



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 37 007 T2 2008.08.21**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 144 671 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/00 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 37 007.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/03592**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 911 779.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/047762**

(86) PCT-Anmeldetag: **11.02.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **17.08.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.10.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **07.11.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.08.2008**

(30) Unionspriorität:

119725 P	12.02.1999	US
422844	21.10.1999	US
168407 P	01.12.1999	US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

Stemcells California, Inc., Palo Alto, Calif., US

(72) Erfinder:

**BUCK, David W., Santa Clara, CA 95054, US;
UCHIDA, Nobuko, Palo Alto, CA 94301, US;
WEISSMAN, Irving, Redwood City, CA 94062, US**

(74) Vertreter:

Klunker, Schmitt-Nilson, Hirsch, 80797 München

(54) Bezeichnung: **ANGEREICHERTE ZENTRALNERVENSYSTEM-ZELLPOPULATIONEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Diese Erfindung betrifft allgemein angereicherte neurale Stammzell- und Progenitorzellpopulationen und Verfahren zum Identifizieren, Isolieren und Anreichern von neuronalen Stamm- und Progenitorzellen, insbesondere neurale Stammzellen und Progenitorzellen des Zentralnervensystems und insbesondere angereicherte Populationen von Neurosphären initiiierenden Zellen (NS-IC).

Erfindungshintergrund

[0002] Stammzellen machen nur einen kleinen Prozentanteil der Gesamtzahl an Zellen aus, sind aber wegen ihrer Fähigkeit, den Körper zu repopulieren, von immensem Interesse. Die Langlebigkeit von Stammzellen und die Dissemination von Stammzellnachkommen sind erwünschte Eigenschaften. Es besteht ein beträchtliches kommerzielles Interesse an diesen Verfahren, weil Stammzellen zahlreiche klinische Anwendungen besitzen. Es besteht auch ein medizinisches Interesse an der Verwendung von Stammzellen als ein Vehikel zur Gentherapie.

[0003] Proteine und andere Zelloberflächenmarker, die auf Stammzell- und Progenitorzellpopulationen gefunden werden, sind bei der Herstellung von Reagenzien für die Separation und Isolierung dieser Populationen verwendbar. Zelloberflächenmarker sind auch bei der weiteren Charakterisierung dieser wichtigen Zellen verwendbar.

[0004] Beispielsweise beschreibt WO 9402593 Neuralleistenzellen und andere multipotente neurale Stammzellen. Es werden auch Verfahren zur Isolierung, Identifizierung, Propagierung, Differenzierung und Nutzung solcher Zellen bereitgestellt. Im genau zu sein, diese Anmeldung offenbart die Verwendung von monoklonalen Antikörpern für schwach affinen Nervenwachstumsfaktor (LNGFR), um Neuralleistenzellen bei einem Verfahren zu isolieren und identifizieren, das auf andere neurale Stammzellpopulationen ausgedehnt werden kann.

[0005] Yin et al., US-Patent 5,843,633, beschreibt einen monoklonalen Antikörper, genannt AC133, der an ein Oberflächenmarker-Glykoprotein auf hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen bindet. Das AC-133-Antigen ist ein 5-Transmembran-Zelloberflächenantigen mit einem Molekulargewicht von 117 kDa. Die Expression dieses Antigens ist höchst gewebespezifisch und ist bei einer Teilmenge hämatopoietischer Progenitorzellen beobachtet worden, die aus humanem Knochenmark, fötalem Knochenmark und fötaler Leber, Nabelschnurblut und adultem peripherem Blut stammen. Die Teilmenge von Zellen, die vom AC133-Antikörper erkannt werden, ist CD34^{bell} und enthält im Wesentlichen die gesamte in der CD34⁺-Population vorhandene CFU-GM-Aktivität, was AC133 als ein Reagenz zum Isolieren und Charakterisieren humaner hämatopoietischer Progenitor- und Stammzellen verwendbar macht.

[0006] Allerdings sind keine für nicht-hämatopoietische Stammzellen und Progenitorzellen und insbesondere neurale Stammzellen und Progenitorzellen des zentralen Nervensystems spezifische Oberflächenmarker identifiziert worden. Darüber hinaus ist der AC133-Antikörper nicht bei Verfahren zum Identifizieren, Isolieren oder Anreichern von nicht-hämatopoietischen Stammzellen oder Progenitorzellen, insbesondere neuronalen Stammzellen und Progenitorzellen des zentralen Nervensystems (ZNS), verwendet worden. Es bleibt ein Bedarf für Werkzeuge, wie monoklonale Antikörper, die bei der Isolierung und Charakterisierung humaner nicht-hämatopoietischer Stammzellen und Progenitorzellen und insbesondere neuraler Stammzellen und Progenitorzellen des zentralen Nervensystems (ZNS) verwendbar sind.

Kurzfassung der Erfindung

[0007] Diese Erfindung stellt Verfahren zum Identifizieren, Isolieren und Anreichern von humanen nicht-hämatopoietischen Stammzellen oder Progenitorzellen und insbesondere neuronalen Stammzellen, die Neurosphären initiieren können (NS-IC), und Progenitorzellen des zentralen Nervensystems (ZNS). Die Erfindung stellt auch angereicherte Populationen bereit, die neurale Stammzellen, die Neurosphären initiieren können, und Progenitorzellen des ZNS enthalten. Eine „Neurosphären initiiierende Zelle (NS-IC)“ ist eine Zelle, die eine Langzeitneurosphärenkultur initiieren kann. Eine „Neurosphäre“ ist wiederum ein Aggregat oder Cluster von Zellen, das neurale Stammzellen und primitive Progenitoren enthält. Die Identifizierung, die Kultur, das Wachstum und die Verwendung von Neurosphären wird bei Weiss et al., US-Patent 6,750,376, und Weiss et al., US-Patent 5,851,832, offenbart. Während der Ausdruck „NS-IC“ durch die Fähigkeit oder das Vermögen dieser Zelle, eine Neurosphäre zu bilden, definiert wird, können diese Zellen zweckmäßigerweise in adhärenter Kultur

gezüchtet werden (siehe beispielsweise Johe, US-Patent 5,753,506), und es sollte beachtet werden, dass die hierin beschriebenen Verfahren und Populationen nicht auf Suspensionskulturen von NS-IC beschränkt sind. Eine NS-IC ist Nestin⁺ und besitzt die Fähigkeit, unter geeigneten Differenzierungsbedingungen zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten auszudifferenzieren.

[0008] Gemäß einem Ausführungsbeispiel dieser Erfindung wird eine angereicherte Population von neuralen ZNS-Stammzellen, die Neurosphären initiieren können (NS-IC), und Verfahren zum Identifizieren, Isolieren oder Anreichern von solchen Zellen durch in Kontakt bringen einer Population von Zellen, die nicht aus humanen Embryos stammt, die wenigstens eine Stammzelle oder NS-IC oder Progenitorzelle enthält, mit einem Reagenz, das an Oberflächenmarker-Glykoprotein-Antigen („AC133-Antigen“) bindet, das vom AC133-Antikörper erkannt wird. Bei einem bevorzugten Ausführungsbeispiel ist das Reagenz der AC133-Antikörper (der AC133-Antikörper wird hierin alternativ als „5F3“ bezeichnet). Die Verwendung traditioneller Techniken zum Zellsortieren, wie etwa durch Immunselektion (beispielsweise FACS), erlaubt dann die Identifizierung, Isolierung und/oder Anreicherung von Zellen, bei denen der Kontakt zwischen dem Reagenz und dem AC133-Antigen detektiert worden ist.

[0009] Bei einem anderen Ausführungsbeispiel verwendet diese Erfindung einen Antikörper, hierin 5E12 genannt, um angereicherte Populationen von neuralen Stammzellen, die Neurosphären initiieren können, und Progenitorzellen des ZNS bereitzustellen, und kann bei Verfahren zum Identifizieren, Isolieren oder Anreichern solcher Zellen durch in Kontakt bringen einer Population von Zellen, die nicht aus humanen Embryos stammt, die wenigstens eine Stammzelle, NS-IC oder Progenitorzelle enthält, mit dem 5E12-Antikörper, der an ein anderes Oberflächenmarker-Glykoprotein-Antigen als das AC133-Antigen bindet, verwendet werden.

[0010] Bei einem bevorzugten Ausführungsbeispiel sind die Zellen der Erfindung, vorzugsweise die neuralen ZNS-Stammzellen, außerdem dadurch gekennzeichnet, dass ihnen Zelloberflächenmarker für CD45 und CD34 fehlen.

[0011] Bei einem weiteren Ausführungsbeispiel verwendet diese Erfindung einen Antikörper, hierin 8G1 genannt, von dem angenommen wird, dass er CD24 erkennt, was die Teilselektion zwischen Populationen von neuralen ZNS-Stammzellen (als 8G1^{-gering} gekennzeichnet) und Populationen von ZNS-Progenitorzellen (als 8G1⁺ gekennzeichnet) ermöglicht.

[0012] Die Erfindung stellt darüber hinaus gemäß den Verfahren der Erfindung erhältliche In-vitro-Zellkulturen und die Anwendung von erfindungsgemäß erhältlichen Zellpopulationen bei der Herstellung von Medikamenten zur Verwendung bei der Transplantation in ein Säugetier und Behandlung von Störungen des menschlichen zentralen Nervensystems bereit.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0013] [Fig. 1](#) ist ein Diagramm, das die Proliferation und Differenzierung einer NS-IC veranschaulicht.

[0014] [Fig. 2](#) ist eine Serie von Photographien, die zeigen, dass Neurosphärenkulturen aus einzelligen sortierten 5F3⁺-Zellen initiiert werden können.

[0015] [Fig. 3](#) ist eine Punktauftragung von fluoreszenzaktivierten Zellsortierungs-Daten (FACS-Daten), die die Isolierung von humanen neuralen ZNS-Stammzellen unter Verwendung von Zelloberflächenmarkern unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 5E12 zeigt.

[0016] [Fig. 4](#) ist eine Zwei-Feld-Punktauftragung von FACS-Sortierungsdaten, die die Isolierung von humanen neuralen Stammzellen durch Zelloberflächenmarker zeigt. Humane fötale Gehirnzellen wurden wie beschrieben enzymatisch dissoziiert. Feld A zeigt, dass 5F3⁺-Zellen das Antigen für den 5E12-Antikörper ko-exprimieren. Feld B zeigt, dass 5F3⁺-Zellen typischerweise nicht das Antigen für den 8G1-(CD24)-Antikörper exprimieren.

[0017] [Fig. 5](#) ist ein Diagramm, das die Verteilung von 5F3⁺-Zellen in fötalem Gehirn als eine Funktion des Schwangerschaftsalters zeigt.

[0018] [Fig. 6](#) ist eine Serie von Photographien, die Ergebnisse der Transplantation von humanen neuralen Zellen in eine NOD-SCID-Maus zeigt.

[0019] [Fig. 7](#) ist eine Serie von Photographien, die zeigen, dass die Nachkommen von 5F3⁺-sortierten Zellen durch den rostromigratorischen Strom (RMS) wandern, wenn sie in ein Nagetiermodell transplantiert werden.

[0020] [Fig. 8](#) ist eine Serie von Photographien, die zeigen, dass die Nachkommen von 5F3⁺-sortierten Zellen durch den rostromigratorischen Strom (RMS) in den Riechkolben wandern, wenn sie in ein Nagetiermodell transplantiert werden.

[0021] [Fig. 9](#) zeigt die Eigenschaften von AC133⁺-Zellen. **Fig. 9A** ist eine durchflusszytometrische Separation von frischen fötalen Gehirnzellen auf der Grundlage der AC133-Expression. Humane fötale Gehirnzellen wurden enzymatisch dissoziiert. Die Zellen wurden mit mAb gegen CD34, CD45 und AC133 angefärbt und in AC133⁻ und AC133⁺-Fraktionen separiert. Die restlichen hämatopoietischen und Endothelzellen wurden durch Ausschleusen von CD45⁻ bzw. CD34⁻ ausgeschlossen. Die sortierten AC133⁻ (**Fig. 9B**) und AC133⁺-Teilmengen (**Fig. 9C**) wurden im serumfreien Medium kultiviert und die Proliferation dieser sortierten Zellen wurde 15 Tage lang überwacht.

[0022] [Fig. 10](#) zeigt eine quantitative Analyse der NS-IC-Aktivität durch Grenzwertverdünnung und Einzelzell-sortierung. **Fig. 10A** ist eine quantitative der NS-IC-Aktivität durch Grenzwertverdünnung nach Zellsortierung. Sortierte Zellen wurden durch FACS-ACDU in Reihen von Grenzwertzell Dosen in 96-Well-Platten plattiert. **Fig. 10B** zeigt die klonale Expansion von neuronalen Stammzellen/Progenitorzellen. Neurosphären können aus einer einzelnen sortierten AC133⁺-Zelle, die direkt aus fötalem Gehirn isoliert wurde, oder aus einer einzelnen AC133⁺-Zelle aus sortierten/expandierten kultivierten Neurosphären abgeleitet werden. **Fig. 10C** zeigt die Differenzierungsfähigkeit von klonal abgeleiteten Neurosphärenzellen. Die Nachkommen von aus einzelnen Zellen abgeleiteten Neurosphären können in Neuronen (β -Tubulin, grün) und Astrozyten (GFAP, rot) differenziert werden.

[0023] [Fig. 11](#) (nicht-illustrativer Test) zeigt die Erfassung von humanen neuronalen Zellen an nicht-neurogenen Stellen. In einigen Fällen (die keinen Teil der Erfindung bilden) wurden humane neurale Zellen, die in neonatale Gehirne von NOD-SCID-Mäusen injiziert wurden, im Corpus callosum, den zerebralen Kortex und dem Zerebellum festgestellt.

[0024] [Fig. 12](#) (nicht-illustrativer Test) zeigt die In-vivo-Langzeit-Proliferation von Nachkommen von transplantierten humanen Neurosphärenzellen in der SVZ von NOD-SCID-Mäusen. AC133⁺-sortierte/expandierte humane Neurosphärenzellen wurden in die lateralen Ventrikel von neonatalen NOD-SCID-Mäusen transplantiert. Das Anwachsen von humanen Zellen wurde 7 Monate nach der Transplantation analysiert. **Fig. 12A** ist ein schematisches Diagramm von adultem Mausgehirn. In dem Diagramm sind Stellen angegeben, an denen das Anwachsen von humanen Zellen beobachtet wurde. SVZ, subventrikuläre Zone; rostromigratorischer Strom. **Fig. 12B** zeigt die Erfassung von humanen neuronalen Zellen in der SVZ. Ein Sagittalschnitt des transplantierten Mausgehirns wurde mit Anti-Human-Zellkern-Antigen (FITC, grün) und GFAP (Cy-5, blau) angefärbt. **Fig. 12C** zeigt die Erfassung von proliferierenden humanen neuronalen Zellen in der SVZ. Der Sagittalschnitt des transplantierten Mausgehirns wurde mit Anti-Human-Zellkern-Antigen (FITC, grün), Ki67 (Cy-3, rot) und GFAP (Cy-5, blau) angefärbt. Die meisten human-zellkern-antigen-positiven Zellen in der SVZ ko-exprimierten auch den Proliferationsmarker Ki67. Die Transplantation von humanen Neurosphärenzellen in die lateralen Ventrikel von neonatalen NOD-SCID-Mäusen bildet keinen Teil der vorliegenden Erfindung. (Siehe auch die [Fig. 13](#) und [Fig. 14](#) unten).

[0025] [Fig. 13](#) (nicht-illustrativer Test) zeigt die In-vivo-Migration und -Differenzierung von transplantierten humanen Neurosphärenzellen im RMS und im Riechkolben. AC133⁺-sortierte/expandierte humane Neurosphärenzellen wurden in die lateralen Ventrikel von neonatalen NOD-SCID-Mäusen transplantiert. Das Anwachsen von humanen Zellen wurde 7 Monate nach der Transplantation analysiert. **Fig. 13A** zeigt, dass die Nachkommen von AC133⁺-sortierten/expandierten Zellen durch den RMS wandert. Im RMS war die Reihe der Human-Zellkern-Antigen⁺-Zellen auch positiv mit Hoechst 33234-Gegenfärbung (rosa) (i). Die human-zellkern-antigen-positiven Zellen (Cy-3, rot) im RMS wurden mit der β -Tubulin-Expression (Alexia 488, grün) ko-lokalisiert (ii). Bei einem anderen Schnitt wurden Zellen im RMS mit humanspezifischem N-CAM (FITC, grün) und GFAP (Cy-5, blau) angefärbt (iii). **Fig. 13B** zeigt die Migration und die Differenzierung von humanen neuronalen Zellen im Riechkolben. Im Riechkolben wurden die human-zellkern-antigen-positiven Zellen in der glomerulären Schicht des Riechkolbens (i und ii) verteilt. In einigen Fällen wurden humane N-CAM⁺ neurale Zellen erfasst (iii).

[0026] [Fig. 14](#) (nicht-illustrativer Test) zeigt die In-vivo-Langzeit-Proliferation und die Differenzierung von transplantierten humanen Neurosphärenzellen im Gyrus dentatus des Hippokampus. AC133⁺-sortierte/expandierte

dierte humane Neurosphärenzellen wurden in die lateralen Ventrikel von neonatalen NOD-SCID-Mäusen transplantiert. Nach 7 Monaten nach der Transplantation von AC133⁺-sortierten/expandierten humanen Neurosphärenzellen in die lateralen Ventrikel von neonatalen NOD-SCID-Mäusen können proliferierende humane Zellen im Hippokampus gefunden werden. **Fig. 14A** zeigt die Erfassung von proliferierenden humanen neuronalen Zellen in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus. Der Sagittalschnitt des transplantierten Mausgehirns wurde mit Anti-Human-Zellkern (FITC, grün), Ki67 (Cy-3, rot) und GFAP (Cy-5, blau) angefärbt. Einige human-zellkern-antigen-positiven Zellen wurden mit Ki67 angefärbt (Pfeil). **Fig. 14B** zeigt die Erfassung von humanen Neuronen im Gyrus dentatus. Der Sagittalschnitt des transplantierten Mausgehirns wurde mit Anti-Human-Zellkern-Antigen (Cy-3, rot) und β -Tubulin (Alexia 488, grün) angefärbt. Eine der zwei human-zellkern-antigen-positiven Zellen war auch positiv für β -Tubulin (Pfeil).

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0027] Innerhalb des adulten Zentralnervensystems (ZNS) existiert eine Zellpopulation, die in ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung und die differenzierten reifen Zellphänotypen des adulten ZNS zu produzieren, Stammzelleigenschaften zeigt. Diese Stammzellen werden überall im ZNS und insbesondere in den subventrikulären Bereichen und im Gyrus dentatus des Hippokampus gefunden.

[0028] Auf Wachstumsfaktoren ansprechende Stammzellen können aus vielen Bereichen der Neuraxis und in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von Maus-, Nager- und Human-ZNS-Gewebe isoliert werden. Diese Zellen variieren in ihrer Reaktion auf Wachstumsfaktoren, wie etwa EGF, basisches FGF (bFGF, FGF-2) und transformierender Wachstumsfaktor Alpha (TGF α), und können für lange Zeitdauern in einem undifferenzierten Zustand in Kultur bewahrt und expandiert werden. Sowohl adulte als auch embryonische murine Progenitorzellen reagieren auf EGF und wachsen als Sphären undifferenzierter Zellen. Diese Zellen zeigen insoweit die Eigenschaften von Stammzellen, dass sie multipotent sind und unter Serum enthaltenden Bedingungen in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren sowie eine Subpopulation aufrechterhalten können, die undifferenziert bleibt und fortführt, unter EGF-Verabreichung zu proliferieren. Murine, auf EGF ansprechende Progenitorzellen exprimieren in vitro mRNA für den EGF-Rezeptor. Humane neurale ZNS-Stammzellkulturen sind ebenfalls identifiziert worden. Die Identifizierung, die Kultur, die Zucht und die Verwendung von neuronalen Säugetierstammzellen, einschließlich humanen, entweder als Suspensionskulturen oder als adhärenente Kulturen, wird bei Weiss et al., US-Patent 5,753,376, und Weiss et al., US-Patent 5,851,832 offenbart. Desgleichen bezieht sich Johe, US-Patent 5,753,506, auf adhärenente neurale ZNS-Stammzellkulturen. Wenn sie in Suspension kultiviert werden, bilden neurale ZNS-Stammzellkulturen typischerweise Neurosphären.

