



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 38 495 T2 2008.08.28

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 941 125 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 38 495.0

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/19935

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 947 319.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1998/019712

(86) PCT-Anmeldetag: 06.11.1997

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: 14.05.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 15.09.1999

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 30.01.2008

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 28.08.2008

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: A61K 48/00 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

744882 08.11.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB, IT

(73) Patentinhaber:

Caritas St. Elizabeth's Medical Center of Boston,  
Inc., Boston, Mass., US

(72) Erfinder:

ISNER, Jeffrey M., Weston, MA 02193, US;  
ASAHARA, Takayuki, Arlington, MA 02174, US

(74) Vertreter:

Strohschänk und Kollegen, 81667 München

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR REGULATION DER ANGIOGENESE

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

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

**Beschreibung****HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0001]** Blutgefäße dienen dazu, lebende Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen und es Abfallprodukte von ihnen abzuführen. Angiogenese ist der Vorgang, durch welchen neue Blutgefäße gebildet werden, wie dies beispielsweise übersichtsmäßig durch Folkman und Shing, J. Biol. Chem. 267 (16), 10931–10934 (1992) beschrieben wird. Somit ist die Angiogenese ein kritischer Vorgang. Sie ist wichtig bei der Reproduktion, der Entwicklung und bei der Wundheilung. Eine unangemessene Angiogenese kann jedoch ernste Folgen haben. Beispielsweise beginnen feste Tumoren erst dann schnell zu wachsen und zu metastatisieren, nachdem sie infolge der Angiogenese mit Gefäßen verbunden worden sind. Da die Angiogenese für diese Funktionen so kritisch ist, muss sie sorgfältig gesteuert werden, um die Gesundheit aufrecht zu erhalten. Es wird angenommen, dass der Vorgang der Angiogenese mit dem Abbau der Basalmembran durch Proteasen beginnt, die von Endothelialzellen (ECs) abgeschieden werden, die durch Mitogene, wie z. B. den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und den Basis-Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) aktiviert werden. Die Zellen wandern und vermehren sich, was zur Ausbildung von festen, Endothelialzellen-Sprossen in das Grundgewebe hinein führt, worauf dann vaskuläre Schlingen gebildet werden und sich Kapillarröhrchen mit der Ausbildung von festen Verbindungen unter Abscheidung von neuen Basismembranen entwickeln.

**[0002]** Bei Erwachsenen ist die Ausbreitungsrate von Endothelialzellen im Vergleich zu anderen Zellarten im Körper typischerweise gering. Die Umsatzzeit dieser Zellen kann 1000 Tage übersteigen. Physiologische Ausnahmen, bei denen die Angiogenese zu einer starken Vermehrung führt, treten unter engen regulatorischen Bedingungen auf, die im weiblichen Reproduktionssystem und bei der Wundheilung angetroffen werden.

**[0003]** Die Rate der Angiogenese umschließt eine Änderung im örtlichen Gleichgewicht zwischen positiven und negativen Regulatoren für das Wachstum von Mikrogefäßen. Eine anormale Angiogenese tritt auf, wenn der Körper seine Kontrolle über die Angiogenese verliert, was entweder zu einem übermäßig oder zu einem nicht ausreichenden Wachstum von Blutgefäßen führt. Beispielsweise können sich Zustände wie Geschwüre, Schlaganfälle und Herzattacken aus dem Fehlen von Angiogenese ergeben, wie sie normalerweise für einen natürlichen Heilvorgang erforderlich ist. Andererseits kann eine übermäßig starke Blutgefäß-Ausbreitung das Tumorwachstum und die Tumorausbreitung, Erblindung, Psoriasis und rheumatoide Arthritis fördern.

**[0004]** Die therapeutischen Implikationen des angiogenetischen Wachstumsfaktors wurden zuerst von Folkman und Kollegen vor mehr als zwei Jahrzehnten beschrieben (Folkman, N. Engl. J. Med., 285: 1182–1186 (1971)). Somit gibt es Fälle, in denen ein stärkeres Ausmaß von Angiogenese wünschenswert ist, nämlich Wund- und Geschwür-Heilung. Jüngste Untersuchungen haben gezeigt, dass die Verwendung von rekombinanten Angiogenese-Wachstumsfaktoren, wie z. B. der Fibroblast-Wachstumsfaktor-Familie (FGF-Familie) (Yanagisawa-Miwa et al., Science, 257: 1401: 1403(1992) und Baffour et al., J. Vasc Surg, 16: 181–91 (1992)), des Endothelialzellen-Wachstumsfaktors (ECGF) (Pu et al., J Surg Res, 54: 575–83 (1993)) und in noch jüngerer Zeit des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) möglich ist, um die kolaterale Arterien-Entwicklung in Tiermodellen der myokardialen und Hinterlauf-Ischämie (Takeshita et al., Circulation, 90: 228–234 (1994) und Takeshita et al., J Clin Invest, 93: 662–70 (1994)) zu fördern und/oder zu verstärken.

**[0005]** Umgekehrt gibt es auch Fälle, in denen eine Hemmung der Angiogenese wünschenswert ist. Beispielsweise werden viele Erkrankungen durch eine andauernde unkontrollierte Angiogenese verstärkt. Bei Arthritis dringen neue kapillare Blutgefäße in die Gelenke ein und zerstören Knorpelgewebe. Bei Diabetes dringen neue kapillare Gefäße in den Glaskörper ein, führen zu Blutungen und verursachen Erblindung. Okulare Neovaskularisation ist die häufigste Ursache von Blindheit. Das Wachstum von Tumoren und der Ausbreitung von Metastasen hängen von der Angiogenese ab. Ein Tumor muss ständig das Wachstum von neuen kapillaren Blutgefäßen stimulieren, damit der Tumor selbst wachsen kann.

**[0006]** Die zurzeit durchgeführte Behandlung dieser Erkrankungen ist inadäquat. Es werden zurzeit Wirkstoffe getestet, welche eine fortgesetzte Angiogenese verhindern, beispielsweise Medikamente (TNP-470), monoklonale Antikörper und Antisens-Nukleinsäuren. Es werden jedoch neue Wirkstoffe benötigt, welche die Angiogenese hemmen.

**[0007]** Vor kurzem wurde die Möglichkeit einer Gentherapie zur Veränderung der Angiogenese gezeigt. Beispielsweise wurde in einem Kaninchenmodell die Förderung der Angiogenese bei der Behandlung von Ischämie gezeigt, sowie bei klinischen Untersuchungen an Menschen mit VEGF unter Verwendung eines mit Hydrogel beschichteten angioplastischen Ballons als Gen-Abgabesystem. Die erfolgreiche Übertragung und aufrechterhaltene Expression des VEGF-Gens in der Gefäßwand erhöhte im Folgenden die Gefäßneubildung in dem ischämischen Glied (Takeshita et al., Laboratory Investigation, 75: 487–502 (1996); Isner et al., Lancet, 348: 370 (1996)). Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine direkte intramuskuläre Injektion von DNA, die VEGF kodiert, in einem

ischämischen Gewebe Angiogenese induziert, durch die das ischämische Gewebe mit vermehrten Blutgefäßen versehen wird (Tsurumi et al., Circulation, 94(12): 3281–3290 (1996)).

**[0008]** Alternative Verfahren zur Regulierung der Angiogenese sind aus einer Reihe von Gründen weiterhin wünschenswert. Beispielsweise wird angenommen, dass die Anzahl und/oder Lebensfähigkeit von nativen Endothelialzellen (EC) im Laufe der Zeit abnehmen. Somit kann bei bestimmten Patientenpopulationen, beispielsweise bei älteren Menschen die residente Population von ECs, die in der Lage ist, auf verabreichte angiogenetische Cytokine zu reagieren, begrenzt sein.

**[0009]** Weiterhin können zwar Wirkstoffe, welche die Angiogenese fördern oder hemmen, an einer Stelle nützlich sein, doch können sie an einer anderen Stelle unerwünscht sein. Somit sind Mittel wünschenswert, die dazu dienen, die Angiogenese an einer bestimmten Stelle genauer zu regulieren.

**[0010]** Asahara et al., Circulation, 1996, Band. 94/8, Seite 1–37 (Abstract 1387) stellt fest, dass von Blut abgeleitete Endothelialzellen-Vorläufer in vivo an der Angiogenese teilhaben können.

**[0011]** WO 93/13807 beschreibt ein Verfahren zur Verabreichung von genetisch veränderten Endothelialzellen an Stellen mit Angiogenese um eine Gen-Therapie zu bewirken.

**[0012]** WO 89/03875 beschreibt die Re-Endothelialisierung von vaskulären Abstammungslinien durch das Unterbrechen der Strömung in einem verletzten Blutgefäß und durch das Anlegen von Abstammungslinien-Endothelialzellen an dieses Gefäß, die aus Mikrogefäßen des Patienten gewonnen worden waren.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0013]** Die vorliegende Erfindung sieht die Verwendung einer CD34<sup>+</sup> Endothelialzellen-Vorläuferzelle oder einer modifizierten Version hiervon bei der Zubereitung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung einer gewissen Ischämie durch ortsgerichtete Abgabe der Zusammensetzung über einen Katheder gemäß Anspruch 1 vor.

**[0014]** Es wurde erkannt, dass durch die Verwendung von Verfahren, die denjenigen ähnlich sind, die für HSCs verwendet werden, EC-Vorläufer bzw. -Progenitoren aus zirkulierendem Blut gewonnen werden können. In vitro differenzieren diese Zellen in ECs. Tatsächlich kann man eine multipotente, undifferenzierte Zelle solange verwenden, als sie noch in der Lage ist, zu einer EC zu werden, wenn man geeignete Wirkstoffe hinzufügt, die dazu führen, dass sie sich

in eine EC (Endothelialzelle) differenziert.

**[0015]** Es wurde auch gefunden, dass sich in vivo heterologe, homologe und autologe EC-Progenitor-Transplantate in Körperstellen inkorporieren, bei denen eine aktive Angiogenese oder eine Blutgefäßverletzung vorhanden ist, d. h. sie wandern selektiv zu derartigen Stellen. Diese Beobachtung war überraschend. Dergemäß kann man durch die vorliegende Erfindung auf derartige Stellen zielen.

**[0016]** Um die Angiogenese zu verstärken, werden bei der Behandlung von cerebrovaskulärer Ischämie, renaler Ischämie, pulmonarer Ischämie, Gliedmaßen-Ischämie, ischämischer Kardiomyopathie und myokardialer Ischämie Endothelialzellen-Vorläufer verabreicht. Um die Angiogenese weiter zu verstärken, können Endothelialzellen-Vorläufer verwendet werden, die modifiziert wurden, um ein Endothelialzellen-Mitogen zu exprimieren. Zusätzlich kann weiterhin ein Endothelialzellen-Mitogen oder eine Nukleinsäure verabreicht werden, die ein Endothelialzellen-Mitogen kodiert.

**[0017]** Die vorliegende Erfindung schafft Verfahren zur Verstärkung der Angiogenese. Gemäß diesem Verfahren werden Endothelialzellen-Progenitoren bzw. -Vorläufer aus dem Patienten, vorzugsweise aus seinem peripheren Blut isoliert und dem Patienten wieder verabreicht. Der Patient kann auch mit Endothelialzellen-Mitogen behandelt werden, um das Endothelialzellen-Wachstum zu verstärken.

**[0018]** Die vorliegende Erfindung umfasst die Zubereitung von pharmazeutischen Produkten für alle die bei den hier beschriebenen Verfahren ins Auge gefassten Verwendungen.

**[0019]** Weitere Gesichtspunkte der Erfindung werden im Folgenden erläutert.

## KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNG

**[0020]** Die [Fig. 1A](#) bis [Fig. 1D](#) zeigen die Zellform und -Ausbildung. [Fig. 1A](#) zeigt spindelförmige Anhaftungszellen ( $AT^{CD34+}$ ) sieben Tage nach dem Beschichten von  $MB^{CD34+}$  auf Fibronectin mit Standardmedium (10). 48 Stunden nach dem Aufbringen einer Kokultur von  $MB^{CD34+}$  die mit Dil-Färbemittel (molekulare Probe) markiert waren, und von nicht markierten  $MB^{CD34-}$  (Verhältnis von 1:100) auf eine mit Fibronectin beschichtete Schale wurden eine Netzwerkausbildung ([Fig. 1B](#)) und schnurartige Strukturen ([Fig. 1C](#)) beobachtet. Diese schnurartigen Strukturen bestanden hauptsächlich aus Zellen ( $AT^{CD34+}$ ), die von mit Dil markierten  $MB^{CD34+}$  abgeleitet waren. Beginnend 12 Stunden nach der Ko-Kultivierung zeigten von  $MB^{CD34+}$  abgeleitete Zellen mehrfache Schwerpunkte einer Cluster-Bildung ([Fig. 1D](#), [Fig. 1E](#)).  $AT^{CD34+}$  keimten von der Peripherie her auf

während runde Zellen in der Mitte zurückbleiben und sich vom Cluster mehrere Tage später ablösen. Nach fünf Tagen wurde eine Aufnahme von acLDL-Dil (molekulare Probe) in AT<sup>CD34+</sup> an der Peripherie aber nicht in der Mitte der Cluster beobachtet ([Fig. 1F](#), [Fig. 1G](#)).

