

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

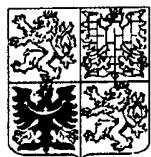
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

558-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12. 09. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **12.09.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/9518606**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 06. 98**
(Věstník č. 6/98)

(86) PCT číslo: **PCT/GB96/02251**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/10329**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	5/10
A 61 K	35/30
G 01 N	33/50
A 01 K	67/027

(71) Přihlášovatel:

RENEURON LIMITED A BRITISH COMPANY
OF MARQUIS HOUSE, London, GB;

(72) Původce:

Sinden John, London, GB;
Gray Jeffrey A., London, GB;
Hodges Helen, London, GB;
Kershaw Timothy, London, GB;
Rashid-Doubell Fiza, Oxford, GB;

(74) Zástupce:

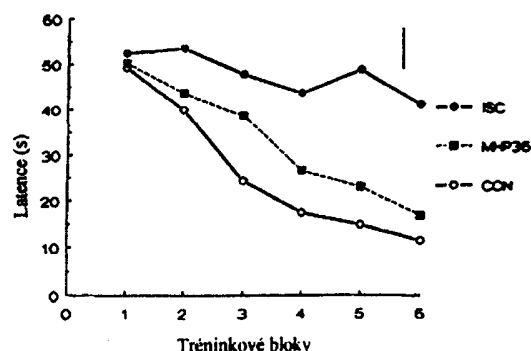
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1,
Praha 4, 14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Léčba behaviorálních a/nebo psychologických deficitů pomocí intracerebrální transplantace pluripotentních neuroepiteliálních buněk, příprava takových buněk a udržování těchto buněčných linií in vitro a příprava léčiv obsahujících takové buňky

(57) Anotace:

Nová metoda korekce behaviorálních a/nebo psychologických deficitů pomocí intracerebrální transplantace pluripotentních neuroepiteliálních buněk. Buňky a buněčné linie, farmaceutické přípravky, medikamenty a metody produkce a udržování buněčných linií pro použití dle tohoto vynálezu.



Léčba behaviorálních a/nebo psychologických deficitů pomocí intracerebrální transplantace pluripotentních neuroepiteliálních buněk, příprava takových buněk a udržování těchto buněčných linií *in vitro* a příprava léčiv obsahujících takové buňky.

Oblast techniky:

Předkládaný patent se týká korekce poruch chování a/nebo psychologických deficitů pomocí intracerebrální transplantace nervových buněk a dále buněčných linií a léčiv použitých pro tento účel. Vynález zahrnuje také metody pro produkci a udržování buněčných linií.

Dosavadní stav techniky:

Poruchy chování a/nebo psychologické deficity mohou být zapříčiněny mnoha chorobami nebo mohou nastat po prodělaném mozkovém traumatu. Například motorická dysfunkce je jedním ze symptomů Parkinsonovy nemoci. Až doposud v mnoha případech neexistuje vhodná léčba takových poruch.

Podstata vynálezu:

Navrhovaný vynález představuje metodu léčení behaviorálních a/nebo psychologických poruch, která zahrnuje intracerebrální transplantaci terapeuticky účinného množství pluripotentních neuroepiteliálních buněk.

Tento vynález je zčásti založen na poznatku, že jsou-li pluripotentní neuroepiteliální buňky transplantovány do poškozeného nebo nemocného mozku, odpovídají pravděpodobně na signály z poškozené nebo nemocné mozkové tkáně tak, že se samy

diferencují na fenotyp, který je schopen nahradit nebo alespoň kompenzovat funkční deficit, ke kterému by jinak poškození nebo nemoc vedly.

Termín „pluripotentní“ je zde použit k popisu nediferencovaných neuroepiteliálních buněk, které se mohou diferencovat na různé typy buněk, nebo buňky s různým fenotypem, především buňky s fenotypem, odpovídajícím zamýšlenému použití. Buněčný typ nebo fenotyp, na který se taková pluripotentní buňka diferencuje je alespoň zčásti závislý na podmínkách, ve kterých se buňka nachází.

Pro použití v tomto vynálezu musí být neuroepiteliální buňky schopné diferenciaci na buňky vhodné k opravě nebo kompenzaci poškození nebo nemoci v cílové oblasti mozku. Dále bude objasněno, že buňky pro transplantaci nemusí být schopné diferenciaci na všechny typy nebo fenotypy nervových buněk. Buňky mohou být například pouze bipotentní, ovšem vyšší stupeň potence je obecně preferován, neboť umožňuje vyšší flexibilitu a potenciál pro transplantace do různých oblastí mozku.

Mezi vhodné pluripotentní buňky patří jednak buňky známé jako „kmenové“ a potom buňky nazývané „prekurzorové“.

Výhodou pluripotentních neuroepiteliálních buněk je, že jsou a zpravidla i zůstávají podmíněně nesmrtelné.

Léčba je vhodná pro kteréhokoliv savce, ale tento vynález se soustřeďuje především na léčbu lidí, zvláště pomocí lidských buněk a buněčných linií.

Navrhovaný vynález zahrnuje i savce, který podstoupil léčbu v souladu s tímto patentem.

Navrhovaný vynález zahrnuje izolované lidské pluripotentní neuroepiteliální buňky.

Navrhovaný vynález zahrnuje především lidské podmíněně nesmrtelné pluripotentní neuroepiteliální buňky.

Navrhovaný vynález dále zahrnuje podmíněně nesmrtelnou pluripotentní neuroepiteliální buněčnou linii, určenou zvláště pro terapeutické použití, konkrétně pro léčbu poruch chování a psychologických deficitů.

Buňky, které jsou zde navrhovány jsou schopné, po implantaci do poškozené části lidského mozku, napravovat poruchy chování a psychologické defekty. Termín „poškozený“ tak jak je použit zde zahrnuje redukci nebo ztrátu funkce. Poškození může být způsobeno množstvím vlivů včetně fyzického traumatu, hypoxie (nedostatek kyslíku), působení chemických látek (například může být poškození způsobeno zneužíváním drog) a včetně nemoci. Následující nemoci a patologické stavy jsou příklady nemocí a stavů, které mají za následek poruchu chování nebo psychologický deficit, který může být léčen ve shodě s navrhovaným vynálezem: traumatické poranění mozku, mrtvice, perinatální ischemie, včetně mozkové obrny, Alzheimerova a Pickcova nemoc a jim příbuzná neurodegenerativní onemocnění způsobující demenci, mnohočetné infarkty vedoucí k demenci, Parkinsonova choroba a jí příbuzná onemocnění, Huntingtonova nemoc, Korsakoffova nemoc a Creutzfeld-Jakobova nemoc.

Amnézie, především jako následek přechodné globální ischemie jako například po zástavě srdce nebo při chirurgickém srdečním bypassu může být také léčena ve shodě s navrhovaným vynálezem.

Navrhovaný vynález dále zahrnuje proces produkce lidských podmíněně nesmrtelných pluripotentních neuroepiteliálních buněk, který se skládá z následujících kroků:

- (a) získání neuroepiteliálních buněk z lidského plodu, buňky musí být v takovém stadiu vývoje, aby byly schopné se diferencovat do mnoha odlišných typů mozkových buněk,
- (b) vložení takové DNA do těchto buněk, která obsahuje sekvenci jež dává buňkám podmíněnou nesmrtelnost a je pod kontrolou odpovídajících kontrolních mechanismů a
- (c) udržování buněk *in vitro* v permisivních podmínkách.

Proces dále zahrnuje klonování buněk, které vede k získání jedné nebo více dalších buněčných linií.

Další aspekt vynálezu se týká pluripotentních neuroepiteliálních buněk (i v izolovaném stavu) pro terapeutické využití, především u člověka. Terapeutickým využitím myslíme léčbu behaviorální a/nebo psychologické nedostatečnosti.

Další aspekt vynálezu se týká podmíněně nesmrtelných pluripotentních neuroepiteliálních buněk pro terapeutické využití, především u člověka. Terapeutickým využitím myslíme léčbu behaviorální a/nebo psychologické nedostatečnosti.

Další aspekt vynálezu se týká pluripotentních neuroepiteliálních buněk (i v izolovaném stavu) ve výrobě medikamentů pro léčbu behaviorální a/nebo psychologické nedostatečnosti. Takové léčivo, aby mohlo být podáno pacientovi musí obsahovat pluripotentní neuroepiteliální buňky.

Podmíněně nesmrtelné buňky ve smyslu navrhovaného vynálezu a tak jak jsou zde použity pochází buď z buněčného klonu, a nebo ze směsné populace. Buněčné klony jsou preferované. Použity

mohou být buňky z jedné buněčné linie, stejně jako směs buňek ze dvou či více buněčných linií.

Navrhovaný vynález dále zahrnuje farmaceutický přípravek, obsahující buňky ve smyslu tohoto vynálezu a farmaceuticky přijatelný nosič.

Transplantace konspecifické fetální nervové tkáně do poškozeného mozku byla studována na zvířecích modelech a následná reparace poškozené tkáně byla sledována na neuroanatomické, fyziologické a behaviorální úrovních (Dunnet & Bjorklund, 1994, Functional Neural Transplantation, Raven Press, New York). Byly provedeny některé pokusy s aplikací této práce v léčbě motorických dysfunkcí doprovázejících Parkinsonovu chorobu (Lindvall O., 1994, v Dunnet & Bjorklund, 1994, Functional Neural Transplantation, Raven Press, New York), ale širší použití této techniky je velmi ztěžováno nutností pracovat s tkání z konspecifického fetálního mozku. Požadovaná fetální tkáň musí být specifická pro daný typ poškození a musí být odebrána v určitém, časově limitovaném stadiu vývoje mozku, které je různé pro jednotlivé mozkové regiony i pro odlišné typy buněk. To vede jak k praktickým, tak k etickým problémům.

Práce (Sinden J.D. a kol., 1995, Beh. Brain. Sci. 18, str.10) na transplantacích fetální tkáně při různých typech poškození prokázala, že pro zlepšení rozpoznávací funkce je nutná velmi specifická shoda buněčných typů.

Prokázali jsme, že jsou-li podmíněně nesmrtelné pluripotentní neuroepiteliální buňky implantovány do poškozeného mozku, diferencují se na správný typ buněk, nutný k opravě poškození, a takto diferencované buňky jsou schopné tvořit odpovídající

propojení, nutná pro zlepšení funkce. Fenotyp diferencovaných buněk může být stejný, jako fenotyp poškozených nebo ztracených buněk, ale stejně tak mohou diferencované buňky vykazovat fenotyp odlišný a nebo dokonce několik fenotypů. V každém případě se ale buňky diferencují na fenotyp, který je schopen funkční integrace do poškozené nebo ztracené tkáně a kompenzace její funkce. To je provázáno sklonem k vyhledávání poškozené tkáně a migrací do takových míst.

Použitím pluripotentních buněk máme na mysli, že pomocí jediného buněčného klonu je možné opravit poškození v mnoha odlišných částech mozku. Znamená to také, že jestliže je k opravě poškození v dané oblasti zapotřebí více buněčných typů, je jedna pluripotentní buněčná linie schopna diferencovat se na všechny potřebné buněčné typy.

Podmíněně nesmrtelné buňky jsou takové buňky, které jsou nesmrtelné za určitých permissivních podmínek, ale nejsou nesmrtelné v nepermissivních podmínkách. V tomto případě to znamená, že přeměnou pluripotentních prekurzorových buněk extrahovaných z fetální tkáně na podmíněně nesmrtelné a jejich udržováním v permissivních podmínkách lze zastavit jejich vývoj ve vybraném stadiu a v tomto stadiu je po dlouhou dobu i množit. Použití této metody umožňuje vývoj klonů, které se dají snadno rozmnožovat *in vitro*. Jestliže se změni udržovací podmínky na nepermissivní, buňky se mohou dále vyvíjet. Jsou-li potom buňky umístěny ve vhodných podmínkách, budou pokračovat ve vývoji a diferencovat se.

Nesmrtelnost je u buněk většinou vyvolána transdukcí onkogenu. Je zde tudíž riziko, že po delší době se buňky nádorově

zvrhnou, a proto nejsou takové buňky v navrhovaném vynálezu preferované.

Podmíněně nesmrtelné buňky mají stejné výhody jako nesmrtelné buňky v tom, že jsou „zmrazeny“ v určitém stadiu vývoje, je snadné je udržovat i rozmnožovat, pokud jsou v permisivních podmínkách, ale mohou být použity k transplantaci jen pokud prostředí, do kterého budou transplantovány je nepermisivní. V případě buněk navrhovaných v tomto vynálezu byl gen, použitý k vyvolání podmíněné nesmrtelnosti, zvolen tak, aby pro něj podmínky v mozkové tkáni byly nepermisivní.

Obvykle je nesmrtelnost u buněk vyvolána pomocí transdukce onkogenu. Použití podmíněně nesmrtelných buněk znamená, že v nepermisivních podmínkách buňky nemají onkogenní vlastnosti, a tak je nemožné, aby implantace takových buněk vedla k nádorovému bujení.

Jestliže jsou použity buňky, které nejsou nesmrtelné, musí být udržovány *in vitro* v kultivačním mediu s přídavkem růstových faktorů.

Gen, který je použit k vyvolání podmíněné nesmrtelnosti může být vložen do buněk až po jejich extrakci ze zvířecího plodu. Alternativně mohou být připraveny a množeny transgenní organismy (ne lidé), jejichž nervové epiteliální buňky nesou gen pro vyvolání podmíněné nesmrtelnosti. Pokud jsou chována taková transgenní zvířata, potom buňky, izolované z fetální zvířecí tkáně již jsou podmíněně nesmrtelné a nevyžadují žádnou další úpravu.

Buňky používané pro léčbu lidí by měly být přednostně lidského původu, aby se zamezilo problémům s odhojením transplantátu. To vyžaduje použití fetální tkáně. Použití podmíněně nesmrtelných

buněk znamená, že pokud jednou byla populace takových buněk založena, není již znovu zapotřebí další fetální tkáně. Například do buněk odebraných z lidského plodu v určitém stadiu vývoje byla vložena DNA, potřebná pro vyvolání podmíněné nesmrtelnosti. Takové buňky mohou být množeny a klonovány a selektovány jednotlivé buněčné linie. Udržování takové smíšené populace a/nebo selekce buněčných linií představuje konstantní zdroj materiálu pro implantace.

Pro léčbu pacienta je obvykle prospěšné vědět, ve které části mozku došlo k poškození. Jakmile je lokalizováno poškození mozku, ať již v jednom, nebo několika místech, může být zahájena léčba pomocí implantace buněk do těchto poškozených oblastí. Ovšem v mnoha případech je lokalizace a/nebo typ poškození neznámý a nebo jen velmi nepřesně charakterizovaný. Například neurodegenerativní onemocnění mohou vést k širokospektrému poškození mnoha typů buněk. I léčení takového poškození je možné díky schopnosti pluripotentních neuroepiteliálních buněk vyhledávat po transplantaci poškozená místa a migrovat do nich. Pluripotentní buňky mohou být transplantovány na jedno místo, a nebo lépe na několik míst, odkud pak migrují do místa (míst) poškození a tam se pak diferencují v závislosti na lokálních podmínkách na fenotyp nebo fenotypy, které jsou potřebné ke zlepšení nebo úplnému obnovení funkce. Posmrtná analýza mozku krys, kterým byly transplantovány buňky podmíněně nesmrtelné pluripotentní neuroepiteliální linie ukázala, že buňky se shlukovaly do poškozených oblastí mozku (viz. Příklad 9), což dokazuje sklon buněk integrovat se do poškozených oblastí raději než do nepoškozených. Pluripotentnost buněk a jejich tendence migrovat do poškozených míst znamená, že vysoce potentní buňky z

jediné linie jsou schopny kompenzovat široké spektrum poškození mnoha odlišných buněčných typů.

Po léčbě jsou pokroky pacienta monitorovány za použití behaviorálních a/nebo psychologických testů a/nebo, je-li to nutné, testů, které monitorují mozkovou aktivitu ve vybraných oblastech mozku. Například mohou být před a po transplantaci provedeny testy rozpoznávací funkce.

Většinou léčba podstatně napraví behaviorální a/nebo psychologický deficit. Ale ne vždy je to možné. Léčba ve smyslu tohoto vynálezu s použitím buněk, léků a farmaceutických přípravků podle tohoto vynálezu může vést ke zlepšení funkce, ale nikoliv k úplné nápravě. I takové zlepšení je ale velmi cenné.

Množství použitých buněk se liší v závislosti na povaze a rozsahu poškození. typický počet buněk použitých pro transplantaci je v rozsahu od stovky tisíc do několika milionů. Léčba není omezena na jedinou transplantaci. Následné transplantace mohou být použity k dalšímu zlepšení funkce. Navrhovaný vynález je ilustrován pokusy, které jsme provedli na kryších s poškozením mozku. V experimentech, které budou dále popsány, byly podmíněně nesmrtelné buňky použité pro transplantaci získány z H-2K^b-tsA58 transgenních myší, připravených M. Noblem a jeho spolupracovníky v Ludwigovu institutu pro výzkum rakoviny (Jat P.S. a kol., 1991, P.N.A.S. (USA) 88, str. 5096). Všechny buňky těchto myší obsahují teplotně senzitivní onkogen (tsA58, teplotně senzitivní mutanta SV40 velkého T antigenu pod kontrolou interferonem indukovatelného H-2K^b promotoru) takový, že buňky se dělí v permisivní teplotě (nižší než je teplota těla, 33°C), ale diferencují se pouze při tělesné teplotě myši (38-39°C). Tato vlastnost činí buňky podmíněně nesmrtelnými a

nám umožnila klonovat a rozmnožovat *in vitro* buněčné linie, které se po transplantování do hostitelského mozku diferencují. Z populace buněk, odebraných původně z transgenní myši, přesně z hippocampu 14. den embryonálního vývoje (E 14), bylo naklonováno množství buněčných linií. Krysy, které obdržely transplantát z těchto buněk, byly sledovány nejméně po dobu osmi měsíců a ani v jednom případě nedošlo po transplantaci k nádorovému zvrhnutí transplantovaných buněk. Navíc posmrtné histologické testy prokázaly, že transplantované buňky (označené předem transfekcí lac-Z reportérovým genem) vykazovaly fenotyp diferencovaných buněk, odpovídající fenotypu buněk krysího nervového systému.