[0029] **Fig. 1** zeigt die Proliferation einer NS-IC, wie sie sich in eine Neurosphäre entwickelt, und die anschließende Differenzierung in neuronale und Glia-Phänotypen sowie die Erzeugung einer Nachkommen-NS-IC. In der Gegenwart eines oder mehrerer die Proliferation induzierender Wachstumsfaktoren teilt sich die NS-IC und ergibt eine Sphäre von undifferenzierten Zellen, die aus mehreren Stammzellen und Progenitorzellen zusammengesetzt ist (eine „Neurosphäre“). Wenn die klonal erhaltene Neurosphäre dissoziiert und als einzelne Zellen ausplattiert wird, kann jede NS-IC in der Gegenwart eines oder mehrerer die Proliferation induzierender Wachstumsfaktoren eine neue Neurosphäre erzeugen. Die Zellen einer einzelnen Neurosphäre sind klonaler Natur, weil sie die Nachkommen einer einzelnen neuronalen Stammzelle sind. In der fortdauernden Gegenwart eines die Proliferation induzierenden Wachstumsfaktors, wie etwa EGF oder dergleichen, fahren die Precursorzellen innerhalb der Neurosphäre fort, sich zu teilen, was zu einer Zunahme der Größe der Neurosphäre und der Zahl von undifferenzierten neuronalen Zellen führt. Die Neurosphäre ist nicht immunreaktiv für saures Gliafaserprotein (GFAP, ein Marker für Astrozyten), Neurofilament (NF, ein Marker für Neuronen), neuronspezifische Enolase (NSE, ein Marker für Neuronen) oder basisches Myelinprotein (MBP, ein Marker für Oligodendrozyten). Allerdings sind Zellen innerhalb der Neurosphäre immunreaktiv für Nestin, ein Intermediärfilamentprotein, das in vielen Typen von undifferenzierten ZNS-Zellen gefunden wird (Lehndahl et al., 60 Cell 585–595 (1990)). Um Nestin zu identifizieren, sind Antikörper erhältlich, einschließlich des Ratten-Antikörpers, der als Rat401 bezeichnet wird. Wenn die Neurosphären unter Bedingungen kultiviert werden, die eine Differenzierung ermöglichen, differenzieren die Progenitorzellen zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten. Die reifen Phänotypen, die mit den differenzierten Zelltypen in Verbindung stehen, die von der neuronalen Stammzellnachkommenschaft abgeleitet sein können, sind überwiegend negativ für den Nestin-Phänotyp.

[0030] Die Terminologie, die für undifferenzierte, multipotente, selbsterneuernde, neurale Zellen verwendet wird, hat sich derart entwickelt, dass diese Zellen nun „neurale Stammzellen“ bezeichnet werden. Eine neurale Stammzelle ist eine klonogene multipotente Stammzelle, die in der Lage ist, sich zu teilen, und unter geeigneten Bedingungen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung für NS-IC aufweist und in ihrer Nachkommenschaft Tochterzellen enthalten kann, die schließlich in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren können.

Folglich ist die neurale Stammzelle „multipotent“, weil die Stammzellnachkommen mehrere Differenzierungswege besitzen. Eine neurale Stammzelle ist zur Selbsterhaltung fähig, was bedeutet, dass mit jeder Zellteilung eine Tochterzelle im Durchschnitt eine Stammzelle sein wird.

[0031] Die Nicht-Stammzellnachkommen einer Stammzelle werden typischerweise als „Progenitor“-Zellen bezeichnet, die in der Lage sind, zu verschiedenen Zelltypen innerhalb einer oder mehrerer Linien zu führen. Der Begriff „neurale Progenitorzelle“ bezieht sich auf eine undifferenzierte Zelle, die von einer neuronalen Stammzelle abstammt und selbst keine Stammzelle ist. Einige Progenitorzellen können Nachkommen erzeugen, die in der Lage sind, in mehr als einen Zelltyp zu differenzieren. Beispielsweise ist eine O-2A-Zelle eine Glia-Progenitorzelle, die zu Oligodendrozyten und Typ-II-Astrozyten führt, und könnte daher als eine „bipotente“ Progenitorzelle bezeichnet werden. Ein Unterscheidungsmerkmal einer Progenitorzelle ist, dass sie anders als eine Stammzelle keine Selbsterhaltung zeigt, und man glaubt, dass sie typischerweise auf einen bestimmten Pfad der Differenzierung festgelegt ist und unter bestimmten Bedingungen schließlich in Glia oder Neuronen differenzieren wird.

[0032] Der Ausdruck „Precursorzellen“ bezieht sich auf die Nachkommen von neuronalen Stammzellen und schließen daher sowohl Progenitorzellen als auch neurale Tochterstammzellen ein.

[0033] Zellmarker. Diese Erfindung sieht die Identifizierung, Isolierung, Anreicherung und Kultur von neuronalen Stammzellen vor, die in der Lage sind, Neurosphären zu bilden (NS-IC). NS-IC werden über die Bindung von Antigenen, die auf den Oberflächen von NS-IC gefunden werden, an Reagenzien, die das Zelloberflächenantigen spezifisch binden, identifiziert oder selektiert.

[0034] Eines dieser Antigene ist ein Antigen, das an den monoklonalen AC133-Antikörper bindet. Der AC133-Antikörper (hierin als der 5F3-Antikörper bezeichnet) ist exemplarisch für Antikörperausführungen von Reagenzien, die einen humanen Zellmarker erkennen, der Prominin genannt wird. Prominin ist ein polytopes Membranprotein, das in verschiedenen Epithelzellen exprimiert wird (Weigmann et al., 94 (23) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 12425–30 (1997); Corbeil et al., 112 (Pt 7) J. Cell. Sci. 1023–33 (1999); Corbeil et al., 91 (7) Blood 2625–6 (1998); Miriglia et al., 91 (11) Blood 4390–1 (1998)). Im US-Patent Nr. 5,843,333 werden verschiedene AC133-Antikörper beschrieben. Bei der American Type Tissue Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville Md. 20852, wurde am 24. April 1997 eine Hinterlegung der murinen Hybridomzelllinie AC133 vorgenommen und mit der ATCC-Kennzeichnung HB12346 versehen. Diese AC133-Antikörper sind bei dieser Erfindung zur Immunselektion für die Teilmenge menschlicher Zellen von Interesse tauglich. Bevorzugte monoklonale AC133-Antikörper können von Miltenyi Biotec Inc. (Auburn CA) kommerziell erhalten werden, einschließlich AC133/1-PE-Antikörper (Katalog-Nr. 808-01) und AC133/2-PE-Antikörper (Katalog-Nr. 809-01). Für die MACS-Separation wird eine 50:50-Mischung der monoklonalen Antikörper bevorzugt. Die hohe Gewebespezifität der AC133-Expression ist besonders vorteilhaft während der Anreicherung nach hochreinen NS-IC-Populationen.

[0035] 5E12 ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen enzymatisch dissoziierte humane fötale Gehirnzellen erzeugt wurde. Der monoklonale 5E12-Antikörper wurde im Wesentlichen nach dem kontralateralen Immunisierungsverfahren erzeugt, das bei Yin, US-Patent 5,843,633, beschrieben wird. Das Antigen, an das 5E12 bindet, besitzt ein mutmaßliches Molekulargewicht von 125 kD und wird derzeit für ein eindeutiges Antigen von Prominin gehalten.

[0036] CD45 ist das allgemeine T200/Leukozyten-Antigen. Antikörper für CD45 sind kommerziell erhältlich. Bei einem bevorzugten Ausführungsbeispiel sind die Zellen der Erfindung und die Kulturen, die diese enthalten, zusätzlich dadurch gekennzeichnet (zusätzlich dazu, dass sie promininin-positiv sind), dass ihnen Zelloberflächenmarker wie CD45 fehlen.

[0037] CD34 ist auch als gp105-120 bekannt. Monoklonale Antikörper für CD34 sind kommerziell erhältlich und monoklonale CD34-Antikörper sind verwendet worden, um lymphohämatopoietische Stamm-/Progenitorzellen für die Forschung und zur klinischen Knochenmarktransplantation zu quantifizieren und zu reinigen.

[0038] Vom monoklonalen Antikörper 8G1 nimmt man an, dass er CD24 erkennt (Antikörper für CD24 sind kommerziell erhältlich) und spezifisch mit der Kette von 515 Kilodalton von humanem LRP/A2MR reagiert, welches in einem beschränkten Spektrum von Zelltypen exprimiert wird. Eine starke immunhistochemische Reaktion wird bei Hepatozyten, Gewebemakrophagen, Teilmengen von Neuronen und Astrozyten im Zentralnervensystem, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und von Monozyten abgeleiteten Schaumzellen bei atherosklerotischen Läsionen in der Arterienwand festgestellt. Der Antikörper kann auch für die Charakterisierung einer Teil-

menge von myelomonozytischen Subtypen von chronischer und akuter Leukämie (CD91) verwendet werden. Antikörper für CD91 sind kommerziell erhältlich.

[0039] Zellhinterlegung. Die beanspruchten 5E12.5- und 8G1.7-Kulturen sind unter Bedingungen hinterlegt, die sicherstellen, dass der Zugriff auf die Kulturen während des Schwebens der Patentanmeldung, die sie offenbart, für einen vom Kommissar für Patente und Warenzeichen Bestimmten möglich ist, der darauf unter 37 C. F. R. § 1.14 und 35 U. S. C. § 122 anspruchsberechtigt ist. Die Hinterlegungen sind zugänglich, soweit es durch fremde Patentgesetze in Ländern erforderlich ist, in denen Kopien der beanspruchten Anmeldungen oder ihre Abkömmlinge eingereicht werden. Die Zugänglichkeit einer Hinterlegung stellt jedoch keine Erlaubnis zum Gebrauch der beanspruchten Erfindung bei Schmälerung der durch staatliches Handeln eingeräumten Patentrechte dar.

[0040] Darüber hinaus werden die Hinterlegungen der beanspruchten 5E12.5- und 8G1.7-Kulturen im Einklang mit den Vorschriften des Budapester Vertrags für die Hinterlegung von Mikroorganismen aufbewahrt und der Öffentlichkeit zugänglich gemacht, d. h. sie werden mit aller Sorgfalt aufbewahrt, die nötig ist, um sie eine Zeitdauer von wenigstens 30 Jahren nach dem Datum der Hinterlegung oder für die durchsetzbare Laufzeit irgendeines Patents, das die Offenlegung der Kulturen behandeln kann, plus 5 Jahre nach der letzten Anfrage nach einer Probe aus der Hinterlegung lebensfähig und unkontaminiert gehalten. Der Hinterleger erkennt die Pflicht an, die Hinterlegungen auszutauschen, wenn die Hinterlegungsstelle infolge der Bedingungen der Hinterlegungen nicht in der Lage sein sollte, bei Anforderung eine Probe beizubringen. Alle Beschränkungen der Verfügbarkeit der Hinterlegungen der beanspruchten Kulturen für die Öffentlichkeit werden bei Gewährung eines sie offenbarenden Patents unwiderruflich beseitigt.

[0041] Isolierung, Anreicherung und Selektion von Zellen. Die Population von Zellen, aus der NS-IC isoliert werden, kann ein neurales Gewebe, eine Population von Zellen, die vom neuralen Gewebe dissoziiert ist oder eine Population von Zellen in einer Zellkultur sein, beispielsweise in einer Neurosphärenkultur oder einer adhärennten neuralen Stammzellkultur.

[0042] Die Erfindung sieht die Isolierung und Identifizierung von NS-IC vor. Die Identifizierung einer Neurosphären initiiierenden Stammzelle (NS-IC) schließen das in Kontakt bringen einer Population von neuronalen Zellen (oder eine, die neurale oder neural abgeleitete Zellen enthält) mit einem Reagenz, das an AC133-Antigen bindet, und Ermitteln des Kontakts zwischen dem Reagenz, das an AC133-Antigen bindet, und dem AC133-Antigen auf der Oberfläche von Zellen ein. Jene Zellen, an die das Reagenz bindet, werden als NS-IC identifiziert. Die Identität jener Zellen kann durch Tests bestätigt werden, um zu demonstrieren, dass die Zellen tatsächlich NS-IC sind, die in der Lage sind, Neurosphären zu initiieren, sich selbst zu erneuern und multipotent sind.

[0043] Die Verfahren dieser Erfindung können auch verwendet werden, um unter Verwendung eines AC133-Antikörpers AC133⁺-Zellen von AC133⁻-Zellen zu isolieren, durch Kombinieren einer Population von neuronalen Zellen, die eine Fraktion von NS-IC enthält, mit einem Reagenz, das spezifisch an AC133-Antigen bindet, und dann Selektieren nach AC133⁺-Zellen, um eine selektierte Population herzustellen, die im Vergleich zur Population von neuronalen Zellen vor der Selektion auf AC133⁺-NS-IC angereichert ist.

[0044] Demgemäß sieht die Erfindung die Anreicherung von NS-IC aus neuralem Gewebe oder neuronalen Stammzellkulturen (beispielsweise Neurosphärensuspensionskulturen oder adhärennte Kulturen von neuronalen Stammzellen) vor. Die Erfindung ist demnach zur Anreicherung von NS-IC aus neuralem Gewebe verwendbar, in dem Stammzellen und Progenitorzellen mit geringer Häufigkeit auftreten, oder das angereichert worden ist, wie etwa fötales, jugendliches oder adultes Gewebe. Ein Fachmann kann eine Population neuraler Zellen, die eine Fraktion von NS-IC enthält, mit einem Reagenz kombinieren, das spezifisch an AC133-Antigen bindet, und nach den AC133⁺-Zellen selektieren. Auf diese Weise werden die AC133⁺-Zellen in den Fraktionen von NS-IC im Vergleich zur Population von neuronalen Zellen angereichert.

[0045] Die Zellselektion kann irgendein im Fachgebiet bekanntes geeignetes Mittel sein, einschließlich Durchflusszytometrie, wie etwa fluoreszenzaktivierte Zellsortierung unter Verwendung eines mit Fluorochrom konjugiertem AC133-Antikörper. Die Selektion kann auch Hochgradientenmagnetselektion unter Verwendung von an Magneteilchen konjugiertem AC133-Antikörper sein. Zudem wird innerhalb des Umfangs der Erfindung jedes andere geeignete Verfahren, das die Bindung an und Ablösung von fester Phase einschließt, ins Auge gefasst.

[0046] Ein Fachmann kann die Population von Zellen durch Immunselektion unter Verwendung eines

AC133-Antikörpers erlangen. Die Population von Zellen sollte wenigstens 30% AC133⁺-NS-IC, vorzugsweise wenigstens 50 bis 70% AC133⁺-NS-IC, und noch besser mehr als 90% AC133⁺-NS-IC enthalten. Am besten wäre eine im Wesentlichen reine Population von AC133⁺-NS-IC, umfassend wenigstens 95% AC133⁺-NS-IC. Der Grad an erzielter und tatsächlich verwendeter Anreicherung hängt von einer Anzahl von Faktoren ab, einschließlich dem Selektionsverfahren, dem Zuchtverfahren und der Zelldosis der Zellen, die zur Initiierung von Neurosphären in Kultur gegeben werden.

[0047] Die Population von Zellen können von fötalem, jugendlichem oder adultem Säugetier-Zentralnervensystemgewebe (ZNS-Gewebe) erhalten werden, oder es kann aus existierenden Kulturen von neuralen Stammzellen erhalten werden, wie es bei Weiss, US-Patent 5,750,376, oder Johe, US-Patent 5,753,506 beschrieben wird. Bei dem am meisten bevorzugten Ausführungsbeispiel sind die NS-IC human. Bei einigen Ausführungsbeispielen können die AC133⁺-Zellen in der Population an Endothelzellen komplexiert sein.

[0048] Die hierin beschriebenen In-vitro-Zellkulturen, die eine angereicherte Population von AC133⁺-NS-IC enthalten, sind im Allgemeinen dadurch gekennzeichnet, dass die Kulturen positiv für Nestin färben und in der Gegenwart von Differentiation induzierenden Bedingungen, Nachkommenzellen produzieren, die in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren.

[0049] Ein Fachmann kann eine isolierte AC133⁺-Zelle in ein Kulturmedium einbringen, die isolierte AC133⁺-Zelle in Kultur proliferieren, insbesondere als eine Neurosphäre, die Nachkommenschaft der isolierten AC133⁺-Zelle unter Bedingungen kultivieren, bei denen die isolierte AC133⁺-Zelle zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten differenziert, dann das Vorhandensein von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten ermitteln. Das Vorhandensein von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten kennzeichnet die isolierte AC133⁺-Zelle als eine NS-IC.

[0050] Typischerweise werden AC133⁺-NS-IC in einem Medium kultiviert, das das Wachstum und die Proliferation von Neurosphären ermöglicht. Die Kultur, in der die isolierte AC133⁺-Zelle proliferiert, kann ein serumfreies Medium sein, das einen oder mehrere bestimmte Wachstumsfaktoren enthält, die zum Induzieren multipotenter neuraler Stammzellproliferation effektiv ist. Das Kulturmedium kann mit einem Wachstumsfaktor ergänzt sein, der aus Leukozyten inhibierendem Faktor (LIF), epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF-2; bFGF) oder einer Kombination daraus ausgewählt ist. Das Kulturmedium kann darüber hinaus mit neuralem Überlebensfaktor (NSF) (Clonetics, CA) ergänzt sein. Die Bedingungen, bei denen die AC133⁺-Zelle zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten differenziert, können Kultivieren der AC133⁺-Zellnachkommen auf einer mit Laminin beschichteten Oberfläche in einem Kulturmedium sein, das fötales Rinderserum (FBS) ohne EGF, EGF-2 oder LIF enthält.

[0051] Die Erfindung stellt darüber hinaus ein Verfahren zum Identifizieren der Anwesenheit eines Wachstumsfaktors bereit, der das Wachstum von NS-IC beeinträchtigt. Ein Fachmann kombiniert eine Mischung, die unter Verdacht steht, wenigstens einen Wachstumsfaktor zu enthalten, der das Wachstum von NS-IC beeinträchtigt, mit einer Mischung, die NS-IC enthält, bestimmt dann das Wachstum der NS-IC als eine Funktion der Gegenwart der Mischung. Verändertes (gesteigertes, verringertes etc.) NS-IC-Wachstum indiziert die Gegenwart eines Wachstumsfaktors in der Mischung, der das Wachstum von NS-IC beeinträchtigt. Man kann dann darüber hinaus den Wachstumsfaktor identifizieren.

[0052] Antikörper für AC133. Antikörper für AC133 können wie im US-Patent 5,843,633 diskutiert erhalten oder hergestellt werden. Das AC133-Antigen kann mit einem Antikörper in Kontakt gebracht werden, wie etwa verschiedene monoklonale AC133-Antikörper, die Spezifität für das AC133-Antigen aufweisen. Ein AC133-Antikörper ist dadurch gekennzeichnet, dass er unter Western-Blot-Bedingungen aus reduzierenden SDS-PAGE-Gelen an das AC133-Protein bindet. Das AC133-Antigen weist auf der Grundlage von kommerziell erhältlichen Standards ein Molekulargewicht im Bereich von etwa 117 kDa auf. Das AC133-Antigen wird auf einer Teilmenge von aus humanem Knochenmark, fötalem Knochenmark und Leber, Nabelschnurblut und adultem peripherem Blut stammenden Progenitorzellen exprimiert.

[0053] Antikörper für AC133 können durch Immunisieren eines xenogenen immunkompetenten Säugetierwirts (einschließlich murine, Rodentia, Lagomorpha, ovine, porcine, bovine etc.) mit humanen Progenitorzellen erhalten werden. Die Wahl eines bestimmten Wirts ist primär eine der Bequemlichkeit. Eine geeignete Progenitorzellpopulation zur Immunisierung kann durch Isolieren von CD34⁺-Zellen aus mit Zytokin mobilisiertem peripherem Blut, Knochenmark, fötaler Leber etc. erhalten werden. Eine geeignete Progenitorzellpopulation zur Immunisierung kann aus neuralen ZNS-Stammzellen oder anderen NS-IC erhalten werden. Die Immunisierungen werden gemäß herkömmlicher Techniken ausgeführt, wobei die Zellen subkutan, intramuskulär, intraperi-

toneal, intravaskulär etc. injiziert werden können. Normalerweise werden etwa 10^6 bis 10^8 Zellen verwendet, die in 1 oder mehrere Injektionen, üblicherweise nicht mehr als 8 Injektionen, über einen Zeitraum von etwa einer bis drei Wochen unterteilt werden kann. Die Injektionen können mit oder ohne Hilfsstoff erfolgen, beispielsweise vollständiges oder unvollständiges Freund's Adjuvans, Specol, Alum etc.

[0054] Nach Vervollständigung des Immunisierungsplans kann das Antiserum gemäß herkömmlicher Wege gewonnen werden, um polyklonale Antisera bereitzustellen, die für die Oberflächenmembranproteine der Progenitorzellen, einschließlich dem AC133-Antigen, spezifisch sind. Lymphozyten werden aus dem geeigneten Lymphgewebe, beispielsweise Milz, drainierenden Lymphknoten etc, gewonnen und mit einem geeigneten Fusionspartner fusioniert, üblicherweise einer Myelomlinie, wodurch ein Hybridom produziert wird, das einen spezifischen monoklonalen Antikörper sezerniert. Das Screening von Hybridomklonen auf die antigenische Spezifität von Interesse wird gemäß herkömmlichen Verfahren ausgeführt.

