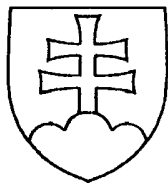


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(22) Dátum podania: 10.01.94
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 727 704
(32) Dátum priority: 10.07.91
(33) Krajina priority: US
(43) Dátum zverejnenia: 08.02.95
(86) Číslo PCT: PCT/US92/04228, 19.05.92

(21) Číslo dokumentu:

26-94

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 P 21/06

(71) Prihlasovateľ: Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY, US;
Max Planck, Gesellschaft zur Förderung, Göttingen, DE;

(72) Pôvodca vynálezu: Wong Vivien, Scarsdale, NY, US;
Radziewski Czeslaw, North White Plains, NY, US;
DiStefano Peter, Carmel, NY, US;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Farmaceutický prostriedok na liečenie porúch a ochorení motorických neurónov**

(57) Anotácia:
Farmaceutický prostriedok na liečenie ochorení motorických neurónov ako svoju účinnú zložku obsahuje účinné množstvo neurotrofného faktora zo skupiny BDNF/NT - 3/NGF, schopného podporovať prežívanie, rast alebo diferenciáciu motorických neurónov a prípadne ďalšiu látku s obdobným účinkom, napríklad CNTF, spolu s farmaceuticky prijateľným nosičom. Použité látky podporujú prežívanie, rast a/alebo diferenciáciu motorických neurónov in vitro.

Farmaceutický prostriedok na liečenie porúch a ochorení motorických neurónov

Oblasť techniky

Vynález sa týka farmaceutických prostriedkov na liečenie ochorenia motorických neurónov. Tieto farmaceutické prostriedky obsahujú účinné množstvá neurotrofného faktora zo skupiny BDNF, NT-3 a NGF. Tieto faktory podporujú prežívanie, rast a/alebo diferenciáciu motorických neurónov, výhodné sú najmä faktory BDNF alebo NT-3. Pomocou týchto faktorov je možné uľahčiť pestovanie motorických neurónov, diagnostiku porúch motorických neurónov a identifikovať látky, ktoré môžu motorické neuróny poškodiť alebo priaznivo ovplyvniť, faktory je možné využiť aj na tvorbu živočíšnych modelov na ochorenie motorických neurónov.

Doterajší stav techniky

Motorické neuróny

Interakcia medzi motorickými neurónmi a svalovými bunkami určuje napätie svalu a uskutočnenie svalového stahu, takže je základom pre všetky vedomé aj podvedomé pohyby.

Motorické neuróny sa tradične klasifikujú ako horné motorické neuróny a spodné motorické neuróny. Vyššie motorické neuróny sú uložené v precentrálnom gyre mozgu a vysielajú dlhé výbežky smerom dole k synapsiám pre nižšie motorické neuróny vo ventrálnej (prednej) rohovej šedej hmoty. Z ventrálnej rohovej šedej vytvárajú aksonové výbežky nižších motorických neurónov svojím spojením ventrálne miechové korene. Tieto výbežky sú potom ukončené v jednom alebo vo väčšom počte svalových látok. Rozvetvením koncovej časti svojho vlákna sa každý z nižších motorických neurónov dostáva do styku od niekoľkých do 100 alebo 200 alebo ešte väčšieho počtu svalových látok, čím vzniká takzvaná "moto-

rická jednotka", ako je opísané napríklad v publikácii Adams a Victor, 1985, "Principles of Neurology", McGraw-Hill, Inc., New York, str. 37.

Poruchy motorických neurónov majú za následok rôzne stupne svalovej slabosti, ktorá má rozsah od drobných ťažkostí pri vykonávaní niektorých pohybov až do úplnej obrny. Poruchy nižších motorických neurónov sú obvykle spojené s chabou obrnou a poklesom svalového tonusu. Skupiny svalov, inervované jediným nervom alebo tie skupiny svalov, ktorých motorické neuróny ležia blízko seba v mieche, môžu byť zasiahnuté súčasne a môže dôjsť k úplnej atrofii až do 70 až 80 % celkovej svalovej hmoty. Chorobne zmenený motorický neurón sa môže stať dráždivým a svalové vlákna, ktoré sú riadené sa môžu z času na čas izolovať od ďalších vlákien, takže môžu vznikať viditeľné šklbnutia čiže fascikulácia. Na druhej strane v prípade, že sú poškodené vyššie motorické neuróny, dochádza k spastickej obrne so zvýšením svalového napätia a zvýšenými šľachovými reflexmi. V tomto prípade je obvykle skôr zasiahnutá celá končatina alebo polovica tela než jednotlivé svalové skupiny. Atrofia je miernejšia a je obvykle výsledkom toho, že končatina nie je používaná. K svalovým šklbnutiam nedochádza. Identifikácia klinického syndrómu podľa vyšších alebo nižších motorických neurónov môže uľahčiť celú diagnózu a liečenie.

Poruchy motorických neurónov

Motorické neuróny môžu byť zasiahnuté celým radom neurologických porúch. Vyššie motorické neuróny sú prevážne zasiahnuté pri mozgových poruchách, najmä cievnych, pri nádoroch, infekciách a úrazoch. Nižšie motorické neuróny alebo bunky predných miechových rohov sú pri týchto chorobách zasiahnuté druhotne, ale okrem toho môžu byť poškodené pri rade ochorení, vyskytujúcich sa prevážne v mieche, ako sú amyotrofná laterálna skleróza, miechová svalová atrofia detského veku, detská obrna a stavy po tejto obrne, rôzne de-

dičné neuropatie motorických a senzorických nervov a toxické motorické neuropatie, vznikajúce napríklad po vincristíne.

Z týchto porúch predných miechových rohov (AHC) je najbežnejšia amyotrofická laterálna skleróza, ALS alebo Lou Gehrigovo ochorenie, ako bolo opísané vo Williams a Windebank, 1991, Mayo Clin. Proc., 66 : 54 až 82.

Počiatočné sťažnosti väčšiny chorých, trpiacich ALS je slabosť, ktorá sa obyčajne skôr prejavuje na horných končatinách podľa Gubbay a ďalší, 1985, J. Neurol., 232, 295 až 300, Vejajiva a ďalší, 1967, J. Neurol. Sci., 4, 299 až 314, Li a ďalší, 1988, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 51 : 778 až 784. Slabosť, atrofia a ďalšie prejavy choroby sú asymetrické a často ložiskové podľa Munsat a ďalší, 1988, Neurol., 38: 409 až 413. Časté sú svalové škľbnutia, parestézie a bolesť podľa Williams a Windebank, vyššie. Tam sú opísané aj veľmi často sa vyskytujúce svalové škľbnutia. Rýchlosť postupu choroby je u rôznych chorých rôzna podľa Gubbaya a ďalší, 1985, J. Neurol. 232: 295 až 300, avšak prakticky vo všetkých prípadoch má choroba za následok takmer úplnú obrnu včítane obrny dýchacích svalov a končí smrťou.

Anatomicky je najvýraznejšou zmenou atrofia miechy a ventrálnych miechových koreňov a tuhosť laterálnych častí (z tohto dôvodu bolo ochorenie nazvané amyotrofická laterálna skleróza podľa vyššie uvedenej publikácie Williamsa a Windebanka. V priebehu ochorenia sú často zasiahnuté aj vyššie motorické neuróny, ktoré degenerujú. Mozog môže mať makroskopicky normálny vzhľad, avšak obyčajne dochádza k atrofii motorickej oblasti mozgovej kôry vzhľadom na zasiahnutie vyšších motorických neurónov. Dochádza k veľkým stratám Betzových buniek a ďalších pyramidových buniek v precentrálnej oblasti kôry a dochádza k relatívnemu pomnoženiu glií podľa Hammer a ďalší, 1979, Exp. Neurol., 63,

336 až 346.

Epidemické štúdie preukázali, že pri vzniku choroby hrajú svoju úlohu tak dedičné faktory, ako aj vplyv prostredia podľa vyššie uvedenej publikácie Williamsa a Windebanka. Skôr bola choroba považovaná za ochorenie stredného veku, avšak v poslednej dobe sa ukazuje, že ALS je skôr ochorenie staršieho veku (tamtiež).

Súčasný liečebný postup spočíva v liečení príznakov tak, aby bolo dosiahnuté zlepšenie únavnosti a pokiaľ možno odstránenie bolesti a kŕčov. Ku kompenzácii svalovej slabosti sa používajú podporné prístroje. Farmakologické liečenie so snahou zmeniť priebeh ochorenia však bolo až dosiaľ do značnej miery neúspešné. Použitie tyreotropného hormónu poskytuje rozporné výsledky podľa Brooks, 1989, Ann. N. Y. Acad. Sci., 553 : 431 až 461. Podávanie gangliosidov bolo neúčinné podľa Lacomblez a ďalší, 1989, Neurol. 39 : 1635 až 1637. Plazmoferéza nemala žiadny liečebný účinok ani v kombinácii s imunosupresívnou liečbou podľa Olarte a ďalší, 1983, Arch. Neurol., 40 : 752 až 753. Protivírusová látka guanidín mala krátkodobé priaznivé účinky, avšak výsledky neboli reprodukovateľné podľa Munsat a ďalší, 1981, Neurol., 31 : 1054 až 1055. Bolo opísané, že podávanie aminokyselín s rozvetveným reťazcom na aktiváciu glutamátdehydrogenázy môže spomaliť postup choroby podľa Plaitakis a ďalší, 1988, Lancet 1 : 1015 až 1018. Rad súčasných liečebných postupov, v ktorých niektoré nie sú ešte dopracované, zahŕňa napríklad ožarovanie lymfoidného tkaniva celého tela, použitie aminokyselín N-acetylcysteínu, N-acetylmethionínu alebo L-treonínu a dlhodobú infúziu hormónu, uvoľňujúceho tierotropný do miechového kanála podľa Williamsa a Windebanka vyššie opísané.

Zo živočíšnych modelov, na ktorých je možné pozorovať klinickú a patologickú podobnosť s ALS je možné uviesť myši Mnd, autosomálnu dominantnú mutantu, u ktorej dochádza k sa-

movolnému nástupu progresívnej degenerácie vyšších a nižších motorických neurónov vo vyššom veku podľa Messer a Flaherty, 1986, J. Neurogen., 3 : 345 až 355, myši kmeňa wobblers, u ktorých dochádza vzhľadom na denerváciu svalov v včasnom veku ku slabosti a atrofii predných končatín a hereditárnu miechovú svalovú atrofiu u psov (Brittany spaniel) podľa Sack a ďalší, 1984, Ann. Neurol., 15 : 369 až 373, Sililevis a ďalší, 1989, J. Neurof. Sci., 91 : 231 až 258, Bird a ďalší, 1971, Acta Neuropathol., 19 : 39 až 50.

Ciliárny neurotrofný faktor a prežívanie motorických neurónov

Vo zverejnenej PCT prihláške č. WO 91/04316, dátum zverejnenia 4. apríla 1991 sa uvádza, že ciliárny neurotrofný faktor CNTF je schopný podporovať prežívanie motorických neurónov in vitro a in vivo. Implantáty z penového materiálu, obsahujúce CNTF zvýšili prežívanie motorických neurónov u poranených lícných nervov novorodených potkanov. CNTF je neurotrofný faktor s biologickým účinkom, ktorý je veľmi odlišný od biologických účinkov faktorov zo skupiny neurotrofínov včítane BDNF, NT-3 a NGF.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvorí farmaceutický prostriedok na liečenie ochorenia motorických neurónov, napríklad amyotrofickéj laterálnej sklerózy, ktorý obsahuje účinné množstvo neurotrofného faktora zo skupiny BDNF, NT-3 alebo NGF, prostriedok podporuje prežívanie, rast a/alebo diferenciáciu motorických neurónov. Prostriedok je založený na zistení, že BDNF a NT-3 môžu zvýšiť účinnosť enzýmu cholinacetyltransferázy v kultúrach motorických neurónov a sú retrográdne transportované z ischiadického nervu do miechy. Vo výhodnom, špecifickom uskutočnení vynálezu je možné na uvedené účely použiť kombináciu BDNF alebo NT-3 a druhej látky, napríklad ciliárneho faktora CNTF.

Prostriedok podľa vynálezu je teda možné použiť aj na podporu prežívania, rastu a/alebo diferenciácie motorických neurónov in vitro, ku kultúre motorických neurónov sa potom pridáva účinná koncentrácia faktora zo skupiny BDNF, NT-3 alebo NGF.

V ďalšom možnom uskutočnení poskytuje vynález skúšobnú metódu, ktorú je možné použiť na identifikáciu látok s účinkom, podobným účinku BDNF alebo NT-3, to znamená látok, použiteľných na liečenie chorôb motorických neurónov.

Podľa vynálezu je možné pripraviť aj živočíšne modely na ochorenie motorických neurónov tak, že sa zvieratá imunizujú proti členom skupiny BDNF, NT-3 a NGF alebo derivátom týchto látok podaním protilátok proti tejto skupine zlúčenín alebo podaním antimediatorových oligonukleotidov pre túto skupinu zlúčenín.