**[0021]** [Fig. 2](#) zeigt eine Anzahl von AT<sup>CD34+</sup> 12 Stunden und 3 Tage nach einer Einzelkultivierung von MB<sup>CD34+</sup> nur auf Kunststoff (CD34+/non), auf einer Kollagenbeschichtung (CD34+/COL) oder Fibronectin (CD34+/FN) und von MB<sup>CD34-</sup> auf Fibronectin (CD34-/FN). AT<sup>CD34+</sup> lieferte eine signifikant größere Anzahl von Zellen nach 12 Stunden und nach 3 Tagen, wenn sie auf Fibronectin aufgebracht worden waren ( $p < 0,05$  durch ANOVA).

**[0022]** [Fig. 3](#) zeigt die FACS-Analyse von frisch isolierten MB<sup>CD34+</sup>, AT<sup>CD34+</sup> nach sieben Tagen in der Kultur und HUVECs. Die Zellen wurden mit FITC unter Verwendung von Antikörpern gegen CD34, CD31 (Biodesign); Flk-1, Tie-2 (Santa Cruz Biotechnology) und CD45 markiert. Alle Ergebnisse wurden durch Dreifach-Experimente bestätigt. Der dunkel ausgefüllte Bereich eines jeden Rechtecks bezeichnet das negative Antigen-Gate, während der weiße Bereich das positive Gate kennzeichnet. Für einzelne Gates angegebene Nummern bezeichnen den Prozentsatz von Zellen, die durch Vergleich mit einer entsprechenden negativen Kontroll-Markierung ermittelt wurden.

**[0023]** [Fig. 4](#) zeigt die Expression von ecNOS mRNA in MB<sup>CD34-</sup>, MB<sup>CD34+</sup>, AT<sup>CD34+</sup>, in menschlichen glatten Koronar-Muskelzellen (HCSMCs) und HUVECs. Die DNA wurde jeweils von ungefähr  $1 \times 10^6$ -Zellen revers transkribiert. Gleiche Mengen der sich ergebenden DNA wurden durch PCR verstärkt (40 Zyklen) mit gepaarten Primern (Sens/Antisens: AAG ACA TTT TCG GGC TCA CGC TGC GCA CCC/TGG GGT AGG CAC TTT AGT AGT TCT CCT AAC, SEQ ID NO: 1) um die ecNOS mRNA zu detektieren. Gleiche Mengen des verstärkten Produkts wurden in einem 1%-igen Agarosegel analysiert. Es wurde ein einziges Band beobachtet, das der erwarteten Größe (548 bp) für ecNOS entsprach. Spur 1 = MB<sup>CD34-</sup> Spur 2 = MB<sup>CD34+</sup>, Spur 3 = AT<sup>CD34+</sup> nach 3 Tagen, Spur 4 = AT<sup>CD34+</sup> nach 7 Tagen, Spur 5 = HCSMCs, Spur 6 = HUVECs.

**[0024]** [Fig. 5](#) ist eine graphische Darstellung, welche die NO-Freisetzung von AT<sup>CD34+</sup> wiedergibt, die mit einer NO-spezifischen polarographischen Elektrode gemessen wurde, die mit einem NO-Messgerät (Iso-NO, World Precision Instruments) (17) verbunden war. Die Eichung der NO-Elektrode wurde täglich vor der experimentellen Protokollaufnahme gemäß der folgenden Gleichung durchgeführt  $2\text{KNO}_2 + 2\text{KI} + 2\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow 2\text{NO} + \text{I}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{K}_2\text{SO}_4$ . Eine Standard-Eichkurve wurde dadurch erhalten, dass gestuf-

te Konzentrationen von  $\text{KNO}_2$  (0–500 nmol/l) der Eichlösung zugegeben wurden, die KI und  $\text{H}_2\text{SO}_4$  enthielt. Die Spezifität der Elektrode bezüglich NO wurde zuvor durch Messung von NO aus authentischem NO-Gas dokumentiert (18). AT<sup>CD34+</sup>, die in einer Platte mit sechs Vertiefungen kultiviert worden waren, wurden gewaschen und dann in 5 ml gefilterter Krebs-Henseleit-Lösung gebadet. Die Zellplatten wurden auf einem Plättchen-Heizergerät (Lab Line Instruments) gehalten, um die Temperatur zwischen 35°C und 37°C zu halten. Für die NO-Messung wurde die Mess-Sonde vertikal in die Vertiefungen eingeführt und die Spitze der Elektrode blieb 2 mm unter der Oberfläche der Lösung. Die Messung von NO, ausgedrückt als pmol/ $10^5$  Zellen, wurde in einer Vertiefung mit inkrementalen Dosen von VEGF (1, 10, 100 ng/ml) und Ach (0,1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. Es wurden HUVECs und ECs aus Rinderaorta als positive Kontrollen verwendet. Für eine negative Kontrolle wurden HCSMCs verwendet und es konnte kein NO gemessen werden. Alle wiedergegebenen Werte stellen Mittelwerte von zehn Messungen für jede Gruppe dar.

**[0025]** Die [Fig. 6A](#) bis [Fig. 6D](#) zeigen Ko-Kultivierung von MB<sup>CD34+</sup> mit HUVECs. Frisch isolierte MB<sup>CD34+</sup> wurden mit Dil-Färbemittel markiert und auf eine konfluente HUVEC-Monoschicht aufgebracht, die an einem mit Fibronectin beschichteten Kammer-Plättchen mit einer Dichte von 278 Zellen/mm<sup>2</sup> (Nunc) hafteten. Es wurde eine Differenzierung von MB<sup>CD34+</sup> in spindelförmige Anhaftungszellen (AT<sup>CD34+)</sup> zwischen den HUVECs innerhalb von 12 Stunden beobachtet ([Fig. 6A](#)). Die Anzahl von AT<sup>CD34+</sup> erhöhte sich auf der Monoschicht über drei Tage hinweg ([Fig. 6B](#)), wobei in einigen Bereichen netzwerkartige Strukturen beobachtet wurden ([Fig. 6C](#)). Drei Tage nach der Ko-Kultivierung wurden beide Zellen neu auf mit Matrikel (Becton Dickinson) beschichteten Plättchen erneut gesät und es wurde innerhalb von 12 Stunden eine Kapillar-Netzwerk-Ausbildung beobachtet, das aus mit Dil markierten AT<sup>CD34+</sup> und HUVECs bestand ([Fig. 6D](#)).

**[0026]** [Fig. 7](#) zeigt die Wirkung von aktivierten ECs und VEGF auf die Differenzierung von MB<sup>CD34+</sup>, die durch eine Vorbehandlung von HUVEC mit TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) 12 Stunden vorbehandelt worden waren und/oder durch Inkubation von AT<sup>CD34+</sup>/HUVEC Ko-Kultur mit VEGF (50 ng/ml).

**[0027]** Die [Fig. 8A](#) bis [Fig. 8K](#) sind Zeichnungen von Schnitten, die aus einem ischämischen Hinterlauf nach einer in vivo erfolgenden Verabreichung von heterologen ([Fig. 8A](#)–[Fig. 8H](#)), homologen ([Fig. 8I](#)) und autologen ([Fig. 8J](#), [Fig. 8K](#)) EC-Progenitoren gewonnen wurden. ([Fig. 8A](#), [Fig. 8B](#)) Rote Fluoreszenz (|||) in kleinen intermuskulären Arterien sechs Wochen nach der Injektion von mit Dil gekennzeichneten MB<sup>CD34+</sup>. Fluoreszenz grün (|||) bezeich-

net EC-spezifisches Lectin UEA-1 ([Fig. 8C](#)). Dil (rot) und CD31 (grün) in Kapillaren zwischen Muskeln, fotografiert durch ein Doppelfilter vier Wochen nach der Injektion von mit Dil gekennzeichneten MB<sup>CD34+</sup>. ([Fig. 8D](#)) Gleiche Kapillarstruktur wie in C, welche die CD31-Expression durch MB<sup>CD34+</sup> zeigt, die in Wirts-Kapillarstrukturen aufgenommen worden waren, die CD31 exprimieren. ([Fig. 8E](#), [Fig. 8F](#)) Immunofärbung zwei Wochen nach einer MB<sup>CD34+</sup>-Injektion zeigt Kapillargefäße, die aus Zellen bestanden, die von MB<sup>CD34+</sup> abgeleitet worden waren, die mit Dil markiert worden waren, die einen tie-2-Rezeptor exprimierten (grüne Fluoreszenz). Die meisten von MB<sup>CD34+</sup> abgeleiteten Zellen sind tie-2-positiv und sind mit einigen tie-2-positiven nativen (vom Wirt stammenden) Kapillarzellen integriert, die durch das Fehlen von roter Fluoreszenz identifiziert wurden. ([Fig. 8G](#), [Fig. 8H](#)) Zwei Wochen nach der Injektion von MB<sup>CD34-</sup>, die mit Dil markiert waren. Obwohl isolierte, von MB<sup>CD34-</sup> abgeleitete Zellen (rot) zwischen den Muskeln identifiziert werden können, exprimieren diese Zellen CD31 nicht.

**[0028]** ([Fig. 8I](#)) Immunohistochemische β-Galactosidase-Färbung von Muskeln, die aus den ischämischen Gliedmaßen von B6, 129-Mäusen vier Wochen nach der Verabreichung von MB<sup>Flik-1+</sup> gewonnen wurden, die aus β-Galactosidase transgenen Mäusen isoliert worden waren. Zellen die β-Galactosidase überexprimieren (Pfeile) wurden in Kapillargefäße und kleine Arterien inkorporiert; diese Zellen wurden durch Anti-CD31-Antikörper und BS-1-Lectin als ECs identifiziert.

**[0029]** ([Fig. 8J](#), [Fig. 8K](#)) Schnitte von Muskeln, die aus ischämischen Hinterläufen von Kaninchen vier Wochen nach einer Verabreichung von autologen MB<sup>CD34+</sup> gewonnen wurden. Die Dil-Fluoreszenz (J) zeigt die Lokalisierung von von MB<sup>CD34+</sup> abgeleiteten Zellen in Kapillargefäßen, die man in einer Phasenkontrast-Mikrofotographie sieht ([Fig. 8K](#)). Jeder Skalenstrich zeigt 50 µm an.

**[0030]** [Fig. 9](#) ist eine Photographie von einem Raster-Elektronenmikroskop, die zeigt, dass EC-Progenitoren sich an die entblößte Arterienoberfläche angeheftet und eine Morphologie angenommen hatten, die auf Endothelialzellen deutlich hinweist.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0031]** Es wurde eine Möglichkeit geschaffen, Angiogenese zu regulieren, d. h. Angiogenese in gewissen Subjekts-Populationen zu fördern und sie genauer auf bestimmte Gewebe zu zielen. Diese Verfahren umfassen alle die Verwendung von Endothelialzellen-Progenitoren. Eine bevorzugte Progenitor-Zelle ist ein Angioblast.

**[0032]** Es wird angenommen, dass eine postnatale Neovaskularisation sich ausschließlich aus der Vermehrung, Wanderung und Remodelierung von völlig differenzierten Endothelialzellen (ECs) ergibt, die aus zuvor existierenden nativen Blutgefäßen abgeleitet wurden (1). Diese bei Erwachsenen auftretende Erscheinung, die als Angiogenese bezeichnet wird, steht im Gegensatz zur Vaskulogenese, wobei dieser Ausdruck auf die Ausbildung von embryonalen Blutgefäßen aus EC-Progenitoren angewendet wird (2).

**[0033]** Im Gegensatz zur Angiogenese beginnt die Vaskulogenese typischerweise als Cluster-Bildung oder die Bildung von Blutinseln, die an der Peripherie aus EC-Progenitoren (d. h. Angioblasten) und im Zentrum aus hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) (3) bestehen. Zusätzlich zu dieser engen und vorhersagbaren räumlichen Zuordnung teilen sich solche EC-Progenitoren und HSCs gemeinsame antigenische Determinanten, einschließlich flk-1, tie-2 und CD-34. Folglich wurde geschlossen, dass diese Progenitor-Zellen von einem gemeinsamen hypothetischen Vorläufer, dem Hämangioblast abgeleitet sind (3, 4).

**[0034]** Der Nachweis, das Transplantate von HSCs, die von peripherem Blut abgeleitet wurden, für eine fortdauernde hämatopoetische Erholung sorgen können, bildet einen sich daraus ergebenden Beweis für zirkulierende Stammzellen (5). Diese Beobachtung wird nun klinisch als Alternative zur Knochenmarks-Transplantation ausgenutzt.