[0055] AC133-Antikörper können anstelle der normalen multimeren Struktur als eine einzelne Kette produziert werden. Einzelkettenantikörper sind bei Jost et al., J. Biol. Chem. 26267-73 (1994), und anderen beschrieben. DNA-Sequenzen, die den variablen Bereich der schweren Kette und den variablen Bereich der leichten Kette kodieren, werden an einen Spacer ligiert, der wenigstens etwa 4 Aminosäuren von kleinen Aminosäuren kodiert, einschließlich Glycin oder Serin. Das Protein, das durch diese Fusion kodiert wird, ermöglicht den Aufbau eines funktionell variablen Bereichs, der die Spezifität und Affinität des ursprünglichen Antikörpers bewahrt.

[0056] AC133-Antikörper können unter Verwendung von Ig-cDNA zur Konstruktion von chimären Immunglobulin-Genen produziert werden (Liu et al., 84 Proc. Natl. Acad. Sci. 3439 (1987) und 139 J. Immunol. 3521 (1987)). mRNA wird aus einer Hybridom- oder einer anderen Zelle isoliert, die den Antikörper produziert, und verwendet, um cDNA zu produzieren. Das cDNA von Interesse kann durch Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung spezifischer Primer amplifiziert werden (US-Patente 4,683,195 und 4,683,202). Alternativ wird eine Bibliothek hergestellt und gerastert, um die Sequenz von Interesse zu isolieren. Die DNA-Sequenz, die den variablen Bereich des Antikörpers kodiert, wird dann an humane Sequenzen des konstanten Bereichs fusioniert. Die Gene der Sequenzen der humanen konstanten Bereiche können bei Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest" NIH-Veröffentlichung Nr. 91-3242 (1991) gefunden werden. Humane C-Bereichs-Gene sind leicht aus bekannten Klonen erhältlich. Der chimäre humanisierte Antikörper wird dann durch herkömmliche Verfahren exprimiert.

[0057] AC133-Antikörper können als Antikörperfragmente hergestellt werden, wie etwa als Fv, $F(ab')_2$ und Fab. Antikörperfragmente können durch Spaltung des intakten Proteins, beispielsweise durch Protease oder chemische Spaltung, hergestellt werden. Alternativ wird ein verkürztes Gen entworfen. Beispielsweise würde ein chimäres Gen, das einen Teil des $F(ab')_2$ -Fragments kodiert, DNA-Sequenzen enthalten, die die CH1-Domäne und den Gelenkbereich der H-Kette, gefolgt von einem translationalen Stop-Kodon, kodieren, um das gekürzte Molekül zu ergeben.

[0058] Immunfärbung. Biologische Proben werden durch irgendein herkömmliches Immunassay-Verfahren auf die Gegenwart von Zellen, die das Oberflächenmolekül exprimieren, das durch die beanspruchten Antikörper gebunden wird, auf die Anwesenheit von AC133⁺-Zellen getestet. Die Tests können an Zelllysaten, intakten Zellen, Gefrierschnitten etc. ausgeführt werden. Die Antikörper, die von Miltenyi Biotec Inc. (Auburn CA) erhältlich sind, sind für die direkte Immunfluoreszenzfärbung von Zellen geeignet.

[0059] Zellsortierung. Die Verwendung von Zelloberflächenantigenen für NS-IC-Zellen stellt ein Mittel für die positive Immunselektion von Progenitorzellpopulationen sowie für die Phänotypanalyse von Progenitorzellpopulationen unter Verwendung von Durchflusszytometrie bereit. Für die Expression von AC133-Antigen selektierte Zellen können darüber hinaus durch Selektion nach anderen Stammzell- und Progenitorzellmarker gereinigt werden.

[0060] Für die Herstellung von im Wesentlichen reinen Progenitor- und Stammzellen wird eine Teilmenge von Progenitorzellen auf der Grundlage der AC133-Bindung von anderen Zellen abgetrennt. Progenitor- und Stammzellen können darüber hinaus durch Bindung an andere in Fachgebiet bekannte Oberflächenmarker weiter abgetrennt werden.

[0061] Prozeduren zur Abtrennung können magnetische Separation unter Verwendung von mit Antikörpern beschichteten Magnetic Beads, Affinitätschromatographie und „Panning“ mit an eine feste Matrix, beispielsweise eine Platte, gebundenen Antikörpern oder eine andere zweckmäßige Technik einschließen. Techniken,

die eine akkurate Separation bieten, schließen fluoreszenzaktivierte Zellsortierer ein, die einen unterschiedlichen Grad an Komplexität aufweisen können, wie etwa Mehrfarbkanäle, Kleinwinkel- und Stumpfwinkel-Streuungs-Detektionskanäle, Impedanzkanäle, etc. Tote Zellen können durch Selektion mit Farbstoffen eliminiert werden, die mit toten Zellen assoziiert sind (Propidiumiodid [PI], LDS). Es kann jede Technik eingesetzt werden, die nicht übermäßig nachteilig auf die Lebensfähigkeit der selektierten Zellen ist.

[0062] Herkömmlicherweise werden die Antikörper mit Markierungen konjugiert, u eine leichtere Separation des einzelnen Zelltyps zu ermöglichen, beispielsweise Magnetic Beads, Biotin, welcher mit hoher Affinität an Avidin oder Streptavidin, Fluorochrome, die mit einem fluoreszenzaktivierten Zellsortierer verwendet werden können, Haptene und dergleichen bindet. Mehrfarbenanalyse kann mit der FACS oder in Kombination von immunmagnetischer Separation und Durchflusszytometrie eingesetzt werden. Mehrfarbenanalyse ist für die Separation von Zellen auf der Grundlage von mehreren Oberflächenantigenen, beispielsweise AC133⁺ CD45⁻, AC133⁻ CD34⁻ etc. von Interesse. Fluorochrome, die bei einer Mehrfarbenanalyse Verwendung finden, schließen Phycobiliproteine, beispielsweise Phycoerythrin und Allophycocyanine, Fluorescein und Texas-Rot ein. Eine negative Angabe indiziert, dass der Färbungspegel bei der Helligkeit einer isotyp abgestimmten negativen Kontrolle oder darunter liegt. Eine dunkle Angabe indiziert, dass der Färbungspegel nahe dem Pegel einer negativen Färbung liegt, aber auch heller als eine isotyp abgestimmte Kontrolle sein kann.

[0063] Bei einem Ausführungsbeispiel ist der AC133-Antikörper direkt oder indirekt an ein magnetisches Reagenz konjugiert, wie etwa ein superparamagnetisches Mikropartikel (Mikropartikel). Eine direkte Konjugation an ein magnetisches Teilchen wird durch Verwendung verschiedener chemischer Verlinkungsgruppen erreicht, wie sie im Fachgebiet bekannt sind. Antikörper können über Seitenketten-Amino- oder -Sulfhydryl-Gruppen und heterofunktionelle Vernetzungsreagenzien an die Mikropartikel gebunden werden. Zur Verlinkung an Funktionseinheiten ist eine große Zahl von heterofunktionalen Verbindungen erhältlich. Eine bevorzugte Verlinkungsgruppe ist 3-(2-Pyridyldithio)-propionsäure-N-hydroxysuccinimidester (SPDP) oder 4-(N-Maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylsäure-N-hydroxysuccinimidester (SMCC) mit einer reaktiven Sulfhydrylgruppe am Antikörper und einer reaktiven Aminogruppe am magnetischen Teilchen.

[0064] Alternativ wird AC133-Antikörper indirekt an magnetische Teilchen gekuppelt. Der Antikörper wird direkt an ein Hapten konjugiert und haptenspezifische Antikörper zweiter Stufe werden an die Teilchen konjugiert. Geeignete Hapten schließen Digoxin, Digoxigenin, FITC, Dinitrophenyl, Nitrophenyl, Avidin, Biotin, etc. ein. Verfahren zum Konjugieren beispielsweise des Hapten an ein Protein sind im Fachgebiet bekannt und Kits für solche Konjugationen sind kommerziell erhältlich.

[0065] Um das Verfahren auszuführen, wird der AC133-Antikörper zu einer Zellprobe hinzugefügt. Die Menge an AC133-Antikörper, die nötig ist, um eine bestimmte Zellteilmenge zu binden, wird empirisch durch Ausführen Testseparation und Analyse bestimmt. Die Zellen und der AC133-Antikörper werden eine Zeitdauer inkubiert, die ausreicht, um Komplexe zu bilden, üblicherweise wenigstens etwa 5 min, besser wenigstens 10 min und üblicherweise nicht mehr als eine Stunde, besser nicht mehr als etwa 30 min.

[0066] Die Zellen können zusätzlich mit Antikörpern oder Bindungsmolekülen inkubiert werden, die spezifisch für Zelloberflächenmarker sind, die dafür bekannt sind, dass sie auf Progenitor- oder Stammzellen vorhanden oder nicht vorhanden sind.

[0067] Die markierten Zellen werden gemäß der speziellen Antikörperzubereitung separiert. Mit Fluorochromen markierten Antikörpern sind für FACS-Separation sinnvoll, magnetische Teilchen für Immunmagnetische Selektion, insbesondere Hochgradientenmagnetselektion (HGMS) etc. Exemplarische magnetische Separationsvorrichtungen werden in WO 90/07380, PCT/US96/00953 und EP 438520 beschrieben. Der AC133-Zellisoliationskit (Miltenyi Biotec Inc., Auburn CA) kann für die positive Selektion von AC133⁺-Zellen verwendet werden. Der Kit stellt ein Werkzeug für die Einzelschrittisolation von AC133⁺-Zellen bereit. Der AC133-Zellisoliationskit enthält FcR-Blockierungsreagenz und MACS kolloide MicroBeads, die mit monoklonalem Maus-Anti-Human-AC133-Antikörper konjugiert sind.

[0068] Die gereinigte Zellpopulation kann in irgendeinem geeigneten Medium gesammelt werden. Verschiedene Medien sind kommerziell erhältlich und können verwendet werden, einschließlich Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (dMEM), Hanks basischer Salzlösung (HBSS), Dulbeccos phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit 5 mM EDTA etc., häufig ergänzt mit fötalem Kälberserum (FCS), Rinderserumalbumin (BSA) humanem Serumalbumin (HSA) etc.

[0069] Stark auf humane Progenitor- oder Stammzellen angereicherte Populationen werden auf diese Art und

Weise erzielt. Die gewünschten Zellen werden 30% oder mehr dieser Zellzusammensetzung, vorzugsweise 50% oder mehr dieser Zellpopulation, besser 90% oder mehr der Zellpopulation und am besten 95% oder mehr (im Wesentlichen rein) der Zellpopulation betragen.

[0070] Verwendung gereinigter Stammzellen/Progenitorzellen. Die AC133⁺-Stammzellen/Progenitorzellen sind auf vielerlei Weise verwendbar. Die AC133⁺-Zellen können verwendet werden, um einen Wirt zu rekonstituieren, dessen Zellen durch eine Krankheit oder eine Verletzung verloren gegangen sind. Genetische Erkrankungen, die mit Zellen assoziiert sind, können durch genetische Modifikation von autologen oder allogenen Stammzellen behandelt werden, um einen genetischen Defekt zu korrigieren oder um zu behandeln, um vor der Krankheit zu schützen. Alternativ können normale allogene Progenitorzellen transplantiert werden. Andere Erkrankungen als jene, die mit Zellen assoziiert sind, können ebenso behandelt werden, wenn die Krankheit mit dem Fehlen eines bestimmten sezernierten Produkts in Verbindung steht, wie etwa einem Hormon, Enzym, Wachstumsfaktor oder dergleichen. ZNS-Störungen umfassen zahlreiche Gebrechen, wie etwa neurodegenerative Erkrankungen (beispielsweise Alzheimer und Parkinson), akute Gehirnverletzungen (beispielsweise Schlaganfall, Kopfverletzung, zerebrale Lähmung) und eine große Zahl von ZNS-Dysfunktionen (beispielsweise Depression, Epilepsie und Schizophrenie). In den vergangenen Jahren sind neurodegenerative Erkrankungen infolge der zunehmenden älteren Population, die für diese Störungen stark gefährdet ist, ein wichtiges Anliegen geworden. Diese Erkrankungen, die Alzheimersche Krankheit, Multiple Sklerose (MS), Huntingtonsche Krankheit, Amyotrophe Lateralsklerose und Parkinsonsche Krankheit einschließen, sind mit der Degeneration von neuronalen Zellen an bestimmten Stellen des ZNS in Verbindung gebracht worden, was zur Unfähigkeit dieser Zellen oder des Gehirnbereichs führt, ihre bestimmungsgemäße Funktion auszuführen. Dadurch, dass durch verschiedene spezifische Wachstumsfaktoren für die Reifung, Proliferation und Differenzierung in eine oder mehrere ausgewählte Linien gesorgt wird, können die Progenitorzellen als eine Quelle für determinierte Zellen verwendet werden. Neurosphären können auch verwendet werden, um eine Vielfalt von Blutzelltypen herzustellen, einschließlich Myeloid- und Lymphoidzellen sowie frühe hämatopoietische Zellen (siehe Bjornson et al., 283 Science 534 (1999)).

[0071] Die AC133⁺-Zellen können auch bei der Isolierung und Evaluierung von Faktoren verwendet werden, die mit der Differenzierung und Reifung von Zellen assoziiert sind. Demgemäß können die Zellen bei Tests verwendet werden, um die Aktivität von Medien zu bestimmen, wie etwa konditionierte Medien, Flüssigkeiten auf Wachstumsfaktoraktivität, Beteiligung mit Dedizierung von Linien oder dergleichen zu evaluieren.

[0072] Die AC133⁺-Zellen können bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs eingefroren und für lange Zeit gelagert werden, aufgetaut werden und sind in der Lage, wieder verwendet zu werden. Die Zellen werden üblicherweise in 5% DMSO und 95% fatalem Kälberserum gelagert. Einmal aufgetaut, können die Zellen unter Verwendung von Wachstumsfaktoren oder Bindegewebszellen, die mit der Stammzellproliferation und -differenzierung assoziiert sind, expandiert werden.

Beispiel 1: AC133 magnetische Zellsortierung (MACS) positiv selektierter fataler Gehirnzellen enthaltend Aktivität für Neurosphären initiiender Zellen (NS-IC)

[0073] AC133⁺-Zellen werden durch das folgende Verfahren hergestellt: Humanes fötales Gehirn (FBR 10. bis 20. Schwangerschaftswoche) wurden von Advanced Bioscience Resources, INC (Oakland, CA), nach Erhalt der Einverständniserklärung erhalten. Humanes fötales Gewebe wurde unter Verwendung von Skalpell in 1 bis 3 mm gewürfelte Stücke geschnitten, in 50 ml Zentrifugenröhrchen übertragen und einmal mit 0,02% EDTA/PBS-Lösung gewaschen. Die Gewebe wurden in der Gegenwart von Collagenase und Hyaluronidase 1 h lang bei 37°C enzymatisch dissoziiert. Ablagerungen und Aggregate wurden durch Filtern der Zellsuspensionen durch eine 70 Micron Filterschale entfernt.

[0074] AC133⁺ humane fötale Gehirnzellen wurden unter Verwendung paramagnetischer Antikörper-Microbeads, AC133/1 Zellisolutionskit (Kat.-Nr. 508-01, Miltenyi Biotec, Auburn, CA) separiert. MACS-Separationen wurden auf der Grundlage von dem Kit beigelegter Anweisungen ausgeführt. Bei einer repräsentativen Durchflusszytometrie-MACS-Separation aus einer typischen AC133⁺-Isolierung waren etwa 44% der Zellen AC133⁺ CD45⁻, während etwa 2% CD34⁺ waren (diese CD34⁺-Zellen waren Endothelzellen, die mit gereinigten NS-IC komplexiert waren).

[0075] Die selektierten AC133⁺-Zellen, die sich nach dem oben beschriebenen Verfahren ergaben (unter Verwendung von Gehirn in der 18. Schwangerschaftswoche), waren immer noch homogen. Die Zellen neigten dazu, Komplexe mit Endothelzellen zu bilden. Endothelzellen wurden als CD34⁺ oder CD105⁺ identifiziert. AC133-MACS-Separation reichert auch CD34⁺-Endothelzellen an, die mit AC133⁺-Zellen assoziiert sind.

(Nach Passage trennen sich die NS-IC von den komplexierten Endothelzellen ab und es können gereinigte NS-IC erhalten werden.) AC133-MACS-separierte Zellen wurden wie oben beschrieben in der Gegenwart von Medien kultiviert, die EGF, EGF-2 und LIF enthielten. Bei Vergleichsbeispielen waren Zellen aus Gehirn mit frühem Schwangerschaftsalter (5. bis 12. Schwangerschaftswoche, nicht-illustrativer Test) mit NS-IC angereichert und es war keine Anreicherung erforderlich, um Neurosphärenkulturen zu initiieren. Demgegenüber enthielten Zellen aus älteren fötalen Gehirnproben (16. bis 20. Schwangerschaftswoche) wesentlich weniger NS-IC-Aktivität und erforderten eine Anreicherung zum Initiieren von Neurosphärenkulturen. Mit anderen Worten, AC133⁺ ist sinnvoll für die Anreicherung von NS-IC aus Gehirngewebe von Menschen mit älterem Schwangerschaftsalter. AC133⁺-MACS-separierte Zellen aus fötalem Gehirn (18. Schwangerschaftswoche) wurden auf NS-IC-Aktivität angereichert, während die gesamten humanen fötalen Gehirnzellen (18. Schwangerschaftswoche) ohne AC133⁺-MACS-Separation versagten, Neurosphärenkulturen zu initiieren.

[0076] Aus AC133-MACS-Zellen gebildete Neurosphärenzellen exprimieren Nestin, wie nach ~ 7 Tagen in Kultur getestet und mit Kaninchen-Anti-Human-Nestin polyklonalem Antikörper ermittelt wurde. Beispielsweise exprimierten unter den Neurosphärenzellen, die von CytoTherapeutics (Providence, RI) erhältlich waren, FBR 1069 (18. Schwangerschaftswoche) und FBR 1070 (20. Schwangerschaftswoche) Nestin. Bei Induktion der Differenzierung könnten die AC133⁺-MACS-abgeleiteten Neurosphärenzellen in Neuronen und Astrozyten differenzieren, wie es durch β -Tubulinfärbung für Neuronen und GFAP-Färbung für Astrozyten ermittelt wurde. Bei diesem speziellen Differenzierungstest wurden Neurosphärenzellen auf einer mit Laminin beschichteten Oberfläche in der Gegenwart von 1% FBS und ohne EGF, EGF-2 und LIF kultiviert.

[0077] Um die Differenzierung von NS-IC zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten zu induzieren, können andere Differenzierungstests verwendet werden.

Beispiel 2: AC133 ist ein kritischer Zelloberflächenmarker, der auf Zellen aus Langzeitneurosphärenkultur exprimiert wird

[0078] Eine Langzeitneurosphärenkultur, 8.5 FBR, wurde von CytoTherapeutics Inc. (Providence, RI) erhalten. Die 8.5-FBR-Neurosphärenzellen exprimieren gleichmäßig AC133. Diese 8.5-FBR-Zellen sind auch Thy-1⁺, CD166⁺ und HLA-DR⁺. Wenn Ex Vivo 15 als Basalmedium verwendet wurde, wurde ein höherer Prozentsatz an Neurosphärenkulturen aus primärem Gehirngewebe der 18. Schwangerschaftswoche initiiert. Es war deshalb möglich, eine AC133⁺-Fraktion von Zellen bei der Entwicklung von Neurosphärenkulturen zu evaluieren. Der Anteil von AC133⁺-Zellen nahm zu, sowie sich die Neurosphären entwickelten. Wenn die Neurosphärenzellen einmal gut ausgebildet waren, exprimierten praktisch alle Neurosphären bildenden Zellen AC133.

Beispiel 3: Neurosphären initiiierende Zellen können unter Verwendung von monoklonalem Antikörper separiert werden; Durchflusszytometrie-Zellsortierungs-(FACS)-Ansatz

[0079] Der Zweck dieses Beispiels ist es zu testen, ob AC133⁺-Zellen die einzigen Zellen im Gehirn sind, die pluripotente NSC-Aktivität aufweisen. mAb gegen humanes CD45 wurde verwendet, um Blutzellkontamination in fötalem Gewebe auszuschließen. In einigen Fällen wurden mAb gegen humanes CD34 verwendet, um Endothelzellen und Endothel-neurale-Progenitor-Komplexe auszuschließen. Die fötalen Gehirnzellen wurden auf diese Weise als CD45⁻ CD34⁻ definiert. Um neurale Stammzellen und primitive Progenitoraktivitäten zu messen, wurde ein NS-IC-Test aufgebaut, um die Häufigkeit von NS-IC in einer gegebenen Population zu bestimmen. Wenn NS-IC selten sind und gleichmäßig AC133-Antigen exprimieren, können NS-IC durch AC133⁺-Selektion angereichert und entsprechend in anderen Fraktionen abgereichert werden.