Klonované buňky vykazují *in vitro* potenciál diferencovat se na více než jeden fenotyp, tj. jak na fenotyp astroglíí, tak na fenotyp neuronů, viz Příklad 4.

Lézně-behaviorální model, na kterém jsme demonstrovali, že klonované buněčné linie jsou schopné obnovit funkci v poškozeném mozku, jsme již dříve intenzivně studovali s použitím fetálních konspecifických transplantantů (viz Sinden J.D. a kol, 1995, Beh. Brain. Sci. 18, str. 10). Tento model využívá krys, u kterých byla technikou 4VO (uzavření čtyř cév) simulována lidská srdeční příhoda s následkem lokalizovaného a specifického poškození CA1 pyramidálních buněk dorzálního hippocampu spolu s poruchou rozpoznávání manifestovanou potížemi při lokalizaci ponořené a neviditelné rampy ve vodním bludišti. Tento lézně-behaviorální model slouží jako model kognitivní dysfunkce, která je následkem běžného typu poškození mozku, tj. například přechodného nedokrvení mozku, které může nastat během zástavy srdce.

Již dříve jsme prokázali, že aby byla v tomto případě transplantace suspenze fetálních buněk úspěšná ve smyslu obnovení funkce, musí být fetální buňky vysoce specifické pro 4 VO poškození: Transplantace CA 1 pyramidálních buněk jsou efektivní; transplantáty obsahující cholinergní buňky z bazálního předního mozku, granulární buňky z *gyrus dentalis*, nebo dokonce jen jinou třídu pyramidálních buněk (CA 3) z hippocampu nejsou účinné. Příklady 5 až 8 níže popisují experimenty na tomto modelu, ve kterých transplantace jak buněčných klonů, tak smíšených populací buněk z H-2K^b-tsA58 transgenních myší vedou k úspěšnému obnovení rozpoznávací funkce.

Zjistili jsme, že dva ze tří testovaných klonů, MHP36 (dříve známý jako buněčná linie C36) a MHP3, jsou při obnově rozpoznávací funkce stejně účinné, jako fetální krysí transplantáty obsahující CA 1 pyramidální buňky. Třetí testovaná linie MHP15, dříve známá jako C15, vede při transplantaci ke zlepšení funkce, ale nevykazuje takové zlepšení, jako MHP36 a MHP3. Pravděpodobnost, že nalezneme buněčnou linii, která se bude diferencovat na CA 1 pyramidální buňky nezávisle na povaze prostředí v hostitelském mozku je malá. Zdá se tedy, že buněčné linie jsou schopné odpovídat na signály z poškozené tkáně tak, že se diferencují na buňky jednoho nebo více typů, které mohou znovu ustavit nezbytná propojení a znovu obnovit funkci(e) původně zastávané poškozenou tkání. Tato jejich kapacita nám dává jak strategii, tak základní materiál pro transplantační terapie pro léčení širokého spektra behaviorálních a psychologických deficitů, které jsou následkem adekvátně širokého spektra různých forem poškození lidského mozku. Zároveň v tomto

případě mizí etické a praktické problémy spojené s použitím lidské fetální tkáně.

Obě buněčné linie, které dosud prokázaly největší schopnost obnovy funkce jsou FGF-2 odpovídavé, tj. vykazují podstatně zvýšenou proliferaci jak v permisivních, tak nepermisivních podmínkách v přítomnosti tohoto růstového faktoru, zatímco třetí linie odpovídá jen velmi slabě. Proto jsou buňky a buněčné linie, které vykazují signifikantně zvýšenou proliferaci po přidání růstového faktoru do jejich kultivačního prostředí, preferovány. Buňky mohou být testovány v permisivním a/nebo nepermisivním prostředí. Buňky vykazující nejvyšší nárůst proliferace jsou nejvíce preferovány. Růstový faktor, používaný pro testování buněk by měl přednostně odpovídat oblasti mozku, do které budou buňky transplantovány, tj. takový růstový faktor, který je v dané oblasti sekretován. Například buňky, které zamýšlíme použít k opravě poškození v hippocampu musíme testovat FGF2 (známým také jako bFGF). Buňky odpovídající na FGF2 jsou obecně upřednostňovány. Pro testování mohou být použity i další mitogenní růstové faktory včetně EGF a FGF.

Součástí vynálezu je tedy i metoda testování včetně udržování populace buněk podmíněně nesmrtelné pluripotentní neuroepiteliální buněčné linie *in vitro* a kultivace buněk v permisivních podmínkách v přítomnosti i nepřítomnosti růstových faktorů, například FGF2, a determinace jejich proliferace. Přednostně jsou buňky testovány také v nepermisivních podmínkách. Takové buňky, které jsou odpovídavé, tj. vykazují signifikantně zvýšenou proliferaci v přítomnosti růstového faktoru jak v permisivních, tak raději i v nepermisivních podmínkách, jsou zvláště vhodné pro léčbu ve smyslu tohoto

vynálezu. Růstový faktor může být použit například v koncentraci 10 ng/ml.

Termosenzitivní onkogen, který je příčinou podmíněné nesmrtelnosti buněk z H-2K^b-tsA58 transgenních myší může být *in vitro* vložen i do lidských buněk. Pro tento účel mohou být použity dobře známé techniky pro vkládání exogenní DNA do buněk, jako např. transfekce. Pro ověření inkorporace vloženého genu do DNA je možné použít běžné techniky, například Southern blot. V některých případech může být použita značka. Je-li použit gen pro ts SV40 velký T antigen, mohou být buňky testovány v permisivní teplotě na expresi SV40, tak jak je to popsáno v Příkladu 4.

Je zřejmé, že ačkoliv byl v experimentech, popsaných dále v Příkladech použit pro vyvolání podmíněné nesmrtelnosti buněk gen pro ts SV40 velký T antigen, je možné použít i jiné geny, které zapříčiní podmíněnou nesmrtelnost. Takové geny mohou být konstruovány ze známých onkogenů. Například jeden gen podmiňující nesmrtelnost byl zkonstruován z c-myc onkogenu a je popsán v (Hoshimaru M., Ray J., Sah D. W. Y., Gage F. H., 1996, PNAS USA 93, str. 1518-1523).

V pokusech na krysách, které jsou popsány v Příkladech 6, 7 a 8 níže byly použity podmíněně nesmrtelné pluripotentní buňky k nápravě velmi specifického typu poškození. Použití buněk ve smyslu tohoto vynálezu není omezeno jen na opravy těchto specifických typů poškození. Předpokládáme, že transplantace do jakékoliv části mozku bude provázena signifikantním zlepšením funkce.

Část fetálního mozku, ze které jsou neuroepiteliální buňky odebrány a přesný čas (stadium vývoje) mohou být různé. Pokud ale chceme získat pluripotentní buňky, musí být odebrány v dostatečně

časném stadiu vývojové dráhy, tak aby měly schopnost diferencovat se na požadované množství odlišných buněčných typů a/nebo fenotypů mozkových buněk. Například v případě buněk odebíraných z embryonálního myšího hippocampu musí být buňky odebrány mezi 14 a 15 dnem embryonálního vývoje. Lidské buňky musí být odebrány v odpovídajícím vývojovém stadiu, například v 8 týdnu vývoje lidského plodu.

Odebrané buňky jsou *in vitro* testovány na schopnost diferencovat se, konkrétně diferencovat se na odpovídající buněčný typ nebo fenotyp. Různé oblasti mozku při poškození, a/nebo různé typy poškození, generují různé signály, např. růstové faktory. Schopnost diferenciaci může být testována *in vitro* v přítomnosti odpovídajícího signálu, například odpovídajícího růstového faktoru. Příklad 4 níže popisuje proces, kterým je prokazována schopnost buněk diferencovat se na fenotyp neuronů a gliových buněk.

Některé behaviorální a/nebo psychologické deficity jsou způsobeny absencí jedné nebo více chemických látek v jinak zdravém mozku. Již dříve bylo prokázáno, že transplantací transgenních buněk mohou být zastoupeny chybějící chemické látky. Navrhovaný vynález se nezabývá specificky takovými problémy. Ačkoliv buňky ve smyslu tohoto vynálezu mohou být geneticky modifikovány tak, aby obsahovaly gen pro expresi požadovaného produktu, obvykle to není nutné, protože jsou-li buňky, použité ve smyslu tohoto vynálezu, transplantovány, diferencují se a fungují jako plnohodnotní zástupci buněk, které byly poškozeny nebo ztraceny. Transplantace není v tomto případě jen sofistikovanou metodou podání léčiva, neboť buňky se stávají funkční součástí hostitelského mozku. Proto je genetická modifikace buněk obvykle omezena jen na vložení genů,

potřebných pro navození podmíněné nesmrtelnosti a klonování. Geny, potřebné pro klonování, čili takové, které umožní selekci, mohou být například geny, nesoucí rezistenci k vybranému antibiotiku.

Genetická modifikace, která by umožnila sekreci farmakologických látek, není preferována.

Metody transplantace buněk lidem a zvířatům jsou v odborných kruzích známé a jsou popsány v odborné literatuře. Termín „transplantace“, tak jak je použit zde, zahrnuje transplantaci buněk pasážovaných *in vitro*, které mohou být geneticky modifikovány, stejně jako transplantaci materiálu extrahovaného z jiného organismu. Buňky mohou být transplantovány implantací ve smyslu mikroinfuze buněk známé kvality do cílové oblasti, kde se rozptýlí do oblasti okolo místa vpichu. Mohou být také implantovány do ventrikulárních prostor mozku. Jsou-li buňky implantovány novorozenci, mohou se rozptýlit po celém jeho mozku.

Výraz „intracerebrální transplantace“, tak jak je použit zde, zahrnuje transplantaci do kterékoliv části mozku. Transplantace není omezena na frontální a větší oblasti mozku.

Následující příklady, které však nejsou limitující, ilustrují navrhovaný vynález.

Obrázky 1 až 20 ukazují výsledky experimentů, popsanych v příkladech 3 a 5 až 8.

Zobrazeno je následující:

Obrázek 1 - zobrazuje proliferaci buněk MHP15 při 33°C a 39°C v SFM.

Obrázek 2 - zobrazuje proliferaci buněk MHP15 při 33°C a 39°C v SFM s přidavkem interferonu γ (12 U/ml).

Obrázek 3 - zobrazuje proliferaci buněk MHP15 při 33°C a 39°C v SFM s přidavkem FGF2 (10 ng/ml).

Obrázek 4 - zobrazuje proliferaci buněk MHP15 při 33°C a 39°C v SFM s přidavkem interferonu γ (12 U/ml) a FGF2 (10 ng/ml).

Obrázek 5 - zobrazuje proliferaci buněk MHP36 při 33°C a 39°C v SFM.

Obrázek 6 - zobrazuje proliferaci buněk MHP36 při 33°C a 39°C v SFM s přidavkem interferonu γ (12 U/ml).

Obrázek 7 - zobrazuje proliferaci buněk MHP36 při 33°C a 39°C v SFM s přidavkem FGF2 (10 ng/ml).

Obrázek 8 - zobrazuje proliferaci buněk MHP36 při 33°C a 39°C v SFM s přidavkem interferonu γ (12 U/ml) a FGF2 (10 ng/ml).

Obrázek 9 - zobrazuje latenci krys v Morrisově vodním bludišti v čase pro kontrolní krysy, které obdržely falešný štěp (CON), ischemické krysy, které obdržely falešný štěp (ISC), ischemické krysy, které obdržely implantát CA 1 buněk (CA1), CA 3 buněk (CA3), nebo smíšené populace podmíněně nesmrtelných prekurzorových buněk z hippocampu H-2K^b-tsA58 transgenních myší (tsA58).

Obrázek 10 - zobrazuje latenci krys v Morrisově vodním bludišti v čase pro kontrolní krysy, které obdržely falešný štěp (CON), ischemické krysy, které obdržely falešný štěp (ISC), ischemické krysy, které obdržely implantát CA 1 buněk (CA1), buněk linie MHP36 (MHP36), nebo smíšené populace podmíněně nesmrtelných prekurzorových buněk z hippocampu H-2K^b-tsA58 transgenních myší (tsA58).

Obrázek 11 - zobrazuje latenci krys v Morrisově vodním bludišti v čase pro kontrolní krysy, které obdržely falešný štěp (CON),

ischemické krysy, které obdržely falešný štěp (ISC), ischemické krysy, které obdržely implantát buněk z linie MHP36 (pasáž 24 až 32) (MHP 36).

Obrázek 12 - zobrazuje latenci krys v Morrisově vodním bludišti v čase pro kontrolní krysy, které obdržely falešný štěp (CON), ischemické krysy, které obdržely falešný štěp (ISC), ischemické krysy, které obdržely implantát buněk z linie MHP36 (MHP36), buněk z linie MHP15 (MHP15) nebo buněk z linie MHP3 (MHP3).

Obrázek 13 - ukazuje proliferaci buněk MHP15 při 33°C a 39°C v SFM, tak jako na Obr. 1, ale pro dny 0 až 6.

Obrázek 14 - ukazuje proliferaci buněk MHP15 při 33°C a 39°C v SFM s přidavkem interferonu γ (12 U/ml), tak jako na Obr. 2, ale pro dny 0 až 6.

Obrázek 15 - ukazuje proliferaci buněk MHP15 při 33°C a 39°C v SFM s přidavkem FGF2 (10 ng/ml), tak jako na Obr. 3, ale pro dny 0 až 6.

Obrázek 16 - ukazuje proliferaci buněk MHP15 při 33°C a 39°C v SFM s přidavkem interferonu γ (12 U/ml) a FGF2 (10 ng/ml), tak jako na Obr. 4, ale pro dny 0 až 6.

Obrázek 17 - ukazuje proliferaci buněk MHP36 při 33°C a 39°C v SFM, tak jako na Obr. 5, ale pro dny 0 až 6.

Obrázek 18 - ukazuje proliferaci buněk MHP36 při 33°C a 39°C v SFM s přidavkem interferonu γ (12 U/ml), tak jako na Obr. 6, ale pro dny 0 až 6.

Obrázek 19 - ukazuje proliferaci buněk MHP36 při 33°C a 39°C v SFM s přidavkem FGF2 (10 ng/ml), tak jako na Obr. 7, ale pro dny 0 až 6.

Obrázek 20 - ukazuje proliferaci buněk MHP36 při 33°C a 39°C v SFM s přidavkem interferonu γ (12 U/ml) a FGF2 (10 ng/ml), tak jako na Obr. 8, ale pro dny 0 až 6.

Příklady provedení vynálezu:**Příklad 1****PŘÍPRAVA BUNĚČNÝCH KULTUR SMÍŠENÝCH POPULACÍ BUNĚK**

E14 H-2K^b-tsA58 myším byly odebrány hippocampy. Tkáň bula poté opracována trypsinem a mechanicky disociována, buněčná suspenze byla naředěna na koncentraci 45×10^3 až 50×10^3 buněk/ml a rozdělena na kultivační misky (10 cm^2). Buňky byly kultivovány v DMEM: bezsérové médium (SFM) F12 s následujícími přísadami: hovězí sérový albumin (0,0286%); transferin (0,1 mg/ml); putrescín (16,2 $\mu\text{g/ml}$); insulin (5 $\mu\text{g/ml}$); progesteron (0,062 $\mu\text{g/ml}$); selen (0,0383 $\mu\text{g/ml}$); L-glutamin (2 mM); L-tyroxin (0,4 $\mu\text{g/ml}$); trijodtyronin (0,337 $\mu\text{g/ml}$); heparin (10 USP jednotek/ml); penicilin/streptomycin (10 000:1000 jednotek/ml), vše od firmy Sigma. Navíc byl k buňkám přidán základní fibroblastový růstový faktor, dříve známý jako bFGF, nyní nazývaný FGF2, v koncentraci 10 ng/ml a interferon γ (IFN- γ) (12 U/ml). Buňky byly inkubovány při 32°C v 5% CO₂. Každé 2 až 3 dny byla vyměněna polovina média a všechny FGF2 a IFN- γ .

Příklad 2**PRODUKCE BUNĚČNÝCH KLONŮ**

Plazmid pPGKB-geo (získaný od P. Soriano), který nese fúzané geny lacZ a gen pro rezistenci k neomycinu pod kontrolou pGK promotoru, byl kultivován přes noc v Lauria Bretaniho médiu při 37°C. Poté byl purifikován komerčně dostupným kitem (Quiagen, Německo). Purifikovaná plazmidová DNA byla linearizována pomocí restriktčního enzymu Sal I (Promega, U.K.), sterilizována a resuspendována v TE pufru v konečné koncentraci 1 mg/ml. Smíšená

populace neuroepiteliálních buněk z hippocampu, připravená podle Příkladu 1, byla podrobena elektroporaci, tak aby byl do buněk vnesen lacZ fúzovaný gen.

