FI000120455B

(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 120455 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **30.10.2009**

(51) Kv.lk. - Int.kl.

C12N 5/06 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **961855**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag **30.04.1996**

(24) Alkupäivä - Löpdag **08.11.1994**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **04.06.1996**

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan **PCT/CA1994/000614**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

09.11.1993 US 149508 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 • Neurospheres Holdings Ltd, 83 Heritage Medical Research Centre, 3330 Hospital Drive N.W., Calgary, Alberta, T2N 4N1, KANADA, (CA)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 • Weiss, Samuel, 4540 Chapel Road N.W., Calgary, Alberta T2L 1A6, KANADA, (CA)
2 • Reynolds, Brent, 1117 Casson Green N.W., CALGARY, ALBERTA T3B 2V6, KANADA, (CA)
3 • Van Der Kooy, Derek, University of Toronto, Department Anatomy, Toronto, Ontario M5S 1A8, KANADA, (CA)
4 • Morshead, Cindi, 274 South Kingsway, TORONTO, ONTARIO M6S 3T9, KANADA, (CA)
5 • Craig, Constance, University of Toronto, Department Anatomy, Toronto, Ontario M5S 1A8, KANADA, (CA)

(74) Asiamies - Ombud

Heinänen Oy Patenttitoimisto, Airport Plaza, Äyritie 8 D, 01510 Vantaa

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä neuraalisten prekursorisolujen lisäämiseksi

Förfarande för att ha neurala prekursorceller att föröka sig

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

WO 90/06757 A1, WO 94/16718 A1,
Reynolds, B.A., et al. Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System, Science, March 1992, vol. 255, pp 1707-1710, McMorris, F.A. et al. Regulation of Oligodendrocyte Development and Central Nervous System Myelination by Insulin-like Growth Factors, Annals of the New York Academy of Sciences, August 1993, vol. 692, pp 321-334, Vescovi, A.L. et al. bFGF Regulates the Proliferative Fate of Unipotent (Neuronal) and Bipotent (Neuronal/Astroglial) EGF-Generated CNS Progenitor Cells. Neuron, November 1993, vol. 11, pp 951-966, Price, J. et al. Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, January 1987, vol. 84, pp 156-160, Davidson, B.L. et al. A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector, Nature Genetics, March 1993, vol. 3, pp 219-223

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Endogeenisiä prekursorisoluja manipuloidaan/muunnetaan in situ käyttämällä yhtä tai useampaa kasvutekijää tai vastaavia yhdisteitä solujen indusoimiseksi lisääntymään, erilaistumaan ja vaeltamaan keskushermostossa siten, että ne korvaavat menetetyt tai ei-toiminnalliset solut. Prekursorisoluja muutetaan myös in situ (in vivo) siten, että ne erittävät yhdistettä, joka muuttaa muiden erilaistuneiden keskushermoston solujen toimintaa. Endogeeniset prekursorisolut voidaan myös käsitellä yhdellä tai useammalla kasvutekijällä in situ sellaisten kantasolujen saannon lisäämiseksi, jotka voidaan eristää aikuisen keskushermostosta ja lisätä in vitro.

Endogeniska prekursorceller manipuleras/förändras in situ genom att använda en eller flera växtfaktorer eller motsvarande föreningar för att inducera cellernas tillväxt, differentiering och migration i det centrala nervsystemet så, att de ersätter förlorade eller icke-funktionella celler. Prekursorcellerna förändras också in situ (in vivo) så, att de avsöndrar en förening som ändrar verksamheten av andra differentierade celler i det centrala nervsystemet. Endogeniska prekursoceller kan också behandlas med en eller flera växtfaktorer in situ för att öka erhållande av basceller som kan isoleras från det centrala nervsystemet hos en fullvuxen person och lägga till in vitro.

MENETELMÄ NEURAALISTEN PREKURSORISOLUJEN LISÄÄMISEKSI

Keksinnön ala

Tämä keksintö on kohdistettu patenttivaatimuksen johdanto-osan mukaiseen menetelmään neuraalisten prekursorisolujen lisäämiseksi.

Keksinnön tausta

Nisäkkään hermojärjestelmän kehittyminen alkaa sikiön kehityksen varhaisessa vaiheessa ja jatkuu varhaiseen postnataaliseen kauteen. Nisäkkään keskushermosto (CNS) koostuu kolmesta solutyypistä; hermosoluista, astrosyyteistä ja oligodendrosyyteistä. Hermosolut muodostuvat ensisijaisesti sikiökaudella, kun taas oligodendrosyytit ja astrosyytit muodostuvat varhaisella postnataalisella kaudella. Myöhäiseen postnataaliseen kauteen mennessä keskushermostolla on sen hermosolujen täysi määrä.

Toisin kuin monilla muilla eri kudoksissa tavattavilla soluilla, aikuisen nisäkkään keskushermoston erilaistuneilla soluilla on vähäinen kyky tai ei kykyä lainkaan siirtyä mitoottiseen sykliin ja tuottaa uusia hermosoluja. Vaikka uskotaan, että astrosyyteillä on rajoittunut ja hidas vaihtuvuus (turnover) [Korr et al., J. Comp. Neurol., 150 : 169 (1979)] ja että oligodendrosyyttien esisoluja [Wolsqijk ja Noble, Development 105 : 386 (1989)] on läsnä, uusien hermosolujen kehittymistä ei esiinny. Vaikka muutamat nisäkäslajit (esim. rotat) osoittavat rajoitettua kykyä tuottaa uusia hermosoluja aikuisen rajoitetuilla aivojen alueilla, kuten pykäläpoimussa ja hajuradan etuosan pullistumassa [Kaplan, J. Comp. Neurol., 195 : 323 (1981); Bayer, N. Y. Acad Sci., 457 : 163 (1985)], tämä ei päde kaikkiin nisäkkäisiin eikä uusien keskushermoston solujen kehittymistä esiinny aikuisilla kädellisillä [Rakic, Science 227 : 1054 (1985)]. Tämä kyvyttömyys tuottaa uusia hermosoluja useimmilla nisäkkäillä (ja erityisesti kädellisillä) voi olla edullista pitkäaikaisen muistin säilymisen kannalta; kuitenkin se on selvä haittapuoli,

kun syntyy tarve korvata hävinneitä hermosoluja vammasta tai taudista johtuen.

Keskushermoston sairauksiin sisältyy lukuisia sairauksia, kuten hermoston rappeumataudit (esim. Alzheimerin tauti ja Parkinsonin tauti), äkillinen aivovamma (esim. aivohalvaus, päävamma, aivovaurio) ja suuri määrä keskushermoston häiriötiloja (esim. masennus, epilepsia ja skitsofrenia). Viime vuosina hermoston rappeumatauti on tullut merkittäväksi huolenaiheeksi johtuen näihin tauteihin suurimmassa sairastumisvaarassa olevan vanhemman väestönosan lisääntymisestä. Nämä taudit, joihin sisältyvät Alzheimerin tauti, multippeliskleroosi, Huntingtonin tauti, amyotrofinen lateraaliskleroosi ja Parkinsonin tauti, on yhdistetty hermosolujen rappeutumiseen määrätyissä keskushermoston kohdissa johtaen näiden solujen tai aivoalueiden kyvyttömyyteen toteuttaa omat tehtävänsä. Hermoston rappeumatautien lisäksi äkilliset aivovammat johtavat usein hermosolujen häviöön, vamman kohteena olleen aivojen alueen epäasianmukaiseen toimintaan ja sen seurauksen epänormaaliin käyttäytymiseen. Luultavasti keskushermoston häiriötoiminnan suurimmalle alueelle (suhteessa sairastuneiden ihmisten lukumäärään) ei ole tunnusomaista hermosolujen häviö, vaan pikemminkin olemassa olevien hermosolujen epänormaali toiminta. Tämä voi johtua hermosolujen epäasianmukaisesta aktivoitumisesta (firing) tai hermoston välittäjäaineiden epänormaalista synteesistä, vapautumisesta ja käsittelystä. Jotkut näistä häiriötiloista ovat hyvin tutkittuja ja karakterisoituja sairauksia, kuten masennus ja epilepsia, jotkut ovat vähemmän ymmärrettyjä sairauksia, kuten neuroosi ja psykoosi.

Tämän päivään mennessä keskushermoston sairauksien hoito on tapahtunut ensisijaisesti antamalla potilaalle farmaseuttisia yhdisteitä. Valitettavasti tämän tyyppiseen hoitoon on liittynyt monia komplikaatioita, mukaan luettuna rajoitettu kyky kuljettaa lääkkeitä veri-aivoesteen läpi ja lääketoleranssi, joka kehittyy potilaille, joille näitä

lääkkeitä annetaan pitkäaikaisesti. Esimerkiksi Parkinsonin tautia sairastavilla potilailla on saavutettu dopamiiniergisen aktiivisuuden osittainen palautuminen levodopalla, joka on dopamiinin prekursori, joka kykenee kulkemaan veri-aivoesteen läpi. Kuitenkin potilaat tulevat vastustuskykyisiksi levodopan vaikutuksille ja sen vuoksi tarvitaan jatkuvasti lisääntyviä levodopa-annoksia sen vaikutusten ylläpitämiseksi. Lisäksi levodopaan liittyy joukko sivuvaikutuksia, kuten lisääntynyt ja kontrolloimaton liike.

Viime aikoina on sovellettu neurologista kudossiirtoa hermoston rappeumatautien, kuten Parkinsonin taudin, hoitamiseksi.

Kehittyvä teknologia neurologisten sairauksien hoitamiseksi vaatii solujen siirtoa keskushermostoon isännän hermosolujen häviön tai epänormaalin toiminnan korvaamiseksi tai kompensoimiseksi. Vaikka alkion keskushermostosolut ovat antaneet parhaat tulokset ihmiskokeissa [Winder et al., New Eng. J. Med., 327 : 1556 (1992)] ja ne ovat edullinen luovuttajakudos, on kehitetty muita luovuttajakudoksen tyyppejä johtuen eettisistä ja poliittisista näkökohdista, jotka rajoittavat alkion solujen käyttöä. Tällaisiin luovuttajakudostyyppeihin sisältyvät: geneettisesti muunnetut hermosolulinjat [Renfranz et al., Cell 66 : 173 (1991); Synder et al., Cell 68 : 1 (1992)], fibroblastit [Kawaja et al., J. Neurosci., 12 : 2849 (1992)], lihassolut [Jiao et al., Nature 363 : 456 (1993)], hermotukikudoksen esisolut [Groves et al., Nature 362 : 453 (1993)] ja kapseloidut solut [Hoffman et al., Exp. Neurol., 132 : 100 (1993)].

Vaikka transplantaatioratkaisut edustavat merkitsevää parannusta tällä hetkellä käytettävissä oleviin neurologisten sairauksien hoitoihin, ne kärsivät muutamista merkittävistä haittapuolista. Esimerkiksi transplantaation jälkeen jotkut solutyypit eivät yhdisty isäntäkudoksen kanssa. Toinen haittapuoli on, että immunologinen yhteensopimattomuus luovuttajan ja isännän välillä voi johtaa implantoitujen solu-

jen hyljintään. On myös mahdollisuus, että siirretyt solut voivat johtaa kasvaimen muodostumiseen tai ne kuljettavat infektion tartuttavia aineita luovuttajakudoksesta isäntään. Muu merkittävä transplantaatiomenetelmien haittapuoli on, että johtuen menetelmien tunkeutuvuudesta elimistöön terveelle aivokudokselle voisi tapahtua vahinkoa, mainittujen menetelmien käsittäessä mihin tahansa suureen neurokirurgiseen leikkaukseen liittyvät riskit.

Leblond [NCI Monograph, 14 : 19 (1963)] on luokitellut aikuisen nisäkkään kudoksen kolmeen luokkaan perustuen solun vaihtuvuusnopeuteen populaatiossa. Nämä ovat:

1. Muuttumattomat populaatiot, kuten hermojärjestelmä, joissa tapahtuu vähän tai ei lainkaan jakautumista ja kehittymisen aikana muodostuneet solut säilyvät eläimen eliniän.

2. Kudokset, joilla on ehdollisesti uudistuva solujen populaatio, kuten maksa, jossa tapahtuu vähän solunjakautumista normaaleissa olosuhteissa, mutta jossa uusia soluja voi kehittyä vasteena sopivalle ärsykkeelle.

3. Jatkuvasti uudistuvat populaatiot, kuten veri ja levyepiteeli, joissa erilaistuneilla soluilla on lyhyt elinaika ja kantasoluiksi kutsuttujen solujen alapopulaatio korvaa niitä jatkuvasti.

Kantasolun ratkaiseva identifiointiominaisuus on sen kyky osoittaa itseuudistumista tai tuottaa soluja itsestään. Kantasolun yksinkertaisin määritelmä voisi olla solu, jolla on kyky ylläpitää itseään. Tiukemman (mutta yhä liian yksinkertaisen) määritelmän kantasolusta ovat tuottaneet Potten ja Loeffler [Development 110 : 1001 (1990)], jotka ovat määritelleet kantasolut "erilaistumattomiksi soluiksi, jotka kykenevät a) lisääntymään, b) pitämään itseään yllä, c) tuottamaan suuren määrän erilaistuneita, toiminnallisia jälkeläisiä, d) uudistamaan kudoksen vaurion jälkeen ja e) osoittavat joustavuutta näitä mahdollisuuksia käytettäessä".

Kantasolujen tehtävä on korvata solut, jotka on

menetetty luonnollisen solun kuoleman, vamman tai taudin seurauksena. Kantasolujen läsnäolo erityisessä kudostyypissä korreloi tavallisesti kudosten kanssa, joilla on suuri solujen vaihtuvuus. Kuitenkaan tämä korrelaatio ei ehkä aina päde, koska kantasolujen otaksutaan olevan läsnä kudoksissa, joilla ei ole suurta solujen vaihtuvuutta [esim. maksa; Travis, Science 259 : 1829 (1993)].

Solujen pieni vaihtuvuus nisäkkään keskushermostossa yhdessä aikuisen nisäkkään keskushermoston solujen kyvyttömyyden kanssa tuottaa uusia soluja vasteena solujen menetykselle vamman tai taudin jälkeen ovat johtaneet olettamukseen, että aikuisen nisäkkään keskushermosto ei sisällä kantasoluja. Kuitenkin äskettäin keskushermostosta on eristetty soluja, jotka osoittavat kantasolujen tunnuspiirteitä in vitro. Tämä solu on läsnä alkiossa [Reynolds et al., J. Neurosci., 12 : 4565 (1992)] aikuisuuteen saakka [Reynolds ja Weiss, Science 255 : 1707 (1992)] viitaten siihen, että aikuisen keskushermostolla, vaikka se ei tuota uusia soluja vasteena vauriolle tai taudille, on kyky tuottaa uusia soluja ja korjata itseään kantasolujen ja niiden jälkelaisten lisääntymisen ja erilaistumisen kautta tavalla, joka on yhdenmukainen hematopoieettisen järjestelmän kanssa.

Tarkasteltaessa rajoituksia ja puutteita, jotka liittyvät aikaisempaan tekniikkaan koskien keskushermoston sairauksien hoitoja, on ilmeistä, että alalla on olemassa tarvetta keskushermoston sairauksien hoitomenetelmästä, joka käsittää vaurion tai taudin seurauksena menetettyjen solujen korvaamisen mutta joka ei käsitä elimistöön tunkeutuvia transplantaatiotoimenpiteitä ja tällaisiin toimenpiteisiin liittyviä haittapuolia. Lisäksi johtuen farmaseuttisiin yhdisteisiin liittyvistä ongelmista alalla on olemassa tarvetta keskushermoston sairauksien hoitomenetelmästä, joka käsittää yhdisteiden vapauttamisen suoraan keskushermostoon tai muiden keskushermoston solujen avulla, jolloin vältetään infuusiopumppujen käyttö ja veri-aivoeste.

Yhteenveto keksinnöstä

Keksinnön tarkoituksena on nyt aikaansaada uusi menetelmä neuraalisten prekursorisolujen lisäämiseksi in vitro. Täsmällisemmin määriteltynä keksinnölle on tunnusomaista se, mitä on esitetty patenttivaatimuksissa.

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä, jolle on olennaista että siinä viljellään prekursorisolua elatusaineessa, jossa on vähintään yhtä kasvutekijää multipotentin neuraalisen kantasolun lisääntymisen indusoimiseksi, joka prekursorisolu on otettu keskushermoston kammion seinämää rajoittavasta kudoksesta ja saatu aikaan lisäämällä fibroblastien kasvutekijää ja epidermaalista kasvutekijää mainittuun elävän nisäkkään keskushermoston kammioon, irrottamalla mainittu solukudos mainitusta nisäkkäästä ja hajottamalla mainittu solukudos mainitun prekursorisolun erottamiseksi mainitusta solukudoksesta.

Tämän keksinnön kohde on myös, että menetelmässä prekursorisolu on otettu keskushermoston kammion seinämää rajoittavasta kudoksesta ja saatu aikaan lisäämällä fibroblastien kasvutekijää ja epidermaalista kasvutekijää mainittuun elävän nisäkkään keskushermoston kammioon, joka kammio on mainitun nisäkkään etuaivojen sivukammio, erityisesti keskeinen neljäs aivokammio.