[0080] Quelle für monoklonale Antikörper. AC133-Antigen wurde durch zwei mAb AC133/1 und AC133/2 definiert, beide mit Phycoerythrin konjugiert, die über Miltenyi Biotec (Auburn, CA) erhältlich sind. Anti-Human-CD45-FITC und Glycophrin A-FITC waren von CALTAG (Burlingame, CA) bzw. Coulter (Miami, FL) erhältlich. Mit Anti-Human-Allophycocyanin konjugiertem CD34 war von BDIS (San Jose, CA) erhältlich.

[0081] Zellpräparation. FBR wurden durch Collagenase und Hyaluronidase dissoziiert und enthielten immer noch Endothel-Progenitor-Komplex, der die Isolierung eines NSC-Kandidaten in Einzelzellsuspension (Endothelzellen sind CD45⁺) verhinderte. Um diesen Endothelzell-NS-IC-Komplex zu dissoziieren, wurden wie oben beschrieben verarbeitete FBR-Zellen weiter 10 bis 15 min lang mit Trypsin behandelt. Das AC133-Antigen, das CD45-Antigen und das CD34-Antigen waren resistent für die Trypsinbehandlung, während Glycophrin A sensitiv war.

[0082] Nach Trypsinverdauung wurden die Zellen gewaschen und mit mAb gegen CD45, Glycophrin A, AC133 und CD34 gefärbt. Es wurden keine immunmagnetischen Bead-Selektionen verwendet. Die Zellen wurden 20 bis 60 min lang auf Eis inkubiert. Nach der finalen Waschung wurden die Zellen in 1 µg/ml Propidiumiodid (PI) enthaltender HBSS-Lösung resuspendiert. Die markierten Zellen wurden mit einer Dual-Laser-FACS (Becton Dickinson, San Jose) analysiert und sortiert. Tote Zellen wurden von der Analyse durch ihre PI-Färbungseigenschaften ausgeschlossen. Nach der Sortierung wurde die Reinheit der sortierten Zellpopulationen durch FACS-Reanalyse überprüft. Es wurde ein repräsentatives FACS-Profil vor der Sortierung und nach der Sortierung von AC133⁺-CD45⁻-Zellen (NS-IC, ~ 5% der anfänglichen Zellen) und AC133⁻-CD45⁻-Zellen (~ 87% der anfänglichen Zellen) ausgeführt.

[0083] Die NS-IC Aktivität ist bei der AC133⁺-, aber nicht bei der AC133⁻-Teilmenge hoch angereichert. FBR-Zellen (typischerweise 16. bis 20. Schwangerschaftswoche) wurden typischerweise auf Fraktionen CD45⁻ CD34⁻ AC133⁻ und CD45⁻ CD34⁻ AC133⁺ sortiert. In CD45⁻- oder CD45⁻-CD34⁻-Populationen in FBR gab es keine signifikante NS-IC-Aktivität.

[0084] Die sortierten Zellen wurden im oben beschriebenen Neurosphärenmedium kultiviert. Typischerweise wurden Ex Vivo 15 oder eine Kombination aus Ex Vivo 15, D-MEM, F-12-Medien als ein Basalmedium verwendet. Um die Neurosphärenentwicklung zu maximieren, wurden die sortierten Zellen typischerweise in der Gegenwart von LIF, FGF-2, EGF und neuralem Überlebensfaktor, NSF (Kat. CC-4323, Clonetics, San Diego, CA) kultiviert.

[0085] Nach Zellsortierung wurde eine Einzelzellsuspension erhalten. Nach 4 bis 5 Tagen In-vitro-Kultur begannen die AC133⁺-Zellen, zu proliferieren und es wurden 8 bis 10 Tage nach der Kulturinitiation kleine Neurosphären beobachtet. Die Zellen könnten Neurosphären initiieren, wenn sie in der Gegenwart von LIF, FGF-2, EGF ohne NSF kultiviert werden. Neurosphärenkulturen wurden von vier aus vier FBR-Geweben (18. bis 20. Schwangerschaftswoche) initiiert, die nach AC133⁺ CD45⁻ oder AC133⁺ CD45⁻ CD34⁻ sortiert wurden.

[0086] Im Gegensatz dazu wurden, wenn AC133⁻-CD45⁻-FBR-Zellen in der Gegenwart von LIF, FGF-2 und EGF in Kultur gelegt wurden, sehr wenige Neurosphärenbildungen gefunden und versagten bei Passage zu einem neuen Kolben. Wenn dem Wachstumsmedium zusätzliches NSF hinzugefügt wurde, wurde eine gewisse Neurosphäreninitiation beobachtet. Demgemäß wurden AC133⁻-CD45⁻-FBR-Zellen in einer signifikanten Menge von NS-IC angereichert.

Beispiel 4: AC133⁺-Zellseparation, um auf NS-IC-Zellen anzureichern

[0087] AC133⁺-Zellseparation kann wirksam verwendet werden, um auf NS-IC-Zellen aus Gewebe anzureichern. Darüber hinaus kann eine AC133⁺-Zellseparation weiter auf NS-IC-Zellen aus etablierten Präparationen anreichern. Bei einem Test lieferte eine AC133⁺-Zellseparation von dissoziierten Neurosphären (CytoTherapeutics, Providence, RI) eine größtenteils angereicherte NS-IC-Kultur und zeigt gesteigerte Neurosphärenbildung. Unter Verwendung dieser Kultur, kann die erforderliche Zelldosis, um eine Neurosphäre in jedem Well zu initiieren (d. h. 100% positiv), von 3000 bis 10000 Zellen auf etwa 30 Zellen verringert werde (siehe Tabelle 1 unten).

Tabelle 1

Gewebe-ID	Zelle	Zelldosis	Score	Nr. Well	% positiv	% negativ
FBR 1104	nach Trypsin	1000	6	24	25,0%	75,0%
	Ex Vivo 15	3000	20	24	83,3%	16,7%
	LIF/EGF/FG F-2	10000	24	24	100,0%	0,0%
		30000	12	12	100,0%	0,0%
		100000	12	12	100,0%	0,0%
FBR 1104	nach Trypsin	1000	23	24	95,8%	4,2%
	Ex Vivo 15	3000	24	24	100,0%	0,0%

	LIF/EGF/FG F-2/NSF	10000	24	24	100,0%	0,0%
		30000	12	12	100,0%	0,0%
		100000	12	12	100,0%	0,0%
FBR 1104	AC133 ⁻ se- lektierte Zel- len	1000	0	24	0,0%	100,0%
	Ex Vivo 15	3000	1	24	4,2%	95,8%
	LIF/EGF/FG F-2/NSF	10000	28	48	58,3%	41,7%
	AC133 ⁺ se- lektierte Zel- len	10	2	24	8,3%	91,7%
	Ex Vivo 15	100	24	24	100,0%	0,0%
	LIF/EGF/FG F-2/NSF	300	24	24	100,0%	0,0%
		1000	24	24	100,0%	0,0%
FBR 1101	nach Trypsin	1000	9	24	37,5%	62,5%
	Ex Vivo 15	3000	16	24	66,7%	33,3%
	LIF/EGF/FG F-2	10000	23	24	95,8%	4,2%
		30000	12	12	100,0%	0,0%
		100000	12	12	100,0%	0,0%
FBR 1101	nach Trypsin	1000	16	24	66,7%	33,3%
	Ex Vivo 15	3000	21	24	87,5%	12,5%
	LIF/EGF/FG F-2/NSF	10000	24	24	100,0%	0,0%
		30000	12	12	100,0%	0,0%
		100000	12	12	100,0%	0,0%
FBR 1101	AC133 ⁺ se- lektierte Zel- len	1	9	96	9,4%	90,6%
	Ex Vivo 15	10	42	60	70,0%	30,0%
	LIF/EGF/FG F-2/NSF	30	23	24	95,8%	4,2%
		100	11	12	91,7%	8,3%

[0088] Wie es in Tabelle 1 gezeigt ist, kann das hier verwendete (Schwangerschaftswoche 20) nicht angereicherte frische Gehirngewebe („FBR“) NS-IC in solcher Zahl enthalten, dass eine Zelldosis zwischen 3000 und 10000 Zellen benötigt wird, um Neurosphären in jedem Well zu initiieren. Unter Verwendung des Verfahrens der Erfindung können angereicherte Populationen erhalten werden, so dass eine Zelldosis von 1000 Zellen oder weniger erforderlich ist, und bevorzugt eine angereicherte Population, so dass eine Zelldosis von weniger als 100 Zellen erforderlich ist. Wie es in Tabelle 1 gezeigt ist, ist hier eine Anreicherung so erreicht worden, dass eine Zelldosis von nur etwa 30 Zellen pro Well erforderlich ist, um in jedem Well eine Neurosphärenkultur zu bilden. Tabelle 1 zeigt auch, dass wenn Populationen in AC133⁺-Zellen (FBR 1104 AC133 neg. selektierte Zellen) abgereichert sind, die Bildung von Neurosphärenkulturen aus diesen Populationen merklich verringert

ist.

[0089] Quantitativer NS-IC-Test. Um auf die Anwesenheit von NS-IC zu testen, werden Populationen, die bei denen vermutet wird, dass sie multipotente NS-IC enthalten, einer klonalen Entwicklung unterzogen. Zellen werden in Proliferationsmedium gezüchtet, um Neurosphären zu bilden, dann wird die Differenzierung induziert, so dass sich Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten bilden. Die Anwesenheit von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten kann durch Immunfärbung gezeigt werden. Beispielsweise färben Neuronen bei Gegenwart von β -Tubulin, Astrozyten färben bei Gegenwart von GFAP und Oligodendrozyten färben bei Gegenwart von O4.

[0090] Der quantitative NS-IC-Test kann an ungereinigten Gewebezellen, an AC133⁺-sortierten Zellen und an klonalen Neurosphärenzelllinien ausgeführt werden.

Beispiel 5: Zellkulturmedien zur Züchtung und Passage von NS-IC

[0091] Weiss et al., US-Patent 5,750,376, und Weiss et al., US-Patent 5,851,832, offenbaren ein "Kulturmedium, das einen oder mehrere bestimmte Wachstumsfaktoren enthält, die zum Induzieren der Proliferation von multipotenten neuralen Stammzellen wirksam sind" und „die Differenzierung induzierende Bedingungen“. Allerdings können unterschiedliche Basalmedien verwendet werden, die folgendes einschließen, aber nicht darauf beschränkt sind:

D-MEM/F12 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD),
 Ex Vivo 15 (Bio Whittaker, Walkersville, MD),
 Neuraler-Progenitor-Basalmedium, (Clonetics, San Diego, CA)
 oder eine Kombination der oben aufgeführten Basalmedien.

[0092] Eine typische Medienformulierung, um humane Neurosphärenzellen zu kultivieren, wird in Tabelle 2 bereitgestellt.

Tabelle 2

serumfreies N2/EGF ergänztes Kulturmedium für Neurosphären	
Menge	Reagenzien
87 ml	DMEM/F12 (Gibco Charge 1012915; Kat.-Nr. 11330-032)
1 ml	N-2 Supplement (Gibco Charge 1017018; Kat.-Nr. 17502-014)
1 ml	0,2 mg/ml Heparin (Sigma Charge 28H0320; Kat.-Nr. H-3149)
1 ml	0,2 M Glutamin (JCR Charge 7N2320; Kat.-Nr. 59202-77p)
10 ml	3% Glukose (Sigma Charge 37H0841; Kat.-Nr. G-7021)
20 μ l	100 μ g/ml EGF (R&D Charge CE107091; Kat.-Nr. 236-EG)
100 μ l	20 μ g/ml FGF-2 (Gibco Charge KCQ411; Kat.-Nr. 13256-029)
100 μ l	10 μ g/ml LIF (R&D Charge OX038021; Kat.-Nr. 250-L)

[0093] Für humane Neurosphären wird nach Filtern des Mediums EGF zu 100 ml Basismedium hinzugefügt. EGF ist in dem Medium vergleichsweise stabil. EGF-2 und LIF werden hinzugefügt, wenn das Medium zur Verwendung bereit ist. Die Endkonzentrationen der Ergänzungsreagenzien sind wie folgt:

5 g/ml	Insulin
100 g/ml	Humanes Transferrin
6,3 ng/ml	Progesteron
16,1 g/ml	Putrescin
5,2 ng/ml	Selenit
20 ng/ml	EGF
20 ng/ml	FGF-2
10 ng/ml	LIF
2 g/ml	Heparin
2 mM	L-Glutamin
6 mg/ml	Glukose

[0094] Die Optimierung der Medienformulierung ermöglicht es, dass sich ein höherer Prozentsatz an aus primärem Gehirngewebe initiierten Neurosphären bildet. Wir bevorzugen EX Vivo 15 Medium. Die Optimierung der Medienformulierung ermöglicht auch ein konsistenteres Wachstum von Neurosphären. Um die Neurosphärenentwicklung zu optimieren, werde die NS-IC typischerweise in der Gegenwart von LIF, bFGF, EGF und neuralem Überlebensfaktor, NSF (Kat.-Nr. CC-4323, Clonetics, San Diego, CA) kultiviert. Bei einem Test zeigten sowohl trypsinisierte FBR 1101 neurale Zellen und trypsinisierte FBR 1104 neurale Zellen (CytoTherapeutics, Providence, CA) gesteigertes Wachstum, wenn sie in EX Vivo 15 Medium mit LIF, bFGF, EGF und NSF kultiviert wurden.

Beispiel 6: Direkte Isolierung von humanen neuronalen Stammzellen aus fötalem Gehirn durch Zellsortierung

[0095] Eine große Quelle für hochdefinierte transplantierbare humane Zellen, die zu extensiver neuraler Regeneration in der Lage sind, könnte ein wirksames therapeutisches Produkt für die Behandlung von neurodegenerativen Störungen. Um reproduzierbare Verfahren für die Anreicherung von humanen neuronalen Stammzellen (NSC) zu definieren, haben wir monoklonale Antikörper (mAb), die gegen Oberflächenmarker auf humanen neuronalen Zellen gerichtet sind, entwickelt und verwendet, um NSC durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) zu identifizieren und zu reinigen. Auf der Grundlage von FACS und immunhistochemischen Analysen wurden zwei mAb, 5F3 und 5E12, identifiziert. Sie definierten zwei Teilmengen von fötalen Gehirnzellen und zeigten spezifische Reaktivität für Zellen in der Bodenplatte und Ependymschicht des Rückenmarks (12. Schwangerschaftswoche), Stellen, die dafür bekannt sind, dass sie ZNS-Stammzellen enthalten. Diese mAb färben weniger als 5% FBR-Zellen und mehr als 95% der Zellen aus Langzeit-Neurosphärenkulturen waren positiv.

[0096] Als ein Beispiel wurden zwei Populationen 5F3⁺ CD34⁻ CD45⁻ (5F3⁺) und 5F3⁻ CD34⁻ CD45⁻ (5F3⁻) sortiert und auf ihre Fähigkeit Neurosphärenkulturen zu initiieren getestet. Die 5F3⁺-Teilmenge war hochangereichert für Neurosphären initiiierende Zellaktivität, sie proliferierte, so dass sich bei 8 bis 10 Tagen in Kultur eine kleine Neurosphäre bildete. Im Gegensatz dazu verblieben die sortierten 5F3⁻-Zellen als eine Einzelzellsuspension, versagten dabei, Neurosphären zu initiieren und starben schließlich. Die expandierten 5F3⁺-sortierten Neurosphärenzellen waren positiv für die Nestinexpression und differenzierten in Folge des Aussetzens verschiedener Differenzierungsbedingungen in Neuronen und Glia. Unter Verwendung der NOD-SCID-Maus zeigten In-vivo-Studien, dass die 5F3⁺-Neurosphärenzellen 8 Wochen nach Transplantation anwachsen und einwandern können. Diese Studien zeigen, dass wir auf der Grundlage von Zelloberflächenmarkern und Durchflusszytometrie humane NSC identifiziert und angereichert haben, und wird demonstrierten unter Verwendung von In-vitro- und In-vivo-Tests ihre Aktivität.

[0097] Bei weiteren Vergleichstests untersuchten wir Gehirn- und Rückenmarksgewebe über verschiedene Schwangerschaftsalter. Die früheren (5. bis 12. Woche der Schwangerschaft; nicht-illustrativer Test) Schwangerschaftsalter weisen eine größere Häufigkeit von Neurosphären initiiierenden Zellen (NS-IC) auf als spätere Schwangerschaftsalter (16. bis 20. Woche der Schwangerschaft). Siehe beispielsweise [Fig. 5](#). Direktes Kultivieren von Zellen, die aus diesen Geweben stammen, führt zur Neurosphäreninitiierung.

[0098] Unsere Daten (unten in Tabelle 3 gezeigt) demonstrieren, dass die Zellpopulation von neuronalen Zellen, die auf 5F3⁺-Zellen angereichert sind, auf NS-IC-Aktivität angereichert sind, bis zu 23-fach.

Tabelle 3

Population	% im Gehirn	NS-IC	Bereich
Gehirnzellen nach Verarbeitung (n = 8)	100	1/819	1/304–1435
5F3 ⁻ -sortiert	95	1/5434	1/4224–7772
5F3 ⁺ -sortiert	4,6	1/36	1/10–74

[0099] Darüber hinaus, wie [Fig. 2](#) zeigt, können aus einzelligen sortierten 5F3⁺-Zellen Neurosphären abgeleitet werden. Wir haben auch demonstriert, dass die Selbsterneuerung von Neurosphärenzellen, die aus 5F3⁺-sortierten Zellen stammen, durch Re-Initiierung von Neurosphären aus Einzelzellen erreicht werden kann (Daten sind nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigen unsere Daten, dass von 5F3⁺-Zellen abgereicherte Zell-

populationen auch eine verringerte NS-IC-Aktivität aufwiesen.

Beispiel 7: Isolierung von NS-IC durch verschiedene Marker

[0100] Als ein zweites Beispiel haben wir unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers, 5E12, hierin beschrieben, Zellpopulationen sortiert. Die 5E12⁻-Teilmenge wurde auf Neurosphären initiiierende Aktivität angereichert, wie es unten in Tabelle 4 gezeigt ist. Siehe auch [Fig. 3](#). Unsere Daten weisen darauf hin, dass das Antigen für den 5E12-Antikörper mit dem AC133-Antigen von 5F3⁺-Zellen ko-exprimiert wird.

[0101] Wir haben auch den 8G1 monoklonalen Antikörper als einen Subselektor für neuronale Stammzellen evaluiert, wie es unten in Tabelle 4 gezeigt ist. Zellen, die 5F3⁺ und 8G1^{-/lo} waren, zeigten mehr stammzellartige Eigenschaften, während Zellen, die 5F3⁺ und 8G1 waren, mehr progenitorzellartige Eigenschaften zeigten.

Tabelle 4

Anreicherung von NS-IC durch 5F3-, 5E12- und 8G1-Antikörper			
Population	% im Gehirn	NS-IC	Bereich
Gehirnzellen Kontrolle (n = 8)	100	1/819	1/304–1435
5F3 ⁻ sortiert (n = 6)	95	1/5434	1/4224–7772
5F3 ⁺ (n = 6)	4,6	1/36	1/10–74
5E12 ⁻ (n = 2)	97	1/1335	1/1259, 1411
5E12 ⁺ (n = 3)	2,5	1/286	1/79–392
5F3 ⁺ 8G1 ^{-/lo} (n = 3)	1,1	1/23	1/15–34
5F3 ⁺ 8G1 ^{mid/hi} (n = 3)	1,7	1/63	1/38–105

* alle sortierten Populationen waren CD34⁻ CD45⁻

Beispiel 9: In-vivo-Studien NS-IC

[0102] Wir transplantierten 5F3⁺-sortierte NS-IC (erhalten wie oben beschrieben) unter Verwendung von herkömmlichen Techniken in die lateralen Ventrikel von neonatalen Mäusen. Das Anwachsen und die Einwanderung von humanen Neurosphärenzellen wurde 4 bis 8 Wochen nach Injektion unter Verwendung eines humanen spezifischen Thy-1-Antikörpers ermittelt (siehe [Fig. 6](#)). Wie es in [Fig. 7](#) gezeigt ist, macht das Färben mit humanem β -Tubulin (einem neuronalen Marker) und humanem Zellkernantigen (für die Lokalisierung von humanen Zellen) die Migration der humanen Neurosphärenzellen durch den rostromigratorischen Strom (RMS) deutlich.

[0103] Darüber hinaus, wie in [Fig. 8](#) gezeigt, demonstrierte die Lokalisierung unter Verwendung von humanem Zellkernantigen, dass humane Neurosphärenzellen über den RMS zum Riechkolben gewandert sind.