Buňky byly vysety na misky v koncentraci 10^5 - 10^6 buněk / misku v SFM médiu (s přísadky tak jak byl popsány v Příkladu 1) s odpovídajícím přísadkem FGF2 a IFN- γ . Po 24 hodinách bylo médium zaměněno za SFM s přísadkem G418 (antibiotikum podobné neomycinu) (200 μ g/ml), což umožní růst pouze buňkám nesoucím plazmid vložený tak, že je schopen exprimovat rezistenci ke G418. Médium bylo obměňováno 2 až 3x za týden a buňky byly ponechány 4 až 6 týdnů, aby se klony mohly správně vyvinout.

Vybrané klony byly odděleny od ostatních a odebrány pomocí skleněné klonovací kličky, namočené v silikonové pastě. Po krátké inkubaci (5 min) s EDTA-EGTA (1:1000) při 37°C byly buňky přeneseny na inkubační destičky s 24 jamkami. Po několika dnech se buňky začaly shlukovat a byly přeneseny na 6 jamkové destičky a poté na kultivační misky (10 cm²). Dále bylo s buňkami nakládáno stejně jako se smíšenou populací netransfektovaných linií tak, jak je popsáno výše, s výjimkou přísadku G418. Ze 32 vybraných klonů bylo 9 přeměněno na trvalé linie.

Všechny tyto hippocampální klonované linie vykazovaly podmíněnou nesmrtelnost; chromogenní MTT test prokázal 1 až 2 x 10^3 krát vyšší proliferaci, ve srovnání s původní hustotou buněk při výsevu, v permisivních podmínkách v SFM bez přísadku FGF2 po 2 až 6 dnech *in vitro* (zde označované „DIV“) s rychlou redukcí počtu buněk v nepermisivních podmínkách (39°C, IFN- γ). Ovšem hippocampální neuroepiteliální populace, ze které byly tyto linie odvozeny vyžaduje pro proliferaci suplementaci FGF2. Dvě z devíti

linií byly navíc FGF2 odpovídavé, tj. podstatně zvýšily stupeň proliferace v jak permisivních, tak i nepermisivních podmínkách v přítomnosti tohoto růstového faktoru.

Linie byly udržovány po mnoho pasáží a zmrazené buňky byly rozmrazeny a kultivovány beze změny fenotypu.

Příklad 3

PROLIFERACE KLONÁLNÍCH LINIÍ MHP15 A MHP36 *IN VITRO*

(Buněčné linie MHP36 a MHP15 byly dříve známé jako C36 a C15 resp. C36 a C15 reference byly použity v žádosti, ze které si tato současná žádost nárokuje prioritu. Buněčné linie jsou stejné buněčné linie, jen jména byla změněna.)

Buňky ze dvou trvalých buněčných linií byly rozpipetovány na destičku s 96 jamkami v hustotě 8 až 12×10^3 buněk/jamku v bezsérovém DMEM:F12 médiu (SFM) s přidavkem základního fibroblastového růstového faktoru (FGF2 - 10 ng/ml) a interferonu γ (12 jednotek/ml) a kultivovány 24 hodin při 33°C v 5% CO₂. Po této době bylo veškeré médium včetně FGF2 a IFN γ odstraněno a každá skupina 8 jamek byla opracována tak, jak je popsáno dále:

- (i) SFM bez přidavků;
- (ii) SFM s přidavkem IFN γ (12 jednotek/ml);
- (iii) SFM s přidavkem FGF2 (10 ng/ml); nebo
- (vi) SFM s přidavkem IFN γ (12 jednotek/ml) i FGF2 (10 ng/ml); pro 2, 4, 6, 8 a 14 dní *in vitro* při 33°C nebo 39°C. Buňky byly spočítány pomocí chromogenního MTT testu pro každý časový úsek, každou teplotu a každou kombinaci přidavků. Obě buněčné linie prokázaly zřejmou teplotní senzitivitu v SFM s i bez IFN γ , buňky překotně proliferovaly (až do 200 násobku hustoty při výsevu) v permisivní

teplotě (33°C), ale prokázaly jen minimální proliferaci při nepermisivní teplotě (39°C). Přídavek FGF2 zvyšuje proliferaci při obou teplotách u MHP36 buněk, ale má jen malý vliv na MHP15 linii; to znamená, že se obě linie liší v odpovědích na tento růstový faktor.

Obrázky 1 až 4 ukazují výsledky tohoto experimentu pro MHP15 linii a časový úsek 14 dnů a Obrázky 13 až 16 ukazují tyto výsledky ve větším detailu pro časový úsek 0 až 6 dnů. Obrázky 5 až 8 ukazují výsledky tohoto experimentu pro MHP36 linii a časový úsek 14 dnů a Obrázky 17 až 20 ukazují tyto výsledky ve větším detailu pro časový úsek 0 až 6 dnů.

Příklad 4

BUNĚČNÉ LINIE MHP15 A MHP36 MAJÍ POTENCIÁL DIFERENCIOVAT SE *IN VITRO* V NEURONY A GLIOVÉ BUŇKY.

Buňky byly připraveny pro imunocytochemické testy za použití mnoha markerů jak v permisivních podmínkách (33°C, IFN γ a FGF2), tak v nepermisivních podmínkách (39°C) v SFM s přídavkem diferenciačního agens dibutyryl cAMP (1 mM). 50 až 100x 10³ buněk bylo rozpipetováno na destičky opračované fibronectinem. Buňky byly kultivovány v SFM s FGF2 a interferonem γ při 33°C 48 hodin. Polovina jamek byla zafixována v tomto stadiu. Ve druhé polovině bylo odstraněno médium a nahrazeno SFM obsahujícím 1 mM dibutyryl cAMP a buňky byly kultivovány při 39°C. Tyto buňky byly fixovány po 2 až 8 dnech *in vitro* 4% paraformaldehydem. Tabulka ukazuje vlastnosti všech buněk na pěti náhodně vybraných typech exprese markerů pro progenitorové buňky: Nestin; marker neuronů, neuron specifická enoláza (NSE); marker gliových buněk, gliální

fibrilární acidický protein (GFAP) a marker pro antigen genu pro podmíněnou nesmrtelnost SV40. Obě buněčné linie vykazují fenotyp neuronů i gliových buněk po, ale nikoliv před diferenciací.

MHP15 linie

DNY <i>in vitro</i>	NESTIN	NSE	GFAP	SV40
- teplota	% značených buněk	% značených buněk	% značených buněk	% značených buněk
2 - 33°C	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
2 - 39°C	100 ± 0	12,4 ± 2,2	3,8 ± 1	100 ± 0*

*SV40 u linie MHP15 po 4 dnech ubývá.

MHP36 linie

DNY <i>in vitro</i>	NESTIN	NSE	GFAP	SV40
- teplota	% značených buněk	% značených buněk	% značených buněk	% značených buněk
2 - 33°C	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
2 - 39°C	100 ± 0	59,3 ± 7,0	12,2 ± 3,3	38,6 ± 16,1

Další charakterizace klonální linie MHP36

Linie MHP36 byla dále charakterizována po 2 DIV v permisivní i nepermisivní kultuře. Bylo prokázáno, že buňky byly v permisivních podmínkách z více než 95% značeny X-gal (tj. vykazovaly histochemickou reakci s β -gal transdukčním markerem). Buňky byly dále testovány s dalšími dvěma protilátkami, jednou proti markeru neuronů PGP 9,5 (Wilson P.O.G., Barber P.C., Hamid Q., Power B.F., Dhillon A.P., Rode J., Day I.N.M., Thompson R.J. a Polak

J.M., 1988, Br. J. Exp. Pathol. 69, str. 91-104) a druhou proti bromodeoxyuridinu (BrdU) (markeru dělících se buněk) po jedné hodině inkubace s BrdU značícím médiem. V permisivních podmínkách byly BrdU značené buňky detekovány v celé kultuře. V permisivní kultuře nebyly nalezeny žádné PGP 9,5 pozitivní buňky.

Po přenesení do nepermisivních podmínek v SFM bez dalších přísad se tato linie přestala dělit a většina buněk zahynula aniž by se před tím diferencovala na maturované neurony nebo buňky gliového fenotypu. Ovšem v přítomnosti diferenciačních činidel (forskolin nebo kyselina retinová) byly buňky udrženy po delší dobu (5 až 14 DIV) a část buněk vykazovala po 2 DIV fenotyp neuronů nebo gliových buněk. MHP36 buňky vykazovaly v přítomnosti kyseliny retinové (10^{-9} M) morfologii zploštělých buněk s množstvím GFAP pozitivních fibrilárních buněk, exprese SV40 byla redukována na 30% a BrdU značení na 5% buněk. Nebyly nalezeny žádné PGP 9,5 pozitivní buňky. V přítomnosti forskolinu (10^{-8} M) byly ale bipolární PGP 9,5 pozitivní buňky detekovány často. GFAP značené fibrilární buňky v kultuře nebyly nalezeny, exprese SV40 byla snížena (na 42% všech buněk) a BrdU značení bylo nalezeno jen ve 4% populace. Tato fakta dále potvrzují, že MHP36 je pluripotentní neurální prekurzorová buněčná linie, jejíž budoucí vývoj je alespoň zčásti determinován induktivními signály.

Příklad 5

TRANSPLANTACE H-2K^B-tsA58 PREKURZOROVÝCH BUNĚK Z HIPPOCAMPU JAKO BUNĚČNÉ SUSPENZE CA 1 BUNĚK OBNOVUJE PROSTOROVOU PAMĚŤ A UČENÍ U KRYŠ S ISCHEMICKOU LÉZÍ CA 1.

V tomto experimentu byly studovány účinky štěpů buněčné suspenze E19 CA1 (CA1), E19 CA 3 (CA3) a nebo expandovaných kultur E14 transgenních H-2K^b-tsA58 hippocamálních neuroepiteliálních buněk (tsA58) (sklizených po páté pasáži), na nalezení skryté plochy (odpočívadla) v Morrisově vodním bludišti po 15 minutách 4VO ischemie (ISC), způsobující selektivní léze CA1 buněk. Pokud není popsáno jinak, postupovali jsme podle metod, popsaných v (Sinden J.D. a kol., 1995, Beh. Brain. Sci. 18, str.10), především jsme používali metody popsané v sekci 9 tohoto článku. Článek detailně popisuje metody vyvolání ischemie, transplantační metody a metody testování v Morrisově vodním bludišti. Následuje stručné shrnutí postupu.

Přechodná globální ischemie byla vyvolána u samců kryš (Wistar) metodou 4VO, při které byly v narkóze (2% halothan, tj. 70% NO₂ a 30% O₂) uzavřeny páteřní arterie pomocí elektrokoagulace přes křídlovitý otvor na prvním cervikálním obratli a pod karotidy byly vloženy úvazy a vyvedeny na povrch. O 24 hodin později byly úvazy utaženy a karotidy na 15 min uzavřeny. Krysy, které ztratily vzpřimovací reflex do dvou minut byly z experimentu vyloučeny. Rány byly rychle uzavřeny klipsy a zvířatům byl podán lignokain.

H-2Kb-tsA58 buňky byly vyjmuty z permissivní kultury a resuspendovány v Hankově vyváženém pufru s 1 mM n-acetyl-L-cysteinem. V tomto stavu byly buňky připraveny k transplantaci. 48 hodin před vyjmutím z permissivního prostředí byly buňky pulzně označeny 0,5 µCi/ml ³H-tymidinem.

Štěpy byly cíleně transplantovány do dorzálních oblastí obsahujících CA 1 buňky (2 místa/hemisféru, 2µl/místo, 25K

buněk/štěp pro každý typ buněk) 2 až 3 týdny po chirurgickém vyvolání ischemie. Krysám, které obdržely štěpy tsA58 buněk, byla po 14 dnů po transplantaci obden podávána imunosupresiva (cyklosporin A, Sandoz, 2,5 mg/krysu v Cremophore EL i.m.). Trénink (2 x denně) začal 12 týdnů po transplantaci (počet podnětů (Ns)= 7 až 11/skupinu).

Kontrolní krysy s falešnou lézí podstoupily kauterizaci vertebrálních artérií, ale už nikoliv podvázání karotid, a poté obdržely falešné transplantáty. Transplantace falešného štěpu v tomto případě znamená, že transplantální injekční jehla byla vpíchnuta do odpovídajícího místa, ale žádné buňky nebyly injikovány.

Pro trénink a testování byl použit černý polypropylénový kruhový bazén (2 m v průměru, 0,5 m vysoký s 0,25 m vody 26°C teplé, zakalené přidáním 200 ml mléka). Jako odpočívadlo byl použit 9cm čirý válec z plastu, umístěný 0,02 m pod hladinou uprostřed severo-západního kvadrantu bazénu. Na počátku pokusu byly krysy umístěny v bazénu čelem ke stěně a ponechány volně plavat dokud nenašly odpočívadlo, kde setrvaly 10 sekund než byly vyjmuty z bazénu. Ty, které neuspěly v hledání do 60 s. byly navedeny na odpočívadlo experimentátorem a jejich latence byla počítána jako maximální. Startovní pozice byly stanoveny jako severní, jižní, východní a západní a v pseudonáhodném pořadí s jedním startovním místem poblíž odpočívadla a jedním vzdálenějším byly používány každý den. Uplavaná dráha byla zaznamenána systémem pro obrazovou analýzu (HVS Image, VP 112) a digitálně zpracována jako posloupnost navigačních vektorů.

Chybová úsečka představuje 2 x standardní odchylku mezi skupinami ve vztahu skupiny x dny při analýze variance. Doba,

připraveny pro transplantaci. Tak, jako v Příkladu 5 byly štěpy bilaterálně souměrně transplantovány do dorzálních oblastí mozku, obsahujících CA1 buňky (2 místa/hemisféru, 2 μ l/místo, 25K buněk/ μ l pro každý typ štěpu. Transplantace proběhla 7 až 14 dnů po ischemii. Všechny krysy v tomto experimentu (včetně kontrolních netransplantovaných (s falešným štěpem) i těch s falešnou lézí) podstoupily po transplantaci 14 denní léčbu imunosupresivní látkou, cyklosporinem A (Sandoz, 2.5 mg/krysu v Cremphoru EL, i.m.). Trénink (2 x denně) započal 12 týden po transplantaci ($N_s = 7$ až 11/skupinu). Vyznačená odchylka odpovídá dvěma standardním odchylkám mezi skupinami ze vztahu skupiny x dny při analýze variance. Stejně jako v předchozím příkladu se doba, potřebná k nalezení odpočívadla u ischemických krys s CA1 a tsA58 štěpy nijak podstatně nelišila od kontrolních časů krys s falešnou lézí, které obdržely falešný štěp (CON). Navíc ani krysy s implantovaným štěpem MHP36 buněk nevykazovaly významnou odlišnost od kontrolní, CA1 a tsA58 skupin. Výsledky experimentu jsou shrnuty na Obrázku 10.

Tyto experimenty prokázaly, že transplantované prekurzorové buňky zřejmě odpovídají na signály z poškozeného mozku tím, že přijmou fenotyp, schopný nahradit a nebo kompenzovat funkční deficit, ke kterému by jinak poškození vedlo.

Další analýza variance (ANOVA) s opakovanými měřeními prokázala ze hlavní efekty jak skupin ($F_{4,38} = 2,92$, $P < 0,05$), tak bloků ($F_{5,896} = 36,5$, $P < 0,001$) jsou statisticky významné. Zároveň byla prokázána i statistická významnost lineárního koeficientu interakce ($F_{4,896} = 3,23$, $P < 0,02$). Porovnání lineárních koeficientů t-testem ukázalo, že ischemické krysy s falešným transplantátem

potřebná k nalezení odpočívadla, (latence), se pro ischemické krysy s oběma typy štěpů (CA1 i tsA58) významně nelišila od kontrolní skupiny (CON, krysy s falešnou lézí, které obdržely falešný štěp), zatímco ostatní ischemické krysy (s CA 3, nebo s falešnými štěpy) se významně lišily od kontrolní, CA 1 i tsA58 skupin v latenci i v dalších testech prostorového učení. Posmrtná analýza prokázala podobné selektivní ztráty hostitelských CA 1 neuronů (70 - 75%) u všech ischemických skupin včetně všech transplantovaných. Přežívání štěpu bylo výborné ve všech transplantovaných skupinách.

Test latence v Morrisově vodním bludišti udává čas, který subjekt potřebuje k doplávání na skryté odpočívadlo.

Výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 9.

Příklad 6

KLONÁLNÍ BUNĚČNÁ LINIE (MHP36), ODVOZENÁ OD H-2KB-tsA58 HIPPOCAMPÁLNÍCH PREKURZOROVÝCH BUNĚK, JE SCHOPNA OBNOVIT PROSTOROVÉ UČENÍ A PAMĚŤ U KRYŠ S ISCHEMICKOU LÉZÍ CA 1 BUNĚK.