Skratky

V nasledujúcom opise a patentových nárokoch sú použité nasledujúce skratky:

BDNF	neurotrofný faktor, odvodený od mozgového tkaniva
b- FGF	základný rastový faktor fibroblastov
CAT	cholínacetyltransferáza
NGF	nervový rastový faktor
NT-3	neurotrofín-3

Na podrobné vysvetlenie podstaty bol opis rozdelený na nasledujúce pododstavce:

- i) látky zo skupiny molekúl BDNF, NT-3 a NGF, ktoré je možné v rámci vynálezu využiť,
- ii) liečebné použitie,
- iii) použitie in vitro,
- iv) diagnostické využitie,
- v) testovacie systémy a
- vi) živočíšne modely.

- i) Látky zo skupiny molekúl BDNF, NT-3 a NGF, ktoré je možné v rámci vynálezu využiť

Bolo preukázané, že BDNF alebo NT-3 môžu zvýšiť účinnosť cholinacetyltransferázy v kultúrach motorických neurónov, čo znamená, že niektoré látky zo skupiny neurotrofínov je možné použiť na podporu prežívania, rastu a/alebo diferenciácie motorických neurónov, ako bude ďalej podrobnejšie opísané v príkladovej časti v príklade 1 a 2. Skutočnosť, že tieto neurotrofíny pôsobia priamo na motorické neuróny je podporovaná pozorovaním, že BDNF a NT-3 sú retrográdne transportované do ventrálnej časti miechy, kde sa nachádzajú bunky motorických neurónov, ako bude ďalej opísané v príkladovej časti.

Podľa vynálezu je teda možné uvedenými látkami podporovať prežívanie, rast a/alebo diferenciáciu motorických neurónov pri využití molekúl zo skupiny zlúčenín BDNF, NT-3 alebo NGF.

Pri výhodnom vykonaní vynálezu sa využívajú zlúčeniny z tejto skupiny tak, aby došlo k zvýšeniu účinnosti cholinacetyltransferázy v motorických neurónoch v pomere k motorickým neurónom bez ošetrovania.

V najvýhodnejšom vykonaní podľa vynálezu je možné využiť zlúčeniny BDNF alebo NT-3, ktoré boli opísané v zverejnenej PCT prihláške č. WO 91/03568, deň zverejnenia 21. marca 1991 a v PCT prihláške č. WO 91/03569, deň zverejnenia taktiež 21. marec 1991, na podporu prežívania a/alebo diferenciácie motorických neurónov. Ako bude ďalej preukázané v príkladoch 1 a 2, je možné použiť BDNF alebo NT-3 na zvýšenie účinnosti cholinacetyltransferázy v kultúre motorických neurónov. Okrem toho je možné použiť aj ďalšie zlúčeniny zo skupiny molekúl BDNF, NT-3 a NGF, ktoré môžu byť identifikované spôsobom podľa zverejnených PCT patentových prihlášok č. WO 91/03568 a WO 91/03569 k tomu istému účelu za predpokladu, že sa preukáže, že aj tieto zlúčeniny môžu podporovať rast a/alebo diferenciáciu motorických neurónov. Okrem toho je možné použiť aj syntetické molekuly, ktoré sú svojou primárnou štruktúrou odlišné od akýchkoľvek známych látok z vyššie uvedenej skupiny zlúčenín a ktoré môžu podporovať rast a/alebo diferenciáciu motorických neurónov.

Vzhľadom na to, že BDNF a NT-3 sú pri zvyšovaní účinnosti cholínacetyltransferázy v motorických neurónoch účinnejšie než NGF, mali by tieto syntetické molekuly mať účinnosť podobnú skôr účinnosti BDNF alebo NT-3 než účinnosti NGF.

Zlúčeniny z vyššie uvedenej skupiny látok je možné na použitie v rámci vynálezu získať akýmkoľvek známym spôsobom. Je napríklad možné ich čistiť z prírodného tkaniva, syntetizovať chemicky alebo s výhodou získať v systémoch na expresiu rekombinantnej DNA, prokaryotických a eukaryotických, napríklad v bunkách COS. Spôsoby na výrobu týchto molekúl zahŕňujú aj tie postupy, ktoré boli opísané v zverejnených PCT patentových prihláškach WO 91/03568 a WO 91/03569.

Vo výhodnom špecifickom uskutočnení vynálezu je možné BDNF alebo NT-3 izolovať z prostredia s eukaryotickými bunkami, môže ísť napríklad o bunky vaječníkov čínskeho škrečka, CHO, po transfekcii BDNF. Po expresii BDNF týmito bunkami môže byť táto látka čistená v dvoch stupňoch, najskôr pomocou kationmeniča a potom chromatografiou na géli. V prípade BDNF je napríklad možno prostredie, získané z biologického reaktora Opticell (Charles River), naočkované bunkami, u ktorých dochádza k expresii BDNF zriediť destilovanou vodou v pomere 1,25 : 1 a kontinuálne privádzať na stĺpec s obsahom S-Sepharózy (Pharmacia) na uskutočnenie rýchlej chromatografie. Je napríklad možné priviesť do stĺpca celkový objem 10,6 litrov zriedeného materiálu v priebehu 5 dní, pričom je možné použiť stĺpec s vnútorným priemerom 1,6 cm a objemom 15 ml. Stĺpec sa potom premýva 50 ml pufra s 20 mM MES s pH 5,8 a potom 50 ml toho istého pufra s obsahom 250 mM chloridu sodného a potom opäť tým istým pufrom MES bez chloridu sodného tak dlho, až sa pri 280 nm dosiahne základnú čiaru, ktorá sa už nemení. Potom sa stĺpec vymýva 25 ml pufra s obsahom 20 mM bicínu s pH 8,5, potom ešte 15 ml pufra s obsahom 100 mM chloridu sodného. Potom je možné stĺpec postupne vymývať vždy 150 ml chloridu sodného pri gradiente 100 mM až 750 mM v 20 mM bicínového pufra s pH 8,5, pričom rýchlosť prietoku je približne 2,5 ml/min. Prietok sa sleduje pri 280 nm pri citlivosti 0,2 jednotky v celej stupnici.

Frakcie, obsahujúce rekombinantný BDNF je možné identifikovať biologickou skúškou na explantáte DRG (gangliá dorsálnych koreňov). Frakcie s najvyššou špecifickou účinnosťou sa pravdepodobne získajú pri koncentrácii chloridu sodného v rozmedzí 500 až 750 mM. Tieto frakcie je možné spojiť a koncentrovať ultrafiltráciou cez membránu pri použití vysokého tlaku a membrány typu omega, schopnej oddeliť látky od molekulovej hmotností 3000 alebo pri použití ekvivalentnej membrány s nízkou nešpecifickou väzbou BDNF. Koncentrovanú vzorku je potom možné naniesť napríklad na stĺpec s obsahom gélu Sephacyl S-100HR (Pharmacia) s vnútorným priemerom 1,6 cm a objemom 120 ml. Tento stĺpec sa naplní a uvedie do rovnovážneho stavu v 20 mM pufru HEPES s pH 7,6 s obsahom 400 mM chloridu sodného. Stĺpec sa potom vymýva pri rýchlosti prietoku 0,25 ml/min. Frakcie sa odoberajú a skúmajú na účinnosť BDNF biologickou skúškou na explantátoch DRG. Frakcie medzi 80 a 90 ml budú pravdepodobne obsahovať biologicky rekombinantný BDNF. Tieto frakcie je možné spojiť a analyzovať elektroforézou na redukujúcom SDS-polyakrylamidovom géli, je možné analyzovať ich N-terminálny reťazec a taktiež je možné zistiť kvantitatívny obsah zvyškov aminokyselín. V prípade potreby je možné upraviť objem.

Molekuly zo skupiny látok BDNF, NT-3 a NGF zahrňujú aj také molekuly, pre ktoré sú kódovými reťazcami gény s homológiou v tej oblasti homológie, ktorá je spoločná pre všetky tri uvedené látky. Látky z uvedenej skupiny ja potom možné podrobiť selekcii skúškami na biologickú účinnosť pri prežívaní alebo pri diferenciácii motorických neurónov. Látky z uvedenej skupiny, ktoré by mohli byť využiteľné v rámci vynálezu, by mali mať aspoň niektorý z nasledujúcich účinkov, bez toho aby ich pôsobenie malo byť na uvedené účinky obmedzené:

- i) zvýšené prežívanie alebo prežívanie motorických neurónov v kultúre po dlhšiu dobu,
- ii) zvýšená tvorba výbežkov u motorických neurónov v kultúre alebo in vivo,

- iii) zvýšená produkcia molekúl, pridružených k motorickým neurónom v kultúre alebo in vivo, môže ísť tiež o tvorbu cholinacetyltransferázy alebo acetylcholin-esterázy, postupy, ktorými je možné účinnosť týchto látok merať, budú ďalej uvedené v príkladovej časti v príklade 1 a 2 alebo
- iv) zníženie príznakov disfunkcie motorických neurónov v živých organizmoch.

Uvedené účinky môžu byť merané akýmkoľvek spôsobom, ktorý je v danej oblasti techniky používaný. Vo výhodnom uskutočnení je možné merať zvýšené prežívanie motorických neurónov spôsobom podľa publikácie Arakawa a ďalší, 1990, J. Neurosci., 10 : 3507 až 3515, zvýšenú tvorbu výbežkov motorických neurónov je možné dokázať spôsobmi podľa Petronk a ďalší, 1980, Exp. Neurol., 70 : 65 až 82 alebo Brown a ďalší, 1981, Ann. Rev. Neurosci., 4 : 17 až 42, zvýšenú produkciu molekúl, pridružených k činnosti motorických neurónov je možné merať biologickými skúškami, enzymatickými skúškami, väzbou protilátok, hybridizáciou Northern blot a podobne, v závislosti na type meranej molekuly, disfunkciu motorických neurónov je možné merať na základe fyzikálnych prejavov porúch motorických neurónov, ako sú slabosť, znížená rýchlosť prenosu motorických neurónov alebo poruchy funkcie.

V ďalších uskutočneniach podľa vynálezu je možné látky zo skupiny zlúčenín BDNF, NT-3 a NGF kombinovať s ďalšou látkou na podporu prežívania a/alebo diferenciácie motorických neurónov. Je žiaduce, aby táto druhá látka taktiež účinne podporovala prežívanie motorických neurónov a/alebo ich diferenciáciu. Vo výhodnom uskutočnení vynálezu je napríklad možné kombinovať zlúčeninu z uvedenej skupiny látok s CNTF na zlepšenie prežívania a/alebo diferenciácie motorických neurónov. Ako bude ďalej vysvetlené v príklade 1, bolo pozorované, že BDNF v kombinácii s CNTF má na účinnosť CAT motorických neurónov aspoň aditívny účinok.

ii) Použitie na liečebné účely

Farmaceutické prostriedky podľa vynálezu je možné použiť na liečenie porúch motorických neurónov tak, že sa chorému podá účinné množstvo neurotrofného faktora zo skupiny molekúl BDNF, NT-3 alebo NGF, ktoré podporujú prežívanie, rast alebo diferenciáciu motorických neurónov.

Pojem "porucha motorických neurónov" tak, ako je tu používaný, sa týka akéhokoľvek stavu, pri ktorom dochádza k poruche normálnej funkcie motorických neurónov. Môže pri tom ísť o poruchy, ktoré môžu, avšak nemusia zasahovať špecificky alebo selektívne motorické neuróny. Poruchami motorických neurónov, ktoré je možné uvedeným spôsobom zlepšiť, zahrňujú napríklad také poruchy, ako krvné výrony, infekcie, pôsobenie jedovatých látok, úrazy, stavy po chirurgickom zákroku, degeneratívne ochorenia alebo zhubné ochorenia, ktoré môžu ovplyvniť motorické neuróny rovnakým spôsobom ako ďalšie zložky nervového systému. Uvedeným spôsobom je však možné zlepšiť aj stavy, pri ktorých dochádza k selektívnemu poškodeniu neurónov, ako sú amyotrofická laterálna skleróza, progresívna atrofia svalov, zásobovaných miechovými nervami, progresívna bulbárna obrna, primárna laterálna skleróza, infantilná a juvenilná svalová atrofia, progresívna bulbárna paralýza v detskom veku (Fazio-Londov syndróm), detská obrna a stavy po detskej obrne a geneticky podmienená neuropatia motorických a senzorických nervov, ochorenie Charcot-Marie-Tooth.

Tieto zlúčeniny zo skupiny látok BDNF, NT-3 a NGF, ktoré sú v rámci vynálezu použiteľné, boli už opísané vyššie. Účinné dávky je možné v jednotlivých prípadoch stanoviť obvyklými postupmi. Účinné dávky a prípadne toxické dávky (do-siaľ však neboli pozorované žiadne toxické účinky pre zlúčeniny zo skupiny BDNF, NT-3 a NGF) môžu byť stanovené, s výhodou in vitro tak, aby bolo možné identifikovať optimálne rozmedzie dávok, ako bude ďalej opísané.

