

33276  
**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**



1991

= 56117 -

52.435/SZE

Eljárás oligodendrocita citotoxikus faktor előállítására

Yeda Research and Development Co., Rehovot, Izrael

A bejelentés napja: 1990.08.28.

Elsőbbsége: 1989.08.28(90459) Izrael

KIVONAT

A találmány új oligodendrocita faktorról, ennek sóival, prekurzoraival, fragmentumaival és homológjaival, valamint ezen faktor funkcionális származékaival és ezek fragmentumaival és homológjaival, valamint ezek előállítási eljárásaival foglalkozik. Ezek szelektíven toxikusak az oligodendrocita vonalra. Az ezeket tartalmazó gyógyászati kompozíciók alkalmasak a központi idegrendszer sérült idegeinek regenerálására emlősökben.

*Földes*

5507/90.

1991

52.435/SZE

S.B.G. & K.  
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI  
ÉS SZABADALMI IRODA  
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.  
TELEFON: 183-3733

-56117-

NR305 CO7K3/20  
AGAK 57/94

KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY

A

ELJÁRÁS OLIGODENDROCITA CITOTOXIKUS FAKTOR  
ELŐÁLLÍTÁSÁRA

YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD., REHOVOT,

IZRAEL

Feltalálók: SCHWARTZ Michal, NEVE METZ

COHEN Avi, REHOVOT, IZRAEL

A bejelentés napja: 1990.08.28

Elsőbbsége: 1989.08.28(91459) IZRAEL

A jelen találmány egy új oligodendrocita inhibitor/citotoxikus faktorról foglalkozik, amely képes csökkenést előidézni a nyúlvány-hordozó oligodendrociták számá**ban**. Az új faktor a központi idegrendszer sérült idegei regenerálódásának fokozására alkalmas emlősökben.

Az emlős központi idegrendszerben (CNS) a neuronok nem regenerálják spontán a sérült axonokat, míg a hal és kétéltű neuronok könnyen regenerálják axonjaikat. Az emlős CNS-nek az a tulajdonsága, hogy regenerálni képtelen, úgy tűnik, nem CNS neuronjai belső tulajdonságainak eredménye, hiszen ezek a neuronok képesek jelentős axonális regenerálódást előidézni in vivo egy perifériális idegpályán. In vitro készítményekben a sérült emlős CNS axonok nem növekednek emlős látóideg szegmensein vagy szegmenseiben, viszont növekednek hal látóideg szegmensein vagy szegmenseiben, vagy emlős perifériás idegekben. A különbségek így valószínűleg a különböző környezetben vannak: az emlős CNS környezete nem támogatja a növekedést, a perifériás idegek vagy a hal látóidegek környezete viszont támogatja a növekedést.

A látóideg kedvező modell a glia-sejtek szerepének tanulmányozására az axonok regenerálására, mivel neuron-sejt testek nincsenek jelen és az ideg fogékony a sérülésre. A patkány látóidegek celluláris komponensei között vannak a makrogliák (asztrociták és oligodendrociták) és mikrogliák (amőboid és szétágazó mikrogliák). Az asztrociták két csoportra oszlanak, amelyek antigén-jellemzőikben különböznek egymástól: a proto-plazmák vagy 1. típusú asztrociták Ran2+, GFAP+ és A<sub>2</sub>B<sub>5</sub>-fenotípusúak, míg a rostos vagy 2. típusú asztrociták Ran2-, GFAP+,

$A_2B_5+$  fenotípusúak [Miller és Raff (1984); Raff és Miller(1984)]. A 2. típusú asztrocitáknak és oligodendrocitáknak közös őse (progenitor) sejtje van (az O-2A progenitor), amelynek fenotípusa  $Ran2-$ ,  $GFAP-$ , és  $A_2B_5+$ . Az oligodendrocita/2. típusú asztrocita vonal (amely az O-2A progenitorból ered) az axonok mielinációjára van specializálva: az oligodendrociták termelik a mielint és a 2. típusú asztrociták a Ranvier-csomók szerkezetéhez járulnak hozzá. Az O-2A progenitor sejtekkel el lehet érni, hogy ezek a tenyésztő tápközegtől függően *in vitro* differenciálódjanak vagy oligodendrocitákká, vagy 2. típusú asztrocitákká. Az 1. típusú asztrocitáknak más progenitor sejtje van.

A nem-neuron sejtek részt vesznek a CNS környezetének kialakításában és ezek felelősek a CNS regenerálódás hiányosságaiért is emlősökben. Ezek között találjuk az asztrocitákat, amelyek túltengése rostos forradást alakít ki a sérülésre adott válaszban, és az oligodendrogliaikat, amelyek gátolják az axon növekedést. Az asztrocitás forradás nagyrészt 1. típusú asztrocitákból áll, és úgy tekinthető, hogy megakadályozza a növekedést, fizikai gátat képezve. A forradásképződés időbeli lefolyása hosszú, az azonban valószínűtlennek látszik, hogy a forradás által kialakított gát megakadályozná a regeneratív axon növekedést a közvetlen trauma utáni időszakban. Az 1. típusú asztrocitákról patkány látóidegben kimutatták, hogy laminint, vagyis egy, az axon keletkezés támogatásában érdekelt molekulát fejez ki a látóideg prenatális kifejlődése során. Az emlős felnőtt agy 1. típusú asztrociták normálisan nem fejeznek ki laminint, csak átmenetileg, az agy sérülése után. Ezzel ellentétben a regeneratív hal látóidegben folyamatosan fejeződik ki la-

minin. Az in vitro preparátumokban az axonok az 1. típusú asztrocitákkal nőnek közeli kapcsolatban.

Az érett oligodendrocitákról úgy hisszük, hogy nem engedik meg az axon növekedést. A növekvő axonok elkerülik az érintkezést az érett oligodendrocitákkal in vitro. A kifejlődés során az axon növekedés zöme a látóidegben már születés előtt lezajlik, mielőtt bármiféle oligodendrocita differenciálódott volna. Ennél fogva úgy tűnik, hogy az emlősökben az axon-regenerálódást gátolja mind az érett oligodendrociták jelenléte, amelyek nem engedik az axon növekedést, mind az 1. típusú reaktív asztrociták jelenléte, amelyek nélkülözik a segítő elemeket, ellentétben a hal látóideggel.

A jelen találmány feltalálójának és másoknak korábbi munkái kimutatják, hogy az alacsonyabbrendű gerincesek CNS-e, elsősorban a regeneráló hal látóideg, olyan faktorok forrása, amelyek, amikor megfelelő időben és megfelelő mennyiségben alkalmazzuk a sérült felnőtt emlős látóidegekhez, elősegíthetik az axon-növekedést [Schwartz és munkatársai (1985); Hadani és munkatársai (1984); Lavie és munkatársai (1987); Cohen és munkatársai (1989)].

Robbins és munkatársai (1987) beszámolnak arról, hogy patkány asztrociták in vitro stimulálása olyan citotoxikus faktor kialakítását eredményezi, amely funkcionálisan hasonló a tumor nekrosis faktorhoz. Beszámolnak arról is, hogy a humán rekombináns tumor nekrosis faktornak patkány oligodendrociták ellen irányuló citotoxikus aktivitása van. Selmaj és munkatársai (1988) rekombináns humán tumor nekrosis faktor (rhTNF) olyan irányú vizsgálatáról számolnak be, hogyan hat ez az anyag egér gerinc<sup>velő</sup>szövet mielinált tenyészetére. Úgy találják, hogy az rhTNF

késleltetett indítású oligodendrocita nekrozist és bizonyos típusú mielin kitágítást indukál.

A világszerte folyó jelentős kutatási erőfeszítések ellenére eddig még nem fejlesztettek ki biztos és hatékony eszközt a CNS regenerálódás kialakítására emlősökben és főként emberben. Ilyen eszköz, főleg egy olyan gyógyszer, amelyet injektálni lehetne a regenerálódás kívánt helyére, nagyon kívánatos lenne, hogy csökkenthessük a baleset utáni két végtagi vagy négy végtagi bénulások, vakság, sükettség, sebészeti beavatkozással társuló axotómia, stb. kialakulásának esélyeit.

Az alábbiakban röviden összefoglaljuk a találmány lényegét.

A találmány az OCF-nek nevezett oligodendrocita citotoxikus faktorról foglalkozik, amely szelektív citotoxikus hatást mutat az oligodendrocita vonalra, de nem hat más sejtekre, pl. az 1. típusú asztrocitákra és a fibroblaszt sejtekre. A találmány foglalkozik továbbá az OCF sóival, prekursoraival, fragmentumaival és/vagy homológjaival és az OCF-nek és/vagy fragmentumainak és/vagy homológjainak funkcionális származékaival is.

A találmány foglalkozik az OCF izolálásának eljárásával különböző forrásokból, pl. regeneráló hal látóidegből, makrofágokból és más celluláris forrásokból, foglalkozik továbbá ennek tisztításával.

Egy további formájában a találmány foglalkozik az OCF elleni poliklonális és monoklonális antitestekkel.

Egy további kiviteli módjában a találmány OCF előállításával foglalkozik genetikai manipulációs technikákkal.

A jelen találmány foglalkozik az OCF, valamint sói, prekursorai, fragmentumai és/vagy homológjai, továbbá az OCF funkcionális származékai és ezek fragmentumai vagy homológjai al-



kalmazásával a CNS idegeinek regenerálása emlősökben. A találmány ismerteti az erre a célra készült gyógyászati készítményeket.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a szabadalmi leírás ábráit.

Az 1. ábra bemutatja a hal CM-R hatását felnőtt, 04 pozitív sejtekre felnőtt sérült patkány látóideg tenyészetében. A felnőtt patkány látóidegekből a sejteket úgy készítjük, hogy a látóidegeket 3 nappal a kimetszés előtt összezúzzuk és poli-L lizinnel burkolt fedőlemezekre ültetjük meghatározott tápközegben. A tenyészetet a 96. órában in vitro megfestjük 04 immunreaktivitásra közvetett immunfluoreszcens eljárással, amelyet a következőképpen hajtunk végre. A sejteket először egér anti-04 antitestekkel inkubáljuk 30 percen át, majd 30 percen át inkubáljuk fluoreszceinnel konjugált kecske anti-egér IgM-mel. A második inkubálás végén a sejteket mossuk és hideg metanollal ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) rögzítjük 10 percen át. Az (a) és (b) panelek a kontroll sejtek fluoreszcens-, illetve fázismikroszkópos képét mutatják be meghatározott tápközegben bármiféle kezelés nélkül. A (c), (e), (f) és (g) panelek 04 pozitív sejteket mutatnak be tenyészetekben, amelyek CM-R-rel ( $12\ \mu\text{g}$  fehérje/ml) voltak kezelve 48 órával a megfestés előtt. A (c) és (d) panelek ugyanazon sejtek fluoreszcens- illetve fázismikroszkópos képét mutatják. A képek egy kísérletből készültek; ezek eredményeit két további kísérletben igazoltuk.

A 2. ábra a CM-R hatását mutatja be 1 napos patkány agyából származó Gabc pozitív sejtek in vitro fejlődésére. Az újszülött patkányokból az agyat kivágjuk és szétbontjuk McCarthy és DeVellis eljárása szerint. 8 nap után (in vitro) az oligo-



dendrocitákat kiszabadítjuk és poli-L-lizinnel burkolt fedőlemezre oltjuk ( $10^4$  sejt/üreg mikrotitráló lemezen). Az in vitro tenyészeteket 24, 48 és 72 órás korokban festjük Galc immunreaktivitásra a közvetlen immunfluoreszcens technikával, fluoreszcinnel konjugált kecske anti-egér IgM-et alkalmazva. A kísérleti tenyészetekhez CM-R-t (1,2 és  $12 \mu\text{g}$  fehérje/ml) adunk a nyíllal jelzett időpontokban a fedőlemezre oltástól számítva. A Galc pozitív sejtek konkrét számát a teljes fedőlemezen számoljuk (az egyes napi oszlopok fölötti számok). A kontroll tenyészetekben a Galc pozitív sejtek száma viszonylag állandó marad a kísérlet során (24-72 óra), ez mintegy 700-850 sejt. Emelítésre érdemes a gátló hatás hiánya az érett oligodendrociták fejlődésére a tenyészetben minden periódusban, amikor a CM-R-t  $1,2 \mu\text{g}$  fehérje/ml koncentrációban adjuk a tápközegbe az oltáskor. Határozott (több, mint 50%) gátló hatást figyelünk meg, amikor  $12 \mu\text{g}$  fehérje/ml koncentrációban adunk CM-R-t az oltáskor. Amikor a CM-R-t 24 óra múlva adjuk az in vitro tenyészethez az oltástól számítva, az oligodendrocitaérés csaknem 50%-os gátlása lép fel a további 24 órás in vitro tenyésztés során; ez a hatás azonban átmenetinek látszik. Ezt a kísérletet kétszer ismételjük meg, ezek kvalitatívan ugyanazokat az eredményeket adják (ezeket az ábrán nem tüntetjük fel). A 2. ábra azt is bemutatja, hogy a gátló hatás reprodukálható akkor is, amikor a Galc pozitív sejtek számát immunfluoreszcencia helyett ELISA-val határozzuk meg. A 2. ábra bemutat egy dózis-függési görbét is, vagyis a gátló aktivitást az alkalmazott CM-R mennyiségének függvényében.

A 3. ábra összehasonlítást mutat be a CM-R és a CM-N hatása között a Galc pozitív sejtekre újszülött patkány agy

oligodendrocitáinak tenyésztésében. Az oligodendrociták tenyésztésében. Az oligodendrociták tenyésztéseit ugyanúgy készítjük el, mint fentebb, és soküreges lemezre oltjuk ( $10^3$  sejt/mikrotitráló lemez). 24 órás in vitro tartás után a jelzett koncentrációban hozzáadjuk a CM-R-t vagy CM-N-et. 48 órával később a sejteket megvizsgáljuk, először Galc antitestekkel  $37^\circ\text{C}$  hőmérsékleten 30 percen át inkubálva ezeket, majd kecske anti-egér antitestekhez konjugált torma-peroxidázzal (HRP-GAM, Bio-Makor, Izrael) inkubálva további 30 percen át  $37^\circ\text{C}$  hőmérsékleten. A kötött antitestek mennyiségének meghatározását úgy végezzük el, hogy a sejteket mossuk, és hozzáadunk  $100\ \mu\text{l}$  szubsztrátumot [2,2-azino-di(3-etil-benzotiazolin-szulfát)(Sigma)] minden egyes üreghez. Az abszorpciót Titertech Multiskan MMC-ben mérjük meg  $630\ \text{nm}$  referencia hullámhosszon. Minden oszlop 3 üreg átlagát ( $\pm\text{SD}$ , vagyis standard eltérés) képviseli. Az összehasonlításhoz mellékelt betét azokat az eredményeket mutatja, amelyet a fedőlemezenkénti Galc pozitív sejtek számának meghatározásával kaptunk olyan tenyészetekben, amelyeket vagy CM-R-rel ( $12\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ), vagy CM-N-nel ( $12\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) kezelünk, 24 órás in vitro tenyésztés után hozzáadva és 48 órával később megvizsgálva.