**[0035]** Wir haben gefunden, dass durch die Verwendung von Techniken, die denjenigen ähnlich sind, die für HSCs angewendet werden, EC-Progenitoren aus zirkulierendem Blut isoliert werden können. In vitro differenzieren diese Zellen in ECs. Tatsächlich kann man eine multipotente, nicht differenzierte Zelle verwenden, solange sie noch in der Lage ist, eine EC zu werden, wenn man geeignete Wirkstoffe hinzugibt, um sie dazu zu bringen, in eine EC zu differenzieren.

**[0036]** Wir haben auch gefunden, dass in vivo heterologe, homologe und autologe EC-Progenitor-Transplantate sich in Stellen aktiver Angiogenese oder in Blutgefäß-Verletzungen inkorporieren, d. h. dass sie selektiv zu solchen Orten wandern. Diese Beobachtung war überraschend. Demgemäß kann man durch die vorliegende Erfindung auf solche Stellen zielen.

**[0037]** Gemäß der vorliegenden Erfindung können EC-Progenitoren bei einem Verfahren für die Ausbildung von Blutgefäßen in einem ausgewählten Patienten verwendet werden, und in einigen bevorzugten Ausführungsformen für ein Zielen auf spezielle Stellen. Beispielsweise können die EC-Progenitoren verwendet werden, um die Angiogenese zu verstärken oder um einen Angiogenese-Modulator abzugeben,

beispielsweise pro-angiogenetische Wirkstoffe, jeweils an Stellen, an denen eine Angiogenese vorteilhaft ist.

**[0038]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform können die EC-Zellen alleine verwendet werden, um bei einem Patienten eine bessere Angiogenese zu erzielen. Manche Patienten, typischerweise ältere Patienten können entweder eine begrenzte Anzahl von ECs oder eine begrenzte Anzahl von funktionalen ECs besitzen. So kann dann, wenn man die Angiogenese fördern will, beispielsweise um die Vaskularisation durch die Verwendung eines potenteren Angiogenese-Promotors wie z. B. VEGF zu stimulieren, diese Vaskularisation durch einen Mangel an ECs begrenzt sein. Dadurch, dass man die EC-Progenitoren verabreicht, kann man aber bei solchen Patienten die Vaskularisation potenzieren.

**[0039]** Demgemäß ermöglicht das vorliegende Verfahren einen großen Bereich von Strategien, die darauf gerichtet sind, die Angiogenese durch eine Förderung der Neovaskularisation von ischämischem Gewebe zu modulieren (24). EC-Mitogene, wie z. B. VEGF und bFGF wurden verwendet, um native ECs dazu zu stimulieren, sich zu vermehren, sich auszubreiten, sich neu zu modellieren und dadurch neue Sprießungen aus Muttergefäß zu bilden (25). Ein möglicherweise begrenzender Faktor bei solchen therapeutischen Bemühungen ist die vorhandene Population von ECs, die in der Lage ist, auf verabreichte angiogenetische Cytokine zu reagieren. Die Erkenntnis, dass die NO-Produktion mit zunehmendem Alter abnimmt (26), kann auf eine Verminderung der EC hinsichtlich ihrer Zahl und/oder Lebensfähigkeit hinweisen, was durch eine autologe EC-Transplantation behandelt werden könnte. Der bis heute mit autologen Transplantaten von HCs gezeigte Erfolg, die von peripherem Blut abgeleitet worden waren (5), unterstützt die klinische Verwendbarkeit eines „supply side“-Vorgehens bei der therapeutischen Angiogenese. Die hier dargelegten *in vivo* erhaltenen Daten zeigen, dass autologe EC-Transplantate geeignet sind und die *in vitro* durchgeföhrten Experimente zeigen, dass EC-Progenitoren (von MB<sup>CD34+</sup> abgeleitete ECs) auf einfache Weise gehandhabt und *ex vivo* expandiert werden können.

**[0040]** Unsere Erkenntnis, dass sich diese EC-Progenitoren zu Stellen bewegen, an denen eine Angiogenese erfolgt, macht diese Zellen als autologe Vektoren für eine Gentherapie von Ischämie verwendbar. Zur Behandlung von örtlicher Ischämie könnte Angiogenese durch eine vorausgehende Transfektion von EC-Progenitoren verstärkt werden, um eine konstitutive Expression von angiogenen Cytokinen und/oder ausgewählten Matrix-Proteinen zu erzielen (27).

**[0041]** EC-Progenitoren können aus menschlichen mononuklearen Zellen erhalten werden, die aus dem

peripheren Blut oder dem Knochenmark des Patienten vor der Behandlung gewonnen wurden. EC-Progenitoren können auch aus heterologem oder autologem Nabelschnurblut gewonnen werden. Peripheres Blut ist wegen der Bequemlichkeit bevorzugt. Der Leukozytenanteil von peripherem Blut ist besonders bevorzugt. EC-Progenitoren können unter Verwendung von Antikörpern isoliert werden, welche für EC-Progenitoren spezifische Antigene auf unreifen menschlichen hämatopoetischen Progenitor-Zellen (HSCs) erkennen. Beispielsweise wird CD34 üblicherweise sowohl von EC-Progenitoren als auch HSCs exprimiert. CD34 wird von allen HSCs exprimiert, doch geht dies für hämatopoetische Zellen verloren, wenn sie sich differenzieren (6). Es wird auch bei Erwachsenen von vielen ECs einschließlich der am stärksten aktivierten exprimiert (7). Flk-1, ein Rezeptor für den vaskulären, endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) (8) wird auch sowohl durch HSCs als auch ECs exprimiert, doch hört diese Expression im Verlauf der hämatopoetischen Differentiation auf (9).

**[0042]** Um die EC-Progenitoren aus dem peripheren Blut zu gewinnen, werden ungefähr 5 ml bis ungefähr 500 ml Blut vom Patienten abgenommen. Vorzugsweise werden ungefähr 50 ml bis ungefähr 200 ml Blut abgenommen.

**[0043]** EC-Progenitoren können *in vivo* durch die Verabreichung von Verstärkungs-Wachstumsfaktoren, beispielsweise GM-CSF und IL-3 an den Patienten vor der Entnahme der Progenitor-Zellen expandiert werden.

**[0044]** Verfahren zur Gewinnung und Verwendung von hämatopoetischen Progenitor-Zellen in autologer Transplantation werden in der US-Patentschrift 5,199,942 beschrieben.

**[0045]** Sobald die Progenitor-Zellen durch ein spezielles Abscheidungsverfahren gewonnen worden sind, können sie einem ausgewählten Patienten verabreicht werden, um eine Reihe von Zuständen zu behandeln. Die Zellen können auch tiefgefroren aufbewahrt werden. Optional können die Zellen *ex vivo* beispielsweise dadurch expandiert werden, dass das in der US-Patentschrift 5,541,103 beschriebene Verfahren angewendet wird.

**[0046]** Die Progenitor-Zellen werden dem Patienten durch eine stellengerichtete Abgabe über einen Katheder verabreicht. Vorzugsweise werden Progenitor-Zellen, die vom Patienten gewonnen wurden, wieder verabreicht. Im Allgemeinen werden dem Patienten für eine Transplantation von ungefähr 10<sup>6</sup> bis 10<sup>18</sup> Progenitor-Zellen verabreicht.

**[0047]** In Abhängigkeit von der Verwendung der Progenitor-Zellen, können verschiedene genetische Materialien an die Zelle abgegeben werden. Das ge-

netische Material, das an die EC-Progenitoren abgegeben werden soll, können beispielsweise Gene sein, welche eine Vielzahl von Proteinen einschließlich Antikrebs-Wirkstoffen kodieren. Solche Gene umfassen diejenigen Gene, die verschiedene Hormone, Wachstumsfaktoren, Enzyme, Cytokine, Rezeptoren, MHC-Moleküle und dergleichen kodieren. Der Ausdruck „Gene“ bezeichnet sowohl für Zellen exogene als auch endogene Nukleinsäure-Sequenzen, in welche ein Virusvektor, beispielsweise ein Pox-Virus wie zum Beispiel ein Schweine-Pox-Virus eingeführt werden kann, der das menschliche TNF-Gen enthält. Zusätzlich ist es von Interesse, Gene zu verwenden, die Polypeptide für eine Ausscheidung aus den EC-Progenitoren kodieren, um so einen systemischen Effekt durch das von dem Gen kodierte Protein zu bewirken. Besonders interessante Gene umfassen solche, die TNF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , Hämoglobin, Interleukin-1, Interleukin-2, Interleukin-3, Interleukin-4, Interleukin-5, Interleukin-6, Interleukin-7, Interleukin-8, Interleukin-9, Interleukin-10, Interleukin-11, Interleukin-12 usw., GM-CSF, G-CSF, M-CSF, menschlichen Wachstumsfaktor, den kostimulierenden Faktor B7, Insulin, den Faktor VIII, den Faktor IX, PDGF, EGF, NGF, IL-1ra, EPO,  $\beta$ -Globin, EC-Mitogene und dergleichen kodieren, sowie biologisch aktive Muteine dieser Proteine. Das Gen kann weiterhin ein Produkt kodieren, dass die Expression eines anderen Gen-Produktes reguliert oder einen oder mehrere Schritte in einem biologischen Pfad blockiert. Zusätzlich können die Gene ein Toxin kodieren, das an ein Polypeptid, beispielsweise einen Rezeptor-Liganden angehängt ist, oder an einen Antikörper, der das Toxin auf ein Ziel, wie z. B. eine Tumorzelle richtet. In ähnlicher Weise können die Gene ein therapeutisches Protein kodieren, das an ein Ziel-Polypeptid angehängt ist, um einen therapeutischen Effekt bei einem kranken Gewebe oder Organ zu erzielen.

**[0048]** Die Zellen können auch verwendet werden, um Gene abzugeben, um die Fähigkeit des Immunsystems zu erhöhen, eine spezielle Erkrankung oder einen Tumor zu bekämpfen. Beispielsweise können die Zellen verwendet werden, um ein oder mehrere Cytokine (beispielsweise IL-2) abzugeben, um das Immunsystem und/oder ein oder mehrere Antigene zu verstärken.

**[0049]** Diese Zellen können auch verwendet werden, um wahlweise Medikamente zu verabreichen. Vorzugsweise wird das Medikament in die Zelle in einem Vehikel, wie z. B. einem Liposom, einer zeitgesteuert frei gebenden Kapsel, usw. eingeführt. Der EC-Progenitor würde sich dann in gezielter Weise an eine Stelle der aktiven Angiogenese bewegen, wo die Verbindung freigesetzt würde. Durch dieses Verfahren kann man unerwünschte Nebeneffekte an anderen Orten vermeiden.

**[0050]** Die vorliegende Erfindung wird verwendet, um die Ausbildung von Blutgefäßen im ischämischen Gewebe, d. h. einem Gewebe zu verstärken, das unter einem Blutmangel infolge einer ischämischen Erkrankung leidet. Solche Gewebe können beispielsweise Muskeln, das Gehirn, die Nieren und die Lunge umfassen. Ischämische Erkrankungen umfassen beispielsweise cerebrovaskuläre Ischämie, Nieren-Ischämie, pulmonare Ischämie, Gliedmaßen-Ischämie, ischämische Kardiomyopathie und myokardiale Ischämie.

**[0051]** Wenn es wünschenswert ist, die Angiogenese weiter zu verstärken, können Endothelialzellen-Mitogene dem Patienten auch in Verbindung mit oder nach der Verabreichung von EC-Progenitor-Zellen verabreicht werden. Endothelialzellen-Mitogene können direkt, d. h. intra-arteriell, intramuskulär oder intravenös verabreicht werden, oder es kann eine Nukleinsäure verwendet werden, die das Mitogen kodiert. Siehe Baffour et al., wie oben, (bFGF); Pu et al., Circulation, 88: 208–215 (1993) (aFGF); Yanagisawa-Miwa et al., wie oben (bFGF); Ferrara et al., Biochem. Biophys. Res. Commun, 161: 851–855 (1989) (VEGF); (Takeshita et al., Circulation, 90: 228–234 (1994)).

**[0052]** Die das EC-Mitogen kodierende Nukleinsäure kann in ein Blutgefäß verabreicht werden, welches sich durch das ischämische Gewebe hindurch erstreckt, oder an eine Stelle einer vaskulären Verletzung über einen Katheder, beispielsweise einen Hydrogel-Katheder, wie dies in der US-Patentanmeldung mit der Anmeldenummer 08/675,523 beschrieben ist. Die Nukleinsäure kann auch durch Injektion direkt in das ischämische Gewebe verabreicht werden, wobei das Verfahren verwendet wird, das in der US-Patentanmeldung mit der Anmeldenummer 08/545,998 beschrieben ist.