Lisäksi tämän keksinnön kohde on, että menetelmässä mainittu fibroblastien kasvutekijä on hapan fibroblastien kasvutekijä (aFGF), emäksinen fibroblastien kasvutekijä (bFGF) tai kasvutekijöiden aFGF ja BGF yhdistelmä.

Yllä esitetyn avulla keksinnön mukaista ratkaisua voidaan nyt hyödyntää vamman, taudin tai toimintahäiriön seurauksena menetettyjen solujen korvaamiseksi indusoimalla endogeeniset prekursorisolut lisääntymään/erilaistumaan ja/tai vaeltamaan keskushermostossa.

Lisäksi on nyt mahdollista aikaansaada menetelmä aineiden vapauttamiseksi keskushermostoon manipuloimalla geneettisesti tai epigeneettisesti endogeenisiä prekurso-

risoluja.

Keksinnön avulla voidaan tuottaa koostumukset, joita käytetään endogeenisten keskushermoston prekursorisolujen lisääntymisen, erilaistumisen ja/tai vaeltamisen indusoimiseksi ja/tai keskushermoston prekursorisolujen muuntamiseksi geneettisesti in situ.

Siten voidaan tuottaa menetelmä kantasolujen in vitro -saannon lisäämiseksi manipuloimalla epigeneettisesti endogeenisiä prekursorisoluja.

Nämä kohteet toteutetaan käyttämällä jäljempänä julkaistuja menetelmiä. Keksinnön mukaisen menetelmän kohteet ja ominaisuudet ilmenevät alan ammattimiehille seuraavasta yksityiskohtaisesta kuvauksesta ja liitteenä olevista patenttivaatimuksista saatettuna yhteyteen kuvien kanssa.

On kuvattu menetelmä neuraalisten prekursorisolujen lisäämiseksi in situ, jolloin keskushermoston kammioon annetaan yhtä tai useampaa kasvutekijää prekursorisolujen lisääntymisen indusoimiseksi.

On kuvattu myös menetelmä neuraalisten prekursorisolujen muuntamiseksi geneettisesti in situ, jolloin geneettistä materiaalia saatetaan keskushermoston kammioon prekursorisolujen infektoimiseksi. Geneettinen materiaali koodittaa neurologisen aineen, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu kasvutekijöistä, kasvutekijäreseptoreista, hermoston välittäjäaineista, hermoston välittäjäaineiden reseptoreista, neuropeptideistä, kasvutekijöitä syntetisoivista entsyymeistä ja hermoston välittäaineita syntetisoivista entsyymeistä.

On julkastu myös menetelmä prekursorisolujen lisäämiseksi in vitro, jolloin menetelmä käsittää vaiheet, joissa yhtä tai useampaa kasvutekijää saatetaan elävän nisäkkään keskushermoston kammioon, keskushermoston kammiota verhoava kudos poistetaan, kudos dissosioidaan prekursorisolujen erottamiseksi ja prekursorisolut saatetaan alttiiksi elatusaineelle, joka sisältää kasvutekijän, joka indusoi solujen lisääntymisen.

On kuvattu myös menetelmä nisäkkään hoitamiseksi, joka sairastaa neurologista sairautta, joka on menetettyjen tai vahingoittuneiden hermosolujen aiheuttama, jolloin nisäkkään keskushermoston kammioon saatetaan yhtä tai useampaa kasvutekijää kammiota verhoavien prekursorisolujen lisääntymisen, vaeltamisen ja erilaistumisen indusoimiseksi in situ siten, että hävinneet tai vaurioituneet hermosolut korvataan.

Lyhyt selostus piirroksista

Kuvat 1a - 1c esittävät erilaistuneita soluja, jotka on tuotettu aikuisen selkäytimen kaventuvasta alaosasta eristetyistä kantasoluista. Selkäytimen kaventuvan alaosan sisältävä kudos oli leikelty täysikasvuisilta hiiriltä. Kantasolut eristettiin ja niitä viljeltiin viljelmässä, jossa oli läsnä 20 ng/ml EGF-kasvutekijää ja bFGF-kasvutekijää yhdessä. Ne tuottivat hermosoluja, astrosyyttejä ja oligodendrosyyttejä, jotka osoitettiin käyttämällä kolmoisleiman käsittävää epäsuoraa immunosytokemiaa vastaavasti MAP-2:n (kuva 1A), GFAP:n (kuva 1B) ja O4:n (kuva 1C) antiseerumeiden avulla.

Kuva 2 esittää subependyymissä lisääntyvien solujen lukumäärää erilaisten tymidiinitappokäsittelyjen jälkeen. Kontrollihiiret saivat tritiumilla käsittelemätöntä tymidiinia (3H-tymidiinia) ja oletettiin, että niillä oli 100-%:inen subependyymissä lisääntyvä solupopulaatio. Eläimillä, jotka saivat sarjan ruiskeita päivänä 0 solujen konstitutiivisesti lisääntyvän populaation tappamiseksi, oli 85 % kontrolliarvoista päivänä 8. Eläimillä, jotka saivat sarjan 3H-tymidiiniruiskeita päivänä 0 ja päivänä 2, oli 45 % kontrolliarvoista 8 päivän kuluttua viimeisestä ruiskeesta (päivänä 10). Eläimillä, jotka saivat sarjan 3H-tymidiiniruiskeita päivänä 0 ja päivänä 4, oli 85 % kontrolliarvoista päivänä 12. Tämä viittaa siihen, että kantasolut elpyvät lisääntyvään malliin kahden päivän kuluttua ensimmäisestä taposta ja että useimmat palaavat jälleen lepotilaan päivään 4 mennessä.

Kuva 3 esittää sellaisten neuropallojen lukumäärää, jotka ovat muodostuneet in vitro eläimistä, jotka on saatettu

erilaisten 3H-tymidiinikäsittelyjen kohteeksi in vivo. Eläimet saivat saman sarjan ruiskeita, kuten kuvassa 2 on esitetty. Kontrollieläimet saivat suolaliuosruiskeet. Hiiret lopetettiin 16 - 20 tunnin kuluttua viimeisestä 3H-tymidiiniruiskeesta ja aivot poistettiin ja niitä viljeltiin jokaisen tymidiinitappokäsittelyn jälkeen muodostuneiden neuropallojen lukumäärän määrittämiseksi. Eläimet, jotka saivat 3H-tymidiinia päivänä 0 (tappaa normaalisti lisääntyvät subependyymin solut), muodostivat saman määrän palloja kuin kontrollieläimet, mikä viittaa siihen, että konstitutiivisesti lisääntyvät subependymaaliset solut eivät ole in vitro eristettyjen kantasolujen lähde. Eläimet, jotka saivat toisen sarjan ruiskeita päivänä 2, muodostivat 45 % neuropallojen lukumäärästä suhteessa kontrolliarvoihin. Eläimet, jotka saivat toisen sarjan ruiskeita päivänä 4, muodostivat lähes yhtä monta neuropalloa kuin kontrollieläimet, mikä viittaa siihen, että neuropalloja muodostava multipotentti kantasolu, joka eristettiin in vitro kasvutekijöiden, kuten epidermaalisen kasvutekijän, läsnäollessa, on peräisen suhteellisesti lepotilassa olevasta kantasolupopulaatiosta subependymaalisessa kudoksessa in vivo.

Kuvat 4a ja 4b esittävät retroviruksella leimattujen prekursorisolujen lisääntymistä ja vaeltamista subependyymissä vasteena aivojen sivukammioon annetulle EGF-infuusiolla in vivo. Kuvien 4a ja 4b eläimet saivat ruiskeena etuaivojen sivukammioihin replikaatioon kykenemättömiä retroviruksia, jotka sisälsivät ß-galaktosidaasigeenin. Lisäksi kuvan 4b eläimellä oli osmoottinen minipumppu, joka oli täytetty 33 µg:lla/ml EFG:ää, implantoituna samaan paikkaan, johon ruiske annettiin. Kuusi päivää myöhemmin kummankin eläimen aivot kiinnitettiin ja ne käsiteltiin ß-gal-histokemian osalta. Kontrollieläimellä (kuva 4a) retroviruksella leimatut solut (avoin nuoli) sijaitsivat lähellä sivukammion seinämää. Eläimellä, joka oli saanut EGF-infuusiota, oli enemmän leimattuja soluja. Lisäksi EGF-infuusiolla käsitellyn eläimen

lisääntyneet solut olivat vaeltaneet pois sivukammion seinämästä (pylväs esittää 200 µm:ä).

Kuva 5 osoittaa, että EGF-infuusio in vivo sivukammioon lisää dramaattisesti in vitro muodostuneiden neuropallojen määrää. Eläimiä käsiteltiin infuusiopumpuilla, jotka oli täytetty 33 µg:lla/ml EGF:ää, 6 päivän ajan ennen eläinten lopettamista. Sitä seuraava aivojen sivukammion seinämien viljely, kun läsnä oli 20 ng/ml EGF:ää, tuotti tulokseksi 9 päivän kuluttua in vitro muodostuneiden neuropallojen lukumäärän 4-kertaisen lisääntymisen verrattuna kontrollieläimiin, jotka saivat suolaliuosinfuusiot samojen 6 päivän aikana.

Kuvat 6a ja 6b esittävät aikaa, joka tarvitaan lisääntyvien solujen lukumäärän uudelleen muodostumiseksi subependyymissä yhden 3H-tymidiiniruiskesarjan jälkeen (kuva 6a) ja toisen 3H-tymidiiniruiskesarjan jälkeen, joka annettiin 2 päivän kuluttua ensimmäisestä sarjasta (6b). Kuten kuvassa 6a on esitetty, ensimmäisenä päivänä yhden ruiskesarjan jälkeen vain 10 % subependymaalisista soluista lisääntyi suhteessa kontrolliarvoihin (ei 3H-tymidiiniruisketta). Lisääntyvien solujen lukumäärä lisääntyi jatkuvasti ajan kuluessa ja 8 päivän aikana lisääntyvien subependymaalisten solujen määrä oli palautunut kontrolliarvoihin. Kun toinen ruiskesarja annettiin kahden päivän kuluttua ensimmäisestä sarjasta, kuten kuvassa 6b on esitetty (avoimen ympyrät), kantasolujen määrä oli käytetty loppuun ja lisääntyvä populaatio oli vähentynyt 50 %:iin kontrolliarvoista. Kun toinen ruiskesarja annettiin neljä päivää ensimmäisen sarjan jälkeen (avoimet neliöt), ne kantasolut, jotka olivat elpyneet miehittämään uudelleen subependyymiä, olivat poistuneet solusyklistä eivätkä enää lisääntyneet. Siten toinen ruiskesarja päivänä 4 ei ollut tappanut niitä. Tässä tapauksessa lisääntyvien subependymaalisten solujen lukumäärä oli palautunut 85 %:iin kontrolliarvoista 8 päivän aikana toisen ruiskesarjan jälkeen.

Kuva 7 esittää tyrosiinihydroksylaasin (TH) mRNA:n suhteellisia määriä CD_1-hiirten käsitellyissä ja käsittele-

mättömissä subventrikulaarisissa vyöhykkeissä (SVZ) ja mustatumakkeen (SN) alueella ensimmäisenä päivänä ja 21 päivän kuluttua kasvutekijöiden antamisesta. CMF = jo käytetty elatusaine rotan B49-hermotukisolulinjasta + FGF (25 µg/ml) + heparaanisulfaatti (10 IU/ml). E + F + FBS = EGF (25 µg/ml) + bFGF (25 g/ml) + heparaanisulfaatti (10 UI/ml) + 25 % nautasikiön seerumia. SAL = suolaliuos. NC SVZ = subventrikulaarinen vyöhyke, johon ei ole asetettu kanyyliä.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Määritelmät

Termi "kantasolu" viittaa suhteellisesti lepotilassa olevaan erilaistumattomaan soluun, joka on kykenevä lisääntymään ja tuottamaan lisää kantasoluja, joilla on kyky tuottaa suuri määrä esisoluja, jotka vuorostaan voivat tuottaa erilaistuneita tai erilaistumiskykyisiä tytärsoluja.

Termi "neuraalinen kantasolu" viittaa multipotentteihin kantasoluihin, jotka kykenevät tuottamaan jälkeläisiä, jotka kykenevät erilaistumaan hermosoluiksi, astrosyyteiksi ja oligodendrosyyteiksi.

Termi "esisolu" viittaa erilaistumattomaan soluun, joka on peräisin keskushermoston kantasolusta. Esisolulla on rajoitettu lisääntymiskyky eikä se kykene itse-uudistumiseen. Se on sidottu erityiseen erilaistumisrataan ja sopivissa olosuhteissa se erilaistuu lopulta hermosoluiksi, astrosyyteiksi tai oligodendrosyyteiksi.

Termi "oligodendrosyytti" viittaa erilaistuneeseen hermotukisoluun, joka muodostaa aksoneita ympäröivän myeliinin keskushermostossa (CNS). Oligodendrosyytit edustavat fenotyyppiä galaktoserebrosidi (+), myeliinin emäksinen proteiini (+) ja hermotukikudoksen säikeinen hapan proteiini (-) [GalC(+), MBP(+),GFAP(-)].

Termi "hermosolu" viittaa erilaistuneeseen hermosoluun, jolla on fenotyyppi hermosoluspesifinen enolaasi (+), neurofilamentti (+), mikrotubulukseen liittynyt proteiini (+) tai Tau-1 (+) [NSE(+), NF(+), MAP-2(+) tai Tau-1(+)].

Termi "astrosyytti" viittaa erilaistuneeseen hermotukisoluun, joka on GFAP(+), GalC(-) ja MBP(-1).

Termi "neuropallo" viittaa neuraalisista kantasoluista peräisin olevien ja in vitro viljeltyjen solujen rykelmään. Ainakin jotkut soluista ovat nestiini(+)-fenotyyppiä. Rykelmä koostuu kantasoluista ja/tai esisoluista ja voi sisältää tai ei sisällä erilaistuneita soluja.

Termi "prekursorisolut" viittaa eläviin soluihin, joita on muunnettu tai manipuloitu käyttämällä tämän keksinnön menetelmiä ja jotka ovat peräisin neuraalisista kantasoluista, in vivo tai in vitro, ja termi käsittää sekä esisolut että kantasolut. In vitro prekursorisolut kasvavat tyypillisesti neuropallojen muodossa, mutta ne voivat osoittaa erilaisia kasvumalleja riippuen viljelyolosuhteista. Prekursorisoluja tavataan subependyymissä, mutta ne eivät ole rajoitettuja tähän keskushermoston alueeseen.

Termi "kasvutekijä" viittaa biologiseen tekijään, kuten proteiiniin, peptidiin tai muuhun molekyyliin, joka vaikuttaa prekursorisolujen kasvuun, lisääntymiseen tai erilaistumiseen tai jolla on niihin troofinen tai säätelevä vaikutus (joko yksin tai yhdistelmässä muiden kasvutekijöiden kanssa).

Esimerkkeihin kasvutekijöistä sisältyvät happamat ja emäksiset fibroblastikasvutekijät (aFGF, bFGF), aktiviini, amfireguliini, Bcl-2-geenituote, luun morfogeeninen proteiini (BMP-2), aivoperäinen neurotroofinen tekijä (BDNF), siliaarinen neurotroofinen tekijä (CNTF), epidermaalinen kasvutekijä (EGF) ja EGF:n kaltainen ligandi, hermotukikudosperäinen neurotroofinen tekijä (GDNF), hepariinin kaltaiset molekyylit, kuten heparaanisulfaatti, insuliinin kaltainen kasvutekijä (IGF_{-1}), interleukiinit, magrofagin inflammatoriset proteiinit (MIP-1α, MIP-1ß ja MIP-2), hermokasvutekijä (NGF), verihiutaleperäinen kasvutekijä (PDGF), retinoiinihappo, tyrotropiinia vapauttava hormoni (TRH), transformoivat kasvutekijät alfa ja beta (TGFα, TGFß) ja tuumorinekroositekijä alfa (TNFα) ja vastaavat.

Termi "neurologinen aine" viittaa mihin tahansa biologisesti aktiiviseen aineeseen, joka on käyttökelpoinen keskushermoston toiminnan kannalta. Esimerkiksi termi sisältää hermoston välittäjäaineet, hermoston välittäjäaineiden repeptorit, kasvutekijät, kasvutekijäreseptorit ja vastaavat sekä entsyymit, joita käytetään näiden aineiden synteesissä.

Termi "kammio" viittaa keskushermostosa mihin tahansa onteloon tai käytävään, jonka läpi aivo-selkäydinneste virtaa. Siten termi ei sisällä vain sivukammioita, kolmatta ja neljättä kammiota, vaan se sisältää myös keskuskanavan ja aivonesteviemärin.

Termi "kammiokudos" viittaa kudokseen, joka verhoaa keskushermoston kammioita ja sisältää subependyymin, joka sisältää kokoelman erilaistumattomia soluja, mukaan luettuna keskushermoston kantasolut ja esisolut.

Termi "konstitutiivisesti lisääntyvä populaatio" viittaa jakautuvien solujen populaatioon, joka sijaitsee aikuisen nisäkkään etuaivojen sivukammioiden subependyymissä [kuten on esitetty lähteessä Smart; J. Comp. Neurol., 116 : 325 (1961)] ja se muodostaa noin 33 % soluista joillakin subependyymin alueilla [Morshead ja van der Kooy, J. Neurosci., 12 : 249 (1992)].

