



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 20 676 T2** 2007.05.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 276 431 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 20 676.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/13321**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 927 340.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/080760**

(86) PCT-Anmeldetag: **25.04.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **01.11.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.01.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **14.06.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.05.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61B 19/00** (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

200036 P 27.04.2000 US

(73) Patentinhaber:

**Tsai, Ray Jui-Fang, Taipei, TW; Tseng, Scheffer C.
G., Pinecrest, Fla., US**

(74) Vertreter:

Einsel und Kollegen, 38102 Braunschweig

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

Tsai, Jui-Fang, Ray, Taipei, TW

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR ENTWICKLUNG VON EPITHELIALEN STAMMZELLEN**

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 eingelegt, 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

Bereich der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Insuffizienz an epithelialen Stammzellen und limbalen Stammzellen und, insbesondere ein Verfahren und Transplantat zur Behandlung des Problems der Insuffizienz an epithelialen Stammzellen, zum Beispiel bei der Wiederherstellung von Hornhautoberflächen.

Stand der Technik

[0002] Bezug nehmend auf das Auge ist die übliche Augenfläche von der Hornhaut (Cornea), dem limbalen Epithel und Bindegewebeeepithel bedeckt. Ihre individuellen zellulären Phänotypen zusammen mit einem stabilen präokularen Tränenfilm gewährleisten die Unversehrtheit der Augenoberfläche. Schwerwiegende limbale Epithelschäden aufgrund chemischer oder thermischer Verätzungen, Stevens-Johnson-Syndrom, okulären Schleimhautpemphigoid, mehrfacher Operationen und Kryotherapien im limbalen Bereich, Abrieb durch Kontaktlinsen und schwerwiegender mikrobieller Infektion können zu einer Insuffizienz der limbalen und epithelialen Stammzellen führen. Insuffizienz limbalen epithelialer Stammzellen manifestiert sich üblicher Weise in Conjunctivalisation, Vaskularisation, chronischer Entzündung und fibrösen Einwachsungen in die Hornhautoberfläche und Trübung der Hornhaut.

[0003] Ist der limbale Schaden unilateral oder bilateral mit asymmetrischem Bezug wird die autologe Transplantation von Limbusgewebe vorgeschlagen. Eine wesentliche Beeinträchtigung der autologen Limbustransplantation ist, dass ein oder zwei limbale Transplantate, die einen Limbusbereich von 2 oder 3 Uhrstunden umspannen, vom gesunden kontralateralen Auge entfernt werden müssen.

[0004] In einem Bericht werden die potentiellen Komplikationen, die beim Spenderauge auftreten können, beschrieben. Experimente mit Kaninchen haben gezeigt, dass Limbusinsuffizienz auftreten kann, wenn das zentrale Corneaepithel nach vorhergehender Entfernung des Limbus dem Spenderauge entnommen wird.

[0005] Pellegrini et al., Lancet 1997; 349: 990–993, berichten über die Transplantation von Flächen aus Corneaepithelzellen, die auf einer 3T3-Fibroblast-Feederschicht entwickelt worden sind, für die Rekonstruktion von Bindehautoberflächen bei 2 Patienten mit limbalem Totalschaden.

[0006] Vor Kurzem wurde von Kim und Tseng, Cornea 1995; 15: 473–84 gezeigt, dass die Transplanta-

tion einer amniotischen Membran als Substratersatz bei der Rekonstruktion der Bindehautoberfläche von Kaninchen mit Totalschaden der limbalen Epithelstammzellen wirksam war.

[0007] Schwab et al. (Annual meeting of the association for research in vision and ophthalmology, Band 40 (4) 9. bis 14. Mai 1999, Seite 5578) beschreiben ein Bindehautepithelverbundtransplantat bestehend aus einer amniotischen Membran und cornealen epithelialen Stammzellen. Die epithelialen Zellen werden in vitro vermehrt und auf eine amniotische Membran aufgezogen, die frei von Epithelzellen ist.

