



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

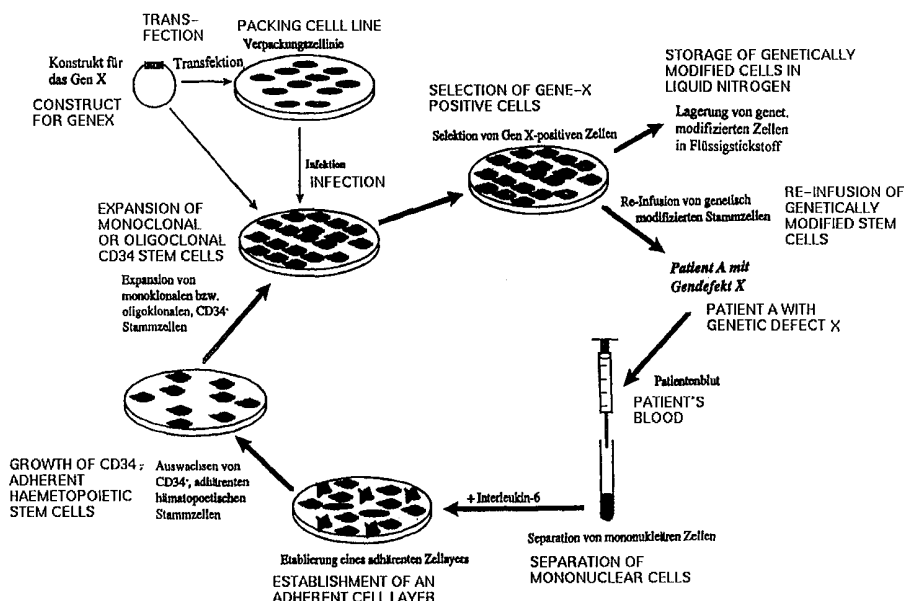
(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 5/10, A61K 35/14	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/06705 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. Februar 2000 (10.02.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/02309 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. Juli 1999 (22.07.99) (30) Prioritätsdaten: 198 33 476.1 24. Juli 1998 (24.07.98) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: HUSS, Ralf [DE/DE]; Alte Holzgasse 4, D-83666 Waakirchen (DE). (74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, D-81679 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: GENETICALLY MODIFIED CD34-NEGATIVE ADHERENTLY GROWING STEM CELLS AND THEIR USE IN GENE THERAPY

(54) Bezeichnung: GENETISCH MODIFIZIERTE CD34-NEGATIVE, ADHÄRENT WACHSENDE STAMMZELLEN UND DEREN VERWENDUNG IN DER GENTHERAPIE

(57) Abstract

The invention relates to the use of genetically modified, very early haematopoietic and mesenchymal stem cells (negative for the expression of the surface molecule CD34) in the individual gene therapy of mono- or oligogenetic diseases or in cell therapy. Autologous CD34-negative adherently growing stem cell cultures from the peripheral blood of the patient are applied and efficiently transfected or infected with genetic constructs. The gene products of these genes should substitute defective or absent proteins or factors in the patient organism in the long term. After expansion, the autologous stem cells can also be used for cell therapy (organ replacement therapy).



(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von genetisch modifizierten, frühesten hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen (negativ für die Expression des Oberflächenmoleküls CD34) in der individuellen Gentherapie von mono- bzw. oligogenetischen Erkrankungen oder in der Zelltherapie. Dazu werden aus dem peripheren Blut des Patienten körpereigene, CD34-negative, adhären wachsende Stammzellkulturen angelegt und diese mit Genkonstrukten effizient transfiziert bzw. infiziert. Die Genprodukte dieser Gene sollen defekte oder fehlende Proteine bzw. Faktoren im Patientenorganismus langfristig substituieren. Die körpereigenen Stammzellen können nach Expansion auch zur Zelltherapie (Organersatztherapie) verwendet werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

GENETISCH MODIFIZIERTE CD34-NEGATIVE, ADHÄRENT WACHSENDE STAMMZELLEN UND DEREN VERWENDUNG IN DER GENTHERAPIE

5

Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von genetisch modifizierten, frühesten hämatopoeti-
10 schen und mesenchymalen Stammzellen (negativ für die Expression des Oberflächenmoleküls
CD34) in der individuellen Gentherapie von mono- bzw. oligogenetischen Erkrankungen,
Erkrankungen der Blutbildung und auch chronischer Leiden. Dazu werden aus dem peripheren
Blut des Patienten körpereigene, CD34-negative, adhärent wachsende Stammzellkulturen
angelegt und diese mit Genkonstrukten effizient transfiziert bzw. infiziert. Die Genprodukte
15 dieser Gene sollen defekte oder fehlende Proteine bzw. Faktoren im Patientenorganismus
langfristig substituieren oder eine Zelltherapie möglich machen.

