert i følgende oppløsninger av etanol ved 30, 50, 70, 90 og 100% (Polaron Equipment Ltd., Watford, UK) og deretter blir cellene fjernet av et fint gullag (SEM beleggenhet E5100, Polaron). Cellene blir deretter
25 undersøkt ved elektronmikroskopi (Philips 505 SEM). Analysene viser at cellene har intercellulære forbindelser som er karakteristiske for epitelcellene.

5.d. Alkalisk fosfatase: Alkalisk fosfataseaktiviteten til cellene fra DSM ACC2258-linjen blir bestemt ved hjelp av Sigma kommersielle sett som reproducerer metoden
30 beskrevet av Dahlquist et al. (Analytical Biochemistry, 22, 99-107, 1968). Resultatene presentert i figur 2 viser at cellene fra DSM ACC2258-linjen (Oc11, Oc12, Oc14) uttrykker en fosfataseaktivitet som kan sammenlignes med den til humane tarmepitel-cancercellene CaCO-2, men høyere enn humane tarmepitelcancercellene HT-29. Resultatene C, Q, D, H, P vedrører andre human tarmepitellinjer presentert i eksempel 2.

5.e. Cytokrom P450: Ekspresjon av cytokromer av cellene fra DSM ACC2258-linjen blir analysert ved hjelp av kjent RT-PCR teknikk ved anvendelse av DNA primerne spesifikke for forskjellige cytokromer P450. Disse primerne ble konvensjonelt dannet fra DNA sekvensen til forskjellige cytokromer tilgjengelig fra genbankdatabasen

- 5 (CYP1A1: aksesjonsnummer X02612; CYP2C, aksesjonsnummer M61855 eller M61858 eller M61856 eller MM61854; CYP2D6: aksesjonsnummer M33388; CYP2E1: aksesjonsnummer J02843; CYP3A5: aksesjonsnummer J04813; CYP1A2: aksesjonsnummer Z00036; aksesjonsnummer M33318; CYP2B6: aksesjonsnummer M29874).

10

Cellene blir følgelig dyrket helt til de blir konfluente på 35 mm skåler (Costar), RNA blir ekstrahert ved hjelp av RNA easy-kit (Qiagen), en revers transkripsjon blir utført (første tråd cDNA syntese-sett for RT-PCR, Boehringer Mannheim) komplementært DNA oppnådd blir utsatt for en PCR-amplifisering ved anvendelse av DNA-primere

15 spesifikke for forskjellige cytokromer P450, amplifiseringsproduktene blir deretter separert på en agarosegel og de blir visualisert under UV i nærvær av etidiumbromid.

Resultatene viser at celler uttrykker cytokromene CYP1A1, CYP2C, CYP2D6, CYP2E1 og CYP3A5. Derimot er cellene negative for cytokromene CYP1A2, CYP2A6 og

20 CYP2B6. Ekspresjon av cytokrom CYP3A5 blir også bekreftet ved Western-analyser av et proteinekstrakt fra DSM ACC2258-celler ved hjelp av et anti-CYP3A5 polyklonalt antistoff (Oxygene, USA).

25

5.f. Enzymer involvert i cellulær oksidasjon og detoksifisering av elektrofiler: Celler fra DSM ACC2258-linjen blir dyrket, RNA blir ekstrahert ifølge Chomczynski et al. method (Anal. Biochem., 162, 156-159, 1987), DNA prober blir dannet fra DNA-sekvensene til Cu/Zn-superoxid dismutase (SOD), glutation peroxidase (GP), katalase (CA), glutation-S-transferase (GST) og quinon reduktase (QR), som er tilgjengelig i genbankdatabasen (GST: aksesjon nr. X08058; GP: aksesjonsnummer M21304; CA: aksesjonsnummer M81578; aksesjonsnummer 729336; QR: aksesjonsnummer

30 M81596_600), og deretter blir et Northern-blot utført på RNA med disse probene for å bekrefte transkripsjon av disse enzymene.

35

Resultatene viser at alle cellene uttrykker en transkripsjon av gener kodende for SOD-GP, CA, GST og QR-aktivitet. DSM ACC2258-linjen uttrykker derfor enzymer involvert i cellulær oksidasjon og detoksifisering av elektrofiler.

6. Ekspresjon av markører spesifikke for epitelcellene i human tarm.

6.a. Overflatevilløser: Som beskrevet i pkt. 5.c ovenfor viser analyser ved elektronmikroskopi av cellene klart tilstedeværelse av korte villi ved polen motsatt den som adherer til bæreren.