A 4. ábra az összehasonlítást mutatja be a PDGF és CM-R hatásai között az újszülött patkány agy oligodendrocitákra. Az oligodendrocitákat az újszülött patkány agyából olyan módon kapjuk meg, ahogyan a 2. ábra magyarázatánál leírtuk. Az összes tenyészetekben sejtek meghatározott számát oltjuk be. 48 órás in vitro tartás után a tenyészeteket vagy GalC, vagy  $A_2B_5$  pozitív sejtekre festjük meg. A kezelt tenyészetekhez vagy PDGF-et ( $5\ \text{mg}/\text{ml}$ , Sigma), vagy CM-R-t ( $12\ \mu\text{g}$  fehérje/ml) adunk a beoltás



időpontjában. Kontrollként olyan tenyészeteket alkalmazunk, amelyek meghatározott tápközegben tartun, de amelyeket nem kezelünk. A féuoreszcens mikroszkópos kép az egér  $A_2B_5$  monoklonális antitestekkel festett, kontroll tenyészetekben levő sejteket (b), a PDGF-fel kezelt tenyészeteket (a), vagy a CM-R-rel kezelt tenyészeteket (d) mutatja be. A (c)-ben levő oszlop-diagram az  $A_2B_5$  vagy Galc pozitív sejtek konkrétan megszámlolt számát mutatja be az egyes kezelések fedőlemezeiben. (Térköz: 10 m).

Az 5. ábra a CM-R és PDGF kombinált alkalmazásának hatását mutatja be Galc pozitív sejtek fejlődésére. Agy oligodendrociták tenyészeteket készítjük el olyan módon, ahogyan ez a 2. és 3. ábrák magyarázatainál leírtuk. Az újszülött patkányagy oligodendrocitákhoz PDGF-et (5 ng/ml) vagy PDGF-et CM-R-rel kombinálva (5 ng/ml, illetve 12 g/ml) adunk az oltás után 24 órával. A jelzett későbbi időpontokban (24, 48, 96 óra) a tenyészeteket megfestjük Galc pozitív sejtekre. A számok a fedőlemezenkénti Galc pozitív sejtek abszolút számát képviselik. Meg lehet figyelni a Galc pozitív sejtek számának csökkenését, amikor a PDGF és a CM-R kombinációjával kezeljük.

A 6. ábra bemutatja, hogy a CM-R szelektíven hat az oligodendrocitákra asztrociták és oligodendrociták kevert, újszülött patkány eredetű tenyészetében. Kevert gliasejteket disszociálunk újszülött patkány agyakból, amint ezt a 2. ábra magyarázatánál leírtuk, és azonnal poli-L-lizinnel borított fedőlemezre oltjuk ( $10^4$  sejt/fedőlemez). Ezeket a sejteket 6 napon át in vitro tartjuk 5% FCS-sel (borjúembrió-szérum) kiegészített DMEM-ben (Dulbecco által módosított Eagle féle tápközeg), amelyet minden 2. napon lecserélünk. A 6. napon a tápközeget meghatározott és vagy CM-R-rel ( $10 \mu\text{g/ml}$ ), vagy CM-N-nel ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) kiegészített tápközegre cseréljük le. Az in vitro tenyésztés 72. és 96. órájában a sejteket kétszeresen jelezzük Galc elleni egér monoklonális antitestekkel és nyúl anti-GFAP-vel, majd speciálisan rodaminnal konjugált kecske anti-egér IgG<sub>3</sub>-mal illetve fluoreszcinnel konjugált kecske anti-nyúl antitestekkel. A fluoreszcens mikroszkópos kép (a) az anti-GFAP-vel festett és CM-R kezeléssel nem befolyásolt 72 órás in vitro kezelés utáni sejteket mutatja be. A (b) mikroszkópos értékelés a Galc pozitív sejtek számát mutatja be az egyes kezelések szerinti fedőlemezeken 72 és 96 órás in vitro kezelés után. Az eredmények két fedőlemez átlagát ( $\pm$ SD) jelentik. A (c) és (d) mikroszkópos képek

a nem kezelt (d) és CM-R-rel kezelt (c) tenyészetek tipikus kevert gliasejtjeinek fázismikroszkópos képei. Megjegyezzük, hogy a nem-CM-R érzékeny sejtek által képzett egy-réteg (monolayer) (c) GFAP-val van festve. A CM-R érzékeny sejtek a kontrollban csomókat képeznek (d, nyilakkal jelölve) és  $A_2B_5$ -tel vannak festve (adatokat nem mutatunk be). Ezek a sejtek valószínűleg azokat a 0-2A progenitorokat képviselik, amelyek burjánzásra vannak stimulálva 1. típusú, egy-réteget képző asztrociták révén.

A 7. ábra a vér-eredetű makrofágokat mutatja be hal látóideg tenyészetekben. Ezek a makrofágok nagyon elterjedtek azoknak az idegeknek a tenyészeteiben, amelyek kimetszésük előtt néhány nappal sérültek meg. Az itt látható sejtek 10 % FCS-sel kiegészített L-15 tápközegben növekedtek. Az (A) egy makrofágot mutat 7 nappal a lemezre vitel után, Giesma festékkal festve, és fáziskontraszttal láthatóvá téve. A (B) és (C) a lemezre vitel után 5 nappal levő sejtek, a (B) rögzítés után fáziskontraszttal láttatva, a (C) a rögzítés után 6D2-vel jelezve. Érdeemes megjegyezni, hogy a (C) megmutatja a makrofág mielinnel borított vakuolumait. Ezek a vakuolumok pozitívan meg vannak festve nem fajlagos észterázzal (8. ábra). Az összes mikroszkópos kép 500-szoros nagyítású.

A 8. ábra nem fajlagos észterázra pozitív makrofágokat mutat be. Aranyhal látóideget növesztünk, amint korábban leírtuk. Az (A), (B) és (C) olyan makrofágokat mutat, amelyek valószínűleg vér-eredetűek. Ezek ritkák olyan hal-látóidegek tenyészeteiben, amelyek szervben tenyészték disszociációjuk előtt, de gyakori olyan hal látóidegek tenyészeteiben, amelyek kimetszésük előtt néhány nappal össze voltak zúzva. Ezek a makrofágok tipikusan köralakúak és vezikulumaik is tipikusan körkörös módon

vannak elrendezve. Ezek a vezikulumok 6D2 pozitívak (7B. és C. ábra), amelyek jelzik ezekben a sejteknek a mielin fagocitózis aktivitását. A (D) - (G) képekben állandó "bennszülött" makrofágok láthatók. Sokféle alakjuk figyelhető meg, a hosszú és fibroblaszt-szerűtől (F) a megjelenésében a köralak felé közelítőig (D és G). Ezeknek a sejteknek a vezikulumai egyenletesen vannak eloszolva a citoplazma mentén, és szintén 6D2 pozitívak.

A 9. ábra állandó makrofágokat mutat be olyan hal látóidegek tenyészetében, amelyek a diszociáció előtt a szervben voltak tenyésztve. Az ábra az állandó makrofágok különböző morfológiáját mutatja be az inkább köralakútól - (A)-tól (D)-ig - a megnyúlt, fibroblaszt-szerű megjelenésig (E). Kapcsolat figyelhető meg az állandó makrofágok és a vér-eredetű makrofágok között, amint ez az (F)-ben és (G)-ben látható. Kapcsolat figyelhető meg az oligodendrociták és mindkét típusú makrofágok között, amint ez a (H)-ban és (I)-ben látható. Ennek a kapcsolatnak a jellege lehet sejt-elnyelő, lásd (H) és (I). Az (A), (C), (E), (F) és (H) fáziskontrasztal készültek, az összes többi mikroszkópos kép 500-szoros nagyítású.

Az alábbiakban részletesen leírjuk a találmányt.

A jelen találmány szerinti új oligodendrocita faktort (OCF) alacsonyabbrendű gerincesek, pl. halak regenerálódó sérült idegeiből kaphatjuk meg. Ez a regenerálódó hal látóidegeknek kondicionált tápközegében van jelen, ebből lehet izolálni, majd tisztítani. Ezt lehet izolálni makrofágokból is, amely inkább hozzáférhető forrás, vagy más alkalmas sejt-forrásból. Ez az említett sejt-források kondicionált tápközegéből izolálható, majd tisztítható.

A "kondicionált tápközeg" (CM) kifejezés, ahogyan ezt a

jelen leírásban és igénypontokban végig használjuk, olyan tápközegre utal, amely regenerálódó hal látóidegekkel van kondicionálva, ahol ezt úgy állítjuk elő, hogy 8 nappal az összezúzás után eltávolított hal látóidegek szegmenseit inkubáljuk szérumentes tápközegben 1,5-3 órán át szobahőmérsékleten, majd a tápközéget összegyűjtjük és szűrjük. A kapott CM mentes minden más szövettől. Példák olyan szérumentes tápközegre, amelyet alkalmazhatunk, lehetnek a Dulbecco által módosított Eagle-féle tápközeg (DMEM; 4 látóideg 300  $\mu$ l tápközegre), vagy az L-15 Leibowitz tápközeg, stb. Amikor összehasonlítást végzünk a regenerálódó idegek és az ép idegek kondicionált tápközégei között, akkor CM-R-nek nevezzük a regenerálódó idegek CM-jét és CM-N-nek az ép idegek CN-jét.

Az OCF citotoxikus aktivitását azzal a képességével mérjük, hogy csökkenti az érett oligodendrociták számát patkányagytenyészetekben. Az oligodendrociták számát úgy határozzuk meg, hogy galaktocerebrozid (Galc) ellen irányuló antitesteket alkalmazunk, amelyek jelzik az érett oligodendrocitákat. A Galc pozitív sejtek számának csökkenése az érett oligodendrociták számának csökkenését jelzi. A vizsgálattal kapcsolatban további részleteket adunk a későbbi kísérleti eljárásokban és kiviteli példákban.

Az OCF citotoxikus aktivitása az oligodendrocita vonalra fajlagos. Így gátolja az oligodendrocita vonal progenitorainak differenciálódását érett oligodendrocitákká és 2. típusú asztrocitákká. Ennek nincs citotoxikus hatása más sejtekre, pl. 1. típusú asztrocitákra vagy fibroblaszt sejtekre.

Az OCF-ről úgy találjuk, hogy jelen van a regenerálódó sérült hal látóidegek CM-jében, de nincs jelen a sérült emlős

látóidegek CM-jében. A regenerálódó sérült hal idegekből származó OCF csökkenti az érett oligodendrociták számát emlős idegek tenyészeteiben, pl. patkányidegek tenyészeteiben.

Az OCF vízzoldható és hőérzékeny,  $56^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten 30 perc után elveszíti aktivitását.  $100^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten az OCF 10 perc alatt elveszíti aktivitását.

Az OCF érzékeny proteázokra, aktivitását tripszines kezelésre elveszíti.

A jelen találmány foglalkozik az OCF oligodendrocita citotoxikus faktorról, ennek sóival, prekuzoraival, fragmentumaival és homológjaival, továbbá az OCF funkcionális származékai-  
val vagy ezek fragmentumaival és homológjaival, mindaddig, amíg ezek legalább egy lényeges részével rendelkeznek az OCF biológiai aktivitásának, vagyis azzal a képességével, hogy csökkenti az érett oligodendrociták számát.

"Homológ" az a molekula, amely lényegében hasonló az OCF-hez, vagy fragmentumához vagy prekuzorához, és amelyet az OCF molekulán belül aminosavgyökök kihagyásával, hozzáadásával vagy kicserélésével kapunk meg. A kihagyás, hozzáadás vagy helyettesítés bármilyen kombinációja elvégezhető, feltéve, hogy a végső molekula rendelkezik a kívánt aktivitással. Így pl. ha az OCF szekvencia már ismert, és az ezt kódoló gén izolálva van egy DNS könyvtárból, mindezeket a módosításokat el lehet végezni a jól ismert rekombinációs DNS technikákat alkalmazva.

A jelen találmány foglalkozik továbbá az OCF és/vagy prekuzorai, fragmentumai és homológjai módosításával, amely magában foglalja az asszociált vagy aggregált molekulákat, vagy az ezekhez kapcsolt gyököket, pl. cukor- vagy foszfát gyököket.

Ahogy itt használjuk, a "sók" kifejezés mind a karboxi-

csoport sóira, mind a polipeptid molekula aminocsoportjainak savaddíciós sóira vonatkozik. A karboxicsoport sóit a szakterületen ismert eljárásokkal lehet kialakítani; az ilyen sók lehetnek szervetlen sók, pl. nátrium, kalcium, ammónium, vas, vagy cink-sók és hasonlók, vagy lehetnek szerves bázisok sói, amelyek pl. aminokkal, mint trietilanol-aminnal, argininnel, lizinnel, piperidinnel, prokainnal és hasonlókkal képzett sók. A savaddíciós sók között találjuk pl. az ásványi savakkal, pl. sósavval vagy kénsavval képzett sókat, vagy a szerves savakkal, pl. ecetsavval vagy oxálsavval képzett sókat.

A "funkcionális származék", ahogyan itt alkalmazzuk, olyan származékokat jelent, amelyeket az N- vagy C-terminális csoportok gyökein oldalláncokként előforduló funkcionális csoportok felhasználásával készíthetünk a szakterületen ismert eljárásokkal; ezek mindaddig a találmány keretén belül vannak, amíg gyógyászatilag elfogadhatók maradnak, azaz a polipeptid aktivitása nem roncsolódik el, az ezt tartalmazó kompozícióknak toxikus tulajdonságokat nem ad át, és nem hat károsan az antigén tulajdonságokra.

Ezek között a származékok között találjuk pl. a karboxicsoport alifás észtereit, a karboxicsoport ammóniával vagy primer vagy szekunder aminokkal végzett reakciójával kialakított amidjait, az aminosavgyökök szabad aminosavcsoportjainak N-acil származékait, amelyek acil-csoportokkal (pl. alkanoil- vagy karbociklusos aroil csoportokkal) képződnek, vagy a szabad hidroxilcsoportok (pl. a szerin- vagy treonin gyökök hidroxil-csoportjainak) O-acil származékait, amelyek acil csoportokkal képződnek.

A "prekurzor"-ok olyan vegyületek, amelyek az emberi vagy állati szervezetben az OCF előtt keletkeznek, majd OCF-fé alakulnak át.

A találmány szerinti faktort a regenerálódó hal látóidegek CM-jéből vagy makrofágok CM-jéből, vagy más alkalmas forrásokból izoláljuk, majd hagyományos biokémiai eljárásokkal, pl. ioncserélő kromatográfiával, méretkizárásos kromatográfiával, HPLC-vel, stb. tisztítjuk.

A hal látóidegből származó CNS axonok regenerálása OCF jelenlétében megy végbe, ahol ez az OCF ezeknek a sérült idegeknek a környezetéből származó faktor. Az OCF gátolja az oligodendrociták érését progenitorjaiból és a nyúlvány-hordozó érett oligodendrociták számában csökkenést idéz elő, amikor emlős rendszerhez adjuk. Az OCF-et patkány tenyészetekben aktívnak találjuk. Ennél fogva ez a faktor utat jelenthet a felé, hogy elkerüljük az érett oligodendrociták elfojtó és nem megengedő hatását a regenerálódásra felnőtt emlős CNS-ben. Az OCF-szerű faktorok a fejlődés során nem szükségesek, mivel a kifejlődő axonok nem találkoznak teljesen differenciált mielin-termelő oligodendrocitákkal, amelyekről ismert, hogy nem-megengedő hatással vannak az axon-növekedésre.