**[0053]** So wie er hier verwendet wird, bedeutet der Ausdruck „Endothelialzellen-Mitogen“ irgendein Protein, Polypeptid, Mutein oder einen Teil hiervon, das bzw. der in der Lage ist, Endothelialzellen-Wachstum direkt oder indirekt zu induzieren. Zu solchen Proteinen gehören beispielsweise saure und basische Fibroblast-Wachstumsfaktoren (aFGF und bFGF), der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), die transformierten Wachstumsfaktoren  $\alpha$  und  $\beta$  (TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ ), der von Plättchen abgeleitete endotheliale Wachstumsfaktor (PD-ECGF), der von Plättchen abgeleitete Wachstumsfaktor (PDGF), der Tumor-Nekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), der Hepatocyt-Wachstumsfaktor (HGF), der insulinartige Wachstumsfaktor (IGF), Erythropoetin, der kolonie-stimulierende Faktor (CSF), Makrophagen-CSF (M-CSF), Granulocy/Makrophagen-CSF (GM-CSF) und Stickoxid-Synthase (NOS). Siehe auch Klagsbrun et al., Annu. Rev. Physiol., 53: 217–239 (1991); Folkman et

al., J. Biol. Chem., 267: 10931–10934 (1992) und Symes et al., Current Opinion in Lipidology, 5: 305–312 (1994). Muteine oder Fragmente eines Mitogens können verwendet werden, solange sie das EC-Zellwachstum induzieren oder fördern.

**[0054]** Vorzugsweise enthält das Endothelialzellen-Mitogen eine sekretorische Sequenz, die die Ausscheidung des Proteins erleichtert. Proteine, die native Signalsequenzen aufweisen, beispielsweise VEGF, sind bevorzugt. Proteine, die keine native Signalsequenz besitzen, beispielsweise bFGF, können modifiziert werden, so dass sie solche Sequenzen enthalten, unter Verwendung üblicher kinetischer Manipulationsverfahren. Siehe Nabel et al., Nature, 362: 844 (1993).

**[0055]** Die Nukleotid-Sequenzen zahlreicher Endothelialzellen-Mitogene sind aus einer Reihe von Computer-Datenbasen ohne weiteres erhältlich, beispielsweise GenBank, EMBL und Swiss-Prot. Unter Verwendung dieser Information kann ein DNA-Segment, das die gewünschte Substanz kodiert, chemisch synthetisiert werden oder es kann ein solches DNA-Segment alternativ dadurch erhalten werden, dass Routine-Verfahren aus dem Stand der Technik eingesetzt werden, beispielsweise eine PCR-Amplifikation. Eine DNA, die VEGF kodiert, ist in dem US-Patent Nr. 5,332,671 beschrieben.

**[0056]** In bestimmten Situationen kann es wünschenswert sein, Nukleinsäuren zu verwenden, die zwei oder mehr verschiedene Proteine kodieren, um das therapeutische Ergebnis zu optimieren. Beispielsweise kann eine DNA, die zwei Proteine kodiert, wie z. B. VEGF und bFGF verwendet werden; dies führt zu einer Verbesserung gegenüber der alleinigen Verwendung von bFGF. Es kann auch ein angiogenetischer Faktor mit anderen Genen oder ihren kodierten Gen-Produkten kombiniert werden, um die Aktivität der Zellen zu erhöhen, auf die gezielt wird, während gleichzeitig eine Angiogenese induziert wird, beispielsweise einschließlich von Stickoxid-Synthase, L-Arginin, Fibronectin, Urokinase, Plasminogen-Aktivator und Heparin.

**[0057]** Der Ausdruck „wirksame Menge“ bedeutet eine ausreichende Menge einer Verbindung, beispielsweise von Nukleinsäure, die abgegeben wird, um eine adäquate Menge des Endothelialzellen-Mitogens zu erzeugen, d. h. eine Menge, die in der Lage ist, Endothelialzellen-Wachstum und/oder Angiogenese zu induzieren. Somit ist ein wesentlicher Gesichtspunkt die Menge des exprimierten Mitogens. Demgemäß kann man multiple Transkripte verwenden oder man kann das Gen unter der Steuerung eines Promoters anwenden, der zu hohen Expressionspegeln führt. Bei einer anderen Ausführungsform steht das Gen unter der Kontrolle eines Faktors, der zu extrem hohen Expressionspegeln führt, d. h. tat

und dem entsprechenden tar-Element.

**[0058]** Die Nukleinsäuren werden in den EC-Progenitor durch irgendein Verfahren eingeführt, das zur Aufnahme und Expression der Nukleinsäure durch die Zellen führt. Es kann sich dabei um die Verwendung von Vektoren, Liposomen, nackter DNA, durch einen Hilfsstoff unterstützte DNA, einen Katheder, ein Gen-Gun usw. handeln. Zu den Vektoren gehören chemische Konjugate, wie sie in der Patentanmeldung WO 93/04701 beschrieben sind, die einen Ziel-Bestandteil umfassen (d. h. einen Liganden für einen Zellen-Oberflächenrezeptor), und einen die Nukleinsäure bindenden Bestandteil (beispielsweise Polylysin), einen viralen Vektor (beispielsweise einen viralen DNA- oder RNA-Vektor), Fusionsproteine, wie sie z. B. in PCT/US 95/02140 (WO 95/22518) beschrieben sind, wobei es sich um ein Fusionsprotein handelt, das einen Ziel-Bestandteil aufweist (beispielsweise einen für eine Ziel-Zelle spezifischen Antikörper) und einen die Nukleinsäure bindenden Bestandteil (beispielsweise ein Protamin), Plasmide, Phagen usw.. Die Vektoren können chromosomal, nicht-chromosomal oder synthetisch sein.

**[0059]** Zu den bevorzugten Vektoren gehören virale Vektoren, Fusionsproteine und chemische Konjugate. Retrovirale Vektoren umfassen Moloney-Mäuse-Leukämie-Viren und auf HIV basierende Viren. Ein bevorzugter auf HIV basierender viraler Vektor umfasst wenigstens zwei Vektoren, wobei die gag- und pol-Gene aus einem HIV-Genom stammen und das env-Gen von einem anderen Virus stammt. Virale DNA-Vektoren sind bevorzugt. Diese Vektoren umfassen Pox-Vektoren, wie z. B. Orthopox- oder Avipox-Vektoren, Herpesvirus-Vektoren, wie z. B. einen Herpes-simplex I-Virus-Vektor (HSV) [A. I. Geller et al., J. Neurochem., 64: 487 (1995), Lim, F. et al., in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Hrsg.. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); A. I. Geller et al., Proc. Natl. Acad. Sci.: USA: 90 7603 (1993); A. I. Geller et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA: 87: 1149 (1990)], Adenovirus-Vektoren [LeGal LaSalle et al., Science, 259: 988 (1993); Davidson et al., Nat. Genet. 3: 219 (1993); Yang et al., J. Virol. 69: 2004 (1995)] und Adeno-assoziierte Virus-Vektoren [M. G. Kaplitt et al., Nat. Genet. 8: 148 (1994)].

**[0060]** Virale Pox-Vektoren führen das Gen in das Cytoplasma der Zelle ein. Avipox-Virus-Vektoren führen nur zu einer Kurzzeit-Expression der Nukleinsäure. Adenovirus-Vektoren, und mit Adeno-Virus verbundene Vektoren und Herpes-Simplex-Virus-Vektoren (HSV) sind bevorzugt, um die Nukleinsäure in neurale Zellen einzuführen. Der Adeno-Virus-Vektor führt zu einer kürzeren Expression (ungefähr 2 Monate) als ein einem Adeno-Virus zugeordneter Vektor (ungefähr 4 Monate), der seinerseits kürzer wirkt als HSV-Vektoren. Der speziell gewählte Vektor hängt von der Zielzelle und dem Zustand ab, der behandelt

werden soll. Die Einführung kann durch Standard-Verfahren erfolgen, beispielsweise Infektion, Transfektion, Transduktion oder Transformation. Beispiele von Verfahren der Gen-Übertragung umfassen z. B. nackte DNA, CaPO<sub>4</sub>-Ausfällung, DEAE-Dextran, Elektroporation, Protoplast-Fusion, Lipofektion, Zell-Mikroinjektion, virale Vektoren und die Verwendung des „Gen-Guns“.

**[0061]** Um die Handhabung und Manipulation der Nukleinsäure zu vereinfachen, die das Protein kodiert, wird die Nukleinsäure vorzugsweise in eine Kassette eingeführt, in der sie in wirksamer Weise mit einem Promotor verknüpft ist. Der Promotor muss in der Lage sein, die Expression des Proteins in Zellen des gewünschten Zielgewebes anzutreiben. Die Auswahl von geeigneten Promotoren kann ohne weiteres durchgeführt werden. Vorzugsweise wird man einen Hochexpressions-Promotor verwenden. Ein Beispiel für einen geeigneten Promotor ist der Promotor 763-Basen-Paar-Cytomegalovirus (CMV). Der Rous-Sarkoma-Virus (RSV) (Davis et al., Hum Gene Ther 4: 151 (1993) und MMT-Promotoren können ebenfalls verwendet werden. Gewisse Proteine können unter Verwendung ihrer nativen Promotoren exprimiert werden. Andere Elemente, welche die Expression erhöhen können, können auch eingesetzt werden, wie z. B. ein Verstärker oder ein System, das zu hohen Pegeln der Expression führt, wie z. B. ein tat-Gen und ein tar-Element. Diese Kassette kann dann in einen Vektor eingesetzt werden, d. h. einem Plasmid-Vektor wie z. B. pUC118, pBR322 oder andere bekannte Plasmid-Vektoren, zu denen beispielsweise ein *E. coli* Replikations-Ursprung gehören kann. Siehe Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory press, (1989). Der Plasmid-Vektor kann auch einen auswählbaren Marker wie z. B. das β-Lactamase-Gen für eine Ampicillin-Resistenz unter der Voraussetzung umfassen, dass das Marker-Polypeptid den Metabolismus des zu behandelnden Organismus nicht nachteilig beeinflusst. Die Kassette kann auch an einen Nukleinsäure bindenden Bestandteil in einem synthetischen Abgabesystem gebunden sein, wie z. B. dem in WO 95/22618 beschriebenen System.

**[0062]** Gewünschtenfalls kann die voraus gewählte Verbindung, beispielsweise eine Nukleinsäure wie z. B. DNA auch mit einem Mikro-Abgabe-Vehikel, wie z. B. kationischen Liposomen und adenoviralen Vektoren verwendet werden. Für eine Übersicht der Verfahren zur Liposom-Zubereitung, des Zielens und der Abgabe von Inhaltsstoffen, siehe Mannino und Gould-Fogerite, BioTechniques, 6: 682 (1988). Siehe weiterhin, Felgner und Holm, Bethesda Res. Lab. Focus, 11(2): 21 (1989) und R. A. Maurer, Bethesda Res. Lab. Focus, 11(2): 25 (1989).

**[0063]** Hinsichtlich der Replikation fehlerhafte, re-

kombinante, adenovirale Vektoren können gemäß bekannter Verfahren hergestellt werden. Siehe Quantin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89: 2581–2584 (1992); Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest., 90: 626–630 (1992); und Rosenfeld et al., Cell, 68: 143–155 (1992).

**[0064]** Die wirksame Dosis der Nukleinsäure ist eine Funktion des speziellen exprimierten Proteins, des Zielgewebes, des Patienten und seines bzw. ihres klinischen Zustands. Wirksame Mengen von DNA liegen zwischen ungefähr 1 und 4000 µg, in stärker bevorzugter Weise zwischen ungefähr 1000 und 2000 µg und in besonders bevorzugter Weise zwischen 2000 und 4000 µg.

**[0065]** Die vorliegende Erfindung umfasst auch die Zubereitung pharmazeutischer Produkte für alle die in den hier beschriebenen Verfahren ins Auge gefassten Verwendungen. Beispielsweise gehört hierzu ein pharmazeutisches Produkt, das Nukleinsäure, die ein Endothelialzellen-Mitogen kodiert, und EC-Progenitoren umfasst, in einer physiologisch akzeptablen, verabreichbaren Form.

**[0066]** Ein Teilesatz kann für die in vivo erfolgende systemische Einführung eines EC-Progenitors und eines Endothelialzellen-Mitogens oder einer dieses Mitogen kodierende Nukleinsäure in einem Patienten verwendet werden. Ein solcher Teilesatz umfasst eine Trägerlösung, Nukleinsäure oder ein Mitogen und einen Katheder. Der Teilesatz kann auch Anweisungen für die Verabreichung der Zubereitung umfassen.

**[0067]** Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden durch Beispiele weiter beschrieben. Diese Beispiele werden gegeben, um das Verständnis der Erfindung zu erleichtern, doch sind sie nicht einschränkend zu verstehen.