5

6.b. Sukrose-isomaltase: Sukrose-isomaltase er spesifikk for epitelcellene i human tarm. Tilstedeværelse av sukrose-isomaltase kan bli demonstrert på budbringer RNA-nivå ved RT-PCR-teknikken beskrevet ovenfor i punkt 5.e etter eksponering av en konfluent kultur av DSM ACC2258-celler i 48 t til 1 ng/ml av human rekombinant TGF- β (Becton Dickinson). DNA-primerne blir konvensjonelt dannet fra DNA-sekvensen til sukrose-isomaltasegenet tilgjengelig på genbankdatabasen (aksjesjonsnummer X63597 S41833 S41836).

10

6.c. Dipeptidylpeptidase IV: DPP IV er spesifikk for epitelcellene i human tarm.

15 Tilstedeværelsen derav kan bli demonstrert på messenger RNA-nivå ifølge RT-PCR-teknikken beskrevet ovenfor i pkt. 5.e. DNA primerene blir konvensjonelt dannet fra DNA-sekvensen til DPPIV-genet tilgjengelig på genbankdatabasen (aksjesjonsnummer U13710-35).

20 **6.d. Klasse II vevsforlikelighetskompleks:** Epitelceller på tarmen kan uttrykke klasse II vevsforlikelighetskompleks (HLA antigener) i nærvær av γ -interferon (γ -IFN). DSM ACC2258-cellene blir dyrket i B50-medium, i nærvær av 100 U/ml rekombinante γ -IFN (Boehringer Mannheim) etter 12, 24, 36 og 48 t dyrkning. Cellene blir separert på en oppløsning omfattende 0.025% trypsin og EDTA (Gibco Life Technologie, USA) og de
25 blir inkubert i nærvær av antistoffer spesifikke for HLA-DR-HLA-DP og HLA-DQ-antigener (Becton-Dickinson, USA), og de blir separert ved anvendelse av et flowcytometer (FACS can, Becton-Dickinson).

Resultatene presentert i figur 3 viser en ekspresjon av HLA-DP antigen fra 12 t kultur, med økende konsentrasjoner etter 24 og 48 t. Ekspresjon av HLA-DR blir observert etter 24 t dyrkning med maksimale konsentrasjoner etter 36 og 48 t. Derimot blir HLA-DQ-antigenet ikke induert og dette bekrefter observasjoner dannet på primære epitelceller i tarmen (Mayer et al.)

35

7. Adhesjon til mikroorganismer.

- 7.a. Adhesjon til stammen av bakterien CNCM-1225: Human tarm blir kolonisert av et stort antall ikke-patogene bakterier, som lactobacilli og bifido bakteriene, og noen har evne til å adherere til villi i tarmslimhinne-membranen. *Lactobacillus johnsonii* stamme CNCM-1225, kjent for å adherere sterkt til epitelcellene i tarmkanalen (EP577904; Bernet et al.), og blir dyrket i 12 t i et MRS-medium (Man, Rogosa and Sharpe, Biokar) omfattende $100 \mu\text{C}^3\text{Hadenin}$, i fravær av oksygen. DSK ACC2258-cellene blir dyrket i to uker helt til de blir konfluente, og de blir deretter inkubert 1 t ved 37°C med 12-t MRS-medium beskrevet ovenfor, eller et friskt MRS-medium eller en fosfatbuffer pH 6.5 omfattende 4×10^8 celler pr. ml avledet fra 12-t MRS-kulturen beskrevet ovenfor. DSM ACC2258-cellene blir vasket tre ganger med PBS, analysert med 1M NaOH-oppløsning, og deretter blir radioaktivitetsintensiteten frigjort av cellene målt ved hjelp av en scintillasjonsteller.
- 15 For sammenligning blir stammen CaCO-2 dyrket på samme måte som beskrevet ovenfor og inkubert med stammen CNCM 1-1225 og den radioaktive intensiteten som blir frigitt fra cellene blir målt.

- Resultatene presentert i tabell 2 nedenfor viser at DSM ACC2258-cellene har evne til å adherere CNCM 1-1225 bakteriene samt CaCO-2 cellene. Det er også å bemerke at kulturen av 12-h LA-1 stammen inneholder faktorer som fremmer adhesjonen av bakteriene. Det friske MRS-mediet som blir tilsatt bakterier utviser et lavere adhesjonsnivå. Det kan videre bli observert at en pH på 6.5 som er lik det som er tilstede i tarmkanalen *in vivo* også fremmer adhesjon av bakterier når det sammenlignes med adhesjonsnivået oppnådd med friskt MRS-medium som har en pH på 5.