Das Ziel der somatischen Gentherapie bzw. der Zelltherapie ist der wirksame Transfer von
genetischem Material in den Organismus. Bei der somatischen Gentherapie werden genetische
20 Defekte in Körperzellen korrigiert oder Gene, die therapeutisch nützliche Genprodukte
kodieren, in Zellen eingeschleust. Die gentherapeutische Veränderung wird dabei nicht an
Nachkommen weitervererbt. Das Einschleusen von genetischem Material in Zielzellen kann *ex*
vivo als auch *in vivo* vorgenommen werden. *Ex vivo* bedeutet, daß die Zielzellen außerhalb des
Körpers kultiviert und nach erfolgter Einschleusung des genetischen Materials anschließend in
25 den Patienten rücküberführt werden. Die Wirksamkeit der somatischen Gentherapie wird
jedoch durch eine begrenzte Lebensdauer der transfizierten Zellen beeinträchtigt. Als
Zielzellen der somatischen Gentherapie sind daher Zellen mit besonders langer Lebensdauer,
wie z.B. hämatopoetische Stammzellen besonders geeignet. Bisher wurden die
hämatopoetischen Stammzellen zu Transplantationszwecken entweder aus dem Knochenmark
30 des Spenders oder nach Anreicherungsschritten aus dem peripheren Blut gewonnen. Isoliert
man die Zellen aus dem Körper des Patienten oder eines nahen Verwandten, so spricht man
von allogenen Knochenmarktransplantationen. Dabei wird häufig das unselektionierte
Gemisch aus Stammzellen und anderen Knochenmarkzellen in den Patienten rücküberführt.

Die in diesem Gemisch enthaltenen hämatopoetischen Stammzellen wandern aus dem Blut schließlich in das blutbildende Knochenmark ein, um alle Zellen des blutbildenden Systems in notwendiger Menge zu produzieren. Eine solche Transplantation ist häufig jedoch mit schwerwiegenden Komplikationen verbunden. Durch noch so geringe Gewebeunterschiede
5 zwischen Empfänger und Spender kann es zu lebensbedrohlichen Komplikationen für den Patienten kommen. Dieses Risiko muß mit der eigentlichen Erkrankung, z.B. Leukämie, aufgewogen werden. Die Spender-Empfänger-Unverträglichkeiten (graft versus host disease) werden im allgemeinen durch Zellen verursacht, welche das eigentliche Stammzelltransplantat verunreinigen. Es handelt sich dabei insbesondere um Zellen des Spenderimmunsystems.

10

Um diese Verunreinigung des Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantats auszuschließen, wurden Verfahren entwickelt, um die Population der hämatopoetischen Stammzelle anzureichern. Diese, auch pluripotente hämatopoetische Stammzelle genannt, wird bisher über die Expression bzw. Nicht-Expression bestimmter Oberflächenmoleküle definiert. Die
15 pluripotente hämatopoetische Stammzelle ist in der Lage, über bestimmte weitere Vorläuferzellen, die hämatopoetischen Zelllinien des Menschen zu bilden, z.B. B-Zellen, T-Zellen, Leukozyten, Blutplättchen oder Erythrozyten. Die Bestimmung einer hämatopoetischen Zelle als pluripotente hämatopoetische Stammzelle wird derzeit über die Expression des sogenannten CD34-Moleküls und gleichzeitig über die Nicht-Expression
20 anderer Oberflächenmoleküle wie CD5 bestimmt. Beim CD34-Molekül handelt es sich um ein stark negativ geladenes Proteoglykan der Muzinfamilie mit einem Molekulargewicht von etwa 105 bis 120 kD. Die Firma Cellpro, Inc., Seattle, USA, hat ein Verfahren zur Aufreinigung CD34-positiver Zellen mittels einer Affinitätschromatographie entwickelt (US-PSen 5.215.927, 5.262.334, 5.240.856, 5.225.353, EP 526577 B und EP 260280 B). Gleichzeitig
25 bilden CD34-negative Zellen auch den Pool für mesenchymale Stammzellen.