## BEISPIELE

### Verfahren und Materialien

**[0068]** Peripheres menschliches Blut wurde unter Verwendung eines intravenösen Katheters der Größe 20 erhalten, wobei die ersten 3 ml weg gegossen wurden. Eine Leukozyten-Faktion des Blutes wurde durch eine Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation erhalten und eine Stunde lang auf eine Kunststoffgewebe-Kultur aufgeschichtet, um eine Kontamination durch differenzierte anhaftende Zellen zu vermeiden.

**[0069]** Es wurde eine Sortierung von fluoreszierend aktivierten Zellen (FACS) mit  $> 1 \times 10^6$  CD34-positiven und negativen mononukleären Blutzellen durchgeführt ( $M^{CD34+}$ ,  $M^{CD34-}$ ). Die Zellen wurden mit einem Becton-Dickinson FACS-Sorter und den Lysis II-Analyseprogramm unter Verwendung von Antikör-

pern gegen CD34 (Biodesign) analysiert.

**[0070]** M-199-Medium mit 20% FBS und Rindergehirnextrakt (Clonetics) wurde als Standardmedium für alle Zellkultur-Experimente verwendet.

**[0071]** Es wurden männliche Mäuse mit C57BU6Jx129/SV-Hintergrund (Hirian) mit einem Alter von drei Monaten und einem Gewicht von 20 bis 30 g bei diesen Experimenten ( $n = 24$ ) verwendet. Die Tiere wurden mit 160 mg/kg intraperitoneal verabreichtem Pentobarbital betäubt. Das proximale Ende einer Oberschenkel-Arterie und der distale Teil der entsprechenden Schenkelarterie wurden verbunden, worauf die Arterie sowie alle Seitenzweige freigelegt und herausgetrennt wurden (alle Versuche wurden durch das St. Elizabeth's Institutional Animal Care and Use Committee) gebilligt.

**[0072]** Weiße Neuseeland-Kaninchen (3,8 bis 4,2 kg,  $n = 4$ , Pine Acre Rabbitry) wurden mit einer Mischung aus Ketamin (50 mg/kg) und Acepromazin (0,8 mg/kg) betäubt, worauf eine Prämedikation mit Xylazin (2 mg/kg) erfolgte. Nach einem Längseinschnitt wurde die Oberschenkel-Arterie über ihre gesamte Länge frei gelegt; alle Verzweigungen der Oberschenkel-Arterie wurden ebenfalls frei gelegt. Nach einer Verbindung der Kniekehlen- und Schenkel-Arterien am distalen Ende mit dem proximalen Ende der äußeren Becken-Arterie und aller Oberschenkel-Arterienzweige, wurde die Oberschenkel-Arterie vollständig heraus getrennt (23).

#### Isolation und Analyse

**[0073]** CD34-positive, mononukleare Blutzellen ( $MB^{CD34+}$ ) wurden aus dem peripheren Blut mit Hilfe von Magnetkügelchen, die mit CD34-Antikörper beschichtet waren (Dynal) wie oben beschrieben isoliert.

**[0074]** Die FACS-Analyse zeigte, dass  $15,9 \pm 3,3\%$  der ausgewählten Zeilen gegen  $< 0,1\%$  der verbliebenen Zeilen CD34 exprimierten. Entleerte  $MB^{CD34-}$ -Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Flk-1-Antikörper wurde für eine Magnetkügelchen-Selektion von Flk-1-positiven mononuklearen Blutzellen verwendet ( $MB^{Flk+}$ ).

**[0075]**  $MB^{CD34+}$  und  $MB^{CD34-}$  wurden getrennt in Standardmedium auf Gewebekultur-Kunststoff, Kollagen-Typen I oder Fibronectin aufgebracht. Bei einer Aufbringung auf Gewebekultur-Kunststoff oder Kollagen mit einer Dichte von ungefähr  $1 \times 10^3/mm^2$  heftete sich eine begrenzte Anzahl von  $MB^{CD34+}$  an und wurde spindelförmig und vermehrte sich für vier Wochen. Eine Untergruppe von  $MB^{CD34+}$ , die auf Fibronectin aufgebracht worden war, heftete sich sofort an und wurde innerhalb von drei Tagen spindelförmig ([Fig. 1A](#)); die Anzahl von anhaftenden Zellen

( $AT^{CD34+}$ ) in der Kultur stieg mit der Zeit an ([Fig. 2](#)). Anhaftende Zellen wurden unter Kulturen von  $MB^{CD34+}$  nur vereinzelt beobachtet, einschließlich von Zellen, deren Entwicklung vier Wochen lang auf mit Fibronectin beschichteten Plättchen verfolgt wurde.

**[0076]** Um zu bestätigen, dass die spindelförmigen Zellen von CD34-positiven Zellen abgeleitet waren, wurden  $MB^{CD34+}$  mit dem fluoreszierenden Farbstoff Dil markiert und gemeinsam mit nicht markiertem  $MB^{CD34-}$  auf Fibronectin mit einer Gesamtdichte von  $5 \times 10^3/mm^2$  aufgebracht; das Verhältnis der beiden Zellarten war identisch mit dem der ursprünglichen mononuklearen Zellpopulation (1%  $MB^{CD34+}$ , 99%  $MB^{CD34-}$ ). Sieben Tage später trugen mit Dil markierte Zellen, die von  $MB^{CD34+}$  stammten und ursprünglich nur 1% der Blutzellen ausmachten, zu  $60,3 \pm 4,7\%$  aller anhaftenden Zellen bei, die durch FACS analysiert wurden. Eine Ko-Inkubation mit  $MB^{CD34-}$  erhöhte die Vermehrung auf  $> 10 \times MB^{CD34+}$  alleine aufgetragen mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^3/mm^2$  Zelle ( $d_3 = 131,3 \pm 26,8$  gegen  $9,7 \pm 3,5/mm^2$ ).  $MB^{CD34+}/MB^{CD34-}$ -Co-Kulturen erhöhten auch die  $MB^{CD34+}$ -Differentiation, einschließlich der Ausbildung von zellulären Netzwerken und röhrenartigen Strukturen auf mit Fibronectin beschichteten Platten ([Fig. 1B](#), C). Diese Strukturen bestanden hauptsächlich aus mit Dil markierten  $MB^{CD34+}$  abgeleiteten Zellen ([Fig. 1C](#)). Darüber hinaus wurde innerhalb von 12 Stunden der Ko-Kultivierung die Ausbildung mehrerer Cluster beobachtet ([Fig. 1D](#)), die hauptsächlich aus Zellen bestanden, die von  $MB^{CD34+}$  stammten, die mit Dil markiert worden waren ([Fig. 1E](#)). Diese Cluster umfassten in der Mitte runde Zellen und Aussprünge von spindelförmigen Zellen an der Peripherie. Das Aussehen und die Organisation dieser Cluster ähnelten inselartigen Blutzellen-Clustern, die in einer dissozierten Quail-Epiblast-Kultur beobachtet worden waren, die ECs induzierte und in vitro vaskulären Strukturen führte (3). Es wurde gezeigt, dass  $AT^{CD34+}$  an der Cluster-Peripherie mit Dil markierte, azetylierte LDL aufnahmen, was für eine EC-Abstammungslinie charakteristisch ist (13), während dies die runden Zellen, die die Mitte der Cluster bildeten, dies nicht taten ([Fig. 1F-G](#)); letztere lösten sich einige Tage später vom Cluster. Ähnliche Ergebnisse wurden bei den Experimenten beobachtet, bei denen  $MB^{Flk+}$  verwendet wurde.

#### Expression von Leukozyten- und EC-Markern

**[0077]** Um das Fortschreiten von  $MB^{CD34+}$  zu einem EC-ähnlichen Phänotyp weiter zu bewerten, wurden die Zeilen auf eine Expression von Leukozyten- und EC-Markern untersucht. Frisch isolierte  $MB^{CD34+}$  gegen  $AT^{CD34+}$ , die mit dichten von  $1 \times 10^3$  Zellen/ $mm^2$  sieben Tage lang kultiviert worden waren, wurden mit Antikörpern inkubiert, die mit Fluoreszenz-Substanzen markiert waren, und durch FACS analysiert ([Fig. 3](#)). Das Leukozyten gemeinsame Antigen CD45

wurde an 94,1% der frisch isolierten Zellen identifiziert, ging aber im Wesentlichen nach sieben Tagen in der Kultur verloren ([Fig. 3](#)). Eine erhöhte Expression von UEA-1, CD34, CD31, Flk-1, Tie-2 und E-Selectin – die alle eine EC-Abstammungslinie bezeichnen (14) – wurde bei AT<sup>CD34+</sup> nach sieben Tagen in der Kultur im Vergleich zu frisch isolierten MB<sup>CD34+</sup> beobachtet. Die CD68-Expression, die auf eine Monozyten/Makrophagen-Abstammungslinie hinweist, war auf  $6,0 \pm 2,4\%$  Zellen begrenzt.

**[0078]** Die Expression von Faktor VIII, UEA-1, CD31, ecNOS und E-Selectin wurde ebenfalls durch Immunohistochemie für AT<sup>CD34+</sup> nach sieben Tagen in der Kultur dokumentiert (Daten nicht dargestellt). Nach 3, 7 und 14 Tagen in der Kultur nahmen mehr als 80% AT<sup>CD34+</sup> das mit Dil markierte acLDL auf (13).

**[0079]** ECs exprimieren einzigartig endothelialbildende Stickoxid-Synthase (ecNOS). Demgemäß wurden MB<sup>CD34+</sup>, MB<sup>CD34-</sup> und AT<sup>CD34+</sup> hinsichtlich der Expression von ecNOS durch RT-PCR (15) untersucht. ecNOS-mRNA war bei MB<sup>CD34-</sup> nicht messbar und war bei frisch isolierten MB<sup>CD34+</sup> nur mit sehr geringen Pegeln vorhanden ([Fig. 4](#)). Bei AT<sup>CD34+</sup>, die sieben Tage lang kultiviert worden waren, war jedoch ecNOS-mRNA deutlich erhöht ([Fig. 5](#)). Der funktionale Beweis des ecNOS-Proteins in AT<sup>CD34+</sup> wurde durch die Messung von Stickoxid in Reaktion auf den EC-abhängigen Agonisten Acetylcholin (Ach) und das EC-spezifische Mitogen, den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) (16) dokumentiert ([Fig. 5](#)); letzteres bildet nebenbei gesagt einen Beweis für einen funktionalen Flk-1-Rezeptor auch bei AT<sup>CD34+</sup>.

#### Zellen-Zellen-Wechselwirkung

**[0080]** Es wird angenommen, dass eine Zellen-Zellen-Wechselwirkung eine entscheidende Rolle bei der Zell-Signalübertragung sowie der Differentiation und Ausbreitung von Zellen während der Hämatopoiese (19) und der Angiogenese (20) bildet. Um den Einfluss der Wechselwirkung von MB<sup>CD34+</sup> mit reifen ECs auf die Differentiation von MB<sup>CD34+</sup> in einem EC-ähnlichen Phänotyp zu untersuchen, wurden mit Dil markierte MB<sup>CD34+</sup> auf eine konfluente HUVEC-Monoschicht aufgebracht. Innerhalb von 12 Stunden wurden anhaftende, markierte Zellen in der gesamten Kultur gefunden ([Fig. 6A](#)) und sie wuchsen in ihrer Anzahl bis zu drei Tagen ([Fig. 6B](#)). Bei einer Inkubation mit 50 ng/ml VEGF und 10 ng/ml bFGF wurde ein Netzwerk von schnurartigen Strukturen innerhalb von drei Tagen der Ko-Kultur gesehen, wobei diese Strukturen sowohl aus mit Dil markierten als auch unmarkierten Zellen bestanden ([Fig. 6C](#)). Beide Zellarten wurden dann auf Plättchen erneut ausgesät, die mit Matrikel (Becton Dickinson) beschichtet waren und zeigten innerhalb von 12 Stunden die Ausbildung eines Kapillar-Netzwerkes, das

aus mit Dil markierten MB<sup>CD34+</sup> abgeleiteten Zellen und HUVECs bestand ([Fig. 6D](#)). Um die Zellen-Zellen-Wechselwirkung zu erleichtern, wurden die HUVECs mit TNF-α (21) vorbehandelt, was zu einer erhöhten Anzahl von AT<sup>CD34+</sup> führte ([Fig. 6E](#)); eine synergetische Verstärkung wurde bei einer Ko-Inkubation mit VEGF beobachtet. Identisch behandelte Ko-Kulturen von HUVECs und mit Dil markierten MB<sup>CD34-</sup> führten zu abgeschuppten, markierten Zellen und/oder keinen Schnüren. Ähnliche Ergebnisse wurden beobachtet, wenn EC-Vorläufer unter Verwendung von MB<sup>Flk1+</sup> isoliert wurden.