V tomto experimentu byly studovány účinky štěpů buněčné suspenze E19 CA1 (CA1), expandovaných kultur E14 transgenních H-2K^b-tsA58 hippocamálních neuroepiteliálních buněk (tsA58) (sklizených po páté pasáži) a expandované klonální linie (MHP36), odvozené od nesmrtelné hippocampální prekurzorové linie E 14 na nalezení skryté plochy (odpočívadla) v Morrisově vodním bludišti po 15 minutách 4VO ischemie (ISC), způsobující selektivní léze CA1 buněk. Byly použity shodné metody, jako v Příkladu 5. MHP36 buňky byly vyjmuty z permissivní kultury a resuspendovány v Hankově vyváženém pufru s 1 mM n-acetyl-L-cysteinem. V tomto stavu byly

vykazovaly prokazatelně odlišnou latenci ve srovnání s kontrolní, i se třemi transplantovanými skupinami (min. $t_{38} = 2,29$, $P < 0,05$), zatímco kontrolní a transplantované skupiny se od sebe navzájem významně nelišily (všechna $t_{38} < 1$). Analýza variance uplavaných vzdáleností ukázala podobné výsledky, jako v případě latence.

Příklad 7

Testy ve vodním bludišti z Příkladů 5 a 6 byly zopakovány v další sérii experimentů (viz níže). V těchto experimentech byly všechny krysy imunosuprimovány každý druhý den po transplantaci intramuskulární injekcí cyklosporinu A (2,5 mg/krysu v Cremophore EL). Výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 11. Na tomto grafu je střední hodnota času, potřebného k nalezení odpočívadla, vyjádřena jako funkce tréninků za dva dny (4 tréninky). Úsečka ukazuje 2 x standardní odchylku ve vztahu: skupiny x tréninkové bloky při analýze variance.

Tyto výsledky dále potvrzují, že štěpy MHP36 buněk jsou schopné zvrátit ischemií navozenou poruchu učení. Jak kontrolní krysy (s falešnou lézí a falešným štěpem), tak ty, které obdržely MHP36 štěp, prokázaly signifikantně rychlejší zkracování latence a kratší uplavané vzdálenosti, potřebné pro dosažení odpočívadla, než krysy s ischemií, které obdržely falešný štěp.

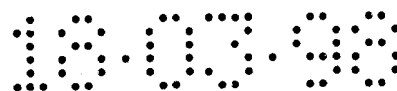
V dalším experimentu ve vodním bludišti byla porovnána ischemická skupina se štěpy MHP36 buněk (P24 až 32) (N=12) (plné čtverce) s ischemickou skupinou s falešnými štěpy (N=10) (plná kolečka) a kontrolní skupinou (falešná léze, falešný transplantát) (N=10) (prázdná kolečka). ANOVA latencí prokázala statisticky významný hlavní efekt jak skupin ($F_{2,29} = 27,80$, $P < 0,001$) a bloků



($F_{5,674} = 54,72$, $P < 0,001$), tak jejich interakce ($F_{10,674} = 5,81$, $P < 0,001$). Zároveň byla prokázána i statistická významnost lineárního koeficientu interakce ($F_{2,674} = 23,31$, $P < 0,001$). Porovnání lineárních koeficientů t-testem ukázalo u ischemické skupiny s falešnými štěpy významně odlišnou latenci ve srovnání s kontrolní skupinou a skupinou s MHP36 štěpy (min. $t_{29} = 5,54$, $P < 0,001$), zatímco mezi kontrolní a MHP36 skupinou nebyly nalezeny podstatné odchylky ($t_{29} = 1,01$). ANOVA test pro uplavanou vzdálenost a i další testy prostorového učení ve vodním bludišti skončily se stejným výsledkem, jako test latence.

Příklad 8

Experimenty z Příkladu 7 byly zopakovány s použitím MHP3 a MHP15 buněčných linií. MHP3 je jednou devíti klonálních linií, vzpomínaných v Příkladu 2 a zároveň je jednou z linií, které prokázaly odpovídavost na FGF2. Výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 12. Dále jsou zde zobrazeny výsledky kontrolní skupiny krys (znovu zvířata s falešnou lézí a falešným štěpem), ischemických krys s falešným štěpem a ischemických krys, kterým byly implantovány buňky MHP36 linie tak jako v Příkladu 7 (výše). Pro MHP3 a MHP15 bylo $N=9$. Je zřejmé, že štěpy MHP3 buněk mají za následek stejně efektivní výkony při učení, jako MHP36, tj. zvířata se učí podstatně rychleji než ischemická skupina, ale nikoliv pomaleji, než kontrolní skupina. Implantace MHP15 buněk má za následek jen středně efektivní léčbu, tj. zvířata se učí podstatně rychleji než ischemická skupina, ale podstatně pomaleji, než kontrolní skupina.



Příklad 9

Post mortem byl v experimentu 7A dvěma nezávislými pozorovateli stanoven rozsah ischemického poškození mozku pomocí barvení tkáňových řezů krystalovou violetí. Poškození bylo stanovováno v kortexu a striatu na dvou úrovních a v oblastech C1 až 4 v hippocampu na dalších dvou úrovních. Při použití pětistupňového měřítka bylo nalezeno poškození pouze v oblasti CA1 buněk s výjimkou dvou krys, které vykazovaly nepatrnou ztrátu CA3 buněk. Nezávisle na místech transplantace byla průměrná ztráta CA1 buněk na úrovni maximálního ischemického poškození (oblast vpředu mezi ušima, 5,7 mm) v rozmezí od 80% u ischemických krys s falešným transplantátem do 90% u ischemických krys s CA1 štěpem. Nebyly nalezeny žádné podstatné rozdíly mezi ischemickou skupinou s falešným štěpem a skupinami s transplantáty. Transplantáty E19 fetálních CA1 buněk vytvořily ohraničený štěp, lokalizovaný nad původní poškozenou oblastí CA1 buněk, podobně, jako již bylo dříve uvedeno. Populace buněk, značených ^3H -tymidinem byla nalezena roztroušená v celém hippocampu, kalózním tělísku a přidružené části neokortexu; některé shluky značených buněk byly nalezeny i v poškozené vrstvě CA1 buněk. Implantáty X-gal pozitivních MHP36 buněk vykazovaly mnohem omezenější distribuci: kromě oblastí přilehlých k místu vpichu byly MHP 36 buňky nalezeny pouze v hippocampu. To ukazuje jak na vyšší citlivost radioaktivního značení, tak na snižování exprese beta-galaktozidázy během poměrně dlouhé doby trvání tohoto experimentu. Jak prokázaly pilotní experimenty, jsou-li štěpy MHP36 buněk implantovány do nepoškozeného hippocampu, jsou X-gal pozitivní buňky nalezeny ve všech vrstvách CA neuronů, ale nikoliv v *gyrus dentalis*. (Jednotlivé

značené buňky byly nalezeny ve tkáni hippocampu, konkrétně v oblastech CA3 a CA4 buněk). Ovšem na rozdíl od štěpů do nepoškozeného hippocampu byla hustá populace X-gal značených buněk nalezena i uvnitř ischemií poškozené CA1 vrstvy. Stupeň osídlení buňkami štěpu se mezi jednotlivými krysami lišil tak, že se buňky nacházely buď jen v malé části CA1 oblasti, nebo osídlily téměř celou oblast, poškozenou lézí, jak bylo patrné z obou typů barvení. Například některé shluky buněk byly nalezeny v jedné hemisféře na různých místech poškozené CA1 vrstvy podél rostro-kaudální osy. Z toho je zřejmé, že buňky MHP36 linie mají schopnost shlukovat se v lézi poškozené vrstvě CA1 neuronů.

Časová studie migrace štěpů MHP36 buněk u ischemických krys s použitím anti- β -gal imunohistochemie prokázala, že migrace a agregace CA1 buněk je ukončena do 4 týdnů po transplantaci.

Navrhovaný vynález není omezen jen na již popsané Příklady. Ty slouží jen pro získání představy o vynálezu. Odborníkům budou nepochybně zřejmé mnohé další modifikace vynálezu kromě těch, které již byly zmíněny. Všechny takové modifikace jsou součástí přiložených patentových nároků.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob léčby behaviorálních a/nebo psychologických deficitů, v y z n a č u j í c í s e intracerebrální transplantací terapeuticky účinného množství pluripotentních neuroepiteliálních buněk.
2. Způsob léčby podle nároku 1. v y z n a č u j í c í s e t í m , že testy kognitivní funkce jsou provedeny před i po transplantaci.
3. Pluripotentní neuroepiteliální buňky, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jsou vhodné pro terapeutické použití, zvláště pro léčbu behaviorálních a/nebo psychologických deficitů.
4. Použití pluripotentních neuroepiteliálních buněk ve výrobě medikamentů pro léčbu behaviorálních a/nebo psychologických deficitů.
5. Způsob léčby podle nároků 1 a 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že buňky jsou podmíněně nesmrtelné.
6. Pluripotentní neuroepiteliální buňky podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jsou izolované.
7. Podmíněně nesmrtelné pluripotentní neuroepiteliální buněčné linie v y z n a č u j í c í s e t í m , že jsou vhodné terapeutické použití, zvláště pro léčbu behaviorálních a/nebo psychologických deficitů.
8. Způsob léčby podle nároků 1, 2 a 5 v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jedná o léčbu člověka.
9. Způsob léčby podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jedná o léčbu člověka a použité buňky jsou lidské.
10. Buňky podle nároků 3, 6 a 7 v y z n a č u j í c í s e t í m , že pocházejí z jediné buněčné linie.
11. Buňky podle nároků 3, 6 a 7 v y z n a č u j í c í s e t í m , že jsou směsí buněk ze dvou či více buněčných linií.

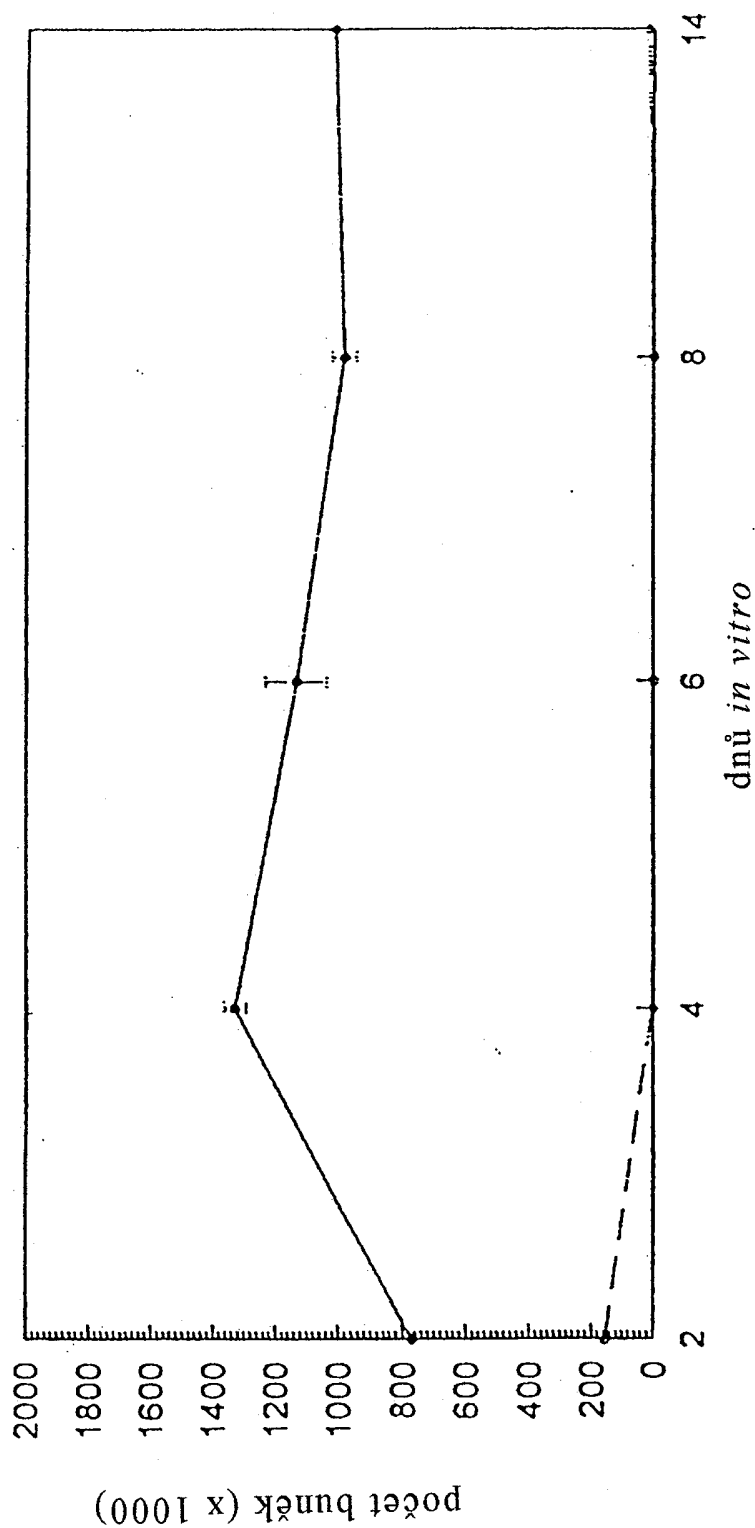
12. Buňky podle nároků 3, 6, 7, 10 a 11 v y z n a č u j í c í s e t í m , že mají vysoký stupeň potence.
13. Způsob léčby podle nároků 1, 2, 5, 8 a 9 v y z n a č u j í c í s e t í m , že proliferace buněk je zvýšena přidáním FGF2 *in vitro* v permisivních i nepermisivních podmínkách.
14. Buňky podle nároků 3, 6, 7, 10, 11 a 12 v y z n a č u j í c í s e t í m , že se liší od buněk nacházených v přírodě pouze v tom, že nesou exogenní DNA nezbytnou pro zajištění podmíněné nesmrtelnosti a případně i umožňující klonování.
15. Způsob léčby podle nároků 1, 2, 5, 8, 9 a 13 v y z n a č u j í c í s e t í m , že léčené behaviorální a/nebo psychologický deficit je výsledkem přechodného nedokrvení mozku pacienta.
16. Izolované lidské pluripotentní neuroepiteliální buňky.
17. Lidské pluripotentní neuroepiteliální linie buněk v y z n a č u j í c í s e t í m , že jsou podmíněně nesmrtelné.
18. Způsob produkce lidských podmíněně nesmrtelných, pluripotentních neuroepiteliálních buněk v y z n a č u j í c í s e t í m , že:
- a) buňky jsou získávány z lidského plodu v dostatečně časném stadiu své vývojové dráhy, aby si podržely schopnost diferenciaci na množství odlišných typů mozkových buněk.
 - b) do těchto buněk je vnesena DNA obsahující sekvenci, jež dává buňkám podmíněnou nesmrtelnost a zároveň je pod kontrolou vhodného kontrolního mechanismu
 - c) buňky jsou udržovány *in vitro* v permisivních podmínkách.
19. Způsob produkce buněk podle nároku 18 v y z n a č u j í c í s e t í m , že navíc obsahuje krok klonování buněk pro získání jedné nebo více buněčných linií.

20. Farmaceutická kompozice v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje buňky podle nároků 3, 6, 7, 10, 11, 12, 14 a 17 a farmaceuticky přijatelný nosič.
21. Způsob testování v y z n a č u j í c í s e udržováním populace buněk podmíněně nesmrtelné pluripotentní neuroepiteliální buněčné linie *in vitro*, kultivováním buněk v permisivních podmínkách v přítomnosti či nepřítomnosti růstových faktorů, a měřením proliferace buněk.
22. Způsob testování podle nároku 21 v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále zahrnuje kultivování buněk v nepermisivních podmínkách v přítomnosti či nepřítomnosti růstových faktorů, a měření proliferace buněk.
23. Savec v y z n a č u j í c í s e t í m , že podstoupil léčbu podle nároku 1 nebo některého na něm závislého nároku.
24. Buněčná linie podmíněně nesmrtelných pluripotentních neuroepiteliálních kmenových buněk v y z n a č u j í c í s e t í m , že může být získána kultivací kmenových buněk v permisivních podmínkách v bezsérovém médiu.
25. Buněčná linie podle nároku 24 v y z n a č u j í c í s e t í m , že bezsérové kultivační médium obsahuje růstový faktor.
26. Buněčná linie podle nároku 25 v y z n a č u j í c í s e t í m , že použitý růstový faktor je FGF2.
27. Buňky získané z buněčné linie podle nároků 24 až 26 pro použití v terapii.
28. Buňky podle nároku 27 v y z n a č u j í c í s e t í m , že terapií je léčba behaviorálního a/nebo psychologického deficitu.

29. Použití buněčné linie tak jak byla definována v nárocích 24 až 26 pro přípravu medikamentu pro intracerebrální transplantaci do poškozeného mozku.