A regenerálódó hal látóidegből származó anyagok megfigyelt hatása a tenyésztett emlős oligodendrociták számára azt sejteti, hogy a regenerálódó hal látóideg CM-jével kezelt sérült nyúl látóidegekben [Lavie és munkatársai (1987)] az axon növekedés ezen komponensek azon lehetséges in vivo hatásának tulajdonítható, hogy módosítják az oligodendrociták populációját is az asztrociták tulajdonságaira való hatásukon kívül [Cohen és Schwartz (1989)]. Az OCF megfigyelt gátló hatását nem a

PDGF vagy CNTF közvetíti, amelyek közvetett módon idéznek elő csökkenést az érett oligodendrociták számában [Noble és munkatársai (1988); Lillien és munkatársai (1988)]. Nem régi közlemények számolnak be arról, hogy aktivált asztrociták forrásai lehetnek olyan faktoroknak, amelyek gátolni képesek az oligodendrociták érését [Rosen és munkatársai (1988)], vagy tumor nekrozis faktor (TNF) forrásai lehetnek Robbins és munkatársai (1987); a TNF -nek citotoxikus aktivitása van egér gerincagy mielinezett szervtenyészetére [Selmaj és Ramie (1988)]. Ennél fogva figyelembe kell venni azt a lehetőséget, hogy a megfigyelt aktivítást olyan faktor közvetíti, amely funkcionálisan hasonló a TNF-hez. Abból a célból, hogy értékeljük a rokonságot a jelen találmány szerinti OCF és a TNF között, humán rekombináns TNF ellen irányuló antitesteket alkalmazunk, és kimutatjuk, hogy ezek nem semlegesítik a CM-R megfigyelt hatását.

A hal látóidegek regenerálódása spontán megy végbe a sérülés után. A normális hal látóidegek in vitro megengedő környezetet biztosítanak az emlős CNS neuronok számára, hogy neuritokat bocsássonak ki. Lehetséges, hogy a normális hal látóidegek mentesek a mielinnel társult neuronális növekedésgátlóktól, amelyek emlősökben megfigyelhetők, vagy csak igen alacsony szinten rendelkeznek ezzel. Ha a hal nem vagy csak alacsony szinten rendelkezik axon növekedési inhibitorokkal, vélhető, hogy a hal és az emlős oligodendrocitáikban különböznek, vagy hogy inhibitor/citotoxikus faktorok szabályozzák ezeknek a mielinnel társult axon növekedésgátlóknak a kifejeződését. Ez a lehetőség egybevág azzal, hogy az ép hal látóidegekben talált inhibitor/citotoxikus faktorok szintje alacsony. A hal látórendszer szokatlan annyiban, hogy az élet folyamán a sejtek fo-

lyamatos hozzáadása megy végbe, ezért a látóideg mindig tartalmaz bizonyos mennyiségű növekedő optikai axont. Ennél fogva lehetőség van arra, hogy az a mechanizmus, amely egy felnőtt környezetben való növesztést tesz lehetővé, jelen van a nem sérült hal látóidegben is, csak sokkal kisebb mértékben. Ez azt sugallja, hogy az emlősökben vagy hiányzik az ilyen faktorok sérülés utáni hozzáférhetősége a megfelelő időben, vagy egyáltalán nem rendelkeznek ezekkel a faktorokkal.

A regenerálódó hal látóidegekben talált citotoxikus hatás közvetve vagy közvetlenül függhet a makrofágoktól, az aktivált állandó ("bennszülött") mikroglia-sejtektől, vagy az aktivált asztrocitáktól. Ha a makrofágok gyorsan előzönlük a hal sérült látóidegét, amint ezt az emlősök regenerálódó perifériás idegeivel teszik, ezek lehetnek felelősek a CM-R-ben megfigyelt megnövekedett aktivitásért a CM-N-hez viszonyítva, és ezeknek tulajdonítható a nem-megengedő érett oligodendrociták eltüntetése. Ez olyan környezetet teremthet, amely a növekedés számára megengedő jellegű, miközben a neuronok a növekedésnek még a sérülés által indukált állapotában vannak.

Megfigyelhető, hogy az olyan idegek tenyészetekben, amelyek 2 nappal kimetszésük előtt sérültek meg, sok makrofág van jelen, de csak néhány oligodendrocita. Ezzel ellentétben olyan nem sérült látóidegek tenyészetében, amelyek a szervben tenyésztettek 2 nappal disszociációjuk előtt, csak néhány makrofág látható, míg az oligodendrociták száma viszonylag nagy. A fordított arányosság az oligodendrociták száma és a makrofágok száma között az sugallja, hogy a makrofágoknak szerepe van az oligodendrociták számának szabályozásában a sérülés után.

A jelen találmány foglalkozik továbbá a jelen találmány szerinti faktor elleni antitestekkel is. A poliklonális antitestek a jelen találmány szerinti dúsított vagy tisztított OCF-et tartalmazó antigén készítménnyel immunizált állatok szérumból származnak.

A monoklonális antitesteket a szakterületen jól ismert eljárásokkal állítjuk elő. Az állatokat az OCF nyers, dúsított vagy tisztított készítményeivel immunizáljuk, és az immunizált állat lép- és/vagy nyirokcsomó sejtjeit megfelelő mielóma sejtekkel fuzionáljuk. A pozitív hibridóma felülűszók átvizsgálását az OCF biológiai vizsgálatára itt leírt eljárással hajtjuk végre.

Az OCF elleni monoklonális antitesteket OCF tisztításához használjuk affinitás-kromatográfiával, jól ismert eljárások szerint.

Az OCF elleni antitesteket, mind a poliklonálisokat, mind a monoklonálisokat, alkalmazhatjuk továbbá egy cDNS könyvtár átvizsgálásához OCF-et kódoló DNS molekulákra, amelyeket azután megfelelő kifejező vektorokba lehet iktatni és gazdasejtekbe fertőzni. Ezeknek az átfertőzött gazdasejteknek a tenyészete rekombináns OCF-et termelhet nagy mennyiségben.

A jelen találmány szerinti faktor felhasználásának egyik útja a CNS sérült sejtjei regenerálásának indukálása emlősökben; ez abból áll, hogy a faktor készítményét a célzott szervbe iktatjuk be. Így pl. az aktív oldható faktor hosszanti beültetése alkalmazható az ideg mentén, hogy növeljük az alkalmazott anyag hozzáférhetőségét; mintegy egy mini-pumpát alkalmazva így a faktor folyamatos szolgáltatásához.

Olyan mértékig, ameddig szükségesnek tűnik a jelen leírás teljessé tétele érdekében, minden, a leírásban referált és idézett

publikáció referenciaként épül be a jelen bejelentésbe.

A találmányt az alábbi kísérletekkel és példákkal illusztráljuk, amelyeket nem tekintünk korlátozó jellegűnek.

#### Kísérleti eljárások

a.) A hal látóideg zúzott sérülése és CM (kondicionált tápközeg) készítése

300  $\mu$ l CM előállításához négy pontyot (*Cyprinus carpio*, 800-1200 g) mélyen érzéstelenítünk 0,05 % trikain metánszulfonáttal (Sigma). A látóidegeket a szemüregen belül összezúzzuk és az állatokat visszahelyezzük a tartályokba. 8 nappal később a halat újból érzéstelenítjük, a zúzott, regenerálódó idegeket kimetsszük, 300  $\mu$ l szérumentes tápközegbe visszük át (DMEM, Gibco) és 1,5 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk. A tápközegeket ezután összegyűjtjük, szűrjük, és  $-80^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten tároljuk. A tápközegek fehérjetartalmát a Bradford eljárással határozzuk meg [Bradford M. (1976)].

Tripszinnel enzimes emésztést végzünk a következőképpen: Tripszinnel kötött agarózt kiegyensúlyozunk PBS-sel (foszfáttal pufferolt fiziológias konyhasóoldat) és 4 órán át inkubáljuk  $37^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten a CM-mel. Az oldatot centrifugáljuk (1000 xg, 5 percig) az inkubálás végén, a kapott felülúszót pedig in vitro megvizsgáljuk az alább leírt tenyészetekben. A CM-et hővel kezeljük  $100^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten 10 percen át.

b.) A patkány látóideg zúzott sérülése

Patkányokat (250-350 g) érzéstelenítünk Rompum-mal (10 mg/kg, intraperitoneálisan) és Vetelar-ral (50 mg/kg, intraperitoneálisan). Oldalsó kantonomiát végzünk binokuláris operáló mikroszkóp alatt és a kötőhártyát laterálisan bemetsszük a szaruhártyába, miután a visszahúzó izmokat (retractor bulbi)

elkülönítettük. A látóidegeket azonosítjuk és a szemgolyó közelébe helyezzük tompa műszerrel. A dura ép marad. Az ideget zúzzuk egy kalibrált keresztállású csipesszel, 1 mm távolságban a szemtől 30 másodpercen át. A kantonomiát bevarrjuk és az állatot hagyjuk feléledni. Megfelelő időben az állatot újból érzéstelenítjük és a látóideget kimetsszük.

c.) Tenyészetek készítése sérült felnőtt patkány látóidegekből.

Abból a célból, hogy gliasejt készítményeket készítsünk, minden egyes kísérletben öt felnőtt patkány látóideget alkalmazunk. A látóidegeket a fentebb leírtak szerint zúzzuk és 3 nappal később kimetsszük ezeket, megőröljük és Leibovitz L-15 tápközegben (Gibco), amely 500 egység/ml kollagenázt is (Sigma) tartalmaz, inkubáljuk. 60 perc után  $37^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten azonos térfogatú tripszint (3000 egység/ml) adunk hozzá, és további 15 percig inkubáljuk. A szuszpenziót centrifugáljuk (500 xg, 5 perc), a felülúszót eltávolítjuk és a szövetet újra szuszpendáljuk, majd 15 percen át tovább kezeljük tripszinnel (15000 egység/ml) olyan oldatban, amely 0,25 mmól/l EDTA-t tartalmaz  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$ -mentes DMEM-ben. Az emésztést úgy fejezzük be, hogy hozzáadjuk szójabab tripszin inhibitor (5000 egység/ml, Sigma), szarvasmarha hasnyálmirigy DN-áz 1 (74 egység/ml, Sigma) és szarvasmarha szérum albumin (BSA, V. frakció, 3 mg/ml, Sigma) oldatának azonos térfogatát, majd centrifugáljuk. A felülúszót Raff által módosított [Raff és munkatársai (1983)] Bottenstein és Sato által meghatározott tápközeggel [Bottenstein és Sato helyettesítjük, (1978)], ezt követően a szövetet eldörzsöljük. Az így létrejövő sejtsuszpenzióból 50  $\mu\text{l}$ -t poli-L-lizinnel (PLL, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) borított fedőlemezekre szélesztünk (1 látóidegből származó sejteket 3 fedőlemezre oltjuk). 30 perc múlva  $37^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten a

letapadó sejteket leöblítjük és 500  $\mu$ l meghatározott tápközeget adunk hozzájuk. Regenerálódó hal látóidegből származó CM-et (12  $\mu$ g/ml) adunk a kísérleti mintákhoz 48 órával később. A sejteket további 48 óra múlva közvetett immunfluoreszcens jelzéssel megvizsgáljuk.

d.) Sejttenyészetek újszülött patkány agyból

Glia-sejteket preparálunk újszülött Sprague-Dawley patkányok agykérgéből [McCarthy és DeVellis (1980)]. A sejteket PLL-lel burkolt lombikokba (85 mm<sup>2</sup>, Nunc) vagy PLL-lel burkolt fedőlemezekre (10<sup>5</sup> sejt/fedőlemez) visszük át, a kevert glia-sejttenyészetek elemzéséhez. A sejteket 5 % borjúembrió szérummal (FBS, Sigma) kiegészített DMEM-ben növesztjük, a tápközeget minden második napon lecserélve.

c.) Dúsított oligodendrocita tenyészetek készítése

8 napos in vitro tenyésztés után az újszülött patkány agy glia-sejtjeinek kevert populációját tartalmazó lombikot egy éjszakán át rázatjuk, a nem tapadó sejteket PLL-lel burkolt fedőlemezekre visszük át mintegy 10<sup>4</sup> sejt/fedőlemez mennyiségben, hacsak másképpen nem jelezzük. A sejteket 30 percen át hagyjuk letapadni, majd Raff által módosított Bottenstein és Sato-féle meghatározott tápközeggel tápláljuk abból a célból, hogy serkentsük az oligodendrocita kifejlődést. A sejteket az átoltás után különböző időtartamokig kezeljük, és közvetett immunfluoreszcens festésnek vagy ELISA-nak vetjük alá általában 48 óra után, hacsak másképp nem jelöljük.

f.) Közvetett immunfluoreszcens jelzés

A tenyésztett sejteket az alábbi antitestekkel immun-jeljezzük: A<sub>2</sub>B<sub>5</sub> egér IgM monoklonális antitestek (hibridóma felülűszó 1:1 arányban hígítva), amelyek jelzik az érett 2. tí-

pusú asztrocitákat és mind az oligodendrociták, mind a 2. típusú asztrociták perinatális progenitorait (0-2A perinatális progenitorok) [Eisenbarth és munkatársai (1979); Raff és munkatársai (1983)]; 04 egér IgM monoklonális antitestek (koncentrált hibridóma felülűszó, 1:100 arányban hígítva), amelyek az éretlen oligodendrocitákat [Sommer és Schachner (1980)] és az 0-2A felnőtt progenitorokat [French-Constant és Raff (1986a)] jelzik; egér antigalaktocerebrozid (Galc) monoklonális antitestek (hibridóma felülűszó 1:10 arányban hígítva), amelyek az érett oligodendrocitákat jelzik [Raff és munkatársai (1987)]; nyúl anti-glia fibrilláris savas fehérje (GFAP, teljes szérum 1:1000 arányban hígítva), amely az érett 1. típusú és 2. típusú asztrocitákat jelzi [Bignami és munkatársai (1972)]; GD2 egér monoklonális antitestek, amelyek a hal oligodendrocitákat jelzik [Jeserich és Romen (1989)]. A rodaminnal vagy fluoreszceinnel konjugált második antitesteket különböző forrásokból szerezzük be: a kecske anti-egér IgM-et a Jackson Immunoresearch Laboratories-től (1:50 arányban hígítjuk); a kecske anti-egér IgG<sub>3</sub>-at a Serotec-től (1:50 arányban hígítjuk); és a sertés anti-nyúl IgG-t a Dakopatts-től (1:50 arányban hígítjuk).