Für die somatische Gentherapie mittels hämatopoetischer Stammzellen werden zur Zeit CD34-
positive Zellen aus dem peripheren Blut der Patienten nach einer Stimulation dieser Zellen mittels Wachstumsfaktoren z.B. G-CSF (Neupogen-R) isoliert, und nach erfolgter genetischer
30 Manipulation dem Patienten zur Rekonstitution des lethal bestrahlten und chemotherapierten Knochenmarks rücküberführt. Bisher werden derart modifizierte hämatopoetische Stammzellen insbesondere für bestimmte Immundefektsyndrome, z.B. Adenosin-Desaminase-

Defekt, SCID-Syndrom oder Infektion mit HIV, für Stoffwechselerkrankungen, z.B. Morbus Gaucher, bei Blutbildungsstörungen, z.B. bestimmte Formen der Thallasämie und bei malignen Erkrankungen, z.B. Leukämien, eingesetzt.

- 5 Dieses Verfahren bleibt jedoch aus ethisch-sozialen Gründen der autologen bzw. der Blutstammzellspende durch nahe Verwandte vorbehalten, da zur Anreicherung der Stammzellen im peripheren Blut dem Spender bzw. dem Patienten ein Wachstumsfaktor gegeben werden muß, dessen Langzeitwirkung auf eine möglich Expansion eines Leukämie-Klons oder einer
10 möglichen Transformation einer gesunden Blutstammzelle bisher nicht abgeschätzt werden konnte.

- Ferner bereitet die somatische Gentherapie mittels hämatopoetischer Stammzellen derzeit noch gewisse technische Schwierigkeiten. Nur ein geringer Teil der mit therapeutischen Genen oder Genkonstrukten transfizierten hämatopoetischen Stammzellen erhält die genetische
15 Modifikation oder es wird kein Genprodukt gebildet. Die Wirksamkeit dieses Verfahrens ist daher momentan noch sehr gering; vgl. Huss R., *Infusionsthera Transfusionsmed* 23 (1996) 147-160.

- Es besteht der Bedarf verbesserte Mittel und Verfahren bereitzustellen, die bei der Genthera-
20 pie eingesetzt werden können.

Die Aufgabe wird gelöst durch die in den Patentansprüchen 1 bis 8 angegebenen Gegenstände.

- Gegenstand der Erfindung sind daher genetisch modifizierte CD34-negative, adhärent wach-
25 sende Stammzellen.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Lebenszeit bzw. Teilungsfähigkeit durch transiente Immortalisierung verlängert.

- 30 Die Erfindung wird durch die Figuren 1 und 2 und die nachfolgende Beschreibung näher erläutert.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Die initiale Beobachtung der Existenz von frühesten CD34-negativen hämatopoetischen Stammzellen beruht auf der Isolierung und Klonierung einer entsprechenden Zelllinie aus primären Knochenmarkstromakulturen des Hundes. Diese bestehen aus Fibroblasten-ähnlichen, CD34-negativen Zellen, welche insbesondere in der Lage sind hämatopoetische Wachstumsfaktoren zu produzieren. Die Produktion von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren ist bisher schon für stromale Zelllinien beschrieben worden (siehe DE 4322570 C1). Aus einer solchen Primärkultur wurden in einem Standardkolonie-Assay monoklonale Populationen (Colony-forming-units = CFU) etabliert. Einige dieser Klone waren in der Lage in reifere, hämatopoetische Vorläuferzellen zu differenzieren (Huss et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:748-752; 1995). Die Differenzierung und auch die Proliferation dieser Zellen ist abhängig von verschiedenen Wachstumsfaktoren. So induziert Stammzellfaktor (c-kit ligand; SCF) die Differenzierung von CD34-negativen, adhärent wachsenden Zellen in CD34-positive, nicht mehr adhärent wachsende Zellen, während Interleukin-6 (IL-6) in erster Linie die Proliferation und das adhärente Wachstum unterstützt (Huss et al., *Blood* 85:2414-2421; 1995).