MHP15 MTT test - změna počtu buněk ve dnech *in vitro*

(i) DMEM: F12 bez přísadků (SFM)



—●— při 33°C -o- při 39°C

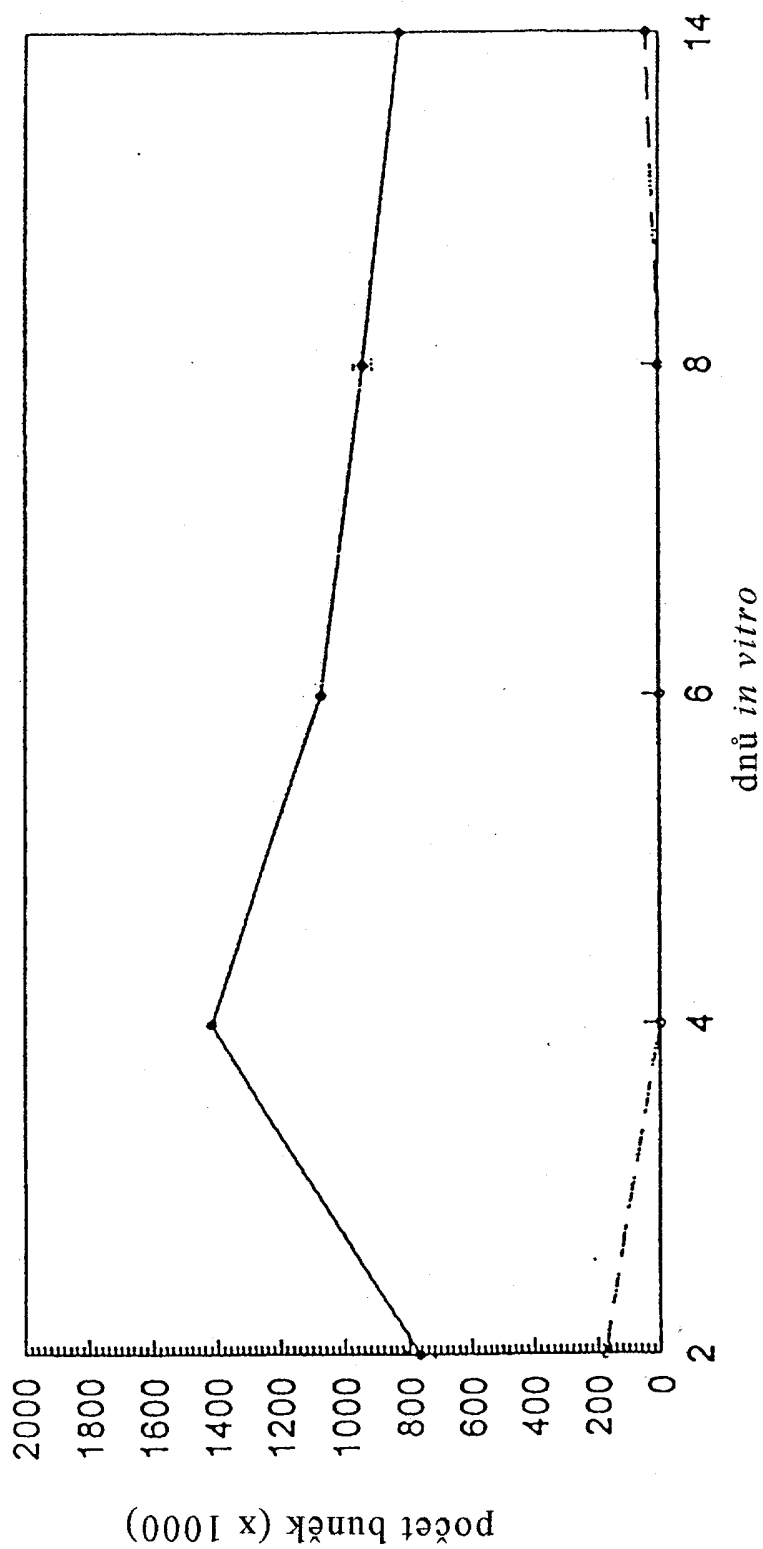
Obrázek 1

18.03.98

2/20

MHP15 MTT test - změna počtu buněk ve dnech *in vitro*

(ii) DMEM: F12 s přidavkem interferonu γ (12 U/ml)



—●— při 33°C -o- při 39°C

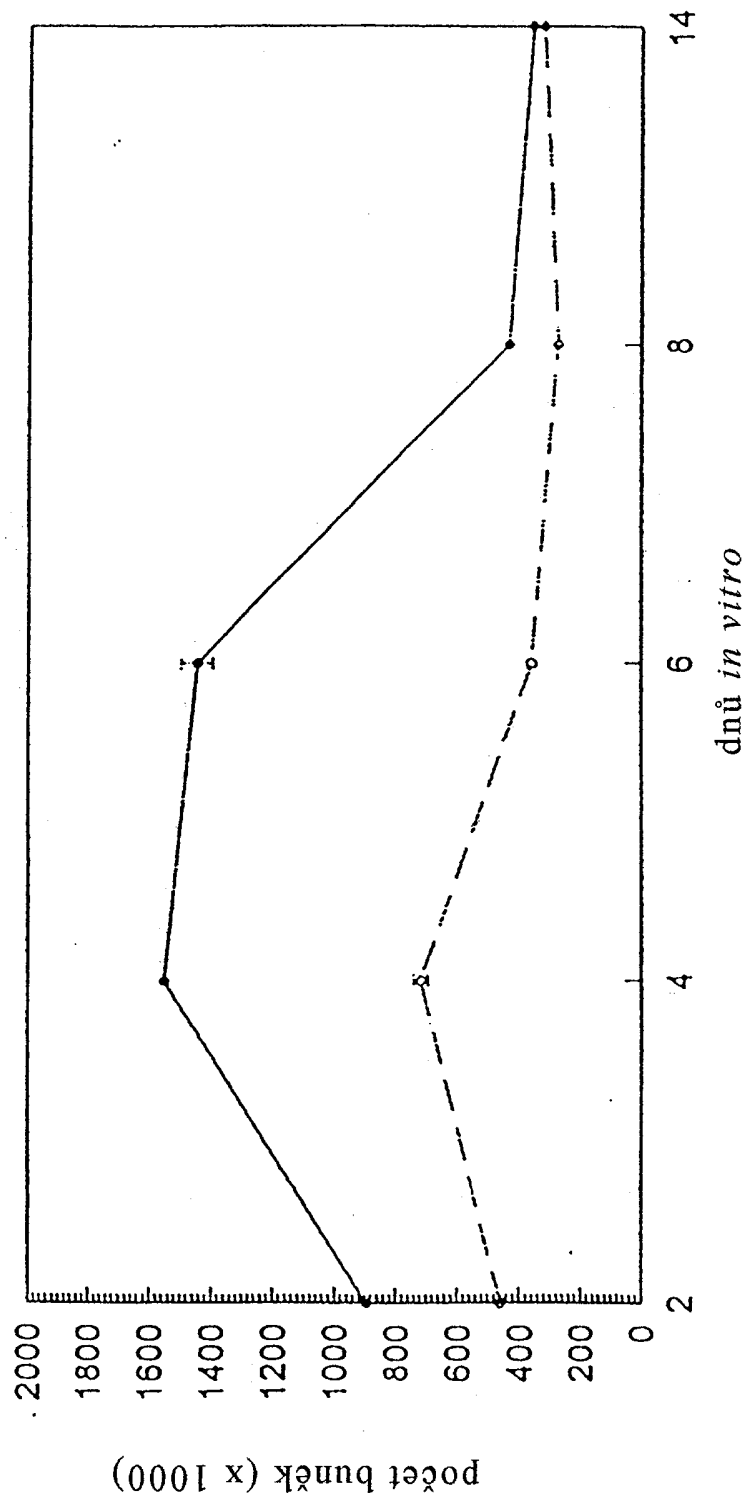
Obrázek 2

18.03.98

3/20

MHP15 MTT test - změna počtu buněk ve dnech *in vitro*

(iii) DMEM: F12 s přísávkem FGF2 (10 ng/ml)



—●— při 33°C -○- při 39°C

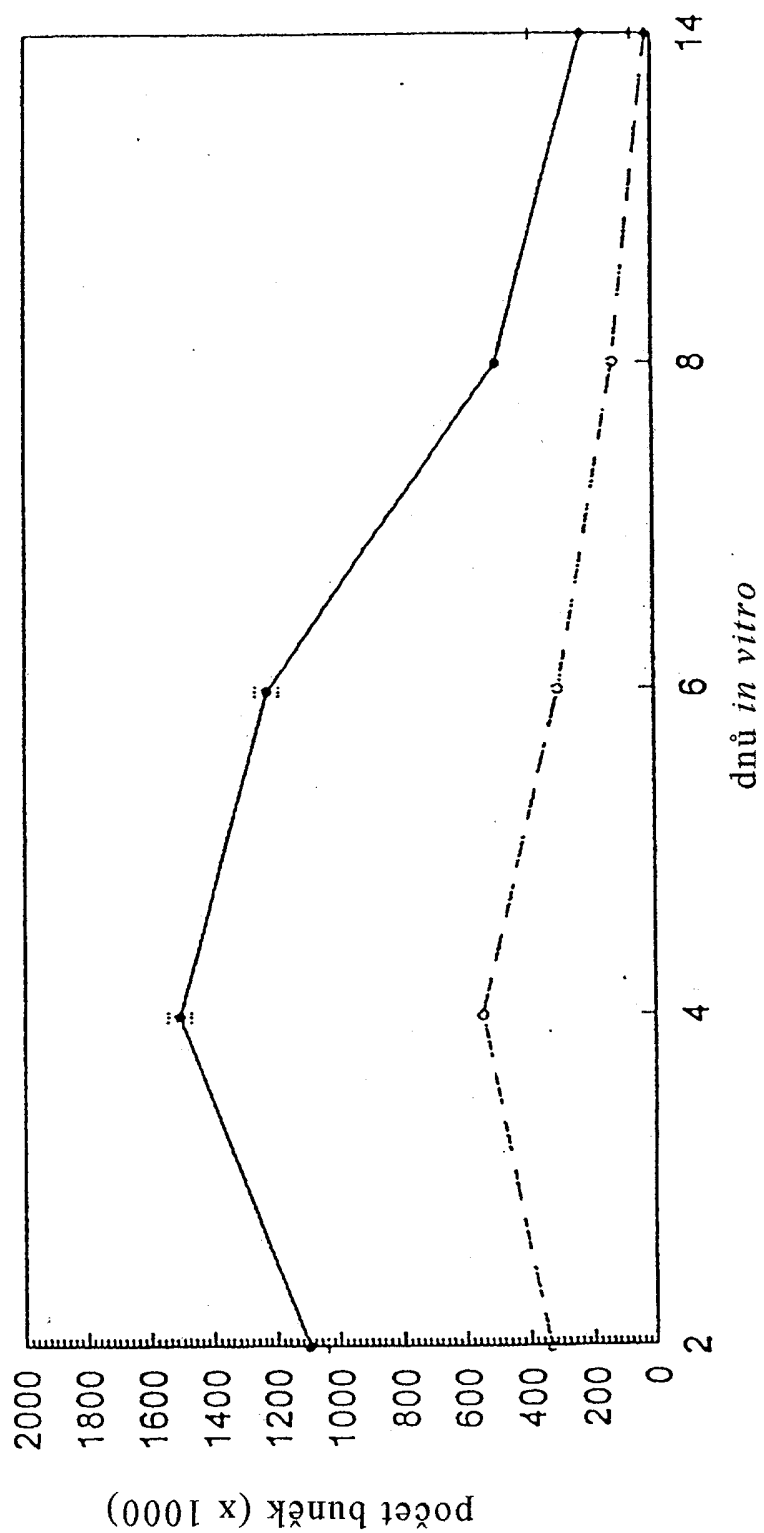
Obrázek 3

18.03.98

4/20

MHP15 MTT test - změna počtu buněk ve dnech *in vitro*

(iv) DMEM: F12 s přísávkou FGF2 & interferonu γ

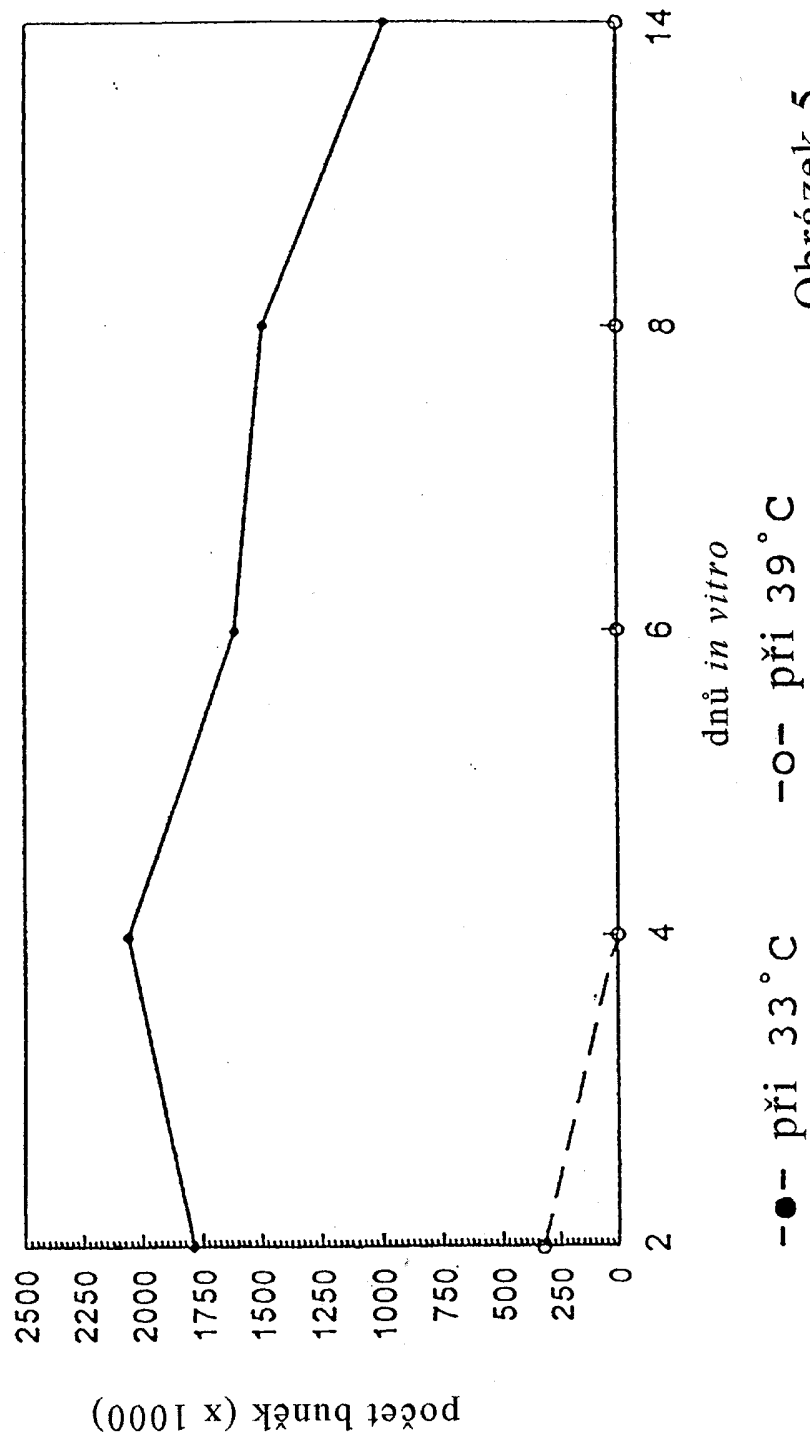


—●— při 33°C -o- při 39°C

Obrázek 4

MHP36 MTT test - změna počtu buněk ve dnech *in vitro*

(i) DMEM: F12 bez přísadků (SFM)



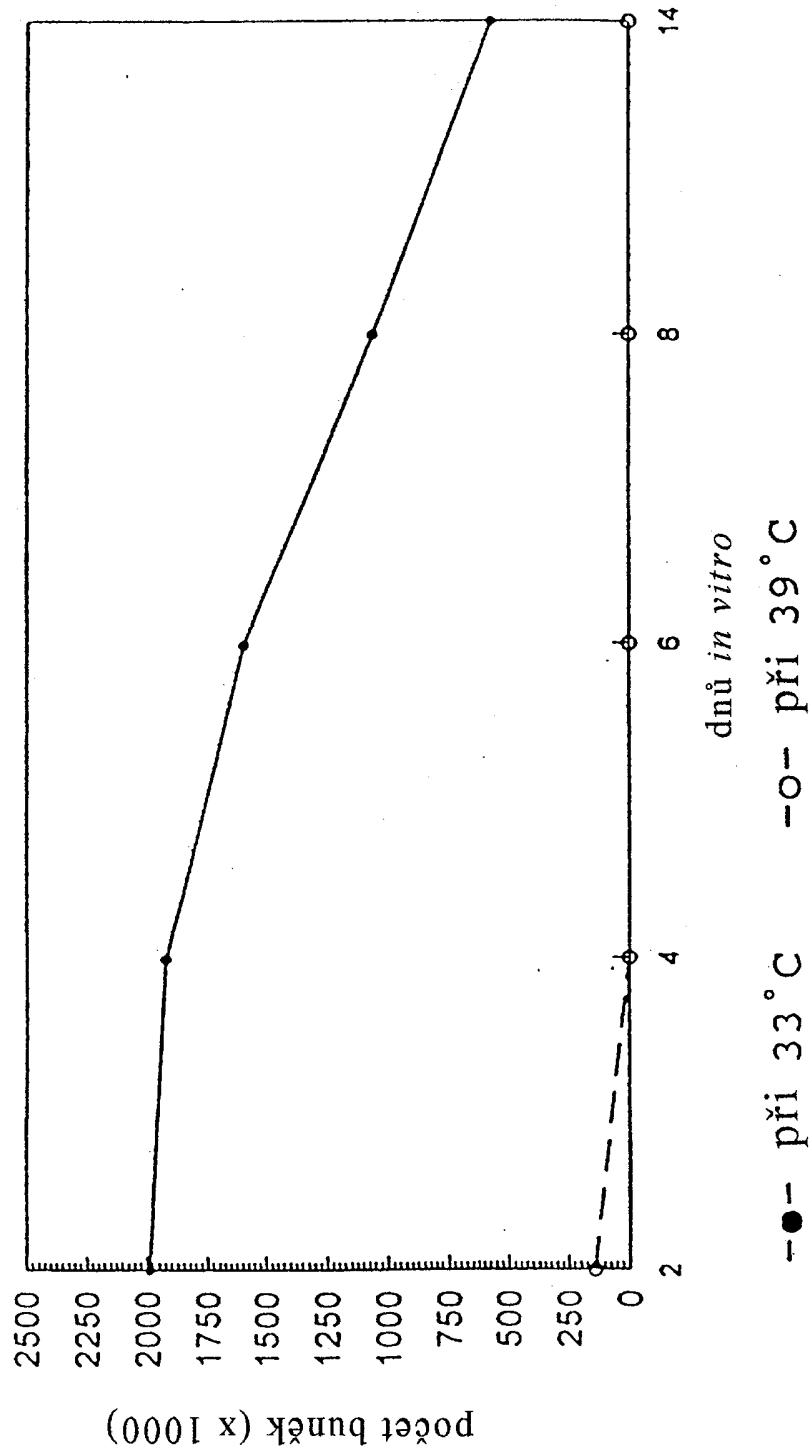
Obrázek 5

18.03.98

6/20

MHP36 MTT test - změna počtu buněk ve dnech *in vitro*

(ii) DMEM: F12 s přidavkem interferonu γ (12 U/ml)