A felületi antigének (A<sub>2</sub>B<sub>5</sub>, 04 és Galc) immunjelzését úgy hajtjuk végre, hogy először a kívánt antitestek mindegyikét inkubáljuk a sejtekkel 50 µl térfogatban 37°C hőmérsékleten 30 percen át. A sejteket azután többször mossuk 2 % hővel inaktivált FBS-t is tartalmazó Hank-féle kiegyensúlyozott sóoldattal, majd további 30 percen át inkubáljuk DMEM-ben hígított, megfelelő rodaminnal vagy fluoreszceinnel konjugált második antitesttel. A sejteket mossuk és metanolban fixáljuk -20°C hőmérsékleten 10 percen át. Az intracelluláris antigéneknél (GFAP) a sejteket

először rögzítjük, majd immunjelezzük. Bizonyos kísérletekben a tenyészeteket egyidejűleg kettősen jelezzük  $A_2B_5$  és Galc anti-testekkel, majd ezt követően anti-egér IgM-mel (rodamin) és anti-egérIgG<sub>3</sub>-mal (fluoreszcein). Az immunjelzés után a fedőlemezeket minden esetben mossuk, egy csepp glicerinbe helyezük, amely 22 mmól/l 1,4 diazobiciklo[2,2]oktánt (Sigma) is tartalmaz, hogy megakadályozzuk az elhalványodást, majd leforrasztjuk és fáziskontrasztal, epifluoreszcens (rodamin és fluoreszcein kimutatásra) optikával és kamerával felszerelt Zeiss Universal mikroszkópon megvizsgáljuk. Az összes immunjelzett sejtek konkrét számát minden fedőlemezen megszámloljuk.

g.) ELISA élő sejteken

Oligodendrocitákban dúsított tenyészeteket készítünk, amint fentebb leírtuk. A sejteket többüreges mikrotitráló lemezekre ( $5 \cdot 10^3$  sejt/üreg, Nunc) oltjuk. 24 órás in vitro tenyésztés után vagy regenerálódó idegekből, vagy ép idegekből származó CM-et adunk hozzá a jelzett koncentrációban. 48 órával később a sejteket megvizsgáljuk Galc antitestekkel inkubálva 37°C hőmérsékleten 30 percen át, majd torna-peroxidázzal konjugált kecske anti-egér antitestekkel (BioMakor, Izrael) inkubálva további 30 percen át 37°C hőmérsékleten. A kötött antitestek meghatározását úgy végezzük el, hogy a sejteket mossuk és hozzáadunk üregenként 100  $\mu$ l szubsztrátumot [2,2-azino-di(3-etil-benzthiazolin)szulfát, Sigma], amely 0,003 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel van kiegészítve. Az abszorpciót Titertech Multiskan MMC-ben vizsgáljuk 405 nm-nél, 630 nm referencia-hullámhosszal.

h.) Nem-fajlagos észteráz festés

A sejteket az  $\alpha$ -naftil-acetát észterázos eljárást, valamint a fluorid gátlásos eljárást alkalmazva festjük meg egy Sigma készlet segítségével. Nátrium-nitrátot (50  $\mu$ l; 0,1 mól/l) adunk

50 ml gyorskékhez (fast-blue, 15 mg/ml 0,4 mól/l HCl-ben). A keveréket szobahőmérsékleten 2-3 percen át állni hagyjuk. Ehhez 37°C hőmérsékleten hozzáadunk 2 ml ionmentesített vizet, majd 250 l Trizmal puffer-koncentrátumot (pH 7,6), majd 50 ml  $\alpha$ -naftil-acetát oldatot. A fluorid-gátláshoz 50 ml nátrium-fluoridot (0,2 g/ml) is adunk. A sejteket azután rögzítjük citrát-aceton-formaldehid rögzítőben (25 ml citrát-oldat + 65 ml acetone + 8 ml 37 %-os formaldehid) 30 percen át szobahőmérsékleten. A sejteket azután alaposan mossuk vízben, ezután ezeket 30 percen át inkubáljuk  $\alpha$ -naftil-acetát reakcióoldattal 37°C hőmérsékleten. Az alapos mosás után a sejteket 2 percig ellenfestjük hematoxin oldattal. A fedőlemezeket azután mossuk, mikroszkóp lemezekre visszük glicerinnel megfigyelésre.

#### i.) Statisztikai elemzés

Az eredmények statisztikai elemzését a Friedman Rank Test módszert alkalmazva végezzük. Ebben a statisztikai módszerben minden egyes kísérletet elkülönített blokkban kezelünk, és az eredmények jelentős különbségét (kontroll a CM-kezelttel szemben) figyeljük meg a blokkok száma szerint.

#### PÉLDÁK

##### 1. példa

Ez a példa azt mutatja be, hogy a regenerálódó hal látóidegekkel kondicionált, OCF-et tartalmazó tápközegek csökkenést idéznek elő a nyúlvány-hordozó oligodendrocitákban disszociált sérült felnőtt patkány látóidegek tenyészetében.

Az 1a. és b. ábrák a nyúlvány-hordozó O4 pozitív sejteket mutatja be felnőtt patkány látóidegekből származó tenyészetekben, amely látóidegek az eltávolításuk előtt 3 nappal szenvedtek sérülést. Regenerálódó hal látóidegekből származó kondi-

cionált tápközeg (CM-R; 12  $\mu$ g fehérje/ml), amelyet 48 órával az oltás után adunk ezekhez a tenyészetekhez, jelenlétében a 04 pozitív sejtek, amelyek az in vitro tenyésztés 96. ábrájában fel-  
tűnnek, száma (1c.-g. ábra) sokkal kisebb, mint a kontroll táp-  
közegben tartott, nem kezelt tenyészetekben (1a.-b. ábra). A  
04 pozitív sejtek, amelyek a CM-R-rel kezelt tenyészetben fenn-  
maradnak, kevésbé hordoznak nyúlványokat és ezért éretlen oli-  
godendrocitáknak azonosíthatók (1c.-g. ábra). Ugyanezeket az  
eredményeket kapjuk akkor is, amikor megismételjük ugyanezeket  
a kísérleteket érett oligodendrociták ellen irányuló antitestek-  
kel, pl. antigalaktocerebrozidot (Galc) alkalmazva 04 antites-  
tek helyett. Következésképpen a hal regenerálódó idegeknek CM-  
jével (CM-R) kezelt tenyészetekben a sejteknek csak 42 %-a fej-  
lődik érett Galc pozitív sejtekké a meghatározott tápközegben  
levő összes Galc pozitív sejteken kívül. Ezek az eredmények  
oldható faktor vagy faktorok jelenlétét sugallják regenerálódó  
hal látóideggel kondicionált tápközegekben, amelyek citotoxi-  
kusak lehetnek és/vagy gátolhatják az oligodendrociták érését  
progenitorjaiból.

## 2. példa

Ez a példa azt mutatja be, hogy a regenerálódó hal látó-  
idegekkel kondicionált, OCF-et tartalmazó tápközeg hatással  
van a Galc pozitív sejtekérésére oligodendrociták újszülött  
patkány tenyészeteiben.

Abból a célból, hogy tovább tanulmányozhassuk ennek az  
inhibitor/citotoxikus faktornak a természetét és lehetséges  
befolyását a regenerálódásra, először megkeressük az oligodend-  
rociták gazdag forrását és megvizsgáljuk az újszülött patkány  
agy tenyészetei alkalmazásának lehetőségét sérült felnőtt pat-

kány látóidegek helyett, mivel az gazdagabb forrása az oligodendro-  
rocitáknak és homogénebb populációt biztosít. Az újszülött patkány agy oligo-  
dendrocitáit és perinatális progenitorjait a következő kísérletsorozattal  
kapjuk meg McCarthy és De Vellis szerint (1980). Az oligodendrocitákat poli-  
L-lizinnel burkolt fedőlemezekre oltjuk. Regenerálódó hal látóidegek CM-jét  
(CM-R) adjuk ezekhez a tenyészetekhez ( $12 \mu\text{g/ml}$ ), amely tenyészetek újszü-  
lött patkány agy oligodendrocitákkal vannak dúsítva vagy az oltás időpontjáb-  
an, vagy 24 és 48 órával később. Minden esetben azonos számú  
oligodendrocitát oltunk, mint a nem kezelt kontroll tenyészete-  
kben. Amint a 2. ábrán látható, az összes CM-mel kezelt tenyészete-  
kben 24 órával a CM alkalmazása után a nyúlványos Galc po-  
zítív sejtek száma kisebb (mintegy 50 %), mint a hasonló nem-ke-  
zelt tenyészetekben. Úgy tűnik, hogy ha a CM csak az oligodendro-  
citák érésére hat progenitorjaikból, a Galc pozitív sejtek meg-  
figyelt alacsony száma, legalábbis az oltás után 24 órával és  
48 órával kezelt tenyészetekben, a spontán sejtpusztulást tük-  
rözheti olyan körülmények között, amelyekben a sejt megújítása a  
progenitorokból gátolva van. Egy más elképzelés szerint a rege-  
nerálódó hal látóideg CM-je hatással lehet az érett oligodendro-  
citákra is a progenitorokra való hatáson kívül. A 2. példában  
bemutatjuk az alkalmazott CM mennyiségétől gátló hatás függő-  
ségét is. Így míg  $12 \mu\text{g/ml}$  hatásos,  $1,2 \mu\text{g}$  fehérje/ml hatás-  
talan. Amint az I. táblázatban bemutatjuk, 24 órával a CM-R  
alkalmazása után a folyamat-hordozó Galc pozitív sejtek száma  
már  $40,3 \pm 6,4$ -gyel kisebb a nem kezelt kontroll tenyészetekben  
levő számhoz viszonyítva (I. táblázat). A CM-R forralása vagy  
tripszinnel kezelése inhibitor/citotoxikus hatásának csökkenté-  
sét eredményezi (II. táblázat), azt sugallva, hogy a faktor fe-  
hérje-természetű.

I. táblázat. A CM-R a patkány agy oligodendrociták csökkenését okozza

A sejtek típusa*	Órák a kezelés után **	A kontroll %-a (átlag <sup>±</sup> SD) ***	A kísérletek száma
Oligodendrociták	24	40,3 <sup>±</sup> 6,4	3
Oligodendrociták	48	14,4 <sup>±</sup> 10,4	12
Kévert glia-sejtek	48	25,7 <sup>±</sup> 4,7	4

\* Ezekben a kísérletekben a megszámlolt oligodendrociták (Galc pozitív sejtek) száma a kontroll tenyészetekben fedőlemezenként 350-1700 sejt között van.

\*\* A CM-R-t 12 µg fehérje/ml mennyiségben adjuk.

\*\*\* A gátlás százalékát az egyes kísérletekben úgy számítjuk ki, hogy a kontroll, nem kezelt tenyészetben levő megszámlált sejtek számát vesszük 100 %-nak.

II. táblázat. A CM-R inhibitor/citotoxikus hatása az oligodendrocitákra. hő- és tripszinérzékeny

Kezelés	A Galc pozitív sejtek száma (átlag <sup>±</sup> SD)
Kontroll	1427 <sup>±</sup> 247
CM-R	361 <sup>±</sup> 17 *
CM-R (forralt)	1474 <sup>±</sup> 70 **
CM-R (tripszinnel kezelt)	1087 <sup>±</sup> 10 **

Ebben a kísérletben a patkány agy oligodendrocitákat ugyanúgy tenyésztjük, mint ahogyan a 2. ábrában ismertettük. A szélesztés után 24 órával CM-R-et (forralt vagy tripszinnel kezelt, 20 µg/ml) adunk hozzá. A CM-R hozzáadása után 48 órával a Galc pozitív, nyúlvány-hordozó sejteket az immunfluoreszcens sejtek megszámlálásával

meghatározzuk. Egy kísérlet eredményét adjuk meg, amelyet három párhuzamosban végeztünk. Ezeket az eredményeket két további kísérletben reprodukáltuk.

\* p-érték: 0,025

\*\* Nem figyelhető meg szignifikáns különbség a kontroll tenyészetek és a forralt vagy tripszinezett CM-R-rel kezelt tenyészetek között

### 3. példa

Ez a kísérlet azt mutatja be, hogy az OCF inhibitor/citotoxikus aktivitása társul a hal látóidegek regenerálódásával.

Abból a célból, hogy kitaláljuk: vajon az inhibitor/citotoxikus faktor aktivitásának szintje korrelációban van-e a hal látóidegek regenerálódásával, összehasonlítjuk a CM-R hatását olyan tápközeg hatásával, amely nem sérült, normál hal látóidegekkel van kondicionálva. A CM-R-t vagy CM-N-et azonos fehérje koncentrációban adjuk az újszülött patkány agy oligodendrocitákhoz 24 órával az oltás után. Az így létrejövő hatást anti-Galc antitestekkel figyeljük a közvetett immunfluoreszcenciával jelzett Galc pozitív sejtek megszámlálását alkalmazva. A 3. ábra hasonlítja össze a CM-N-nel kezelt tenyészetekben levő Galc pozitív sejtek számát a CM-R-rel kezelt tenyészetben levő sejtek számával. A CM-N hatása kisebb, vagyis a nem sérült sejtekből hiányzik a gátló aktivitás az oligodendrociták érésére.

### 4. példa

Ez a kísérlet azt mutatja be, hogy a CM-R-ben levő OCF nem a PDGF hatását utánozza.

Az oligodendrociták differenciálódásáról nemrégén mutatták ki, hogy ezt a vérlemezke-eredetű növekedési faktor (platelet

derived growth factor, PDGF) szabályozza [Noble és munkatársai (1988); Raff és munkatársai (1988); Richardson és munkatársai (1988)]. PDGF hozzáadása oligodendrocita progenitorok tenyésze-  
teihez átmenetileg elhalasztja ezek differenciálódását mitogén  
aktivitása következtében.

Hogy bepillantást nyerjünk a megfigyelt gátlás lehetséges  
mechanizmusába, legalábbis ami az oligodendrociták érésére vo-  
natkozik progenitoraiból, összehasonlítjuk a regenerálódó hal  
látóidegek CM-jének (CM-R) aktivitását a PDGF aktivitásával.  
PDGF hozzáadása az oltás időpontjában a Galc pozitív sejtek  
számának nyilvánvaló csökkenését eredményezi 48 óra után in vitro.  
A hatás azonban határozottan kisebb, összehasonlítva a CM-R ha-  
tásával (4. ábra). A PDGF-fel kezelt tenyészetekben megfigyelt  
Galc-pozitív sejtek nyilvánvalóan kisebb száma a kontroll, nem  
kezelt sejtekhez viszonyítva  $A_2B_5$  antitestekkel festett proge-  
nitorjaik burjánzását tükrözi. Ez nyilvánvaló az  $A_2B_5$  pozitív  
sejtek megnövekedett számából a PDGF-fel kezelt tenyészetekben.  
Amint a 4. ábrából látható, a PDGF-fel kezelt tenyészetekben,  
ahogyan ez várható is, növekszik az  $A_2B_5$  antitestekkel festett  
0-2A progenitorok száma (4a., b., c. ábrák). Ezzel ellentétben a  
CM-mel kezelt tenyészetekben csökkenés észlelhető az  $A_2B_5$  pozi-  
tív sejtek számában (4c., d. ábrák). Ezek az eredmények azt sugall-  
ják, hogy a CM-R nem csupán a felnőtt oligodendrocitákra hat,  
hanem progenitorjaikra is. Ezek a megfigyelések kizárják annak  
lehetőségét, hogy a CM-R megfigyelt hatását a Galc pozitív sejtek  
kifejlődésére progenitorjaikból a PDGF vagy bármely más mitogén  
közvetíti. Ezt támasztja alá az 5. ábra is, amely azt mutatja  
be, hogy a CM-R hozzáadása PDGF-fel együtt a Galc pozitív sej-  
tek csökkenését eredményezi, amint ez várható akkor is, ha

egyedül CM-R-t alkalmazunk.

A csillós neurotróf faktor (ciliary neurotropic factor, CNTF) egy további olyan faktor, amelyről nemrégiben mutatták ki, hogy hatásos az O-2A sejtvonalban, indukálva a 2. típusú asztrocita differenciálódást és ilyen módon közvetett módon az érett Galc pozitív oligodendrociták számának csökkenését idézve elő [Lilien és munkatársai (1988)]. Mivel a CM-R nem idéz elő növekedést az A<sub>2</sub>B<sub>5</sub> antitesttel festett sejtek számában, és így nem növeli sem a progenitorokat, sem a 2. típusú asztrocitákat, nem valószínű, hogy a CM-R hatást a CNTF közvetíti.