V rôznych špecifických uskutočneniach je možné neurotrofné faktory zo skupiny zlúčenín BDNF, NT-3 a NGF podávať

spoločne s účinným množstvom aspoň jednej ďalšej zlúčeniny, ktorá je sama osebe schopná podporovať prežívanie, rast alebo diferenciáciu motorických neurónov. Zlúčeniny zo skupiny látok BDNF, NT-3 a NGF je napríklad možné podávať spoločne s CNTF. Vo výhodnom špecifickom uskutočnení je možné pri liečení porúch motorických neurónov podávať spoločne najmä BDNF a CNTF.

V prípade, že sú uvádzané zlúčeniny zo skupiny látok BDNF, NT-3 a NGF, predpokladá sa aj možné použitie rôznych fragmentov, derivátov, agonistov alebo antagonistov neurotrofných molekúl z tejto skupiny látok.

Neurotrofný faktor alebo faktory podľa vynálezu môžu byť podávané pri použití akéhokoľvek farmakologicky prijateľného nosiča. Taktiež spôsob, ktorým sú látky podávané, môže byť akýkoľvek známy spôsob a zlúčeniny je teda možné podávať napríklad vnútrožilovo, intratekálne, podkožne, injekciou do podkožného tkaniva, intraarteriálne, do nosa, perorálne alebo vo forme implantátu. Podstatu vynálezu tvoria farmaceutické prostriedky, ktoré obsahujú látky zo skupiny BDNF, NT-3 alebo NGF, napríklad BDNF alebo NT-3 spoločne s CNTF spolu s nosičom, prijateľným z farmakologického hľadiska.

Podávanie takéhoto prostriedku môže viesť k distribúcii neurotrofného faktora alebo faktorov po celom tele alebo len v obmedzenej oblasti. V niektorých prípadoch, ktoré sa týkajú od seba vzdialených oblastí nervového systému, môže byť žiaduce podávať neurotrofný faktor vnútrožilovo alebo intratekálne. Na druhej strane v prípadoch, kedy sú zasiahnuté obmedzené oblasti nervového systému, ako je tomu napríklad pri poškodení motorických neurónov, ku ktorému došlo na základe úrazu alebo chirurgického zákroku, môže byť žiaduce prostriedok podľa vynálezu podávať miestne. V týchto prípadoch je napríklad vhodné uložiť implantát s obsahom neurotrofného faktora do poškodenej časti systému alebo do jej blízkosti. Vhodné implantáty sú napríklad z penového gélu, vosku alebo môže ísť o implantáty na báze mikročastíc.

iii) Použitie in vitro

Vynález navrhuje spôsob, ktorým je možné zlepšiť prežívanie, rast a/alebo diferenciáciu motorických neurónov tak, že sa tieto neuróny vystavia pôsobeniu účinnej koncentrácie neurotrofného faktora z vyššie uvedenej skupiny zlúčenín. Tento postup je možné uskutočniť aj in vitro a tiež v tomto prípade sú výhodnými zlúčeninami z vyššie uvedenej skupiny látok BDNF alebo NT-3.

Pri rôznych uskutočneniach in vitro je možné účinné množstvo neurotrofného faktora obyčajne stanoviť len prípad od prípadu vzhľadom nato, že motorické neuróny z rôznych tkanív alebo rôznych živočíšnych druhov môžu byť na jednotlivé neurotrofné faktory citlivé. Pre určitú kultúru môže byť žiaduce skonštruovať krivku závislosti odpovedí na dávke tak, aby bola preukázaná korelácia medzi koncentráciou neurotrofného faktora a odpoveďou motorických neurónov. Aby bolo možné vyhodnotiť prežívanie, rast a/alebo diferenciáciu motorických neurónov, môže byť užitočné porovnať populáciu motorických neurónov po pôsobení zlúčeniny z uvedenej skupiny látok s populáciou motorických neurónov, ktorá takémuto účinku vystavená nebola. Na vyhodnotenie prežívania je možné použiť farbivá, ktorými sa farbía len živé bunky, mikroskop a fázovým kontrastom a/alebo farbivá pre nervové vlákna tak, aby bolo možné merať tvorbu výbežkov nervových buniek alebo je možné použiť postupy, pri ktorých sa merá biologická účinnosť zlúčenín, pridružených k motorickým neurónom, ako je napríklad cholínacetyltransferáza CAT. Účinnosť CAT je napríklad možno merať tak, že sa oddelia a rozrušia ošetrené a neošetrené motorické neuróny v roztoku s obsahom 20 mM tris-HCl s pH 8,6 s obsahom 0,1 % Triton X-100, oddelia sa podiely po niekoľkých mikrolitroch a účinnosť CAT sa merá tak, že sa ako substrát použije 0,2 ml (1-¹⁴C)acetyl-CoA, 300 mM NaCl, 8 mM cholínbromidu, 20 mM EDTA a 0,1 mM neostigmínu v pufri s 50 mM NaH² s pH 7,4 pri použití postupu vykonávaného na veľmi malom množstve materiálu podľa Fonnum, 1975, J. Neurochem., 24 : 407 až 409 tak, ako bude ďalej

opísané v príklade 2.

V špecifickom vykonaní, na ktoré však vynález nemá byť obmedzený, je možné motorické neuróny pripraviť a pestovať in vitro nasledujúcim spôsobom. Aspoň časť miechy, získaná s výhodou z embryonálneho organizmu, napríklad potkana, sa asepticky vyberie a oddelí od ostatných častí tkaniva, najmä od senzorických ganglií a od miechových blán. Ventrálne segmenty miechy sa potom izolujú vzhľadom na to, že motorické neuróny sú uložené vo ventrálnych, predných rohoch miechy. Segmenty tohto tkaniva sa potom rozdelia na malé časti a inkubujú sa približne 20 minút v 0,1% trypsíne a 0,01% deoxyribonukleáze typu 1 vo fyziologickom roztoku chloridu sodného s fosfátovým pufrom (PBS), zbaveným vápnika a horčíka pri teplote 37 °C. Trypsínový roztok je potom možné odstrániť a bunky sa prepláchnu a uložia do čerstvého prostredia, napríklad 45 % Eaglovho minimálneho základného prostredia MEM, 45 % Hamovej živnej zmesi F12, 5 % fetálneho telacieho séra, inaktivovaného teplom, 2 mM glutamínu, 0,5 jednotiek/ml penicilínu G a 0,5 mikrogramov/ml streptomycínu. Tkanivo sa potom mechanicky rozruší jemným rozotretím Pasteurovou pipetou a supernatanty sa spoja a prefiltrujú cez nylonový filter, napríklad Nitex, Tetko, 40 µm. Prefiltrovaná bunková suspenzia potom môže byť frakcionovaná pri použití modifikovaného postupu, opísaného v publikácii Schnaar a Schaffner 1981, J. Neurosc., 1 : 204 až 217. Všetky stupne postupu sa majú vykonávať pri teplote 4 °C. Metrizamid je možné rozpustiť v zmesi prostredia F12 a MEM v pomere 1 : 1 a je možné vytvoriť diskontinuálny gradient, ktorý je tvorený vrstvou 18% metrizamidu, napríklad 0,5 ml, potom nasledujú 3 ml 17% metrizamidu, 3 ml 12% metrizamidu a 3 ml 8% metrizamidu. Prefiltrovanú suspenziu buniek, napríklad v množstve 2,5 ml je možné navrstviť na postupne vytvorený gradient a skúmavku odstrediť po dobu 15 minút pri 2500 g pri použití napríklad rotora Sorval HB4. Pri odstredení sa obyčajne vytvoria tri vrstvy buniek: Frakcia I na rozhraní 0 až 8 %, frakcia II na rozhraní 8 až 12 % a frakcia III na rozhraní koncentrácie 12 až 17 %. Frakcia I, ktorá je obohatená o motorické neuró-

ny, môže byť odstránená v malom objeme, napríklad 1 ml a dvakrát premytá definovaným prostredím, zbaveným séra, napríklad prostredím, ktoré je tvorené 50 % F12 a 50 % MEM a je doplnené 2 mM glutamínu, 5 mikrogramami/ml inzulínu, 100 mikrogramami/ml transferínu, 20 mM progesterónu, 100 μ M putrescínu a 30 nM selenitu sodného, ako je opísané v publikácii Bottenstein and Sato, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 76 : 514 až 517. Počet životaschopných buniek je potom možné preukázať pomocou hemocytometra pri farbení trypanovou modrou. Suspenziu buniek, obohatenú o motorické neuróny je potom možné naniesť na platne s vyhlíbeninami pre tkanivové kultúry, s výhodou s priemerom 6 mm, vopred opatrených povlakom poly-L-ornitínu napríklad 19 mikrogramov/ml a laminínu napríklad v rovnakej koncentrácii. Potom je možné pridávať napríklad BDNF do konečnej koncentrácie v rozmedzí 0,01 až 100 ng/ml, s výhodou 50 ng/ml alebo sa pridáva NT-3 do konečnej koncentrácie v rozmedzí 0,01 až 100 ng/ml, s výhodou 5 ng/ml alebo sa pridáva BDNF vo vyššie uvedenom koncentračnom rozmedzí spolu s CNTF v koncentrácii aspoň 1 ng/ml a s výhodou približne 10 ng/ml. Kultúry motorických neurónov je potom možné udržiavať v definovanom prostredí, zbavenom séra pri teplote 37 °C v atmosfére, obsahujúcej 95 % vzduchu a 5 % oxidu uhličitého pri relatívnej vlhkosti, ktorá sa blíži 100 %.

Diagnostické použitie

Podstatu vynálezu tvorí aj spôsob diagnostiky porúch motorických neurónov, ktorý spočíva v tom, že sa porovnáva koncentrácia neurotrofného faktora zo skupiny látok BDNF, NT-3 a NGF vo vzorke a potom sa zistí úbytok koncentrácie neurotrofného faktora u chorého, ktorý je v korelácii s prítomnosťou určitej poruchy motorických neurónov. Poruchy motorických neurónov, ktoré je týmto spôsobom možné diagnostikovať, sú napríklad poruchy, ktoré boli uvedené vyššie, možnosť diagnostiky však nie je na tieto poruchy obmedzená.

Koncentráciu neurotrofného faktora je možné určiť akým-

koľvek známym spôsobom, napríklad imunoadsorpčnou "sendvičovou" skúškou s viazaným enzýmom alebo akoukoľvek inou skúškou s využitím protilátok proti neurotrofnému faktoru, vrátane skúšky Western blot a hybridizácie in situ, biologickými skúškami na účinnosť, analýzou Northern blot a podobne.

Vzorka môže byť odobratá a akéhokoľvek vhodného tkaniva alebo telovej tekutiny vrátane mozgového tkaniva, nervového tkaniva, mozgo-miechového moku alebo krvi.

Nízka koncentrácia neurotrofného faktora môže byť definovaná ako štatisticky významný rozdiel medzi koncentráciou neurotrofného faktora u chorého a u zdravého človeka. Líšia sa koncentrácia však môže byť nielen znížená, ale aj zvýšená v porovnaní s normálnou koncentráciou a/alebo sa môže vyskytovať u chorého v celom organizme alebo len v obmedzenej oblasti. U chorých s celkovo zníženou hladinou neurotrofného faktora môže byť zvlášť vhodné faktor podávať, ako už bolo uvedené vyššie. U chorých so zvýšenou koncentráciou neurotrofného faktora môže dochádzať k expresii abnormálneho faktora alebo sa môže vyskytovať odchýlka v receptore pre faktor. V tomto prípade ide najmä o menšie množstvo receptorov. Chorí, ktorí majú menšie alebo abnormálne množstvo receptorov pre daný faktor, môžu byť identifikované skúškou na receptory pre neurotrofný faktor, napríklad tak, že sa porovnáva schopnosť príslušných buniek viazať značený neurotrofný faktor so schopnosťou buniek zdravého človeka. Chorých s menším množstvom receptorov alebo s abnormálnymi receptormi môže, avšak nemusí byť možné priaznivo ovplyvniť podávaním neurotrofného faktora, obyčajne je skôr možné ich stav zlepšiť podávaním agonistov alebo analógov príslušného neurotrofného faktora.

Zistenie, že BDNF alebo NT-3 môžu byť retrográdne transportované motorickými neurónmi, poskytuje metódu na diagnostiku porúch motorických neurónov, ktorá súvisí s BDNF alebo NT-3 tak, že sa injekčne podá značený BDNF alebo NT-3 tak, že značená látka vstupuje do motorického nervu a potom sa stanoví, či dochádza k jej retrográdnemu prenosu, pričom skutočnosť, že k tomuto prenosu nedochádza, je v pozitívnej

korelácii s disfunkciou motorických neurónov. Tento postup je možné aplikovať pri diagnostike niektorých porúch, ako je amyotrofická laterálna skleróza, progresívna spinálna svalová atrofia, infantilná svalová atrofia, detská obrna, stavy po detskej obrne, ochorenie Charcot-Marie-Tooth a tiež stavy po úraze alebo po poškodení nervov.