Termi "geneettinen materiaali" viittaa RNA:han tai DNA:han, joka koodittaa neurologisen aineen, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu kasvutekijöistä, kasvutekijäreseptoreista, hermoston välittäjäaineista, hermoston välittäjäaineiden reseptoreista, neuropeptideistä, kasvutekijöitä syntetisoivista entsyymeistä ja hermoston välittäjäaineita syntetisoivista entsyymeistä. Geneettistä materiaalia käytetään prekursorisolujen infektoimiseksi in vitro tai in vivo käyttäen alalla tunnettua geneettisen muuntelun tekniikkaa.

Edullisten suoritusmuotojen kuvaus

Aikuisen nisäkkään keskushermostosta peräisin olevien kantasolujen in vitro eristäminen ja karakterisointi

Keskushermoston kantasolut on raportoitu ja niiden

mahdollinen käyttö kuvattu [Reynolds ja Weiss, Science 255 : 1707 (1992); Reynolds et al., J. Neurosci 12 : 4565 (1992); Reynolds ja Weiss, Restorative Neurology and Neuroscience 4 : 208 (1992); Reynolds ja Weiss, Neuronal Cell Death and Repair, toimittaja Cuello (1993)]. Lisäksi näiden solujen hyödyllisyyttä on kuvattu julkaistuissa PCT-patenttihakemuksissa WO 93/01275, WO 94/16718, WO 94/10292 ja WO 94/09119. Kuten muissa nisäkkään kudoksissa havaitut kantasolut, keskushermoston kantasolu kykenee ylläpitämään itseään ja tuottamaan suuren joukon jälkeläsiä -- niihin sisältyvät hermosolut, astrosyytit ja oligodendrosyytit.

Keskushermoston prekursorisolut voidaan eristää aikuisen nisäkkään keskushermostosta ja viljellä niitä käyttämällä menetelmiä, jotka on kuvattu jäljempänä esimerkissä 2 ja edellä mainituissa Reynoldsin ja Weissin julkaisuissa ja PCT-patenttihakemuksissa. Lyhyesti esitettynä epidermaaliseen kasvutekijään (EGF:ään) reagoivaa kantasolua kasvatetaan elatusainessa vähintään yhden kasvutekijän läsnäollessa. Elatusaine on edullisesti täysin keinotekoinen seerumivapaa elatusaine. Kasvutekijöihin, joita voidaan käyttää lisääntymisen indusoimiseksi, sisältyy mikä tahansa troofinen tekijä, joka sallii prekursorisolujen lisääntymisen, mukaan luettuna mikä tahansa molekyyli, joka sitoutuu reseptoriin solun pinnalla troofisen tai kasvun indusoivan vaikutuksen tuottamiseksi soluun. Edullisiin kasvutekijöihin, joilla proliferatiivinen vaikutus, sisältyvät EGF, amfireguliini, aFGF, bFGF ja TGFα. Voidaan myös käyttää erilaisia kasvutekijöiden yhdistelmiä. Edullinen yhdistelmä on EGF aFGF:n tai bFGF:n kanssa.

Tietyillä kasvutekijöillä on säätelevä vaikutus prekursorisolujen lisääntymiseen. Näitä kasvutekijöitä voidaan käyttää yhdistelmässä edellä mainittujen lisääntymisen indusoivien kasvutekijöiden kanssa lisääntymisen säätelemiseksi esimerkiksi lisäämällä tai vaimennussäätelemällä lisääntymistä tai muuttamalla prekursorisolun jälkeläisten fenotyyppejä.

Kasvutekijöihin, joilla on säätelevä vaikutus lisääntymiseen, sisältyvät heparaanisulfaatti, transformoiva kasvutekijä beta (TGFß), aktiviini, luun morfogeeninen proteiini (BMP-2), siliaarinen neurotroofinen tekijä (CNTF), retinoiinihappo, tuumorinekroositekijä alfa (TNFα), makrofagin inflammatoriset proteiinit (MIP-1α, MIP-1ß ja MIP-2), hermokasvutekijä (NGF), verihiutaleperäinen kasvutekijä (PDGF), interleukiinit ja Bcl-2-geenituote.

Lisääntymisen indusoiva kasvutekijä tai kasvutekijöiden yhdistelmä indusoi keskushermoston kantasolun lisääntymisen, jolloin se jakautuu tuottaen erilaistumattomien prekursorisolujen rykelmän. Solujen rykelmät eivät ole immunoreaktiivisia GFAP:n, neurofilamentin (NF), hermosoluspesifisen enolaasin (NSE) tai MBP:n suhteen. Kuitenkin rykelmässä olevat prekursorisolut ovat immunoreaktiivisia nestiinin suhteen, joka on välituotefilamenttiproteiini, joka on tavattu erilaistumattomista keskushermoston soluista. Lehndahl et al. [Cell 60 : 585 - 595 (1990)] ovat karakterisoineet nestiinimarkkerin. Kypsät fenotyypit, jotka liittyvät neljään solutyyppiin, jotka voivat erilaistua prekursorisolujen jälkeläisistä, ovat vallitsevasti negatiivisia nestiinifenotyypin suhteen.

Mitogeenin, kuten EGF:n tai vastaavan, ollessa jatkuvasti läsnä, neuropallossa olevat prekursorisolut jatkavat jakautumista, mikä johtaa neuropallon koon ja erilaistumattomien solujen [nestiini(+), GFAP(-), NF(-), NSE(-), MBP(-)] lukumäärän lisääntymiseen. Tässä vaiheessa solut ovat tarttumattomia ja pyrkivät muodostamaan neuropalloja, joille on tunnusomaista vapaasti kelluvat rykelmät. Kuitenkin viljelyolosuhteita voidaan muuttaa siten, että vaikka prekursorisolut yhä ilmentävät nestiinifenotyyppiä, ne eivät muodosta tunnusomaisia neuropalloja. Mitogeenin poistamisen jälkeen solut tarttuvat substraattiin (polyornitiinilla käsitelty muovi tai lasi), litistyvät ja alkavat erilaistua hermosoluiksi ja hermotukisoluiksi. Tässä vaiheessa elatusaine voi sisältää

seerumia, kuten 0,5 - 1,0 % nautasikiön seerumia (FBS). Sitten 2 - 3 päivän kuluessa useimmat tai kaikki prekursorisolut alkavat menettää immunoreaktiivisuuttaan nestiinin suhteen ja alkavat ilmentää antigeenejä, jotka ovat spesifisiä hermosolujen, astrosyyttien tai oligodendrosyyttien suhteen, mitä osoittaa vastaavasti immunoreaktiivisuus MAP-2:n, GFAP:n ja GalC:n suhteen.

Hermosolujen identifiointi toteutetaan myös käyttäen immunoreaktiivisuutta hermosoluspesifisen enolaasin (NSE), neurofilamentin ja hermosoluspesifisen proteiinin tau-1:n suhteen. Koska nämä markkerit ovat erittäin luotettavia, ne ovat jatkuvasti käyttökelpoisia hermosolujen primaarista identifiointia varten, mutta hermosolut voidaan myös identifioida perustuen niiden spesifiseen hermoston välittäjäainefenotyyppiin.

Käyttäen kaksoisleima-immunofluoresenssi- ja immunoperoksidaasimenetelmiä erilaistuneista neuropalloviljelmistä voidaan analysoida hermoston välittäjäaineiden ilmentyminen tai joissakin tapauksissa entsyymit, jotka vastaavat hermoston välittäjäaineiden synteesistä. Vaihtoehtoisesti in situ -hybridisaatiohistokemia voidaan toteuttaa käyttäen cDNA- tai RNA-koettimia, jotka ovat spesifisiä hermoston peptidivälittäjäaineen suhteen, tai hermoston välittäjäaineen syntetisoivan entsyymin mRNA:ta. Nämä tekniikat voidaan yhdistää immunosytokemiallisten menetelmien kanssa spesifisten fenotyyppien identifioimisen parantamiseksi. Tarvittaessa voidaan käyttää vasta-aineita ja edellä selostettuja molekyylikoettimia vastaavasti western- ja northern blot -menetelmissä solujen identifioinnin auttamiseksi.

Solut, jotka eivät ilmennä hermosolujen tai astrosyyttien suhteen spesifisiä välituotefilamentteja, alkavat ilmentää oligodendrosyyttien suhteen spesifisiä markkereita oikealla ajallisella tavalla. Se tarkoittaa, että solut tulevat ensin imuunoreaktiivisiksi O4:n (solun pinnan antigeenin), galaktoserebrosidin (GalC, myeliinin glykolipidin) ja lopuksi

myeliinin emäksisen proteiinin (MBP:n) suhteen. Näillä soluilla on myös tunnusomainen oligodendrosyyttimorfologia.

Keskushermoston kantasoluja on eristetty erilaisilta aikuisen keskushermoston alueilta, mukaan luettuna selkäytimen kaventuva alaosa (katso kuvat 1a - 1c), kaulan ja rintakehän selkäydin, aivorunko ja hypotalamus. Kaikissa näissä tapauksissa eristetty keskushermoston kantasolu osoittaa itsensä ylläpitämistä ja tuottaa suuren määrän jälkeläisiä, joihin sisältyvät hermosolut, astrosyytit ja oligodendrosyytit. Siten kantasoluja on läsnä monilla aikuisen nisäkkään keskushermoston alueilla.

Aikuisen nisäkkään keskushermostosta peräisin olevien kantasolujen karakterisointi ja manipulaatio in vivo

Tekniikka, joka on kuvattu edellä keskushermoston kantasolujen eristämiseksi, lisäämiseksi ja erilaistamiseksi in vitro, voidaan muokata in vivo -tekniikaksi, kuten jäljempänä on kuvattu, samanlaisten tulosten saavuttamiseksi. Näiden solujen tällainen in vivo -manipulaatio ja - muuntaminen tekee mahdolliseksi vamman tai taudin johdosta menetettyjen solujen korvaamisen endogeenisesti, jolloin vältetään tarve vieraiden solujen siirtämiseksi potilaaseen. Lisäksi soluja voidaan muuntaa tai muokata geneettisesti in vivo siten, että ne ilmentävät erilaisia biologisia aineita, jotka ovat käyttökelpoisia neurologisten sairauksien hoidossa.

Normaalisti aikuisen nisäkkään keskushermosto on mitoottisesti lepotilassa in vivo lukuunottamatta subependymaalista aluetta, joka verhoaa sivukammioita etuaivoissa. Tämä alue sisältää konstitutiivisesti lisääntyvien solujen alapopulaation solusykliajan ollessa 12,7 tuntia. Lisääntyvien solujen BrdU- ja retrovirusleimaus paljastavat, että mikään uudestaan tuotetuista soluista ei erilaistu kypsiksi hermosoluiksi tai hermotukisoluiksi eivätkä ne vaella toisille keskushermoston alueille (Morshead ja Van der Kooy, edellä).

Solujen jatkuvaa lisääntymistä ja niiden vakiomäärän ylläpitämistä subebendyymissä selitetään kahden mekanismin

avulla. Toisen tytärsolun kuolema jokaisen jakautumisen jälkeen ylläpitää lisääntyvän populaation muuttumatonta lukumäärää. Konstitutiivisesti jakautuva populaatio kuolee lopulta ja suhteellisesti lepotilassa olevien solujen alapopulaatio subependyymissä kykenee miehittämään uudelleen konstitutiivisesti jakautuvan populaation. Tämä kantasolun kaltainen malli lisääntyvän subependymaalisen populaation ylläpitämiseksi on vastaava kuin muilla kudoksilla, joissa soluilla on lyhyt elinikä ja kantasoluiksi kutsuttujen, suhteellisesti lepotilassa olevien solujen alapopulaatio miehittää ne uudelleen.

Kuten esimerkissä 1 on kuvattu yksityiskohtaisesti, kokeet, joissa käytetään näiden lisääntyvien solujen retrovirusinfektiota in vivo ja sen jälkeen ß-galaktosidaasireportterigeenin (ß-gal-reportterigeenin) ilmentämistä laimentumattomana markkerina, osoittavat, että täysikasvuisten hiirten eloonjäämisajan lisääntyessä (enintään 28 päivään saakka retrovirusinfektion jälkeen) ilmenee ß-gal-positiivisten subependymaalisten solujen etenevä häviö. Verrattuna yhden päivän elossa oleviin eläimiin, 6 päivän kuluttua retrovirusinfektiosta ß-gal-positiivisten solujen häviö on 45 % ja 28 päivän kuluttua retrovirusinfektiosta ß-gal-positiivisten solujen häviö on 97 %. Käyttäen sisäkkäistä polymeraasiketjureaktiota (PCR) retroviruksen DNA:n sisältävien yksittäisten solujen identifioimiseksi määritettiin, että ß-gal:in ilmentävien solujen häviö johtuu retroviruksella infektoitujen solujen häviöstä solukuoleman kautta, ei ß-gal-ilmentymisen katoamisesta.

Vatsaontelon sisäiset BrdU-ruiskeet (tymidiinianalogi, joka sisällytetään jakautuvien solujen DNA:han) paljastavat, että 33 % soluista joillakin subependyymin alueilla muodostavat normaalisti jakautuvan populaation (katso esimerkki 9 jäljempänä). BrdU:lla leimattujen solujen lukumäärä vähenee ajan kuluessa. BrdU-leimaamisen jälkeen 30 päivän kuluttua vain 3 % jakautuvista soluista on yhä leimattuja. BrdU-ruiskeiden

jälkeen 30 päivän kuluttua pienen solumäärän raskas leimaaminen osoittaa, että leimatut solut jakautuivat ruiskeiden aikana, ja tämä viittaa siihen, että ne olivat suhteellisesti lepotilassa 30 päivän jakson ajan. Tämä osoittaa, että nämä solut ovat kantasoluja pikemmin kuin konstitutiivisesti jakautuvan populaation soluja.

Kaksi edellä esitettyä esimerkkiä tukevat olettamusta, että koko aikuisen eliniän nähtävä lisääntyvien subependymaalisten solujen muuttumaton lukumäärä edellyttää suhteellisesti lepotilassa olevan kantasolun läsnäoloa mainitun kantasolun lisääntyessä sporadisesti konstitutiivisesti lisääntyvän populaation täydentämiseksi ja itseuudistumiseksi.

Kuten esimerkissä 5 on esitetty yksityiskohtaisesti, konstitutiivisesti jakautuvat subependymaaliset solut voidaan tappaa ruiskuttamalla suuria annoksia radioaktiivista tymidiinia solusyklin keston ajan väliaikojen ollessa lyhyempiä kuin S-vaiheen kesto. Päivänä 1 tappamisen jälkeen lisääntyvä populaatio on 10 % kontrolleista ja 8 päivän aikana lisääntyvä populaatio on palautunut kontrollitasolle. Jos täydennetty populaatio johtuu normaalisti lepotilassa olevien solujen elpymisestä lisääntyvään malliin, niin toisen tapon sinä aikana, jolloin kantasolut tuottavat jälkeläisiä subependyymin miehittämiseksi uudelleen, pitäsi muuttaa solujen lukumäärää konstituviivisesti lisääntyvässä populaatiossa. Kun toinen tappo toteutetaan 2 päivän kuluttua ensimmäisestä taposta, 8 päivää myöhemmin konstitutiivisesti lisääntyvä populaatio on vain 45 % kontrolliarvoista (eläimet, jotka eivät saaneet tymidiinitappokäsittelyä) tai eläimistä, jotka saivat vain yhden tappokäsittelyn päivänä 0 (ensimmäisen tapon aika) (katso kuva 6b). Lisääntyvien solujen lukumäärän vähentyminen subebendyymissä säilyy 63 %:ssa myös päivänä 31 toisen tapon jälkeen. Kun toinen tappo toteutetaan päivänä 4, lisääntyvä populaatio palautuu 83 %:iin kontrolliarvoista 8 päivää myöhemmin. Nämä tulokset viittaavat siihen, että normaalisti lepotilassa oleva kantasolu elpyy lisääntyvään malliin

ensimmäisten kahden päivän kuluessa ensimmäisen tapon jälkeen ja että 4 päivän kuluttua kantasolun ei enää tarvitse olla elpyneenä subependyymin miehittämiseksi uudelleen (katso kuva 2).

Kuten esimerkissä 6 jäljempänä on esitetty yksityiskohtaisesti, toteutettiin koe tarkoituksena määrittää, onko in vitro -kantasolu peräisin konstitutiivisesti lisääntyvästä populaatiosta vai levossa olevasta populaatiosta. Eläimet käsiteltiin seuraavasti:

Ryhmä 1 kontrolli.

Suuret annokset radioaktiivista tymidiinia annettiin seuraavina päivinä:

Ryhmä 2 päivänä 0

Ryhmä 3 päivänä 0 ja päivänä 2

Ryhmä 4 päivänä 0 ja päivänä 4.

Viimeisen ruiskeen jälkeen eläimet lopetettiin ja kantasolut eristettiin aivojuoviosta (mukaan luettuna subebendymaalinen alue) käyttämällä menetelmiä, jotka on kuvattu esimerkissä 2 jäljempänä.