Tabell 2

Cellelinje	Inkuberingsbetingelser	% ^3H -adenin
DSM ACC2258	12-t MRS	30.2
	Frisk MRS	11.8
	Buffer pH 6.5	13.03
CaCo-2	12-t MRS	34.8
	Frisk MRS	6.1
	Buffer pH 6.5	8.3

Kapasiteten DSM ACC2258-linjen har til å beholde bakterien CNCM 1-1225 blir også målt ifølge metoden beskrevet av Bernet et al. (Gut, 35, 483-489, 1994). Antall bakterier som adhererer til 100 tarmceller blir bestemt visuelt. Et 12-t MRS kultur-medium, eller friskt MRS-medium omfattende 4×10^8 celler pr. ml avledet fra 12-t MRS-kulturen blir anvendt. Analysen blir utført på tre preparater og 20 mikrografer blir tatt tilfeldig i hvert preparat som blir anvendt.

Til sammenlikning ble kapasiteten CaCO-2-linjen har til å beholde bakteriene CNCM 1-1225 målt på samme måte.

Resultatene presentert i tabellen nedenfor viser at linjen har evne til å beholde et betydelig antall bakterier. Det kan også bli bemerket at kulturen av 12-t LA-1 stammen inneholder faktorer som fremmer adhesjon av bakteriene. Friskt MRS-medium hvor det ble tilsatt bakterier gjør det ikke mulig å oppnå et slikt høyt adhesjonsnivå.

Tabell 3

Cellelinje	Inkuberingsbetingelser	Celler	Standardavvik
DSM ACC2258	12-t MRS	118	7
	Frisk MRS	13	4
CaCo-2	12-t MRS	124	13
	Frisk MRS	9	4

7.b. Adhesjon til Clostridium difficile og/eller adherente bifidobakterier:

Kapasiteten til DSM ACC2258-linjen må tilbakeholde bakteriene Clostridium difficile og adherente bifidobakterier beskrevet i Applied Env. Microb., 59, 4121-4128, 1993 og i EP577904 (Nestlé) er blitt analysert. Resultatene viser at linjen også har evne til å beholde et betydelig antall av hver bakterie.

8.Cytokinekspresjon: Ekspresjon av cytokiner i cellene av DSM ACC2258-linjen, nærvær eller ikke av et inflammasjonsmiddel blir analysert ved hjelp av kjent RT-PCR-teknikk ved anvendelse av DNA primere spesifikke for forskjellige cytokiner. Disse primerene ble hensiktsmessig fremstilt fra DNA sekvensen til forskjellige cytokiner tilgjengelig på genbankdatabasen (aksesjonsnummer: TNF α : X02910; IL-1 β : M15840;

IL-6: M14584; IL-8: M28130; IL-1ra: M97748). Induksjon av betennelsen ble utført ved inkubering av linjen med mM histamin eller 20 ng/ml TPA i løpet av 24 t.

- For sammenligning ble samme analysen utført med et normalt tarmvev, HT-29 og
5 CaCO-2 tumorigene celler. Resultatene er presentert i tabell 4 nedenfor.

Tabell 4.

MRNA	Tarmvev ikke- indusert	DSM ACC2258 ikke-indusert/indusert		HT-29 ikke-indusert/indusert		CaCO-2 ikke-indusert/indusert	
IL-1 β	+	+	++	-	++	-	+
IL-1ra	-	-	+	+	++	-	+
TNF α	-	+	++	+	++	+	++
IL-6	+	+	++	+	++	+	++
IL-8	-	+	++	+	++	+	++

10

EKSEMPEL 2

De andre humane tarmepitel udødeliggjorte celler utviklet i eksempel 1 utviser karaktertrekk lignende de som er beskrevet ovenfor for DSM ACC2258-stammen. Som eksempel er alkalisk fosfataseaktiviteten til 5 andre linjer betegnet C, Q, D, H, P

- 15 presentert i figur 2.

20

Patentkrav

1.

- 25 Serumfritt kulturmedium egnet for dyrking og udødeliggjøring av epitelcellene i human tykktarm, omfattende uorganiske salter, glukose, natrium pyruvat, aminosyrer, BSA, etanolamin, fosforetanolamin, vitaminer og hormoner,
karakterisert ved at mediet omfatter sporelementer, vitaminer bestående av vitamin C og retinoisk styre, og hormoner bestående av

trijodtyroдин, deksametason, hydrokortison, bovint hypofysekjertelektstrakt, insulin, EGF og transferrin.