#### Angiogenese in vivo

**[0081]** Frühere Studien haben gezeigt, dass ECs die Hauptzellen bilden, die für eine Angiogenese in vivo verantwortlich sind (1). Um zu ermitteln, ob MB<sup>CD34+</sup> zu einer Angiogenese in vivo beitragen können, wurden zwei zuvor charakterisierte Tiermodelle der Hinterlauf-Ischämie verwendet. Für die Verabreichung von humanem MB<sup>CD34+</sup> wurden athymische Nacktmäuse mit C57BU6Jx129/SV-Hintergrund verwendet, um mögliche Transplantations-Wirts-Komplikationen zu vermeiden. Zwei Tage später, als das Körp erglied stark ischämisch war, wurde den Mäusen  $5 \times 10^5$  mit Dil markiertes humanes MB<sup>CD34+</sup> oder MB<sup>CD34-</sup> über die Schwanzvene injiziert. Eine histologische Schnittuntersuchung der Glieder nach dem Vorhandensein von mit Dil markierten Zellen nach 1, 2, 4 und 6 Wochen zeigte zahlreiche mit Dil markierte Zellen in dem mit neuen Gefäßen versehenen, ischämischen Hinterlauf. Markierte Zellen waren bei Mäusen, denen MB<sup>CD34+</sup> injiziert worden war, wesentlich zahlreicher als bei Mäusen mit MB<sup>CD34-</sup> und es schienen nahezu alle markierten Zellen in die kapillaren Gefäßwände integriert zu sein ([Fig. 8A](#), C, E, G).

**[0082]** In unverletzten Gliedern sowohl von Mäusen, denen MB<sup>CD34+</sup> oder MB<sup>CD34-</sup> injiziert worden war, wurden keine markierten Zellen beobachtet. Mit Dil markierte Zellen wurden auch in beträchtlicher Weise zusätzlich mit Immuno-Stains für UEA-1-Lectin ([Fig. 8B](#)), CD31 ([Fig. 8D](#)) und Tie-2 ([Fig. 8F](#)) markiert. Im Gegensatz hierzu wurden bei Hinterlauf-Schnitten von Mäusen, denen MB<sup>CD34-</sup> injiziert worden war, markierte Zellen typischerweise in dem Stroms nahen Kapillaren gefunden, doch bildeten sie keinen Teil der Gefäßwand und zeigten Markierung mit UEA-1 oder Anti-CD31-Antikörpern ([Fig. 8G](#), H).

**[0083]** Danach wurde eine transgene Maus, die β-Galactosidase überexprimiert, verwendet, um die Hypothese zu überprüfen, dass homologe Transplantate von EC-Progenitoren zu einer Neovaskularisation in vivo beitragen können. Flk-1-Zellen-Isolation wurde für die Selektion von EC-Progenitoren aufgrund des Fehlens eines geeigneten Anti-Maus-CD34-Antikörpers verwendet. Es wurden ungefähr  $1 \times 10^4$  MB<sup>Flk1+</sup> aus dem Gesamtblut einer

10 $\beta$ -Galactosidase transgenen Maus mit einem genetischen B6, 129-Hintergrund isoliert. Die MB<sup>Flk1+</sup> oder die gleiche Anzahl von MB<sup>Flk1-</sup> wurden B6, 129-Mäusen mit einer Hinterlauf-Ischämie mit zweitägiger Dauer injiziert. Eine Immunofärbung des ischämischen Gewebes in Bezug auf  $\beta$ -Galactosidase, die vier Wochen nach der Injektion gewonnen wurde, zeigte die Inkorporation von  $\beta$ -Galactosidase exprimierenden Zellen in Kapillaren und kleinen Arterien ([Fig. 8I](#)); diese Zellen wurden durch Anfärben mit Anti-CD31-Antikörper und BS-1-Lectin als ECs identifiziert.

**[0084]** Schließlich wurde die *in vivo* erfolgende Inkorporation von autologen MB<sup>CD34+</sup> in Zentren der Neovaskularisation in einem Kaninchenmodell von einseitiger Hinterlauf-Ischämie untersucht. MB<sup>CD34+</sup> wurde aus 20 ml Blut isoliert, das durch direkte Venenpunktur von normalen weißen Neuseeland-Kaninchen unmittelbar vor der chirurgischen Induktion von einseitiger Hinterlauf-Ischämie erhalten worden war. Unmittelbar nach Vervollständigung des Operationsvorganges wurden frisch isolierte autologe, mit Dil markierte MB<sup>CD34+</sup> in die Ohrvene des gleichen Kaninchens rückinjiziert, von dem das Blut zunächst gewonnen worden war. Vier Wochen nach der Ischämie wurden histologische Schnitte des ischämischen Gliedes durchgeführt. Mit Dil markierte Zellen wurden ausschließlich in neovaskulären Zonen des ischämischen Gliedes gefunden, die in Kapillaren inkorporiert waren und konsistent CD31 und UEA-1 exprimierten ([Fig. 8J, K](#)).

**[0085]** In Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass HSCs und ECs von einem gemeinsamen Vorläufer abgeleitet sind, deuten unsere Erkenntnisse darauf hin, dass unter geeigneten Bedingungen eine Sub-Population von MB<sup>CD34+</sup> oder MB<sup>Flk1+</sup> *in vitro* in ECs differenzieren kann. Darüber hinaus deuten die *in vivo* erhaltenen Ergebnisse darauf hin, dass ein Einbringen von MB<sup>CD34+</sup> oder MB<sup>Flk1+</sup> in den peripheren Blutkreislauf eine eventuelle Quelle von ECs für die Angiogenese bilden kann. Die Inkorporation von *in situ* differenzierenden EC-Progenitoren in die Neovaskulatur dieser erwachsenen Arten ist konsistent mit der Vaskulogenese, einer Erscheinung, die ansonsten auf Embryogenese beschränkt ist (2,3). Die Tatsache, dass diese Zellen sich nicht in reife Blutgefäße inkorporieren, die keiner Angiogenese unterliegen, deutet darauf hin, dass eine Verletzung, eine Ischämie und/oder eine aktive Angiogenese erforderlich sind, um eine *in situ* erfolgende Differentiation von MB<sup>CD34+</sup> in ECs zu induzieren.

## BEISPIEL II

EC-Progenitoren verstärken die Re-Endothelialisierung

**[0086]** (Hierbei handelt es sich nicht um ein Beispiel

der Erfindung, doch wird es hier beibehalten, da es für das Verständnis der Erfindung nützlich ist).

**[0087]** Nach einer mit einem Ballon erfolgenden Verletzung wurde die Halsschlagader einer nackten Ratte sofort heraus operiert und in ein HUVEC-Kulturmedium eingebracht und es wurden mit Dil markierte CD34+ EC-Progenitor-Zellen auf der Arterie ausgesät. Nach einer Woche wurde die Arterie mit PBS gewaschen, um nicht anhaftende Zellen zu entfernen. Entsprechend der Fähigkeit von CD34+-Zellen, in Filtrationszellen zu differenzieren, wurden mit Dil markierte Zellen in der glatten Muskelzellschicht der Arterie gefunden. Eine Raster-Elektronen-Mikroskop-Untersuchung der Intimoberflächen zeigte jedoch, dass die mit Dil markierten Zellen sich auch an die entblößte Arterienoberfläche angeheftet hatten, wobei sie eine Morphologie angenommen hatten, die auf ECs hinwies ([Fig. 9](#)). Mit Dil markierte Zellen wurden auch in die kapillar-artigen Aussprossungen an den offenen Enden des heraus getrennten arteriellen Segments inkorporiert, was darauf hinweist, dass CD34+-Zellen in der Lage sein können, ebenfalls an der Angiogenese teil zu nehmen.

**[0088]** Um zu ermitteln, ob exogen verabreichte CD34+-EC-Progenitor-Zellen zur Re-Endothelialisierung einer entblößten arteriellen Oberfläche *in vivo* beitragen können, wurden frisch isolierte menschliche CD34+ oder CD34-Zellen mit Dil markiert und auf eine entblößte Halsschlagader einer nackten Ratte ausgesät. Nach einer Ballon-Entblößung wurden  $1,0 \times 10^6$ -markierte Zellen in PBS in die entblößte Arterie über einen 22G Katheder eingeführt, der in der Arterie 30 Minuten verblieb, bevor die Nadel herausgezogen wurde. Die externe Halsschlagader wurde dann ligiert, die gemeinsamen und internen Halsschlagader-Ligaturen entfernt und der Einschnitt geschlossen. Am nächsten Tag wurde die Ratte betäubt und die Vaskulatur-Perfusion mit Histo Choice (Amresco) fixiert. Das entblößte arterielle Segment wurde heraus getrennt und auf das Vorhandensein von anhaftenden, mit Dil markierten Zellen untersucht, die in Arterien identifiziert wurden, die mit CD34+-Zellen angesetzt worden waren, aber nicht in solchen mit CD34-Zellen.

**[0089]** Die folgenden Literaturstellen werden in der Beschreibung genannt:

- (1) J. Folkman, Y. Shing, *J. Biol. Chem.* 267, 10931 (1992); W. Schaper, M. D. Brahander, P. Lewi, *Circ. Res.* 28, 671 (1971); W. Risau, *FASEB J.* 9, 926 (1995).
- (2) W. Risau, H. Sariola, H-G. Zerwes, J. Sasse, P. Ekblom, et al., *Development* 102, 471 (1988); L. Pardanaud, C. Altman, P. Kitos, F. Dieterlen-Lievre, *Development* 105, 473 (1989).
- (3) I. Flamme, W. Risau, *Development* 116, 435 (1992).
- (4) W. His, *Abhandl. K. S. Ges. Wiss. Math. Phys.* 22,

- 171 (1900); M. Weiss, S. H. Orkin, *J. Clin. Invest.* 97, 591 (1996).
- (5) W. Brugger, S. Heimfeld, R. J. Berenson, R. Mertelsmann, L. Kanz, *N. Engl. J. Med.* 333, 283 (1995); A. Kessinger, J. O. Armitage, *Blood* 77, 211 (1991); W. P. Sheridan, C. G. Begley, C. Juttener, *Lancet* 339, 640 (1992); E. J. Shpall, R. B. Jones, S. I. Bearman, *J. Clin. Oncol.* 12, 28 (1994).
- (6) C. I. Civin, L. C. Strauss, C. Brovall, M. J. Frakler, J. F. Schwartz, et al., *J Immunol* 133, 157 (1984); F. Katz, R. W. Tindle, D. R. Sutherland, M. D. Greaves, *Leuk. Res.* 9, 191 (1985); R. G. Andrews, J. W. Singer, I. D. Bernstein, *Blood* 67, 842 (1986).
- (7) J. Fina, H. V. Molgard, D. Robertson, N. J. Bradley, P. D. Managhan, et al., *Blood* 75, 2417 (1990); D. Soligo, D. Delia, A. Oriani, G. Cattoretti, A. Orazi, et al., *Leukemia* 5, 1026 (1991); A. Ito, S. Nomura, S. Hirota, T. Suda, Y. Kitamura, *Lab. Invest.* 72, 532 (1995).
- (8) C. deVries, J. A. Escobedo, H. Ueno, K. Houck, N. Ferrara, et al., *Science* 255, 989 (1992); B. I. Terman, M. Dougher-Vermazen, M. E. Carrion, D. Dimitrov, D. C. Armellino, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1579 (1992); F. Shalaby, J. Rossant, T. P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X-F. Wu, et al., *Nature* 376, 62 (1995).
- (9) W. Matthews, C. T. Jordan, M. Gavin, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9026 (1991); B. Millauer, S. Wizigmann-Voos, H. Schnurch, R. Martinez, N. P. H. Moller, et al., *Cell* 72, 835 (1993); T. P. Yamaguchi, D. J. Dumont, R. A. Conlon, M. L. Breitman, J. Rossant, *Development* 118, 489 (1993).
- (13) J. C. Voyta, D. P. Via, C. E. Butterfield, B. R. Zetter, *J. Cell Biol.* 99, 2034 (1984).
- (14) B. Millauer, S. Wizigmann-Voos, H. Schnurch, R. Martinez, N. P. H. Moller, et al., *Cell* 72, 835 (1993); T. P. Yamaguchi, D. J. Dumont, R. A. Conlon, M. L. Breitman, J. Rossant, *Development* 118, 489 (1993); M. Miettinen, H. Holthofer, V. P. Lehto, A. Miettinen, I. Virtanen, *Am. J. Clin. Pathol.* 79, 32 (1983); E. A. Jaffe, R. L. Nachman, C. G. Becker, C. R. Minick, *J. Clin. Invest.* 52, 2745 (1973); P. J. Newman, M. C. Berndt, J. Gorski, G. C. White, S. Lyman, et al., *Science* 247, 1219 (1990); A. Vecchi, C. Garanda, M. G. Lampugnani, M. Resnati, C. Matteucci, et al., *Eur. J. Cell Biol.* 63, 247 (1994); T. N. Sato, Y. Tozawa, U. Deutsch, K. Wolburg-Buchholz, Y. Fujiwara, et al., *Nature* 376, 70 (1995); H. Schnurch, W. Risau, *Development* 119, 957 (1993); M. P. Bevilacqua, *Annu. Rev. Immunol.* 11, 767 (1993).
- (15) S. P. Janssens, A. Shimouchi, T. Quertermous, D. B. Block, K. D. Bloch, *J. Biol. Chem.* 267, 14519 (1992); S. Lamos, P. A. Marsden, G. K. Li, P. Tempst, T. Michel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6348 (1992).
- (16) R. van der Zee, F. Zollman, J. Passeri, C. Lekutat, M. Silver, et al., *Circulation*, in press.
- (17) K. Shibuki, D. Okada, *Nature* 358, 676 (1991).
- (18) A. S. Weyrich, X-1. Ma, M. Buerke, T. Murohara, V. E. Armstead, et al., *Circ. Res.* 75, 692 (1994).
- (19) B. Torok-Storb, *Blood* 72, 373 (1988); N. Dainiak, *Blood* 78, 264 (1991).
- (20) J. Folkman, M. Klagsbrun, *Science* 235, 442 (1987); R. O. Hynes, *Cell* 48, 549 (1987); P. C. Brooks, R. A. F. Clark, D. A. Cheresh, *Science* 264, 569 (1994); M. Friedlander, P. C. Brooks, R. W. Shaffer, C. M. Kincaid, J. A. Varner, et al., *Science* 270, 1500 (1995).
- (21) P. J. Simmons, B. Masinovky, B. M. Longenecker, R. Berenson, B. Torok-Storb, et al., *Blood* 80, 388 (1992); J. L. Liesveld, K. E. Frediani, A. W. Harbol, J. F. DiPersio, C. N. Abboud, *Leukemia* 8, 2111 (1994).
- (23) S. Takeshita, L. P. Zheng, E. Brogi, M. Kearney, L. Q. Pu, et al., *J. Clin. Invest.* 93, 662 (1994); L. Q. Pu, A. D. Sniderman, R. Brassard, K. J. Lachapelle, A. M. Graham, et al., *Circulation* 88, 208 (1993); R. Baffour, J. Berman, J. L. Garb, S. W. Rhee, J. Kaufman, et al., *J. Vasc. Surg.* 16, 181 (1992).
- (24) J. M. Isner, A. Pieczek, R. Schainfeld, R. Blair, L. Haley, et al., *Lancet* 348, 370 (1996).
- (25) P. A. D'Amore, R. W. Thompson, *Annu. Rev. Physiol.* 49, 453 (1987).
- (26) M. R. Tschudi, M. Barton, N. A. Bersinger, P. Moreau, F. Cosentino, et al., *J. Clin. Invest.* 98, 899 (1996).
- (27) Y. Sato, K. Okamura, A. Morimoto, R. Hamanaka, K. Hamanaguchi, et al., *Exp. Cell Res.* 204, 223 (1993); M. S. Pepper, N. Ferrara, L. Orci, R. Montesano, *Biochem Biophys Res Comm* 181, 902 (1991); D. R. Senger, S. R. Ledbetter, K. P. Claffey, A. Papadopoulos-Sergiou, C. A. Perruzzi, et al., *Am. J. Pathol.* 149, 293 (1996).