Testovacie systémy

Vynález sa týka aj testovacích systémov, ktoré je možné použiť na identifikáciu zlúčenín, využiteľných na liečenie motorických neurónov. Pomocou týchto systémov je možné vyhodnotiť skúmanú látku, pokiaľ ide o jej schopnosť blokovat väzbu BDNF alebo NT-3 na motorické neuróny.

Podstatu vynálezu tvorí aj spôsob skúmania určitých látok na schopnosť podporovať prežívanie, rast alebo diferenciáciu motorických neurónov. Postup spočíva v tom, že sa motorické neuróny v kultúre vystavia pôsobeniu značeného BDNF alebo NT-3 alebo akejkoľvek inej látky zo skupiny, do ktorej tieto zlúčeniny patria za takých podmienok, že značený BDNF alebo NT-3 je schopný sa viazať na motorické neuróny a súčasne sa motorické neuróny vystavia pôsobeniu skúmanej látky, pričom prípadná inhibícia alebo väzba značeného BDNF alebo NT-3 na skúmanú látku znamená, že látku je možné využiť na liečenie porúch motorických neurónov. Látky, ktoré sú pri týchto skúškach pozitívne, je však nutné ďalej vyhodnotiť in vitro alebo in vivo priamo na schopnosť podporovať prežívanie, rast alebo diferenciáciu motorických neurónov v kultúre. Látka, pre ktorú je výsledok negatívny, môže byť v niektorých prípadoch látkou, antagonizujúcou účinnosť typu BDNF alebo NT-3.

BDNF alebo NT-3 je možné označiť tak, aby označenie bolo zistiteľné akýmkoľvek známym spôsobom včítane zaradenia rádioaktívne značených aminokyselín alebo naviazaním zistiteľného "predĺženia" na molekulu neurotrofného faktora. Takéto predĺženie môže byť fluorescenčné, môže mať enzymatickú účinnosť, môže ísť o protilátku, schopnú viazať sa na

neurotrofný faktor alebo antigén, schopný viazať protilátku, napríklad časť antigénu myc, ktorý je schopný sa viazať na protilátku proti myc.

Látky, ktoré je možné v rámci vynálezu použiť zahrňujú neurotrofné faktory zo skupiny BDNF, NT-3 a NGF, ich fragmenty alebo deriváty, ďalšie peptidy, peptidové deriváty a nepeptidové zlúčeniny bez toho, aby bol vynález na použitie týchto látok obmedzený.

V špecifickom vykonaní je možné postupovať tak, že sa rádioaktívne značený BDNF inkubuje spolu s neznačenou skúmanou látkou v kultúre za podmienok, pri ktorých môže dôjsť k väzbe BDNF. V kontrolnej vzorke sa tie isté motorické neuróny vystavia pôsobeniu rádioaktívne značeného BDNF v neprítomnosti skúmanej látky. V prípade, že skúmaná látka je schopná sa viazať na receptor BDNF, môže dôjsť ku kompetitívnej inhibícii väzby značeného BDNF. V prípade, že sú potom bunky premyté na odstránenie nenaviazaného BDNF, je možné očakávať, že kultúra s obsahom skúmanej látky bude menej rádioaktívna než kontrolná kultúra.

Živočíšne modely

Vynález ďalej navrhuje použitie živočíšnych modelových systémov pre poruchy motorických neurónov. Ide o živočíchy so systemickým alebo generalizovaným nedostatkom alebo úplným nedostatkom BDNF alebo NT-3. Generalizovanú depleciu BDNF alebo NT-3 je možné vyvolať tak, že sa skonštruuje živočích, u ktorého dochádza k expresii protilátky proti BDNF alebo NT-3. Takýto živočích môže vzniknúť imunizáciou za použitia BDNF alebo NT-3 z iného druhu alebo faktora, ktorý bol chemicky modifikovaný tak, aby vyvolával imunitu. Miestne vyčerpanie faktorov môže byť dosiahnuté tak, že sa protilátka proti BDNF alebo NT-3 použije miestne, napríklad vo forme implantátu, ako hybridómu v blízkosti precentrálneho gyru. Okrem toho je možné získať transgénické živočíchy, u ktorých bola tvorba endogénneho BDNF alebo NT-3 zablokovaná vyradením génu pre tieto látky pomocou homológnej rekombinácie.

binácie.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Na obr. 1 je znázornená účinnosť cholínacetyltransferázy v závislosti na koncentrácii BDNF. Kultúry, obohatené o motorické neuróny boli pestované v chemicky definovanom prostredí, zbavenom séra celkom 2 dni a bola zistená účinnosť cholínacetyltransferázy v impulzoch za minútu z priebehu jednej hodiny na jedno vyhlbenie $\pm$ stredná chyba. BDNF bol pridaný v okamžiku nanášania kultúry na platne v koncentráciách 10 pg/ml až 100 ng/ml ako riedidlo bol použitý fyziologický roztok chloridu sodného s fosfátovým pufrom, PBS, bolo použitých 0,5 mg tejto látky na 1 ml BSA ako riedidla. Kontrolné kultúry obsahovali 0,5 mg PBS/ml BSA.

Na obr. 2 je znázornený výsledok pokusu, pri ktorom boli kultúry, obohatené o motorické neuróny pestované dva dni v chemicky definovanom prostredí, zbavenom séra a potom bola stanovená účinnosť cholínacetyltransferázy v impulzoch za minútu v priebehu jednej hodiny na jedno vyhlbenie $\pm$ stredná chyba. V okamžiku nanesenia kultúry na platňu bolo pridané aj faktory CNTF, BDNF, bFGF, NGF a CNTF/BDNF spoločne vždy v koncentrácii 59 ng/ml pri zriedení 0,6 mg PBS/ml BSA. Kontrolné kultúry obsahovali 0,5 mg PBS/ ml BSA.

Na obr. 3 je znázornený výsledok pokusu, pri ktorom boli kultúry, obohatené o motorické neuróny pestované v chemicky definovanom prostredí, zbavenom séra celkom 2 dni a potom bola stanovená účinnosť cholínacetyltransferázy v impulzoch za minútu na jedno vyhlbenie v priebehu 1 hodiny $\pm$ stredná chyba. V okamžiku nanesenia na platne bol pridaný faktor nt-š v koncentrácii 10 pg/ml až 100 ng/ml.

Na obr. 4 je znázornená krivka odpovede v závislosti na dávke pre rekombinantný BDF, čistený spôsobom podľa odstavca 8 pri biologickom pokuse na explantáte ganglií dorsálnych

miechových koreňov.

Na obr. 5 je znázornená morfológia neurónov motorického líčneho nervu v mozgovom tkanive u potkanov, starých 7 dní, po jednostrannom poškodení líčneho nervu v okamžiku vrhu. Znázornená je a) poškodená strana po pôsobení BDNF, b) poškodená strana po pôsobení NT-3, c) poškodená strana po pôsobení NGF, d) poškodená strana po pôsobení BSA ako kontrolnej látky, e) nepoškodená strana toho istého zvieraťa ako v prípade a) a f) stav po poškodení a pôsobení CNTF ako kontrolnej látky, vo všetkých prípadoch je zväčšenie 400x.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

BDNF zvyšuje účinnosť cholinacetyltransferázy v kultúre motorických neurónov z ventrálnej časti miechy

1) Materiály a metódy

a) Pokusné zvieratá

Embrya E14 potkanov kmeňa Sprague-Dawley (HSD alebo Zivic-Miller) boli použité na vykonanie všetkých pokusov. Brezivé potkany boli usmrtené oxidom uhličitým a zárodky boli rýchlo vybraté a uložené do prostredia, chladeného ľadom na ďalšie použitie.

b) Technika tkanivových kultúr

Z uvedených zárodkov, starých 14 dní, sa odoberú miechy. Miecha sa preruší kaudálne smerom od predĺženej miechy na úrovni prvých ganglií dorsálnych koreňov a zbaví sa ganglií pre senzorické nervy a ľnúcich blán. Potom sa miecha rozdelí na ventrálne a mediodorsálne segmenty, ktoré sú určené na pestovanie v oddelených kultúrach. Ventrálne časti miechy sa rozdelia na malé časti a inkubujú v 0,1% trypsíne (GIBCO) a 0,01% deoxyribonukleáze typu 1 (Sigma) v roztoku

chloridu sodného s fosfátovým pufrom, PBS, zbavenom vápnika a horčíka, celkom 20 minút pri teplote 37 °C. Potom sa trypsinový roztok odstráni a bunky sa prepláchnu a uložia do prostredia, ktoré je tvorené 45 % Eaglovho minimálneho základného prostredia MEM, 45 % Hamovej živnej zmesi F12, 5 % fetálneho telacieho séra (Gibco), inaktivovaného teplom, 5 % teplom inaktivovaného konského séra (Gibco), okrem toho prostredie obsahuje 2 mM glutamínu, 0,5 jednotiek penicilínu G/ml a 0,5 mikrogramov streptomycínu/ml. Tkanivo sa potom mechanicky rozruší jemným rozotrením Pasteurovou pipetou, supernatanty sa spoja a prefiltrujú nylonovým filtrom (Nitetex, Tetko, 40 mikrometrov). Prefiltrovaná suspenzia buniek sa potom podrobí frakcionácii tak, ako bude ďalej uvedené.

c) Frakcionácia buniek ventrálnej časti miechy za použitia hustotného gradientu metrizamidu

Táto frakcionácia je modifikáciou postupu podľa publikácie Schnaar a Schaffner, 1981, J. Neurosci., 1 : 204 až 217. Všetky stupne boli vykonávané pri teplote 4 °C. Metrizamid bol rozpustený v prostredí s obsahom F12 a MEM v pomere 1 : 1 a bol vytvorený diskontinuálny gradient tak, že najskôr bola použitá vrstva 0,5 ml 18% metrizamidu, potom boli použité 3 ml 17% metrizamidu, 3 ml 12% metrizamidu a 3 ml 8% metrizamidu. 2,5 ml prefiltrovanej suspenzie buniek ventrálnej časti miechy, získanej vyššie uvedeným spôsobom bolo prevrstvené na tento gradient a skúmvka bola odstredená 15 minút pri 2500 g za použitia rotora Sorvall HB4. Odstredením vznikli tri vrstvy buniek: frakcia I na rozhraní 0 až 8 %, frakcia II na rozhraní 8 až 12 % a frakcia III na rozhraní 12 až 17 %. Frakcia I, obohatená o motorické neuróny na rozhraní 0 až 8 % bola odobratá v malom objeme približne 1 ml, dvakrát premytá prostredím, zbaveným séra a tvoreným 50 % F12 a 50 % MEM, prostredie bolo upravené doplnením 2 mM glutamínu, 5 mikrogramov/ml inzulínu, 100 mikrogramov/ml transferínu, 20 nM progesterónu, 100 µM putrescínu a 30 nM selenitu sodného podľa Bottestein a Sato,

1979, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76 : 514 až 517. Počet životaschopných buniek je možné zistiť hemocytometrom pri farbení trypanovou modrou. Suspenzia buniek z frakcie I, obohatená o motorické neuróny sa potom naniesie na platňu pri hustote 100 000 buniek/cm², použijú sa platne s priemerom vyhlbenín 6 mm, vyhlbenia sú vopred opatrené povlakom 10 mikrogramov/ml poly-L-ornitrínu (Sigma) a 10 mikrogramov/ml laminínu (GIBCO). Rastové faktory CNTF a BDNF boli pridané ten istý deň, kedy boli kultúry prenesené na platne. Kultúry boli udržiavané v definovanom živnom prostredí, zbavenom séra pri teplote 37 °C v atmosfére, obsahujúcej 95 % vzduchu a 5 % oxidu uhličitého pri relatívnej vlhkosti v blízkosti 100 %. Druhý deň, po 48 hodinách boli bunky izolované na meranie účinnosti cholinacetyltransferázy CAT podľa publikácie Fonnum, 1975, J. Neurochem., 24 : 407 až 409, postup je podrobnejšie opísaný nižšie v príklade 1.

d) Neurotrofný faktor, odvodený od mozgového tkaniva, BDNF

BDNF bol produkovaný v bunkách CHO a bol čistený zo živného prostredia s obsahom týchto buniek až do homogenity, preukázanej elektroforézou na polyakrylamidovom géli pri farbení striebrom a analýzou reťazca aminokyselín, ako bude nižšie opísané v príklade 3.

e) Ciliárny neurotrofný faktor CNTF

CNTF, použitý vo všetkých pokusoch bol rekombinantný CNTF potkana, ktorého expresia bola dosiahnutá v E. coli, zlúčenina bola čistená spôsobom podľa medzinárodnej patentovej prihlášky Masiakowski a ďalší, WO 91/04316.

f) Ďalšie faktory

NGF (2,5S), použitý pri týchto štúdiách bol čistený zo slinných žliaz myši spôsobom podľa publikácie Mobley a ďalší, 1976, Biochemistry, 15 : 5543 až 5551. Faktor FGF je do-

dávaný Collaborative Research.