Ryhmissä 2 - 4 konstitutiivisesti lisääntyvä populaatio tapettiin. Ryhmässä 3 kantasolut, jotka elpyivät solusykliin subependymaalisten lisääntyvien solujen uudelleen muodostamiseksi, tapettiin myös.

In vitro tuotettujen neuropallojen määrä:

Ryhmä 1	100 % (kontrolli)
Ryhmä 2	100 %
Ryhmä 3	45 %
Ryhmä 4	85 %.

Nämä tulokset osoittavat, että kun eliminoidaan lähes kaikki konstitutiivisesti lisääntyvät solut subependyymissä, niin se ei vaikuta kantasolujen lukumäärään, joka voidaan eristää ja jota voidaan lisätä in vitro (ryhmä 1 verrattuna ryhmiin 2 ja 4). Kuitenkin kun normaalisti lepotilassa olevat solut tapetaan, kun ne on elvytetty miehittämään uudelleen subependyymiä (kuten ryhmä 3), kantasolujen lukumäärä, joka

voidaan eristää in vitro, vähenee merkitsevästi (ryhmä 3 verrattuna ryhmiin 1 ja 2). Ensimmäisen tappokäsittelyn jälkeen 4 päivän kuluttua kantasolut itse eivät enää vaihdu (turn over) ja sen seurauksen toinen sarja tritiumilla käsiteltyjä tymidiiniruiskeita ei tapa niitä [siitä johtuen vain 15 %:n vähennys (ryhmä 4) verrattuna 55 %:n vähenemiseen (ryhmä 3)].

Edellä esitetyt tulokset osoittavat, että in vitro kantasolut ovat peräisin supependymaalisten solujen levossa olevasta populaatiosta in vivo (katso kuva 3). Tämä selittää myös, miksi kantasolut voivat olla peräisin keskushermoston kammioalueilta, jotka ovat muita kuin etuaivojen kammioalueita ja joilla ei ole konstitutiivisesti lisääntyvien solujen alapopulaatiota. Siten kun on määritetty subependymaalisten solujen konstitutiivisesti jakautuvan populaation ja sivukammioiden suhteellisesti lepotilassa olevien kantasolujen välinen suhde, voidaan hyötyä näiden solupopulaatioden tunnuspiirteistä niiden manipuloimiseksi tehokkaamiin in vivo. Tällainen tekniikka tekee mahdolliseksi endogeenisten solujen käytön ja manipulaation erilaisten neurologisten sairauksien hoitamiseksi. Jotkut tekijät, jotka vaikuttavat solujen lisääntymiseen ja erilaistumiseen in vitro, saavuttavat myös samat vaikutukset in vivo. Siten esimerkiksi soluja voidaan manipuloida in situ antamalla kasvutekijöitä ja kasvutekijöiden yhdistelmiä, jotka johtavat määrättyihin tuloksiin, kuten ne on määritetty in vitro -tutkimusten avulla. Esimerkiksi in vitro -erilaistumismenetelmiä, jotka on julkaistu patenttijulkaisussa WO 94/10292 ja joissa solut voidaan indusoida seuraamaan erityistä erilaistumisrataa, voidaan muuntaa käyttäen tässä kuvattuja menetelmiä samanlaisten tulosten saavuttamiseksi in vivo. Kasvutekijöitä voidaan saattaa kammioon käyttämällä stereotaktista ruisketta, osmoottisen pumpun implantaatiota tai mitä tahansa muuta sopivaa menetelmää.

Levossa olevia neuraalisia kantasoluja sijaitsee kaikkalla keskushermostossa lähellä kammioalueita. Etuaivoissa

ovat sivukammiot (ensimmäinen ja toinen kammio). Kolmas kammio on etuaivojen alemman osan ontelo. Keskiaivojen ontelo on putkenmuotoinen aivonesteviemäri ja se yhdistää kolmannen kammion taka-aivojen ontelon, neljännen kammion, kanssa. Keskuskanava on aivo-selkäydinnesteen käytävä selkäytimessä.

Tosiasia, että keskushermoston kantasolut sijaitsevat kammioita verhoavissa kudoksissa, tarjoaa useita etuja näiden solujen muuntamiseksi ja manipuloimiseksi in situ ja keskushermoston eri alueilla vaikuttavien erilaisten neurologisten tautien, sairauksien ja vamman hoitamiseksi viimekädessä. Näiden hoito voidaan räätälöidä näin ollen siten, että kantasoluja, jotka ympäröivät kammioita lähellä sairastunutta aluetta, voidaan manipuloida tai muuntaa in situ käyttäen tässä kuvattuja menetelmiä. Aivokammiojärjestelmä tavataan lähes kaikilta aivojen alueilta, mikä tekee mahdolliseksi helpomman pääsyn sairastuneille alueille. Jos halutaan muuntaa kantasoluja saattamalla ne alttiiksi koostumukselle, joka sisältää kasvutekijän tai virusvektorin, on suhteellisen helppoa implantoida laite, joka saattaa koostumuksen kammioon. Esimerkiksi koostumuksen vapauttamiseksi voidaan käyttää osmoottiseen pumppuun kiinnitettyä kanyyliä. Vaihtoehtoisesti koostumus voidaan ruiskuttaa suoraan kammioihin. Tämä tekisi mahdolliseksi keskushermoston kantasolun jälkeläisten vaeltamisen alueille, jotka ovat vahingoittuneet vamman tai taudin seurauksena. Lisäksi kammioiden välitön läheisyys moniin aivojen alueisiin sallisi kantasolujen tai niiden jälkeläisten erittämän neurologisen aineen diffuusion.

Ensisijaisesti etuaivoihin vaikuttavien Huntingtonin taudin, Alzheimerin taudin, Parkinsonin taudin ja muiden neurologisten sairauksien hoitamiseksi kasvutekijöitä tai muita neurologisia aineita voitaisiin vapauttaa etuaivojen kammioihin kantasolujen muuntamiseen tai manipuloimiseen vaikuttamiseksi in situ. Esimerkiksi Parkinsonin tauti on seuraus matalista dopamiinin pitoisuuksista aivoissa, erityisesti aivojuoviossa. Olisi edullista indusoida potilaan omat

levossa olevat kantasolut aloittamaan jakautuminen in vivo ja sitten indusoida näiden solujen jälkeläiset erilaistumaan dopaminergisiksi soluiksi aivojuovion sairastuneella alueella nostaen siten paikallisesti dopamiinin pitoisuutta. Normaalisti dopaminergisten hermosolujen perikarionit sijaitsevat keskiaivojen mustatumakkeessa ja sen viereisillä alueilla, aksonien työntyessä aivojuovioon. Aikaisempi tekniikka, joka koskee dopaminergisten hermosolujen induktiota aivoissa, keskittyy keskiaivokudoksen manipulaatioihin. Aikaisemman tekniikan menetelmät Parkinsonin taudin hoitamiseksi käsittävät tavallisesti L-dopa-lääkkeen käytön dopamiinipitoisuuksien nostamiseksi aivojuoviossa. Kuitenkin tähän hoitoon liittyy haittapuolia, mukaan luettuna lääketoleranssi ja sivuvaikutukset. On myös siirretty dopamiinia tuottavia alkion kudoksia Parkinsonin tautia sairastavien ihmispotilaiden aivojuovioon kohtalaisella menestyksellä. Kuitenkin sen lisäksi, että tämä on kiistanalainen hoitomenetelmä, vieraan kudoksen implantaatioon liittyy riskejä, mukaan luettuna kudoksen hyljintä ja infektio.

Tämän keksinnön menetelmät ja koostumukset tuottavat vaihtoehdon lääkkeiden käytölle ja alkiokudoksen kiistanalaiselle käytölle Parkinsonin taudin hoitamiseksi. Dopamiinisolujen määrää aivojuoviossa lisätään antamalla sivukammioon koostumusta, joka sisältää kasvutekijöitä. Erityisen edullinen koostumus sisältää EGF:n, bFGF:n ja heparaanisulfaatin yhdistelmän. Koostumus sisältää edullisesti myös seerumia. Tämän koostumuksen antamisen jälkeen tyrosiinihydroksylaasin (TH) (dopamiinisolujen markkeri) lähetti-RNA:n (mRNA:n) transkriptiossa ilmenee merkittävä lisääntyminen aivojuovion subventrikulaarisella alueella, alueella, joka normaalisti ei sisällä dopaminergisiä perikarioneja. Nämä menetelmät ja tulokset selostetaan yksityiskohtaisesti esimerkissä 11. Kuten esimerkissä 12 on kuvattu yksityiskohtaisesti, kudoksen kaksoisleimaaminen BrdU+- ja TH+-solujen jakatumisen esittämiseksi osoittaa, että vasteena

kasvutekijöiden antamiselle in vivo TH+-perikarioneja ilmenee aivojuoviokudoksessa. Monet näistä uudelleen tuotetuista TH+-soluista ovat myös BrdU+-soluja.

Multippeliskleroosin ja muiden demyelinoivien tai hypomyelinoivien sairauksien ja amyotrofisen lateraaliskleroosin tai muiden motoneuronitautien hoitamiseksi keskuskanavaan voitaisiin vapauttaa kasvutekijöitä tai muita neurologisia aineita. Muut taudit ja sairaudet, joita voitaisiin hoitaa tämän keksinnön menetelmillä, on julkaistu PCT-patenttihakemuksessa WO 93/01275.

Välittömästi aivokammiota ympäröivän keskushermoston kudoksen hoitamisen lisäksi lannesammioon (lumbar cistern), voidaan helposti saattaa virusvektori, DNA:ta, kasvutekijää tai muuta neurologista ainetta, jotta se kiertää kaikkialle keskushermostoon.

Normaaleissa olosuhteissa subependymaaliset prekursorit eivät erilaistu tai vaella, pikemminkin niiden kohtanalona näyttää olevan solukuolema määrittelemättömän solunjakautumisten määrän jälkeen (Morshead ja Van der Kooy, edellä). Tätä selitystä tukevat myös PCR-todisteet, kuten edellä on kuvattu. Kasvutekijöiden ruiskuttaminen sivukammioon muuttaa tätä kohtaloa. Kuten on kuvattu yksityiskohtaisemmin esimerkissä 1 jäljempänä, retroviruksia ruiskutettiin sivukammioihin kuutena peräkkäisenä päivänä. EGF:llä täytettyihin osmoottisiin pumppuihin kiinnitettyjen kanyylien implantaatio sivukammioihin samana päivänä (ja 1 tai 6 päivää sen jälkeen), jolloin retrovirusruiskeet on annettu, johtaa RV-ß-gal-leimattujen solujen kokonaismäärän lisääntymiseen 6 päivää myöhemmin (keskimäärin 20 solusta/aivot 150 soluun/aivot).

Edellä kuvatuista PCR-kokeista on tunnettua, että 6 päivän kuluttua retrovirusruiskeesta ei ole yhtään soluja, jotka sisältävät ilmentymätöntä retroviruksen DNA:ta. Siten nämä tulokset osoittavat, että EGF:n indusoima ß-gal-positiivisten solujen lukumäärän lisäys johtuu retroviruksella

leimatun, konstitutiivisesti lisääntyvän populaation kloonin koon laajenemisesta. On myös mahdollista, että osa tästä lisäyksestä johtuu suhteellisesti levossa olevan kantasolun aktivoitumisesta EGF:n vaikutuksesta.

Mielenkiintoisesti tätä ß-gal-leimattujen solujen lukumäärän lisääntymistä seuraa näiden solujen vaeltaminen pois subependyymistä keskelle ja sivulle (mahdollisesti rostraalisesti ja kaudaalisesti) noin 400 µm:n etäisyyteen saakka (katso kuva 4), mitä seuraa myöhemmin erilaistuminen. Siten EGF:n tai vastaavien kasvutekijöiden infuusio indusoi neuraalisten kantasolujen ja esisolujen lisääntymisen, vaeltamisen ja erilaistumisen in vivo ja sitä voidaan käyttää hoidollisesti vamman tai taudin johdosta menetettyjen hermosolujen korvaamiseksi. Edullisessa suoritusmuodossa EGF:ää ja FGF:ää annetaan potilaalle yhdessä tai peräkkäin.

Konstitutiivisesti lisääntyvän solupopulaation normaalia kohtaloa (so. solukuolemaa) voidaan muuttaa antamalla Bcl-2:ta tai muuntamalla geneettisesti soluja bcl-2-geenillä. Geenituotteen tiedetään estävän ohjelmoitua solukuolemaa (apoptoosia) erilaisissa solutyypeissä. Samoin kuin EGF-kokeissa, konstitutiivisesti lisääntyvän solupopulaation klonaalinen laajeneminen saavutetaan.

Tässä kuvattua in vivo -tekniikkaa voidaan käyttää keskushermoston kantasolujen ja esisolujen muuntamiseksi geneettisesti. Mikä tahansa käyttökelpoinen solujen geneettinen muuntaminen kuuluu tämän keksinnön piiriin. Esimerkiksi solut voidaan muuntaa tuottamaan neurologista ainetta, esimerkiksi hermoston välittäjäainetta, kasvutekijää tai vastaavaa, tai lisäämään sen tuotantoa. Geneettinen muuntaminen toteutetaan joko infektoimalla keskushermoston kammioalueita verhoavat solut rekombinanteilla retroviruksilla tai transfektoimalla ne käyttäen alalla tunnettuja menetelmiä [katso julkaisu Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. (1982)]. Voidaan käyttää mitä tahansa geneettisen muuntamisen menetelmää, joka

on nyt tunnettu tai myöhemmin kehitetty. Suoran DNA-transfektion tapauksessa solut voitaisiin muuntaa käyttämällä hiukkaspommitusta, reseptorin välittämää vapauttamista ja kationisia liposomeja. Kun käytetään kimeerisiä geenirakennelmia, ne sisältävät yleensä viruksen, esimerkiksi retroviruksen pitkän terminaalisen toiston (LTR), simian viruksen 40 (SV 40), sytomegaloviruksen (CMV); tai nisäkkään soluspesifisiä promoottoreita, kuten tyrosiinihydroksylaasin (TH), dopamiini-ß-hydroksylaasin (DBH), fenyylietanoliamiini-N-metyylitransferaasin (PNMT), koliiniasetyylitransferaasin (ChAT), hermotukikudoksen säikeisen happaman proteiinin (GFAP), hermosoluspesifisen enolaasin (NSE), neurofilamenttiproteiineja (NF-L, NF-M, NF-H ja vastaavia), jotka ohjaavat halutun proteiinin koodittavien rakennegeenien ilmentymistä.

Jos retrovirusrakennelmaa on tarkoitus käyttää normaalisti levossa olevien kantasolujen muuntamiseksi geneettisesti, niin on edullista indusoida näiden solujen lisääntyminen käyttäen tässä kuvattuja menetelmiä. Esimerkiksi voitaisiin käyttää osmoottista infuusiopumppua kasvutekijöiden vapauttamiseksi keskuskanavaan useita päiviä ennen retrovirusinfektion toteuttamista. Tämä varmistaa, että on aktiivisesti jakautuvia neuraalisia kantasoluja, jotka ovat herkkiä retrovirusinfektiolle.

Kun geneettinen muuntaminen tapahtuu biologisesti aktiivisen aineen tuottamiseksi, tällainen aine on yleensä aine, joka on käyttökelpoinen tietyn keskushermoston sairauden hoitamiseksi. Esimerkiksi voi olla toivottavaa muuntaa solut geneettisesti siten, että ne erittävät tiettyä kasvutekijätuotetta. Kasvutekijätuotteisiin, jotka ovat käyttökelpoisia keskushermoston sairauksien hoitamiseksi, sisältyvät, rajoittumatta niihin, hermokasvutekijä (NGF), aivoperäinen neurotroofinen tekijä (BDNF), neurotrofiinit (NT-3, NT-4/NT-5), siliaarinen neurotroofinen tekijä (CNTF) ja muut sytokiinit, amfireguliini, bFGF, aFGF, EGF, TGFα, TGFß, PDGF, IGF:t ja muut interleukiinit.

Soluja voidaan myös muuntaa in vivo tietyn kasvutekijäreseptorin (r) ilmentämiseksi, mukaan luettuna, rajoittamutta kuitenkaan niihin, p75 matalan affiniteetin NGFr, CNTFr, neurotrofiinireseptoreiden trk-perhe (trkA, trkB, trkC), EGFr, FGFr ja amfireguliinireseptorit.

Soluja voidaan muokata geneettisesti tuottamaan erilaisia hermoston välittäjäaineita tai niiden reseptoreita, kuten serotoniinia, L-dopaa, dopamiinia, noradrenaliinia, adrenaliinia, takykiniiniä, substanssi P:tä, endorfiinia, enkefaliinia, histamiinia, N-metyyli-D-aspartaattia (NMDA), glysiiniä, glutamaattia, γ-aminovoihappoa (GABA), asetyylikoliinia ja vastaavia. Käyttökelpoisiin hermoston välittäjäaineita syntetisoiviin geeneihin sisältyvät TH, dopadekarboksylaasi (DDC), DBH, PNMT, glutamiinihappodekarboksylaasi (GAD), tryptofaanihydroksylaasi, ChAT ja histidiinidekarboksylaasi. Geeneihin, jotka koodittavat erilaisia neuropeptidejä, jotka voivat osoittautua käyttökelpoisiksi keskushermoston sairauksien hoidossa, sisältyvät substanssi P, neuropeptidi-Y (NP-Y), enkefaliini, vasopressiini, vasoaktiivinen intestinaalinen peptidi (VIP), glukagoni, bombesiini, kolekystokiniini (CCK), somatostatiini, kalsinotiinigeeniin liittyvä peptidi (CGRP) ja vastaavat.