#### 5. példa

Ez a kísérlet az OCF inhibitor/citotoxikus hatásának fajlagosságát mutatja be oligodendrocitákra a regenerálódó hal látóideggel kondicionált tápközeg segítségével.

Abból a célból, hogy megvizsgáljuk, vajon a CM megfigyelt inhibitor/citotoxikus aktivitása egyedi-e oligodendrocitákra, a CM-R-t asztrociták és oligodendrociták kevert populációjához alkalmazzuk.

A 6. ábra azt mutatja be, hogy a megfigyelt inhibitor hatás nem tulajdonítható egy nem-fajlagos toxikus hatásnak, hanem ez az oligodendrocitákra fajlagos. Az újszülött patkány agyból disszociált glia-sejtek kevert populációjának tenyészteteit kezeljük vagy regenerálódó, vagy ép idegek CM-jével (CM-R illetve CM-N). Olyan körülményeket alkalmazunk, amelyek a legkedvezőbbek az asztrociták által képzett egy-rétegre (monolayer) oltott oligodendrociták differenciálódásához. A CM-R gátló hatása még ilyen körülmények között is hangsúlyozott, míg a CM-N-nek csak csekély gátló aktivitása van 72 és 96 órás in vitro tenyésztés után (6. ábra). A regenerálódó CM oligodendrocitákra való

gátló hatásával ellentétben a nem-oligodendrocita sejtek, amelyek jelen vannak ezekben a kevert tenyészetekben és festődnek glia fibrilláris savas fehérjével (ez az asztrociták jelölésére szolgál), túlélésére és differenciálódására a CM-R nem hat (6a., ábra). A kezelt és nem kezelt tenyészetekben képződött asztrociták egy-rétegének látszólagos sűrűsége hasonló (6c. ábra összehasonlítva a 6d. ábrával). A CM-R megfigyelt gátló hatása ennek következtében nem tulajdonítható nem-fajlagos toxikus hatásnak, hanem szelektív hatásnak tulajdonítható oligodendrocita vonalra (6. ábra).

#### 6. példa

Ez a kísérlet azt mutatja be, hogy fordított arányosság van az oligodendrociták száma és a makrofágok száma között.

Az első kísérletben közönséges aranyhalat alkalmazunk. A kondicionált tápközeget a Dulbecco által módosított Eagle-féle tápközeggel készítjük el (DMEM, 4 látóideg 300  $\mu$ l tápközegben).

Az összehasonlítás azoknak az idegeknek, amelyek szerv-tenyészetben voltak tartva, disszociációja után kapott sejtpopuláció- és a megfelelően zúzott idegekből kapott sejtpopuláció között (azaz OC-3 és PC-3 patkányban, és OC-2 és PC-2 halban) jelezheti, vajon ezeknek a sejteknek a sérülés utáni viselkedése belső ügy, vagy hatással vannak erre külső faktorok is, pl. vér monociták. Szövettenyészetekben minden ilyen külső faktor távol van, mivel a látóideg a sérülés időpontjában lett kiemelve.

A disszociált hal látóidegek tenyészetében, amelyek a szervben voltak tenyésztve 2 nappal a disszociáció után (OC-2 tenyészetek), viszonylag nagy számú oligodendrocita, (65 sejt fedőlemezenként) figyelhető meg (6D2 pozitív sejtek), de csak néhány makrofág látható. Ezzel ellentétben azoknak a disszo-



látóidegeknek a tenyészteteiben, amelyek 2 nappal sérülésük után lettek kimetszve (PC-2 tenyészetek), sok makrofág fejlődik ki, de csak néhány oligodendrocita. Az a kevés oligodendrocita, amely a zúzott idegek tenyészteteiben (PC-2) látható, sokkal kisebb, és sokkal rövidebb nyúlványokkal bír, mint az OC-2 tenyészetekben levő oligodendrociták. Ezeket az eredményeket a III. táblázatban foglaljuk össze.

Az oligodendrociták megjelenésével párhuzamosan a szervben tenyésztett idegek disszociált sejtjeiben a makrofágok vagy makrofágszerű sejtek teljesen távol vannak ezekben a tenyészetekben. Még 7 napos tenyészetben sem látható egyetlen ilyen sejt sem (ekkorra már a OC-2 tenyészetben ezek a sejtek óriás méretet érnek el).

III. táblázat. Az oligodendrociták száma olyan hal látóidegek disszociált tenyészteteiben, amelyek a kimetszés és disszociáció előtt 2 nappal zúzva voltak (PC-2 tenyészetek), és olyan hal látóidegek tenyészteteiben, amelyek a szervben voltak tenyésztve két nappal a disszociáció előtt (OC-2 tenyészetek)

Tenyészet	az oligodendrociták száma			
	1. kísérlet	2. kísérlet	3. kísérlet	4. kísérlet
OC-2	65( <sup>±</sup> 3)	93( <sup>±</sup> 25)	40( <sup>±</sup> 12)	66( <sup>±</sup> 26)
PC-2	3( <sup>±</sup> 1)	2( <sup>±</sup> 1)	15( <sup>±</sup> 5)	7( <sup>±</sup> 6)

<sup>1</sup> Ezen a kísérleten belül azonos számú és mintegy azonos méretű halat veszünk a PC-2 és az OC-2 tenyészetekhez. A sejteket végül azonos számú fedőlemezre oltjuk. Ezen a módon a kísérleti eljárásoknak tulajdonítható variációk a minimumra csökkennek. Minden kísérletet három párhuzamosban végzünk. Az oligodendrociták teljes számát (6D2 pozitív sejtek) megszámloljuk a fedő-

lemezen, és a megadott számok három kísérlet átlagai.

Ellentétben a halnál tapasztalt szituációval, a patkányban azoknak az érett oligodendrocitáknak a száma, amelyeket sérült idegek tenyésztésében figyelünk meg, és azok száma, amelyeket szervben tenyésztve figyelünk meg, hasonló. A patkány látóidegek tenyésztésében, amelyeket 3 napig szervben tenyésztünk (OC -3 tenyészetek), sejtek három fő populációja figyelhető meg. A zúzott patkány látóidegek tenyésztéséhez hasonlóan (3. ábra) ezeknek a tenyészeteknek jelentős hányada nyúlvány-hordozó oligodendrocita, amelyeket Galc-vel jelzünk 96 órás tenyésztés után, és az összes sejtek számának közel 40 %-át képviselik. A sejteknek egy másik nagy populációja (mintegy 40 %) a morfológiailag felismerhető makrofágok.

Az alábbi kísérletekben aranyhal látóideg sejteket növesztünk vagy 1-2 % FCS-sel kiegészített L-15 Leibowitz tápközegben, vagy olyan L-15 tápközegben, amely ugyanazokkal az adalékanyagokkal van kiegészítve, amelyeket a Raff által módosított Botenstein és Sato meghatározott tápközegben alkalmaznak, továbbá még 1-2 % FCS-sel van kiegészítve.

A regenerálódó aranyhal látóidegekkel kondicionált tápközeg (CM) a fentebb megadott CM-R-hez hasonlóan állítjuk elő a zúzás után 8 nappal eltávolított aranyhal látóidegek szegmenseit L-15 tápközegben inkubálva (10 aranyhal látóideg 500  $\mu$ l tápközegben, 3 órás inkubálás szobahőmérsékleten).

A hal tenyésztésekben levő makrofágok magukban foglalnak mind vér-eredetű, mind állandó ("bennszülött") makrofágokat. A makrofágok két típusa morfológiai kritériumok alapján megkülönböztethető: a vér-eredetű makrofágok tipikusan köralakúak és



vezikulumaik is köralakban vannak elrendezve; az állandó makrofágok viszont alakjukban szabálytalanok és vezikulumaik véletlenszerűen vannak elrendezve a citoplazma mentén. Ezen kívül azok a sejtek, amelyek a vér-eredetű makrofágokra emlékeztetnek (7. ábra), bőségesen fordulnak elő azoknak a látóidegeknek a tenyészetében, amelyeket több nappal a zúzósos sérülés után metszettünk ki, viszont nagyon ritkák azoknak a látóidegeknek a tenyészetében, amelyeket a kimetszés után szervben tenyésztettünk. Mindkét makrofág típus aktívan fagocitálja a mielin törmelékét, amint ezt a 6D2-jelzett vakuolumokkal bizonyítjuk rögzített sejtben (a vakuolumok nem jelződnék semmiféle más alkalmazott antitesttel, sem magával a második antitesttel). A nyilvánvalóan vér-eredetű makrofágok a legjobban akkor nőnek, amikor a tápközeg 10 % FCS-sel van kiegészítve, és egy hét után tenyészetben ezek nagyon nagy méretet érnek el a tenyészetben levő más sejtekhez viszonyítva (7A. ábra). A 7C. ábra olyan makrofágokat mutat be, amelyek vakuolumai erőteljesen jelződnék a 6D2 antitesttel. Ezek a makrofágok pozitívan festődnek nem-specifikus észterázzal is (8A-C. ábrák).

Azok a sejtek, amelyeket állandó makrofágoknak tekintünk, több formában tűnnek fel, de két nagyobb csoportba oszthatók: azokra, amelyeknek egyenes, fibroblaszt-szerű megjelenésük van (8F. és 9E. ábrák), és azokra, amelyek kerekesebbek és vastagabbak, és amelyek néha rendelkeznek nyúlványokkal (9A.-D. ábra). Kapcsolat figyelhető meg a vér-eredetű makrofágok és az állandó makrofágok között (9F.-G. ábrák), és mindkét makrofág típus és az oligodendrociták között (9H.-I. ábrák). Ennek a kapcsolatnak a természete sejt-elborítónak tűnik; az oligodendrocitákat, úgy tűnik, mindkét típusú makrofág beborítja. Ezek az ál-

landó (bennszülött) makrofágok nem-fajlagos észteráz pozitívak is (8D.-G. ábrák).

Az oligodendrociták és makrofágok száma közti fordított összefüggés kapcsán és a CM-nek a patkány oligodendrocitákra való hatása kapcsán megvizsgáljuk, vajon a regenerálódó hal látóidegből származó oldható anyagok (vagyis CM) felelősek-e a sérülés utáni oligodendrocita szabályozásért. Amikor a disszociált látóidegek, amelyek előzőleg 2-3 napig szervben voltak tenyésztve, tenyészeteihez CM-et adunk, az oligodendrociták száma csökken. Az oligodendrociták fedőlemezenkénti kis száma miatt a kísérletet többször megismételjük. A statisztikai vizsgálat azt mutatja, hogy a CM hatása az oligodendrocita -számra szignifikáns. Ezeket az eredményeket a IV. táblázat mutatja be.

IV. táblázat. A regenerálódó hal látóideggel kondicionált tápközeg (CM) hatása az oligodendrociták számára hal látóideg tenyészetekben<sup>a</sup>.

A kísérlet száma <sup>b</sup>	Az oligodendrociták száma <sup>c</sup> ( $\pm$ SD) <sup>d</sup>			
	Kontroll		CM-mel kezelt <sup>e</sup>	
1	24,5	$\pm$ 2,0	13	$\pm$ 1,5
2	57	$\pm$ 16	30	$\pm$ 3,5
3	36	$\pm$ 8,0	26	$\pm$ 12
4	24	$\pm$ 4,0	19	$\pm$ 4,0
5	19	$\pm$ 3,0	3,5	$\pm$ 2,5
6	13,5	$\pm$ 0,6	4,5	$\pm$ 0,6
7	15	$\pm$ 3,5	7	$\pm$ 5,0

- <sup>a</sup> A látóidegeket kimentesszük és szervben tenyésztjük két napon át. A látóidegeket azután disszociáljuk és lemezre visszük. Ebben a stádiumban adjuk hozzá a megfelelő üregekhez a regenerálódó hal látóidegek kondicionált tápközegeit (CM).
- <sup>b</sup> A sejtek kicsiny száma miatt a kísérletet sokszor ismételjük.
- <sup>c</sup> Minden kísérletet három párhuzamosban végzünk, amelyek átlagát adjuk meg.
- <sup>d</sup> A három párhuzamos standard eltérése.
- <sup>e</sup> A CM-et 40  $\mu$ g/ml végső koncentrációban adjuk be. A Friedman Rank Test vizsgálatot alkalmazva a statisztikai elemzéshez az eredmények  $p=0,0001$  értéket adnak, vagyis szignifikáns különbség van a kontroll és a CM-mel kezelt fedőlemezek között.

A Friedman Rank Test, amelyet az eredmények elemzésére alkalmazunk, azt mutatja, hogy szignifikáns különbség van a kontroll (nem kezelt) és CM-mel kezelt fedőlemezek között, mégpedig 0,01 % ( $p<0,0001$ ) szinten. Amikor a nem regenerálódó (normális) aranyhal látóidegekkel kondicionált tápközeget (CM-N) adunk hasonló módon a tenyészetekhez, nem figyelhető meg hatás az oligodendrociták számára, amint ezt az V. táblázatban bemutatjuk.

V. táblázat. A normális hal látóidegekkel kondicionált tápközeg (CM-N) hatása a hal oligodendrociták számára, összehasonlítva a regenerálódó hal látóidegekkel kondicionált tápközegekkel (CM)<sup>a</sup>

Az oligodendrociták száma ( $\pm$ SD) <sup>b</sup>					
Kontroll		CM-mel kezelt <sup>e</sup>		CM-N-nel kezelt <sup>e</sup>	
92	$\pm 22^c$	50	$\pm 6^c$	103	$\pm 15^c$
46	<sup>d</sup>	ND		45	<sup>d</sup>

<sup>a</sup> A kísérleteket úgy hajtjuk végre, amint ezt az 1. táblázatnál leírtuk

<sup>b</sup> A három párhuzamos standard eltérése

<sup>c</sup> Minden kísérletet három párhuzamosban végzünk, amelyek átlagát adjuk meg

<sup>d</sup> A kísérletek két párhuzamos eredményeit mutatják, ezért SD értéket nem adunk meg

<sup>e</sup> A CM-et és CM-N-t 40  $\mu$ g/ml végső koncentrációban adjuk hozzá

### 7. példa

Ez a kísérlet a találmány szerinti OCF érzékenységét mutatja 56°C hőmérsékleten végzett kezelésre.

Az oligodendrocitákban feldúsított újszülött patkány agy sejtek tenyészeiben levő Galc pozitív sejtek meghatározását ELISA-val végezzük el, olyan módon, ahogyan ezt a kísérleti eljárásoknál leírtuk. Amint a VI. táblázatból látható, 56°C hőmérsékleten csökkenés lép fel a Galc pozitív sejtek számában, amelyet a mért optikai sűrűség csökkenésével bizonyítunk.

VI. táblázat. A kondicionált tápközegben (CM) levő OCF hőmérséklet-érzékenysége ELISA-val mérve

Koncentráció <sup>a</sup>	Átlagos optikai sűrűség $\pm$ SD	
	Szobahőmérséklet	56°C <sup>b</sup>
-	0,752 $\pm$ 0,076 <sup>c</sup>	-
CM(200 $\mu$ g/ml)	0,556 $\pm$ 0,008	0,738 $\pm$ 0,040
CM(20 $\mu$ g/ml)	0,646 $\pm$ 0,029	0,709 $\pm$ 0,016

<sup>a</sup> A CM végső koncentrációja

<sup>b</sup> A tenyészetet 56°C hőmérsékleten melegítjük 30 percen át

<sup>c</sup> A kísérletet 4 párhuzamosban végezzük, amelyek átlagát adjuk meg

### 8. példa

Ez a kísérlet a hal vér-makrofág kondicionált tápközegének hatását mutatja be az oligodendrocitákra.