Aus CD34-positiven Zellen des peripheren Blutes konnte eine CD34-negative, adhärent wachsende, Fibroblasten-ähnliche Population etabliert werden. Es wurde gefunden, daß der Vorgang der Differenzierung vom CD34-negativen, adhärenenten Wachstum zum CD34-positiven, nicht mehr adhärenenten Wachstum auch reversibel war. Durch die Zugabe von IL-6 wurde aus peripheren, mononukleären Zellen von gesunden, freiwilligen Spendern eine adhärente, jedoch zunächst nicht homogene Zellpopulation etabliert. Zu diesem Zweck wurden ca. 20 ml hepariniertes Blut zweifach über einen Ficoll-Gradienten gegeben, die mononukleäre Zellfraktion nach Standardmethoden isoliert und in IL-6 haltigem Medium in Zellkulturflaschen in einen Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ gegeben. Nach wenigen Tage entstand ein adhärent wachsender Zellrasen. Diese Primärkultur bestand zunächst aus den Fibroblasten-ähnlichen Zellen, sowie Makrophagen, Endothelzellen und vereinzelt Fettzellen. Dies wurde mittels Immunphänotypisierung nachgewiesen. Jedoch nahm die Anzahl der "kontaminierenden" Zellen im Verlauf der ersten Tage und Wochen vollständig ab (Huss et al., *Infusions- und Transfusionsmed* 24:404-409; 1997), bis eine nahezu homogene Zellpopulation entstanden war. Jedoch ist diese Population zu diesem Zeitpunkt nicht klonierbar, da diese nicht immor-

talisiert wurde. Dennoch können diese Zellen entweder in der Zellkultur gehalten oder in üblicher Weise in Flüssigstickstoff eingefroren werden.

- 5 Durch Modifikationen der Bedingungen in der Zellkultur können CD34-negative, adhären wachsende Zellen auch in mesenchymale Stammzellen differenzieren, und somit eine Vorläuferzelle für Knochen, Knorpel und andere Gewebe bilden.

Gentransfer

- 10 Es wurden CD34-negative, adhären wachsende, Fibroblasten-ähnliche Zellen aus aufgereinigten, mononukleären Zellen des peripheren Blutes nach vorstehendem Verfahren isoliert. Zunächst war die Kontamination mit anderen Zellen sehr hoch, welche jedoch mit der Zeit in Kultur vollständig verschwanden, sodaß 100% der adhären Zellen als CD34-negative, adhären Zellen vorlagen. Um die Transduktionseffizienz optimal zu gestalten, wurden
- 15 verschiedene Methoden zum Gentransfer von "green-fluorescence protein" (GFP) untersucht. Beim „green-fluorescence-protein“ handelt es sich um ein Genkonstrukt, welches in transfizierten bzw. infizierten Zellen unter ultraviolettem Licht grün aufleuchtet und so den Nachweis einer mit GFP transfizierten bzw. infizierten Zelle auf einfache Art und Weise ermöglicht.
- 20 Die Ergebnisse mit in-vitro Kulturen als auch in-vivo Versuche in SCID-Mäusen [*SCID-Mäuse besitzen einen zellulären Immundefekt, wodurch sich diese Mäuse als in-vivo Modell für allogene oder xenogene Transplantationsmodelle eignen-*] haben gezeigt, daß die Expression von GFP in den Zielzellen viele Wochen andauert, wobei die Fluoreszenz von GFP-transfizierten Zellen in SCID-Mäusen zwar deutlich sichtbar ist, jedoch schwächer ist als
- 25 im reinen Zellkulturverfahren.

Die Untersuchung verschiedener Transfektions- bzw. Infektionsmethoden für das GFP-Protein erbrachte unterschiedliche Ergebnisse:

- 30 Die CaCl_2 -Methode zur Transfektion induzierte einen starken Zellstress, sodaß ein großer Teil der zu transfizierenden Zellen abstarben.

Dagegen war die Effizienz des Gentransfers mittels Lipofectamin bzw. Infektion mit viralem Überstand sehr hoch. Während die Transfektionseffizienz mit Lipofectamin nach einmaliger Anwendung bei ca. 40-50% lag, war die Infektionseffizienz mit viralem Überstand nach 10 bis 14 Tagen bei 3-4 Passagen bei 88-94%. Entsprechend wurde alle 3-4 Tage neuer, virus-

5 haltiger Überstand auf die Zielzellen gegeben.