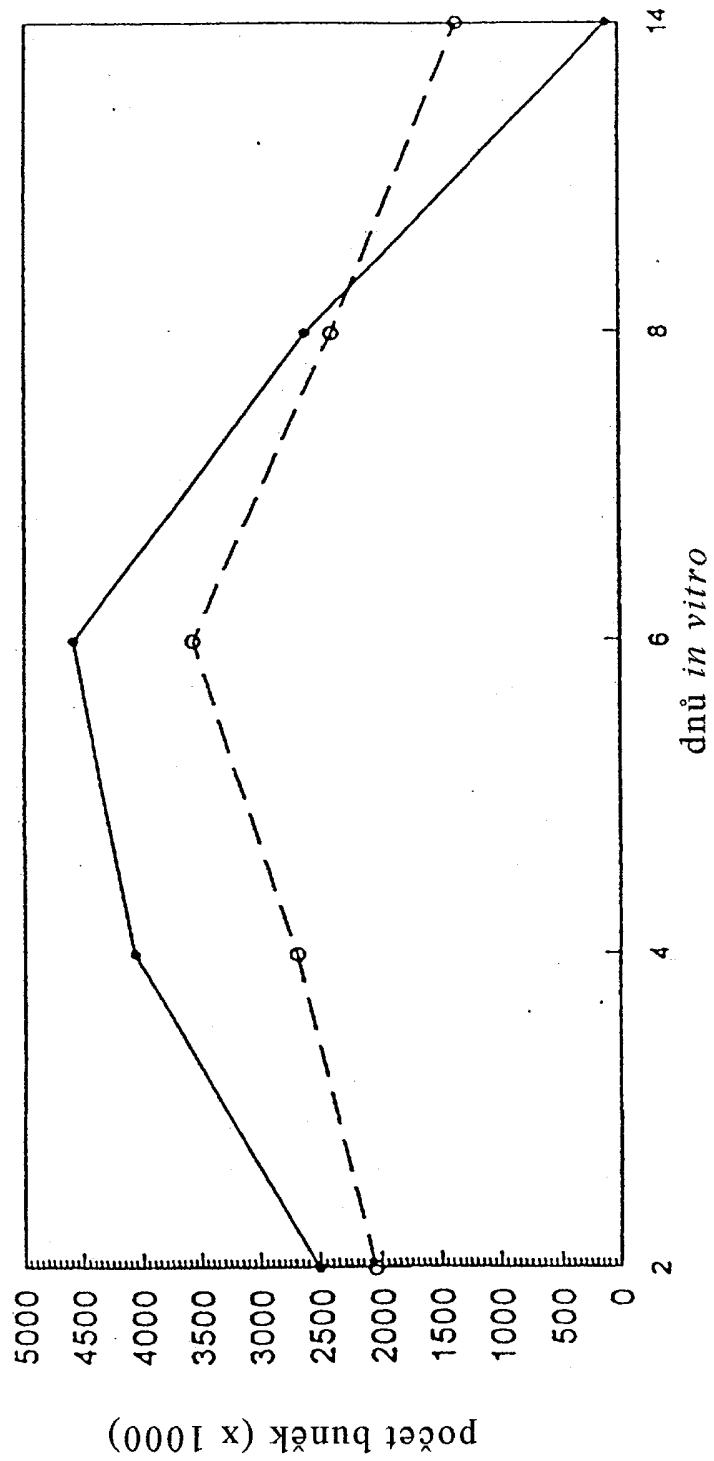
Obrázek 6

18.03.98

7/20

MHP36 MTT test - změna počtu buněk ve dnech *in vitro*

(iii) DMEM: F12 s přísávkem FGF2 (10 ng/ml)



—●— při 33°C -o- při 39°C

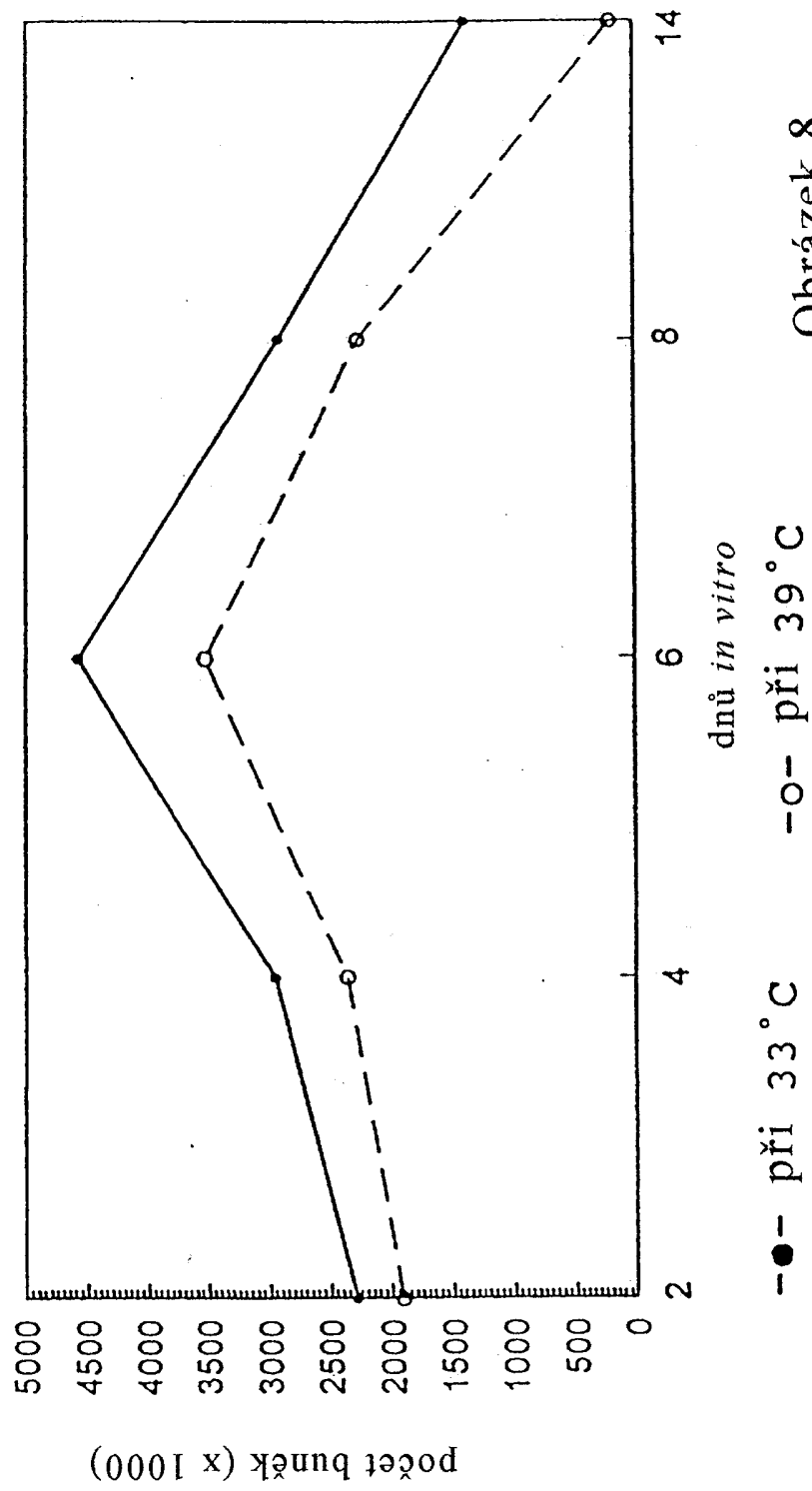
Obrázek 7

18.03.98

8/20

MHP36 MTT test - změna počtu buněk ve dnech *in vitro*

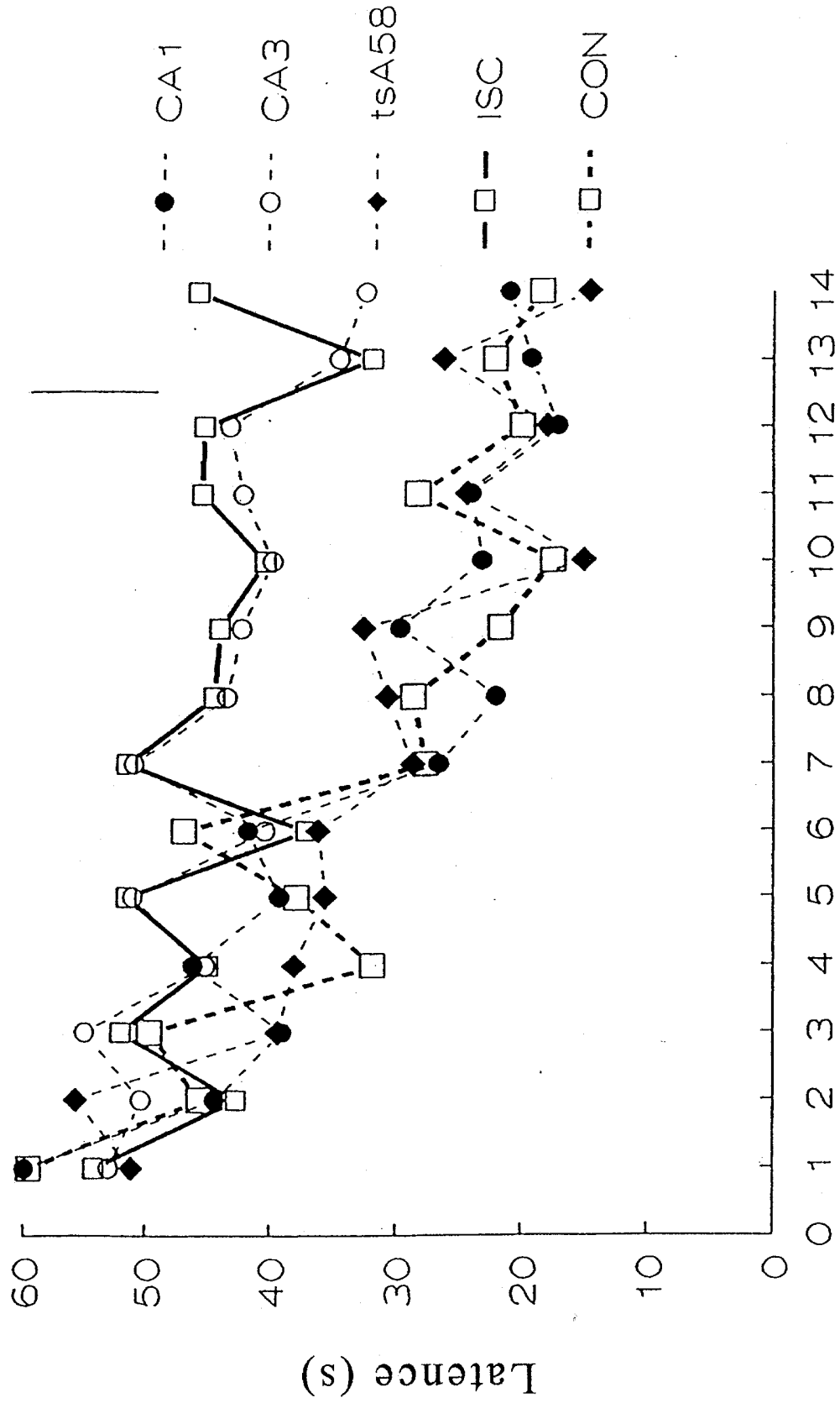
(iv) DMEM: F12 s přísávkou FGF2 & interferonu γ