[0008] Schwab I. R. (Transactions of the American Ophthalmological Society, Band 97, 1999, Seiten 891–986) beschreiben gleichfalls corneale epitheliale Stammzellen, die in vitro entwickelt wurden, und auf eine bloße amniotische Membran aufgebracht wurden (das heißt, das amniotische Epithel wurde entfernt), um ein Verbundtransplantat auszubilden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Gemäß einem Beispiel der Erfindung werden limbale Stammzellen und epitheliale Zellen aus einer geringfügigen limbalen Biopsie von einem gesunden Auge und in Kultur auf einer speziell behandelten amniotischen Membran entwickelt. Die Verwendung solcher amniotischer Membranen als Substrat unterstützt die Wiederherstellung von nicht entzündetem Limbusstroma und die Entwicklung von limbalen und epithelialen Stammzellpopulationen.

[0010] Das erhaltene „Produkt“ kann in Anschluss an eine oberflächliche Heretektomie zur Entfernung von fibrovaskulären Einwachsungen als Transplantat einer denudierten Augenoberfläche transplantiert werden. Für andere verletzte Körperbereiche als dem Auge wird eine Biopsie von gesunden epithelialen Zellen aus benachbarten Gewebereichen verwendet, die dieselben oder ähnliche biologische/histologische Charakteristiken aufweisen, das heißt die mit dem verletzten Bereich histokompatibel sind.

Beschreibung einer bevorzugten Ausführungsform

[0011] Die limbale Biopsie wird an einem gesunden Auge durchgeführt, das das kontralaterale Auge eines Patienten oder das Auge eines anderen Individuums sein kann. Das Augenlid wird mit Betadine® (povidone-Jod) sterilisiert. Unter sterilen Bedingungen werden 1 bis 2 mm² des Limbusgewebes, das epitheliale Zellen und Teile von cornealen Stromagewebe enthält, vom limbalen Bereich abgetrennt und mittels lamellärer Keratektomie mit einer Nummer 66 Beaver®-Klinge (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) von oberflächlicher cornealer Stroma abgetrennt. Das Gewebe wird in eine 35 mm Schale mit 1,5 ml

Kulturmedium gegeben, das pro ml enthält: DMEN (Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium) und Hamis F12 (im Verhältnis 1:1), ergänzt mit 0,5% DMSO (Dimethylsulfoxid), 2 µg Maus-EGF (epidermaler Wachstumsfaktor), 1 µg Rinderinsulin, 0,1 µg Chole-ratoxin und 5% fötales Rinderserum. Es wird unver-züglich zur Kultivierung in einem sterilen Laminar flow hood in das Labor gesandt.

[0012] Amnioitsche Membran (von Bio Tissue, Miami, Fl.) wird als Kultursystem eingesetzt und bezo-gen, verarbeitet und aufbewahrt gemäß Tseng SCG in Am. J. Ophthalmol 1997; 124: 765–774 und Tseng U.S. Patent 6,452,142.

[0013] Die amniotische Membran, mit der Membranunterseite nach oben, wird vorsichtig auf einer Kul-turplatte befestigt und vor Verwendung bei 37°C un-ter 5% CO₂ und 95% Luft in einem befeuchteten In-kubator über Nacht gehalten. Mit einigen Modifikati-onen wird die limbale Explantkultur wie vor kurzem be-schrieben durchgeführt (Tsai und Tseng, Invest Ophthalmol Vis Sci 1988; 29: 97–108; und Tsai et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 35: 3865–2875). An-stelle der Übertragung auf ein Kunststoffsubstrat wie es in diesen Publikationen beschrieben ist, wird das limbale Explant mit den epithelialen Stammzellen auf die Membranunterseite der amniotischen Membran in einer 35 mm Schale mit 1 ml des vorstehend be-schriebenen Kulturmediums aufgepflanzt/übertra-gen.