Parannukset in vitro -tekniikassa keskushermoston kantasolujen lisäämiseksi

Nisäkkään keskushermostosta in vitro eristettyjen prekursorisolujen lukumäärän absoluuttista saantoa voidaan lisätä ratkaisevasti ruiskuttamalla kasvutekijää tai kasvutekijöiden yhdistelmää, esimerkiksi EGF:ää, FGF:ää tai EGF:ää ja FGF:ää yhdessä, aivokammioihin in situ, kuten edellä on kuvattu. Kuten esimerkissä 10 jäljempänä on kuvattu yksityiskohtaisesti, 6 päivän kuluttua EGF:n infuusiosta hiiren etuaivojen sivukammioon kammion seinät poistettiin ja kantasolut otettiin talteen. EGF:n infuusio sivukammioon lisäsi sellaisten kantasolujen saannon tehokkuutta, jotka lisääntyivät muodostaen neuropalloja.

Tämä tekninen in vitro -teknologian parannus keskushermoston kantasolujen lisäämiseksi osoittautuisi verrattoman arvokkaaksi, jos kantasolut olisi tarkoitus ottaa talteen siirrettäväksi myöhemmin takaisin potilaaseen, jolloin ensimmäinen leikkaus tehdään 1) vähemmän traumaattiseksi, koska täytyisi poistaa vähemmän kudosta ja 2) tehokkaammaksi, koska suurempi kantasolujen saanto leikkausta kohden lisääntyisi in vitro. Lisäksi potilaan kantasolut, kun ne ovat lisääntyneet in vitro, voitaisiin myös muuntaa geneettisesti in vitro käyttäen tekniikkaa, joka on kuvattu PCT-patenttihakemuksssa WO94/16718. Geneettinen muuntaminen in vitro voi olla toivottavampaa tietyissä olosuhteissa kuin in situ -tekniikka, kun edellytetään enemmän kontrollia geneettisellä materiaalilla tapahtuvan infektion suhteen.

Seuraavat esimerkit esitetään, jotta tässä kuvattu keksintö voidaan ymmärtää täydellisemmin. Pitäisi ymmärtää, että nämä esimerkit ovat vain kuvaavia tarkoituksia varten eikä niitä pidä tulkita keksinnön piiriä rajoittaviksi millään tavoin.

Esimerkit

Esimerkki 1

Replikaatioon kykenemätön retrovirus, joka sisälsi ß-galaktosidaasigeenin [kuten on kuvattu lähteessä Walsh ja Cepko, Science 241 : 1342 (1988)] ruiskutettiin täysikasvuisten urospuolisten CD1-rottien (25 - 30 g, yhtiöltä Charles River) etuaivojen sivukammiohin. Ruiskutettu retrovirus oli otettu talteen BAG-solulinjasta (ATCC CRL-9560) Walshin ja Cepkon (edellä) menetelmän mukaisesti. Hiiret nukutettiin käyttäen natriumpentobarbitaalia, annos 65 mg/kg vatsaontelonsisäisesti. Unilateraaliset stereotaktiset ruiskeet, joissa oli 0,2 - 1,0 µl retrovirusta, ruiskutettiin sivukammioon käyttäen 1 µl:n Hamilton-ruiskua. Ruiskeen koordinaatit olivat AP +4,2 mm ennen lambdaa, L ± 0,7 mm ja DV -2,3 mm kovakalvon alapuolella, suutanko (mouth bar) -2 mm interauraalisen linjan alapuolella.

Yhden päivän tai kuuden päivän kuluttua retrovirus-

ruiskeesta infuusiokanyylit, jotka oli kiinnitetty osmoottisiin ALZET-minipummpuihin, joista ainetta vapautui nopeudella 0,5 µl/h ja jotka oli täytetty 3,3 - 330 µg:lla/ml EGF:ää, implantoitiin kirurgisesti sivukammioihin edellä mainittuihin identtisiin stereotaktisiin koordinaatteihin. Infuusiokanyylipakkaukset oli saatu ALZA-yhtiöltä. Infuusiokanyylit leikattiin 2,7 mm:iin jalustan alapuolelta. Pumput kiinnitettiin hiiren kalloon käyttämällä akryylikittiä ja kalloruuvia kontralateraalisesti ja kaudaalisesti injektiopaikan suhteen. Osmoottinen minipumppu sijaitsi ihon alla vasemman etukäpälän kainalokuopan alla ja takana ja se oli kiinnitetty infuusiokanyyliin polyeteeniputken avulla.

Kuuden päivän kuluttua EGF-infuusion aloittamisen jälkeen eläimet lopetettiin antamalla niille yliannos natriumpentobarbitaalia. Hiirten sydämen läpi valutettiin 2-%:ista puskuroitua paraformaldehydiä ja aivot leikattiin irti ja niitä kiinnitettiin jälkikäteen yön yli 20-%:isella sakkaroosilla 2-%:isessa puskuroidussa paraformaldehydissä. Preparoitiin koronaaliset viipaleet -20 °C:eisella kryostaatilla 30 µm:n paksuuteen. Viipaleet kehitettiin ß-gal-histokemiaa varten Morsheadin ja Van der Kooyn menetelmän mukaan (edellä).

Näissä olosuhteissa riippumatta päivästä retrovirusruiskeen jälkeen EGF:n infuusio johti ß-gal-leimattujen solujen populaation lisääntymiseen keskimäärin noin 20 solusta/aivot keskimäärin 150 soluun/aivot ja näiden solujen vaeltamiseen pois sivukammioiden vuorauksesta (katso kuva 4). Emäksisen fibroblastikasvutekijän (bFGF) infuusio, 33 µg/ml, johti ß-gal-leimattujen solujen lukumäärän lisääntymiseen, mutta tähän lisäykseen ei liittynyt mitään ylimääräistä vaeltelua. EGF:n ja FGF:n infuusio yhdessä johti jopa suurempaan ß-gal-leimattujen solujen populaation lisääntymiseen 20 solusta/aivot keskimäärin 350 soluun/aivot.

Nämä tulokset osoittavat, että FGF voi olla eloonjäämistekijä suhteellisesti lepotiassa oleville kan-

tasoluille subependyymikerroksessa, kun taas EGF voi toimia eloonjäämistekijänä konstitutiivisesti lisääntyvän populaation normaalisti kuoleville jälkeläisille. ß-galaktosidaasilla leimattujen solujen lukumäärän synergistinen lisäys, kun EGF:ää ja FGF:ää annettiin yhdessä infuusiona, heijastaa lisäksi suoraa yhteyttä suhteellisesti lepotilassa olevan kantasolun ja konstitutiivisesti lisääntyvän esisolun välillä.

Esimerkki 2

Naaraspuolisten, patogeenivapaiden CD1-albinohiirten [ikä 3 - 18 kk; Charles River (CF1 ja CF2-kannat tuottivat samanlaisia tuloksia)] aivojuoviot, mukaan luettuna subependymaalinen alue, irrotettiin ja leikattiin käsin saksilla 1 mm:n koronaalisiksi leikkeiksi ja siirrettiin keinotekoiseen aivo-selkäydinnesteeseen (aCSF), jonka sisälsi 124 mM NaCl:a, 5 mM CKl:a, 1,3 mM $MgCl_2$:a, 2 mM $CaCl_2$:a, 26 mM $NaHCO_3$:a ja 10 mM D-glukoosia (pH 7,35; suunnilleen 180 mOsmol) ja jota ilmastettiin 95 %:lla O_2:a - 5 %:lla CO_2:a huoneenlämpötilassa. Sitten 15 minuutin kuluttua kudosleikkeet siirrettiin pyörivään pulloon (Bellco Glass), jossa oli magneettisekoitin ja joka oli täytetty pienen Ca^{2+}-konsentraation omaavalla aCSF:llä, joka sisälsi 124 mM NaCl:a, 5 mM KCl:a, 3,2 mM $MgCl_2$:a, 0,1 mM $CaCl_2$:a, 26 mM $NaHCO_3$:a ja 10 mM D-glukoosia (pH 7,35; suunnilleen 180 mOsmol) ja jota ilmastettiin 95 %:lla O_2:a - 5 %:lla CO_2:a 32 - 35 °C:n lämpötilassa ja joka sisälsi edelleen 1,33 mg/ml trypsiiniä (9 000 BAEE-yksikköä/mg), 0,67 mg/ml hyaluronidaasia (2 000 yksikköä/mg) ja 0,2 mg kynureenihappoa. Sitten 90 minuutin kuluttua kudosleikkeet siirrettiin normaaliin aCSF-nesteeseen 5 minuutin ajaksi ennen triturointia. Kudos siirrettiin DMEM/F-12-elatusaineeseen (A:1, Gibco), joka sisälsi 0,7 mg/ml ovomukoidia (Sigma), ja seos trituroitiin mekaanisesti tulen avulla kavennetun pasteur-pipetin avulla. Solut saatettiin viljelylevyille (1 000 elävää solua/levy) päällystämättömiin 35 mm:n viljelymaljoihin (Costar), jotka sisälsivät seerumivapaata elatusainetta [tämä sisälsi täysin

keinotekoisen hormoni- ja suolaseoksen, joka sisältää insuliinia (25 µg/ml), transferriiniä (100 µg/ml), progesteronia (20 nM), putreskiinia (60 µM) ja seleenikloridia (30 nM), glukoosia (0,6 %), glutamiinia (2 mM), natriumbikarbonaattia (3 mM) ja HEPES-puskuria (5mM)] ja EGF:ää [20 ng/ml, puhdistettu hiiren yläleuan alaisesta rauhasesta (Collaborative Research)] tai ihmisen rekombinanttia (Gibco/BRL). Solujen annettiin laskeutua 3 - 10 minuutin ajan, minkä jälkeen elatusaine imettiin pois ja lisättiin tuoretta DMEM/F-12/hormoniseos/EGF-seosta. Sitten 5 - 10 päivän kuluttua in vitro pallojen (neuropallojen) lukumäärä laskettiin kultakin 35 mm:n maljalta.

Esimerkki 3

Retrovirusrakennelma, joka sisälsi ihmisen bcl-2-geenin ja ß-galaktosidaasigeenin, mikroruiskutettiin täysikasvuisen hiiren aivojen sivukammioon. Kontrollihiireen ruiskutettiin retrovirusrakennelma, joka sisälsi vain ß-galaktosidaasigeenin. Aikuisen aivojen sivukammion kaikkien konstitutiivisesti lisääntyvien subependymaalisten solujen kahdesta jälkeläisestä toinen kuolee normaalisti muutamassa tunnissa jakautumisen jälkeen. bcl-2-geenituote estää solujen ohjelmoidun kuoleman useissa muissa kudoksissa. Aikuisen subependyymissä yksittäisistä soluista, jotka on infektoitu sekä ß-galaktosidaasi-geenillä että bcl-2-geenillä, on merkkinä näiden molempien geenituotteiden ilmentyminen. Nämä solut identifioidaan aivokudosviipaleista vasta-aineilla, jotka ovat spesifisiä ß-galaktosidaasin ja ihmisen Bcl-2:n suhteen. Näin infektoidut lisääntyvät, infektoidut subependymaaliset solut tuottavat suurempia määriä soluja/klooni suhteessa kontrolliin. Siten Bcl-2 indusoi konstitutiivisesti lisääntyvän, täysin kehittyneen subependymaalisen solun jokaisen jakautumisen normaalisti kuolevien jälkeläisten eloonjäämisen. Lisäksi bcl-2:lla infektoidut jälkeläiset vaeltavat aivojuovio- ja väliseinäkudokseen uusien hermosolujen ja hermotukisolujen tuottamiseksi. Tämä osoittaa, että EGF ja Bcl-2 toimivat

eloonjäämistekijöinä konstitutiivisesti lisääntyvien, täysin kehittyneiden subependymaalisten solujen normaalisti kuoleville jälkeläisille, jotka tuottavat uusia hermosoluja ja hermotukikudosta in vivo.

Esimerkki 4

Retrovirusrakennelma, joka sisältää hermokasvutekijägeenin, mikroruiskutetaan (kuten rakennelma esimerkissä 1) aivojen sivukammion konstitutiivisesti lisääntyvien, täysin kehittyneiden subependymaalisten solujen infektoimiseksi. Siten näitä soluja käytetään endogeenisen kasvutekijän tuottamiseksi täysin kehittyneissä aivoissa. Transfektoitujen solujen tuottaman hermokasvutekijän pitoisuudet mitataan suoraan radioimmunomäärityksen avulla ja (suorasta funtionaalisesta määrityksestä) pelastamlla basaalisten etuaivojen kolinergiset hermosolut in vivo aksotomiavamman jälkeen käyttämällä mallia, jonka on kehittänyt Gage yhteistyökumppaneineen [P.N.A.S., 83 : 9231 (1986)].

Esimerkki 5

Täysikasvuiset, urospuoliset CD1-hiiret saivat sarjan vatsaontelonsisäisiä 3H-tymidiiniruiskeita (0,8 ml/ruiske, spesifinen aktiivisuus 45 - 55 mCi/mmol, ICN Biomedical) päivänä 0 (3 ruisketta, 1 joka 4. tunti) konstitutiivisesti lisääntyvien subependymaalisten solujen tappamiseksi. Päivänä 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 tai 12 eläimet saivat 2 BrdU-ruisketta 1 tunnin välein (katso esimerkki 9) ja ne lopetettiin 0,5 tunnin kuluttua viimeisestä ruiskeesta.

Havaittiin, että 10 % soluista lisääntyi päivänä 1 tappokäsittelyn jälkeen ja 8 päivän aikana lisääntyvien solujen määrä oli saavuttanut arvon 85 % (katso kuva 6a), joka ei poikennut tilastollisesti merkitsevästi kontrolliarvoista. Eläimet lopetettiin ja aivot poistettiin ja käsiteltiin, kuten esimerkissä 9 on kuvattu.

Toisessa eläinten ryhmässä 3H-tymidiiniruiskeet annettiin päivänä 0 (3 ruisketta, 1 joka 4. tunti) ja sen jälkeen samanlainen ruiskesarja päivänä 2 tai 4. Eläinten annettiin

elää 8 päivää toisen ruiskesarjan jälkeen (päivinä 9, 10 ja 12 vastaavasti), jolloin ne saivat 2 ruisketta BrdU:ta ja ne lopetettiin 0,5 tuntia myöhemmin. Eläimet lopetettiin ja aivot poistettiin ja käsiteltiin, kuten esimerkissä 9 on kuvattu.

Toisen ruiskesarjan jälkeen päivänä 2 vain 45 % lisääntyvästä populaatiosta oli palautunut suhteessa kontrolliarvoihin. Tämä osoittaa, että toinen ruiskesarja, joka oli annettu päivänä 2, oli tappanut kantasoluja, kun ne olivat elpyneet lisääntyvään malliin (katso kuva 6b). Toinen ruiskesarja, joka annettiin päivänä 4, tuotti tulokseksi kontrolliarvoihin palautumisen päivään 8 mennessä viitaten siihen, että tähän aikamäärään mennessä kantasolut eivät enää lisääntyneet eikä siten päivänä 4 annettu ruiskesarja ollut tappanut niitä (kuva 6b).

Esimerkki 6

Täysikasvuiset, urospuoliset CD1-hiiret jaettiin 4 ryhmään. Ryhmä A sai sarjan 3H-tymidiiniruiskeita päivänä 0 (3 ruisketta, 1 joka 4. tunti). Ryhmien B ja C eläimet saivat sarjan 3H-tymidiiniruiskeita päivänä 0 ja sen jälkeen toisen sarjan ruiskeita päivänä 2 tai 4. Ryhmän D eläimet saivat fusiologisen suolaliuoksen ruiskeet 3H-tymidiinin sijasta saman ajan kuluessa kuin ryhmä A. Kaikkien ryhmien eläimet lopetettiin nyrjäyttämällä niska sijoiltaan 16 - 20 tunnin kuluttua viimeisestä ruiskesarjasta. Aivot poistettiin ja sivukammioita ympäröivä subependyymi etuaivoista leikeltiin ja sitä viljeltiin, kuten on kuvattu esimerkissä 2, kunkin ruiske-esimerkin jälkeen muodostuneiden pallojen lukumäärän määrittämiseksi. Aivoista saadut solut saatettiin viljelyyn levyille kahteen 35 mm:n kuoppaan. Sitten 6. ja 8. päivänä in vitro pallojen kokonaismäärä laskettiin kummastakin 35 mm:n kuopasta (katso kuva 3).