Makrofágban dúsított tenyészetet készítünk az alábbi módon. Vért veszünk halakból heparint tartalmazó PBS-be, és Hypaque-Ficoll gradiens fölé rétegezzük, ahol a gradienst úgy készítjük el, hogy összekeverünk 70,6 ml 12 %-os (tömeg/térfogat) Ficoll-t (Sigma) 29,4 ml 32,8 %-os (tömeg/térfogat) nátrium-diatriziózáttal (Sigma). 10 ml vért rétegzünk 5 ml, 15 ml-es polisztirol csőben levő Hypaque-Ficollra. A csöveket 1000 xg-nél centrifugáljuk 25 percen át 10°C hőmérsékleten. A limfocitákat tartalmazó "buffy coat" frakciót kivesszük és egyszer mossuk PBS-sel. A sejteket összegyűjtjük és  $20 \cdot 10^6$  sejt/ml koncentrációra állítjuk be. 1 óra múlva 16°C hőmérsékleten a sejteket háromszor mossuk PBS-sel, hogy eltávolítsuk a lazán tapadó és nem tapadó sejteket. Ezután L-15 tápközeget adunk a sejtekhez.

A makrofágban gazdag tenyésztettel kondicionált tápközeget

úgy készítjük el, hogy a sejteket szérumentes tápközegben 8 órán át inkubáljuk, vagy olyan tápközegben inkubáljuk, amely lipopoliszacharidokat tartalmaz. Ezt a kondicionált tápközeget adjuk az oligodendrocita tenyészetekhez, és az oligodendrociták számát az immunfluoreszcens Galc pozitív sejtek megszámlálásával határozzuk meg, amint ezt a kísérleti módszereknél leírtuk. Az első kísérletben a Galc-pozitív sejtek száma, amelyeket a makrofágban gazdag tenyészet kondicionált tápközege jelenlétében számloltunk meg, 420, összehasonlítva a kontrollban levő 839-cel. A második kísérletben 24 a Galc pozitív sejtek száma, összehasonlítva a kontrollban levő 62-vel.

#### 9. példa:

##### Gyógyászati kompozíciók

A jelen találmány szerinti OCF oligodendrocita citotoxikus faktor alkalmazható aktív alkotórészként a központi idegrendszer idegeinek regenerálására alkalmas gyógyászati kompozíciókhoz. Ezeket előnyösen helyileg adjuk be a cél-szervhez. Az OCF-nek bármilyen sója, prekuzora, fragmentuma és/vagy homológja, vagy az OCF valamely funkcionális származéka vagy ennek valamely fragmentuma vagy homológja, vagy mindezek keveréke alkalmazható ugyanerre a célra mindaddig, amíg OCF aktivitásuk van.

Az OCF-et olyan mennyiségben és tisztaságban alkalmazzuk, amely alkalmas a CNS axonok regenerálásának előidézésére emlősökben, elsősorban emberben. Az OCF-et bármilyen módon beadhatjuk, amelyről kiszámítható, hogy eljuttatja a faktort a regenerálandó sérült axonok szomszédságába. Az OCF-et előnyösen egy gyógyászatiilag elfogadható folyékony hordozóban közvetlenül a gyógyítandó helyre injektáljuk. Egy másik eljárás szerint az OCF-et tartalmazó implantátumot sebészeti úton iktatjuk be. Egy

ilyen implantátum tartalmazhat bármilyen olyan anyagot, pl. nitrocellulózt, amely szivacsként abszorbeálja az OCF-et és lassan bocsátja ki azt az implantálás helyén. A gyógyszer bevezetésének más eszközei is nyilvánvalóak azok számára, akik a szakterületen jártasak, és ezek szándékunk szerint mind belül vannak a találmány oltalmi körén.

A bevezetendő OCF mennyisége bármely adott betegbe sokféle tényezőtől függ, pl. a kezelendő sérüléstől, a regenerálandó sérült axon elhelyezkedésétől és a beteg állapotától. Tipikusan azonban az OCF-et mintegy 100 egységes adagban adjuk be, egyetlen injekcióban vagy többszöri injekcióban, a sérült hely környezetébe, vagy az OCF-et nitrocellulózbba vagy más adszorbeáló hordozóba itatjuk. A pontos adagolást tapasztalati úton kell kialakítani.

Az OCF-et előnyösen olyan gyorsan be kell adni a kezelendő sérülés után, amennyire csak lehetséges. Így előnyösebben alkalmazható akut sérüléshez, mint krónikus sérüléshez. Nehezebb regenerálódást előidézni a jelen találmány szerint, ha a degeneráció már hosszabb ideje fennáll.

Bár az OCF egyedüli bevezetése jó eredményeket mutat, az ilyen kezelés kombinálható bármilyen típusú kísérő terápiával, amely hatásainak fokozására irányul. Így pl. a sérült hely besugárzása kis energiájú lézerrel, előnyösen He-Ne lézerrel (5 perc/nap, 35 mW) késleltetheti a degeneráció sérülés utáni előrehaladását és ezáltal késleltetheti a hegeképződést [Assia és munkatársai: Brain Res. 476, 205-212 (1988)].

Azok a sérülések, amelyek a jelen találmány szerint kezelhetők, igen sokfélék lehetnek és nyilvánvalók azok számára, akik a szakterületen jártasak. A nélkül, hogy eljárásunk csak

ezekre korlátozódna, megemlíthetjük a gerincagy sérüléseket, a látóidegek sérüléseit, a hallóidegek sérüléseit, stb. A CNS neuronok idegsebészeti eljárás közbeni sérülései vagy a tumorok által okozott sérülései szintén kezelhetők a jelen találmány szerinti készítményekkel.

A jelen találmány céljaira az OCF-et bármilyen gyógyászati lag elfogadható hordozóval vagy kötőanyaggal kiszerezhetjük. Az OCF-et szolgáltatathatjuk vizes oldatként, pl. steril vizes oldatként. Az OCF-et tartalmazó oldatot vagy port valamely stabilizálószer segítségével stabilizálhatjuk. A kompozíciót a sérülés helyére olyan mennyiségben adjuk be, amely hatékony a sérült axonok regenerálódásának előidézésében.

Az alábbiakban közöljük az irodalmi hivatkozások listáját:

1. Bignami A., Eng L.F. Dahl D. and Uyeda C.T.: Localization of glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. (A glia fibrilláris savas fehérje lokalizálása asztrocitákban immunfluoreszcenciával.) Brain Research, 43, 429-433(1972).
2. Bottenstein J.E. and Sato G.H.: Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. (Patkány neuroblasztóma sejtvonala növekedése szérumentes, kiegészített tápközegben.) Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 76, 514-517(1978).
3. Bradford M.: A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. (Gyors és érzékeny módszer mikrogrammnyomnyiségű fehérje mennyiségi meghatározására a fehérjefesték kötődés elvét alkalmazva.) Anal. Biochem. 72, 248-256(1976).
4. Cohen A. and Schwartz M.: Conditioned media of regenerating

- fish optic nerves modulate laminin levels in glial cells. (A regenerálódó hal látóidegek módosítják a laminin szinteket glia-sejtekben.) J. Neurosci. Res., 22, 269-273(1989).
5. Eisenbarth G.S., Walsh F.S. and Nirenberg M.: Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. (Monoklonális antitest neuronok plazma membrán antigénje ellen). Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 76, 4913-4917(1979).
  6. French-Constant C. and Raff M.C.: Proliferating bipotential glial progenitor cells in adult rat optic nerve. (Burjánzó bipotenciális glia progenitor sejtek felnőtt patkány látóidegben). Nature(Lond.), 319, 499-502(1986a).
  7. Hadani M., Harel A., Solomon A., Belkin M., Lavie V. and Schwartz M.: Substances originating from optic nerves of neonatal rabbit induce regeneration-associated response in injured nerves of adult rabbit. (Az újszülött nyúl látóidegeiből eredő anyagok regenerálódással társuló választ indukálnak felnőtt nyulak sérült idegeiben). Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81, 7965-7969(1984).
  8. Jeserich G. and Roman T.: Glia 3, 65-74(1989).
  9. Lavie V., Harel A., Doron A., Solomon A., Lobel D., Belkin M., Ben-Bassat S., Sharma S. and Schwartz M.: Morphological response of injured adult rabbit optic nerves to implants containing media conditioned by growing optic nerves. (A sérült felnőtt nyúl látóidegek morfológiai válasza a növekedő látóidegekkel kondicionált tápközeget tartalmazó implantátumra). Brain Research, 419, 166-172(1987).
  10. Lillien L.E., Sendtner M., Rohrer H., Hughes S.M. and Raff M.C.: Type-2 astrocyte development in rat brain cultures is initiated by a CNTF-like protein produced by type-1

astrocytes.(A 2. típusú asztrocita kifejlődését patkány agy tenyészetekben egy CNTF-szerű fehérje indítja be, amelyet 1. típusú asztrociták termelnek.) Neuron, 1, 485-494 (1988).

11. McCarthy K.D. and DeVellis J.: Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. (Elkülönített asztroglia és oligodendroglia sejttenyészetek előállítása patkány agyszövetből.) J.Cell.Biol. 851, 890-902(1980).
12. Miller R.H. and Raff M.C.: J. Neurosci. 4, 585-592(1984).
13. Noble M. Murray K., Stroobant P., Waterfield M.D. and Riddle P.: Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type 2 astrocyte progenitor cell, (A vérlemezke-eredetű növekedési faktor elősegíti az oligodendrocita/2. típusú asztrocita progenitor sejtek osztódását és mozgékonyágát, és gátolja ezek érés előtti differenciálódását.) Nature(Lond.) 333, 560-562(1988).
14. Raff M.C., Lillien L.E., Richardson W.D., Burne J.F. and Noble M.D.: Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture.(A vérlemezke-eredetű növekedési faktor, amely asztrocitákból származik, hajtja azt az órát, amely a tenyészetben időzíti az oligodendrocita kifejlődést). Nature (Lond.) 333, 562-565(1988).
15. Raff M.C. and Miller R.H.: T.I.N.S. 7, 469-472(1984).
16. Raff M.C., Miller R.H. and Noble M.: A glia progenitor cell that develops in vitro an astrocyte or an oligodendrocyte depending on the culture medium. (Glia progenitor

- sejt, amely in vitro asztrocitává vagy oligodendrocitává fejlődik a tenyésztő tápközegtől függően). Nature(Lond.), 303, 390-396(1983).
17. Raff M.C., Mirsky R., Fields K.L., Lisak R.P., Dorfman S.H., Silberberg D.H., Grenson N.A., Leibowitz S. and Kennedy M.C.: Galactocerebroside is a specific cell-surface antigenic marker for oligodendrocytes in culture. (A galaktocerebrozid a tenyészetekben levő oligodendrociták fajlagos sejt-felületi antigén markere). Nature(London), 274, 813-816 (1978).
  18. Robbins D.S., Shirazi Y., Drysdale B., Liberman A., Shin H.S. and Shin M.L.: Production of cytotoxic factor for oligodendrocytes by stimulated astrocytes. (Oligodendrociták elleni citotoxikus faktor előállítása stimulált asztrocitákká). J.Immunol., 139, 2593-2597(1978).
  19. Rosen C.L., Bunge R.P., Ard M.D. and Wood P.M.: Type 1 astrocytes inhibit myelination by adult rat oligodendrocytes in vitro. (Az 1. típusú asztrociták gátolják a felnőtt patkány oligodendrociták általi in vitro mielinezést). J.Neurosci., 9, 3371-3379(1988).
  20. Richardson W.D., Pringle N., Mosley M.J., Westermarck B. and Dubois-Dalcq M.: A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. (A vérlemezke-eredetű növekedési faktor szerepe a normális gliogenezisben a központi idegrendszerben). Cell, 53, 309-319(1988).
  21. Schwartz M., Belkin M., Harel A., Solomon A., Lavie V., Hadani M., Rachailovich I. and Stein-Izdek C.: Regenerating fish optic nerves and regeneration-like response in injured

optic nerve of adult rabbits. (Regenerálódó hal látóidegek és regeneráció jellegű válasz felnőtt nyulak sérült látóidegeiben). Science, 228, 600-603(1985).

22. Selmaj K.W. and Ramie C.S.: Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocytes damage in vitro. (A tumor nekrosis faktor közvetíti az in vitro mielin és oligodendrocita károsodást) Ann.Neurol., 23, 339-346(1988).
23. Sommer I. and Schachner M.: Monoclonal antibodies (01 to 04) to oligodendrocyte cell surfaces: An immunocytological study in the central nervous system. (Oligodendrocita sejtfelületek elleni monoklonális antitestek (01-04): immunocitológiai tanulmány a központi idegrendszerben). Dev.Biol., 83, 311-327(1981).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

- 1.) Oligodendrocita citotoxikus faktor (OCF), ennek sói, prekurzorai, fragmentumai és/vagy homológjai, valamint az OCF funkcionális származékai, ennek fragmentumai és/vagy homológjai azzal jellemezve, hogy szelektíven toxikusak az oligodendrocita vonalra.
- 2.) Oligodendrocita citotoxikus faktor (OCF), ennek sói, prekurzorai, fragmentumai és/vagy homológjai, valamint az OCF funkcionális származékai, ennek fragmentumai és/vagy homológjai azzal jellemezve, hogy szelektíven toxikusak az oligodendrocita vonalra, ahol a toxicitást ezek azon képességével mérjük, hogy csökkentik az érett oligodendrociták számát sérült idegek nyészeteiben.
- 3.) Az 1. vagy 2. igénypont szerinti faktor azzal jellemezve, hogy gátolja az oligodendrocita vonal progenitorjainak differenciálódását érett oligodendrocitákká és 2. típusú asztrocitákká.
- 4.) Az 1.-3. igénypontok bármelyike szerinti faktor azzal jellemezve, hogy vízzoldható és hőérzékeny, aktivitását 56°C hőmérsékleten melegítve elvesztve.
- 5.) Az 1.-4. igénypontok bármelyike szerinti faktor azzal jellemezve, hogy proteázra érzékeny és aktivitását tripszinnel végzett emésztéskor elveszíti.
- 6.) Az 1.-5. igénypontok bármelyike szerinti faktor azzal jellemezve, hogy alacsonyabbrendű gerincesek sérült, regenerálódó idegeiből, pl. sérült hal látóidegekből nyerhető, és az említett regenerálódó idegek kondicionált tápközegéből tisztítható.
- 7.) Az 1.-6. igénypontok bármelyike szerinti faktor azzal jellemezve, hogy makrofágokból nyerhető és a makrofágok kondicio-

nált tápközegéből tisztítható.

8.) Az 1.-7. igénypontok bármelyike szerinti faktor azzal jellemezve, hogy valamely alacsonyabbrendű gerinces regenerálódó sérült idegeiből, pl. sérült hal látóidegekből nyerhető, és csökkenti az érett oligodendrociták számát emlős idegek tenyészetében.