[0014] Das Medium wird alle zwei Tage gewechselt und es wird 2 bis 3 Wochen kultiviert, wobei die epi-thelialen Stammzellen in dieser Zeit wachsen und sich ausbreiten unter Ausbildung einer Zellschicht, die einen Bereich von etwa 2 bis 3 cm im Durchmes-ser bedeckt, für die corneale Oberflächenrekonstruk-tion. Zur Wiederherstellung von anderem Gewebe kann ein größerer oder kleinerer Schichtbereich aus epithelialen Stammzellen je nach Bedarf eingesetzt werden.

[0015] Fortfahrend mit dem Beispiel der Wiederher-stellung der Bindehaut wird nach Peritomie am Lim-bus, die perilimbale subconjunktivale Narbe und ent-zündetes Gewebe bis auf die reine Sklera entfernt. Das fibrovaskuläre Gewebe der Bindehaut wird mit-tels lamellärer Keratektomie mit Nr. 57 und Nr. 66 Be-averklingen, auf eine ähnliche Weise entfernt wie es für die allogene Limbustransplantation beschrieben worden ist (Tsai und Tseng Cornea 1994; 13: 389–400). Für Patienten mit teilweiser oder vollstän-diger limbalen Corneaschädigung, jedoch mit norma-ler zentraler Cornea, werden die kultivierten Limbu-sepithelstammzellen mit der amniotischen Membran als ein ausschnittweises limbales Corneatransplantat oder als Limbusersatz eingesetzt, die an die Größe des Empfänger-anges angepasst werden und auf den entsprechenden Limbusbereich (von 90° bis 360°)

des Empfängers transplantiert werden. Für Patienten mit vollständiger Schädigung der Limbus- und Cor-neaoberfläche wird das neuartige Transplantat als voll-ständiges lamelläres Corneagewebe oder als limba-ler Corneaersatz eingesetzt und als lamelläre Kerato-plastik transplantiert, sodass der gesamte Bereich abgedeckt ist.

[0016] Eine kultivierte epitheliale Stammzellenflä-che geeigneter Größe auf dem behandelten amnioti-schen Membransubstrat wird mit der Epithelseite nach oben so befestigt, dass sie den gesamten De-fekt bedeckt was ohne Weiteres anhand Fluores-zenzfärbung oder der Gegenwart von lose anhaften-den Originalexplant festgestellt werden kann. Das Transplantat wird dann an der Schadstelle befestigt. Im Fall einer geschädigten Cornea kann die Befesti-gung mittels unterbrochener 10-0 Nylonnaht auf der Corneaseite und unterbrochener 8-0 Vicryl® Naht an den umgebenden Bindehautrand mit episkleraler Verankerung erfolgen. Während des gesamten Vor-gangs ist die Schicht aus kultivierten epithelialen Stammzellen vor Strahleneinwirkung, Austrocknen und Abrieb durch eine Beschichtung aus Natriumhy-aluronsäure (Hyluronat) Healon® (Pharmacia & Up-john AB, Uppsala, Schweden) geschützt. Das origi-nale Explantgewebe kann von der amniotischen Membran nach der Operation entfernt werden. Befin-det sich das Transplantat auf der Cornea wird das Auge über Nacht druckverbunden und am nächsten Tag wird für eine Woche eine therapeutische Kontakt-linse daraufgesetzt. Eine topische 1%-Lösung Pred-nisolonacetat wird vier mal am Tag in der ersten Wo-che und zweimal am Tag in den nächsten zwei Wo-chen verabreicht. In den nächsten 2 bis 3 Monaten wird in Abhängigkeit von der Schwere der Bindehaut-entzündung rund um den Operationsbereich 0,1% Fluorometholon verabreicht.

[0017] Wie vorstehend ausgeführt, wird das Explan-tat auf der Membranunterseite der speziell behandel-ten amniotischen Membran kultiviert. Nach 2 bis 3 Wochen bilden die wachsenden epithelialen Stamm-zellen eine Fläche von etwa 2 bis 3 cm² Größe auf der amniotischen Membran. Die Flächenpräparierung zeigt, dass die Epithelstammzellenschicht negativ auf PAS und Alcianblaufärbung reagiert und die blan-ke amniotische Membran purpur angefärbt wird. His-tologische Untersuchungen zeigen, dass die Epithel-fläche aus 4 bis 5 Schichten Stammzellen am Rand der Fläche und 1 bis 4 Zellschichten in dem Bereich zwischen dem Rand und dem originalen Explantge-webe aufgebaut ist.