Beispiel 10: Direkte Isolierung und Transplantation von humanen Zentralnervensystem-Stammzellen

[0104] Einführung und Zusammenfassung. Stammzellen, klonogene Zellen mit Selbsterneuerung und Multilinien-Differenzierungseigenschaften, haben das Potential, beschädigtes Gewebe zu ersetzen oder zu reparieren. Bei diesem Beispiel haben wir klonogene humane Gehirnstammzellen (ZNS-SC) isoliert, die Neurosphärenkulturen initiieren und sowohl Selbsterneuerung als auch Differenzierung zu Neuronen und Glia zeigen. Diese nicht genetisch modifizierten humanen ZNS-SC sind durch monoklonale Antikörper für Oberflächenmarker markiert. Die Zellen sind 5F3 (AC133)⁺, 5E12⁺, CD34⁻ CD45⁻ und CD24^{-/lo}. Einzelne AC133⁺ CD34⁻ CD45⁻ sortierte Zellen initiierten Neurosphärenkulturen und zeigten Multilinien-Differenzierung. Wenn sie einmal in Gehirne von immundefizienten neonatalen Mäusen sind, zeigen die sortierten und expandierten ZNS-SC starkes Anwachsen, Proliferation, Migration und Differenzierung auf orts-spezifische Art und Weise.

[0105] Bei diesem Beispiel zeigen wir, dass mAb 5F3 und die neuartigen mAb, 5E12, eine bestimmte Teilmenge von humanen fötalen Gehirnzellen (FBr-Zellen) erfassen. Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung unter

Verwendung dieser mAb in Verbindung mit mAb, die kontaminierende Blut- und Endothelzellen markieren (CD34 und CD45), führte zu einer Teilmenge von humanen FBr-Zellen, AC133⁺ CD34⁻ CD45⁻. Nach Zellsortierung sind die sortierten Zellen auf dem Niveau einzelner Zellen zur Neurosphäreninitiierung, Selbsterneuerung und Multilinen-Differenzierung in der Lage, Zellen, die wir für humane ZNS-SC halten. Dieser humane ZNS-SC-Kandidat hat sich in Neurosphärenkultur selbst erneuert und signifikant expandiert und differenzierte in vivo zu Neuronen und Glia. Der sortierte und expandierte ZNS-SC-Kandidat kann in die lateralen Ventrikel von neugeborenen NOD-SCID-Mausgehirnen transplantiert werden, wo sie wenigstens 7 Monate lang offenbar ein entsprechendes orts-spezifisches Anwachsen, kontinuierliche Selbsterneuerung, Migration und Differenzierung durchmachen. Solch eine Transplantation von humanen ZNS-SC in neonatale Mausgehirne bildet keinen Teil der Erfindung, ist aber für das Verständnis der Erfindung dienlich.

[0106] Suche nach neuralen ZNS-Stammzellmarkern; Strategie. Wir stellen die Hypothese auf, dass ZNS-SC-Markerkandidaten nur auf einer kleineren Teilmenge von FBr-Zellen exprimiert werden sollten. Da es Hinweise gibt, dass die Neurosphärenkulturen eine angereicherte Population von Stamm-/Progenitorzellen enthalten, stellen wir die Hypothese auf, dass die neuralen Stammzellmarkerkandidaten eher reichlich auf diesen Zellen exprimiert werden sollten. Demgemäß rasteren wir mAb durch, die zuvor verwendet wurden, um humane hämatopoietische Stammzellen (HSC) zu definieren.

[0107] Sortierte Populationen wurden getestet, um zu bestimmen, ob sie auf Neurosphären initiiierende Zellen (NS-IC) angereichert sind. Jeder mAb, der FBr sauber in 2 Fraktionen trennte (eine Fraktion, die eine Neurosphärenkultur bildete, und eine, die das nicht tat), wurde als ein mAb-Kandidat betrachtet, um zu helfen, NS-IC zu identifizieren. Bei einer anfänglichen Rasterung wurden mAb gesucht, die eine kleine Fraktion von FBr und eine große Fraktion von langfristig kultivierten Neurosphärenzellen positiv färben, und andere mAb (zur negativen Selektion), die die meisten FBr-Zellen färbten, außer eine kleine Fraktion von Neurosphärenzellen. Enzymdissoziiertes FBr und langfristig kultivierte Neurosphärenzellen wurden mit über 50 bekannten mAb gefärbt.

[0108] Eine Langzeit-Neurosphärenkultur, 8.5 FBr, ist kürzlich beschrieben worden (Carpenter et al., 158 Exp. Neurol. 265-78 (1999)). Diese Zellen wurden in Standard-Human-Neurospärenmedium kultiviert: D-MEM/F12 Basalmedium mit N-2-Supplement (Gibco), 3% Glukose, 0,2 M Glutamin und 0,2 mg/ml Heparin in der Gegenwart von FGF-2 (20 ng/mL), EGF (20 ng/mL) und LIF (10 ng/mL). Die kultivierten Zellen wurden geerntet und 5 bis 10 min lang in der Gegenwart von Collagenase für die Passage enzymatisch dissoziiert oder trypsinisiert, um eine Einzelzellsuspension für die mAb-Färbung zu erhalten.

[0109] Die Neurosphärenzellen exprimierten keine vaskularen und hämatopoietischen Marker CD34 oder CD45. Im Gegensatz dazu wurde Thy-1, ein kritischer Zelloberflächenmarker, der sowohl Maus- als auch Human-HSC identifizierte, mit hohen Pegeln auf praktisch allen FBr-Zellen und Neurosphärenzellen exprimiert, und war deshalb nicht verwendbar. Interessanterweise machte anfängliches Antikörper-Screening deutlich, dass ein anderer HSC-Marker, AC133, nur auf 1 bis 5% FBr-Zellen, die aus Gewebe aus der 16. bis 20. Schwangerschaftswoche stammten, und auf ~ 90% der kultivierten Neurosphärenzellen exprimiert wurde.

[0110] Monoklonaler Antikörper AC133 reichert für humane ZNS-SC an. Humanes FBr-Gewebe wurde nach NIH-Richtlinien aus den Resten von Föten der 16. bis 20.

[0111] Schwangerschaftswoche von Advanced Bioscience Resources, Inc., erhalten. FBr-Gewebe wurden unter Verwendung von Scalpellen in Stücke von 1 bis 3 mm geschnitten, in 50 ml Zentrifugenröhrchen übertragen und einmal mit 0,02% EDTA/PBS-Lösung gewaschen. Die Gewebe wurden 1 h lang bei 37°C in der Gegenwart von 0,1% Collagenase (Roche, Indianapolis, IN) und 0,1% Hyaluronidase (Sigma, St Louis, MO) in HBSS, ergänzt mit 0,1% BSA, 10 mM HEPES und DNase, enzymatisch dissoziiert. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurden die dissoziierten FBr-Zellen weiter 10 bis 15 min lang mit 0,05% Trypsin, 53 mM EDTA (Gibco, Grand Island, NY) behandelt. Brocken und Aggregate wurden durch Filtrieren der Zellsuspension durch eine 70-Mikron-Filtereinheit entfernt.

[0112] Nach Collagenase/Hyaluronidase-Behandlung gefolgt von Trypsinisierung wurde eine Einzelzellsuspension erhalten. Deshalb wurde das Screening auf trypsinresistente Zelloberflächenepitope beschränkt.

[0113] Große Kulturen von sortierten CD45⁺- oder CD34⁺-Zellen aus FBr versagten dabei, Neurosphärenkulturen zu initiieren. Somit könnten sowohl CD34 als auch CD45 als negative Selektoren für humane ZNS-SC verwendet werden.

[0114] Um zu testen, ob ZNS-SC auf der Grundlage von AC133-Expression isoliert werden können, wurden humane FBr-Zellen mit Antikörpern für CD34, CD45 und AC133 gefärbt. AC133 war durch zwei mAb AC133/1 und AC133/2 definiert, beide konjugiert mit Phycoerthrin (PE), die über Milteny Biotec (Auburn, CA) erhältlich sind. Anti-Human-CD45-FITC, Anti-Human-CD34, konjugiert mit Allophycocyanin (APC), wurden von CALTAG (Burlingame, CA) bzw. BDIS (San Jose, CA) erhalten. Die dissoziierten FBr-Zellen wurden 20 bis 60 min lang auf Eis mit mAb gegen CD45-FITC, AC133/1 AC133/2-PE und CD34-APC inkubiert. Nach der letzten Wäsche wurden die Zellen in HBSS-Lösung, enthaltend 0,5 g/ml Propidiumiodid (PI), resuspendiert. Die markierten Zellen wurden mit einem Dual-Laser Vantage SE (BDIS, San Jose) analysiert und sortiert. Tote Zellen wurden von der Analyse durch ihre PI-Färbungseigenschaften ausgeschlossen. Kontaminierende Blutzellen und Endothelzellen wurden durch Ausschleusen von CD45⁺-Zellen bzw. CD34⁺-Zellen ausgeschlossen. Nach Sortieren wurde die Reinheit der sortierten Zellen überprüft.

[0115] Zwei Zellpopulationen, AC133⁻ CD34⁻ CD45⁻ (AC133⁻) und AC133⁺ CD34⁻ CD45⁻ (AC133⁺) wurden sortiert und auf NS-IC-Aktivität kultiviert. Obwohl die AC133-Expression anfänglich als ein Kontinuum erschien (**Fig. 9A**), zeigte FACS-Voranreicherung von AC133⁺-Zellen gefolgt von einer zweiten Runde an Zellsortierung eine eindeutige AC133⁺-Population (**Fig. 9A**). Bei allen Teilmengentests wurden sowohl die AC133⁻- als auch die AC133⁺-Teilmengen zweifach sortiert, was zu AC133⁻- und AC133⁺-FBr-Zellfraktionen mit hoher Reinheit führte (**Fig. 9A**).

[0116] AC133⁺-Einzelzellpopulationen, kultiviert unter Neurosphärenbedingungen, wurden blastenartig, haftend auf der Kunststoffplatte, und begannen Zellteilung zu initiieren. Nach 4 bis 5 Tagen in Kultur begann eine große Fraktion der AC133⁺-Zellen, zu proliferieren und als ein Cluster einiger Zellen zu schwimmen. Kleine Neurosphären wurden schon 7 bis 10 Tage nach Kulturinitiierung beobachtet (**Fig. 9C**). Im Gegensatz dazu blieben die AC133⁻-Zellen eine Einzelzellsuspension, versagten dabei, Neurosphären zu initiieren, und starben schließlich (**Fig. 9B**). Demgemäß wurde NS-IC-Aktivität bei der AC133⁺-Teilmenge, aber nicht bei der AC133⁻-Teilmenge der CD34⁻ CD45⁻ FBr-Zellen beobachtet.

[0117] Nur AC133⁺ humane FBr-Zellen weisen NS-IC Aktivität auf. Da der qualitative NS-IC-Test einen beachtlichen Unterschied zwischen der Proliferation von AC133⁻- und AC133⁺-Teilmengen zeigte, wollten wir die Häufigkeit von NS-IC in unfraktionierten (d. h. nach Zellverarbeitung) und verschiedenen fraktionierten FBr-Zellsuspensionen bestimmen. Unfraktionierte FBr-Zellen wurden durch Grenzwertverdünnung (100 bis 10000 Zellen/Well) in 96-Well-Platten unter Verwendung der automatischen FACS-Zellabscheidungseinheit (ACDU) plattiert. Diese Platten wurden 6 bis 8 Wochen lang kultiviert und Wells, die Neurosphären enthielten, wurden als positiv gewertet.

[0118] Die sortierten FBr-Zellen wurden in Neurosphärenkultur in Ex Vivo 15 (Bio Whittaker, Walkersville, MD) Medium mit N2-Supplement (Gibco) in der Gegenwart von FGF-1 (20 ng/mL), EGF (20 ng/mL), LIF (10 ng/mL), Neuralem Überlebensfaktor-1 (Clonetics, San Diego, CA) und 60 g/mL N-Acetylcystin (Sigma) (Neurosphären-Initiierungs-Medium) kultiviert. Die Medienformulierung wurde auf der Grundlage der Häufigkeitsanalyse der Grenzwertverdünnung von FBr-Zellen optimiert. Die Kulturen wurden wöchentlich genährt und passiert, wenn die Neurosphären groß wurden. In einigen Fällen wurden sortierte FBr-Zellen durch die automatische Zellabscheidungseinheit (ACDU) in 96-Well-Platten resortiert, um die Häufigkeit von Precursoren, um Neurosphärenkulturen zu initiieren, zu evaluieren. Diese 96-Well-Platten wurden wöchentlich genährt und die Gegenwart von Neurosphären in den Wells wurde 6 bis 8 Wochen nach Kulturinitiierung beurteilt. Lineare Regressionsanalyse des Anteils an negativen Wells bei jeder Zellkonzentration wurde verwendet, um die Häufigkeit von NS-IC zu bestimmen.

[0119] In den Wells, die mit hohen Zelldosen (d. h. 10000 Zellen pro Well) plattiert waren, wurden mehrere Neurosphären ermittelt, wohingegen bei den Wells, die mit geringeren Zelldosen (d. h. 300 bis 1000 Zellen pro Well) plattiert waren, positive Wells nur einzelne Neurosphären enthielten. Bei 100 bis 300 Zellen pro Well enthielten nur wenige Wells eine einzelne Neurosphäre. Wenn der log der negativen Wells gegen die Zahl der pro Wells plattierten Zellen aufgetragen wurde, wurde eine gerade Linie gefunden; bei 37% negativen Wells wurde ein einzelner Treffer für NS-IC bestimmt (**Fig. 10A**). Bei einem in **Fig. 10A** gezeigten repräsentativen Gewebe wiesen zur Kontrolle verarbeitete Gehirnzellen NS-IC-Aktivität bei einer Häufigkeit von 1/880 Zellen auf. Bei der AC133⁻-Teilmenge ergab sich eine Verminderung der NS-IC-Häufigkeit auf 1/1860 Zellen. Im Gegensatz dazu wurde die NS-IC-Aktivität in der AC133⁺-Teilmenge mit einer Häufigkeit von 1/32 Zellen stark angereichert (**Fig. 10A**). Die NS-IC-Häufigkeit von 8 verschiedenen FBr-Geweben (16. bis 20. Schwangerschaftswoche) wurde in **Fig. 10B** und Tabelle 5 zusammengefasst evaluiert.

und sie sind in der Lage, Neurosphären reproduzierbar zu re-initiieren. Deshalb definiert AC133 eine neurale Zellpopulation, die in vitro kontinuierlich expandiert und sich selbst erneuert.

Tabelle 6

Expansion von humanen AC133 ⁺ -sortierten Zellen		
Expansion	Tage in Kultur	Zellzahlexpansion zwischen Passage 0 bis 5
Exp. 1	87	924
Exp. 2	76	944
Exp. 3	96	750
Exp. 4	74	463
Exp. 5	110	2469
Mittel	89	1013

[0125] NS-IC werden auch in 5E12⁺- und 8G1^{-lo}-Zellen angereichert; Erzeugung von neuartigen mAb. Gleichzeitig zum Screening der Brauchbarkeit von erhältlichen mAb versuchten wir, neuartige Zelloberflächenmarker auf humanen neuronalen Zellen zu identifizieren. FBr-Zellen wurden mit einer Kombination aus Collagenase und Hyaluronidase dissoziiert und wurden verwendet, um BALB/c-Mäuse zu immunisieren, mit einer Decoy-Strategie, um gewebespezifische mAb zu steigern. Etwa 1900 Wells wachsender Hybridomzellen wurden gerastert und es wurden Hybridome selektiert, expandiert und weiter auf spezifische Reaktivität auf humanes Gehirn getestet. Monoklonale Antikörper für humane neurale Zellen wurden unter Verwendung einer kürzlich bei Yin et al., 90 Blood 5002-12 (1997), beschriebenen Decoy-Immunsierungsstrategie hergestellt. Kurz, BALB/c-Mäuse wurden in einen Fußballen mit peripherem Blut, das mit humanen Decoy-Leukozyten angereichert war, und in den kontralateralen Fußballen mit enzym-dissoziierten fötalen Gehirnzellen immunisiert. Die die FBr-Zellen-Immunsierung drainierenden Donor-Lymphknotenzellen wurden geerntet, zu einer Zellsuspension verarbeitet und mit einer Maus-Myelom-Linie fusioniert. Diese Fusion an eine Maus-Myelom-Linie führte zu 1900 Wells wachsender Hybridom-Zellen. Ungefähr 180 Hybridome wurden selektiert, expandiert und weiter auf spezifische Reaktivität für humane Gehirnzellen getestet.

[0126] Wie es oben beschrieben wurde, wurden die ZNS-SC in der AC133⁺-Teilmenge stark angereichert. Um den Phänotyp der ZNS-SC weiter zu charakterisieren, haben wir getestet, ob AC133⁺-Zellen phänotypisch heterogen sind. Demgemäß wurden AC133⁺-Zellen auf die Ko-Expression von anderen Markern aus dem Panel neuer mAb gerastert. Es wurden zwei neuartige mAb, 5E12 und 8G1, identifiziert. Der mAb 5E12 ko-färbt AC133⁺-Zellen und Langzeit-Neurosphärenzellen. 5E12⁺-FBr-Zellen sind hinsichtlich der NS-IC-Aktivität angereichert und 5E12⁻-Zellen sind angereichert (Tabelle 5).

[0127] Bei sich entwickelndem fötalem Gehirn exprimierte die Mehrheit der FBr-Zellen einen hohen Pegel an 8G1-Marker ([Fig. 4](#)). Die AC133⁺-Zellen waren hinsichtlich der 8G1-Expression heterogen; hauptsächlich 8G1^{-lo}-, einige 8G1^{mid}- und wenige 8G1^{hi}-Zellen ([Fig. 12](#)). Interessanterweise war auch die 8G1-Expression auf langfristig kultivierten humanen Neurosphärenzellen heterogen. Immunpräzipitation und Blocking-Studien bestimmten, das 8G1 ein Anti-CD24-mAb ist. Historisch ist CD24 als das wärmestabile Antigen (HSA) bekannt und wird verbreitet als ein Marker bei Hämato-Lymphopoiese verwendet (Alterman et al., 20 Eur J Immunol 1597-602 (1990)). HSA wird mit geringen Pegeln auf Maus-HSC (Shih und Ogawa, 81 Blood 1155-60 (1993); Spangrude und Scollay, 18 Exp. Hematol. 920-6 (1990)) und mit hohen Pegeln auf pro-B- und pre-B-Zellen und Thymozyten exprimiert und wird vollständig abwärtsreguliert, wenn diese Zellen reife Lymphozyten werden (Alterman et al., 20 Eur J Immunol 1597-602 (1990)). Wie es in Tabelle 5 gezeigt wird, ist die Häufigkeit von NS-IC in der AC133⁺-CD24^{-lo}-Fraktion im Vergleich zur AC133⁺-CD24^{mid/hi}-Teilmenge höher.

[0128] Starke Anwachs-Fähigkeit von AC133⁺-abgeleiteten humanen Neurosphärenzellen (nicht-illustrativer Test). Um die In-vivo-Fähigkeit zum Anwachsen, zur Migration und zur Differenzierung von humanen sortierten/expandierten ZNS-SC zu testen und beim Verständnis der vorliegenden Erfindung zu helfen, wurden 10⁵ oder 10⁶ Neurosphärenzellen (initiiert aus AC133⁺-sortierten FBr-Zellen) in die lateralen Ventrikel von neonatalen NOD-SCID-Mausgehirnen injiziert. Wie es oben erwähnt wurde, bildet solch eine Transplantation von humanen Zellen in Mausgehirne keinen Teil der vorliegenden Erfindung.

[0129] Um kleine Zellcluster zu erhalten, wurden expandierte AC133⁺-sortierte Neurosphärenzellen bei Pas-

sage 6 bis 10 geerntet und sanft mit Collagenase dissoziiert. Die Zellen wurden im Äquivalent von $0,25 \times 10^5$ oder $2,5 \times 10^5$ /l resuspendiert. Neonatale Mäuse (< 24 h nach Geburt) wurden unter Verwendung von Eis kryo-anästhetisiert; einmal anästhetisiert, wurden die Jungtiere auf einer Stereotaxie-Vorrichtung platziert. Mit einer Nadel wurde ein kleines Loch in den Knorpel gebohrt und durch eine Hamilton-Spritze wurden Zellsuspensionen in beide lateralen Ventrikelräume eingebracht. Neonatalen Mäusen wurde 2 10^5 an Zellen im Bereich von 10^5 bis 10^6 Zellen/Injektion injiziert. Die Jungtiere wurden durch Aufwärmen revitalisiert, um den Erfolg der Operation zu überwachen, und dann zur Mutter zurückgegeben. Die injizierten Mäuse wurden vor dem Testen des Anwachsens von humanen Zellen für 7 Monate bewahrt.