2) Výsledky

Účinnosť BDNF na účinnosť cholinacetyltransferázy

V prípade, že sa na kultúry, obohatené o motorické neuróny pôsobí BDNF, dochádza k 4 až 5 násobnej maximálnej stimulácii účinnosti CAT po 48 hodinách v porovnaní s kontrolami bez akéhokoľvek pôsobenia. Zvýšenie účinnosti CAT bolo závislé na koncentrácii BDNF, maximálna odpoveď bola pozorovaná pri koncentrácii približne 10 ng/ml, ako je znázornené na obr. 1.

Vplyv súčasného pridávania BDNF a CNTF na účinnosť cholinacetyltransferázy

Vzhľadom na to, že bolo preukázané, že ciliárny neurotrofný faktor podporuje prežívanie motorických neurónov potkana in vitro podľa Wong a ďalší, 1990, Soc. Neurosci. Abst., boli vyvíjané snahy dokázať, či zvýšenie účinnosti CAT oboma faktormi BDNF a CNTF je súčtom ich účinku. Pri súčasnom použití BDNF 50 ng/ml a CNTF 50 ng/ml, čo znamená nasýtenú koncentráciu týchto látok, došlo k zvýšeniu účinnosti CAT u motorických neurónov v kultúre, ktorá je vyššia než súčet účinkov jednotlivých faktorov, ako je znázornené na obr. 2, takže pravdepodobne majú oba faktory synergný účinok pri odlišnom mechanizme tohto účinku. Maximálny účinok, ktorý bolo možné dosiahnuť súčasným pridaním BDNF a CNTF bol približne 15-násobkom kontrolnej hodnoty. Bolo tiež preukázané, že NGF ani bFGF nemajú významnejší účinok na účinnosť CAT v porovnaní s hodnotami pre kontrolné kultúry, ako je zrejmé z obr. 2b.

Degenerácia a uhynutie motorických neurónov vo ventrálnej rohoch miechy je hlavným prejavom patofyziologických pochodov pri amyotrofickkej laterálnej skleróze, ALS, ochorení Lou Gehrig, pri poranení miechy a pri ďalších ochoreniach motorických neurónov. Tieto výsledky napovedajú, že by bolo

možné použiť BDNF samotný alebo v kombinácii s CNTF pri liečení týchto chorôb na vyvolanie cholinergného účinku.

Príklad 2

Pôsobenie NT-3 zvyšuje účinnosť cholínacetyltransferázy v kultúrach motorických neurónov miechy

1) Materiály a metódy

a) Pokusné zvieratá

Pre všetky pokusy boli použité zárodky E14 z potkanov kmeňa Sprague-Dawley (HSD alebo Zivic-Miller). Brezivé potkany boli usmrtené oxidom uhličitým, zárodky boli rýchlo vybraté a uložené do prostredia, ochladeného ľadom na ďalšie použitie.

b) Technika pre tkanivové kultúry

Miechy boli asepticky z potkaních zárodkov E14 oddelené a ďalej spracovávané rovnakým spôsobom, aký bol uvedený vyššie.

c) Frakcionácia buniek ventrálnej časti miechy hustotným gradientom metrizamidu

Frakcionácia bola vykonávaná rovnakým spôsobom ako je uvedené vyššie, s tým rozdielom, že ku kultúram bol pridaný faktor NT-3. Ako je zrejmé z obr. 3, po pridaní tohto faktora došlo k 3 až 4-násobnej maximálnej stimulácii účinnosti CAT u motorických neurónov v porovnaní s hodnotami pre kontroly. Zvýšenie účinnosti bolo závislé na koncentrácii, maximálne zvýšenie bolo dosiahnuté pri koncentrácii 1 ng/ml.

d) Neurotrofín-3, NT-3

NT-3 bol produkovaný v bunkách CHO a z prostredia s obsahom týchto buniek bol čistený až do homogenity spôsobom,

ktorý bude ďalej opísaný pre BDNF, homogenita bola preukázaná elektroforézou na polyakrylamidovom géli pri farbení striebrom a analýzou reťazca aminokyselín.

e) Stanovenie účinnosti cholínacetyltransferázy

Kultúry boli ukončené rozrušením buniek v roztoku s obsahom 20 mM tris-HCl s pH 8,6 s obsahom 0,1 % Triton X-100. Potom boli odobraté 2 mikrolitre materiálu s obsahom rozrušených buniek a účinnosť CAT bola stanovená mikroskúškou podľa publikácie Fonnum, 1975, J. Neurochem., 24: 407 až 408. Výsledný substrát obsahoval 0,2 mM (1-¹⁴C)acetyl-CoA (NEN, 54,4 mCi na mol), 300 mM NaCl, 8 mM cholínbromidu, 20 mM EDTA a 0,1 mM neostigminu v 50 mM dihydrogénfosforečnanu sodného s pH 7,4 ako pufru. Pri tejto koncentrácii enzýmu a substrátu prebieha enzymatická reakcia lineárne 90 až 120 minút. Špecifickosť indukcie pre CAT bola stanovená pridaním špecifického inhibítora účinnosti CAT, ktorým je N-hydroxyetyl-4-(1-naftylvinyl)pyridium, HNP, v priebehu pokusu podľa publikácie White a Cavallito, 1970, J. Neurochem., 17 : 1579 až 1589.

2) Výsledky

Ako už bolo vyššie diskutované, degenerácia a uhynutie motorických neurónov vo ventrálnoch rohoch miechy sú hlavným prejavom patofyziologických pochodov pri amyotrofickej laterálnej skleróze, ALS, ochorení Lou Gehrig, pri poraneniach miechy a pri ďalších ochoreniach motorických neurónov. Súčasné výsledky preukazujú zvýšenú účinnosť CAT u motorických neurónov po pôsobení NT-3 podporujú možnosť použitia tejto látky pri liečení uvedených chorôb tak, že dôjde k vyvolaniu zvýšeného cholinergného účinku.

Príklad 8

Spôsob čistenia rekombinantného rastového faktora, odvodeného od mozgového tkaniva z prostredia s obsahom vaječných

buniek čínskeho škrečka.

1) Materiál a metódy

Rekombinantný BDNF bol izolovaný z prostredia, obsahujúceho bunky CHO postupom v dvoch stupňoch, boli použité kationmeniče a chromatografia na géli.

Prostredie, získané z biologického reaktora Opticell (Charles River) a obsahujúceho bunky CHO, u ktorých dochádza k expresii BDNF, bolo zriedené destilovanou vodou v pomere 1,25 : 1 a kontinuálne privádzané pri teplote 4 °C na stĺpec s vnútorným priemerom 1,6 cm a objemom 15 ml, naplnenie S-Sepharozou (Pharmacia) pre rýchlu chromatografiu. V priebehu 5 dní bol do stĺpca privedený materiál s objemom 10,6 litrov. Stĺpec bol premytý 50 ml pufru s obsahom 20 mM MES (roztok kyseliny 4-morfolín-etánsulfónovej, pH upravené na 5,8 pridaním hydroxidu sodného), potom bol stĺpec premytý 50 ml toho istého pufru s obsahom 250 mM chloridu sodného, potom tým istým pufrom MES bez chloridu sodného a postup bol vykonávaný tak dlho, až bola pri 280 nm dosiahnutá základná línia, ktorá sa už nemenila. Potom bol stĺpec premytý 25 ml 20 mM bicínového pufru s pH 8,5 a potom 15 ml toho istého pufru s obsahom 100 mM chloridu sodného. Potom bol stĺpec postupne premývaný 150 ml gradientu chloridu sodného v rozmedzí 100 až 750 mM tejto látky v 20 mM bicínového pufru s pH 8,5 pri rýchlosti prietoku 2,5 ml/min. Materiál bol sledovaný pri 280 ml, citlivosť bola nastavená na 0,2 jednotky po celej stupnici. Frakcie s obsahom rekombinantného BDNF boli identifikované biologickou skúškou s použitím ganglií dorsálnych koreňov, DRG. Frakcie s najväčšou špecifickou účinnosťou zodpovedali koncentrácii chloridu sodného v rozmedzí 500 až 750 mM. Tieto frakcie sa spoja, 45 ml takto získaného materiálu sa zahustí na 2 ml ultrafiltráciou pri vysokom tlaku pri použití membrány typu Omega, oddelujúcej látky od molekulovej hmotnosti 3000. Membrána bola zvolená na základe svojej nízkej nešpecifickej väzby pre BDNF. Koncentrovaná vzorka bola potom nanosená na stĺpec s vnútorným priemerom 1,6 cm a náplňou 120 ml gélu Sephacryl

S-100HR (Pharmacia). Stĺpec bol naplnený a uvedený do rovnovážneho stavu s 20 mM pufru HEPES s pH 7,6 s obsahom 400 mM chloridu sodného. Stĺpec bol premývaný rýchlosťou 0,25 ml/min, boli odoberané frakcie s objemom 2 ml a tieto frakcie boli skúmané na účinnosť BDNF biologickou skúškou na explantáte DRG. Frakcie, získané v rozmedzí 80 až 90 ml obsahovali biologicky účinný rekombinantný BDNF. Tieto frakcie boli spojené a analyzované elektroforézou na redukujúcom SDS-polyakrylamidovom géli, stanovením N-zakončenia a kvantitatívnou analýzou aminokyselín. Elektroforézou na 18% polyakrylamidovom géli bolo možné preukázať prítomnosť dvoch pásov, uložených blízko seba navzájom a putujúcich súčasne s cytochrómom C. Analýza N-zakončenia a kvantitatívna analýza aminokyselín boli vykonané pri použití štandardných postupov.

Reťazec N-zakončenia preukazuje, že izolovaný materiál obsahoval približne 66 % BDNF s plnou dĺžkou reťazca a okrem toho skrátený BDNF, ktorému chýbalo prvých šesť zvyškov aminokyselín. Kvantitatívna analýza aminokyselín preukázala, že koncentrácia bielkoviny bola približne 0,043 mg/ml. Na základe tejto hodnoty bol konečný výťažok čistého biologicky účinného BDNF 0,439 mg. Biologická skúška na explantátoch DRG vyžaduje približne 1,2 ng/ml tejto látky na polovičné nasýtenie.

2) Výsledky

Kvantitatívna analýza reťazca aminokyselín BDNF

Kvantitatívna analýza aminokyselín na čistenie BDNF bola vykonaná na analyzátore aminokyselín Beckman 6300. Výsledky, uvedené v tabuľke I preukazujú, že približná stredná koncentrácia bielkoviny bola 0,043 mg/ml. Na obr. 4 je znázornená krivka závislosti odpovedí na koncentráciu BDNF pri použití štandardnej biologickej skúšky s explantátom ganglií dorsálnych koreňov.

T a b u ľ k a I

Analýza reťazca aminokyselín BDNF

Vzorka 1: Neurotrofný faktor, odvodený od mozgového tkaniva,
frakcia 23, BDNF 2, 100 mikrolitrov, 20 mM HEPES
a 400 mM NaCl

Vzorka bola zrážaná cez noc 75% acetónom pri -20 °C
v mraziacom zariadení. Zrazenina bola odstredená pri 13 000
ot/min 10 minút. Analýza reťazca bola vykonaná na bielkovi-
ne, rozpustenej v 70% kyseline trifluóroctovej.

cyklus	reťazec I	reťazec II	Ref.
1	His 17,5 pmol	Arg 18,6 pmol	His
2	Ser 14,1	Gly 8,5	Ser
3	Asp 26,2	Glu 8,8	ASp
4	Pro 25,0	Leu 10,8	Pro
5	Ala 36,0	Ser 12,3	Ala
6	Arg 54,6	Val 19,0	Arg
7	Arg 44,1	-	Arg
8	Gly 16,9	Asp 8,2	Gly
9	Glu 13,6		Glu
10	Leu 10,7		Leu
11	Ser 7,4		Ser
12	Val 15,7		Val
13	-		Cys
14	Asp 8,1		Asp
15	Ser 4,0		Ser
16	Ile 5,0		Ile

Stanovené množstvá:

Bielkovina I: $36,0 \times 2,5 = 90,1$ pmol (Ala-5)

Bielkovina II: $19,0 \times 2,5 = 47,7$ pmol (Val-6)

Pomer bielkoviny I a bielkoviny II = 2,1

Príklad 4

Retrográdny transport ^{125}I -BDNF a ^{125}I -NT-3 do ventrálnej časti miechy u potkana

1) Materiály a metódy

a) Neurotrofíny

Rekombinantný BDNF a NT-3 boli pripravené z prostredia s obsahom príslušných buniek tak, ako bolo opísané vyššie. Oba faktory boli označené rádioaktívnym jódom podľa publikácie Yip a ďalší, 1983, J. Neurosci., 3 : 2172 až 2182 pri použití laktoperoxidázovej metódy, špecifická aktivita bola 3000 až 7800 impulzov za minútu/fmol. Voľný ^{125}I bol odstránený pred sledovaním transportu.

b) Pokusné zvieratá

Na sledovanie retrográdneho transportu boli použité potkaní samci kmeňa Sprague-Dawley s hmotnosťou 250 až 300 g, získaní od Zivic-Miller.

c) Sledovanie retrográdneho transportu

Potkany boli anesteziované zmesou 4% chloralhydrátu a 0,88% pentobarbitálu sodného v objeme 3 ml/kg telesnej hmotnosti. Pravý ischiadický nerv bol vyoperovaný a stlačený na 10 s v mieste 0,4 cm distálne od šlachy m.pbturator internus. Toto poškodenie bolo vykonané preto, aby čo najväčší počet receptorových miest bol prístupný pre BDNF. Potom bolo do miesta poškodenia vstreknuté množstvo 2 mikrolitre ^{125}I -BDNF alebo NT-3 v 10 mg/ml BSA v PBS alebo neznáčený BDNF, NT-3 alebo NGF v 100-násobnom prebytku v pufri PBS/BSA. Celkom bolo použitých 16 ng BDNF a 14 ng NT-3, to znamená 4×10^6 a $2,2 \times 10^6$ impulzov za minútu. Rany boli zašité a potkany boli udržiavané v rekonvalescencii celkom 18 hodín. Potom boli potkany usmrtené a boli vybraté miecho-

vé segmenty v bedrovej oblasti 4 a 5, segmenty boli rozdelené na pravú stranu, zodpovedajúcu miestu poškodenia a ľavú stranu na opačnej strane vzhľadom na miesto poškodenia. Vzorky boli uložené do 4% paraformaldehydu s fosfátovým pufrom s pH 7,4 a výsledok bol odčítaný pri použití počítača gamma-žiarenia. Údaje boli vyjadrené ako attomoly (10^{-18} molu) ^{125}I -neurotrofínu, transportovaného do pravej alebo ľavej časti miechy $\pm$ stredná chyba.