**[0090]** Die Erfindung wurde einschließlich ihrer bevorzugten Ausführungsformen im Detail beschrieben. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass der Fachmann aufgrund dieser Offenbarung am Erfindungsgegenstand Abwandlungen und Verbesserungen durchführen kann, ohne vom Geist und Umfang der Erfindung abzuweichen, wie sie in den Ansprüchen definiert sind.

### Patentansprüche

1. Verwendung einer CD34<sup>+</sup> Endothelialzellen-Progenitor-Zelle oder einer modifizierten Version hiervon für die Zubereitung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für eine Verstärkung der Angiogenese bei der Behandlung einer Erkrankung, die mit Angiogenese einhergeht, wozu cerebrovaskuläre Ischämie, renale Ischämie, pulmonare Ischämie, Gliedmaßen-Ischämie, ischämische Kardiomyopathie oder myokardiale Ischämie gehören, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung durch eine ortsgerechtete Abgabe mit Hilfe eines Katheters verabreicht werden soll.

2. Verwendung nach Anspruch 1, bei der die Zel-

le eine Endothelialzellen-Progenitor-Zelle ist, die modifiziert wurde, um ein endotheliales Zellmitogen zu exprimieren.

3. Verwendung nach Anspruch 1, weiterhin umfassend die Verwendung eines Endothelialzellen-Mitogens oder einer Nukleinsäure, die ein Endothelialzellen-Mitogen codiert.

4. Verwendung nach Anspruch 2, bei der das Endothelialzellen-Mitogen aus der Gruppe ausgewählt ist, die saure und basische Fibroblast-Wachstumsfaktoren, den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor, epidermalen Wachstumsfaktor, Transformations-Wachstumsfaktoren  $\alpha$  und  $\beta$ , von Plättchen abgeleiteten endothelialen Wachstumsfaktor, von Plättchen abgeleiteten Wachstumsfaktor, Tumor-Necrose-Faktor  $\alpha$ , Hepatocyt-Wachstumsfaktor, insulinartigen Wachstumsfaktor, Erythropoietin, Kolonie stimulierenden Faktor, Makrophagen-CSF, Granulozyten/Makrophagen-CSF und Stickoxid-Synthase umfasst.

5. Verwendung nach Anspruch 3, bei der das Endothelialzellen-Mitogen aus der Gruppe ausgewählt ist, die saure und basische Fibroblast-Wachstumsfaktoren, den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor, epidermalen Wachstumsfaktor, Transformations-Wachstumsfaktoren  $\alpha$  und  $\beta$ , von Plättchen abgeleiteten endothelialen Wachstumsfaktor, von Plättchen abgeleiteten Wachstumsfaktor, Tumor-Necrose-Faktor  $\alpha$ , Hepatocyt-Wachstumsfaktor, insulinartigen Wachstumsfaktor, Erythropoietin, Kolonie stimulierenden Faktor, Makrophagen-CSF, Granulozyten/Makrophagen-CSF und Stickoxid-Synthase umfasst.

6. Verwendung nach Anspruch 5, bei der das Endothelialzellen-Mitogen ein vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor ist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

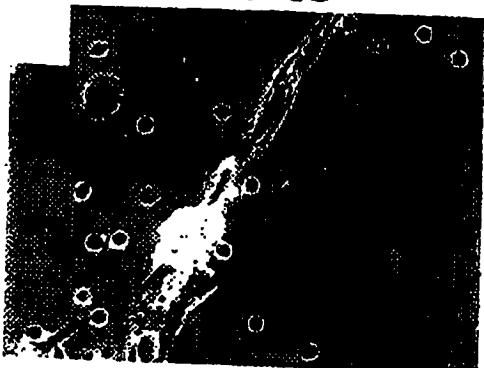
**FIG. 1A**



**FIG. 1B**



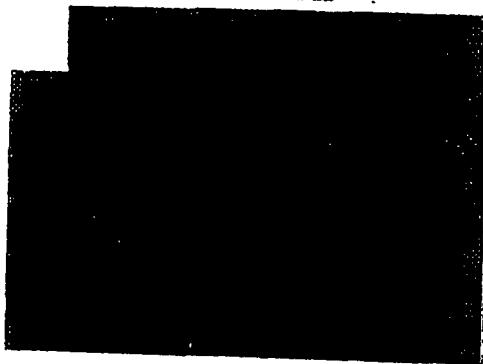
**FIG. 1C**



**FIG. 1D**



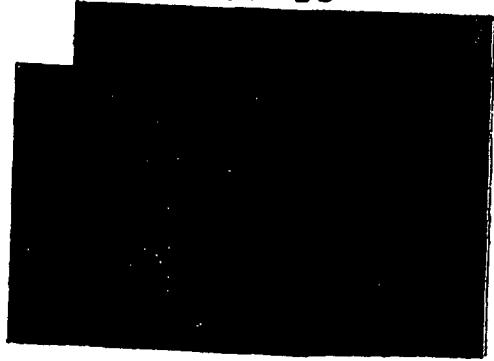
**FIG. 1E**

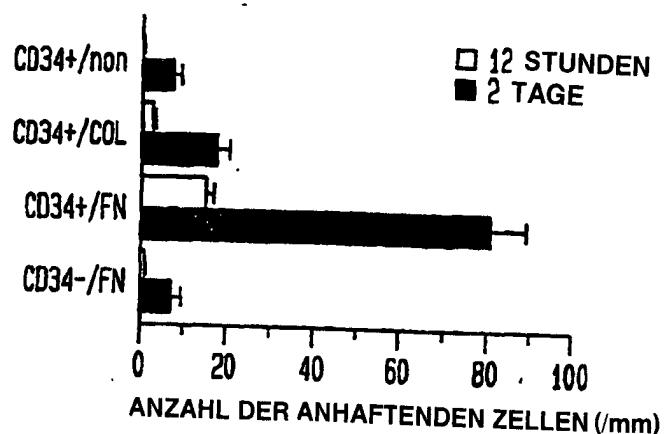
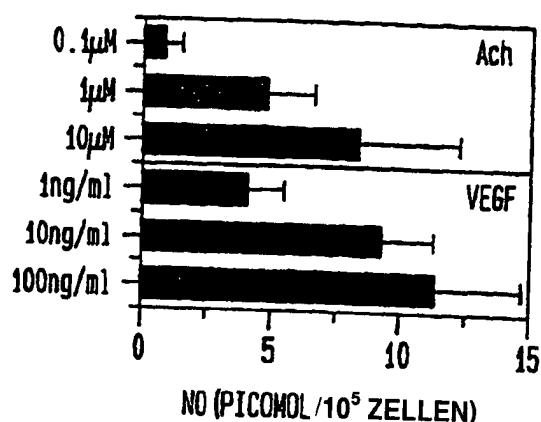
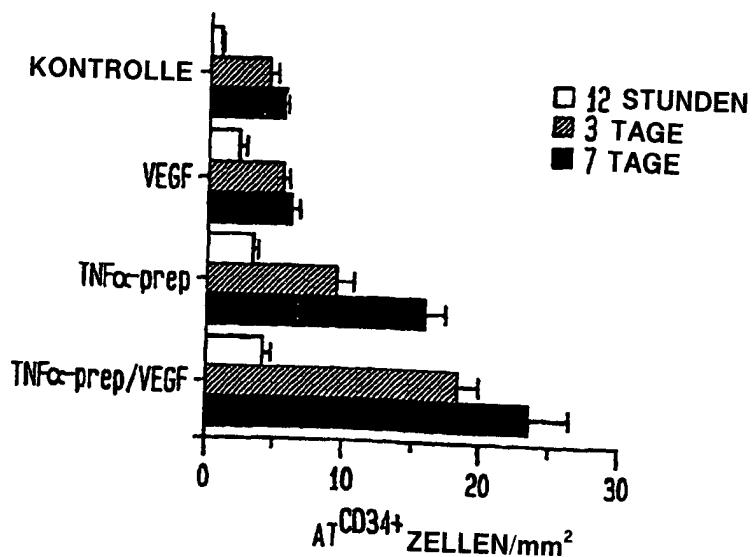