[0130] Um die Partizipation von injizierten Zellen in das neurologische System zu maximieren, wurden neonatale NOD-SCID-Mäuse als Empfänger gewählt, da die Zellgenese in Teilen von neonatalem Mausgehirn immer noch aktiv im Gang ist. Zudem stoßen immundefiziente Mäuse humane Gewebe nicht ab und SCID- und NOD-SCID-Mäuse sind als Wirte für In-vivo-Studien von humaner Hämatopoese und Gewebearwachsung verwendet worden (McCune et al., 241 Science 1632-9 (1988); Kamel-Reid und Dick, 242 Science 1706-9 (1988); Laroche et al., 2 Nat. Med. 1329-37 (1996)). Sieben Monate nach der Transplantation wurden die Tiere getötet und Sagittalschnitte wurden mit humanen spezifischen mAb gegen N-CAM und Thy-1 sowie humanes Zellkern-Antigen angefärbt.

[0131] Nach 7 Monaten nach der Transplantation wurden NOD-SCID-Mäuse mit Avertin tief anästhetisiert und mit PBS, gefolgt von 4% Paraformaldehyd in Phosphatpuffer, perfundiert. Die Gehirne wurden über Nacht nachfixiert, in 30% Sucrose-Lösung gelegt und in der OCT-Verbindung eingefroren. Die Gehirne wurden zur weiteren Immunhistochemie mit einer Dicke von 5 μ m sagittal geschnitten. Um humane Zellen in den transplantierten Mausgehirnen zu erfassen, wurden die Schnitte mit monoklonalen Maus-Antikörpern gegen humanes Thy-1 (Pharmingen, San Diego, CA), N-CAM, β -Tubulin (Sigma) oder Zellkernantigen (Chemicon) gefolgt von Ziegen-Anti-Maus-IG konjugiert mit Alexa 488 (Molecular Probe, Eugene, OR) gefärbt.

[0132] Die Färbung dieser mAb auf Mausgehirnkontrollen zeigte keine Kreuzreaktivität. Die mAb gegen GFAP und β -Tubulin färbte sowohl humane als auch Mauszellen, und daher wurde Doppelmarkierung mit dem Anti-Human-Zellkernantikörper verwendet, um humane linienspezifische Zellpopulationen zu demonstrieren. Die detaillierte Analyse richtete sich insbesondere auf die zwei Stellen des Gehirns, von denen kürzlich gezeigt wurde, dass sie Stellen der aktiven Neurogenese sind, die subventrikuläre Zone (SVZ) der lateralen Ventrikel und der Gyrus dentatus des Hippokampus (**Fig. 12A**).

[0133] Humane Zellen wurden überall im Mausgehirn gefunden und waren sieben Monate nach der Injektion in der SVZ reichlich vorhanden (**Fig. 12**). Beispielsweise waren in einem Bereich viele Zellen mit humanen Zellkernen⁺ von GFAP⁺-Zellen umgeben (**Fig. 12B**). Konfokalmikroskopische Untersuchungen wiesen darauf hin, dass die meisten humanen Zellen GFAP⁻ waren, aber gelegentlich wurden auch humane GFAP⁺-Zellen beobachtet (**Fig. 12B**, Pfeil).

[0134] Die transplantierten Mausgehirne wurden bei einer Dicke von 40 μ m auf einem Mikrotom geschnitten und mit mAb angefärbt und unter Verwendung eines Bio-Rad konfokalen Rasterlichtmikroskops analysiert, wie es kürzlich von Suhonen et al., 383 Nature 624-7 (1996), beschrieben wurde.

[0135] Weil gezeigt wurde, dass Stammzellen/Progenitorzellen in der SVZ kontinuierlich proliferieren, haben wir getestet, ob die Nachkommen der transplantierten humanen AC133⁺-sortierten/expandierten Neurosphärenzellen in situ immer noch proliferierten.

[0136] Ein Schnitt des transplantierten Gehirns wurde mit Ki67 angefärbt, einem Marker, der mit der Zellproliferation assoziiert ist. Bemerkenswerterweise ko-exprimiert ein Cluster humaner Zellen in der SVZ, eingestrichelt in GFAP⁺-Zellen, Ki-67, was darauf hinweist, dass die humanen Zellen in der SVZ, wie ihre Maus-Gegenstücke, 7 Monate nach der Transplantation in die SVZ fortfahren können, zu proliferieren (**Fig. 12C**).

[0137] Im Riechsystem von Nagetieren treten die Nachkommen von Stammzellen/Progenitorzellen, die in der SVZ proliferierten, in den rostromigratorischen Strom (RMS) ein und wandern zum Riechkolben (Lois und Alvarez-Buylla, 164 Science 1145-8 (1994)). Die „Neuroblastenkette“ von endogenen Nagetier-Progenitoren im RMS exprimiert β -Tubulin und N-CAM (Fricker et al., 19 J. Neurosci. 5990-6005 (1999); Gage und Cristen, Isolation, characterisation and utilization of CNS stem cells (Springer, Heidelberg, 1997)). Die Sagittalschnitte, die den RMS enthielten, wurden auf die Gegenwart von humanen neuronalen Zellen untersucht. In Mäusen, die mit AC133⁺-sortierten Neurosphärenzellen transplantiert waren, wurden große Zahlen an humanen Zellen festgestellt, beginnend in der SVZ und sich durch den ganzen RMS erstreckend (**Fig. 13A**). Viele dieser zusammen-

geballten humanen Zellen waren mit β -Tubulin kolokalisiert, aber es war schwierig, doppelt positive Zellen in solchen Cluster zu identifizieren. Sorgfältige Untersuchung von Geweben, die weniger humane Zellen enthielten, offenbarten mehrere Zellen, die doppelt positiv sowohl für β -Tubulin als auch für humanes Zellkernantigen waren (**Fig. 13B**, Pfeil). Zudem exprimierten viele dieser Zellen im RMS den humanen spezifischen Marker, N-CAM (**Fig. 13C**).

[0138] Es ist zu erwarten, dass sich die Nachkommen von Stammzellen/Progenitorzellen nach Wandern durch den RMS in den Riechkolben begeben und sich zum Glomeruli olfactorii zu den periglomerulären Schichten des Kolbens erstrecken (Lois und Alvarez-Buylla, 164 Science 1145-8 (1994)). Wie es in **Fig. 13D** gezeigt ist, sind die Nachkommen von humanen Zellen in den glomerulären sowie den periglomerulären Schichten verteilt. Einige dieser Zellen exprimierten humanes N-CAM, was darauf hinweist, dass sie an neurale Linien gebunden waren. Demgemäß wandern die Nachkommen der transplantierten sortierten/expandierten humanen ZNS-SC in den RMS, verteilen sich und differenzieren im Riechkolben in neurale Linien. In wenigen Fällen wurden tyrosin-hydroxylase-positive humane Zellen beobachtet.

[0139] Eine andere Stelle, an der in adulten Lebewesen Neurogenese stattfindet, ist der Gyrus dentatus des Hippokampus (Gage et al., 92 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 11879-83 (1995)). Bei diesem Beispiel fanden wir zahlreiche humane Kernzellen im Gyrus dentatus des Hippokampus. Einige der humanen Zellen in der subgranulären Zellzone ko-exprimieren Ki-67, was darauf hinweist, dass sie immer noch in der Lage sind, nach 7 Monaten nach der Transplantation zu proliferieren (**Fig. 14A**). Bei einer anderen Analyse waren einige andere humane Zellen β -Tubulin⁺, wie es für sich entwickelnde granuläre Neuronen zu erwarten ist, wobei ihre Prozesse sich zum Hilus des Hippokampus erstrecken (**Fig. 14B**). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese sortierten/expandierten humanen ZNS-SC nicht nur anwachsen, wandern, fortfahren, zu proliferieren, und differenzieren, sondern ihr Verhalten und Zellschicksal auch durch Wirts-Signalstoffe auf orts-spezifische Art und Weise reguliert wurden. In keinem Fall bildeten die injizierten Zellen keine Tumoren.

[0140] Diskussion. Der Zweck dieses Beispiels war es, Oberflächenmarker auf humanen Gehirnzellen zu finden, die die prospektive Isolation von humanen ZNS-SC-Kandidaten ermöglichen. Wir nahmen an, dass humane Neurosphärenkulturen aus ZNS-SC klonal initiiert sein können, und unternahmen die Isolierung der NS-IC aus frischen humanen FBr-Zellsuspensionen. Wir demonstrierten, dass humane FBr-Zellen der 16. bis 20. Schwangerschaftswoche eine seltene Teilmenge von klonogenen AC133⁺, E512⁺, 8G1^{-/lo}-CD34⁻-CD45⁻-Zellen enthalten, die Neurosphärenkulturen initiieren können, die sich in diesen Kulturen extensiv selbst erneuern und in vitro zu Neuronen und Glia differenzieren. Nach Transplantation in die lateralen Ventrikel von immundefizienten neugeborenen Mäusen wuchsen diese Zellen wenigstens 7 Monate lang an und führen zu Nachkommen, die differenzieren, die wandern und einigen, die fortfahren, zu proliferieren (d. h. Anwesenheit von Ki-67⁺ humanen neuronalen Zellen in der SVZ und im Gyrus dentatus). Die angewachsenen humanen Zellen werden an Stellen gefunden, an denen ihre endogenen neuronalen Mauszell-Gegenstücke die gleichen Abläufe durchleben.

[0141] Die Daten in **Fig. 10** und Tabelle 5 demonstrieren, dass es keine anderen detektierbaren NS-IC-Zellen außerhalb der AC133⁺-Teilmenge im humanen fötalen Gehirn gibt.

[0142] Während der Analyse von AC133-Färbungsmustern bemerkten wir, dass ~ 0,2% der FBr-Zellen CD34 exprimieren und an Zellen haften blieben, die AC133⁺ CD34⁻ waren. Diese CD34⁺-Zellen ko-exprimierten die bekannten Endothelzellmarker CD105 und CD31 und verblieben nach Trypsinisierung als Komplexe von Zellen, die ineffizient einige Neurosphären bilden könnten, wenn sie in hoher Dichte in großen Kulturen plattiert werden. Wir haben ähnliche Komplexe nach einer positiven Selektion für CD34-exprimierende Zellen beobachtet. Demgemäß gibt es eine häufige Vergesellschaftung von AC133⁺ ZNS-SC und CD34⁻ Endothelzellen, die natürlich vorkommen. Der Befund, dass AC133⁺ ZNS-SC perivaskulär sind, passt zu der Hypothese, dass die Neurogenese gleichrangig mit der Angiogenese abläuft.

[0143] Es ist bemerkenswert, dass die humanen fatalen ZNS-SC-Kandidaten im Anschluss an die Injektion in die lateralen Ventrikel von neonatalen Mäusen anwachsen und sich im ganzen Mausgehirn ausbreiteten. Dies ist eine Stufe fortlaufender Neurogenese in der Maus, obwohl das Ausmaß, mit dem sich diese Zellen verteilen, größer ist als man erwarten würde. Insbesondere wurden humane Zellen benachbart zu den ventrikulären Räumen im Hippokampus, im zerebralen Kortex, im Corpus callosum sowie in den zerebellaren Bereichen des Gehirns gefunden (**Fig. 11**). Zudem werden Zellen sowohl in der SVZ (dem Bereich der Selbsterneuerung und Replikation) und entlang des RMS (dem Bereich der Differenzierung und Migration) sowie direkt innerhalb des Riechkolbens in und nahe den Glomeruli olfactorii gefunden. Deshalb fahren die injizierten humanen ZNS-SC mit den Prozessen der Neurogenese an diesen Stellen fort.

[0144] Snyder et al. demonstrieren unter Verwendung von v-myc-immortalisierten Maus- und humanen neuronalen Zelllinien diese breite („globale“) Verteilung von Zellen (Yandava et al., 96 Proc Natl Acad Sci USA 7029-34 (1999)). Hier zeigen wir, dass dies nicht nur eine Eigenschaft von myc-immortalisierten Zellen von muriner Herkunft ist, sondern auch von nicht genetisch modifizierten humanen ZNS-SC.

[0145] Im Gegensatz zur Transplantation mit Teratokarzinomzellen (Trojanowski et al., 122 Exp Neurol 283-94 (1993)) bilden ZNS-SC keine neoplastischen oder hyperplastischen Aggregate, auch wenn sie 7 Monate nach Injektion in eine vollständig permissive Mikroumgebung getestet werden. Deshalb können ZNS-SC-Zellen Entwicklungs- und funktionelle Wege zeigen, die humanen neuronalen Systemen, die nicht durch die Funktionen von Onkogenen modifiziert sind, oder bereits neoplastisch transformierten Zelllinien inhärent sind. Die Isolierung von ZNS-SC bietet mehrere Möglichkeiten für wissenschaftliche Entdeckungen: (i) um die Linien direkt zu beschreiben, die von Zellen an einer bestimmten Stufe oder Differenzierung stammen; (ii) um ein Genexpressionsprofil von ZNS-SC und ihren unmittelbaren Abwärtsnachkommen in vitro oder in vivo zu erhalten; (iii) um zu testen, ob spezifische Genmodifikationen der Zellen ihr Anwachsen, ihre Migration, Differenzierung und/oder funktionelle Integration ermöglichen. Die Isolierung von humanen ZNS-Stammzellen ermöglicht die Transplantation dieser Zellen bei Mausanaloga von humanen Krankheiten als präklinische Tests für ihre Transplantierbarkeit, Differenzierungsfähigkeit und das Fehlen von Tumorigenese, wobei solch eine Transplantation keinen Teil der Erfindung bildet.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Population, die mit menschlichen Zentralnervensystem-Stammzellen angereichert ist, welche Neurosphären (NS-IC) initiieren können, wobei das Verfahren das Selektieren nach Zellen, die an monoklonalen Antikörper AC133 oder an monoklonalen Antikörper 5E12 binden, aus einer Population umfasst, die neurale oder neural-abgeleitete Zellen enthält, welche Population nicht von menschlichen Embryos stammt, um eine mit NS-IC angereicherte Population herzustellen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, das darüber hinaus den Schritt des weiteren Anreicherns der Population durch Selektieren und Eliminieren jener Zellen aus der Population umfasst, die an einen Antikörper binden, der an das CD45-Antigen bindet.

3. Verfahren nach Anspruch 2, gekennzeichnet durch das Selektieren und Eliminieren jener Zellen aus der Population, die an einen monoklonalen Antikörper binden, der an das CD45-Antigen bindet.

4. Verfahren nach Anspruch 1, das darüber hinaus den Schritt des weiteren Anreicherns der Population durch Selektieren und Eliminieren jener Zellen aus der Population umfasst, die an einen Antikörper binden, der an das CD34-Antigen bindet.

5. Verfahren nach Anspruch 4, gekennzeichnet durch das Selektieren und Eliminieren jener Zellen aus der Population, die an einen monoklonalen Antikörper binden, der an das CD34-Antigen bindet.

6. Verfahren nach Anspruch 1, das darüber hinaus den Schritt des weiteren Anreicherns der Population durch Selektieren und Eliminieren jener Zellen aus der Population umfasst, die an einen Antikörper binden, der an das CD45-Antigen bindet, und jener Zellen, die an einen Antikörper binden, der an das CD34-Antigen bindet.

7. Verfahren nach Anspruch 6, gekennzeichnet durch das Selektieren und Eliminieren jener Zellen aus der Population, die an einen monoklonalen Antikörper binden, der an das CD45-Antigen bindet, und jener Zellen, die an einen monoklonalen Antikörper binden, der an das CD34-Antigen bindet.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, das darüber hinaus den Schritt des weiteren Anreicherns der Population durch Eliminieren jener Zellen aus der Population umfasst, die in der Lage sind, an monoklonalen Antikörper 8G1 zu binden.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Antikörper fluorochromkonjugiert sind.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Antikörper an magnetische Partikel konjugiert sind.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Selektieren durch Durchflusszytometrie er-

folgt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Selektieren durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung oder Hochgradienten-Magnet-Selektion erfolgt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Population, die neurale oder neural-abgeleitete Zellen enthält, aus irgendeinem Gewebe erhalten wird, das zu neuralem Gewebe führt.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Population, die neurale oder neural-abgeleitete Zellen enthält, neurales Gewebe ist.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Population, die neurale oder neural-abgeleitete Zellen enthält, von neuralem Gewebe losgelöst ist.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Population, die neurale oder neural-abgeleitete Zellen enthält, aus einer neuronalen Zellkultur erhalten wird.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei die Population, die neurale oder neural-abgeleitete Zellen enthält, aus einer Neurosphärenkultur oder einer anhaftenden neuronalen Stammzellkultur erhalten wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die anhaftende neurale Stammzellkultur eine anhaftende Monoschichtkultur ist.

19. Verfahren zum Isolieren einer Neurosphären initiiierenden Stammzelle (NS-IC), umfassend das Herstellen einer mit AC133⁺- oder 5E12⁺-Zellen angereicherten Population nach Anspruch 1, Einbringen wenigstens einer der AC133⁺- oder 5E12⁺-Zellen in ein Kulturmedium, das in der Lage ist, das Wachstum der Neurosphären initiiierenden Stammzelle (NS-IC) zu fördern, und Proliferieren der AC133⁺- oder 5E12⁺-Zelle im Kulturmedium.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die neurale Zellkultur ein Kulturmedium umfasst, das in der Lage ist, das Wachstum von NS-IC zu fördern, umfassend einen Wachstumsfaktor, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Leukozyten-Inhibitions-Faktor (LIF), epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF-2) und Kombinationen daraus besteht.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei das Kulturmedium, das in der Lage ist, das Wachstum von NS-IC zu fördern, darüber hinaus einen neuronalen Überlebensfaktor (NSF) umfasst.

22. In-vitro-Zellkulturzusammensetzung, umfassend:

- a) eine Population neuronaler Zellen, die gemäß den Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21 erhältlich ist;
- b) ein Medium, das in der Lage ist, das Wachstum der Zellen zu fördern; und
- c) wenigstens einen monoklonalen Antikörper, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus monoklonalem Antikörper AC133 und monoklonalem Antikörper 5E12 besteht.

23. Zusammensetzung nach Anspruch 22, wobei die Population wenigstens 50% AC133⁺ oder 5E12⁺ Neurosphären initiiierende Zellen (NS-IC) umfasst, die positiv auf Nestin anfärben und in der Gegenwart von Differentiation initiiierenden Bedingungen Nachkommen bilden, die in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren.

24. Zusammensetzung nach Anspruch 23, die darüber hinaus einen festen Träger umfasst, auf dem die Zellen aufgebracht sind.

25. Zusammensetzung nach Anspruch 23, wobei die Population der Zellen wenigstens 70% Zellen umfasst, die an monoklonalen Antikörper AC133 oder an monoklonalen Antikörper 5E12 binden.

26. Zusammensetzung nach Anspruch 23, wobei die Population der Zellen wenigstens 90% Zellen umfasst, die an monoklonalen Antikörper AC133 oder an monoklonalen Antikörper 5E12 binden.

27. Zusammensetzung nach Anspruch 23, wobei die Population der Zellen im Wesentlichen eine reine Population ist.

28. Zusammensetzung nach Anspruch 23, wobei das Medium ein serumfreies Medium umfasst, das einen oder mehrere festgelegte Wachstumsfaktoren enthält, die wirksam sind, die Proliferation multipotenter neuraler Stammzellen zu induzieren.

29. Zusammensetzung nach Anspruch 23, wobei das Medium darüber hinaus einen Wachstumsfaktor umfasst, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Leukozyten-Inhibitions-Faktor (LIF), epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF-2) und Kombinationen daraus besteht.

30. Zusammensetzung nach Anspruch 23, wobei das Medium darüber hinaus einen neuronalen Überlebensfaktor umfasst.

31. Zusammensetzung nach Anspruch 23, wobei die neuronalen Zellen menschlich sind.

32. Verfahren, das die Herstellung einer Population, die mit menschlichen Zentralnervensystem-Stammzellen angereichert ist, welche Neurosphären (NS-IC) initiieren können, nach Anspruch 1 und die Herstellung eines Medikaments zur Transplantation in einen Wirt unter Verwendung der Population umfasst.

33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei die Population in einem Kulturmedium proliferiert worden ist.

34. Verfahren nach Anspruch 32, wobei die Transplantation in das Zentralnervensystem erfolgt.

35. Verfahren nach Anspruch 32, wobei die Transplantation in ein Gebiet außerhalb des Zentralnervensystems erfolgt.

36. Verfahren, das die Herstellung einer Population, die mit menschlichen Zentralnervensystem-Stammzellen angereichert ist, welche Neurosphären (NS-IC) initiieren können, nach Anspruch 1 und die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Störung des Zentralnervensystems unter Verwendung der Population umfasst.