Kontrollieläimet, jotka saivat sarjan suoliuosruiskeita, muodostivat saman määrän palloja kuin eläimet, jotka olivat saaneet 3H-tymidiinia päivänä 0 (tappaa normaalisti lisääntyvät subependymaaliset solut). Tämä osoittaa, että

konstitutiivisesti lisääntyvät subependymaaliset solut eivät ole in vitro eristettyjen kantasolujen lähde. Eläimet, jotka saivat toisen ruiskeiden sarjan päivänä 2, muodostivat 45 % pallojen määrästä (sama määrä kuin in vivo havaittujen lisääntyvien subependymaalisten solujen määrä). Kun toinen ruiskeiden sarja annettiin päivänä 4, in vitro -muodostuneiden pallojen lukumäärä ei poikennut merkitsesvästi kontrolliarvoista korreloiden jälkeen in vivo -havaintojen kanssa. Yhteensä nämä tiedot osoittavat, että multipotentit pallot, jotka eristetään in vitro EGF:n läsnäollessa, muodostuvat suhteellisesti levossa olevasta kantasolupopulaatiosta subependyymissä in vivo.

Esimerkki 7

Retrovirusrakennelma, joka sisältää ß-galaktosidaasigeenin, mikroruiskutetaan (kuten esimerkissä 1) väliaivojen III kammioon, aivorungon IV kammioon ja selkäytimen keskuskanavaan. Sitten käytetään minipumppuja, jotka sisältävät EGF:ää ja FGF:ää, kasvutekijöiden antamiseksi jatkuvasti 6 päivän ajan (kuten esimerkissä 1) kammiojärjestelmän samaan osaan, johon retrovirusrakennelma on annettu. Tämä tuottaa sellaisten ß-galaktosidaasia tuottavien solujen lukumäärän lisääntymisen, jotka jäävät eloon ja vaeltavat kudokseen, joka on lähellä III kammiota, IV kammiota ja selkäytimen keskuskanavaa, muodostaen uusia hermosoluja ja hermotukisoluja.

Esimerkki 8

Retrovirusrakennelma, joka sisältää tyrosiinihydroksylaasigeenin (TH-geenin) sekä ß-galaktosidaasigeenin, mikroruiskutetaan aikuisen aivojen sivukammioon, kuten esimerkissä 1. Käytetään minipumppuja, jotka sisältävät EGF:ää, FGF:ää tai EGF:ää ja FGF:ää yhdessä, kasvutekijän (kasvutekijöiden) antamiseksi jatkuvasti sivukammioon 6 päivän ajan, kuten esimerkissä 1. Kun infektoidut subependymaaliset solut vaeltavat aivojuovioon, ne erilaistuvat hermosoluiksi, jotka tuottavat dopamiinia, mikä on mitattu suoraan immunofluoresenssin avulla käyttäen vasta-ainetta ja (suorasta

funktionaalisesta määrityksestä) ja määrittämällä kyky välttää pyörivät taivutukset (rotational bias), jotka ovat unilateraalisten 6-hydroksidopamiinivaurioiden aiheuttamia.

Esimerkki 9

Täysikasvuisille, urospuolisille CD1-hiirille (25 - 30 g, Charles River) annettiin ruiskeena vatsaontelonsisäisesti (i.p.) bromideoksiuridiinia (BrdU, Sigma, 65 mg/kg) joka 2. tunti, yhteensä 5 ruisketta, kaikkien konstitutiivisesti lisääntyvien solujen leimaamiseksi sivukammioita verhoavassa subependyymissä etuaivoissa. Kuukautta myöhemmin eläimet lopetettiin antamalla niille yliannos natriumpentobarbitaalia ja niiden sydämen läpi valutettiin 4-%:ista paraformaldehydiä. Aivot poistettiin ja niitä kiinnitettiin jälkikäteen yön yli 4-%:isella paraformaldehydillä 20-%:isessa sakkaroosissa. Aivoleikkeet leikattiin kryostaatilla (30 um) ja kerättiin pesupuskuriin [0,1 M fosfaatilla puskuroitu suolaliuos (PBS), pH-arvo 7,2, 1 % normaalia hevosen seerumia ja 0,3 % Triton X-100:aa]. Leikkeitä inkuboitiin 1 M HCl:ssa 60 °C:n lämpötilassa 0,5 tunnin ajan, sitten ne pestiin 3 kertaa (kulloinkin 10 min) pesupuskurissa. Viimeisen pesun jälkeen leikkeitä inkuboitiin anti-BrdU:ssa (Becton Dickinson, 1 : 25) 45 tunnin ajan 4 °C:n lämpötilassa. Inkuboinnin jälkeen primaarisessa vasta-aineessa leikkeet pestiin 3 kertaa ja niitä inkuboitiin yhden tunnin ajan sekundaarisessa, biotinyloidussa hevonen-anti-hiiri-vasta-aineessa (Dimension Lab, 1 : 50) huoneenlämpötilassa, sitten ne pestiin vielä 3 kertaa. Leikkeitä inkuboitiin sitten 1 tunnin ajan avidiinikonjugoidussa FITC:ssä (Dimension Lab, 1 : 50) huoneenlämpötilassa ja sitten ne pestiin 3 kertaa. Leikkeet asetettiin gelatiinilla päällystetyille objektilaseille, ilmakuivattiin ja peitettiin Fluoromount'lla. Objektilaseilta tutkittiin BrdU-positiiviset solut fluoresoivalla NIKON-mikroskoopilla. BrdU-positiivisten solujen lukumäärä laskettiin kammioita ympäröivästä subependyymistä 8 näytteestä leikkeistä, jotka olivat rostraalisesti aivokurkiaisen kiinnityskohdan ja

kaudaalisesti etummaisen kannaksen (anterior commissure) risteyksen välistä. Havaittiin, että 31 päivän kuluttua BrdU-ruiskeiden sarjasta 3 % subependymaalisista soluista oli yhä leimattuja verrattuna kontrollieläimiin, jotka oli lopetettu välittömästi ruiskesarjan jälkeen (kontrolli 100 %).

Esimerkki 10

EGF-pumput implantoitiin, kuten on kuvattu esimerkissä 1. Eläimet lopetettiin nyrjäyttämällä niska sijoiltaan 6 päivän kuluttua pumpun implantaatiosta. Aivot poistettiin ja kantasolut eristettiin ja laskettiin, kuten esimerkissä 2 on kuvattu.

Kuten kuvassa 5 on esitetty, eläimille annettiin infuusiona EGF:ää sivukammioihin 6 päivän ajan ennen niiden lopettamista ja aivoviljelmillä oli 4 kertaa enemmän palloja, jotka olivat muodostuneet 9 päivän kuluttua in vitro, kuin kontrollieläimillä, jotka olivat saaneet suolaliuospumput samaksi 6 päivän jaksoksi. Siten EGF:n infuusio sivukammioihin in vivo ennen prekursorisolujen poistamista lisää suuresti in vitro lisääntyvien ja neuropalloja muodostavien kantasolujen saantoa.

Esimerkki 11

Täysikasvuiset, urospuoliset CD_1-hiiret nukutetiin ja asetettiin stereotaksiseen laitteeseen. Kanyyli, joka oli kiinnitetty ALZET-minipumppuun, implantoitiin kunkin eläimen aivojen sivukammioon. Minipumput implantoitiin ihon alle ja niita käytettiin (a) jo käytetyn elatusaineen (rotan B49-hermotukisolulinjasta, saatu D. Schubertilta, Salk Institute) plus bFGF:n (R & D Systems, 25 µg/ml) plus heparaanisulfaatin (Sigma, 10 IU/ml) (CMF) vapauttamiseksi tai (b) EGF:n (Chiron, 25 µg/ml) plus bFGF:n (25 µg/ml) plus heparaanisulfaatin (10 IU/ml) plus nautasikiön seerumin (25 %) (E + F + FBS) vapauttamiseksi tai (c) steriilin suolaliuoksen (SAL) vapauttamiseksi kontrollina aivojen sivukammioihin. Yksi erä eläimistä lopetettiin ensimmäisenä päivänä, sen jälkeen kun vapautusjärjestelmä oli toteutettu, ja muut eläimet

lopetettiin 20 päivää myöhemmin. Näiden hiirten subventrikulaariset vyöhykkeet (SVZ) leikeltiin pois, erottaen kanyylilla varustettu ja siten käsitelty puoli kanyylittomista kontrollipuolesta. Näiden hiirten mustatumake (SN) otettiin myös talteen. Kaikki RNA uutettiin näistä kudoksista käyttäen guanidiumtiosyanaattihappofenolimenetelmää [Chomzynski ja Sacchi, Annal. Biochem., 162 : 156 - 159 (1987)]. Sitten RNA:sta tehtiin käänteistranskriptio cDNA:n tuottamiseksi. Nämä cDNA:t saatettiin polymeraasiketjureaktion (PCR) kohteeksi käyttäen alukkeita, jotka oli suunniteltu yhdistämään samaan ryhmään tyrosiinihydroksylaasin (TH) lähetti-RNA:n (mRNA:n) 254 nukleotidialue, ja termaalisia syklisointiolosuhteita, jotka suosivat kvantitatiivista amplifikaatiota. PCR-tuotteet saatettiin elektroforeesiin 2-%:iselle agaroosigeelille ja sitten ne imettiin kapillaarin avulla positiivisesti varatulle nylonmembraanille. Radioaktiivisesti leimattu cDNA-koetin TH:n suhteen hybridisoitiin suodattimeen ja havaittiin autoradiografian avulla. Autoradiografi skannattiin ja analysoitiin densitometrin avulla, jolloin saatiin TH:n mRNA:n suhteelliset pitoisuudet kanyylillä varustettujen puolten subventrikulaarisissa vyöhykkeissä vasteena käsittelyille kanyylittomissa subventrikulaarisissa kontrollivyöhykkeissä ja mustatumakkeessa. Tulokset esitetään kuvan 7 pylväsdiagrammissa. Eläimillä, jotka analysoitiin päivän kuluttua käsittelystä, E+F+FBS:n antaminen tuotti 11-kertaisen lisäyksen TH-mRNA:n pitoisuudessa subventrikulaarisessa vyöhykkeessä verrattuna pitoisuuteen, joka havaittiin vasteena CMF:lle ja joka puolestaan oli yli kaksi kertaa suurempi kuin pitoisuus, joka saatiin suolaliuosta käytettäessä. Sitten 21 päivän kuluttua käsittelystä TH-mRNA:n määrä, joka havaittiin vasteena E+F+FBS-käsittelylle, oli suunnilleen sama kuin ensimmäisen päivän jälkeen havaittu, kun taas CMF:llä ja suolaliuoksella käsitellyillä subventrikulaarisilla vyöhykkeillä (SVZ) oli TH-mRNA:n pitoisuudet, jotka olivat havaittavan rajan alapuolella eikä niitä voitu erottaa

kanyylittomista SVZ-kontrolleista. Kaikissa käsittelyissä mustatumakkeella (SN) oli mitattavat määrät TH-mRNA:ta.

Esimerkki 12

Urospuolisille CD_1-hiirille (Charles River, ikä noin 4 - 6 viikkoa) annettiin vatsaontelonsisäiset BrdU-ruiskeet (Sigma, 120 mg/kg) 2 tunnin välein 24 tunnin ajan mitoottisesti aktiivisten solujen leimaamiseksi. Kanyyli, joka oli kiinnitetty ALZET-minipumppuun, implantoitiin sitten unilateraalisesti kunkin eläimen aivojen sivukammioon koostumusten a - c (CMF, E+F+FBS tai steriili suolaliuos) vapauttamiseksi, jotka on kuvattu esimerkissä 11.

Eläimet lopetettiin 24 tunnin kuluttua kasvutekijöiden antamisesta käyttäen tappavaa annosta pentobarbitaali-nukutusainetta. Eläinten sydänten läpi valutettiin sitten 10 ml jääkylmää 4-%:ista paraformaldehydiliuosta. Aivot poistettiin ja kudos alueelta, joka ulottuu hajuradan etuosan pullistumasta kolmanteen kammioon, mukaan luettuna aivojuovio, leikeltiin ja varastoitiin yöksi 4 °C:n lämpötilaan 30-%:isen sakkaroosin/4-%:isen paraformaldehydin liuokseen. Kudos pakastettiin sitten kuivan jään päällä ja sitä pidettiin -70 °C:n lämpötilassa, kunnes se käsiteltiin. Leikattiin 30 µm:n koronaaliset leikkeet käyttäen kryostaattia ja leikkeet pantiin 12 kuoppaisiin porsliinimaljoihin, joihin oli lisätty 400 µl PBS-liuosta. Leikkeet huuhdottiin tuoreella PBS-liuoksella ja niitä inkuboitiin yön yli seuraavien primaaristen vasta-aineiden kanssa: anti-TH (kaniinin polyklonaalinen, 1 : 1 000, Eugene Tech International Inc., tai 1 : 100, Pel-freeze) ja hiiren anti-BrdU (1 : 55, Amersham), valmistettuna liuokseen, jossa oli PBS-liuosta/10 % normaalia vuohen seerumia/0,3 Triton x-100:aa. Kolmen huuhtelun jälkeen PBS-liuoksessa vuohen anti-kaniini-rodamiinia ja vuohen anti-hiiri-fluoreseiinia (Jackson) käytettiin PBS-liuoksessa 50 minuutin ajan huoneenlämpötilassa. Leikkeet pestiin sitten kolme kertaa (kulloinkin 10 min) PBS-liuoksessa, pantiin

lasisille objektilaseille, kuivattiin ja peitettiin sitten Fluorsave'lla (Calbiochem # 345789).

Dopaminergisten hermosolujen sijanti määritettiin kartoittamalla TH-immunoreaktiivisten solujen (TH+-solujen) tai TH+- ja BrdU+-solujen sijainti suhteessa aivokammioihin. Vasteena sivukammiohin annetuille suolaliuosruiskeille TH+-säikeiden normaali populaatio havaittiin aivojuoviosta, mutta TH+-perikarioneja ei havaittu tältä alueelta. CMF-käsittely tuotti tulokseksi TH+-polykarionien havaitsemisen TH+-säikeiden normaalin populaation lisäksi aivojuoviosta ja kolmannen kammion alueelta. E+F+FBS-käsittelyllä on syvällisin vaikutus tuottaen tulokseksi useimpien TH+-perikarionien havaitsemisen. Useat TH+-perikarioneista olivat myös BrdU-positiivisia.

Esimerkki 13

Käytetään Parkinsonin taudin 6-hydroksidopamiini- (6-OHDA) -vauriomallia rotalla aivojen sivukammioon annettujen kasvutekijöiden erilaisten yhdistelmien vaikutusten mittaamiseksi. Unilateraaliset 6-OHDA-vauriot toteutetaan rottamallissa ja pyörimiskäyttäytymisestä tehdään havainnot. Minipumput implantoidaan ihon alle eläimille, kuten on kuvattu esimerkissä 11. EGF:ää (Chiron, 25 µg/ml) plus bFGF:ää (25 µg/ml) plus heparaanisulfaattia (10 IU/ml) plus 25 % nautasikiön seerumia saatetaan jatkuvasti sivukammioon. Kontrollieläimille annetaan suolaliuosta. Tehdään havainnot kyvystä voittaa unilateraalisten 6-OHDA-vaurioiden tuottamat pyörimisliikkeet.

Esimerkki 14

Täysikasvuiset, urospuoliset CD_1-albinohiiret (30 - 35 g), saatu Charles River -yhtiöltä, nukutettiin natriumpentobarbitaalilla (0,40 ml 10-%:ista liuosta) ja pantiin stereotaksiseen laitteeseen. Kallon dorsaalinen puoli paljastettiin pitkänomaisella viillolla. Kanyylit työnnettiin neljänteen aivokammioon (stereotaksiset koordinaatit A/P -7,0, L ± 0,3 D/V -5,8), aivo-selkäydinnesteviemäriin (A/P -4,8 L ± D/V -2,6)

tai keskuskanavaan (D/V -1,5). Kanyylit kiinnitettiin steriilillä putkella ihon alle sijoitettuihin osmoottisiin ALZET-minipumppuihin, jotka sisälsivät 25 µg/ml EGF:ää (Becton 40001) ja/tai 25 µg/ml bFGF:ää (R&D Systems 233-FB). Pumppuja, jotka sisälsivät steriiliä suolaliuosta plus 0,1 % hiiren albumiinia (Sigma A3134), käytettiin kontrolleina. Viillot suljettiin hammaskitillä.