2) Výsledky

Z tabuľky II je zrejmé, že BDNF sa hromadí v mieche potkanov, ktoré boli ošetrované podaním ^{125}I -BDNF do poraneného nervu. Bolo pozorovaných 300 až 400 impulzov za minútu, čo zodpovedá približne 50 attomolom na ošetrenej strane, na opačnej strane zodpovedal počet impulzov takmer pozadiu. Nízky počet impulzov na opačnej strane môže vznikať prenikaním materiálu z miesta injekcie systemickým obehom. Toto pozadie bolo obvyčajne 50 až 25 % hodnoty pre ošetrovanú stranu a táto hodnota zostávala pomerne stála v priebehu pokusu. Pri podávaní 100-násobného prebytku BDNF došlo k podstatnému zablokovaniu transportu, ale NGT a NT-3 vo viac než stonásobnej dávke blokovali transport len čiastočne. Autorádiografická analýza emulzie miestneho tkaniva preukázala značenie veľkých neurónov ventrálneho rohu (v dorsolaterálnom kvadrante ventrálneho rohu) zjavne išlo o motorické neuróny na základe morfológického hľadiska. V dorsálnej časti miechy bolo možné pozorovať len hodnoty, zodpovedajúce pozadiu.

Retrográdny transport ^{125}I -BDNF do miechy potkana

Vo všetkých pokusoch bol BDNF vstreknutý do miesta poškodenia pravého ischiatického nervu.

^x p je manjše než 0,05 pri porovnanju s ¹²⁵I-BDNF + PBS.

T a b u l' k a I I I

Výsledky sú vyjadrené ako priemer $\pm$ stredná chyba pre 3 až 4 zvieratá.

^x p je menšie než 0,05 pri porovnaní so ¹²⁵I-NT-3 + PBS.

Príklad 5

Neurotrofný faktor, odvodený od mozgového tkaniva a neurotrofín-3 podporujú prežívanie poškodených motorických neurónov u novorodených potkanov

Nasledujúce údaje boli získané v rukopise od skupiny autorov M. Sendtner, B. Holtmann, R. Kolbeck, H. Thoenen a Y. A. Barde z Department of Neurochemistry and Neurobiochemistry, Max-Planck-Institute for Psychiatry.

1) Materiály a metódy

a) Chirurgické a histologické postupy

Poškodenie pravého lícneho nervu u potkaních novorodencov bolo vykonané spôsobom podľa publikácie Sendtner a ďalší 1990, Nature, 345 : 440 až 441. Postup spočíva v tom, že sa novorodené potkany kmeňa Vistar anestezuje znížením telesnej teploty, potom sa vykoná rez v dĺžke približne 3 mm tesne za pravým uchom. Lícny nerv sa vypreparuje v mieste foramen stylomastoideum a oba korene sa prerušia približne 1 mm distálne od tohoto miesta. Gélová pena (Spongostan, Paesel, Frankfurt, SRN) sa rozreže na malé častice s rozmerom približne 1 x 2 x 3 mm a nechá sa vsiaknuť 30 mikrolitrov PBS s obsahom buď 5 mikrogramov BSA (Cohn Fraction V, Sigma, Deisenhofen, SRN) alebo to isté množstvo trofického faktora. Potom sa častice penového gélu uložia do miesta poškodenia a zasunie po vázy, ktoré v tejto polohe prekrývajú nerv. Koža sa zašije hodváhom (Ethikon 3-0) a zvierať sa vráti k matke. Siedmy deň po vrhu sa zvierať usmrtia predávkovaním a premyjú cez srdcový obeh 50 ml 4% formaldehydu. Mozgový kmeň sa vyberie, jednu hodinu sa fixuje, premyje sa vodou a potom sa zbaví vody zvyšujúcou koncentráciou etanolu v rozmedzí 70 až 100 %. Po uložení do parafínu sa pripraví sériové rezy s hrúbkou 7 mikrometrov z celého mozgového kmeňa mikrotomom (Reichert-Jung 3050 supercut). Rezy sa zbavia kresylovou fialovou (Sigma, Deisenhofen, SRN) a jadrá moto-

rických neurónov líčneho nervu na kontrolnej strane sa počítajú pri použití svetelného mikroskopu vo zväčšení 125 x v každom piatom reze podľa vyššie uvedenej publikácie Sandthera a ďalších. Získaný počet jadier nebol opravovaný v závislosti na počte rozrezaných jadier.

b) Produkcia a stanovenie vlastností NGF, BDNF a NT-3

Faktor rastu nervov, NGF (2,5 S) sa izoluje z podčelustných žliaz dospelých myších samcov. Rekombinantný BDNF a NT-3 sa získa z buniek králičích obličiek po ich transfekcii rekombinantným vírusom ovčích kiahní a izoluje sa čistením príslušného supernatantu.

2) Výsledky

Axóny motorických neurónov líčneho nervu boli prerušené alebo inak poškodené, 80 % poškodených buniek v priebehu niekoľkých dní degenerovalo. V prípade, že bol do miesta poškodenia aplikovaný CNTF, bolo možné pozorovať zvýšené prežívanie týchto buniek na približne 100 %. Za týchto podmienok nedošlo pri podávaní 5 mikrogramov na podstatné zvýšenie prežívania motorických neurónov.

Na rozdiel od prípadu, u ktorých bol podávaný NGF bolo možné pozorovať významné zvýšenie prežívania v prípade, že do miesta prerušeného líčneho nervu sa aplikuje BDNF. V priemere bolo po jednom týždni po poškodení možné preukázať približne 50 % živých poškodených motorických neurónov, ako je zrejmé z tabuľky IV. Prežívalo 765 až 4580 neurónov na poškodenej strane. U zvieraťa, u ktorého bolo možné preukázať len 765 prežívajúcich neurónov, došlo k vysunutiu penového gélu s obsahom podporného faktora z miesta poškodenia, čo bolo zrejmé príčinou nízkeho prežívania nervových buniek po podávaní BDNF v priebehu tohto jediného pokusu, v ktorom bol preukázaný taký nízky počet prežívaných nervových buniek.

Rovnako ako v prípade BDNF bolo možné pozorovať zvýšené prežívanie buniek motorických nervov tiež po podávaní NT-3, ako je tiež zrejme z tabuľky IV. V tomto prípade však boli účinky nižšie než v prípade podania BDNF, bolo možné zachrániť v priemere 27 % poškodených motorických neurónov na poškodenej strane. V porovnaní s 18 % motorických neurónov, prežívajúcimi po podaní BSA je však aj tento vplyv na zvýšené prežívanie buniek v prípade NT-3 štatisticky významný pre prípad, že p je nižšie než 0,05.

Pokiaľ ide o morfológické zmeny buniek, boli motorické neuróny na poškodenej strane u zvierat, liečených BDNF aj NT-3 menšie a bolo na nich možné pozorovať typické reaktívne zmeny, ako je zrejme z obr. 5. Jadrá boli vysunuté zo strednej polohy a bolo možné pozorovať chromatolýzu po podaní BDNF aj NT-3. Avšak pri porovnaní s kontrolnými bunkami u zvierat, ktorým bola podaná len gélová pena s obsahom BSA sa jadrá buniek zdali väčšie, ako je zrejme z obr. 5.

3) Diskusia

Je teda možné preukázať, že BDNF podporuje prežívanie významného množstva motorických neurónov po prerušení lícného nervu u novorodených potkanov. Aj faktor NT-3 má určitý účinok, aj keď v nižšom stupni. Oproti tomu nemá NGF v tomto prípade žiadny vplyv na prežívanie buniek. Je zrejme, že faktory zo skupiny neurotrofínov môžu ovplyvniť prežívanie motorických neurónov in vivo podobne ako CNTF.

T a b u ľ k a IV

Prežívanie motorických neurónov po poškodení lícneho nervu
u novorodených potkanov - účinok neurotrofínov

spôsob ošetrenia počet prežívajúcich neurónov $\pm$ SEM
poškodená strana opačná strana

penový gél + BSA n = 8	844 $\pm$ 115	4597 $\pm$ 222
penový gél + NGF n = 3	500 $\pm$ 322	4160 $\pm$ 409
penový gél + BDNF n = 9	2222 $\pm$ 446	4534 $\pm$ 129
penový gél + NT-3 n = 6	1155 $\pm$ 109	4273 $\pm$ 415

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Farmaceutický prostriedok na liečenie porúch a ochorení motorických neurónov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ako svoju účinnú zložku obsahuje zlúčeninu zo skupiny BDNF/NT-3/NGF, schopnú podporovať prežívanie, rast alebo diferenciáciu motorických neurónov a CNTF spolu s farmakologicky prijateľným nosičom.

2. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa ako zlúčenina zo skupiny BDNF/NT-3/NGF použije BDNF.

3. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa ako zlúčenina zo skupiny BDNF/NT-3/NGF použije NT-3.

4. Spôsob podpory prežívania, rastu a/alebo diferenciácie motorických neurónov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa na motorické neuróny pôsobí účinnou koncentraciou neurotrofného faktora zo skupiny zlúčenín BDNF/NT-3/NGF, schopného podporovať prežívanie, rast alebo diferenciáciu motorických neurónov.

5. Spôsob podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa vykonáva in vitro.

6. Spôsob podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa vykonáva in vivo.

7. Spôsob podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa ako zlúčenina zo skupiny BDNF/NT-3/NGF použije BDNF.

8. Spôsob podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa ako zlúčenina zo skupiny BDNF/NT-3/NGF použije NT-3.

9. Spôsob diagnostiky porúch motorických neurónov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa u chorého porovnáva koncentrácia neurotrofného faktora zo skupiny zlúčenín BDNF/NT-3/NGF vo vzorke s koncentráciou v analogickej vzorke, ktorá bola odobratá zdravému človeku, čím sa dokáže odchyľka v koncentrácii neurotrofného faktora u chorého, ktorá je v pozitívnej korelácii s prítomnosťou poruchy motorických neurónov.

10. Spôsob podľa nároku 9, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa ako zlúčenina zo skupiny látok, obsahujúcich BDNF/NT-3/NGF použije BDNF.

11. Spôsob podľa nároku 9; v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa ako zlúčenina zo skupiny látok BDNF/NT-3/NGF použije NT-3.

12. Spôsob podľa nároku 9, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa postup využije na diagnostiku amyotrofickej laterálnej sklerózy.

13. Spôsob stanovenia zlúčeniny, schopnej podporovať prežívanie, rast alebo diferenciáciu motorických neurónov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa

- a) motorické neuróny vystavia pôsobeniu zistiteľne značeného BDNF za podmienok, pri ktorých sa táto látka môže viazať na motorické neuróny a
- b) súčasne sa motorické neuróny vystavia pôsobeniu skúmanej látky, u ktorej inhibícia väzby značeného BDNF preukazuje využiteľnosť tejto látky na liečenie porúch motorických neurónov.