37. Verfahren nach Anspruch 36, wobei die Störung des Zentralnervensystems aus einer Gruppe ausgewählt ist, die aus neurodegenerativen Erkrankungen, akuter Gehirnschädigung und ZNS-Dysfunktion besteht.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

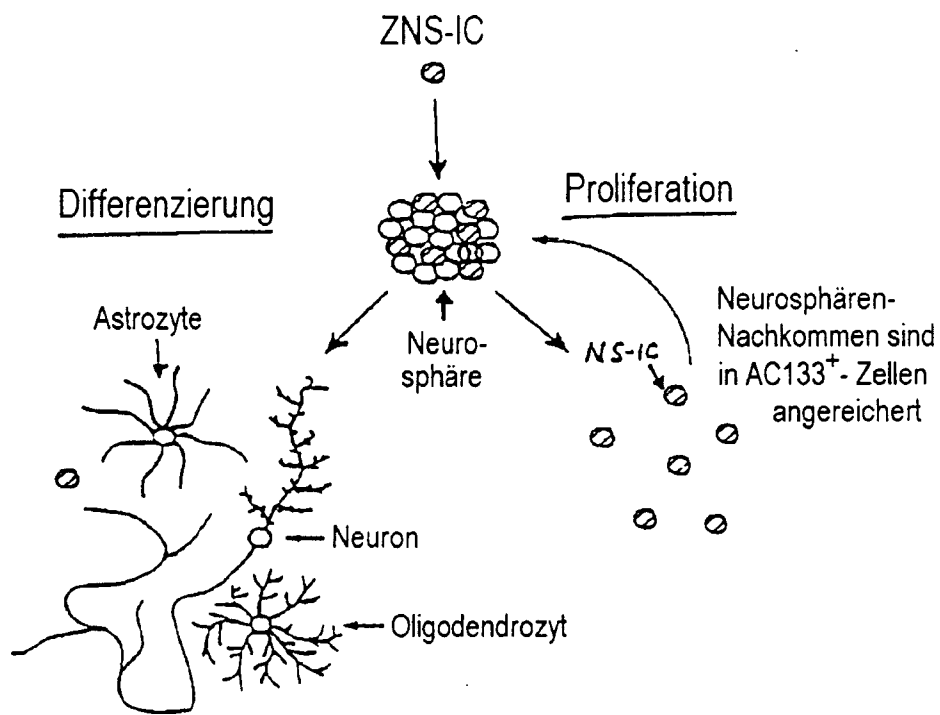
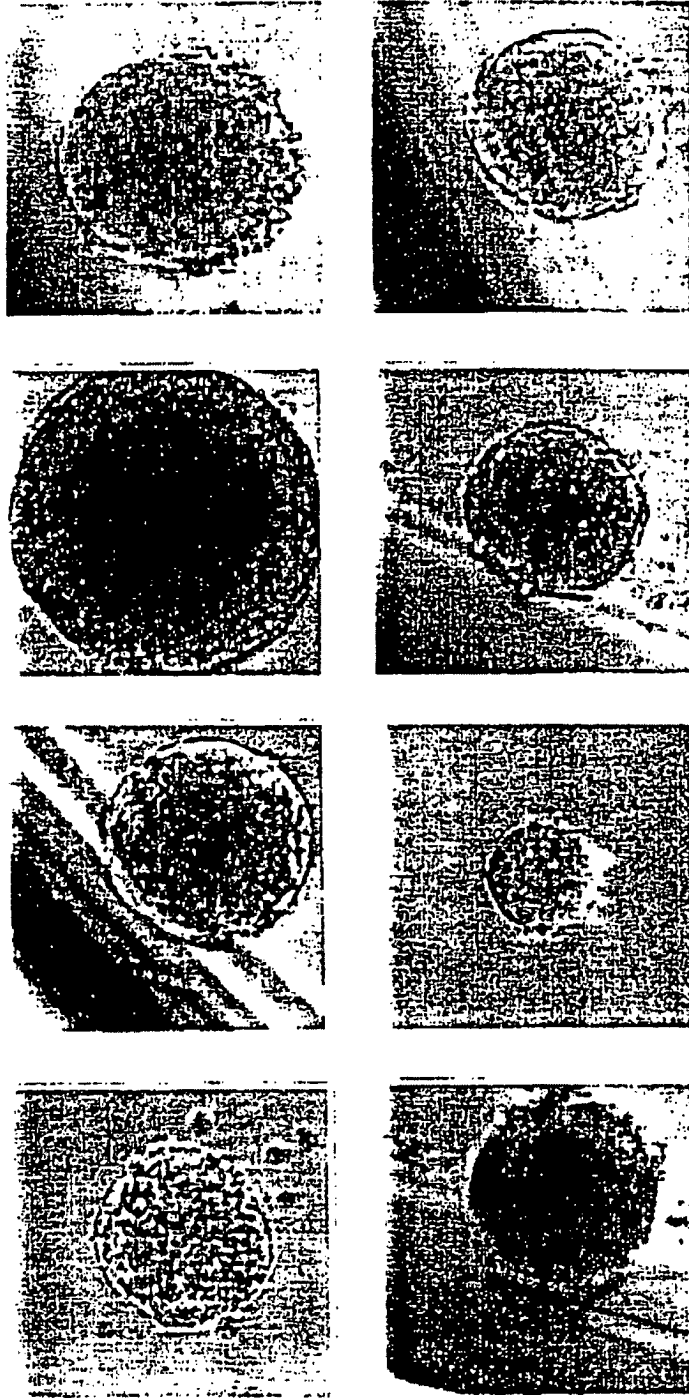


FIG. 1

Klonale Expansion von neuralen Stammzellen/Progenitorzellen

Neurosphärenzellen können aus einzelligen sortierten 5F3⁺-Zellen abgeleitet werden

Woche 8 NS-IC, 1 Zelle/Well



FBR 1209 (16. Schwangerschaftswoche)

FIG. 2

20x

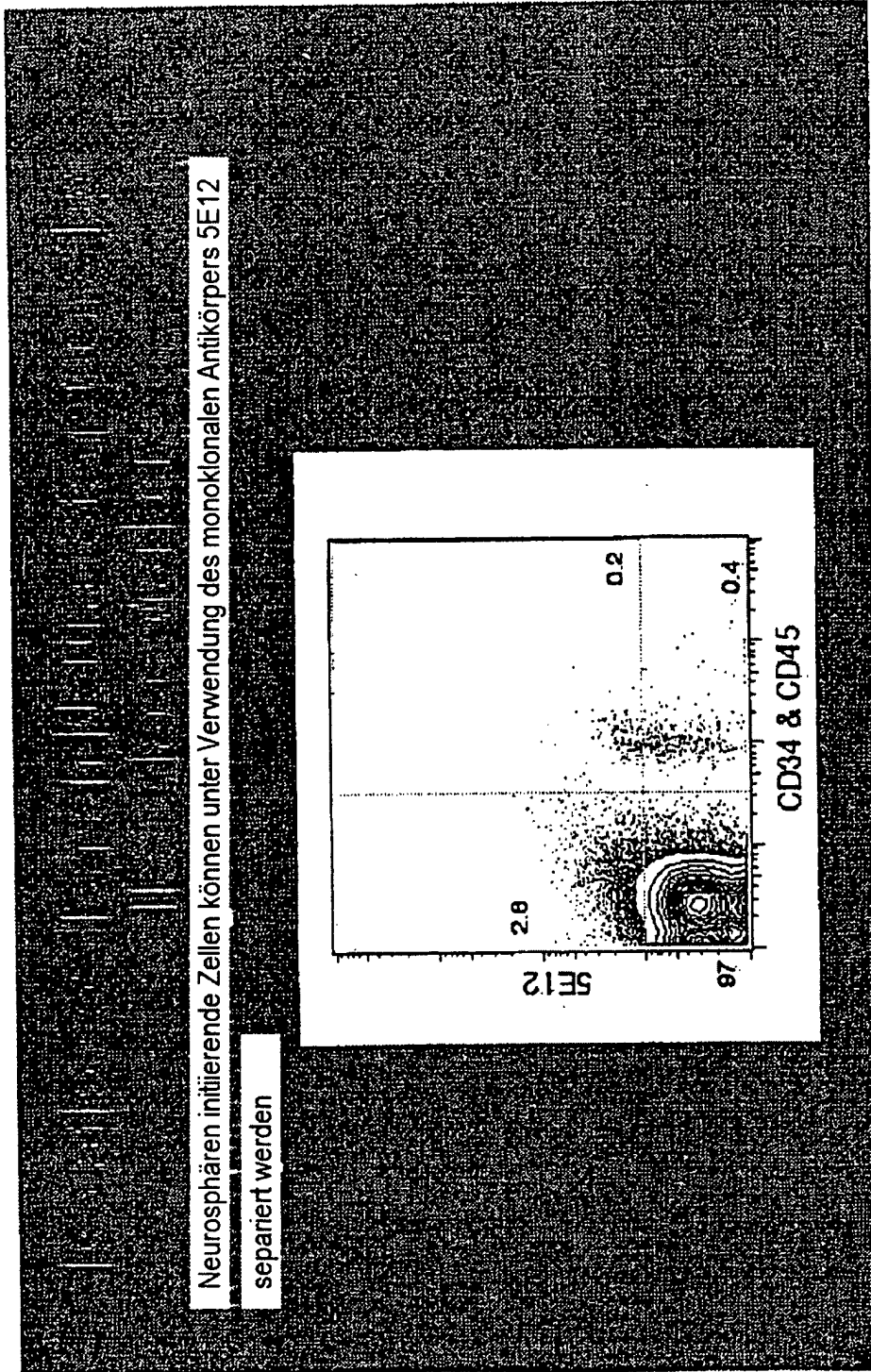
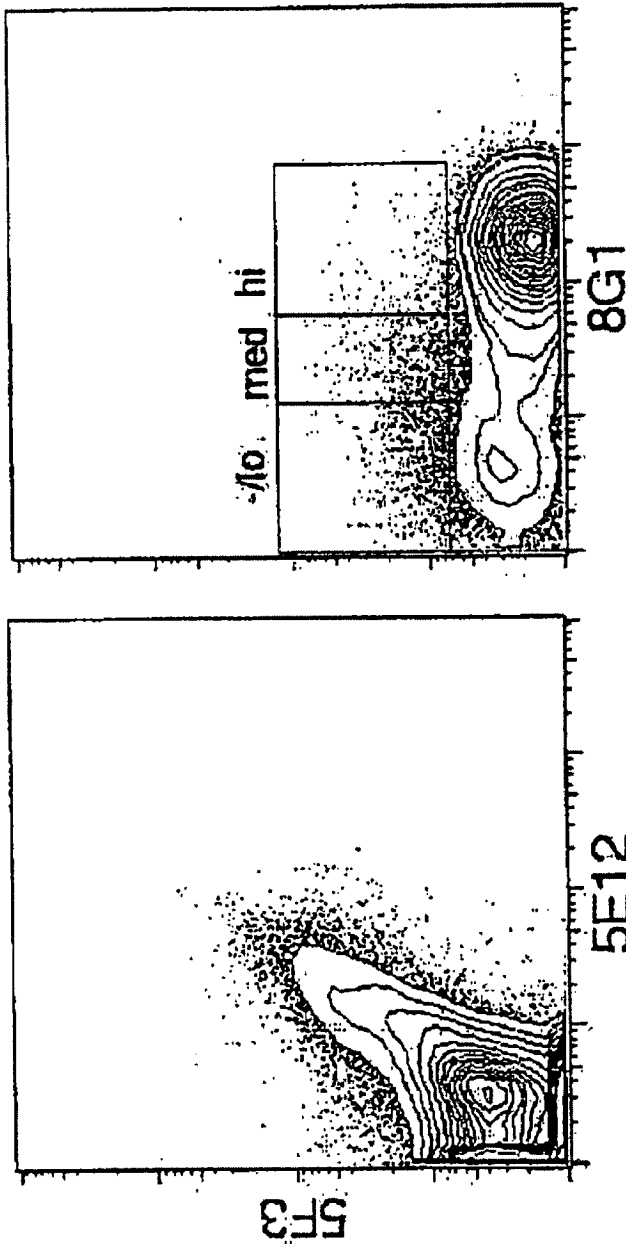


FIG. 3



B

A

FIG. 4

Verteilung von 5F3⁺-Zellen in sich entwickelndem Gehirn

- ◆ Die Häufigkeit von 5F3⁺-Zellen ist bei späteren Schwangerschaftsaltern geringer.
- Extensive Proliferation von Nicht-Stammzell-Kompartimenten?
- Wird zusätzlicher Oberflächenmarker für Teilmenge der 5F3⁺-Zellen benötigt?

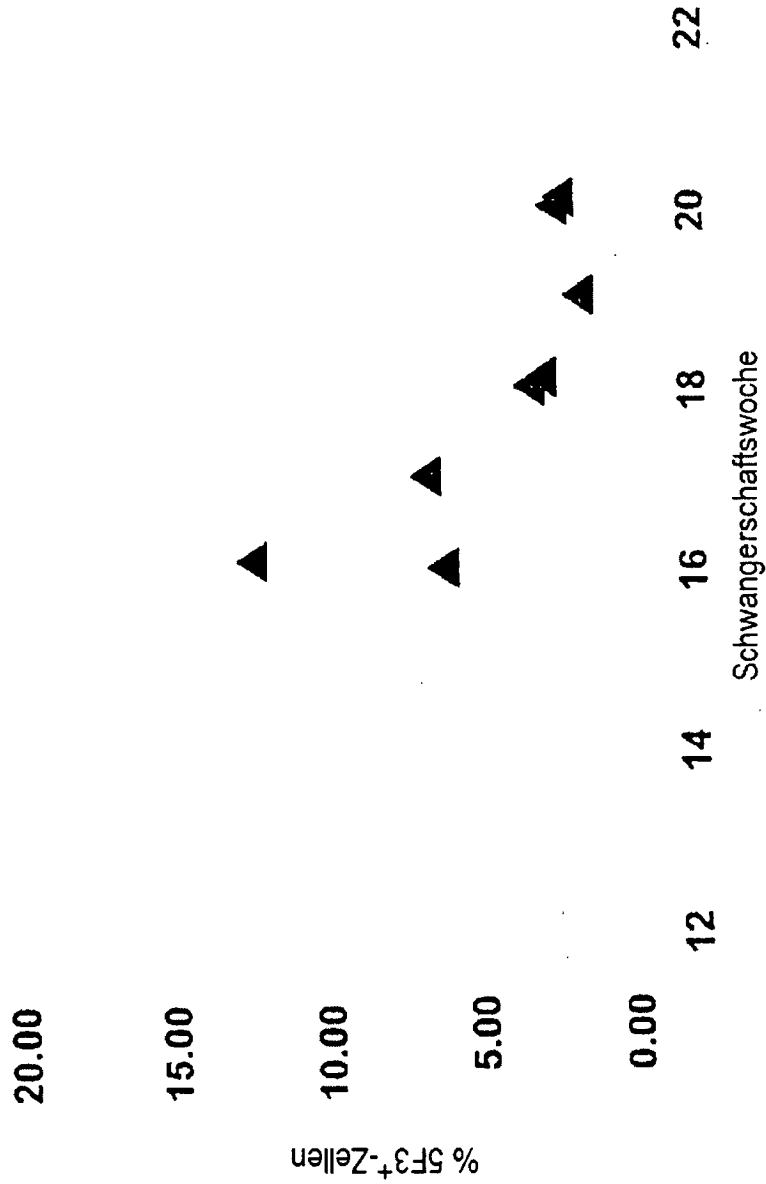


FIG. 5

In-vivo-Studien: Transplantation in NOD-SCID-Maus

Humane neurale Zellen können in die lateralen Ventrikel von neonatalen immundefizienten Mäusen

- Anwachsen und Migration von humanen Neurosphärenzellen wurden zwischen 4 bis 8 Wochen nach der Injektion unter Verwendung eines humanspezifischen Thy-1-Antikörpers ermittelt

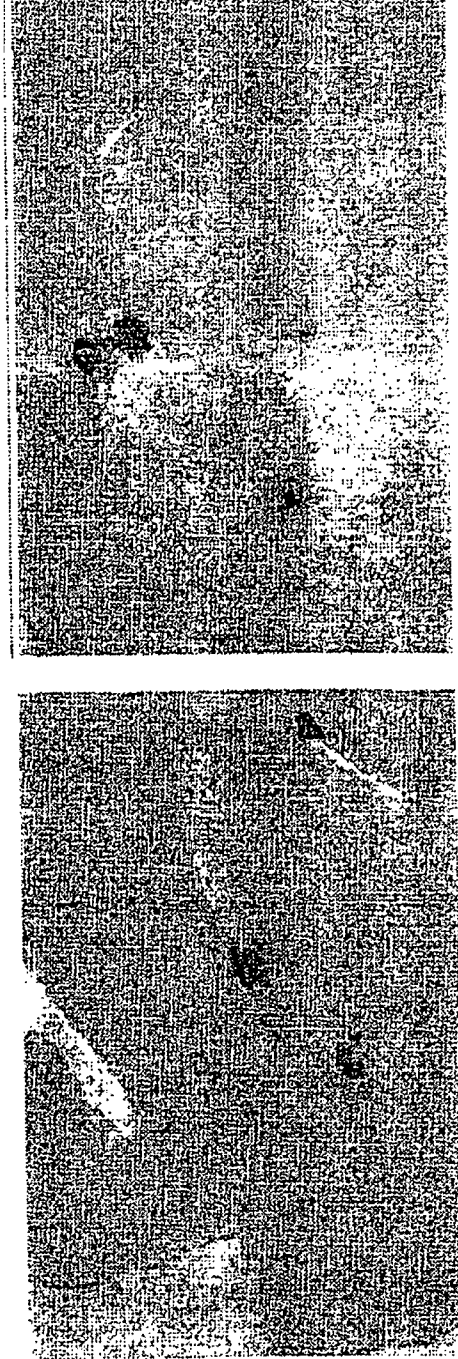
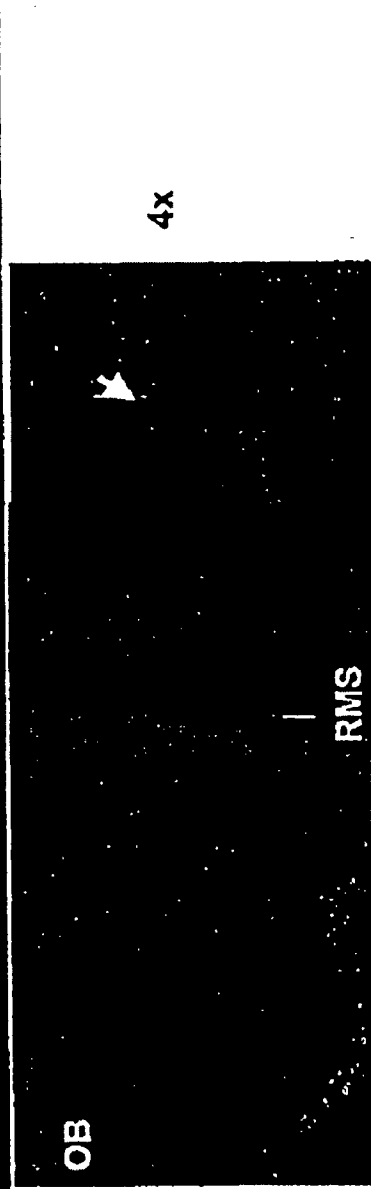


FIG. 6

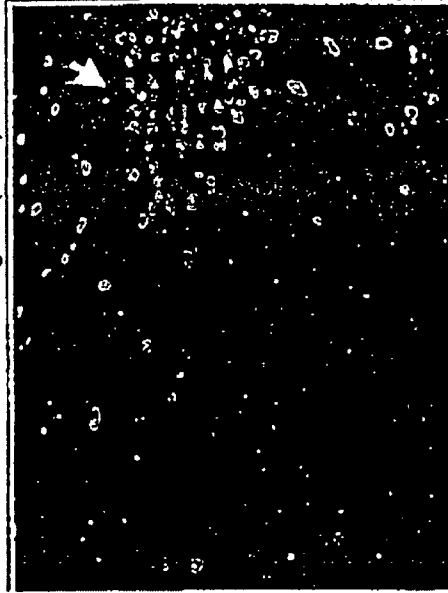
Nachkommen von 5F3 -sortierten Zellen wandern durch den RMS



humanes β -Tubulin im RMS (20x)



Human-Zellkern-Antigen (20x)



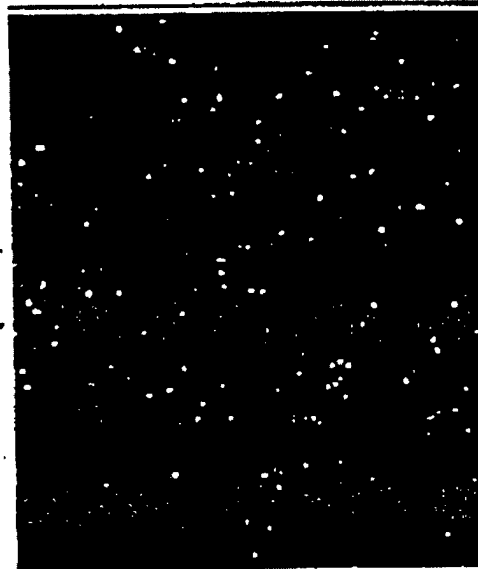
+ sortierte Neurosphärenzellen (p8), 7 Monate nach Transplantation
FIG. 7