Tabelle:

	% GFP-positiv	Wiederholung	% tote Zellen
Transfektion mit CaCl ₂	68 ± 17	nein	40 ± 21
Transfektion mit Lipofectamin	47 ± 6	nein	< 5
Infektion mit viralem Überstand	91 ± 5	ja	< 1%

10 Effizienz

Der unübersehbare Vorteil des erfindungsgemäßen Systems liegt in der hohen Transfektions- bzw. Infektionseffizienz dieser sehr homogenen, wenn auch meist noch nicht monoklonalen, so doch meistens oligoklonalen Zellpopulation.

15

Während ähnliche Verfahren trotz intensiver Bemühungen bei einer Infektionseffizienz von ca. 5-20% von hämatopoetischen Vorläuferzellen liegen, sind nahezu alle Zellen der erfindungsgemäßen frühen Stammzellpopulation mit dem gewünschten Gen infiziert.

20 Versuche in Zusammenarbeit mit SCID-Mäusen haben gezeigt, daß die Expression des Gens in allen Reihen der Hämatopoese auch in-vivo erfolgt. Dies gilt nicht nur für retrovirale Konstrukte, sondern auch für die Anwendung Adeno-virus assoziierter Viren (AAV) oder Konstrukte, welche auf dem Epstein-Barr-Virus (EBV) beruhen.

25

Homogenität

Die adhärent wachsenden, Fibroblasten-ähnlichen, nahezu homogenen Zellpopulation lassen sich aufgrund der leichten Isolierbarkeit aus peripherem Blut und der hohen Effizienz hervorragend im Bereich der Gentherapie und Zelltherapie einsetzen.

Experimente haben gezeigt, daß diese frühesten hämatopoetischen Stammzellen nicht nur langfristig rekonstituieren können, sondern über die Besiedlung des Thymus auch eine Toleranz induzieren können.

Dies erlaubt eine Anwendung nicht nur im autologen oder syngen System, sondern auch im Bereich der allogenen Transplantation.

Therapieoptionen

Alle Gene, die im Patienten ein defektes oder nicht vorhandenes Genprodukt repräsentieren, können so durch die Infektion von autologen, hämatopoetischen Zellen mit einem Konstrukt für das fehlende oder defekte Gen dem Patienten mit seinen körpereigenen, genetisch modifizierten Zellen wieder zugeführt werden (siehe Figur 1).

Kandidaten sind insbesondere Gene bei bestimmten metabolischen Stoffwechsel-erkrankungen (z.B. M. Gaucher, PNH, Diabetes mellitus), bei Immundefektsyndromen (ADA-Mangel, SCID, CGD, LAD, AIDS), Hämoglobinopathien (z.B. Sichelzellanämie, Thalassämie) und malignen Erkrankungen (z.B. MDR, Antisense-Konstrukte, Hammerhead-Ribozyme bei identifizierten Mutationen)

[siehe auch Tabelle 1, Seite 8: *Somatic Gene Therapy*; P.L. Chang (ed.) CRC Press, Inc., Boca Raton, USA].

Die vom Patienten isolierten Zellen können nach dem Transfer des gewünschten Gens in die autologen, frühen hämatopoetischen Stammzellen des Patienten auch in Flüssigstickstoff tiefgefroren werden, um sie später bei Bedarf erstmals oder nochmals zu verwenden. Dies ist möglich, da diese Zellen sehr ausgiebig proliferieren.

Ein weitere Ausführungsform betrifft den Einbau eines "Suizid-Gens", z.B. der Thymidin-Kinase, um ggf. mittels Ganciclovir diese infizierten Zellen komplett oder teilweise eliminieren zu können. Dies ermöglicht die Zellen auch in-vivo weiterhin unter einer Wachstumskontrolle zu behalten, z.B. wenn die Aktivität eines Enzyms den gewünschten Serumspiegel übersteigen würde oder die Tumorerkrankung ausgeheilt ist.