[0018] Ultrastrukturelle Untersuchungen ergeben das Vorliegen von losen und weiten interzellulären Bereichen und Membranunterseitenstruktur mit foka-ler Ansammlung von elektronendichter Grundsub-stanz an dem basalen Zellen-Aminonmemb-ran-Übergang.

[0019] Bezug nehmend auf eine Ausführungsform der Erfindung, die insbesondere die Behandlung von Augen betrifft, ergaben sich nach einer mittleren (\pm SD) Folgezeit von $14,8 \pm 1,9$ Monaten variierende Grade der Sehschärfeverbesserung auf Basis der Sehschärfeskala von Snellen. Alle Augen wiesen eine vollständige Reepithelialisierung in 2 bis 4 Tagen mit einer mittleren (\pm SD) Zeitdauer von $2,7 \pm 0,8$ Tagen auf. Die rekonstruierten Corneaoberflächen zeigen eine verringerte Entzündung und Rückbildung der Vaskularisation innerhalb von 1 bis 2 Wochen. Einen Monat nach der Operation hatte sich die Corneaklarheit verbessert und die Oberfläche war glatt und benetzbar.

[0020] In Abhängigkeit von der Fläche der limbalen Corneaschädigung können die kultivierten epithelialen Stammzellen, die auf einem speziell präparierten amniotischen Membransubstrat entwickelt worden sind, als Limbusersatz oder als limbalen Corneareersatz eingesetzt werden.

[0021] Bei Kaninchen wurde über Limbusschädigung des Spenderauges aufgrund der Entfernung eines relativ großen Limbusstückes für die Transplantation berichtet. Das neue Verfahren und das resultierende Transplantat gemäß dieser Erfindung verringern daher wesentlich die potentiellen Komplikationen für das Spenderauge, da lediglich ein kleines Stück Limbus entfernt wird. Darüber hinaus kann dieses Verfahren für Augen mit bilateraler Limbusschädigung mit asymmetrischem Bezug eingesetzt werden. Die ex-vivo Entwicklung von autologen epithelialen Stammzellen auf einer speziell vorbehandelten amniotischen Membran liefert innerhalb von 2 bis 3 Wochen ausreichend epitheliale Stammzellen für die Transplantation. Für Patienten mit vollständiger bilateraler Limbusschädigung kann Limbus aus kompatiblen Quellen, anderen Lebewesen, verwandten Personen für die erfindungsgemäße Verwendung in Betracht gezogen werden.

[0022] Die Verwendung der autologen epithelialen Stammzellen auf Basis der einzigartig vorbehandelten amniotischen Membran für die Transplantation weist alle vorteilhaften Effekte auf, die einer Transplantation auf Grundlage amniotischer Membranen inhärent ist, einschließlich der Erleichterung der Epithelisierung, Verringerung von Entzündungen und Narbenbildung und Substratersatz, falls das darunterliegende Stromagewebe zerstört ist. Von größter Bedeutung ist, dass eine amniotische Membran, die gemäß Tseng vorbehandelt worden ist, ein natürliches Substrat zur Bewahrung und Entwicklung von epithelialen Stammzellen darstellt, wobei die autologe Zellmasse ausgebildet wird, die für die Cornearekonstruktion erforderlich ist. Da lediglich autologe Zellen transplantiert werden, ist darüber hinaus nach der Transplantation keine Immununterdrückung erforderlich. Für allogene Stammzellen, die auf diese

Art und Weise transplantiert werden, kann die Abstoßungsrate verringert werden, da lediglich epitheliale Stammzellen ohne andere Zelltypen transplantiert werden.