**FIG. 1F**



**FIG. 1G**



**FIG. 2****FIG. 5****FIG. 7**

**FIG. 3**

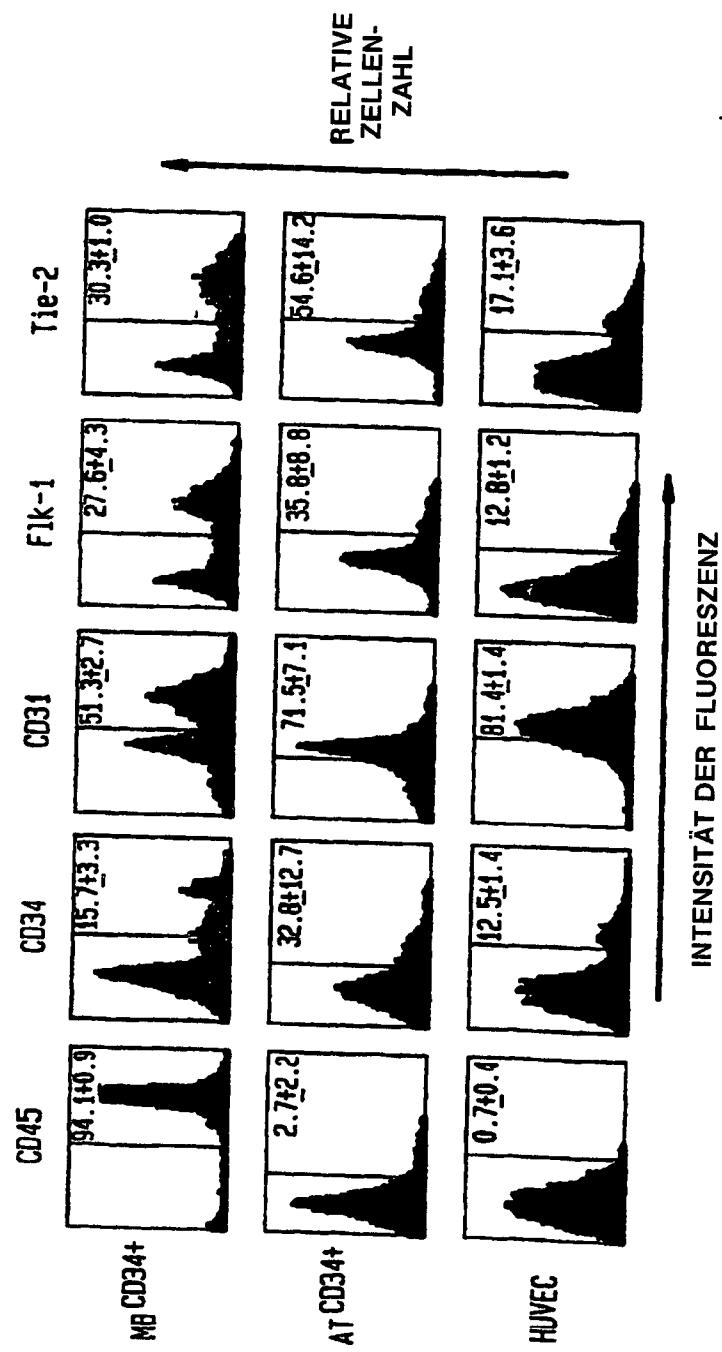


FIG. 4

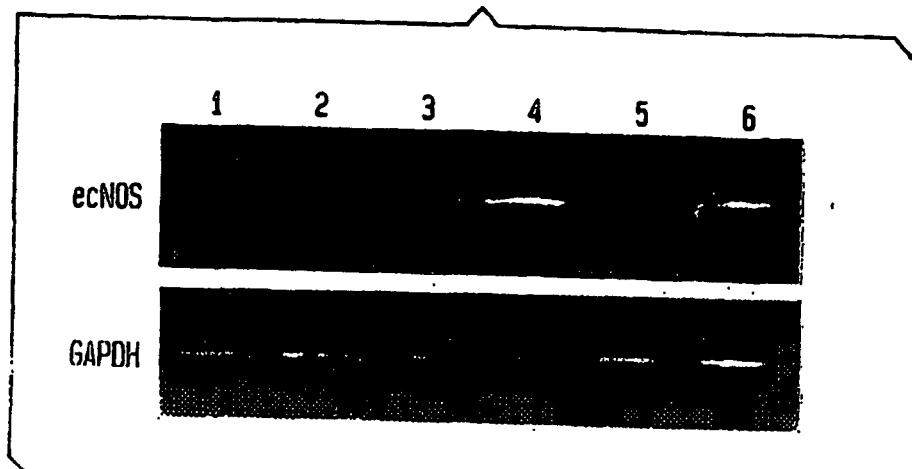
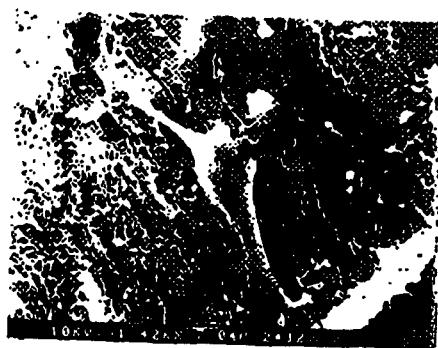
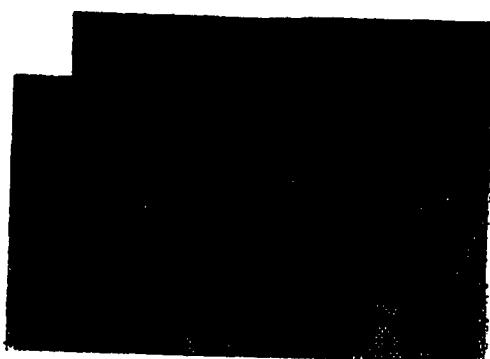


FIG. 9



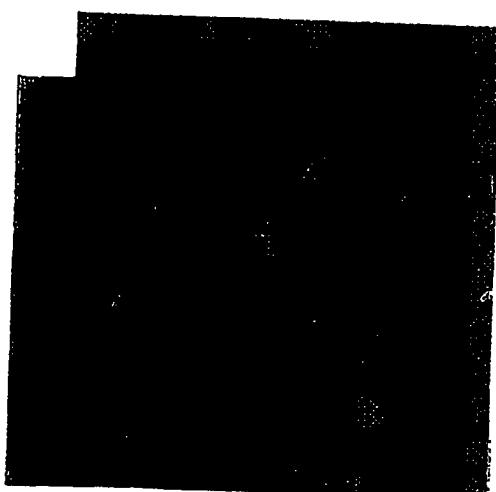
*FIG. 6A*



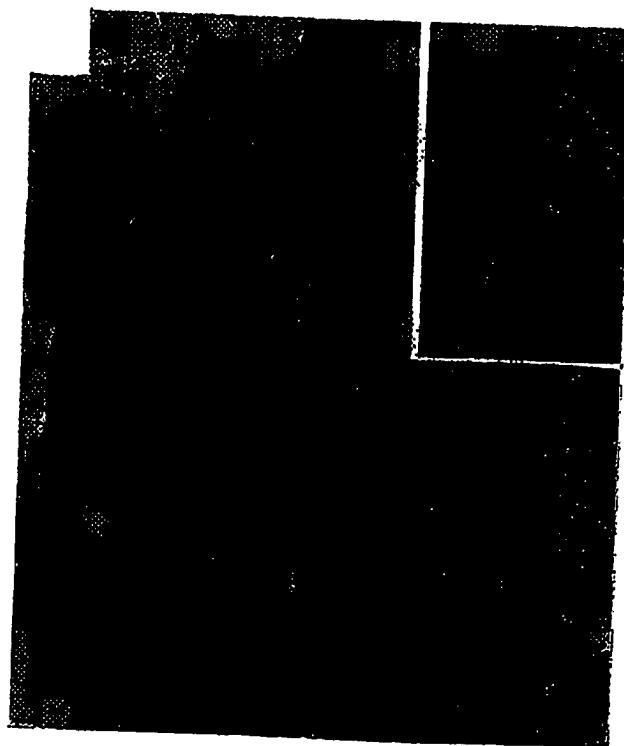
*FIG. 6B*



*FIG. 6C*



*FIG. 6D*



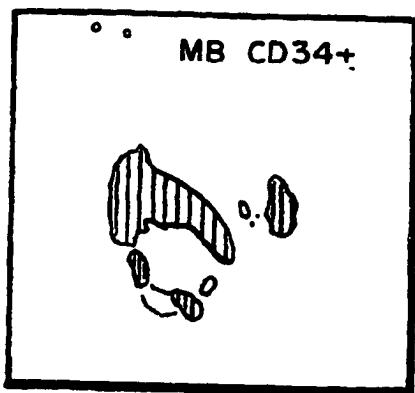


FIG.8A

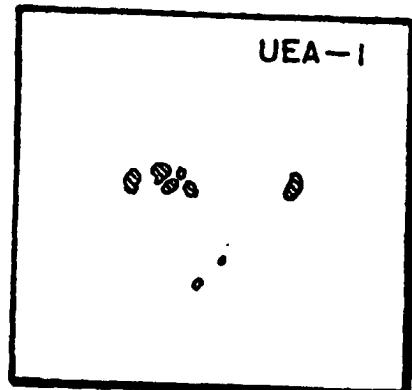


FIG.8B

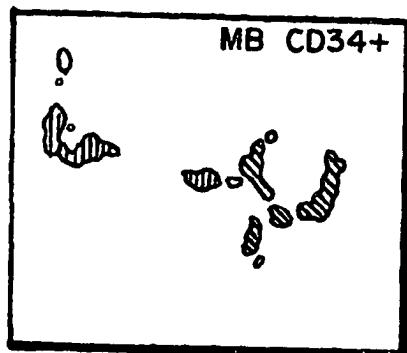


FIG.8C

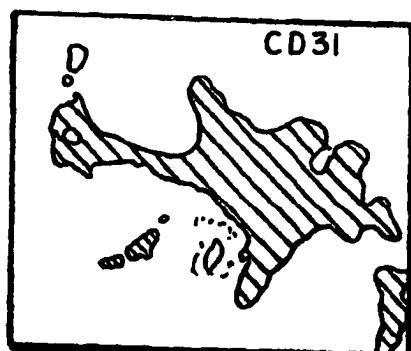


FIG.8D

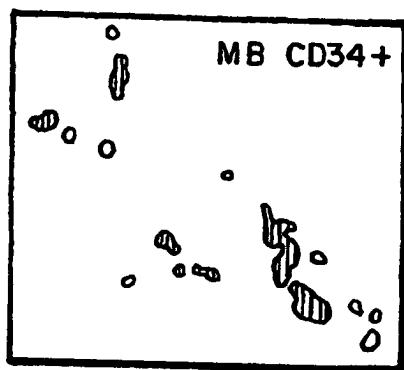


FIG.8E

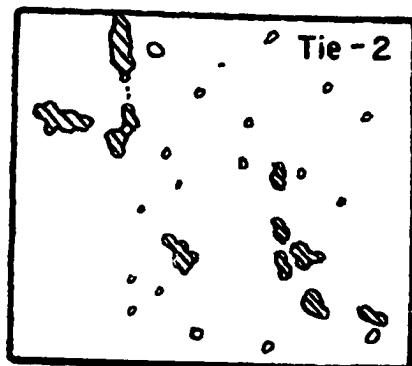


FIG.8F

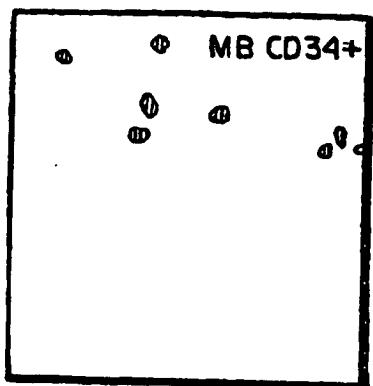


FIG.8G

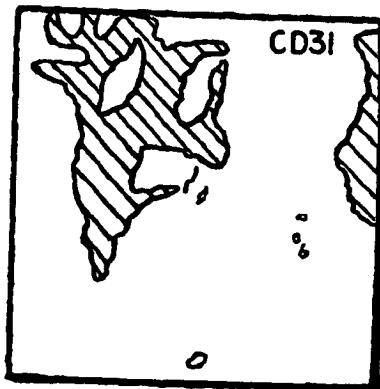


FIG.8H

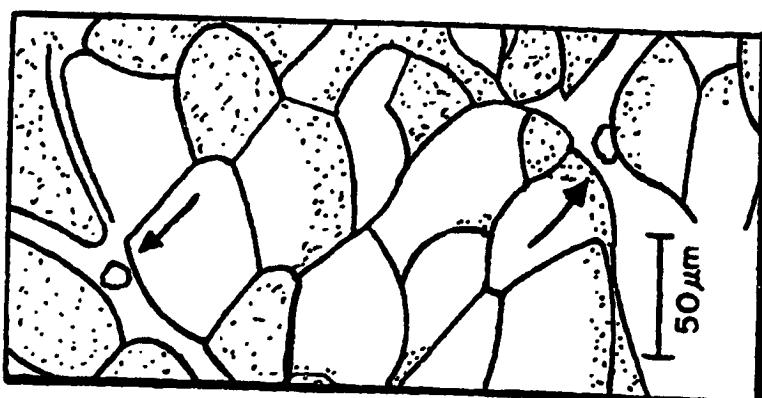


FIG.8I

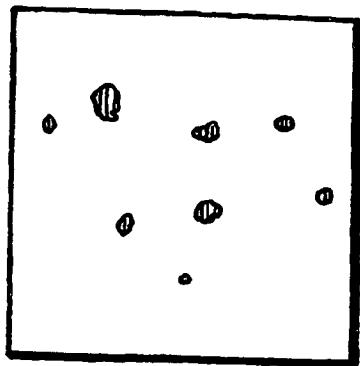


FIG.8J

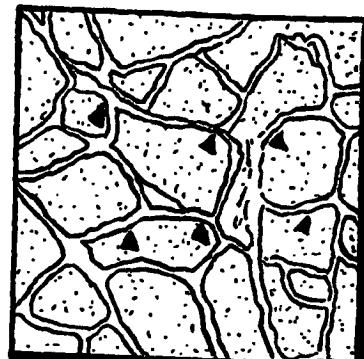


FIG.8K