2.

- 5 Kulturmedium ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at mediet omfatter 1-100 nM sporelementer, 10-1000 nM retinoisk syre, 10-1000 nM trijodtyroдин, 0.1-50 nM deksametason, 1-100 nM hydrokortison, 1-100 µg/ml vitamin C, 1-100 µg/ml bovint hypofysekjertelektstrakt, 0.1-50 µg/ml insulin, 0.1-50 ng/ml EGF og 0.1-100 µg/ml transferrin.

10

3.

- Kulturmedium ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at de uorganiske saltene blir valgt fra gruppen bestående av natriumklorat, kaliumklorat, kaliumsulfat, kalsiumklorat, dibasisk natriumfosfat, natrium bikarbonat, jernnitritt, 15 amonium metevanadat, ammonium molybdat, kobbersulfat, magnesiumklorat, manganklorat, nikkelsulfat, natriumacetat, natriumpyruvat, natriumselenitt, natrium-silikat, tinnklorat og sink-sulfat.

4.

- 20 Kulturmedium ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at vitaminene blir valgt fra gruppen dannet av kalsium D-pantotenat, kolinklorat, folinsyre, inositol, nikotinamid, pyridoksin, riboflavin, tiamin, biotin og cyano-kobalamin.

5.

- 25 Kulturmedium ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at mediet omfatter mindre enn 8 µM kalsium.

6.

- Kulturmedium ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det 30 har sammensetningen B50 definert i tabell 1.

7.

- Fremgangsmåte for uødelliggjøring av epitelcellene i human tykktarm, k a r a k t e r i s e r t v e d at en kultur av primære epitelceller 35 avledet fra den humane tykktarmen blir fremstilt, kulturen blir infisert med et

rekombinant virus, og udødeliggjorte celler blir dyrket i serumfritt kulturmedium ifølge ett av kravene 1 til 6.

8.

- 5 Fremgangsmåte ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at de primære epitelcellene blir dyrket i serumfritt kulturmedium ifølge ett av kravene 1 til 6.

9.

- 10 Fremgangsmåte ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at kulturen blir infisert med et rekombinant SV40 T-Ag-virus inneholdende en del av MuLV-retroviruset.

10.

- 15 Fremgangsmåte for identifisering av den mutagene, toksiske eller fordelaktige effekten til et middel for metabolismen til cellene i tarmkanalen in vitro, k a r a k t e r i s e r t v e d at (1) et middel antatt å være et mutagent, toksisk eller fordelaktig middel for metabolisme av cellene i tarmkanalen blir omsatt, dyrket eller brakt i kontakt med en kultur omfattende en cellelinje ifølge ett av kravene 11 til 16 og (2) effektene av nevnte middel på nevnte cellelinje blir bestemt eller
20 målt.

11.

Humane kolon epitelcellelinjer udødeliggjort ved anvendelse av et rekombinant virus, der cellelinjen

- 25 - er i stand til å formere seg i minst 40 påfølgende passasjer,
- mangler tumormarkører,
- uttrykker metabolske markører spesifikke for ikke-udødeliggjorte, humane epitelceller og metabolske differensieringsmarkører spesifikke for ikke-udødeliggjorte, humane kolonepitelceller,
30 - er i stand til å adherere, in vitro, til melkesyrebakteriestammen CNCM I-1225, og
- er i stand til å frembringes ifølge en fremgangsmåte ifølge kravene 7 til 10, med den forutsetning at dette ekskluderer cellelinjer som er oppnådd ved en fremgangsmåte for å oppnå en hovedsakelig ren, udødeliggjort human epitelcellelinje, som omfatter