9.) Oligodendrocita citotoxikus faktor azzal jellemezve, hogy az alábbi jellemzőkkel bír:

i.) szelektíven toxikus az oligodendrocita vonalra, míg nem toxikus más sejtekre, pl. 1. típusú asztrocitákra és fibroblaszt sejtekre;

ii.) csökkenti az érett oligodendrociták számát alacsonyabbrendű gerincesek és emlősök sérült idegeinek tenyészetében;

iii.) gátolja az oligodendrocita vonal progenitorjainak differenciálódását érett oligodendrocitákká és 2. típusú asztrocitákká;

iv.) vízóldható;

v.) hőérzékeny, aktivitását 56°C hőmérsékleten végzett melegítéssel elvesztve;

vi.) proteáz-érzékeny, aktivitását tripszinnel végzett emésztéssel elvesztve;

vii.) jelen van alacsonyabbrendű gerincesek, pl. halak sérült, regenerálódó idegeinek kondicionált tápközegeiben, de nincs jelen sem az alacsonyabbrendű gerincesek ép idegeinek kondicionált tápközegeiben, sem az emlősök sérült vagy ép idegeinek kondicionált tápközegeiben;

viii.) jelen van makrofágok kondicionált tápközegeiben; és

ix.) az alacsonyabbrendű gerincesek sérült, regenerálódó idegeinek vagy makrofágoknak kondicionált tápközegéből tisztítható.

títható.

10.) Antitestek azzal jellemezve, hogy ezek az 1.-9. igénypontok bármelyike elleni antitestek.

11.) A 10. igénypont szerinti antitestek azzal jellemezve, hogy poliklonális antitestek.

12.) A 10. igénypont szerinti antitestek azzal jellemezve, hogy monoklonális antitestek.

13.) Az 1.-9. igénypontok bármelyike szerinti faktor, ennek sói, prekursorai, fragmentumai és/vagy homológjai, valamint ezen faktor funkcionális származékai, ezek fragmentumai és/vagy homológjai azzal jellemezve, hogy gyógyászatilag aktív anyagként alkalmazhatók emlősök idegei regenerálódásának indukálására.

14.) Az 1.-9. igénypontok bármelyike szerinti faktor, ennek sói, prekursorai, fragmentumai és/vagy homológjai, valamint ezen faktor funkcionális származékai, ezek fragmentumai és/vagy homológjai azzal jellemezve, hogy a központi idegrendszer sérült idegei regenerálódásának indukálására alkalmazhatók emlősökben.

15.) Az 1.-9. igénypontok bármelyike szerinti faktor, ennek sói, prekursorai, fragmentumai és/vagy homológjai, valamint ezen faktor funkcionális származékai, ezek fragmentumai és/vagy homológjai azzal jellemezve, hogy a központi idegrendszer idegeinek emlősökben való regenerálására szolgáló gyógyászati kompozíciók előállítására alkalmazhatók.

16.) Gyógyászati kompozíció azzal jellemezve, hogy aktív alkotórészként valamely, 1.-9. igénypontok szerinti oligodendrocita citotoxikus faktort, vagy ennek sóit, prekursorait, fragmentumait és/vagy homológjait, vagy ezen faktor funkcionális származékait, ezek fragmentumait és/vagy homológjait vagy mindezek keverékét tartalmazza, valamely gyógyászatilag elfogadható hor-

dozóval együtt.

17.) A 16. igénypont szerinti gyógyászati kompozíció azzal jellemezve, hogy a cél-szervhez juttatandó helyi beadáshoz készül a központi idegrendszer idegeinek regenerálására.

18.) Gyógyászati kompozíció azzal jellemezve, hogy egységnyi dózisú oligodendrocita citotoxikus faktorból és valamely gyógyászatilag elfogadható hordozóból vagy kötőanyagból áll, ahol az egység olyan mennyiséget jelent, amely hatékony a sérült axonok regenerálódásának előidézésére, amikor a sérülés helyére visszük be.

19.) Eljárás egy 1.-9. igénypontok bármelyike szerinti faktor előállítására azzal jellemezve, hogy alacsonyabbrendű gerincesek regenerálódó idegeinek vagy makrofágoknak kondicionált tápközegét elkülönítési folyamatoknak, előnyösen kromatográfiának vetjük alá.

**S.B.C.S.K.**  
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI  
ÉS SZAKADALMI IRODA  
106 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.  
TELEFON: 153-6733

*Földbolt 7 a/Smoldal*

*Földbolt*

5507/90

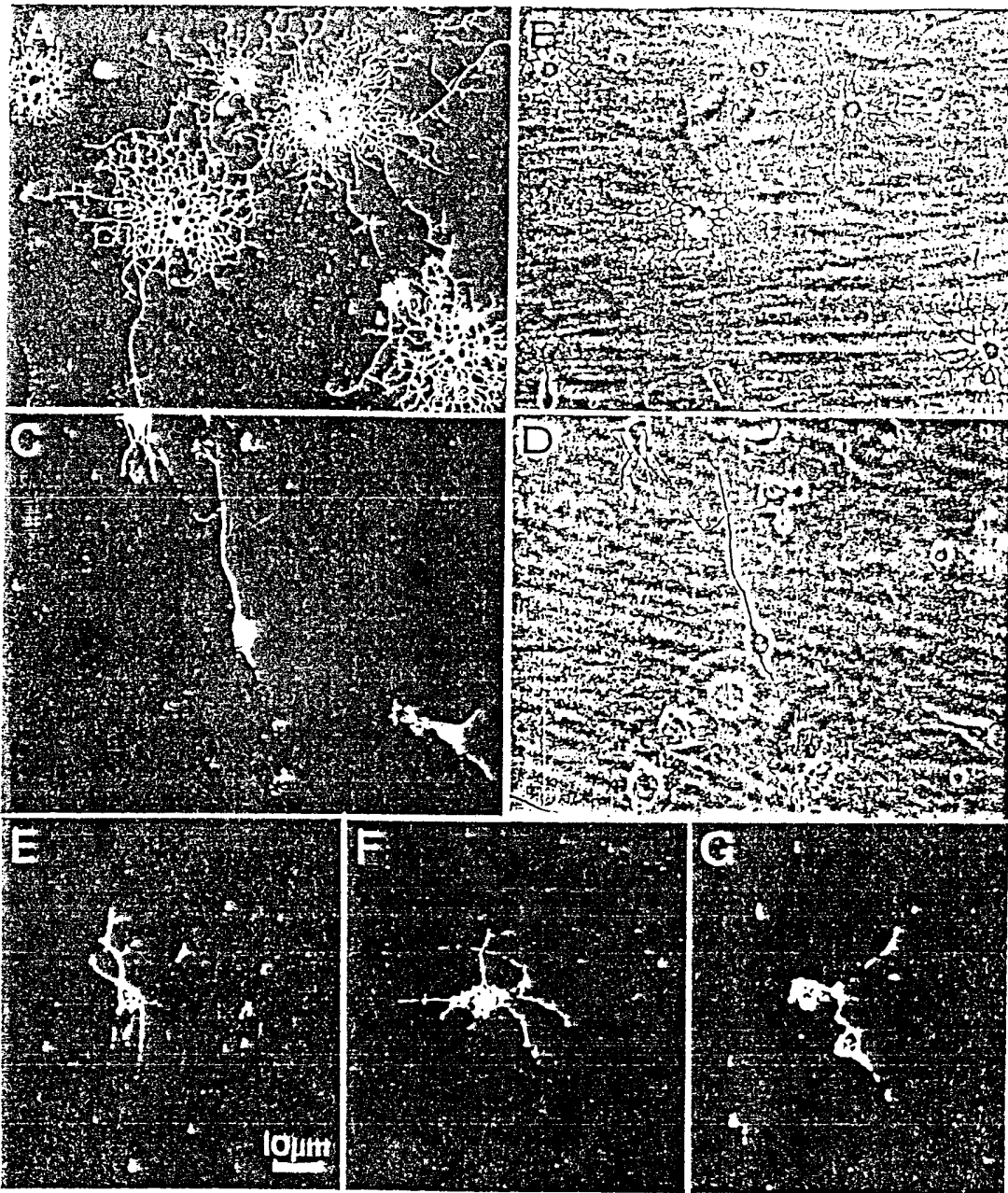


(91)

KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY

-56117-

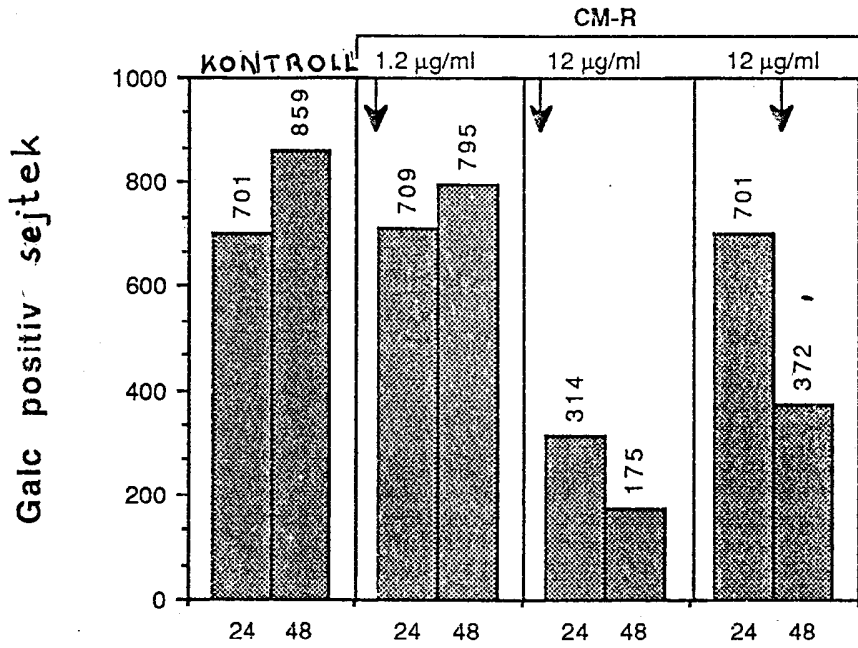
7/1



1. ábra

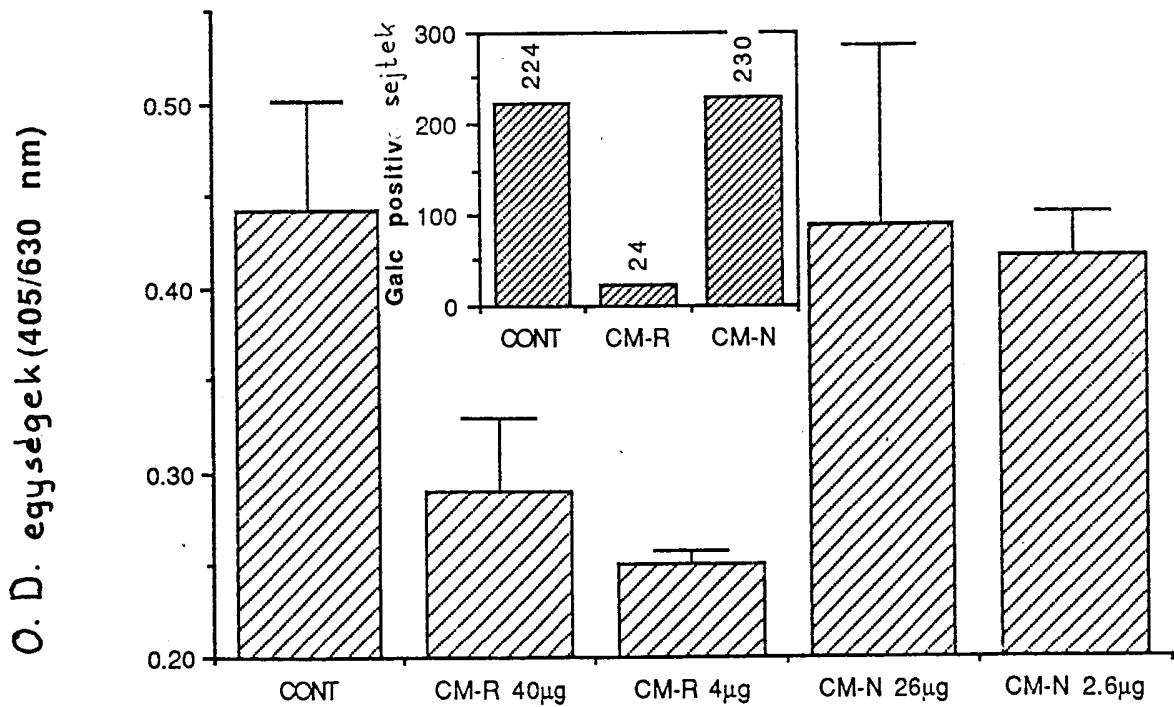
S.B.G. & K.  
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ŐGYVÉDI  
ÉS SZABADALMI IRODA  
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.  
TELEFON: 183-3733

*[Handwritten signature]*



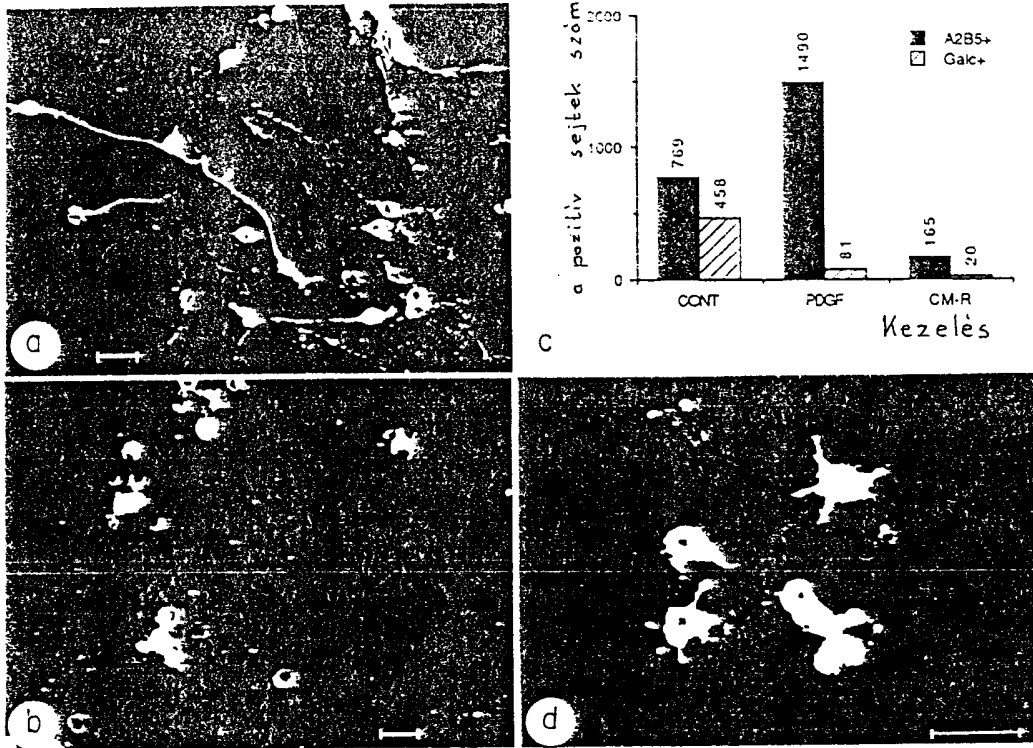
In vitro órák (hiv)