Obrázek 8

18.03.98

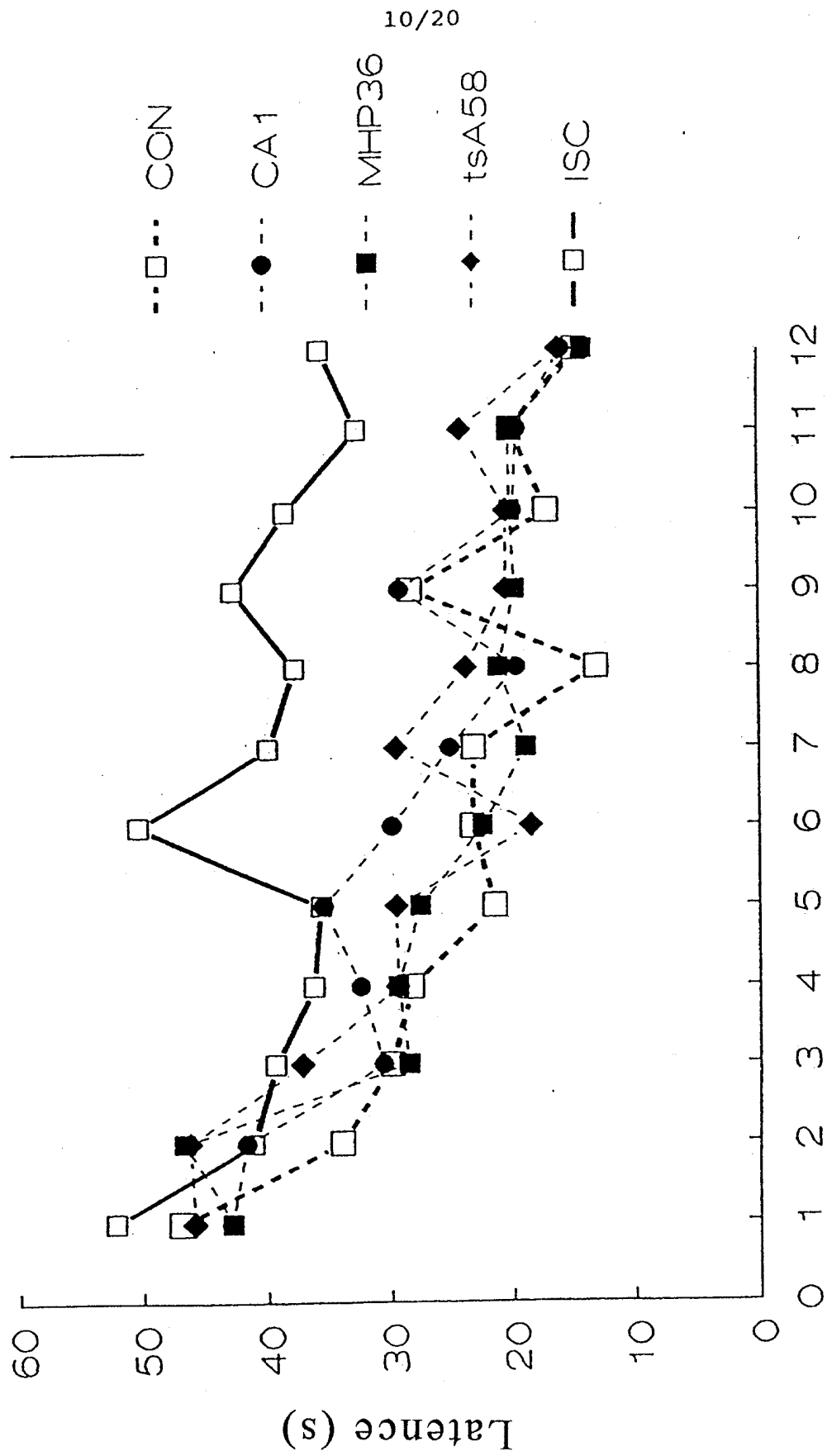
9/20



Obrázek 9

Počet dnů tréninku

18.03.98

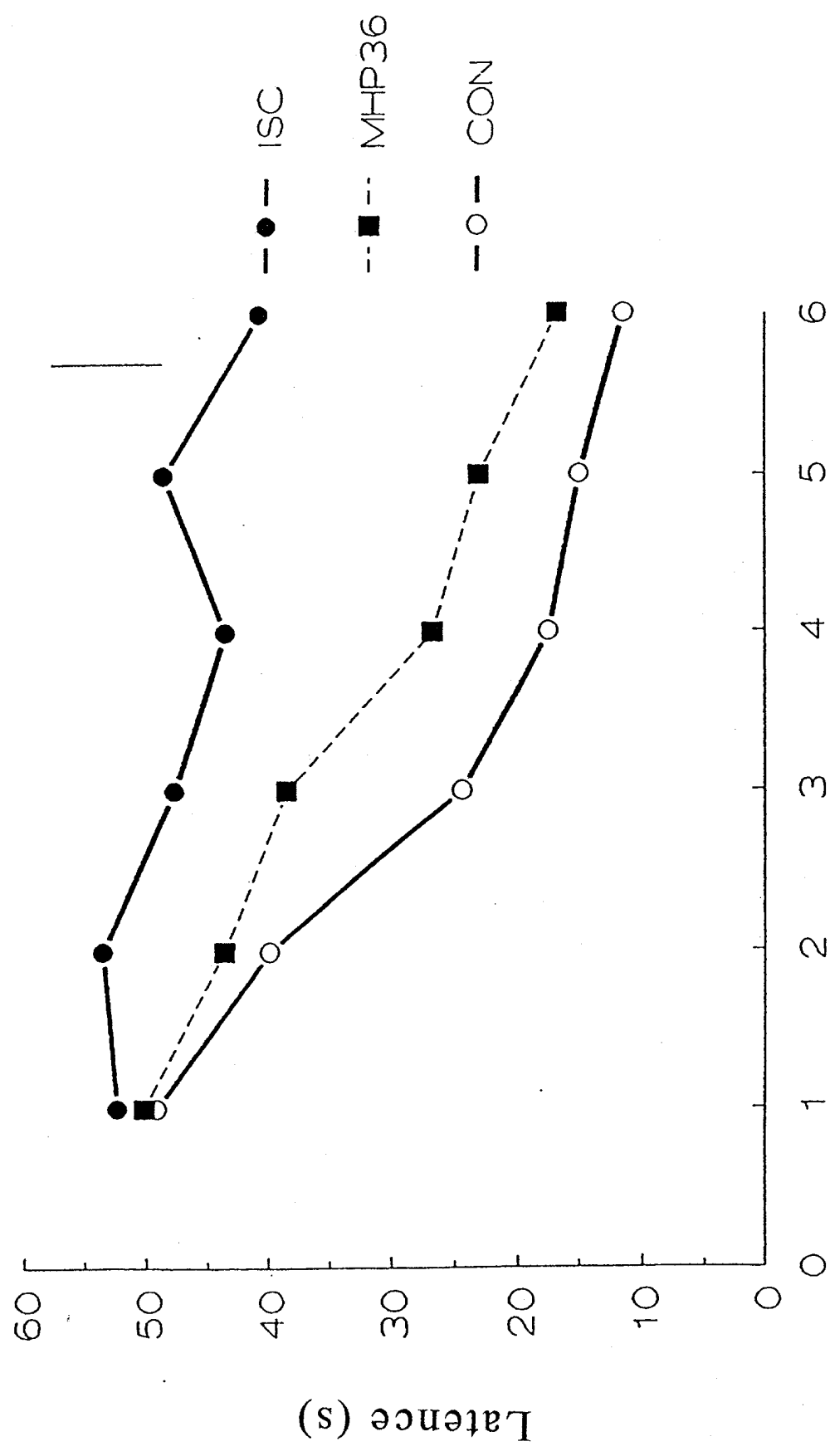


Počet dnů tréninku

Obrázek 10

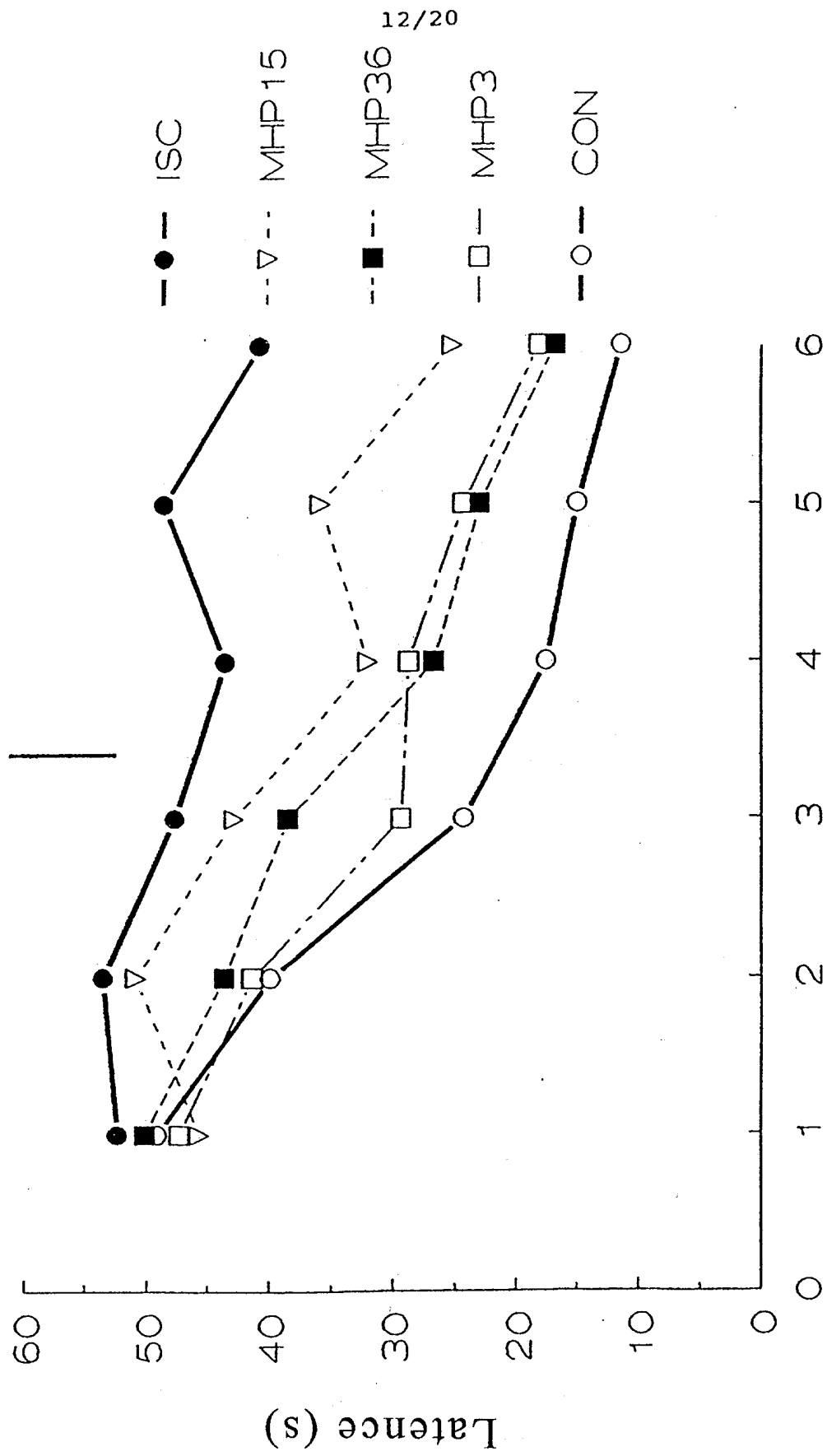
18.03.98

11/20



Počet tréninkových bloků Obrázek 11

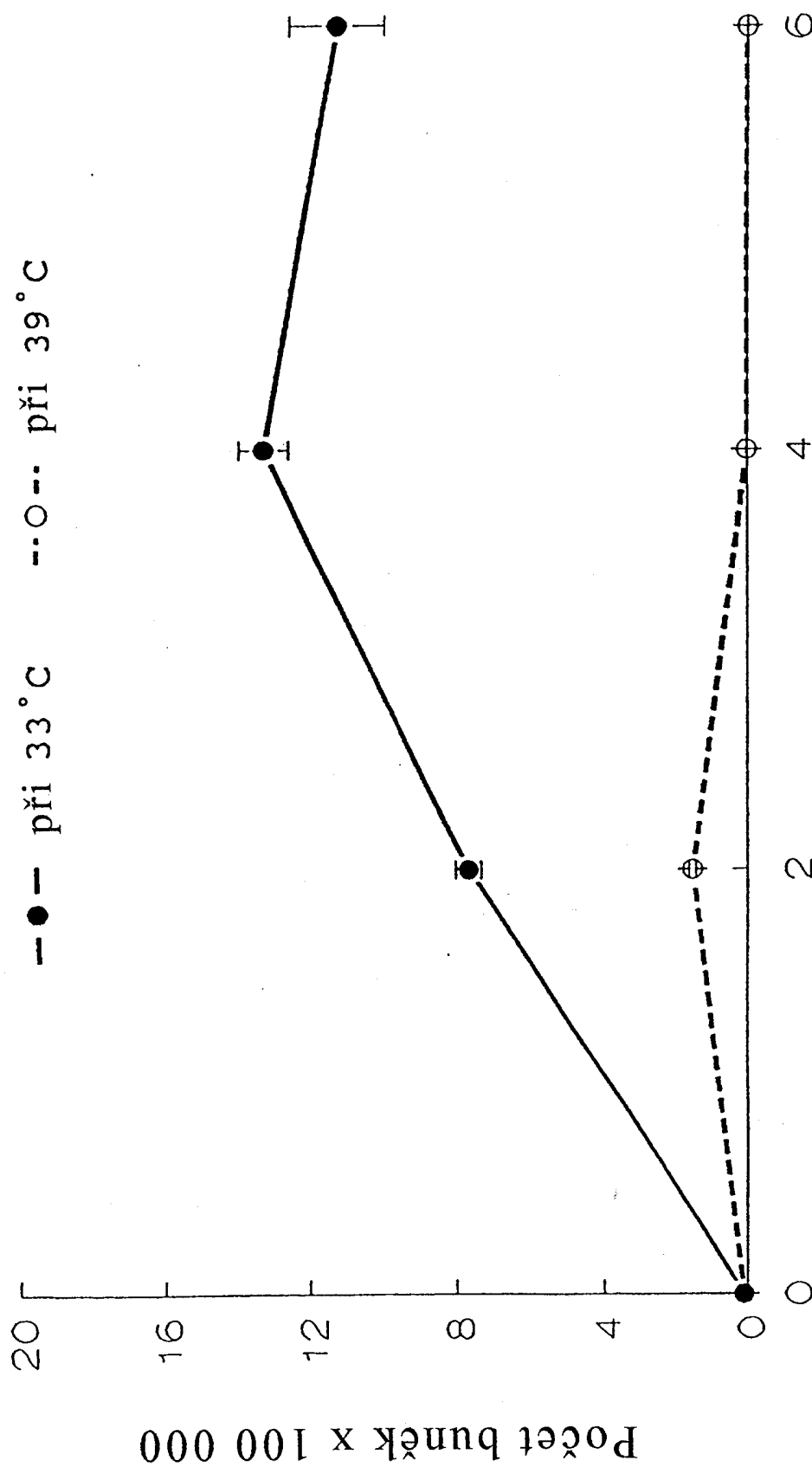
18.03.98



Počet tréninkových bloků Obrázek 12

MHP15 MTT test - změna počtu buněk ve dnech *in vitro*

(i) DMEM: F12 bez přísadků (SFM)



Obrázek 13

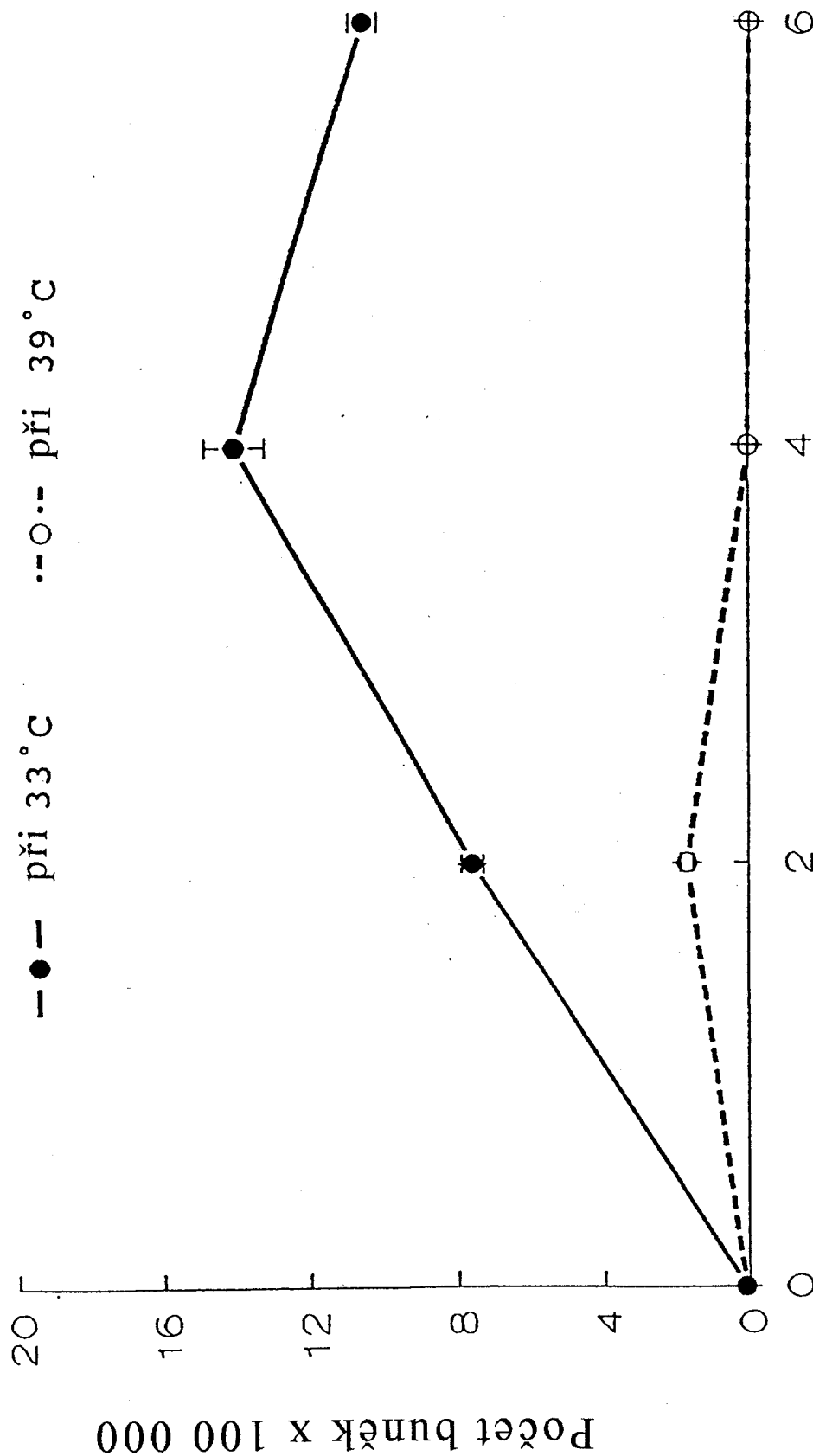
18.03.98

18.03.98

14/20

MHP15 MTT test - změna počtu buněk ve dnech *in vitro*

(ii) DMEM: F12 s přísávkem interferonu γ (12 U/ml)