- (a) frembringelse av en primær kultur av humane epitelceller oppnådd ved anvendelse av et fibroblast-samdyrkingssystem omfattende en første populasjon av celler omfattende en kultur av humane fibroblaster på et substrat i et egnet medium, et støttemateriale slik som en membran der støttematerialet er plassert over fibroblastkulturen, og en annen, heterogen populasjon av celler tilført støttematerialet og omfattende humane epitelceller,
- (b) utsåing av en tredje populasjon av celler omfattende en kultur av humane fibroblaster på et annet substrat i et egnet medium,
- (c) selektiv løsning av ikke-epiteliale celler fra substratet ved å inkubere samkulturen med et egnet løsrivelsesmiddel for en tidsperiode tilstrekkelig for å løsne ikke-epiteliale celler fra substratet uten å løsne en vesentlig mengde av epitelcellene,
- (d) plassering av støttematerialet over fibroblastkulturen oppnådd i trinn (b), slik at en hovedsakelig ren epitelcellestamme opprettholdes på støttematerialet, og
- (e) udødeliggjøring av den hovedsakelige rene epitelcellestammen med minst en retrovirusvektor som har en ekspresjonskassett omfattende et nukleinsyremolekyl som koder for et papillomavirus polypeptid valgt fra gruppen bestående av E6 og E7 og kombinasjoner av disse, og kontrollsekvenser som dirigerer transkripsjonen av nukleinsyremolekylet slik at sekvensen kan transkriberes og translateres i den transfekterte cellelinjen.

20

12.

- Udødeliggjort linje ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den uttrykker, som metabolsk markør spesifikk for ikke-udødeliggjorte humane epitelceller, minst to markører valgt fra gruppen dannet av cytokeratiner, koblinger mellom celler, alkalisk fosfatase, cytokromene P450, en glutation-S-transferase, quinon reduktase, Cu/Zn-superoksid dismutase, glutation peroksidase og en katalase.

25

13.

- Udødeliggjort linje ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den uttrykker, som metabolsk differensieringsmarkør, minst to markører valgt fra gruppen dannet av overflatevilli, sukrose isomaltase, klasse II vevsforlikelighetskomplekset og dipeptidylpeptidase IV.

30

14.

- Udødeliggjort linje ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den uttrykker HLA-DR- og HLA-DP-antigener fra klasse II vevsforlikelighets-

35

komplekset, og som ikke uttrykker HLA-DQ-antigenet til nevnte kompleks, i nærvær av human gamma-interferon.

15.

- 5 Udødeliggjort linje ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at den har evnen til å adherere in vitro til melkesyrebakteriestammen CNCM I-1225 i et forhold på minst 80 bakterier pr. 100 tykktarmsepitelceller.

16.

- 10 Udødeliggjort linje ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at den har deponeringsnummer DSM ACC2258.

17.

- 15 Diagnostisk sett, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter de udødeliggjorte epitelcellene i human tykktarm ifølge ett av kravene 11 til 16, kulturmediet ifølge ett av kravene 1 til 6 og reagenser for å bestemme en metabolsk respons av nevnte celler overfor mutagene, toksiske eller fordelaktige midler med hensyn på metabolismen til cellene i tarmkanalen.

20 18.

Anvendelse av udødeliggjorte epitelceller fra human tykktarm ifølge ett av kravene 11 til 16 i fremgangsmåte for identifikasjon av mutagene, toksiske eller fordelaktige midler for metabolisme til cellene i tarmkanalen.

25 19.

Anvendelse av udødeliggjorte epitelcellene i human tarm ifølge ett av krav 11 til 16 for fremstilling av et aktivt farmasøytisk middel.