Migration von humanen neuronalen Zellen in den Riechkolben

Nachkommen von 5F3⁺-sortierten Neurosphärenzellen wandern durch den RMS in den Riechkolben

Human-Zellkern-Antigen

(10x)



(40x)



5F3⁺-sortierte Zellen (p8), 7 Monate nach Transplantation

FIG. 8

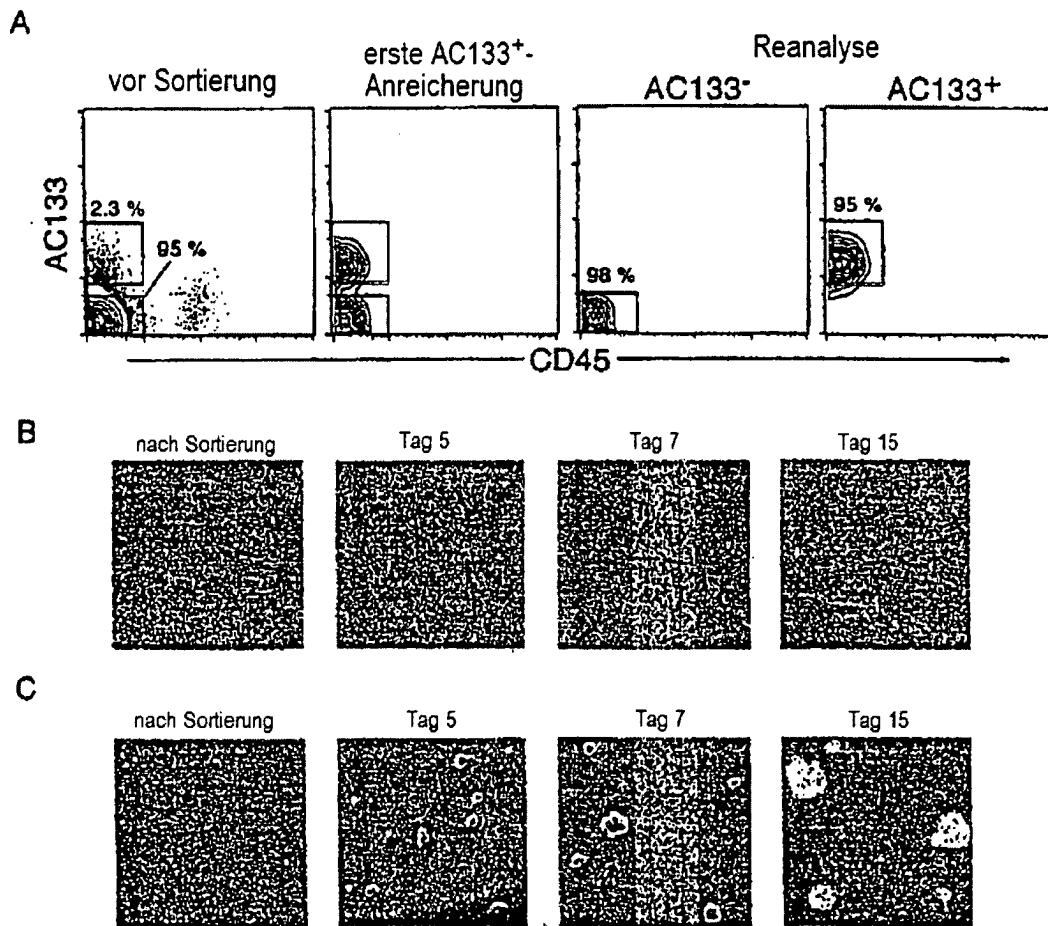


FIG. 9

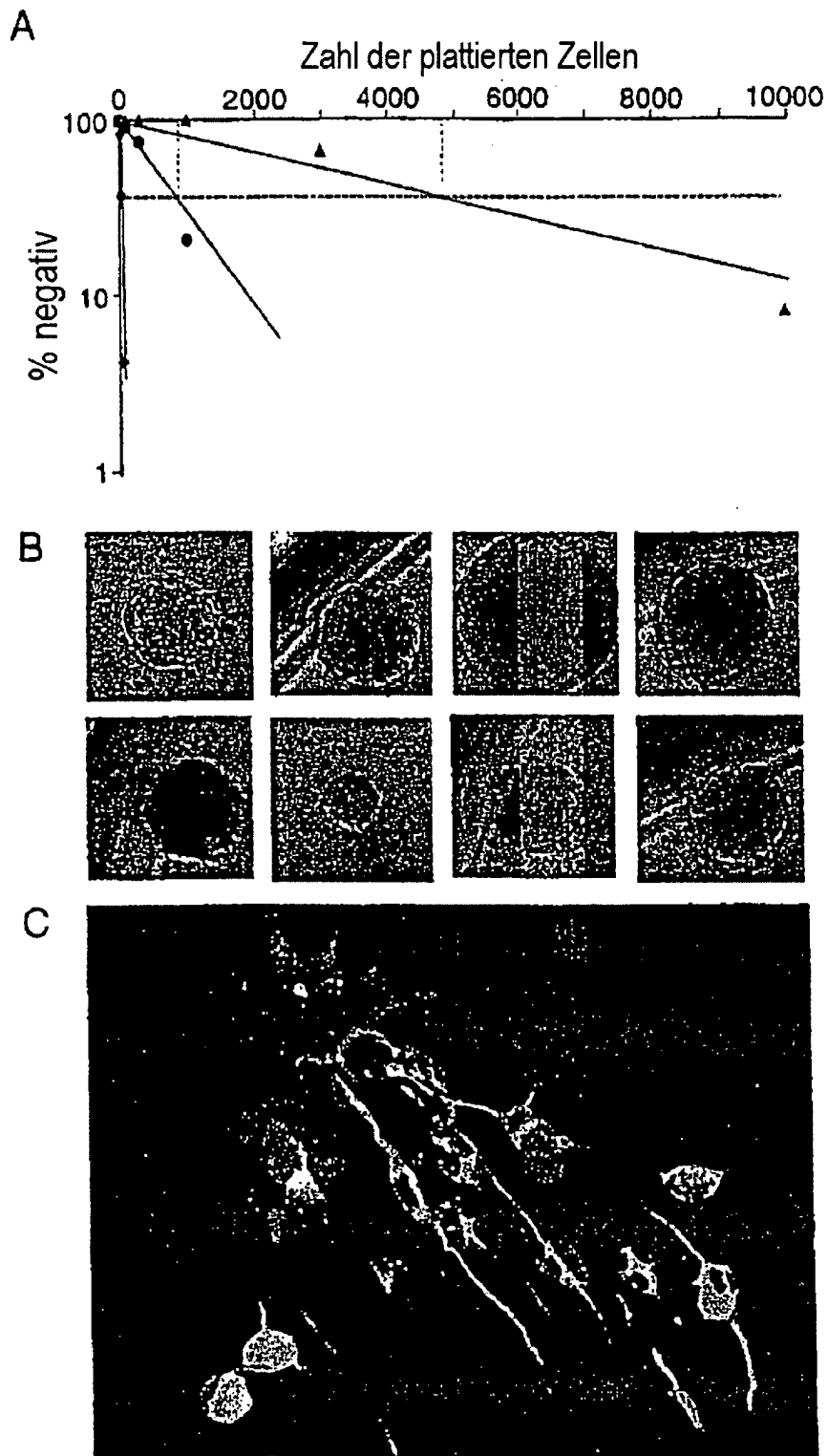


FIG. 10

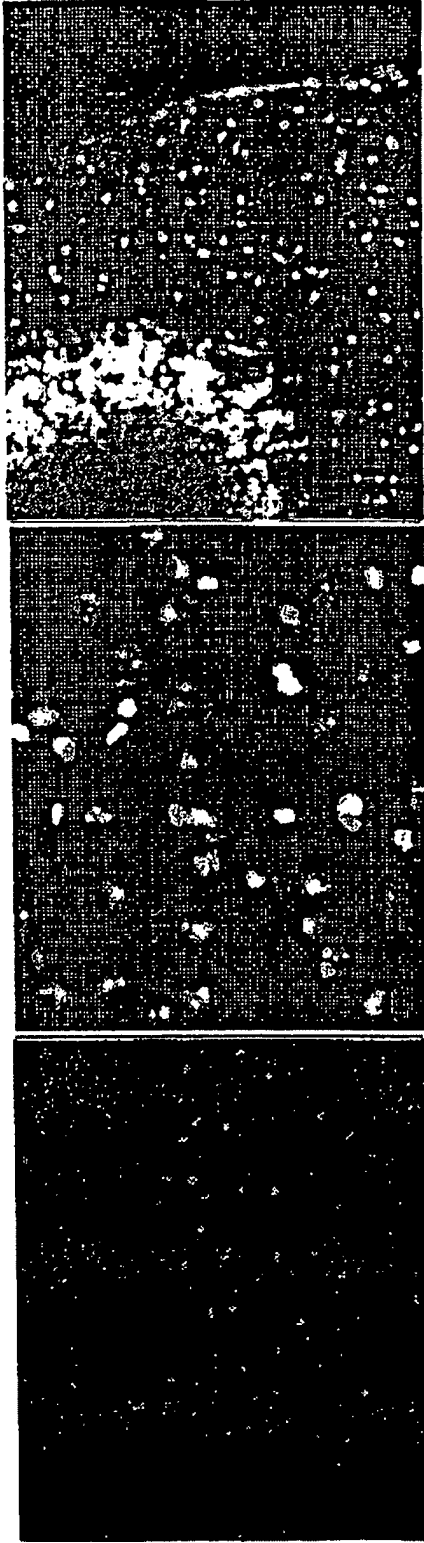
Detektion von humanen neuronalen Zellen an nicht-neurogenen Stellen

in einigen Fällen wurden in neonatales Gehirn von NOD-SCID-Mäusen injizierte Zellen im Corpus callosum, im zerebralen Kortex und im Zerebellum detektiert

Corpus callosum
(20x)

zerebraler Kortex
(40x)

Zerebellum
(20x)



(nicht-illustrativ)

FIG. 11

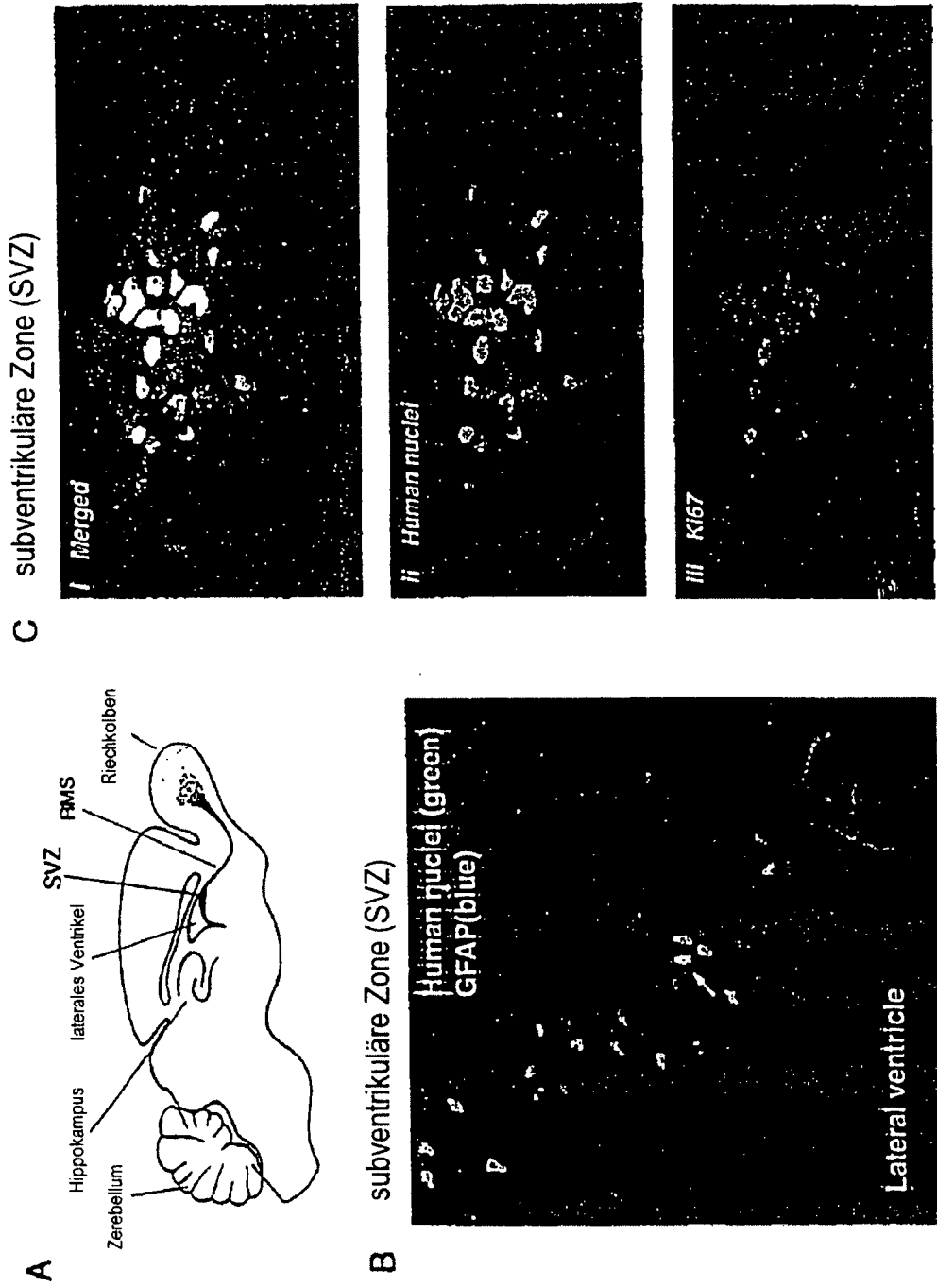
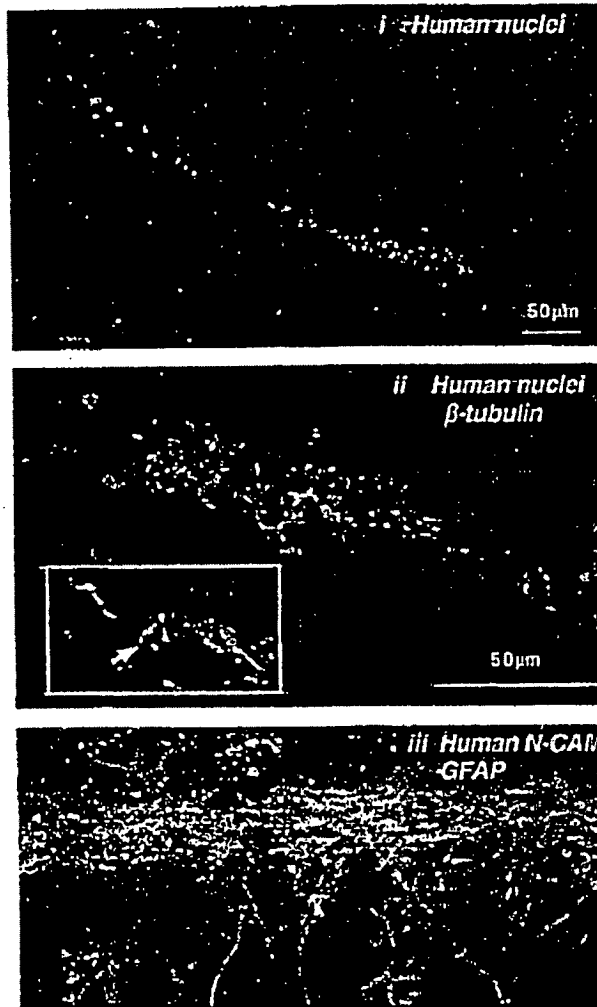


FIG. 12 (nicht-illustrativ)

A Rostromigratorischer Strom (RMS)



B Riechkolben

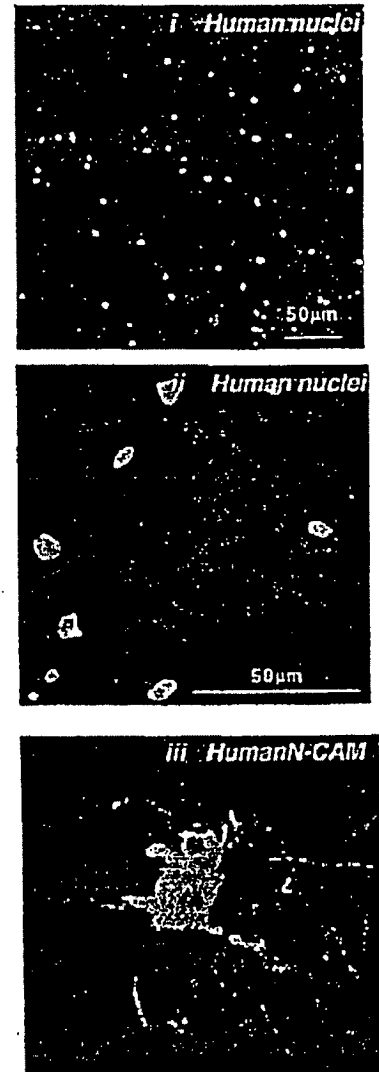
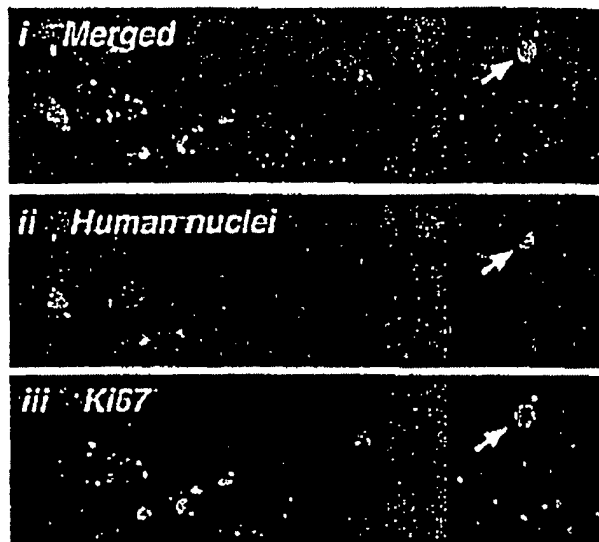


FIG. 13 (nicht-illustrativ)

Hippokampus

A



B

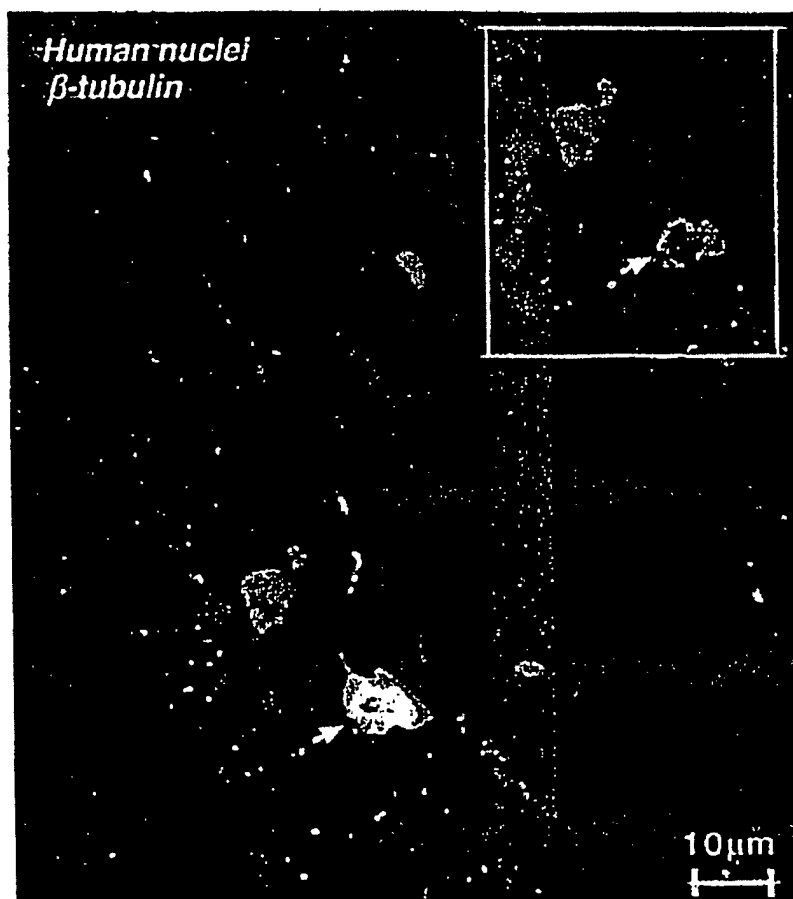


FIG. 14 (nicht-illustrativ)