Kuuden päivän kuluttua leikkauksesta hiiret saivat ruiskeina 0,15 ml BrdU:ta (Sigma B5002); 18 mg/ml 0,007-%:isessa NaOH:ssa/0,1 M PBS-liuoksessa, joka 2. tunti 8 tunnin ajan. Ne lopetettiin 0,5 tunnin kuluttua viimeisestä ruiskeesta nukutusaineen yliannoksella ja niihin valutettiin sydämen läpi 10 ml jääkylmää steriiliä suolaliuosta ja sen jälkeen 10 ml jääkylmää Bouin'in kiinnitysainetta (5 % jääetikkaa, 9 % formaldehydiä, 70 % pikriinihappoa). Kaulan selkäydinalue leikeltiin ja sitä kiinnitettiin jälkikäteen yön yli 4 °C:n lämpötilassa Bouin'in jälkikiinnitysliuoksessa (9 % formaldehydiä, 70 % pikriinihappoa). Seuraavana päivänä kudos kylmäsuojattiin upottamalla se 10-%:iseen sakkaroosiliuokseen 2 tunnin ajaksi, 20-%:iseen sakkaroosiliuokseen 2 tunnin ajaksi ja 30-%:iseen sakkaroosiliuokseen yöksi. Kudos jäädytettiin jauhetussa kuivassa jäässä, se pantiin Tissue-Tek-laitteeseen (Miles 4583) -18 °C:n lämpötilaan ja 30 µm:n sarja nuolimaisia leikkeitä pantiin geelillä pohjustetuille lasisille objektilaseille. Kukin objektilasi sisälsi myös yhden tai useampia 30 µm:n koronaalisia leikkeitä saman eläimen aivojen sivukammioista positiivisina kontrolleina. Objektilaseja pidettiin -80 °C:n lämpötilassa, kunnes ne käsiteltiin. Immunohistokemia: Objektilaseja huuhdottiin PBS-liuoksessa 3 x 15 minuutin ajan 0,1 M PBS-liuoksessa huoneenlämpötilassa, niitä hydrolysoitiin käyttämällä 1 N HCl:a 60 minuutin ajan 37 °C:n lämpötilassa, niitä huuhdottiin 3 x 15 minuutin ajan 0,1 M PBS-liuoksessa huoneenlämpötilassa, ne pantiin 6-:%iseen H_2O_2:iin metanolissa 30 minuutin ajaksi huoneenlämpötilassa, niitä huuhdottiin 3 x 15 minuutin ajan 0,1 M PBS-liuoksessa

huoneenlämpötilassa, ja niitä inkuboitiin 10-%:isessa normaalissa hevosen seerumissa (Sigma H-0146) 0,1 M PBS-liuoksessa tai 20 minuutin ajan huoneelämpötilassa. Objektilaseja inkuboitiin yön yli huoneenlämpötilassa monoklonaalisessa anti-BrdU-vasta-aineessa (Becton 7580), joka oli laimennettu suhteessa 1 : 50 0,1 M PBS-liuoksella, joka sisälsi 1,5 % normaalia hevosen seerumia ja 0,3 % Tritonia. Seuraavana päivänä objektilaseja huuhdottiin PBS-liuoksessa 3 x 10 minuutin ajan 0,1 M PBS-liuoksessa huoneenlämpötilassa, niitä inkuboitiin hevosen biotinyloidun anti-hiiri-IgG:n kanssa (Vector BA-2000) 2 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, niitä huuhdottiin 2 x 15 minuutin ajan 0,1 M PBS-liuoksessa huoneenlämpötilassa, niitä inkuboitiin ABC-reagenssissa (Vector PK-6100) 2 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, niitä huuhdottiin 3 x 15 minuutin ajan 0,1 M PBS-liuoksessa huoneenlämpötilassa ja niitä kehitettiin DAB-reagenssilla 2 - 4 minuutin ajan. Objektilasit peitettiin Aqua Polymount'lla (Polysciences 18606). BrdU-positiivisten solujen lukumäärä laskettiin kaulan selkäydinosaa kohden. Joitakin Brdu-leimattuja soluja havaittiin suolaliuoskontrollileikkeissä. Käsittely joko EGF:llä tai bFGF:llä tuotti tulokseksi BrdU:lla leimattujen solujen lukumäärän merkittävän lisääntymisen verrattuna kontrolliin. EGF:n ja bFGF:n yhdistelmä tuotti jopa suuremman määrän BrdU-positiivisia soluja leikettä kohden.

Esimerkki 15

EGF:ää ja FGF:ää annetaan infuusiona aivojen sivukammioihin (katso esimerkki 1) (tai muille keskushermoston kammioalueille, jotka sisältävät levossa olevia kantasoluja). Sitten keskushermoston kantasolut eristetään ja niiden annetaan lisääntyä in vitro käyttäen proliferaatiomenetelmiä, jollaiset on kuvattu esimerkissä 2. Tämä menetelmä tuottaa muodostuneiden kantasolujen lukumäärän lisääntymisen ja neuropallojen määrän lisääntymisen (katso kuva 5). Tällä menetelmällä tuotettuja neuropalloja käytetään luovuttajasolujen lähteenä myöhemmin siirrettäväksi ihmisen täysin kehittyneen keskushermoston

rappeutuneille alueille. Neuropalloja voidaan myös lisätä potilaan oman keskushermoston kantasoluista ja siirtää takaisin potilaaseen.

Kaikki tässä lainatut viitteet sisällytetään tähän viittauksena.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä neuraalisten prekursorisolujen lisäämiseksi *in vitro*, t u n n e t t u siitä, että siinä viljellään prekursorisolua elatusaineessa, jossa on vähintään yhtä kasvutekijää multipotentin neuraalisen kantasolun lisääntymisen indusoimiseksi, joka prekursorisolu on otettu keskushermoston kammion seinämää rajoittavasta kudoksesta ja saatu aikaan lisäämällä fibroblastien kasvutekijää ja epidermaalista kasvutekijää mainittuun elävän nisäkkään keskushermoston kammioon, irrottamalla mainittu solukudos mainitusta nisäkkäästä ja hajottamalla mainittu solukudos mainitun prekursorisolun erottamiseksi mainitusta solukudoksesta.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu kammio on mainitun nisäkkään etuaivojen sivukammio.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu kammio on keskeinen neljäs aivokammio.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu fibroblastien kasvutekijä on hapan fibroblastien kasvutekijä (aFGF), emäksinen fibroblastien kasvutekijä (bFGF) tai kasvutekijöiden aFGF ja BGF yhdistelmä.

Patentkrav

1. Förfarande för att ha neurala prekursorceller att föröka sig *in vitro*, k ä n n e t e c k n a t av att därvid odlas en prekursorcell i ett näringsämne med minst en tillväxtfaktor for att få en multipotent neural stamcell att föröka sig, vilken prekursorcell har tagits ur en vävnad som bildar gräns för en kammare i det centrala nervsystemet och har åstadkommits genom att tillsätta en fibroblasttillväxtfraktor och en epidermal tillväxtfaktor i kammaren i nämnda levande däggdjurs centrala nervsystem, genom att lösgöra nämnda cellvävnad från nämnda däggdjur och genom att sönderdela nämnda cellvävnad för att skilja nämnda prekursorcell från nämnda cellvävnad.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att nämnda kammare är en sidokammare i nämnda däggdjurs främre hjärna.

3. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att nämnda kammare är den centrala fjärde hjärnkammaren.

4. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att nämnda fibroblasttillväxtfaktor är en sur fibroblasttillväxtfaktor (aFGF), en basisk fibroblasttillväxtfaktor (bFGF) eller en kombination av fibroblasttillväxtfaktorerna aFGF och BGF.

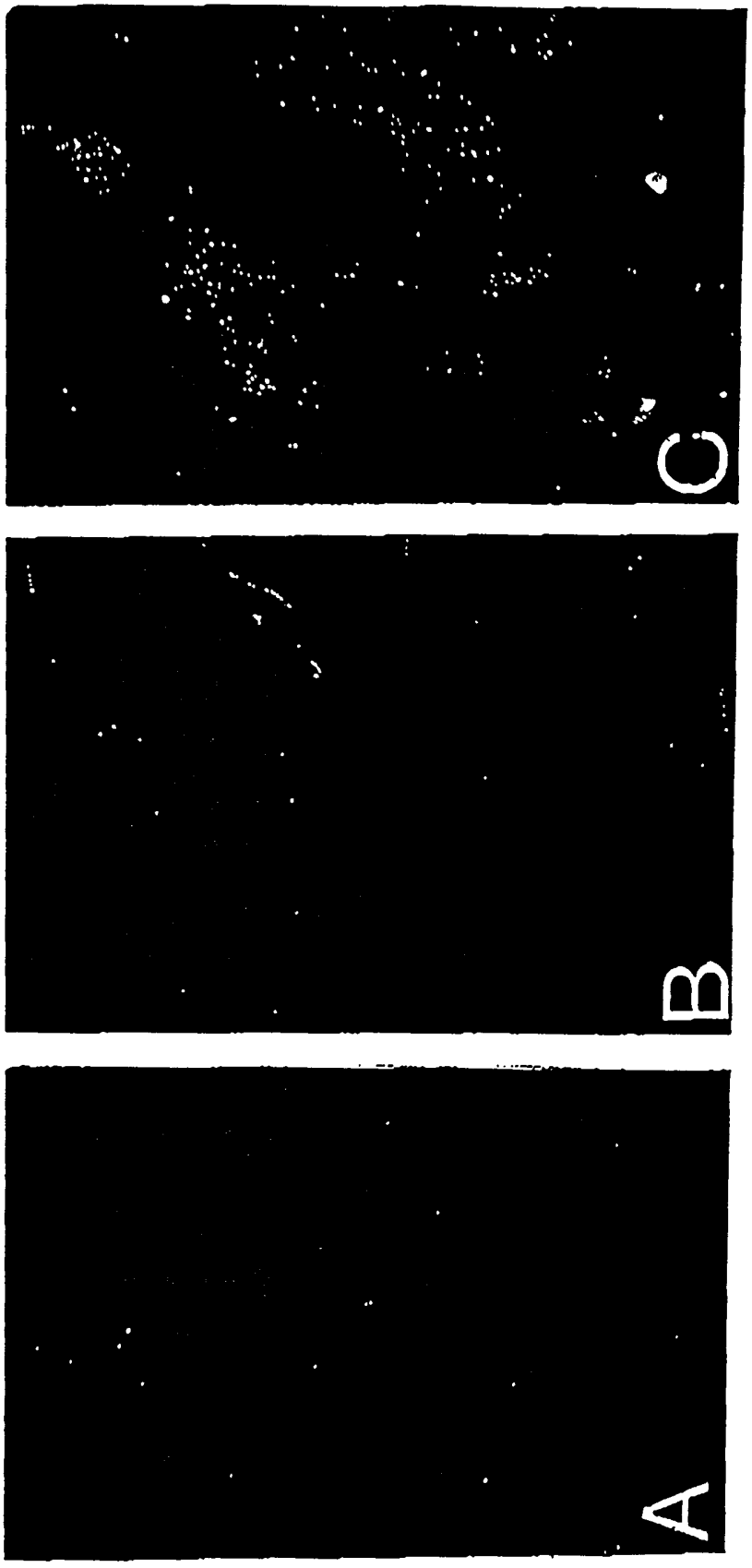


FIG._1A

FIG._1B

FIG._1C

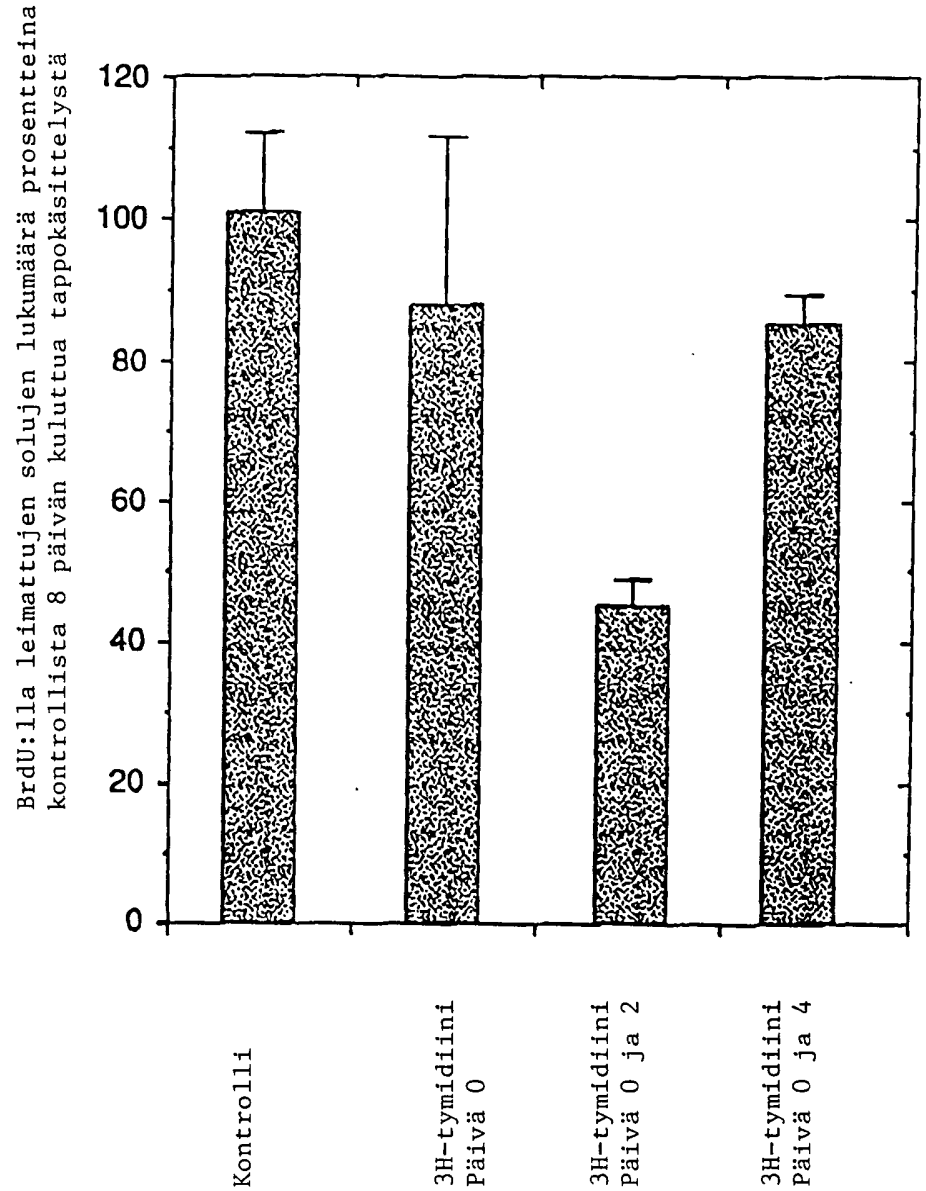

BrdU:lla leimattujen solujen lukumäärä prosentteina kontrollista 8 päivän kuluttua tappokäsittelystä
120
100
80
60
40
20
0
Kontrolli
3H-tymidiini Päivä 0
3H-tymidiini Päivä 0 ja 2
3H-tymidiini Päivä 0 ja 4

FIG._2

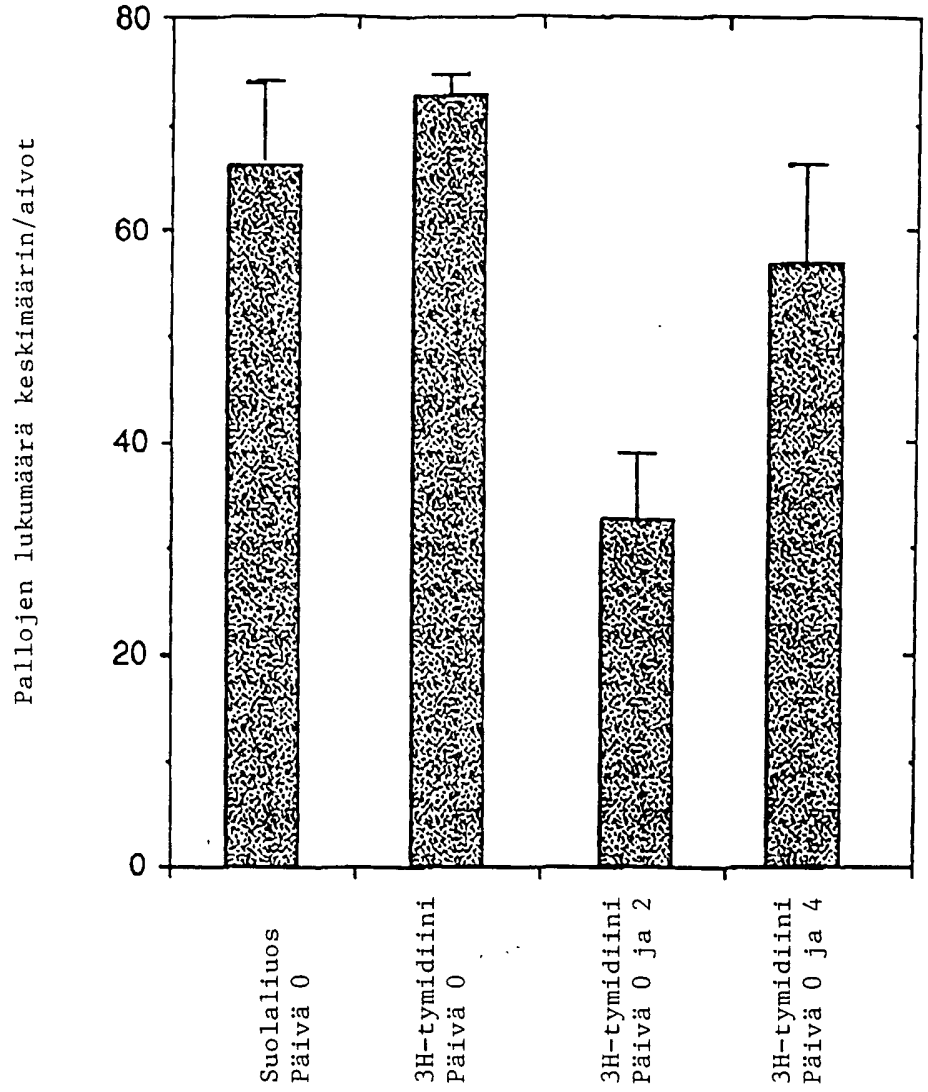

Pallojen lukumäärä keskimäärin/aivot
80
60
40
20
0
Suolaliuos Päivä 0
3H-tymidiini Päivä 0
3H-tymidiini Päivä 0 ja 2
3H-tymidiini Päivä 0 ja 4