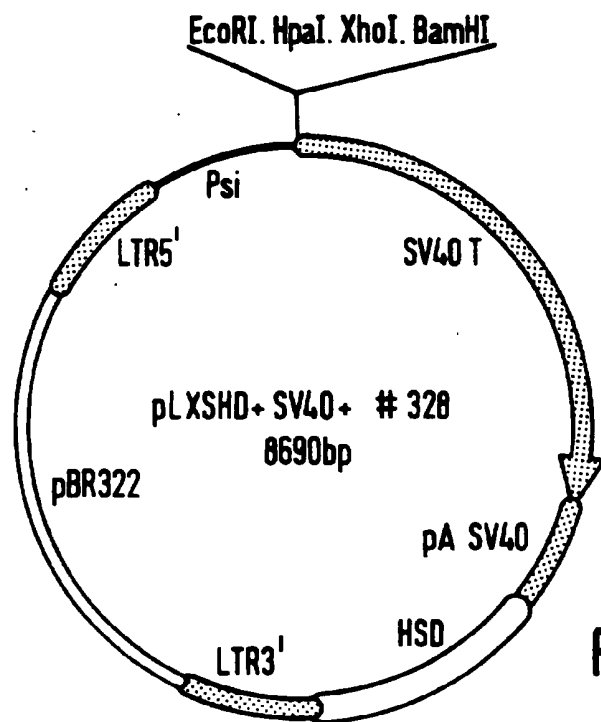


FIG. 1

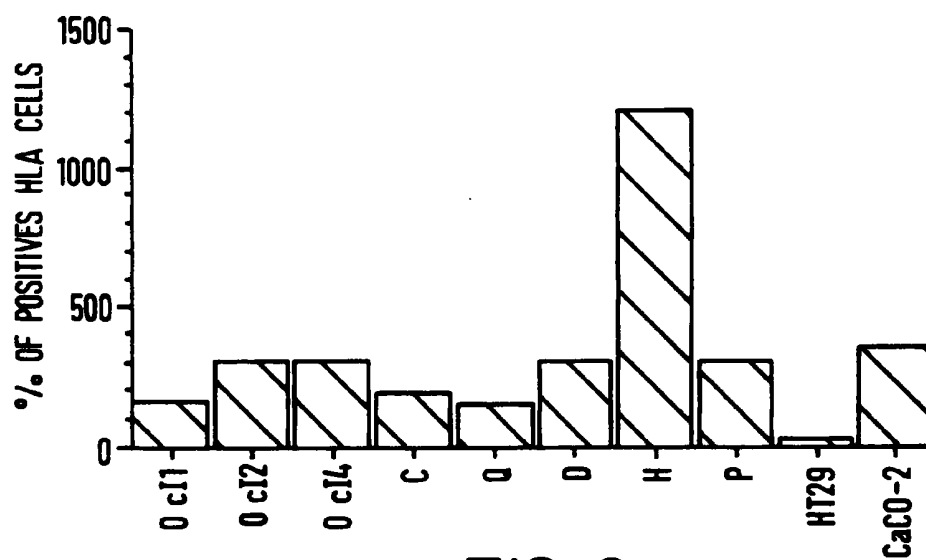


FIG. 2

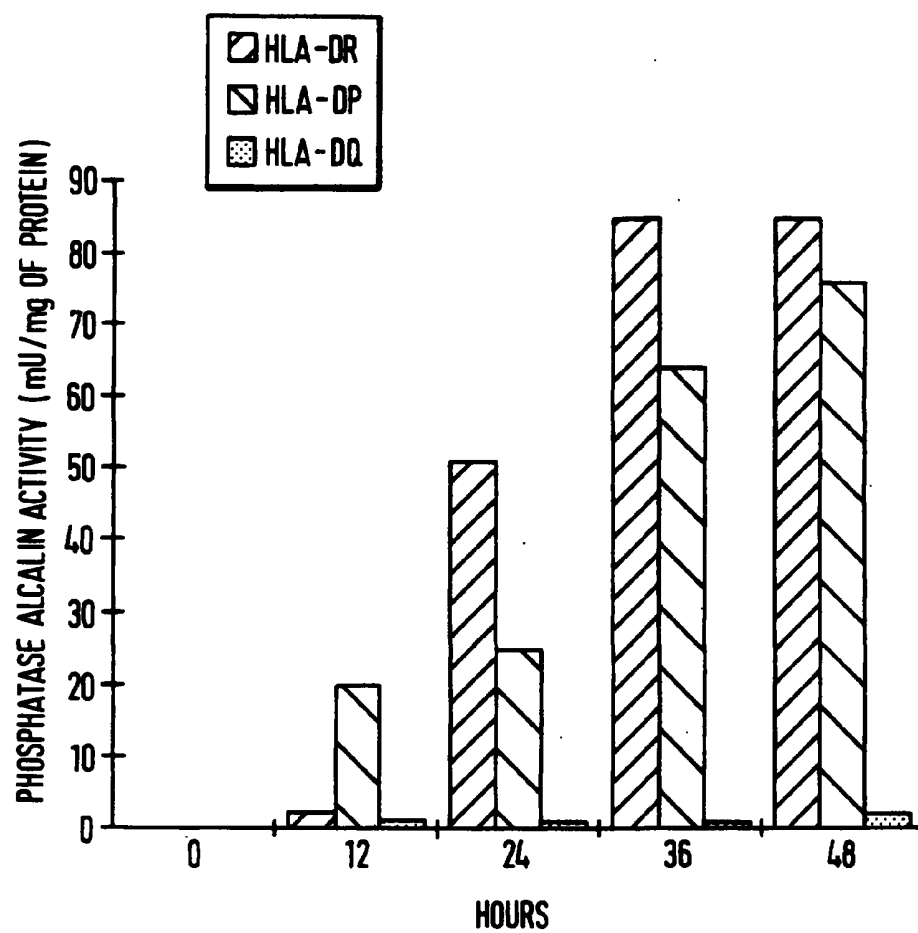


FIG. 3