14. Spôsob preukázania zlúčeniny, vhodných na podporu prežívania, rastu alebo diferenciácie motorických neurónov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa

- a) motorické neuróny vystavia pôsobeniu zistiteľne značeného NT-3 za podmienok, pri ktorých sa táto látka môže viazať na motorické neuróny a
- b) súčasne sa motorické neuróny vystavia pôsobeniu skúmanej látky, pričom inhibícia väzby značeného NT-3 touto látkou je dôkazom využiteľnosti tejto látky na liečenie porúch motorických neurónov.

15. Spôsob prípravy v podstate čistého rekombinantného BDNF, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa

- i) dosiahne expresia rekombinantného BDNF v eukaryotickej bunke,
- ii) odoberie sa živné prostredie s obsahom eukaryotických buniek, získaných v stupni i),
- iii) živné prostredie sa zriedi destilovanou vodou,
- iv) prostredie po zriedení sa naniesie na stĺpec, obsahujúci S-Sepharozu a stĺpec sa vymýva pri použití gradientu chloridu sodného 100 až 750 mM,
- v) príslušné frakcie eluátu sa oddelia,
- vi) frakcie, u ktorých je možné preukázať účinnosť typu BDNF sa spoja a
- vii) frakcie zo stupňa vi) sa koncentrujú,
- viii) koncentrované frakcie zo stupňa vi)) sa naniesú na stĺpec, obsahujúci gél na filtráciu Sephacryl S-100HR a
- ix) stĺpec zo stupňa viii) sa vymýva roztokom, obsahujúcim približne 400 mM chloridu sodného pri pH 7,6.

16. Spôsob prípravy v podstate čistého rekombinantného NT-3, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa

- i) dosiahne expresia rekombinantného NT-3 v eukaryotických bunkách,
- ii) odoberie sa živné prostredie s obsahom eukaryotických buniek, získaných v stupni i),
- iii) živné prostredie sa zriedi destilovanou vodou,
- iv) prostredie po zriedení sa naniesie na stĺpec, obsahujúci S-Sepharozu a stĺpec sa vymýva pri použití gradientu

- tu chloridu sodného 100 až 750 mM,
- v) príslušné frakcie eluátu sa oddelia,
 - vi) frakcie, u ktorých je možné preukázať účinnosť typu NT-3 sa spoja a
 - vii) frakcie zo stupňa vi) sa koncentrujú,
 - viii) koncentrované frakcie zo stupňa vi)) sa nanesú na stĺpec, obsahujúci gél na filtráciu Sephacryl S-100HR a
 - ix) stĺpec zo stupňa viii) sa vymýva roztokom, obsahujúcim približne 400 mM chloridu sodného pri pH 7,6.

17. Spôsob diagnostiky poruchy motorických neurónov, spojených s BDNF, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa vstrekuje zistiteľne značený BDNF tak, že sa dostáva do motorického nervu a potom sa stanoví, či dochádza k jeho retrográdnemu transportu, pričom nedostatok retrográdneho transportu je v korelácii s dysfunkciou motorických neurónov.

18. Spôsob podľa nároku 17, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa diagnostikuje porucha zo skupiny amyotrofická laterálna skleróza, progresívna spinálna svalová atrofia, infantilná svalová atrofia, detská obrna, stav po detskej obrne, ochorenie Charcot-Marie-Tooth, úraz alebo poranenie nervu.

19. Spôsob diagnostiky poruchy motorických neurónov, spojených s NT-3, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa vstrekuje zistiteľne značený NT-3 tak, že sa dostáva do motorického nervu a potom sa stanoví, či dochádza k jeho retrográdnemu transportu, pričom nedostatok retrográdneho transportu je v korelácii s dysfunkciou motorických neurónov.

20. Spôsob podľa nároku 19, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa diagnostikuje porucha zo skupiny amyotrofická laterálna skleróza, progresívna spinálna svalová atrofia, infantilná svalová atrofia, detská obrna, stav po detskej obrne, ochorenie Charcot-Marie-Tooth, úraz alebo poranenie

nervu.

21. Spôsob liečenia porúch motorických neurónov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa podá účinné množstvo neurotrofného faktora, ktorý i) patrí do skupiny molekúl faktorov BDNF/NT-3/NGF a ii) podporuje prežívanie, rast alebo diferenciáciu motorických neurónov.

22. Spôsob podľa nároku 21, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa ako člen uvedenej skupiny zlúčenín na liečenie použije BDNF.

23. Spôsob podľa nároku 21, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa ako člen uvedenej skupiny zlúčenín použije na liečenie NT-3.

24. Spôsob podľa nároku 21, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa spôsob využije na liečenie amyotrofickéj laterálnej sklerózy.

25. Spôsob podľa nároku 21, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa spôsob využije pri liečení porúch motorických nervov, ktoré boli spôsobené poranením.

26. Spôsob podľa nároku 21, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa spôsob využije pri liečení porúch motorických neurónov, ktoré boli vyvolané progresívnou atrofiou svalov, zásobených miechovými nervami.

27. Spôsob podľa nároku 21, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa spôsob využije pri liečení infantilnej alebo juvenilnej svalovej atrofie.

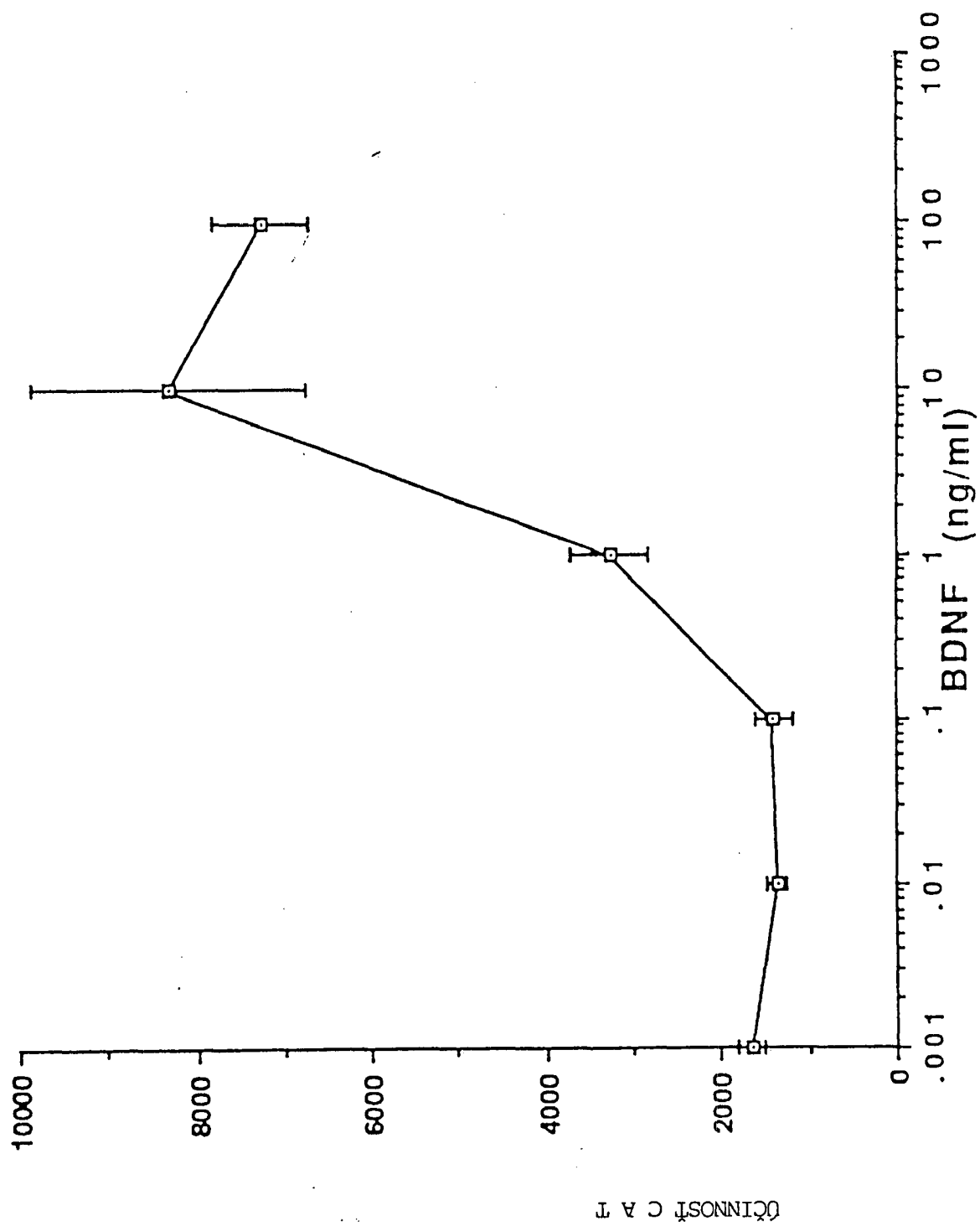
28. Spôsob podľa nároku 21, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa spôsob využije pri liečení detskej obrny alebo stavov po detskej obrne.

29. Spôsob podľa nároku 21, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa spôsob využije pri liečení poruchy motorických neurónov, vyvolanej chorobou Charcot-Marie-Tooth.

30. Spôsob podľa nároku 21, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa zlúčenina zo skupiny BDNF/NT-3/NGF podáva súčasne s účinným množstvom aspoň jednej ďalšej látky, schopnej podporovať prežívanie, rast alebo diferenciáciu motorických neurónov.

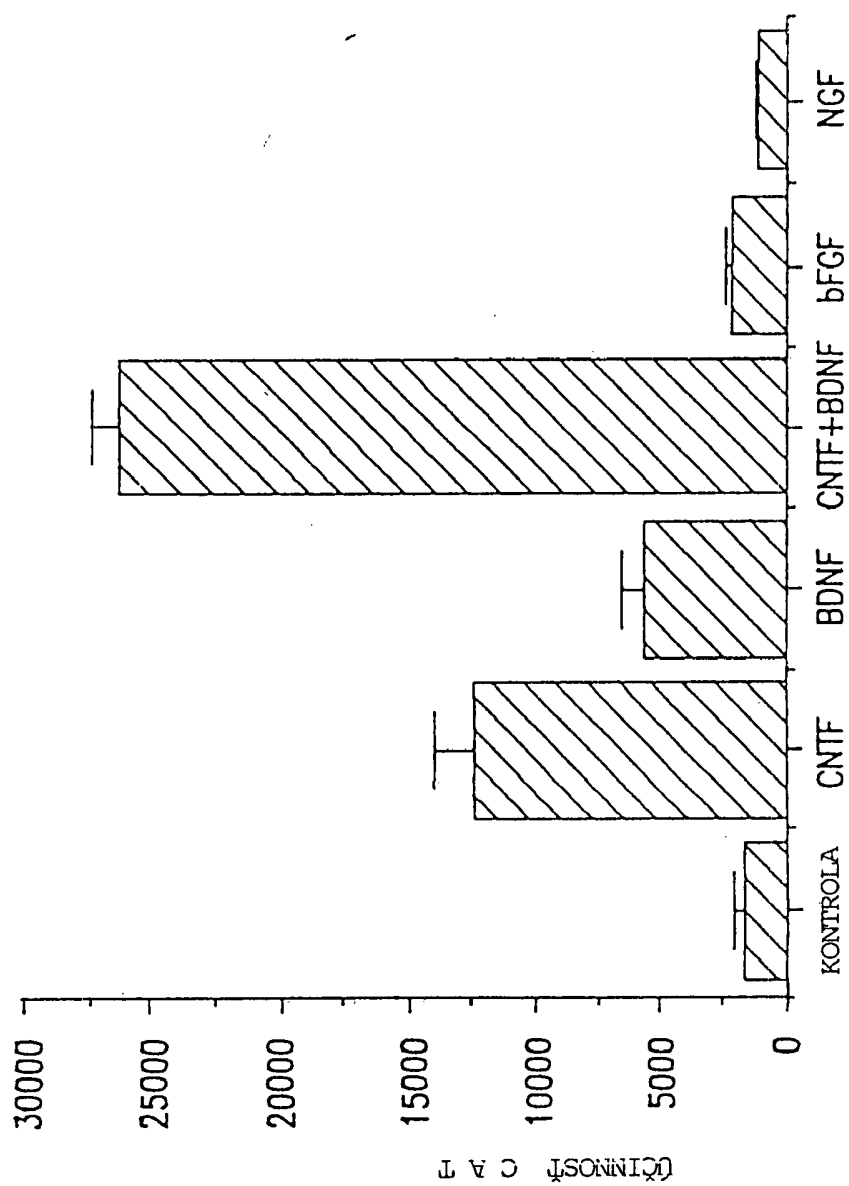
31. Spôsob podľa nároku 30, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa ako druhá látka použije ciliárny neurotrofný faktor.