FIG._3

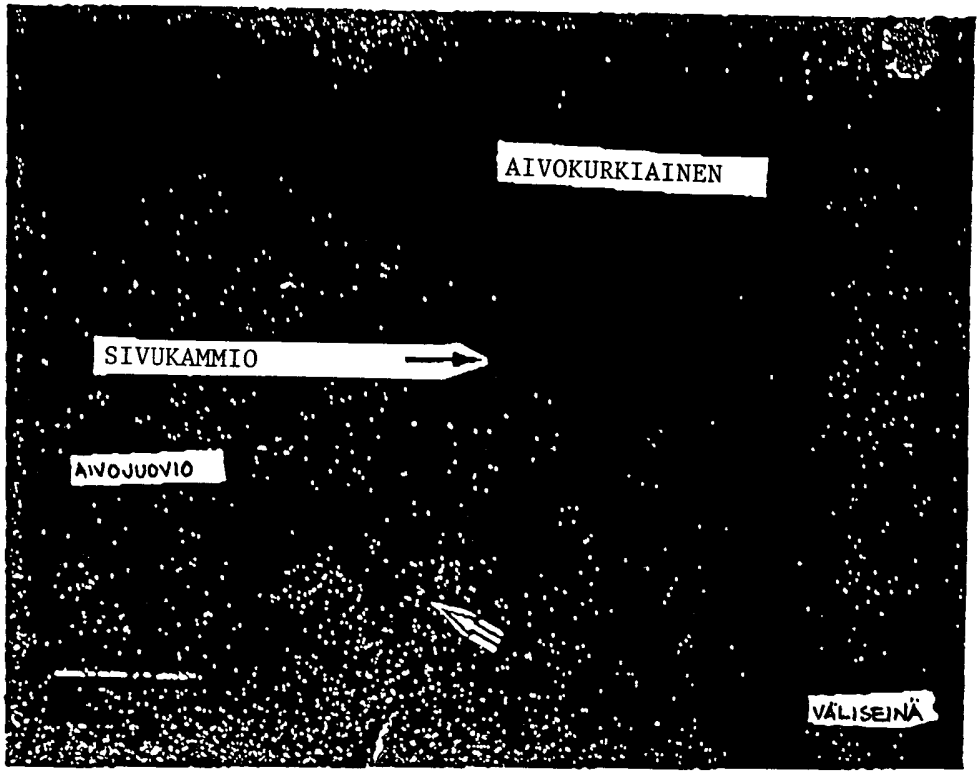
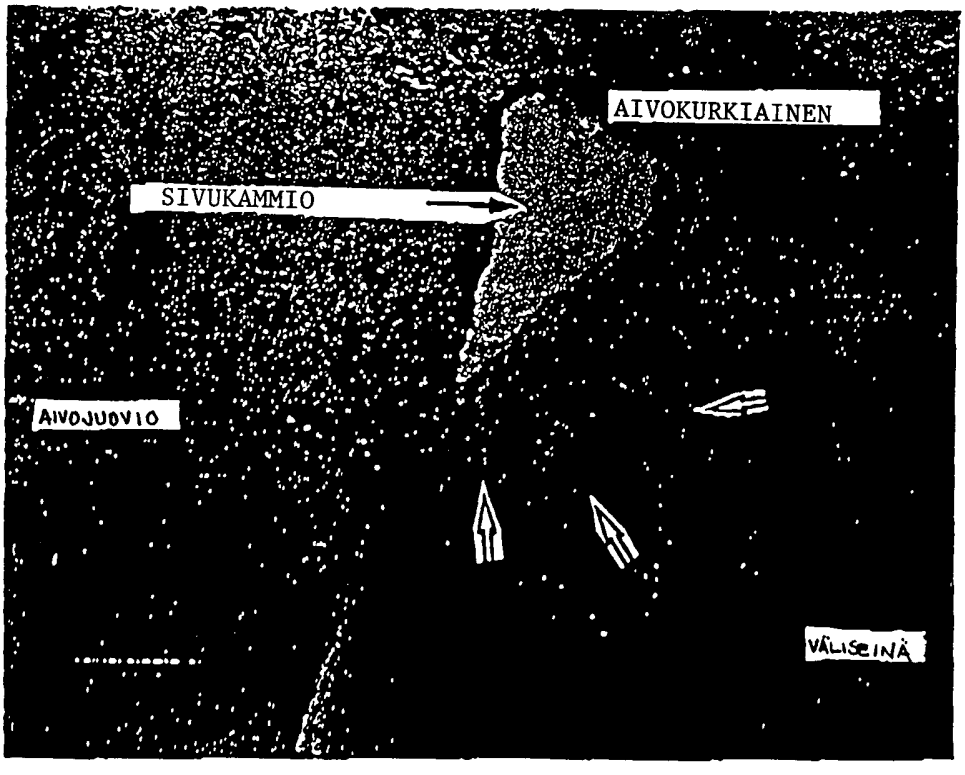

AIVOKURKIAINEN
SIVUKAMMIO
AIVOJUOVIO
VÄLISEINÄ

FIG._4A


AIVOKURKIAINEN
SIVUKAMMIO
AIVOJUOVIO
VÄLISEINÄ

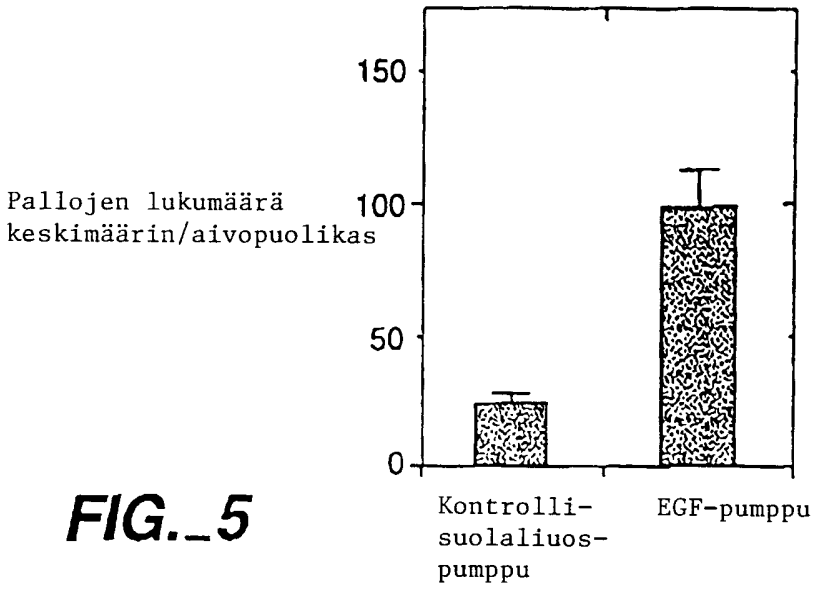

Pallojen lukumäärä
keskimäärin/aivopuolikas
150
100
50
0
Kontrolli-
suolaliuos-
pumppu
EGF-pumppu

FIG._5

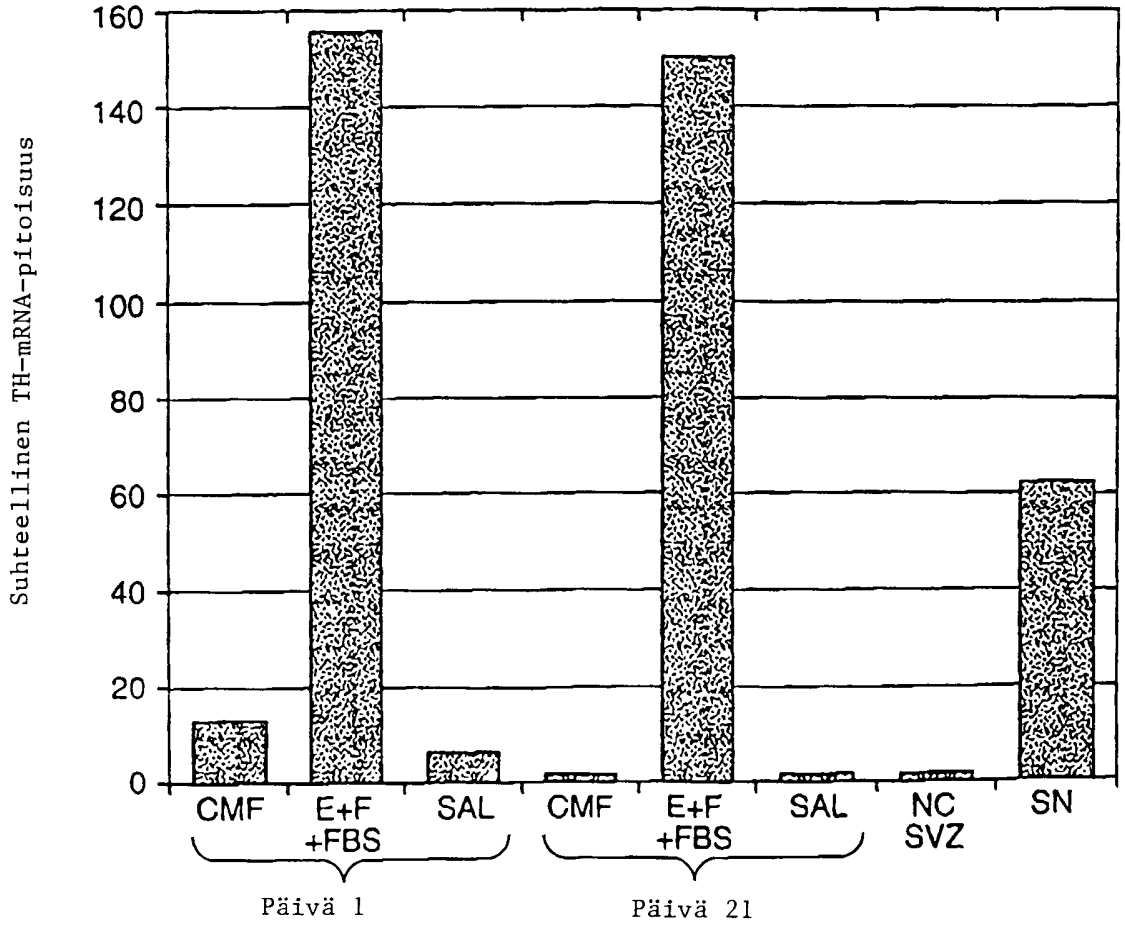

Suhteellinen TH-mRNA-pitoisuus
160
140
120
100
80
60
40
20
0
CMF
E+F
+FBS
SAL
CMF
E+F
+FBS
SAL
NC
SVZ
SN
Päivä 1
Päivä 21

FIG._7

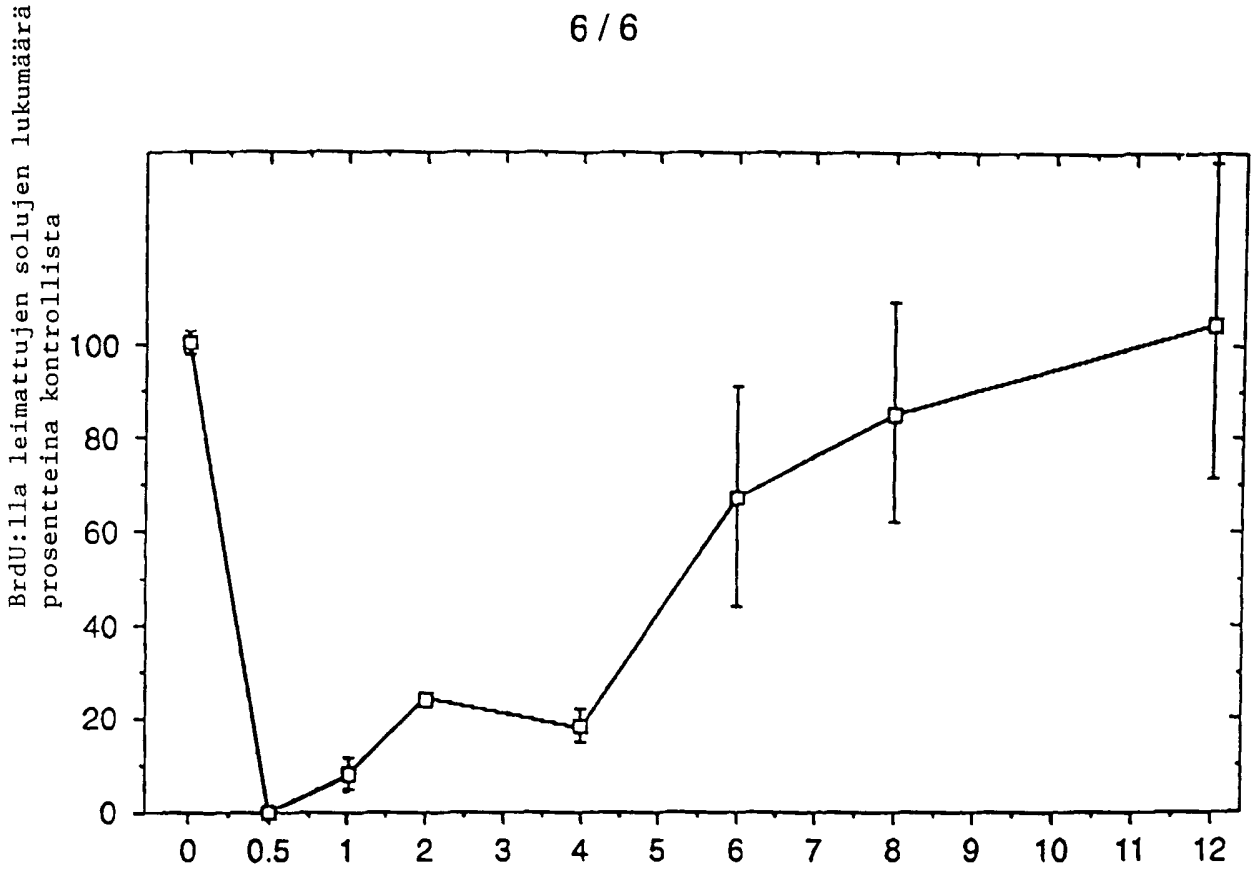


FIG._6A

Aika (päivät) ensimmäisen tappokäsittelyn jälkeen tritiumilla merkityllä tymidiinillä

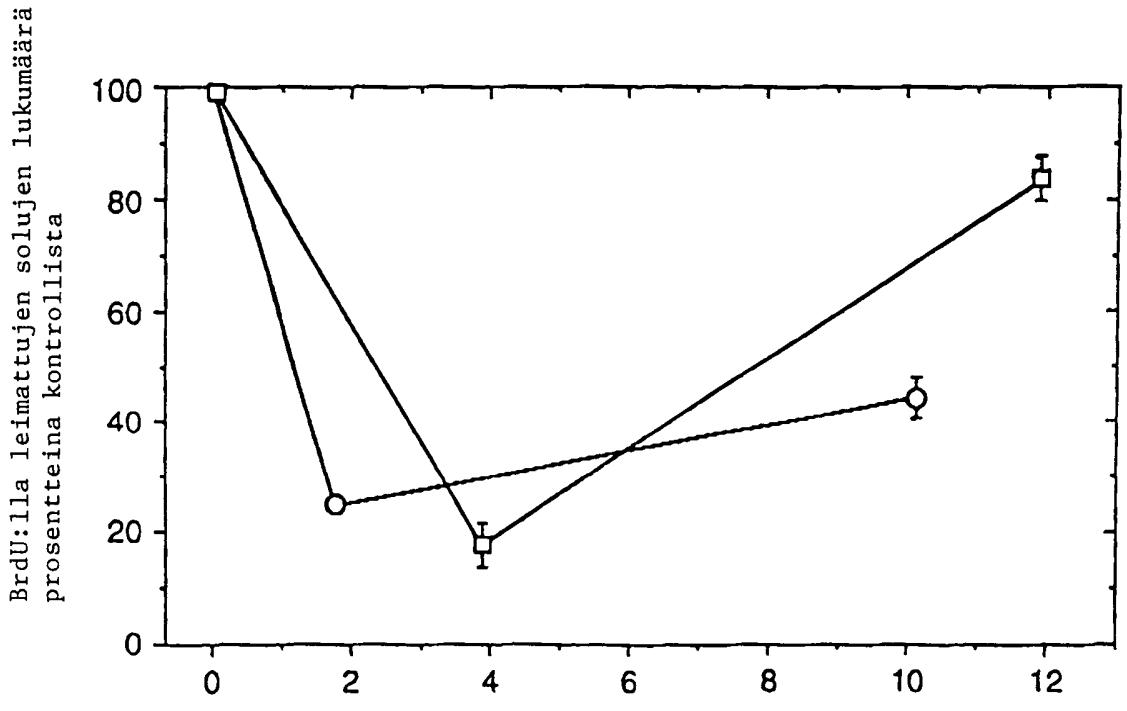


FIG._6B

Aika päivissä