Die teilweise transient (oder passager) immortalisierten Stammzellen können auch für eine Zelltherapie oder zur Herstellung von körpereigener Knorpel- bzw. Knochensubstanz verwendet werden (siehe Figur 2).

Bei dieser Ausführungsform ist es ebenfalls nicht nötig, den Patienten einer myeloablativen Therapie zu unterziehen, da der Patient nicht vollständig hämatopoetisch rekonstituiert werden muß, sondern nur ein Teil der hämatopoetischen Stammzellen durch die genetisch modifizierten Stammzellen ersetzt wird.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung

Beispiel 1: Isolierung von Zellen

20

Dem Patienten bzw. freiwilligen Spender werden ca. 20 ml hepariniertes Blut oder Citratblut abgenommen und über einen Ficoll-Hypaque Gradienten (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) geschichtet (siehe auch Huss et al., *Infusionsthera Transfusionsmed* 24:404-409, 1997).

25

Nach 15 - 20 min Zentrifugation bei 400 x g ohne Bremse wird der Ring aus mononukleären Zellen abgenommen und mehrfach in PBS oder isotonischer Kochsalzlösung gewaschen.

30

Anschließend werden 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen / ml in einer Zellkulturflasche (z.B. NUNC) in Zellkulturmedium (z.B. McCoy's Standard Medium mit 12,5% fötalem Kälberserum und 12,5% Pferdeserum) in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ in Gegenwart von 10 ng/ml rekombinantem Interleukin-6 (rhu IL-6; RD Systems GmbH, Wiesbaden) inkubiert.

Die Kulturen werden täglich beobachtet und wöchentlich gezählt.

Nach 10-14 Tagen entsteht eine homogene Zellpopulation aus adhärent wachsenden, Fibroblasten-ähnlichen Zellen, welche bei der Analyse im FACScan bzw. in der Immunhistochemie nahezu vollständig CD34-negativ sind. Einige, differenzierende Zellen exprimieren zeitweise dennoch das CD34-Antigen, da diese Zellen nicht synchronisiert sind.

Beispiel 2: Retrovirale Infektion / am Beispiel der Infektion mit EBV-Konstrukten

10

Diese oben beschriebene homogene Zellpopulation wird nun mit retroviralem Überstand der PG-13 Zelllinie (*Eine Verpackungszelllinie, welche den gewünschten retroviralen Vektor nach Transfektion der PG-13 Zellen in eine Gibbonaffen-Leukämievirushülle verpackt. Die Transfektion der Verpackungszelllinie geschieht indem 2,5 µg Plamid-DNA mit 15 µl Superfect (Qiagen) gemischt werden und in 100 µl Serum-freiem Medium bei Raum-Temperatur für 20 Minuten inkubiert werden. Anschließend wird diese Mischung für 5 Stunden bei 37°C mit den PG-13 Zellen inkubiert, bevor erneut Serum-haltiges Medium zugegeben wird.*) über einen Zeitraum von ebenfalls 10-14 Tagen inkubiert, wobei das Virus-haltige Medium mindestens 3-4 mal gewechselt werden sollte. Nach dieser Zeit wird die Genexpression (bei GFP mittels Fluoreszenzmikroskopie) in den Zielzellen untersucht und die Effizienz festgestellt.

25

Die positiven Zellen können nun dem Patienten zurückgegeben oder für einen späteren Gebrauch eingefroren werden. Bei diesen retroviralen Infektionen liegt die MOI (*Multiplicity of Infection = wieviel Viruspartikel sind für die Infektion einer Zelle erforderlich*) bei 10.

Die Zellen können auch transient immortalisiert werden, um eine Expansion der Stammzellen zu erreichen.

30

Beispiel 3: Infektion der aus dem Patienten isolierten Zielzellen mit rekombinantem AAV-Virus, welcher Luziferase exprimiert

Die aus dem Patienten isolierten Zielzellen konnten sehr effizient ebenfalls mit rekombinantem AAV-Virus infiziert werden, welcher Luziferase exprimiert. Die Zielzellen des Patienten wurden für 3 Stunden bei 37°C mit LUC-rAAV inkubiert und anschließend für weitere 72 Stunden in Serum-haltigem Medium gehalten. Anschließend wurde die Luziferase-Aktivität als auch die Lumineszenz gemessen. In diesem System liegt die MOI bei 1000.