1/7



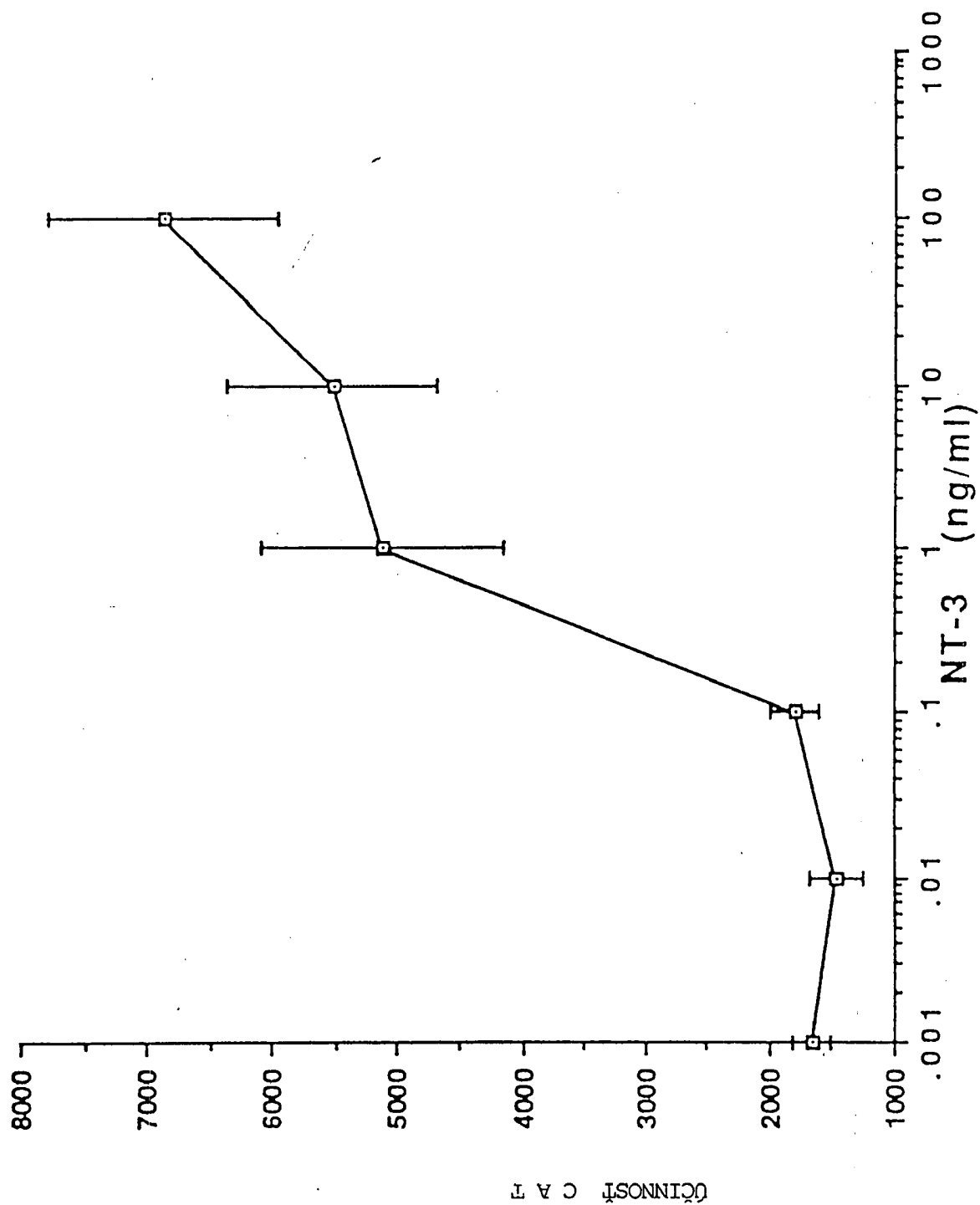
Obr. 1

2/7



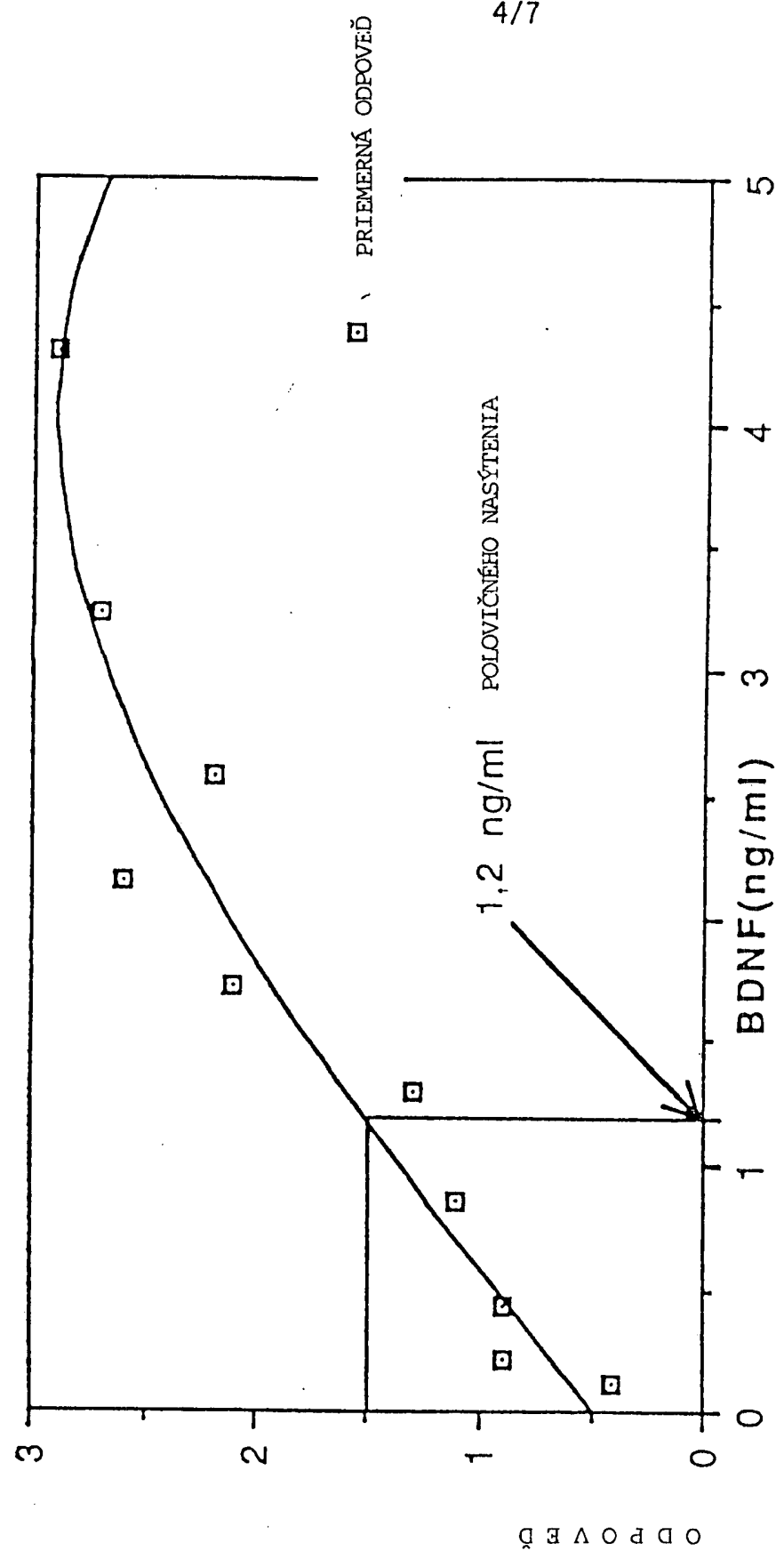
Obr. 2

3/7



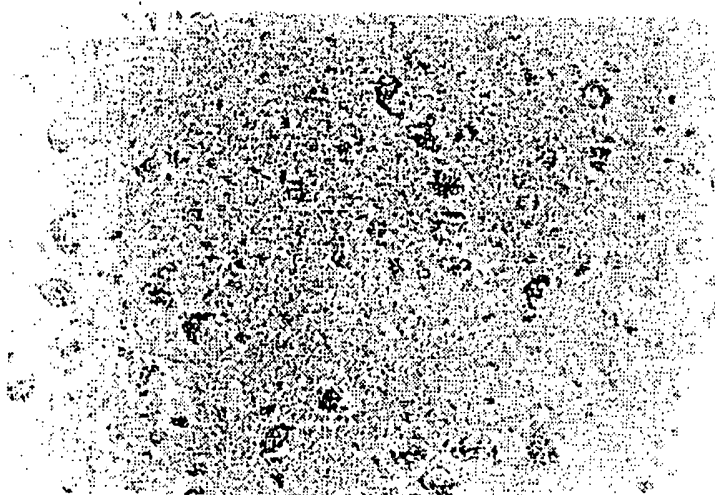
Obr. 3

4/7

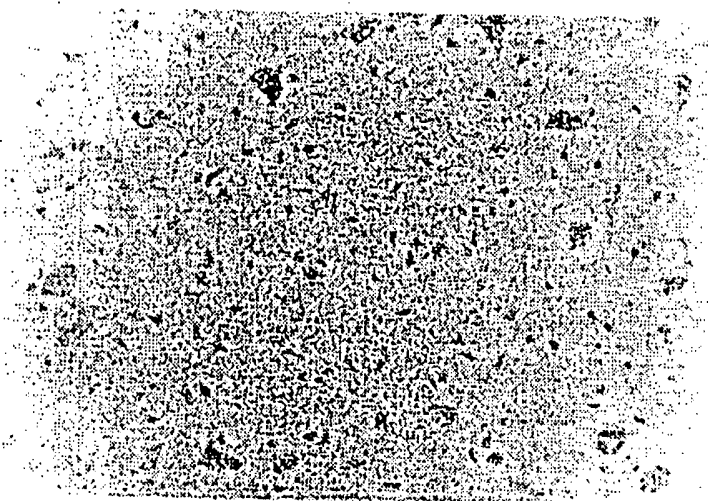


Obr. 4

5/7

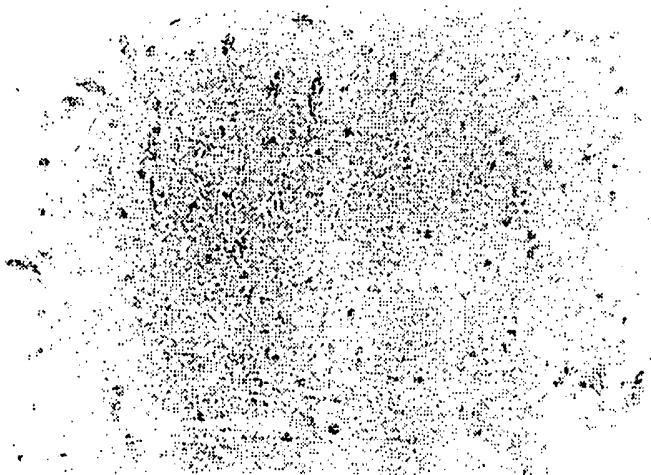


Obr. 5a

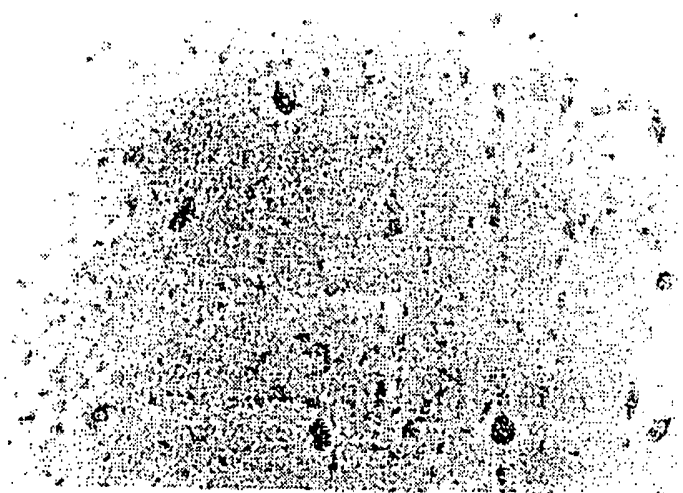


Obr. 5b

6/7



Obr. 5c

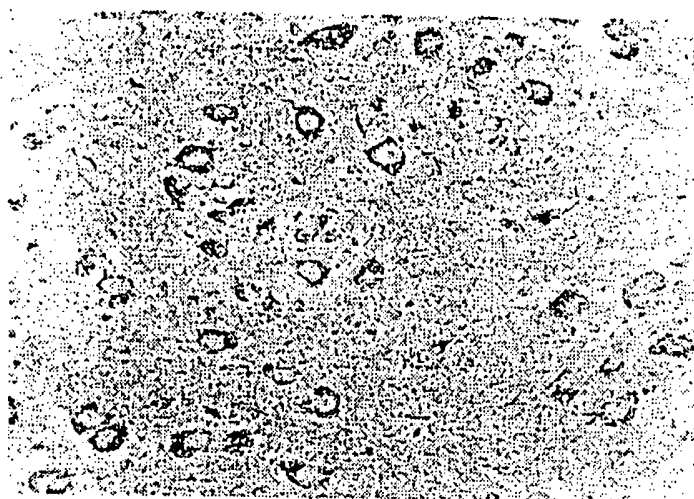


Obr. 5d

7/7



Obr. 5e



Obr. 5f