2. ábra

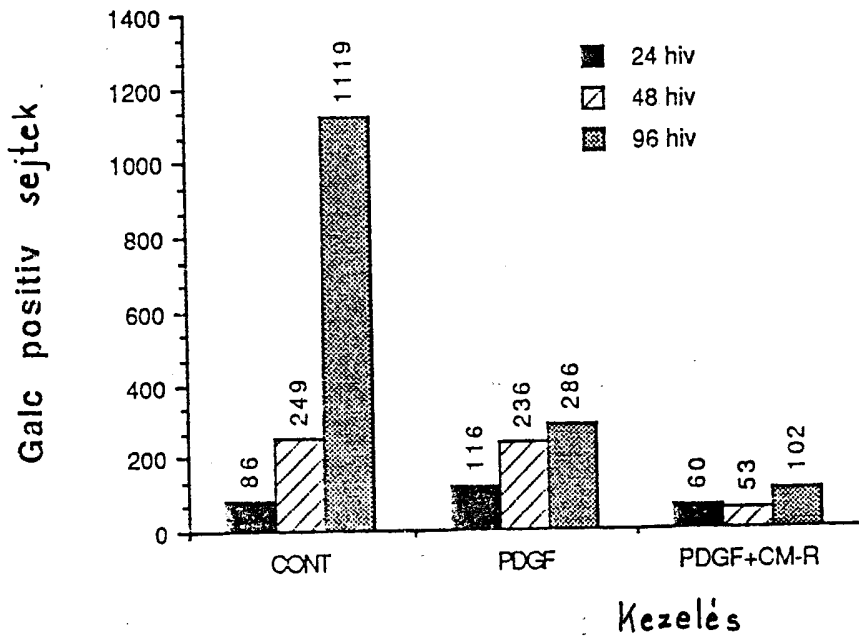


Kezelés

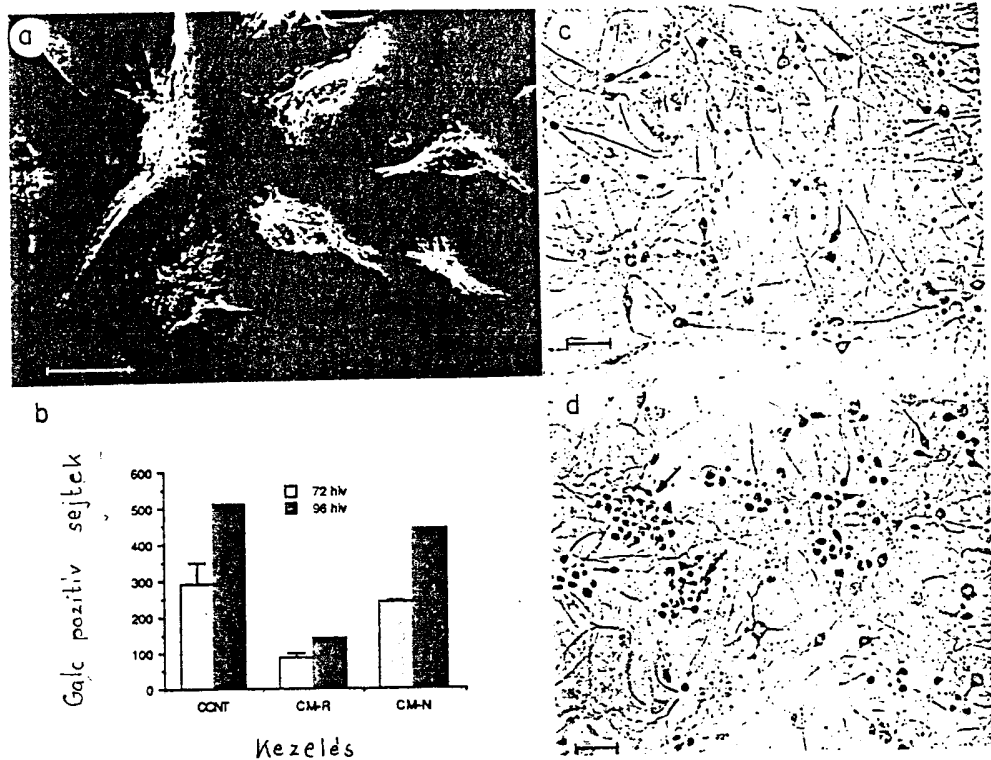
3. ábra



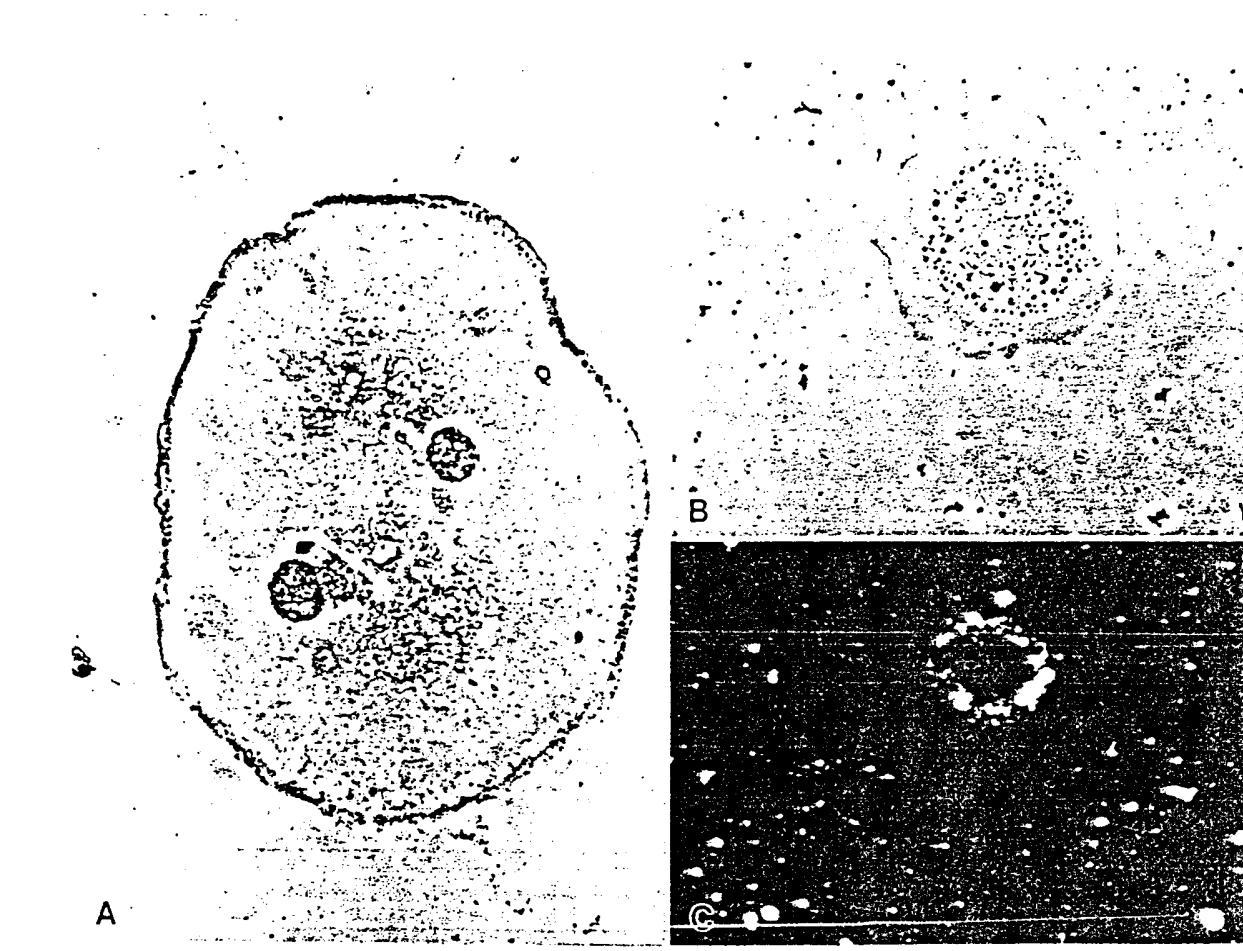
4. ábra



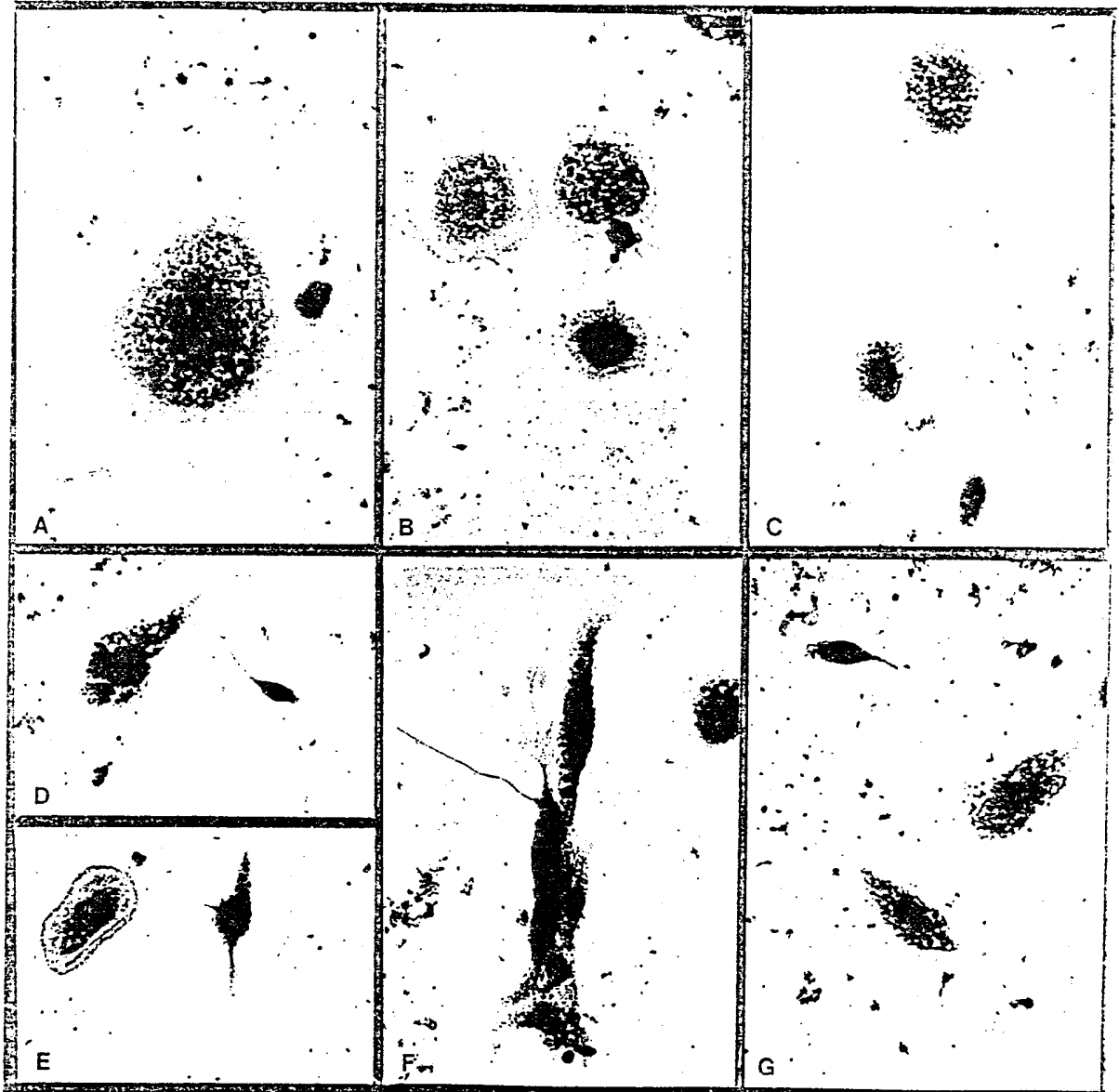
5. ábra



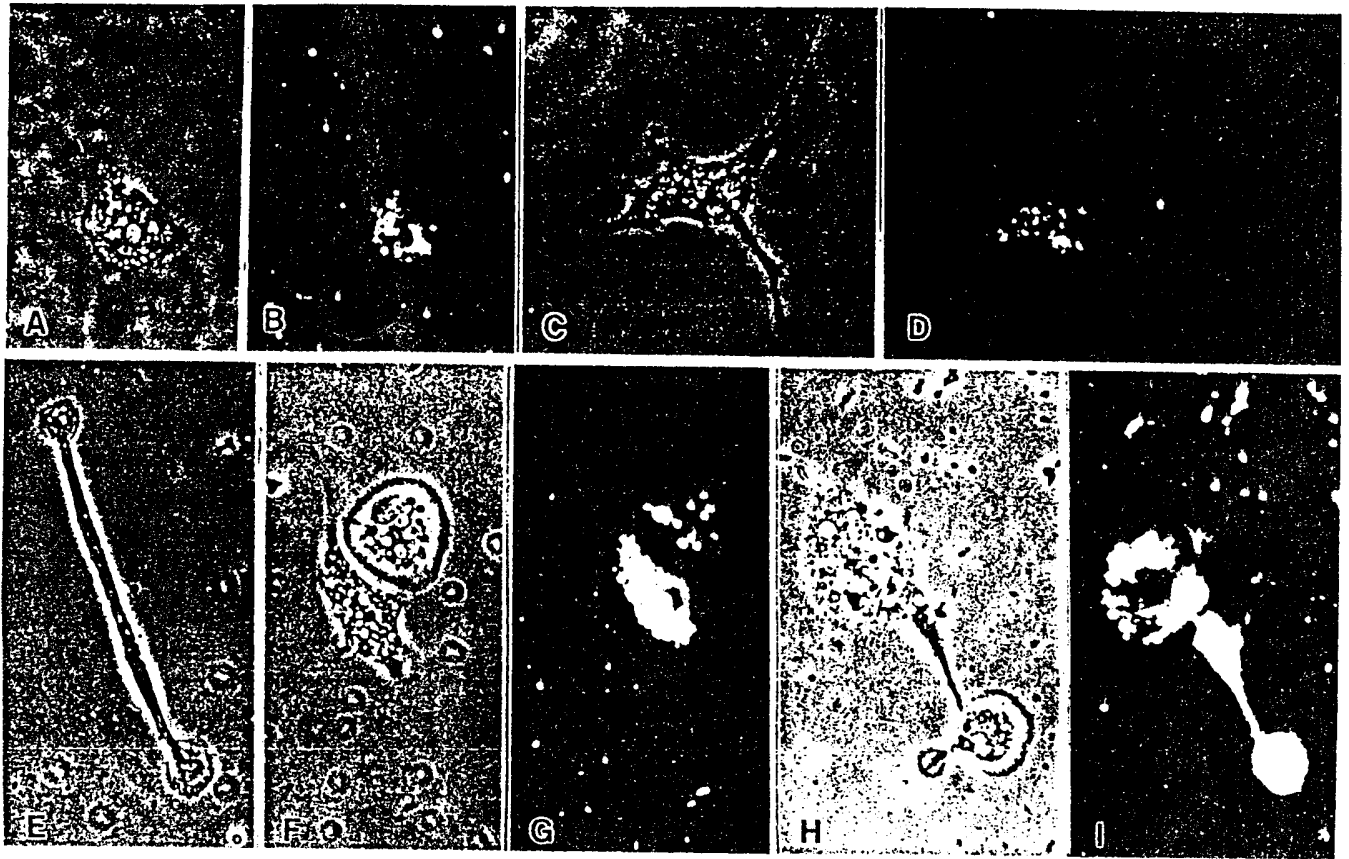
6. ábra



7. ábra



8. ábra



9. ábra