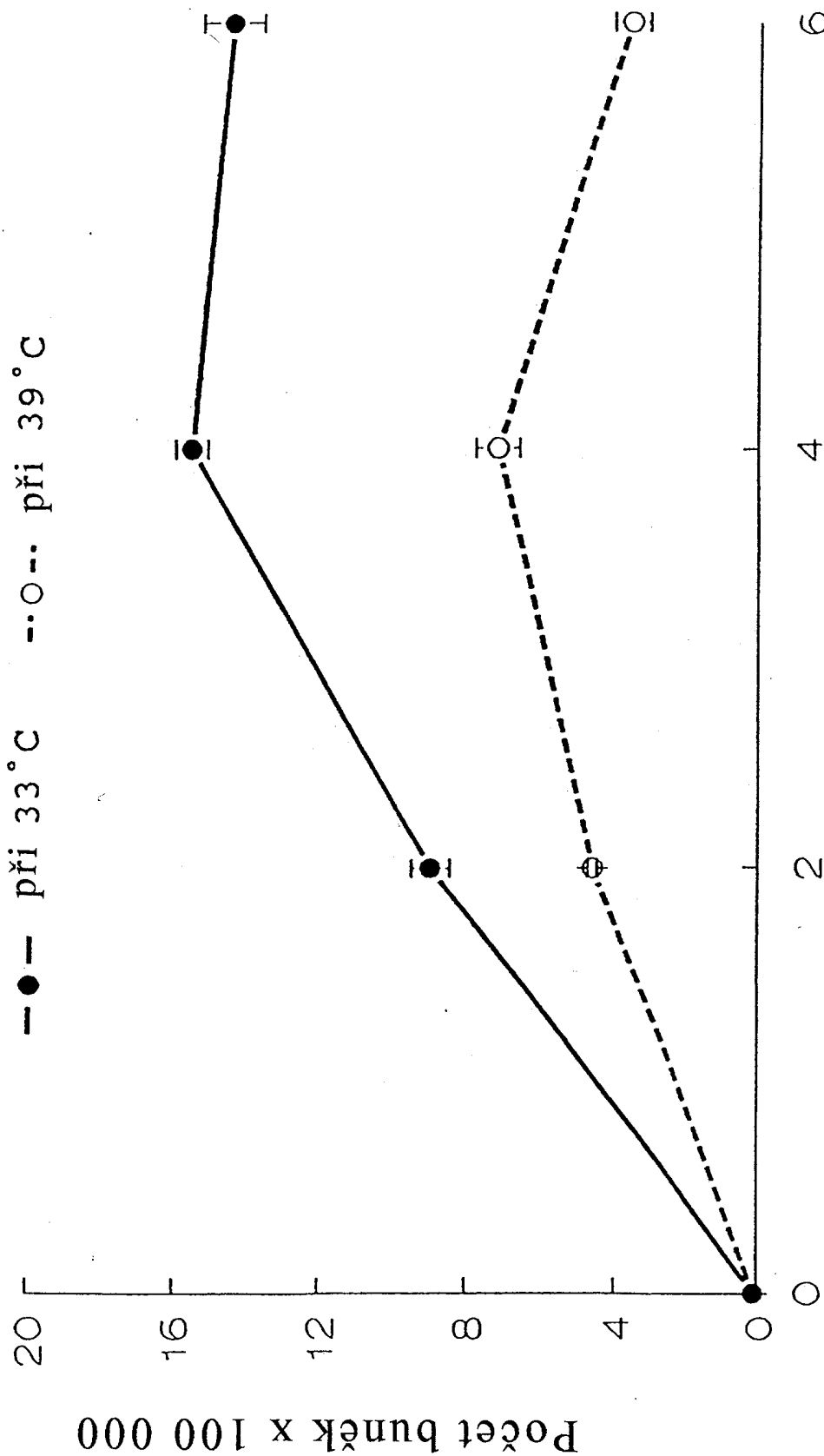


Obrázek 14

Počet dnů *in vitro*

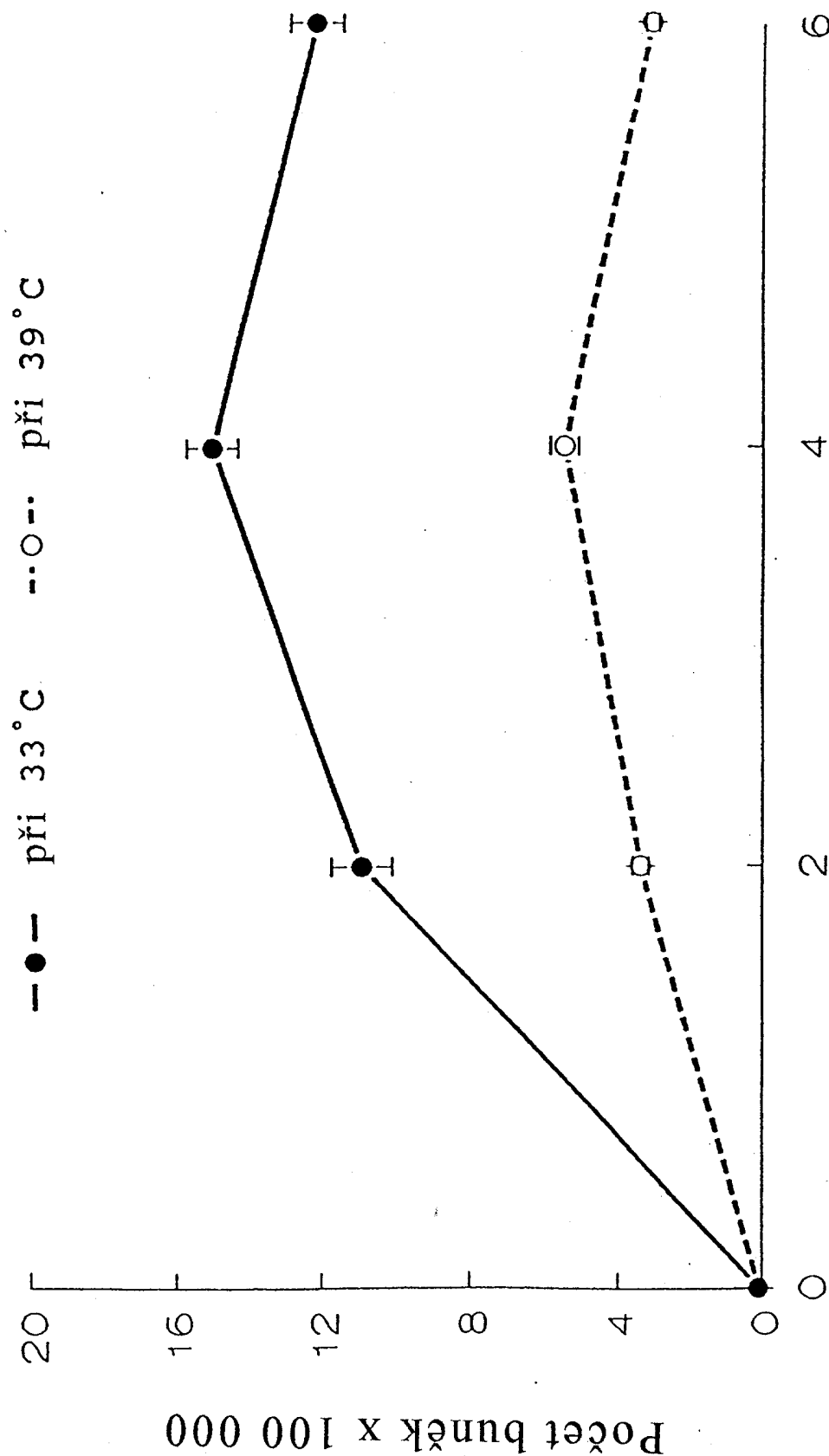
MHP15 MTT test - změna počtu buněk ve dnech *in vitro*

(iii) DMEM: F12 s přísávkem FGF2 (10 ng/ml)



MHP15 MTT test - změna počtu buněk ve dnech *in vitro*

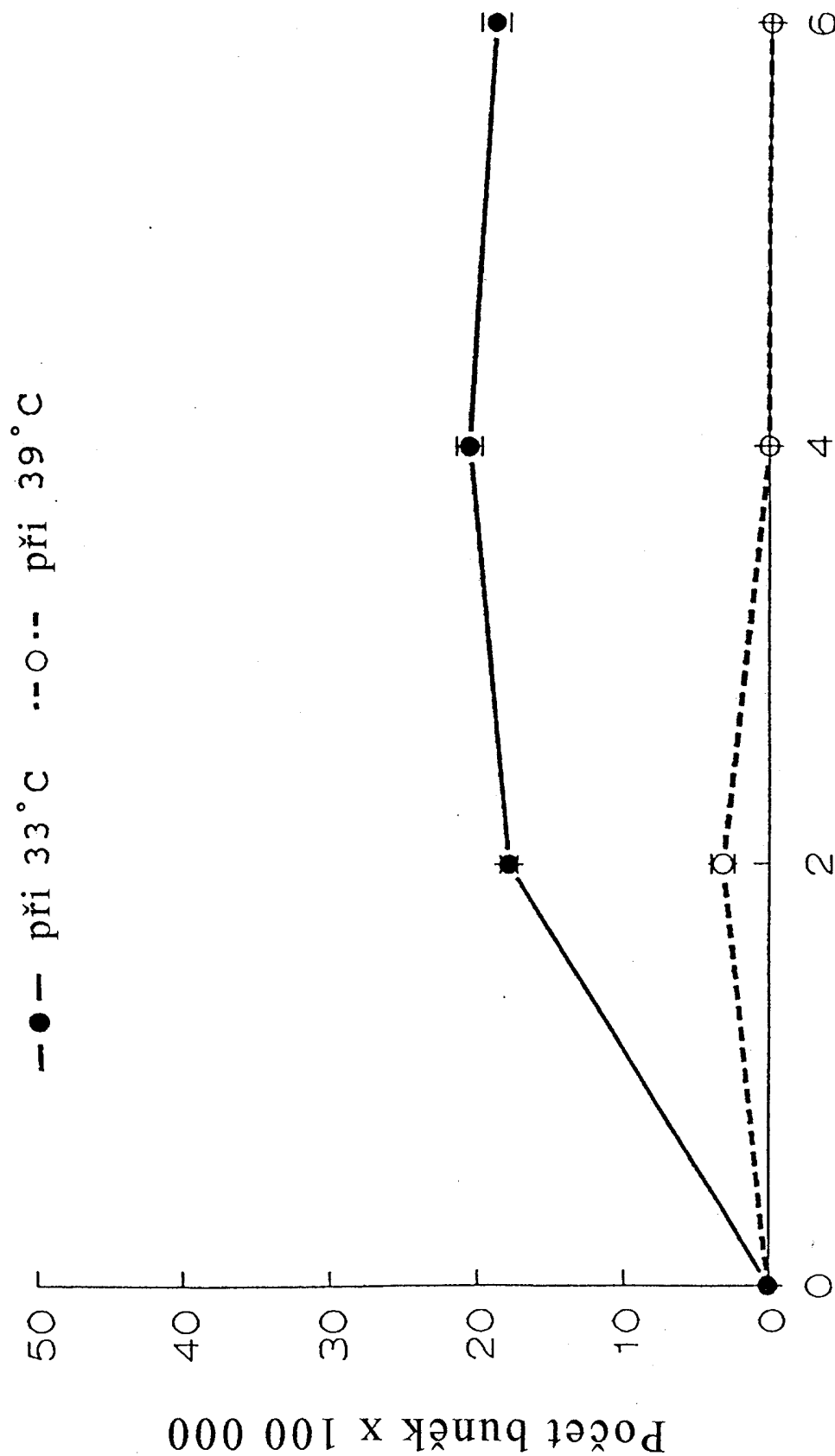
(iv) DMEM: F12 s přísávkou FGF2 & interferonu γ



Obrázek 16

MHP36 MTT test - změna počtu buněk ve dnech *in vitro*

(i) DMEM: F12 bez přísadků (SFM)

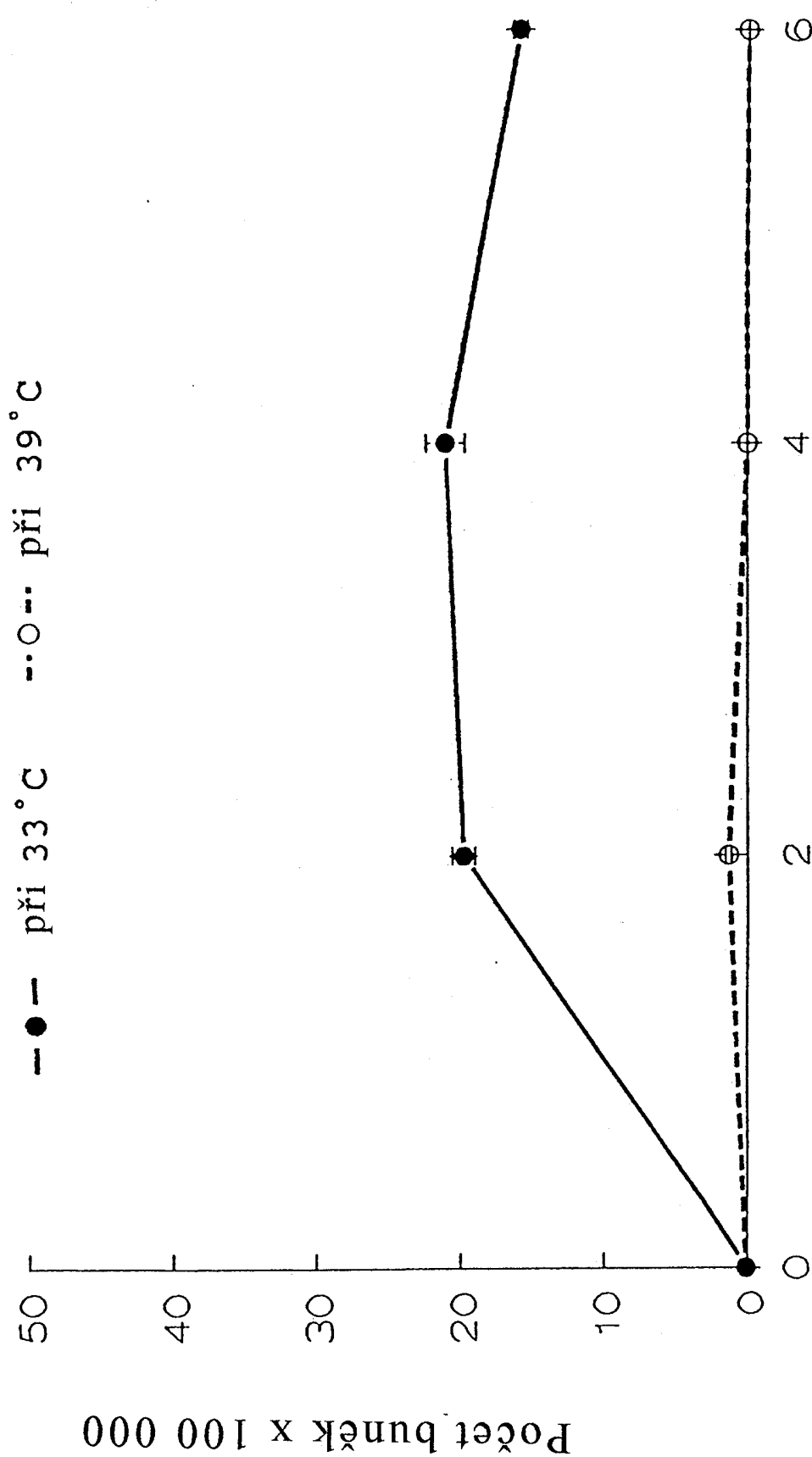


Obrázek 17
Počet dnů *in vitro*

18.03.98

MHP36 MTT test - změna počtu buněk ve dnech *in vitro*

(ii) DMEM: F12 s přísávkem interferonu γ (12 U/ml)

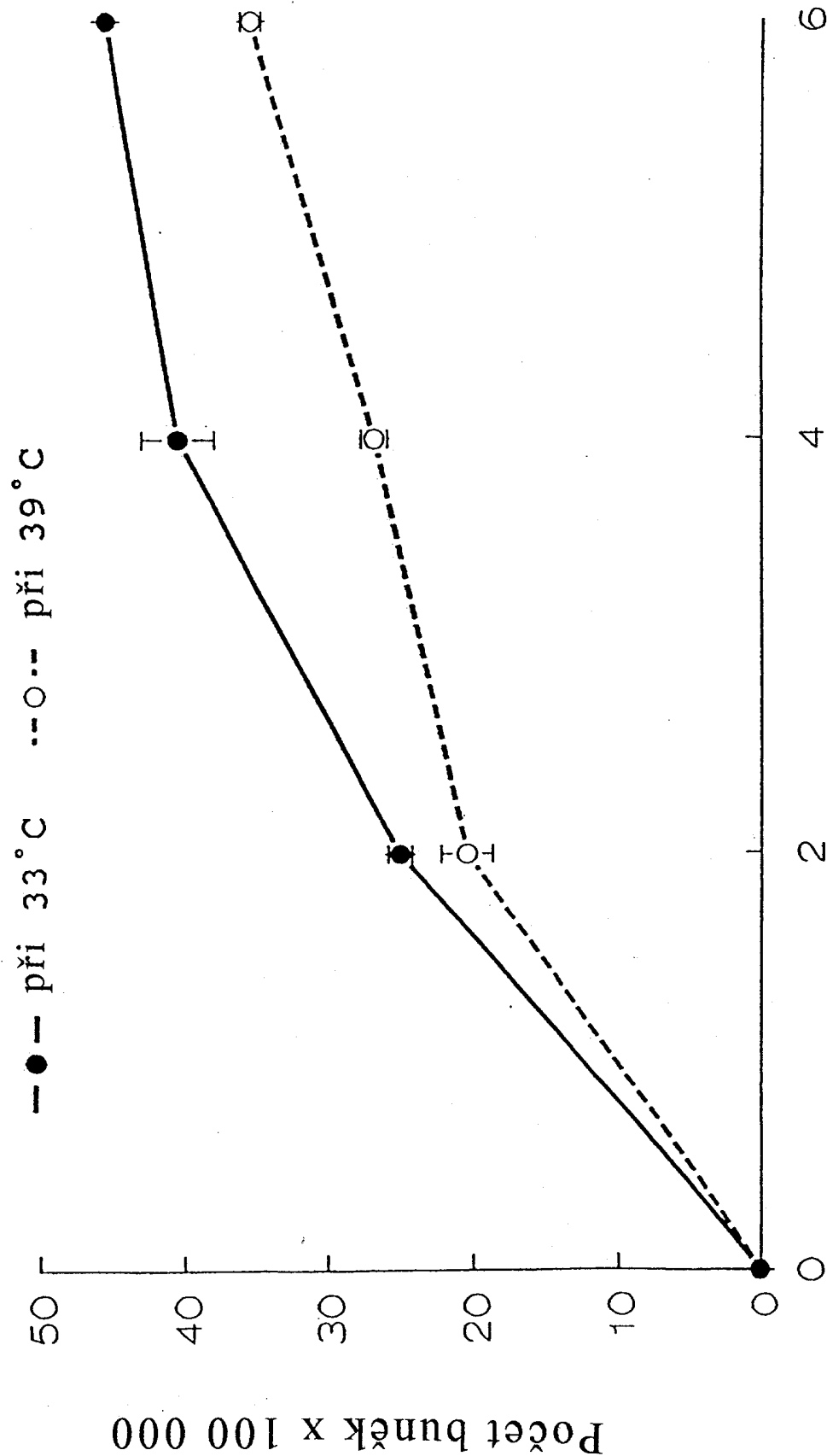


Obrázek 18
Počet dnů *in vitro*

18.03.98

MHP36 MTT test - změna počtu buněk ve dnech *in vitro*

(iii) DMEM: F12 s přísávkem FGF2 (10 ng/ml)



Obrázek 19

18.03.98

18.03.98

20/20

MHP36 MTT test - změna počtu buněk ve dnech *in vitro*

(iv) DMEM: F12 s přísávkou FGF2 & interferonu γ

