



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 601 15 432 T2 2006.08.24

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 289 534 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 601 15 432.0

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/CA01/00758

(96) Europäisches Aktenzeichen: 01 935 896.9

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2001/089536

(86) PCT-Anmeldetag: 25.05.2001

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 29.11.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 12.03.2003

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 30.11.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 24.08.2006

(51) Int Cl.⁸: A61K 35/12 (2006.01)

A61K 35/14 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

2309518 25.05.2000 CA

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR

(73) Patentinhaber:

Vasogen Ireland Ltd., Shannon, County Clare, IE

(72) Erfinder:

SAUDER, Daniel, Toronto, CA; MANDEL, Arkady, North York, CA; BOLTON, Anthony E., Bakewell, GB

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 28209 Bremen

(54) Bezeichnung: APOPTOTISCHE KÖRPER ZUR VERWENDUNG IN DER BEHANDLUNG VON T-ZELL-VERMITTEL-TEN- UND ENTZÜNDUNGSERKRANKUNGEN

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**Gebiet der Erfindung**

[0001] Die Erfindung betrifft biochemische und biologische Zusammensetzungen, die bei der Behandlung und/oder Prophylaxe von verschiedenen medizinischen T-Zell-vermittelten und Entzündungserkrankungen bei Säugetierpatienten verwendet werden können. Insbesondere kann eine Behandlung und Prophylaxe von medizinischen T-Zell-vermittelten (z.B. Autoimmun-) und Entzündungserkrankungen durch Verabreichung der Zusammensetzungen enthaltend zelluläre Säugetiermaterialien und Fragmente derselben durchgeführt werden.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Zwei Mechanismen des Zelltods im Körper sind bekannt, Nekrose und Apoptose. Apoptose ist das Verfahren des programmierten Zelltods, das von Kerr et al. im Jahre 1992 beschrieben worden ist [Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1992). „Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics”, British Journal of Cancer 26:239–257], durch welches Grade der verschiedenen Organsysteme und Gewebe im Körper im stationären Zustand gehalten werden, wenn kontinuierliche Zellteilung und Differenzierung stattfindet. Zellen, die einer Apoptose unterliegen, zeigten häufig ausgeprägte morphologische Änderungen, wie eine deutlich hervortretende Abnahme des Zellvolumens, eine Modifikation des Cytoskeletts, was in einer deutlich hervortretenden Membranblasenbildung resultiert, eine Kondensation des Chromatins und ein Abbau der DNA in oligonukleosomale Fragmente.

[0003] Folgend diesen morphologischen Änderungen kann eine apoptotische Zelle in eine Anzahl von kleinen Fragmenten aufbrechen, die als apoptotische Körper bekannt sind, umfassend Membran-gebundene Körper, die intakte Organellen, Chromatin, etc. enthalten. Apoptotische Körper werden normalerweise schnell aus dem Körper durch Phagocytose, durch Macrophagen, dendritische Zellen und andere Antigen-präsentierende Zellen entfernt, bevor sie lysiert werden können und ihre potentiell entzündungsförderlichen intrazellulären Inhalte freigeben.

[0004] In einfacher Kurzdarstellung wird angenommen, daß Apoptose wie folgt stattfindet. Drei Phasen können im apoptotischen Mechanismus des programmierten Zelltods identifiziert werden:
Induktionsphase;
Effektorphase; und
Abbauphase.

[0005] Die Induktionsphase ist teilweise abhängig von spezifischen Wechselwirkungen der einen Tod induzierenden Signale an der Zelloberflächenmembran. Ein häufiges Signal wird durch das Binden eines spezifischen Liganden an Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie, die auf der Zellmembran vorliegen, initiiert. Ein wichtiger solcher Faktor ist Fas (APO-1, CD95), der mit Fas-Ligand wechselwirkt, um eine Apoptose zu initiieren.

[0006] Die Effektorphase, die durch das Binden von Rezeptoren und Liganden der Induktionsphase aktiviert wird, führt zur Aktivierung von Caspasen, Cystinyl-Aspartat-benötigenden Proteininasen (proteolytischen Enzymen) einschließlich Caspase 1 und 8. Diese Aktivierung kann mit einer Änderung in der Permeabilität der Mitochondrien verbunden sein, was es ermöglicht, Cytochrome-c freizusetzen, das in der Caspaseaktivierung involviert ist. Aktivierte Caspaseen initiieren eine Kette von lethalen proteolytischen Anlässen, die in den Veränderungen der Chromatin- und Cytoskelettkomponenten kulminieren, die bei einer Apoptose beobachtet werden.

[0007] Viele Zellen, die einer Apoptose unterliegen, können durch eine charakteristische „Kettenbildung (laddering)“ einer DNA identifiziert werden, die bei einer Agarosegelektrophorese beobachtet wird, was in einer Spaltung der DNA in eine Reihe von Fragmenten resultiert. Diese Veränderungen finden wenige Stunden vor dem Tod der Zelle statt, wie er definiert wird durch die Fähigkeit einer Zelle, Vitalfarbstoffe abzusondern. Das Auftreten der DNA-Kettenbildung bei der Agarosegelektrophorese folgend einer Extraktion von DNA aus Zellen ist ein bekanntes Verfahren zur Identifizierung einer Apoptose in Zellen [Loo, D.T. und Rillema, J.R. (1998) „Measurement of Cell Death”, Methods in Cell Biology 57: 251–264], obwohl es nicht immer empfindlich genug ist, um eine Apoptose zu detektieren. Ein in-situ-Markieren einer nuklearen DNA-Kernfragmentierung beispielsweise unter Verwendung kommerziell erhältlicher terminaler Einkerbendmarkierungs-dUTP-Untersuchungen (TUNEL) sind ein alternatives und reproduzierbareres Maß für die Bestimmung von fragmentierter DNA in apoptotischen Zellen und Zellen, die einer Apoptose unterliegen [Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) „Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation.“

Journal of Cell Biology 119: 493–501].

[0008] Während einer Apoptose wird Phosphatidylserin äußerlich auf der Zellmembran exponiert [Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992), „Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages“. Journal of Immunology 148: 2207–2216] und dieses exponierte Phosphatidylserin bindet an spezifische Rezeptoren, um die Aufnahme und Beseitigung von apoptotischen Zellen bei Säugetieren zu vermitteln [Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekowitz RAB, Henson PM (2000) „A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells“, Nature 405: 85–90]. Die Oberflächenexpression von Phosphatidylserin auf Zellen ist ein weiteres bekanntes Verfahren zur Identifizierung von apoptotischen Zellen.

[0009] Veränderungen der Mitochondrialintegrität sind eng mit einer Apoptose verbunden, was in Veränderungen der Mitochondrialmembranpermeabilität und der Freisetzung von Cytochrom-c aus den Mitochondrien in das Zellcytoplasma resultiert [Susin S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M.C., Alzari, P.M. und Kroemer, G. (1999) „Mitochondrial Release of Caspase-2 and -9 during the Apoptotic Process“, Journal of Experimental Medicine, 189: 381–394]. Eine Messung der Veränderungen des Mitochondrialmembranpotentials, die Veränderungen der Mitochondrialmembranpermeabilität widerspiegelt, ist ein weiteres bekanntes Verfahren zur Identifizierung von apoptotischen Zellen.

[0010] Eine Anzahl von anderen Verfahren zur Identifizierung von Zellen, die einer Apoptose unterliegen, und von apoptotischen Zellen, viele unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegenüber spezifischen Markierungsmitteln für apoptotische Zellen, sind in der Wissenschaftsliteratur beschrieben worden.

[0011] Verfahren zum Quantifizieren von apoptotischen Zellen und apoptotischen Körpern in einer Zellzusammensetzung sind bekannt und werden von Fachleuten auf dem Gebiet leicht durchgeführt. Methoden schließen ein Färben der behandelten Zellpopulation mit einem geeigneten selektiven Farbstoff, wie Fluorescein-konjugiertem Annexin V, gefolgt von einer Inkubation und Analyse durch Flusszytometrie ein.

[0012] Eine Nekrose ist im Gegensatz dazu ein Zelltod einer pathologischen Natur, der aus einer Verletzung, bakteriellen Toxinwirkungen, Entzündungsvermittlern, etc. resultiert und ein Membranreißer einschließt und intrazelluläre Inhalte zum umgebenden Gewebe freisetzt, häufig mit schädlichen Entzündungsfolgen. Nekrotische Zellen können detektiert und charakterisiert werden durch Detektion von beeinträchtigten Zellmembranen, z.B. durch Verfahren wie einem Färben mit Propidiumiodid gefolgt von Flusszytometrie oder Mikroskopie.

[0013] US 5,908,954 an Bolton, herausgegeben am 9. November 1999, offenbart einen Autoimmunimpfstoff zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen, der hergestellt wird, indem autologes Blut ex vivo Stressfaktoren unterworfen wird, nämlich Oxidationsmitteln, UV-Strahlung und/oder erhöhten Temperaturen. Von dem so hergestellten Impfstoff wird berichtet, Lymphozyten und andere Leukozyten, die eine kondensierte apoptotisch-artige Morphologie zeigen, in größeren Anzahlen zu enthalten als sie im normalen Blut des Patienten enthalten sind. Solche Zellen sind unterschiedlich und verschieden von apoptotischen Zellen und apoptotischen Körpern. Wiederholungen der in diesem Patent beschriebenen Vorgehensweisen, nämlich eine Unterwerfung des menschlichen Vollbluts einer Ozon/Sauerstoffgas-Mischung enthaltend 14–15 mcg/ml Ozon/Sauerstoff von medizinischer Qualität, durchgeblasen durch das Blutaliquot mit einer Geschwindigkeit von etwa 200 mLs pro Minute für drei Minuten bei einer Temperatur von 42,5°C, während es einer UV-Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 253,7 nm unterworfen wird, erzeugten eine Leukozytenfraktion, die, wenn sie getrennt und analysiert wurde durch Färbung mit Annexin 5 unter Verwendung von „Annex 5 FTIC Apoptosis Detection Kit“ (Sigma Product Cord/APO/AF), praktisch keine Gegenwart von apoptotischen Zellen oder apoptotischen Körpern zeigte.

Zusammenfassung der Erfindung

[0014] Die Aufgabe der Erfindung ist in den Ansprüchen definiert.

[0015] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann die Verabreichung von apoptotischen Zellen und/oder apoptotischen Körpern, die zuvor ex vivo hergestellt worden sind, bei der Prophylaxe und/oder Behandlung von medizinischen Entzündungs- und T-Zell-vermittelten Erkrankungen verwendet werden. Die medizinische Erkrankung kann eine T-Zell-vermittelte Erkrankung, wie rheumatische Arthritis, Skleroderma, Lupus, Diabetes, Psoriasis, etc. sein. Sie kann eine Entzündungserkrankung sein, die aus einer allergischen Reaktion des Körpers oder eines Organs desselben mit einer äußerlich kontaktierten oder aufgenommenen Substanz resultiert, beispielsweise Kontakthypersensibilität, Asthma, Giftefeu- oder Gifteichenreaktion, Nesselausschlag, etc. und In-

fektionen. Sie kann ebenfalls Entzündungs-, allergische oder T-Zell-vermittelte Erkrankungen von inneren Organen, wie Lebererkrankungen, Nierenerkrankungen, Herzerkrankungen und dergleichen sein.

[0016] Diese Erfindung kann für die Behandlung oder Prophylaxe gegenüber T-Zell-vermittelten und Entzündungserkrankungen bei einem Säugetierpatienten verwendet werden, wobei die Behandlung eine Verabreichung an den Patienten einer wirksamen Menge von apoptotischen Körpern und/oder apoptotischen Zellen umfasst.

[0017] Die Behandlung wird bevorzugt erreicht durch Verabreichen der hierin beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzungen an den Patienten.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

[0018] Die Figur ist ein Graph, der einen Vergleich einer reinen Ohrschwellung bei Mäusen, die mit den Zusammensetzungen dieser Erfindung behandelt worden sind, und einer Kontrollgruppe zeigt.

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0019] Diese Erfindung ist auf die Verwendung von apoptotischen Zellen und/oder apoptotischen Körpern für die Behandlung von T-Zell-vermittelten und Entzündungserkrankungen bei Säugetierpatienten gerichtet.

[0020] „Apoptotische Zellen“ und „apoptotische Körper“, wenn die Begriffe hierin verwendet werden, bedeuten Zellen und Zellkörper, die eines oder mehrere der folgenden Merkmale zeigen, die eine Apoptose kennzeichnen: Oberflächenexposition von Phosphatidylserin, wie es durch akzeptierte Standardverfahren zur Detektion detektiert wird, wie ein Annexin V-Färben: Veränderungen der Mitochondrialmembranpermeabilität, gemessen durch akzeptierte Standardverfahren (z.B. Salvioli, S., Ardizzone, A., Franceschi, C., Cossarizza, A. (1997) „JC-1, but not DIOC6(3) or Rhodamine 123, is a Reliable Fluorescent Probe to assess Delta Psi Changes in Intact Cells: Implications for Studies on Mitochondrial Functionality during Apoptosis“, FEBS Letters 411: 77–82); Nachweis aus einer DNA-Fragmentierung, wie das Auftreten der DNA-Kettenbildung auf Agarosegel-elektrophorese gefolgt von einer Extraktion der DNA aus den Zellen [Teiger, E., Dam, T.V., Richard, L., Wisnewsky, C., Tea, B.S., Gaboury, L., Tremblay, J., Schwartz, K., und Hamet, P. (1996) „Apoptosis in Pressure Overload-induced Heart Hypertrophy in the Rat“, Journal of Clinical Investigation 97: 2891–2897], oder durch in-situ-Markierung (siehe Gavrieli et al., 1992, oben genannt).

[0021] Die apoptotischen Zellen und/oder apoptotischen Körper zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung umfassen bevorzugt nicht mehr als 35 Gewichtsprozent an nekrotischen Zellen und/oder nekrotischen Körpern, basierend auf dem Gesamtgewicht der apoptotischen Zellen/Körper und nekrotischen Zellen/Körper; noch bevorzugter nicht mehr als etwa 20 Gewichtsprozent; und noch bevorzugter nicht mehr als etwa 10 Gewichtsprozent. Bei diesen Gehalten wird angenommen, daß die Gegenwart solcher nekrotischen Zellen und/oder Körper in vivo-Verfahren nicht beträchtlich ändert. In ihrer bevorzugtesten Ausführungsform sind die apoptotischen Zellen/Körper im wesentlichen frei von nekrotischen Zellen und/oder Körpern (d.h. weniger als etwa 2 Gewichtsprozent an nekrotischen Zellen/Körpern).

[0022] Die apoptotischen Zellen und/oder apoptotischen Körper zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung werden ex vivo aus Säugetierzellen hergestellt, die mit solchen des Säugetierpatienten verträglich sind. Sie können hergestellt werden aus im wesentlichen jeder Art einer Säugetierzelle, einschließlich gezüchteter Zelllinien. Bevorzugt werden sie hergestellt aus einem Zelltyp, der aus dem eigenen Körper des Säugetierpatienten oder aus einer etablierten Zelllinie abgeleitet wird. Insbesondere werden sie hergestellt aus Leukozyten aus Blut, das mit demjenigen des Säugetierpatienten verträglich ist, noch bevorzugter aus den eigenen Leukozyten des Patienten und noch bevorzugter aus den eigenen T-Lymphozyten des Patienten. Noch bevorzugter werden sie hergestellt aus einer etablierten Zelllinie. Die apoptotischen Zellen und/oder apoptotischen Körper werden extrakorporal vor der Verabreichung an den Patienten hergestellt. Somit kann in einer Ausführungsform ein Aliquot des Bluts des Patienten abgezogen werden, z.B. durch Venenpunktion, und wenigstens ein Teil der Leukozyten desselben wird extrakorporal Apoptose-induzierenden Bedingungen unterworfen.

[0023] Eine Vielzahl von Verfahren zum Induzieren von Apoptose in Säugetierzellen, um so apoptotische Zellen und apoptotische Körper zu erzeugen, ist auf dem Fachgebiet bekannt und im wesentlichen kann jedes von diesen angepasst werden zur Herstellung von apoptotischen Körpern zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung. Ein solches Verfahren ist das Unterwerfen der Zellen einer ionisierenden Strahlung (γ Strahlen,

x-Strahlen, etc.) und/oder einer nicht-ionisierenden elektromagnetischen Bestrahlung einschließlich ultraviolettes Licht. Eine Apoptose kann ebenfalls durch Unterwerfen der Zellen gegenüber Ultraschall induziert werden.

[0024] Ein weiteres Verfahren ist die Behandlung der Zellen mit Arzneimitteln, wie nicht-spezifischen Proteinkinaseinhibitoren, wie es durch Staurosporin veranschaulicht wird (siehe Bombeli, Karsan, Tait und Hirlan (1997), „Apoptotic Vascular Endothelial Cells Become Procoagulant“, Blood, Band 89:2429–2442). Ebenfalls induzieren bestimmte chemotherapeutische Agentien, die für die Behandlung von bösartigen Tumoren verwendet werden, Apoptose, beispielsweise Adriamycin, wie es ebenfalls Statinarzneimittel (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Koenzym A Reduktaseinhibitoren) [Guizarro C, Blanco-Colio LM, Ortega M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Diaz C, Hernandez G, Edigo J (1998), „3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase and Isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle in culture“, Circulation Research 83: 490–500] und Colcicin [Suzuki Y (1998), „Cell death, phagocytosis and neurogenesis in mouse olfactory epithelium and vomeronasal Organ after colcicine treatment“, Annals of the New York Academy of Sciences 855: 252–254] können. Die Verwendung von Liganden für Todrezeptoren an Zellen, wie Fas-Ligand, sind offensichtlich zur Induzierung von Apoptose aus der oben gegebenen Diskussion von Apoptose.

[0025] Noch ein weiteres Verfahren ist die extrakorporale Beaufschlagung von oxidativem Stress an Zellen (siehe beispielsweise Buttke und Sandstrom (1994) „Oxidative Stress as a Mediator of Apoptosis“, Immunology Today, 15:7–10). Dies kann erreicht werden durch Behandeln der Zellen, in Suspension, mit chemischen Oxidationsmitteln, wie Wasserstoffperoxid, anderen Peroxiden und Hydroperoxiden, Ozon, Permanganaten, Periodaten und dergleichen. Solche biologisch annehmbaren Oxidationsmittel werden bevorzugt verwendet, um so mögliche Probleme zu vermindern, die mit Rückständen und Kontaminationen der apoptotischen Zellen und apoptotischen Körper, die so gebildet werden, verbunden sind.

[0026] Die vorliegende Erfindung ist nicht auf irgendein besonderes Verfahren zum Herstellen von apoptotischen Zellen und apoptotischen Körpern zur Verwendung hierin beschränkt, und irgendein geeignetes bekanntes Verfahren kann verwendet werden.

[0027] Verfahren zur Detektion und Quantifizierung der Apoptose können verwendet werden, um die Gegenwart und den Gehalt an Apoptose in der an den Patienten gemäß der vorliegenden Erfindung zu verabreichen-den Zubereitung zu bestimmen. Wenigstens eines der Verfahren aus denjenigen, die in der Einführung oben beschrieben worden sind, sollte verwendet werden, um den Gehalt an Apoptose, der vor der Verabreichung erzielt wird, zu bestätigen. Sie werden geeigneterweise vor der Verwendung durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren, wie eine Differentialzentrifugation, gereinigt.

[0028] Bei der Herstellung der apoptotischen Zellen und/oder apoptotischen Körper sollte acht gegeben werden, nicht übermäßige Niveaus an oxidativem Stress, Strahlung, Arzneimittelbehandlung, etc zu beaufschlagen, da es ansonsten ein beträchtliches Risiko zur Verursachung von Nekrose bei wenigstens einigen der Zellen unter Behandlung gibt.

[0029] Eine Nekrose verursacht ein Zellmembranreißen und die Freisetzung der Zellinhalte häufig mit biologisch schädlichen Ergebnissen, insbesondere Entzündungsanlässen, so daß die Gegenwart von nekrotischen Zellen und deren Komponenten zusammen mit den apoptotischen Körpern am besten vermieden wird.

[0030] Geeignete Niveaus zur Behandlung der Zellen, um apoptotische Körper zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung zu erzeugen, hängen in einem gewissen Ausmaß von der Natur der gewählten Zellen und der Zellzusammensetzung und der Art der gewählten Behandlung, um Apoptose zu induzieren, ab. Solche geeigneten Niveaus werden leicht von Fachleuten auf dem Gebiet bestimmbar sein, unter Berücksichtigung der verfügbaren Wissenschaftsliteratur für den Gegenstand, einschließlich der oben erwähnten Aufsätze.

[0031] Ein bevorzugtes Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung schließt die Züchtung von Zellen aus dem Patienten oder einer verträglichen Säugetierzelllinie ein. Die gezüchteten Zellen können dann behandelt werden, um Apoptose zu induzieren und apoptotische Zellen und/oder apoptotische Körper darin zu erzeugen. Die Zellen, suspendiert im Plasma des Patienten oder einem anderen geeigneten Suspensionsmedium, wie Salzlösung oder einem ausgeglichenen Säugetierzellkulturmedium, können dann wie unten angezeigt verabreicht werden. Die Anzahl an apoptotischen Zellen und/oder Körpern kann durch veröffentlichte Verfahren bestimmt werden, die in der Fachliteratur für den betroffenen Gegenstand verfügbar sind, einschließlich der oben erwähnten Aufsätze. Die Anzahlen an solchen apoptotischen Zellen und/oder apoptotischen Körpern, die zur Verabreichung an den Patienten erforderlich sind, um den erforderlichen klinischen Nutzen zu erhalten, wird

von der Quelle der Zellen, dem Zustand des Patienten, dem Alter und Gewicht des Patienten und anderen relevanten Faktor abhängen, die leicht durch den behandelnden Arzt bestimmbar sind.

[0032] Daher schließt ein Beispiel eines bevorzugten Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung demzufolge ein Entnehmen eines extrahierten Aliquots von Blut aus dem zu behandelnden Patienten und eine Behandlung der Leukozyten desselben unter Apoptose auslösenden Bedingungen ein, um so eine Zellzusammensetzung zu erzeugen, in welcher beträchtliche Anzahlen der Leukozyten darin apoptosiert worden sind, um darin beträchtliche Anzahlen von apoptotischen Zellen oder Körpern zu erzeugen. Die behandelte Zusammensetzung wird dann dem Patienten wieder verabreicht.

[0033] Das behandelte Aliquot, um Apoptose zu bewirken, kann Vollblut sein, ist jedoch bevorzugt eine abgetrennte Fraktion von Leukozyten desselben, getrennt vom Blut durch bekannte Maßnahmen, und suspendiert in Plasma oder anderem geeigneten Suspensionsmedium, wie Salzlösung oder einem ausgeglichenen Säugetierzellkulturmedium. Insbesondere können T-Lymphozyten, isoliert aus dem Blut durch bekannte Maßnahmen und wie oben suspendiert, als eine Quelle von apoptotischen Zellen und apoptotischen Körpern verwendet werden.

[0034] Die Anzahl an lebensfähigen Zellen, die zur Behandlung ausgewählt werden, um apoptotische Zellen und/oder apoptotische Körper zu erzeugen, ist geeigneter Weise bis etwa 4×10^9 , bevorzugt von etwa 1.000.000 bis etwa 1.000.000.000, und am bevorzugtesten von etwa 50.000.000 bis etwa 150.000.000 für jede Verabreichung an einen menschlichen Patienten. Etwa 10% bis 90%, bevorzugt etwa 30% bis 70% der Zellzusammensetzung zur Verabreichung ist von apoptotischen Zellen und apoptotischen Körpern umfasst, wobei der Rest lebensfähige Zellen und nekrotische Zellen sind. Demzufolge sind die bevorzugten Mengen an apoptotischen Zellen und/oder apoptotischen Körpern zur Verabreichung solche, die durch Unterwerfen dieser Anzahlen von Zellen gegenüber den apoptosierenden Bedingungen hergestellt werden. Wenn Vollblut als die Quelle der Zellen verwendet wird, die den Apoptose induzierenden Bedingungen zu unterwerfen sind, werden diese Anzahlen von Leukozyten in Blutvolumenquotienten von bis zu etwa 400 ml, bevorzugt bis 100 ml erhalten. Insbesondere sind 50.000.000 bis 150.000.000 Zellen äquivalent zu den Leukozyten in Blutvolumenquotienten von 10–30 ml.

[0035] Das Volumen des Blutvolumenquotienten, das aus dem Patienten zur Behandlung zur Erzeugung apoptotischer Zellen und/oder apoptotischer Körper darin entnommen wird, ist geeigneter Weise bis zu etwa 400 ml, bevorzugt von etwa 0,1 bis etwa 100 ml und am bevorzugtesten von etwa 5 bis etwa 15 ml. Demzufolge sind die bevorzugten Mengen an apoptotischen Zellen und/oder apoptotischen Körpern zur Verabreichung solche, die zu den Zahlen korrespondieren, die aus den Leukozyten oder isolierten T-Lymphozyten ableitbar sind, die in solchen Mengen an Vollblut folgend einer Unterwerfung gegenüber Apoptose induzierenden Bedingungen enthalten sind.

[0036] Die Suspension der behandelten apoptotischen Zellen und/oder Körper zur Verabreichung an den Patienten wird in einem biologisch annehmbaren, flüssigen Suspensionsmedium hergestellt, wie dem Serum oder Plasma des Patienten, Salzlösung oder ausgeglichenem Säugetierzellkulturmedium. Die Zugabe weiterer Faktoren, wie Zytokinen, Hormonen, Produkten von unter Stress gesetzten Zellen oder anderem geeigneten biologisch aktiven Material kann den Nutzen des verabreichten apoptotischen Zellmaterials erhöhen. Das Aliquot kann in den Körper des Patienten wieder eingeführt werden durch irgendein geeignetes Verfahren, am bevorzugtesten durch intramuskuläre Injektion, kann jedoch ebenfalls subkutane Injektion, Mini-Grafting, intra-peritoneale Injektion, intra-arterielle Injektion, intravenöse Injektion und orale Verabreichung einschließen. Die apoptotischen Einheiten können an das spezifische Körperorgan und/oder die Stelle durch Verwendung irgendeines geeigneten bekannten Liefersystems geliefert werden.

[0037] Die Zusammensetzungen dieser Erfindung können optional einen pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff einschließen. Einige Beispiele geeigneter Trägerstoffe schließen steriles Wasser, sterile Salzlösung, phosphatgepufferte Salzlösung und dergleichen ein.

[0038] Wenn sie verabreicht sind, umfassen die pharmazeutischen Zusammensetzungen eine wirksame Menge an apoptotischen Körpern/Zellen, um eine geeignete prophylaktische und/oder therapeutische Ansprechung beim Patienten zu induzieren, der das Risiko des Leidens an einer T-Zell-vermittelten oder Entzündungserkrankung aufweist oder darunter leidet. Bevorzugt umfasst die an den Säugetierpatienten verabreichte Zusammensetzung 10.000 bis 10.000.000 apoptotische Zellen oder Körper pro Kilogramm Körpergewicht, bevorzugter etwa 500.000 bis 5.000.000 und am bevorzugtesten von etwa 1.500.000 bis 4.000.000 apoptotische Zellen oder Körper pro Kilogramm Körpergewicht. Die spezifische eingesetzte Dosis wird selbstverständlich

abhängig sein vom Alter, Gewicht und Schwere der Erkrankung beim behandelten Patienten, die alle innerhalb des Geschicks des behandelnden Arztes liegen.

[0039] Für die effektivste Behandlung und/oder Prophylaxe von Säugetiererkrankungen, die eine Entzündungskomponente einschließen, kann dem Patienten eine Behandlungskur mit apoptotischen Zellen und/oder Körpern gemäß der Erfindung gegeben werden. Jeder Behandlungsgang kann eine Verabreichung an den Patienten von 1 bis 6 Aliquoten des suspendierten Zellmaterials, wie es oben beschrieben ist, einschließen. Nicht mehr als ein solches Aliquot sollte pro Tag verabreicht werden, und die maximale Ruhedauer zwischen zwei Verabreichungen sollte nicht größer als etwa 21 Tage sein. Booster-Behandlungen, wie sie unten beschrieben werden, können vorteilhafterweise verwendet werden. Um die gewünschten Effekte zu bewahren, kann der Patient Booster-Behandlungen unterzogen werden, mit einem weiteren Verabreichungsgang von Aliquoten an suspendierten apoptotischen Zellen und/oder apoptotischen Körpern, wie oben beschrieben, in Intervallen von 3 bis 4 Monaten.

[0040] Wie erwähnt, ist die vorliegende Erfindung anwendbar für die Behandlung und/oder Prophylaxe einer breiten Vielzahl von T-Zell-vermittelten und Entzündungserkrankungen bei Säugetieren, wie Autoimmunerkrankungen. Diese schließen Lupus, Diabetes, Skleroderma, Psoriasis und rheumatische Arthritis ein, ebenso wie allergischen Entzündungsreaktionen, Organ- und Zelltransplantationsreaktionserkrankungen und mikrobiellen Infektionen, die zu Entzündungsreaktionen führen. Die vorliegende Erfindung ist ebenfalls anwendbar auf ein Vorkonditionieren gegenüber der Aufnahme von Giften, der Exposition gegenüber toxischen Chemikalien, einer Strahlungsschädigung und der Exposition gegenüber durch die Luft beförderte und durch Wasser beförderte, reizende Substanzen, etc., die eine schädigende Entzündung verursachen. Zusätzlich ist sie anwendbar auf Entzündungs-, allergische und T-Zell-vermittelte Erkrankungen innerer Organe, wie der Niere, Leber, des Herzens, etc.

[0041] Die Erfindung wird ferner zu Veranschaulichungszwecken in den folgenden spezifischen Beispielen beschrieben.

BEISPIEL 1

[0042] Experimente, um die Erfindung zu demonstrieren, wurden an Versuchsmäusen unter anerkannten Bedingungen zum Durchführen solcher Experimente durchgeführt.

[0043] Die Wirksamkeit der Behandlung gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, in Bezug auf Kontakthypersensibilität (CHS), ein Beispiel einer Th-1-Zellentzündungserkrankung, die dafür bekannt ist, durch Entzündungscytokine vermittelt zu werden, wurde an Versuchsmäusen gemäß der anerkannten Tierversuchsvorgehensweisen unter Verwendung des Verfahrens beurteilt, das von Kondo et al., „Lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) is required for maximum elicitation of allergic contact dermatitis“ Br J. Dermatol. 131: 354–359 (1994) beschrieben worden ist, mit kleinen Abweichungen. Die Offenbarung derselben ist hierin durch Bezugnahme eingeschlossen. Kurzgesagt, wird, um CHS zu induzieren, die Abdominalhaut jeder Maus rasiert und mit Dinitrofluorbenzol DNFB, dem sensibilisierenden chemischen Stoff, unter Verwendung von 25 µl 0,5% DNFB in 4:1 Aceton-Olivenöl-Lösung bestrichen. Diese Sensibilisierung wurde auf zwei Gruppen von Balb/c-Mäusen, 10 Tiere insgesamt, beaufschlagt.

[0044] Apoptotische Körper wurden aus mausartigen Fibroblasten hergestellt. Die mausartigen Fibroblasten wurden mit 50 mM Natriumbutyrat in RPMI-Medium behandelt, mit Konfluenz für einen Tag, und dann wurde das Natriumbutyratmedium gewechselt. Um die Anzahl an apoptotischen Zellen im Körper zu erhöhen, können die Zellen zusätzlich mit UV-Licht (z.B. 75 mJ) bestrahlt werden. Die überstehende Flüssigkeit, die schwimmende Zellen enthält, wird 24 Stunden nach der Bestrahlung entfernt.

[0045] Apoptotische Körper wurden durch Zentrifugieren der überstehenden Lösung (1200 rpm, 5 Min.), Belüften der überstehenden Lösung, Waschen des resultierenden Zellpellets mit PBS und erneutes Zentrifugieren, wie oben, quantifiziert. Das Pellet, das die apoptotischen Körper enthielt, wurde wieder in PBS suspendiert. Die Zellen wurden in PBS bei 4°C für die Dauer des Experiments gelagert. Die zur Quantifizierung zu färbenden Zellen wurden wieder suspendiert in 1 X Bindungspuffer mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml. 100 µl der Zellen wurden in ein 5 ml Röhrchen überführt, und 10 µl Fluorescein-konjugiertes Annexin V und 10 µl Propidiumiodidreagenz wurden zugegeben. Die Zellen wurden sanft gevortext, und die Zellmischung wurde für 15 Minuten bei 25°C in Dunkelheit inkubiert. Folgend der Inkubation wurden 400 µl des 1X Bindungspuffer zu jedem Röhrchen zugegeben. Die Probe wurde auf einem Flusszytometer über eine Stunde analysiert.

[0046] Von den zwei Gruppen an sensibilisierten Mäusen erhielt die erste Gruppe, Kontrollgruppe A, keine Behandlung. Die zweite, Testgruppe B, wurde mit einer Injektion der wie oben beschrieben hergestellten suspendierten apoptotischen Körpern behandelt, 50 µl Volumen enthielten wenigstens 150.000 Körper pro Blutinjektion, unterworfen gegenüber stressauslösenden Faktoren, wie es oben beschrieben wurde. Behandlungen, jeweils einschließend eine intramuskuläre Injektion von 50 µl der entsprechenden Flüssigkeit, begannen am Tag der Sensibilisierung und wurden jeden Tag für eine Gesamtdauer von sechs Tagen wiederholt. Am gleichen Tag wie für die letzte Behandlung, jedoch nach dieser Verabreichung, wurden die Tiere mit DNFB herausgefordert, durch Beaufschlagen auf das rechte Ohr jedes Tieres von 10 µl einer 0,2% Lösung an DNFB in Aceton und Olivenöl. Auf das linke Ohr jedes Tieres wurde das Aceton/Olivenöl-Lösungsmittel ohne DNFB aufgetragen. Eine Entzündung aufgrund von CHS drückt sich in einem Anschwellen des rechten Ohres aus. Die Ohrdicke wurde gemessen, 24 Stunden nach der Herausforderung, mit einem federbelasteten Peacock-Mikrometer (Ozaki Co., Tokyo, Japan). Die Ergebnisse wurden als die Dicke und der Dickenunterschied der rechten Ohren und der linken Ohren jedes Tieres, 24 Stunden nach der Herausforderung, ausgedrückt.

[0047] Die Experimente wurden wiederholt unter Verwendung mehrerer Sätze von 2 Tiergruppen, einer ausreichenden Anzahl von Zeiten, um eine statistische Bedeutung in den Ergebnissen zu gewährleisten. Eine bemerkenswerte und beträchtliche Reduktion der Ohrdicke (Entzündung) wurde für die Tiere beobachtet, die mit der Suspension der apoptotischen Zellen und apoptotischen Körper gemäß der Erfindung behandelt worden waren, verglichen mit der nicht behandelten Gruppe, was eine beträchtliche Entzündungsreduktion zeigt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle, und auf der beigefügten Figur als ein Säulendiagramm der reinen Ohrschwellung (Unterschied zwischen der Dicke des rechten Ohres und des linken Ohres), für jede Gruppe, mit einer „Standardabweichung“, die durch die senkrechte Linie an der oberen Seite jeder Säule gezeigt ist, dargestellt.

Tabelle 1

<u>Gruppe</u>	<u>Linkes Ohr</u>	<u>Rechtes Ohr</u>	<u>Unterschied</u>
A	17	31	14
A	18	39	21
A	17	30	13
A	18	32	14
A	18	31	13
			Durchschnitt: 15 S.D.: 3,391165

<u>Gruppe</u>	<u>Linkes Ohr</u>	<u>Rechtes Ohr</u>	<u>Unterschied</u>
B	21	31	10
B	18	18	0
B	17	30	13
B	20	24	4
B	18	22	4
			Durchschnitt: 6,2 S.D.: 5,215362

[0048] Eine Analyse der Suspension der apoptotischen Zellen und Körper, die an die Tiere der Testgruppe B verabreicht worden ist, zeigte die Gegenwart darin von etwa 40% apoptotischen Zellen und Körpern, wobei der Rest lebensfähige Zellen und kleinere Mengen an nekrotischen Zellen (nicht mehr als 20 %) waren, von deren Gegenwart angenommen wird, nicht im in-vivo-Verfahren signifikant zu sein.

BEISPIEL 2

[0049] Das obige Testverfahren wurde an ähnlichen Tiergruppen, einer Kontrollgruppe und einer Testgruppe, wiederholt, jedoch unter Verwendung einer Suspension von apoptotischen Zellen und Körpern an der Testgruppe, die etwa 60% apoptotische Zellen und Körper umfasste, wobei der Rest lebensfähige Zellen und eine kleinere Menge (weniger als 20%) nekrotische Zellen war. Im wesentlichen ähnliche Ergebnisse wurden erhalten.

[0050] Die Wirksamkeit der Verfahren und Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung beim Vermeiden und Lindern einer Entzündung aufgrund von CHS zeigt an, daß eine Verabreichung von apoptotischen Zellen und Körpern, wie es beschrieben wurde, die in-vivo-Erzeugung von entzündungshemmenden Th-2-abgeleiteten Zytokinen, wie IL-10 (bekannt dafür, in CHS einbezogen zu sein, siehe Kondo, McKenzie und Sauder, „The Journal of Investigative Dermatology“, Band 103, 1994, Seite 811–814), aufreguliert und, vielleicht als eine Folge, Entzündungszytokine, wie TNF γ , IL-6 und IL-12, abreguliert. Diese Entzündungszytokine sind bei Autoimmunerkrankungen, wie Psoriasis, rheumatischer Arthritis, Skleroderma, Lupus, Diabetes mellitus, Organabstoßung, Fehlgeburt, multipler Sklerose, entzündlicher Darmerkrankung und Atherosklerose ebenso wie Graft-versus-Host-Erkrankung einbezogen. Folglich ist der gefundene Erfolg bei der CHS-Behandlung, der in den obigen Beispielen beschrieben wird, anzeigend für eine erfolgreiche Verwendung des Verfahrens und der Zusammensetzungen bei der Behandlung und/oder Prophylaxe einer großen Vielzahl von T-Zell-vermittelten und Entzündungserkrankungen, einschließlich der oben diskutierten.

Patentansprüche

1. Verwendung einer zellulären Zusammensetzung umfassend apoptotische Körper und/oder apoptotische Zellen in der Herstellung eines Medikaments für die Behandlung und/oder Prophylaxe einer Erkrankung, die ausgewählt ist aus T-Zell-vermittelten und Entzündungserkrankungen, bei einem Säugetierpatienten, wobei die apoptotischen Körper und/oder apoptotischen Zellen mit den Blutzellen des Patienten verträglich sind.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Medikament eine flüssige Suspension ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die apoptotischen Körper und/oder apoptotischen Zellen aus einer extrakorporalen Behandlung von Blutzellen erhalten werden, die mit denen des Säugetierpatienten verträglich sind.
4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei die Blutzellen Leukozyten sind.
5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die Leukozyten die eigenen Leukozyten des Patienten sind.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die Blutzellen die eigenen T-Lymphozyten des Patienten sind.
7. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die apoptotischen Körper und/oder Zellen aus etablierten gezüchteten Zelllinien erhalten werden.
8. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die zelluläre Zusammensetzung nicht mehr als 20 Gew.-% nekrotische Zellen/Körper basierend auf dem Gesamtgewicht der apoptotischen Zellen/Körper und nekrotischen Zellen/Körper umfaßt.
9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei die zelluläre Zusammensetzung im wesentlichen frei von nekrotischen Zellen und/oder Körpern ist.
10. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Erkrankung ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Psoriasis, rheumatischer Arthritis, Skleroderma, Lupus, Diabetes mellitus, Organabstoßung, Fehlgeburt, Multiple Sklerose, entzündliche Darmerkrankung, Atherosklerose und Graft-versus-Host-Krankheit.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Erkrankung Kontakthypersensibilität ist.
12. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche in Bereitstellung einer Einheitsdosierung eines Medikaments zur Verabreichung an einen menschlichen Patienten, wobei die Dosierung 10.000 bis 10.000.000 apoptotische Körper und/oder apoptotische Zellen pro Kilogramm Körpergewicht des Patienten

enthält.

13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Dosierung 500.000 bis 5.000.000 apoptotische Körper und/oder apoptotische Zellen pro Kilogramm Körpergewicht des Patienten enthält.

14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die Dosierung 1.500.000 bis 4.000.000 apoptotische Körper und/oder apoptotische Zellen pro Kilogramm Körpergewicht des Patienten enthält.

15. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die apoptotischen Körper und/oder apoptotischen Zellen 10% bis 90% des zellulären Anteils des Medikaments ausmachen.

16. Verwendung nach Anspruch 14, wobei die apoptotischen Körper und/oder apoptotischen Zellen 30% bis 70% des zellulären Anteils des Medikaments ausmachen.

17. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend eine flüssige Suspension eines zellulären Säugetiermaterials einschließlich apoptotische Körper und/oder apoptotische Zellen, wobei das zelluläre Säugetiermaterial nicht mehr als 20 Gew.-% an nekrotischen Zellen/Körpern basierend auf dem Gesamtgewicht der apoptotischen Zellen/Körper und nekrotischen Zellen/Körper umfaßt.

18. Zusammensetzung nach Anspruch 17, die im wesentlichen frei von nekrotischen Zellen und/oder Körpern ist.

19. Zusammensetzung nach Anspruch 17 oder Anspruch 18, wobei 10% bis 90% des zellulären Materials apoptotische Körper und/oder apoptotische Zellen sind.

20. Zusammensetzung nach Anspruch 19, wobei 30% bis 70% des zellulären Materials apoptotische Körper und/oder apoptotische Zellen sind.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