10 Beispiel 4: Patientenbeispiel 1

Die Vorgehensweise ist schematisch in Figur 1 dargestellt.

Dem Patienten A mit dem Gendefekt X wird aus der Armvene Blut entnommen und aus diesem periphere mononukleäre Zellen mittels Gradientenzentrifugation isoliert. Diese mononukleären Zellen werden in der Zellkultur mit Interleukin-6 inkubiert bis sich ein adhärenter Zellrasen etabliert hat.

In der primären Kultur ist die Kontamination mit nicht hämatopoetischen Stammzellen noch sehr hoch. Nach 2-4 Wochen sind nahezu ausschließlich CD34-negative, hämatopoetische Stammzellen ausgewachsen, welche nun expandiert werden können.

Diese werden nun mit retroviralen Viruskonstrukten oder AAV-Viren, welche zuvor mit dem gewünschten Genkonstrukt transfiziert worden waren, infiziert. Nach wenigen Tagen kann in den hämatopoetischen Stammzellen des Patienten A nun die Gegenwart des Gens X und die Expression des Genproduktes X (z.B. Glucocerebrosidase oder Insulin) nachgewiesen werden.

Nun erhält der Patient A seine genetisch modifizierten, frühen hämatopoetischen Stammzellen über eine Infusion zurück, wobei ein Teil dieser Zellen zur späteren Verwendung in Flüssigstickstoff konserviert wird. Die nun mit einer neuen genetischen Information versehenen Blut-

stammzellen des Patienten versorgen den Patienten A nun mit dem für ihn wichtigen Genprodukt X.

- 5 Im Falle des Diabetes mellitus wird es schon reichen einen ganz geringen Prozentsatz der körpereigenen Stammzellen mit dem neuen genetischem Material zu versehen, um den Blutzuckerspiegel langfristig zu senken und damit ebenfalls den notwendigen Insulinbedarf. Dies würde bei Diabetespatienten sicherlich auch die schweren Begleiterkrankungen langfristig verzögern oder gar verhindern.

10 Beispiel 5: Patientenbeispiel 2

- Patent B leidet an einem schweren Knorpeldefekt im Kniegelenk. Dem Patienten werden periphere Blutstammzellen entnommen (z.B. durch Apherese) und transitiert (passager) immortalisiert (z.B. durch SV40- Large-T Antigen in einem cre/lox-System mit EBNA1).
- 15 Diese Zellen werden dann in der Zellkultur in Knorpel-/ Knochenvorläuferzellen differenziert und an die defekte Stelle transplantiert.

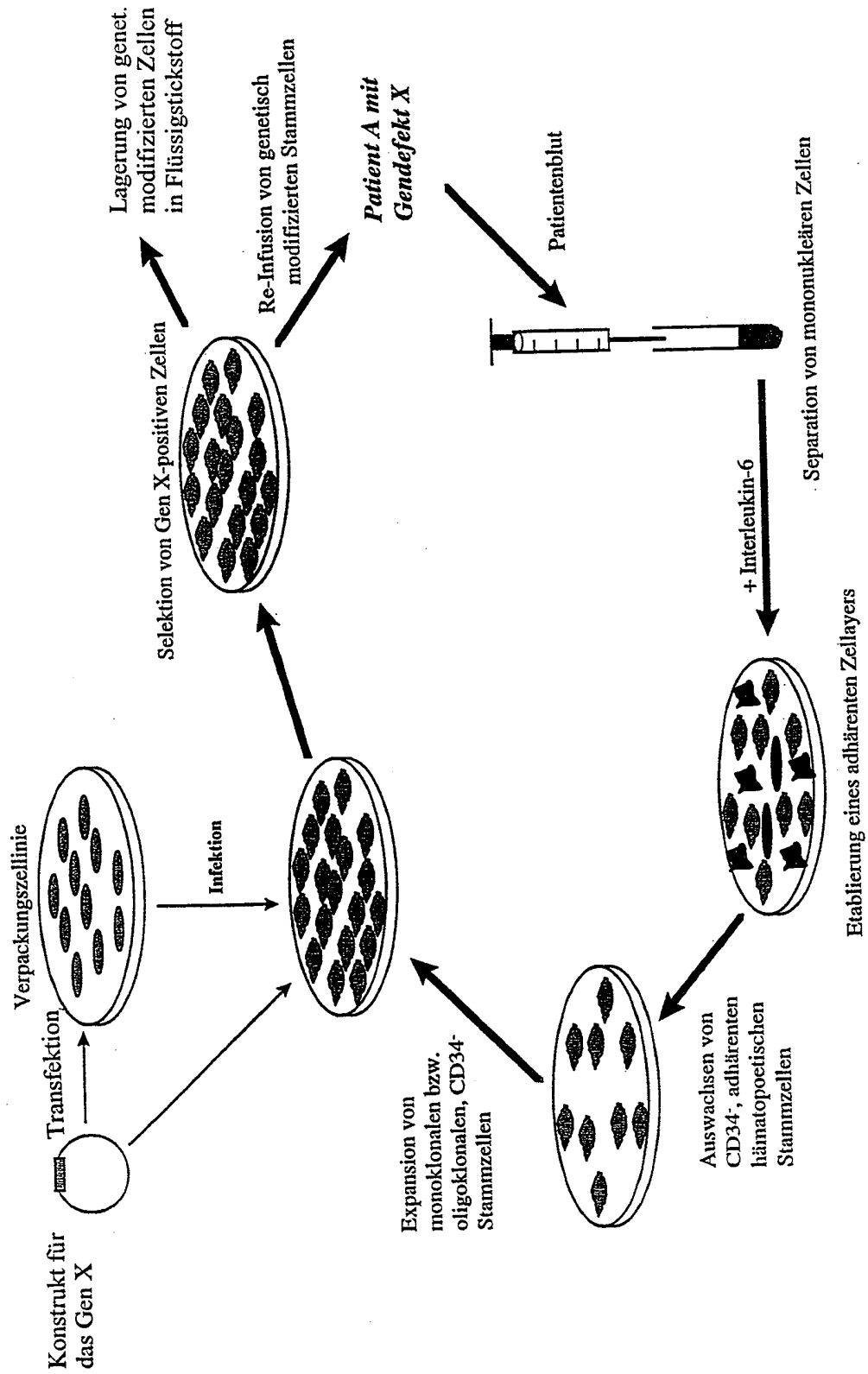
PATENTANSPRÜCHE

1. Genetisch modifizierte CD34-negative, adhärent wachsende Stammzellen.
5
2. Genetisch modifizierte CD34-negative, adhärent wachsende Stammzellen gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein retrovirales Konstrukt oder ein EBV-Konstrukt oder ein Adenovirus-assoziiertes Konstrukt enthalten.
- 10 3. Genetisch modifizierte CD34-negative, adhärent wachsende Stammzellen gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das retrovirale Konstrukt oder das EBV-Konstrukt oder das Adenovirus-assoziiertes Konstrukt ein therapeutisches Gen trägt.
- 15 4. Genetisch modifizierte CD34-negative, adhärent wachsende Stammzellen gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das therapeutische Gen codiert für Insulin, Faktor VIII, Adenindesaminase, Multidrug-Resistance (MDR) oder einen Immortalisierungsfaktor.
- 20 5. Verwendung von genetisch modifizierten CD34-negativen adhärent wachsenden Stammzellen gemäß einem der Ansprüche 1-4 als Arzneimittel.
6. Verwendung von genetisch modifizierten CD34-negativen adhärent wachsenden Stammzellen gemäß einem der Ansprüche 1-4 zur Herstellung eines Arzneimittels
25 zur individuellen Gentherapie bei mono- bzw. oligogenetischen Erkrankungen.
7. Verwendung von genetisch modifizierten CD34-negativen adhärent wachsenden Stammzellen gemäß einem der Ansprüche 1-4 zur Herstellung eines Arzneimittels zur individuellen Gentherapie bei einem Immundefektsyndrom, einer Stoffwechselerkrankung, bei Blutbildungsstörungen und bei malignen Erkrankungen.
30

8. Verwendung von genetisch modifizierten CD34-negativen, adhärent wachsenden Stammzellen gemäß einem der Ansprüche 1-4 zur Herstellung eines Arzneimittels zur individuellen Zelltherapie mittels mesenchymaler oder hämatopoetischer Stammzellen.

1 / 2

Figur 1



2 / 2

Figur 2