[0023] Wie vorstehend ausgeführt, geht der Anwendungsbereich dieses einzigartigen Transplantats und Verfahrens zu dessen Herstellung unter Verwendung einer speziell behandelten amniotischen Membran, auf der epitheliale Stammzellen aus einem Explant entwickelt werden, über die Augenchirurgie hinaus, zum Beispiel für die Wiederherstellung von verbrannten Hautbereichen, insbesondere, wenn der Spenderanteil des Explants gering sein muss. Ebenso ist die Biopsie aus der das kleine Explant stammt, nicht auf Limbusgewebe beschränkt. Das Explant soll gesundes Gewebe aufweisen, epitheliale Stammzellen enthalten und histokompatibel mit der Empfängerstelle des Transplantats sein. Falls die Biopsie nicht demselben Körperbereich wie der Empfängerstelle entnommen werden kann, kann ein entsprechender ähnlicher Körperbereich für das Explant ausgewählt werden; genauso wie bei dem bevorzugten Beispiel, bei dem das geschädigte Auge die Empfängerstelle ist und das andere Auge, das gesunde Auge, das Spenderexplant liefert.

[0024] Es wird davon ausgegangen, dass das einzigartige und erfinderische chirurgische Transplantat und Verfahren zu dessen Schaffung für Fachleute zur Nacharbeitung ohne erhebliches Experimentieren ausreichend beschrieben worden ist.

Patentansprüche

1. Ein chirurgisches Transplantat zur Aufbringung auf eine Empfängerstelle, wobei das Transplantat **dadurch gekennzeichnet** ist, dass es umfasst: eine Amnionmembran mit amniotischen Zellen und einer unversehrten extrazellulären Matrix; und epitheliale Stammzellen, die auf der Amnionmembran entwickelt worden sind.
2. Chirurgisches Transplantat nach Anspruch 1, wobei die Amnionmembran eine Membranunterseite aufweist, dadurch gekennzeichnet, dass die epithelialen Stammzellen auf der Membranunterseite entwickelt werden.
3. Chirurgisches Transplantat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass Limbalgewebe aus einer Limbalbiopsie eines gesunden Auges die Quelle der epithelialen Stammzellen ist.
4. Chirurgisches Transplantat nach Anspruch 1, wobei die Amnionmembran eine Membranunterseite hat,

dadurch gekennzeichnet,
dass die epithelialen Stammzellen aus einem Gewebe stammen, das in einem Kulturmedium behandelt worden ist, die dann auf die Amnionmembran übertragen worden sind; und
dass die epithelialen Stammzellen ex vivo auf der Membranunterseite der Amnionmembran kultiviert werden.

5. Chirurgisches Transplantat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Quelle der epithelialen Stammzellen ein Gewebe ist, das aus einer Biopsie einer gesunden Stelle stammt, die der Empfängerstelle biologisch entspricht und dazu histokompatibel ist.

6. Verfahren zur Erzeugung eines chirurgischen Transplantats für eine versehrte Empfängerstelle, wobei das Verfahren durch die Schritte gekennzeichnet ist:

- a) Aufbringen einer Biopsie als Explantat auf eine Amnionmembran, wobei die Amnionmembran amniotische Zellen und eine unversehrte extrazelluläre Matrix umfasst, und die Biopsie epitheliale Stammzellen enthält, und
- b) Entwickelnlassen der epithelialen Stammzellen auf der Amnionmembran.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Amnionmembran eine Membranunterseite hat; dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt des Aufbringens das Aufbringen des Explantats auf diese Membranunterseite beinhaltet.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Aufbringen bewirkt, dass die entwickelten epithelialen Stammzellen in Richtung der versehrten Stelle des Empfängers ausgerichtet sind.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt des Entwickelnlassens die Kultivierung des Explantats in einem Kulturmedium vor dem Schritt des Aufbringens umfasst.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9, wobei der Schritt des Entwickelnlassens, dadurch gekennzeichnet ist, dass die Amnionmembran mit dem Explantat ausreichend lange kultiviert wird, so dass die epithelialen Stammzellen sich über einen Bereich von etwa 2 cm bis 3 cm im Durchmesser entwickeln können.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Explantat von der Amnionmembran nach chirurgischer Befestigung des Transplantats an der Empfängerstelle entfernt wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen