



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 22 933 T2** 2005.12.29

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 062 321 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 22 933.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/05351**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 909 964.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/046366**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.03.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **16.09.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.12.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **29.12.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.12.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 5/06**

A61K 35/28, A61P 19/04, A61P 21/00

(30) Unionspriorität:

39127 13.03.1998 US

(73) Patentinhaber:

Osiris Therapeutics, Inc., Baltimore, Md., US

(74) Vertreter:

LOUIS, PÖHLAU, LOHRENTZ, 90409 Nürnberg

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**BRUDER, P., Scott, Waltham, US; McINTOSH, R.,
Kevin, Ellicott City, US; MARSHAK, R., Daniel,
Lutherville, US; MOSCA, D., Joseph, Ellicott City,
US**

(54) Bezeichnung: **ANWENDUNGEN FÜR HUMANE NICHT AUTOLOGE, MESENCHYMALE 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

[0001] Die Anmeldung ist eine Continuation-in-part-Anmeldung der US-Patentanmeldung SN 09/039,127 (Anmeldetag 13. März 1998) und beansprucht deren Priorität. US-5 591 625 ist auf genetisch modifizierte, humane, mesenchymale Stammzellen abgestellt, die mit exogenem genetischem Material, das für ein zu exprimierendes Protein kodiert, transfiziert sind. Bei Verwendung dieser genetisch modifizierten, mesenchymalen Stammzellen bei einer allogenen Zelltherapie ist der Patient einer Immunosuppression zu unterziehen.

[0002] WO-97/40137 beschreibt ein Verfahren zur Verstärkung der Knochenbildung in einem Individuum, wobei humane mesenchymale Stammzellen dem Individuum mit einem keramischen Material oder Matrix verabreicht werden. WO-97/40137 sagt nichts über die Verwendung von nicht-autologen mesenchymalen Stammzellen ohne Verwendung einer keramischen Matrix aus.

[0003] WO-97/41208 ist auf die Hautregeneration unter Verwendung einer Gerüstschicht abgestellt.

[0004] Cell-Transplantation, Bd. 7 (1998), S. 63-70, beschreibt die Verwendung von autogenen, chondrozytisch angereicherten, von Knochenmark abgeleiteten, mesenchymalen Zellen als Quelle für die Regeneration von Gelenkknorpeln. GB-2 137 209-A ist auf die Reparatur von Knorpeln und Knochen unter Verwendung von Chondrozyten abgestellt.

[0005] Die vorliegende Erfindung ist auf die Verwendung von allogenen, humanen, mesenchymalen Stammzellen (MSCs) zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 1 abgestellt.

[0006] Entsprechend der erfindungsgemäßen Verwendung werden die mesenchymalen Stammzellen von einem Patienten, bei dem es sich nicht um den behandelten Patienten handelt, erhalten, d. h. die mesenchymalen Stammzellen sind nicht autolog.

[0007] Insbesondere wird gemäß der erfindungsgemäßen Verwendung ein Patient mit allogenen, humanen, mesenchymalen Stammzellen behandelt. Gemäß der hier verwendeten Ausdrucksweise handelt es sich bei einer allogenen, humanen, mesenchymalen Stammzelle um eine mesenchymale Stammzelle, die von einem Menschen, bei dem es sich nicht um den vorgesehenen Empfänger der mesenchymalen Stammzellen handelt, erhalten.

[0008] Obgleich die mesenchymalen Stammzellen Oberflächen-MHC-Moleküle exprimieren, hat die Anmelderin festgestellt, dass mesenchymale Stammzellen immunologisch neutral sind und daher gemäß

den hier gemachten Angaben verwendet werden können, ohne dass eine nachteilige Immunreaktion beim Empfänger der Zellen induziert wird.

[0009] Ferner hat die Anmelderin festgestellt, dass der Spender der mesenchymalen Stammzellen nicht mit dem Empfänger "abgeglichen" sein muss. Erfindungsgemäß wurde festgestellt, dass mesenchymale Stammzellen für das Immunsystem "unsichtbar" sind. Normalerweise führen gemeinsam gezüchtete Zellen von unterschiedlichen Individuen (allogene Zellen) zu einer T-Zellproliferation, die sich durch eine gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) bemerkbar macht. Wenn jedoch humane mesenchymale Stammzellen mit allogenen T-Lymphozyten in vitro kontaktiert werden, erzeugen sie keine Immunantwort durch die T-Zellen, d. h. die T-Zellen vermehren sich nicht, was darauf hinweist, dass die T-Zellen nicht auf die nicht abgeglichenen mesenchymalen Stammzellen reagieren. Dieser Befund ist unerwartet, da humane mesenchymale Stammzellen sämtliche Oberflächenmoleküle exprimieren, die ihnen eine immunogene Beschaffenheit verleihen, d. h. sie exprimieren allogene MHC-Moleküle der Klasse I und der Klasse II.

[0010] Ferner wurde festgestellt, dass mesenchymale Stammzellen in aktiver Weise die allogene T-Zellreaktion in gemischten Lymphozytenreaktionen in dosisabhängiger Weise verringern. Außerdem wurde festgestellt, dass mesenchymale Stammzellen von unterschiedlichen Spendern keine Spezifität der verringerten Reaktion in Bezug auf den MHC-Typ aufweisen. Somit müssen mesenchymale Stammzellen nicht MHC-abgeglichen zu einer Zielzellpopulation bei der gemischten Lymphozytenreaktion sein, um die proliferative Reaktion auf alloreaktive T-Zellen gegen mesenchymale Stammzellen zu verringern.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0011] [Fig. 1](#): Fehlen einer Alloreaktivität auf mesenchymale Stammzellen. T-Zellen von A vermehrten sich in dosisabhängiger Weise, wenn sie mit verschiedenen Mengen an PBMCs von B vermischt wurden. T-Zellen von A vermehrten sich nicht in Reaktion auf einen Kontakt mit mesenchymalen Stammzellen von B, selbst wenn die mesenchymalen Stammzellen manipuliert wurden, um eine vollständige T-Zellaktivierung zu gewährleisten (die mesenchymalen Stammzellen wurden mit kostimulierenden Molekülen B7-1 oder B7-2) transduziert).

[0012] [Fig. 2](#): Mesenchymale Stammzellen unterdrückten in aktiver Weise die gemischte Lymphozytenreaktion zwischen Lymphozyten von zwei verschiedenen Individuen. hMSC-1 war sowohl für die Stimulator- als auch die Responderzellen bei der gemischten Lymphozytenreaktion eine "dritte Partei"; hMSC-2 war autolog zu den Stimulatorzellen bei der

gemischten Lymphozytenreaktion. Somit unterdrückten die mesenchymalen Stammzellen die gemischte Lymphozytenreaktion ohne Spezifität bezüglich des MHC-Typs. Die mesenchymalen Stammzellen unterdrückten die gemischte Lymphozytenreaktion in dosisabhängiger Weise.

[0013] Fig. 3: Allogene Hunde-Studie. Eine histologische Analyse einer 6 Wochen alten autologen Probe, bearbeitet in DMEM-LG, zeigte eine erhebliche Knochenmenge.

[0014] Fig. 4: Allogene Hunde-Studie. Eine histologische Analyse einer 6 Wochen alten allogenen Probe zeigte Knochenbildung.

[0015] Fig. 5: Allogene Hunde-Studie. Eine histologische Analyse einer 6 Wochen alten allogenen Probe eines Spenders, der sich von dem in Fig. 4 dargestellten Spender unterschied, zeigte ebenfalls Knochenbildung.

[0016] Fig. 6: Schematische Karte des in Beispiel 4 verwendeten EGFP-pOT24-Plasmids.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0017] Erfindungsgemäß hergestellte Zusammensetzungen, die allogene mesenchymale Stammzellen enthalten, eignen sich insbesondere zur Erleichterung der Reparatur, der Rekonstruktion und/oder Regeneration eines Bindegewebedefekts. Erfindungsgemäß werden die allogenen mesenchymalen Stammzellen zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Behandlung von Störungen des Skelettgewebes und anderen Bindegeweben verwendet.

[0018] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von allogenen mesenchymalen Progenitorzellen (Vorläuferzellen) oder Stammzellen zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Verstärkung der hämatopoetischen Zellbildung.

[0019] Gemäß einem weiteren, hier beschriebenen Aspekt der Erfindung werden allogene mesenchymale Stammzellen gentechnisch mit einem Gen von Interesse bearbeitet (oder transduziert oder transfiert). Die transduzierten Zellen können zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Verabreichung an einen behandlungsbedürftigen Patienten, z. B. zur Behandlung von genetischen Störungen oder Krankheiten, verwendet werden.

[0020] Die vorliegende Erfindung bedient sich isolierter und in Kultur expandierter mesenchymaler Stammzellen, die für den vorgesehenen Empfänger allogon sind. Obgleich die Erfindung nicht hierauf beschränkt ist, können mesenchymale Stammzellen

isoliert, gereinigt und in Kultur, d. h. in vitro, expandiert werden, um eine ausreichende Anzahl an Zellen zur Verwendung in den hier beschriebenen Verfahren zu erhalten; vergl. Caplan und Haynesworth, US-Patent 5 486 359; US-Patent 5 197 985; US-Patent 5 226 914; WO-92/22584.

[0021] Somit werden in einer bevorzugten Ausführungsform die humanen mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark erhalten, das einem Individuum, das für den Empfänger allogon ist, entnommen worden ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die mesenchymale Zellpräparation im wesentlichen rein, d. h. zu mindestens 95 % frei von allogenen Zellen, die von mesenchymalen Stammzellen abweichen.

[0022] Die vorliegenden humanen mesenchymalen Stammzellen werden aus dem Knochenmark oder einer anderen Quelle für mesenchymale Stammzellen erhalten. Knochenmarkzellen lassen sich aus Darmbeinkamm, Oberschenkel, Schienbein, Wirbelsäule, Rippen oder anderen Marklücken erhalten. Zu weiteren Quellen für humane mesenchymale Stammzellen gehören Plazenta, Nabelschnur, Haut von Jugendlichen und Blut. Isolierte und gereinigte, allogene, humane, mesenchymale Stammzellen lassen sich durch mitotische Expansion in einem spezifischen Medium in einem undifferenzierten Zustand züchten. Diese Zellen können sodann geerntet und durch eine Anzahl von Faktoren, einschließlich mechanische, zelluläre und biochemische Stimuli, zur Differenzierung zu Knorpelgewebe, Knorpelgewebe und verschiedenen anderen Typen von Bindegewebe aktivieren. Humane mesenchymale Stammzellen besitzen das Potential zur Differenzierung zu Zellen, wie Osteoblasten und Chondrozyten, die eine Vielzahl von mesenchymalen Gewebezellen erzeugen, wie Sehnen, Bänder und Haut. Dieses Potential bleibt nach Isolierung und über mehrmalige Populationsexpansionen in Kultur erhalten. Somit ergibt sich aufgrund der Fähigkeit zur Isolierung, Reinigung, starken Vermehrung und anschließenden Aktivierung von mesenchymalen Stammzellen zur Differenzierung zu spezifischen Typen von angestrebten mesenchymalen Zellen, wie Skelett- und Bindegewebe, z. B. Knochen, Knorpel, Sehnen, Bänder, Muskeln, Fett- und Markstroma (vergl. US-Patent 5 197 985) ein hochwirksames Verfahren zur Behandlung von Skelettgewebestörungen und anderen Bindegewebestörungen.

[0023] Obgleich gemäß einer bevorzugten Ausführungsform die mesenchymalen Stammzellen vor der Verwendung in Kultur expandiert werden, ist es ferner möglich, derartige mesenchymale Stammzellen ohne Kulturexpansion zu verwenden. Beispielsweise können mesenchymale Stammzellen von Knochenmark abgeleitet und nach Abtrennung von Blutzellen daraus ohne Expansion verwendet werden. Somit

kann beispielsweise allogenes Knochenmark in Bezug auf allogene, humane, mesenchymale Stammzellen durch Entfernung von Blutzellen angereichert und einem behandlungsbedürftigen Patienten zugeführt werden, z. B. zur Skelettrepauratur.

[0024] Somit stellt die vorliegende Erfindung gemäß einer Ausführungsform verschiedene Verwendungsmöglichkeiten zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats zur Verstärkung der Implantation und Differenzierung von allogenen mesenchymalen Stammzellen bereit. Demzufolge können die mesenchymalen Stammzellen zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats zur Behandlung von Bindegewebestörungen, z. B. zur Förderung des Wachstums von Bindegewebe, verwendet werden. Der Ausdruck Bindegewebe wird hier in der Bedeutung verwendet, dass er die Gewebe des Körpers, die spezialisierte Elemente stützen, umfasst. Der Ausdruck umfasst somit Knochen-, Knorpel-, Bänder-, Sehnen-, Stroma-, Muskel- und Fettgewebe. Gemäß einem bevorzugten Aspekt dieser Ausführungsform können die allogenen mesenchymalen Stammzellen in verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats zur Behandlung von Störungen des Skelettgewebes und anderer Bindegewebe verwendet werden. Die vorliegende Erfindung bedient sich isolierter, allogener mesenchymaler Progenitorzellen, die unter bestimmten Bedingungen zur Differenzierung und Erzeugung verschiedener Typen erwünschter Bindegewebe, z. B. zu Zellen, die Knochen oder Knorpeln bilden, angeregt werden können.

[0025] Gemäß einem weiteren Aspekt ist die Erfindung auf verschiedene Anwendungsmöglichkeiten von humanen, allogenen mesenchymalen Stamm- oder Progenitorzellen zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats für therapeutische Zwecke abgestellt. Beispielsweise finden allogene humane mesenchymale Stamm- oder Progenitorzellen Anwendung in folgenden Fällen: (1) Regeneration von mesenchymalen Geweben, die durch eine akute Verletzung, eine abnormale genetische Expression oder eine erworbene Krankheit geschädigt worden sind; (2) Behandlung eines Wirts mit geschädigtem mesenchymalen Gewebe durch Behandlung des geschädigten Gewebes mit allogenen mesenchymalen Stammzellen in Kombination mit einem biologisch verträglichen Trägerstoff, der sich zur Abgabe der mesenchymalen Stammzellen an die geschädigte(n) Gewebestelle(n) eignet; (3) Erzeugen verschiedener mesenchymaler Gewebe; (4) Nachweisen und Bewerten von Wachstumsfaktoren, die für die mesenchymale Stammzellen-Selbstregeneration und -Differenzierung zu feststehenden mesenchymalen Zelllinien relevant sind; (5) Nachweisen und Bewerten von Hemmfaktoren, die die Beteiligung und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu spezifischen mesenchymalen Zelllinien modulieren; und (6)

Entwickeln von mesenchymalen Zelllinien und das Bestimmen von Faktoren, die mit der Entwicklung von mesenchymalem Gewebe in Zusammenhang stehen.

[0026] Die Dosis der allogenen mesenchymalen Stammzellen variiert innerhalb breiter Grenzen und wird selbstverständlich in jedem speziellen Fall an die individuellen Erfordernisse angepasst. Die Anzahl der verwendeten Zellen hängt vom Gewicht und vom Zustand des Empfängers und anderen Variablen ab, die dem Fachmann bekannt sind. Das pharmazeutische Präparat, das die Zellen enthält, kann auf einem Weg verabreicht werden, der sich für das spezielle, zu behandelnde Gewebe oder Organ eignet. Das pharmazeutische Präparat, das die Zellen enthält, kann systemisch, d. h. parenteral, durch intravenöse Injektion verabreicht werden. In den meisten Fällen werden die allogenen mesenchymalen Stammzellen an der Stelle der angestrebten Behandlung oder Therapie abgegeben oder sie können auf ein spezielles Gewebe oder Organ, wie Knochenmark, zielgerichtet abgegeben werden.

[0027] Die Zellen können in einem geeigneten Verdünnungsmittel in einer Konzentration von etwa 0,5 bis etwa 5×10^6 Zellen/ml suspendiert werden. Bei geeigneten Exzipientien für derartige Lösungen handelt es sich um Produkte, die für den Empfänger biologisch und physiologisch verträglich sind, z. B. um eine gepufferte Kochsalzlösung. Zu weiteren Exzipientien gehören Wasser, isotonische Salzlösungen, Alkohole, Polyole, Glycerin und Pflanzenöle. Die Zusammensetzung für die Verabreichung muss gemäß üblichen Verfahren entsprechend den Sterilitäts- und Stabilitätsanforderungen zubereitet, hergestellt und gelagert werden.

[0028] Das pharmazeutische Präparat, das die humanen mesenchymalen Stammzellen enthält, kann durch subkutane Implantation von Zellen oder durch Injektion von Stammzellen, beispielsweise in Muskelzellen, verabreicht werden.

[0029] Das pharmazeutische Präparat kann in einem Verfahren zur Reparatur einer Bindegewebeschädigung verwendet werden. Das Verfahren umfasst die Stufen der Anwendung eines Extrakts, der allogene mesenchymale Stamm- oder Progenitorzellen enthält, auf einen Bereich einer Bindegewebeschädigung unter Bedingungen, die sich für eine Differenzierung der Zellen zu dem Typ von Bindegewebe, das für die Reparatur erforderlich ist, eignen.

[0030] Das pharmazeutische Präparat kann in einem Verfahren zur Verstärkung der Implantation einer prothetischen Vorrichtung in Skelettgewebe verwendet werden. Das Verfahren umfasst die Stufen des Anheftens von allogenen mesenchymalen Stamm- oder Progenitorzellen an einer Verbindungs-

oberfläche einer prothetischen Vorrichtung und das Implantieren der prothetischen Vorrichtung, die diese mesenchymalen Zellen enthält, unter Bedingungen, die sich für eine Differenzierung der Zellen zu dem Typ von Skelett- oder Bindegewebe, das für die Implantation erforderlich ist, eignen.

[0031] Das pharmazeutische Präparat kann in einem Verfahren zur Vermehrung der Knochenbildung bei einem behandlungsbedürftigen Individuum angewandt werden. Somit sind die Verfahren dieses Aspekts auf "Bindegewebedefekte" anwendbar, die, verglichen mit normalem Bindegewebe, beliebige Schäden oder Unregelmäßigkeiten aufweisen, die aufgrund von Traumata, Krankheiten, Alter, Geburtsdefekten, chirurgischen Eingriffen und dergl. auftreten können. Außerdem kann das pharmazeutische Präparat insbesondere in einem Verfahren zur Reparatur von segmentalen Knochendefekten, bei fehlendem Zusammenwachsen, bei schlechtem Zusammenwachsen oder verzögertem Zusammenwachsen verwendet werden. Der hier verwendete Ausdruck "Bindegewebedefekte" bezieht sich ferner auf nicht-geschädigte Bereiche, bei denen lediglich eine Knochenbildung angestrebt wird, beispielsweise für eine kosmetische Knochenvermehrung. Die hier beschriebenen pharmazeutischen Präparate eignen sich somit für orthopädische, dentale, orale, maxillofaziale, periodontale und andere chirurgische Maßnahmen.

[0032] Die vorliegende Erfindung ist auch auf die Verwendung der allogenen mesenchymalen Progenitor- oder Stammzellen zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats zur Korrektur oder Modifikation von Bindegewebestörungen abgestellt. Somit offenbart die vorliegende Erfindung gemäß einem weiteren Aspekt verschiedene Vorrichtungen und Faktoren, die entwickelt wurden, um die allogenen mesenchymalen Stamm- oder Progenitorzellen dazu zu veranlassen, sich zu verschiedenen Typen von erwünschten Phänotypen zu differenzieren, z. B. zu knochenbildenden oder knorpelbildenden Zellen. Beispielsweise haben die Erfinder festgestellt, dass verschiedene poröse keramische Tricalcium- oder Hydroxylapatit-Vorrichtungen als Vehikel oder Träger für die allogenen mesenchymalen Stamm- oder Progenitorzellen verwendet werden können, wenn diese in Skelettdefekte implantiert werden, wodurch die Differenzierung der Zellen zu Skelettgewebe ermöglicht und/oder gefördert wird.

[0033] Somit ist eine Ausführungsform der Erfindung auf die Verwendung einer porösen keramischen Zusammensetzung, die Tricalciumphosphat oder Hydroxylapatit oder Kombinationen dieser beiden Bestandteile umfasst, als Vehikel oder Träger für mesenchymale Stamm- oder Progenitorzellen abgestellt, wobei die Vorrichtung bei Implantation in Skelettdefekte die Differenzierung der Zellen zu Skelett-

gewebe fördert.

[0034] Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist die Erfindung auf die Verwendung einer resorbierbaren Matrix auf der Basis von Gelatine, Cellulose und/oder Kollagen in Kombination mit allogenen mesenchymalen Stammzellen abgestellt. Diese Zusammensetzung kann in Form von Schwämmen, Streifen, Pulvern, Gelen, Netzen oder anderen physikalischen Formaten verwendet werden. Verschiedene alternative Vehikel können zur Abgabe von humanen mesenchymalen Stammzellen zur Reparatur von Bindegewebe herangezogen werden. Die Zusammensetzungen können als ein Pflaster für das beschädigte Gewebe konzipiert werden, um für die Bildung von neuem Knochen oder Gewebe für Masse und ein Gerüst zu sorgen. Die hier beschriebenen verschiedenen Zusammensetzungen, Verfahren und Materialien können erfindungsgemäß zur Stimulation der Reparatur von frischen Brüchen und von nicht zusammengewachsenen Brüchen und zur Förderung von spinalen Fusionen verwendet werden; vergl. das US-Patent 5 197 985. Gleichmaßen kann eine Reparatur von Knorpeln und anderen muskuloskeletalen Geweben erreicht werden. Im Fall einer spinalen Fusion können derartige Zusammensetzungen, Verfahren und Materialien nachträglich mit oder ohne Instrumente zur Förderung der Massefusion entlang laminarer und transversaler Vorgänge verwendet werden. Ferner können sie vorher eingesetzt werden, um einen Fusionskäfig zur Förderung von Zwischenkörperfusionen aufzufüllen. Die erfindungsgemäß unter Verwendung von allogenen mesenchymalen Stammzellen hergestellten pharmazeutischen Präparate können zur Behandlung bei einem vollständigen Gelenkaustausch und bei Osteoporose eingesetzt werden.

[0035] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung können die pharmazeutischen Präparate, die mesenchymale Stammzellen umfassen, zur Erzeugung von Knochenmarkstroma verwendet werden. Das Knochenmarkstroma liefert das Gerüst sowie lösliche Faktoren, die die Synthese von Blutzellen, d. h. die Hämatopoese dirigieren und unterstützen. Demgemäß ist die Erfindung auf ein Verfahren zur Verbesserung des Vorgangs der Regeneration von Blutzellen und Knochenmarkgewebe bei Patienten abgestellt, bei denen das Knochenmark eine Verarmung oder Zerstörung erfahren hat, z. B. bei intensiver Bestrahlung und einer chemotherapeutischen Behandlung. Dabei werden hämatopoetische Progenitorzellen, die beispielsweise von Knochenmark oder peripherem Blut abgeleitet sind, eingesetzt.

[0036] Gemäß einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung Produkte zur Verwendung von allogenen mesenchymalen Stammzellen mit dem Ziel bereit, das Engraftment von hämatopoetischen Stamm- oder Progenitorzellen zu unterstützen.

[0037] Somit wird gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ein pharmazeutisches Präparat zur Verstärkung der Regeneration von Knochenmarkgewebe unter Verwendung von allogenen mesenchymalen Stammzellen bereitgestellt. Das Verfahren zur Unterstützung des Engraftments von hämatopoetischen Stamm- oder Progenitorzellen umfasst die Verabreichung folgender Bestandteile an ein behandlungsbedürftiges Individuum: (i) allogene mesenchymale Stammzellen und (ii) hämatopoetische Stamm- oder Progenitorzellen, wobei die mesenchymalen Stammzellen in einer Menge verabreicht werden, die eine Förderung der Transplantation von derartigen hämatopoetischen Stamm- oder Progenitorzellen bei dem Individuum bewirken. Insbesondere ist eine Ausführungsform der Erfindung auf die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen in einem pharmazeutischen Präparat abgestellt, wobei die Zellen bei systemischer Verabreichung in die Markhöhle wandern oder zurückkehren und einer Differenzierung zu Knochenmarkstroma unterliegen, wodurch das Knochenmarkstroma regeneriert wird. Die allogenen mesenchymalen Stammzellen können systemisch, z. B. intravenös, an verschiedenen Abgabestellen oder direkt in den Knochen verabreicht werden. Ein weiterer Gesichtspunkt bei diesem Aspekt befasst sich mit dem Zeitpunkt der Injektion der allogenen mesenchymalen Stammzellen relativ zum Zeitpunkt der Verabreichung der hämatopoetischen Stamm- oder Progenitorzellen. Gemäß einer Ausführungsform werden die mesenchymalen Stammzellen gleichzeitig mit den hämatopoetischen Stamm- oder Progenitorzellen verabreicht. Gemäß einer weiteren Ausführungsform werden die mesenchymalen Stammzellen vor oder nach Verabreichung der hämatopoetischen Stamm- oder Progenitorzellen verabreicht. Die hämatopoetischen Stammzellen können autolog sein oder auf die allogenen Zellen abgestellt sein.

[0038] Die vorliegende Erfindung eignet sich zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats mit dem Ziel, die Wirksamkeit einer Knochenmarkstransplantation bei der Krebsbehandlung zu verstärken. Die Behandlung von Krebs durch eine Röntgenstrahlen- oder Alkylierungstherapie zerstört die Mikroumgebung des Knochenmarks sowie die hämatopoetischen Stammzellen. Die derzeitige Behandlung besteht darin, bei dem Patienten nach Ablation des Knochenmarks eine Transplantation mit Knochenmark vorzunehmen, das vorher geerntet und kryokonserviert worden ist. Da jedoch die Umgebung des Knochenmarks zerstört ist, verzögert sich das Engraftment bis zur Wiederherstellung der stromalen Umgebung. Demzufolge ist ein kritischer Aspekt der vorliegenden Erfindung auf die Vorteile der Transplantation von isolierten, gereinigten, in Kultur expandierten, allogenen, mesenchymalen Stammzellen mit dem Ziel, den Vorgang der stromalen Rekonstitution und Regeneration von Knochengewebe zu beschleunigen, abgestellt.

nigen, abgestellt.

[0039] Zu Verabreichungsarten für das mesenchymale Stammzellpräparat gehören (ohne Beschränkung hierauf) eine systemische intravenöse Injektion sowie eine direkte Injektion an der vorgesehenen Wirkungsstelle. Das Präparat kann auf einem beliebigen zweckmäßigen Weg verabreicht werden, beispielsweise durch Infusion oder Bolus-Injektion und es kann zusammen mit anderen biologischen Wirkstoffen verabreicht werden. Vorzugsweise erfolgt die Verabreichung systemisch.

[0040] Bei diesem Aspekt der Erfindung kann das mesenchymale Stammzellpräparat allein verabreicht werden. Jedoch werden gemäß einer bevorzugten Ausführungsform die mesenchymalen Stammzellen in Form von pharmazeutischen Zusammensetzungen verwendet. Derartige Zusammensetzungen umfassen eine therapeutisch wirksame Menge der allogenen mesenchymalen Stammzellen und einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Exzipients. Ein derartiger Träger umfasst (ohne Beschränkung hierauf) Kochsalzlösung, gepufferte Kochsalzlösung, Dextrose, Wasser und Kombinationen davon. Die Zubereitung soll für den Verabreichungsweg geeignet sein.

[0041] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das mesenchymale Stammzellpräparat oder die Zusammensetzung gemäß üblichen Verfahren als eine pharmazeutische Zusammensetzung, die für die intravenöse Verabreichung an den Menschen geeignet ist, zubereitet. Typischerweise handelt es sich bei Zusammensetzungen für die intravenöse Verabreichung um Lösungen in einem sterilen, isotonischen, wässrigen Puffer. Gegebenenfalls kann die Zusammensetzung auch ein Lokalanästhetikum enthalten, um etwaige Schmerzen an der Injektionsstelle zu lindern. Im allgemeinen werden die Bestandteile getrennt oder in einer Dosiseinheitsform gemischt bereitgestellt, z. B. als kryokonserviertes Konzentrat in einem hermetisch verschlossenen Behälter, z. B. einer Ampulle, wobei die Wirkstoffmenge angegeben ist. Sofern die Zusammensetzung durch Infusion verabreicht wird, kann sie mit einer Infusionsflasche, die steriles, für pharmazeutische Zwecke geeignetes Wasser oder Kochsalzlösung enthält, abgegeben werden. Sofern die Zusammensetzung durch Injektion verabreicht wird, können eine Ampulle mit sterilem Wasser für Injektionszwecke oder mit Kochsalzlösung bereitgestellt werden, so dass die Bestandteile vor der Verabreichung vermischt werden können.

[0042] Das Verabreichungsverfahren kann abgeändert werden, insbesondere indem man (1) die Zeitabstände zwischen der Injektion von mesenchymalen Stammzellen und der Implantation des Gewebes verlängert oder verkürzt; (2) die Menge der injizierten mesenchymalen Stammzellen erhöht oder verringert;

(3) die Anzahl der Injektionen von mesenchymalen Stammzellen variiert; oder (4) das Verfahren zur Abgabe der mesenchymalen Stammzellen variiert.

[0043] Das mesenchymale Stammzellpräparat wird in einer Menge verwendet, die dazu geeignet ist, das Engraftment von hämatopoetischen Stamm- oder Progenitorzellen beim Empfänger zu fördern. Im allgemeinen beträgt eine derartige Menge mindestens 1×10^4 mesenchymale Stammzellen pro kg Körpergewicht und insbesondere nicht mehr als 3×10^6 mesenchymale Stammzellen/kg. Vorzugsweise beträgt die Menge mindestens etwa 1×10^6 mesenchymale Stammzellen/kg vor der Zuführung des Transplantats.

[0044] Üblicherweise braucht die Menge nicht mehr als etwa 2×10^6 mesenchymale Stammzellen/kg betragen. Das allogene mesenchymale Stammzellpräparat kann gleichzeitig mit den hämatopoetischen Stamm- oder Progenitorzellen oder für einen Zeitraum vor der Zufuhr des Transplantats von mindestens etwa 7 Tagen, der im allgemeinen aber 30 Tage nicht übersteigt, bei einer typischen therapeutischen Behandlungsdauer von 7 bis 14 Tagen verabreicht werden. Das mesenchymale Stammzellpräparat wird vorzugsweise intravenös 1- bis 3-mal täglich verabreicht. Die Verabreichung kann so eingestellt werden, dass ein Optimum an Wirksamkeit und pharmakologischer Dosierung erreicht wird. Erfindungsgemäß wird ferner eine pharmazeutische Packung oder Kit bereitgestellt, das ein oder mehr Behälter enthält, die mit einem oder mehreren Bestandteilen des erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparats gefüllt sind. Diesen Behältern kann ein Beipackzettel in der von den Regierungsbehörden, die die Herstellung, die Verwendung oder den Vertrieb von pharmazeutischen oder biologischen Produkten regulieren, vorgeschriebenen Form beigefügt werden, wobei auf dem Beipackzettel ausgeführt wird, dass die für die Herstellung, die Verwendung oder den Vertrieb zuständigen Behörden eine Zulassung für die Verabreichung an den Menschen erteilt haben.

[0045] Die vorliegende Erfindung ist insbesondere insofern besonders vorteilhaft, als mesenchymale Stammzellpräparate für eine Vielzahl von Behandlungen verwendet werden können, bei denen die Quelle für die mesenchymalen Stammzellen nicht der Empfänger ist, wobei es nicht erforderlich ist, diese Quelle mit dem Empfänger abzugleichen. Außerdem können derartige mesenchymale Stammzellen eingesetzt werden, ohne dass es erforderlich ist, eine chronische Behandlung mit Immunsuppressiva vorzunehmen.

[0046] Gemäß einem weiteren Aspekt ist die vorliegende Erfindung auf die Verwendung von allogenen, humanen, mesenchymalen Stammzellen in Form von gentechnisch bearbeiteten Zellen abgestellt, wo-

bei die Zellen Gene von Interesse enthalten, die insbesondere der Expression von physiologisch oder pharmakologisch aktiven Proteinen oder zur Verwendung zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats für die Gentherapie dienen.

[0047] Gemäß diesem Aspekt der vorliegenden Erfindung können allogene, humane, mesenchymale Stammzellen oder Progenitorzellen als Wirtszellen für die Expression von exogenen Genprodukten verwendet werden. Die in Kultur expandierten Zellen gelangen in das Knochenmark zurück und verstärken die hämatopoetische Ausbeute bei einem Vorgang der Knochenmarktransplantation. Ferner können die Zellen für eine zelluläre Therapie manipuliert werden, z. B. für die klinische Verwendung expandiert, gereinigt, ausgewählt und aufrechterhalten werden, wobei immer noch der Vorläufer-Phänotyp erhalten bleibt. Ein Bestandteil dieser Manipulation ist die Charakterisierung von derartigen Zellen und ihre Kryokonservierung für eine spätere Verwendung.

[0048] Es kommt in Betracht, dass die transformierten, allogenen Stammzellen und die Expressionsprodukte des eingebauten genetischen Materials allein oder in Kombination mit anderen Zellen und/oder Zusammensetzungen verwendet werden können.

[0049] Die Technologie zur Einführung fremder Gene in diese Progenitor-Zellkulturen ist in der Literatur beschrieben (vergl. z. B. US-Patent 5 591 625) und ergibt transduzierte mesenchymale Stammzellen, bei denen sämtliche Nachkommen der Zellen das neuartige genetische Material tragen. Die Abgabe der transformierten Zellen kann durch verschiedene Verfahren erfolgen, einschließlich Infusion und direkte Injektion in Knochenhaut, Knochenmark, Muskeln und subkutane Stellen. Gemäß diesem Aspekt der vorliegenden Erfindung können Gene in allogene mesenchymale Stammzellen, die für die Herstellung von pharmazeutischen Präparaten verwendet werden, eingeführt werden, wobei die Präparate anschließend dem Patienten, bei dem die Genexpression ihren therapeutischen Nutzen entfaltet, verabreicht werden. Zu Beispielen für derartige Anwendungen gehören Gene, die eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung von mesenchymalen Zellen, bei der Zellentwicklung, bei der Remodellierung, bei der Reparatur und bei der in vivo-Erzeugung von extrazellulären Genprodukten spielen.

[0050] Zusätzlich zur Korrektur von genetischen Störungen können bei diesem Aspekt der Erfindung in zielgerichteter Weise zusätzliche Kopien von wesentlichen Genen eingeführt werden, um eine erhöhte Expression von bestimmten Genprodukten zu ermöglichen. Diese Gene können sich beispielsweise auf Hormone, Matrixproteine, Zellmembranproteine, Zytokine, Haftmoleküle, entgiftende Enzyme und "Wiederaufbau"-Proteine, die für die Geweberepara-

tur von Bedeutung sind, beziehen. Normale mesenchymale Stammzellen können bereitgestellt werden, um abnormale mesenchymale Stammzellen zu behandeln.

[0051] Eine weitere Anwendung besteht in der Verwendung von eingeführten Genen, um den Phänotyp der allogenen mesenchymalen Stammzellen und ihrer differenzierten Nachkommen für spezifische therapeutische Anwendungen zu verändern. Hierzu gehören intrazelluläre Genprodukte, Signaltransduktionsmoleküle, Zelloberflächenproteine, extrazelluläre Genexpressionsprodukte und Hormonrezeptoren. Zu Krankheitszuständen und Vorgängen, bei denen derartige Behandlungen angewendet werden, gehören genetische Störungen des Muskel-Skelett-Systems, Krankheiten von Knochen und Knorpeln, Knochenmark, entzündliche Zustände, degenerative Muskelkrankungen, maligne Erkrankungen und autologe und allogene Knochen- oder Knochenmarktransplantationen.

[0052] Bei einer Ausführungsform handelt es sich bei den isolierten, humanen, mesenchymalen Stammzellen vorzugsweise um mesenchymale Stammzellen, die mit mindestens einer DNA-Sequenz transformiert worden sind, die zur Expression von solchen Transplantationsprodukten befähigt sind, die wiederum zur Verpackung einer viralen Sequenz befähigt sind, so dass es sich um gentherapeutische Producerzellen handelt. Bei einer bevorzugten Ausführungsform dieses Aspekts sind die isolierten, humanen, mesenchymalen Stammzellen mit einer DNA-Sequenz transformiert, die ein retrovirales 5'LTR und unter der transkriptionalen Kontrolle davon mindestens ein retrovirales gag-, pol- oder env-Gen umfasst. Gemäß einem weiteren Aspekt sind die isolierten, humanen, mesenchymalen Stammzellen auch mit einer DNA-Sequenz transformiert, die eine retrovirale Packungssignalsequenz und eingebautes genetisches Material, das unter der Kontrolle eines Promotors zu exprimieren ist, umfasst, so dass es sich um inkompetente Retroviren handelt. Ferner kommt die Transfektion von mesenchymalen Stammzellen oder beteiligten Stromoblasten in Frage, um die Hämatopoese einzuleiten, zu modulieren oder zu verstärken. Praktisch sämtliche genetischen Läsionen von mesenchymalen Stammzellen oder Gewebe können durch diese Technologie behandelt oder "korrigiert" werden. Eine Schlüsselkomponente besteht in der Fähigkeit zur Abgabe dieser gentransportierenden Stammzellen an das entsprechende Gewebe unter solchen Bedingungen, dass die Stammzellen einer Expansion unterliegen und diesen Geweberaum wieder bevölkern. Eine Patientenvorbereitung zur Einführung von allogenen mesenchymalen Stammzellen umfasst (ohne Beschränkung hierauf) (a) eine Ablation des Knochenmarks durch Chemotherapie und/oder Bestrahlung in Verbindung mit einer Knochenmarktransplantation und (b) eine direkte

Gewebeinfiltration von "transduzierten" Zellen ohne Präparation, insbesondere wenn die transduzierten Zellen möglicherweise einen Überlebensvorteil, einen Vorteil während der Differenzierung oder einen funktionellen Vorteil besitzen (was beispielsweise der Fall sein kann, wenn eine Muskelstörung, z. B. eine Muskeldystrophie, mit dem Dystrophin-Gen oder einem ähnlichen Gen korrigiert wird). Eine zusätzliche Anwendung besteht in der Markierung von mesenchymalen Stammzellen, die für die in vivo-Verwendung allein hergestellt worden sind oder auf eine beliebige zurückbleibende Vorrichtung aufgebracht worden sind, z. B. eine orthopädische Vorrichtung, bei der es von Interesse ist, die mesenchymalen Stammzellen zu "markieren" und ihr Überleben, ihre Aufrechterhaltung und Differenzierung sowie ihre Verbindung mit der Vorrichtung im Laufe der Zeit zu beobachten.

[0053] Zu den Vorteilen, die durch die allogenen, humanen, mesenchymalen Stammzellen, die mit exogenem genetischen Material transfiziert sind, das für ein zu exprimierendes Protein kodiert, gehören: (a) die Fähigkeit zur Verwendung von humanen mesenchymalen Stammzellen, die aus einer Vielzahl von Quellen, die von dem Individuum, dem sie verabreicht werden sollen, abweichen, d. h. die für das Individuum allogene sind; (b) die Fähigkeit zur Abgabe dieser gentragenden mesenchymalen Stammzellen an das geeignete Gewebe in einem Patienten, ohne dass eine nachteilige Immunreaktion hervorgerufen wird, wodurch der Bedarf nach einer immunsuppressiven Therapie vor der Verabreichung der Zellen auf ein Minimum beschränkt wird; (c) die Fähigkeit, humane mesenchymale Stammzellen in Kultur zu expandieren, und zwar für eine Infusion, bei der sie die mesenchymalen Geweberäume besetzen; (d) die Fähigkeit zur Expansion in Kultur und zur Kryokonservierung von humanen mesenchymalen Stammzellen, die als Wirte für einen stabilen, vererblichen Gentransfer verwendet werden können; (e) die Fähigkeit zur Gewinnung von genetisch veränderten Zellen nach in vivo-Installation; (f) die Fähigkeit zur Anpassung einer genetischen Therapie an eine Vielzahl von Störungen, wobei die genetische Veränderung genau auf das Zielgewebe festgelegt wird; und (g) die Fähigkeit von neu in die humanen mesenchymalen Stammzellen und ihre Nachkommen eingeführten Genen zur Expression in einer im Vergleich zu anderen Zellen weniger restriktiven Art und Weise, was die Anwendungsmöglichkeiten bei der Behandlung von medizinischen Krankheiten erweitert.

[0054] Retroviren sind aufgrund ihrer Struktur und ihres Lebenszyklus in idealer Weise als Gen-Transfervehikel geeignet. Was den durch Retroviren vermittelten Gentransfer allgemein betrifft, wird auf McLachlin et al., Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Bd. 38 (1990), S. 91-135, verwiesen. Die Transformation von Stammzellen unter

Verwendung von Retroviren ist im US-Patent 5 591 625 beschrieben.

[0055] Ferner ist es möglich, von Retroviren abweichende Vehikel zur genetischen Bearbeitung oder Modifikation der allogenen Stammzellen zu verwenden. Eine genetische Information von Interesse kann mittels beliebiger Viren eingeführt werden, die das neue genetische Material in derartigen Zellen exprimieren, z. B. SV40, Herpes-Virus, Adenovirus und humaner Papillomavirus. Zahlreiche Verfahren können zur Einführung von klonierten eukaryontischen DNAs in gezüchtete Säugetierzellen verwendet werden, wozu die entweder durch Calciumphosphat oder DEAE-Dextran vermittelte Transfektion, die Protoplastenfusion und die Elektroporation gehören. Das in Stammzellen zu übertragende genetische Material kann in Form von viralen Nucleinsäuren, bakteriellen Plasmiden oder Episomen vorliegen.

[0056] Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, allogene, mesenchymale, humane Stammzellen genetisch so zu bearbeiten, dass sie Polypeptide, Hormone und Proteine erzeugen, die normalerweise in humanen Stammzellen nicht in biologisch signifikanten Mengen oder nur in geringen Mengen erzeugt werden, jedoch in Situationen, bei denen eine Überproduktion zu einer günstigen therapeutischen Wirkung führen würde. Diese Produkte würden dann in den Blutkreislauf oder andere Bereiche des Körpers, z. B. das zentrale Nervensystem, sezerniert. Die auf diese Weise gebildeten humanen Stammzellen können als kontinuierliche Arzneistoffabgabesysteme dienen, und zwar unter Ersatz von vorhandenen Verabreichungsformen, die eine periodische Verabreichung der benötigten Substanz (z. B. durch Einnahme, Injektion, Depotinfusion und dergl.) erforderlich machen. Die Erfindung ist zur Bereitstellung von Hormonen, Enzymen und Arzneistoffen bei Menschen, die derartige Substanzen benötigen, geeignet. Die Erfindung ist von besonderem Wert bei der Bereitstellung von Substanzen, wie Hormonen (z. B. Parathyroidhormon, Insulin), die über ausgedehnte Zeitspannen hinweg in Aufrechterhaltungsdosen benötigt werden.

[0057] Beispielsweise kann die Erfindung zur Bereitstellung einer kontinuierlichen Abgabe von Insulin herangezogen werden. Dadurch würde die Notwendigkeit für tägliche Insulininjektionen entfallen. Genetisch bearbeitete, humane, mesenchymale Stammzellen können auch zur Erzeugung von Gerinnungsfaktoren, wie Faktor VIII, oder für die kontinuierliche Abgabe von Dystrophin an Muskelzellen bei Behandlung von muskulärer Dystrophie verwendet werden.

[0058] Der Einbau von genetischem Material von Interesse in allogene, humane, mesenchymale Stammzellen ist von besonderem Wert bei der Behandlung von ererbten und erworbenen Krankheiten. Im Fall von ererbten Krankheiten wird dieser Weg zur

Bereitstellung von genetisch modifizierten, humanen, mesenchymalen Stammzellen und anderen Zellen, die als metabolisches Abflussbecken dienen können, eingeschlagen. Dies bedeutet, dass mesenchymale Stammzellen dann dazu dienen würden, eine potentiell toxische Substanz abzubauen. Beispielsweise kann dieser Weg bei Behandlung von Störungen des Aminosäure-Katabolismus, einschließlich Hyperphenylalaninämien aufgrund eines Defekts der Phenylalanin-hydroxylase und Homocysteinämien aufgrund eines Defekts der Cystathionin- β -synthase, eingeschlagen werden. Zu weiteren Störungen, die auf diese Weise behandelt werden könnten, gehören Störungen des Aminosäure-Stoffwechsels, wie Cystinose; Störungen des Membrantransports, wie Histidinurie oder familiäre Hypocholesterinämie; und Störungen des Nucleinsäure-Stoffwechsels, wie erbliche Orotsäureurie.

[0059] Die erfindungsgemäß verwendeten allogenen, humanen, mesenchymalen Stammzellen können auch zur Behandlung von genetischen Krankheiten verwendet werden, bei denen ein Produkt (z. B. ein Enzym oder Hormon) normalerweise vom Körper nicht oder nicht in ausreichenden Mengen erzeugt wird. Dabei können humane mesenchymale Stammzellen, die mit einem Gen, das für die fehlende oder in unzureichendem Maße erzeugte Substanz kodiert, zur Erzeugung der Substanz in ausreichenden Mengen verwendet werden. Dieser Weg kann bei der Erzeugung von α -1-Antitrypsin eingeschlagen werden. Er kann auch bei der Erzeugung von Faktor XIII und Faktor IX eingeschlagen werden und würde sich dann zur Behandlung von Hämophilie eignen.

[0060] Es gibt zahlreiche erworbene Krankheiten, für die eine Behandlung unter Verwendung von bearbeiteten, allogenen, humanen, mesenchymalen Stammzellen (d. h. humanen mesenchymalen Stammzellen, die mit genetischem Material von Interesse transduziert sind) für die Herstellung eines pharmazeutischen Präparats bereitgestellt werden kann. Beispielsweise können derartige Zellen bei der Behandlung von Anämie, die üblicherweise bei chronischen Krankheiten auftritt und häufig in Verbindung mit chronischem Nierenversagen (z. B. Hämodialysepatienten) auftritt, verwendet werden. In diesem Fall würden humane mesenchymale Stammzellen, denen ein für Erythropoietin kodierendes Gen einverleibt ist, die Anämie korrigieren, indem sie das Knochenmark zur Erhöhung der Erythropoese (d. h. der Erzeugung von roten Blutzellen) stimulieren. Bei weiteren kodierten Cytokinen kann es sich beispielsweise um G-CSF oder GM-CSF handeln.

[0061] Die erfindungsgemäß verwendeten allogenen, humanen, mesenchymalen Stammzellen können auch zur Verabreichung einer geringen Dosis an Gewebe-Plasminogen-Aktivator als Aktivator zur Verhinderung der Bildung von Thrombi verwendet

werden. In diesem Fall würden humane mesenchymale Stammzellen mit dem eingebauten genetischen Material, das für TPA kodiert, in einem Individuum platziert werden, bei dem eine Thrombusverhinderung angestrebt wird. Dies wäre beispielsweise als eine prophylaktische Maßnahme gegen häufige Störungen, wie koronare Arterienerkrankungen, zerebrovaskuläre Erkrankungen, periphere, vaskuläre, okklusive Erkrankungen, Venenthrombose (z. B. eine außenliegende Thrombose), wie sie bei pulmonalen Embolien auftritt, oder tiefe Venenthrombose, geeignet sein. Humane mesenchymale Stammzellen, die für Calcitonin kodierende DNA enthalten, können bei der Behandlung der Paget-Krankheit, einer progressiven, chronischen Störung des Knochenstoffwechsels, bei der derzeit Calcitonin subkutan verabreicht wird, verwendet werden.

[0062] Eine andere Anwendungsmöglichkeit besteht in einer subkutanen Implantation von allogenen, humanen, mesenchymalen Stammzellen allein oder nach Anheftung an eine poröse, keramische würfelförmige Vorrichtung, die die mesenchymalen Stammzellen enthält und ihnen eine in vivo-Differenzierung ermöglicht. Ein weiteres Beispiel wäre die Injektion von allogenen mesenchymalen Stammzellen in einen Muskel, wo sie sich zu Muskelzellen differenzieren. Ein weiteres Beispiel wäre ein Transplantat mit genetisch bearbeiteten, humanen, mesenchymalen Stammzellen, die kontinuierlich ein Polypeptidhormon, z. B. Luteinisierungshormon freisetzendes Hormon (LHRH) zur Verwendung bei der Geburtenkontrolle, sezernieren.

[0063] Humane mesenchymale Stammzellen, die zur Erzeugung und Sekretion von Interleukinen (z. B. IL-1, IL-2, IL-3 oder IL-4 bis IL-11) bearbeitet worden sind, können auf verschiedenen Gebieten eingesetzt werden. Beispielsweise kann eine Verabreichung von IL-3 durch humane mesenchymale Stammzellen, die für IL-3 kodierendes genetisches Material enthalten, zur Behandlung von Neutropenie durch Erhöhung der Neutrophilenzahl verwendet werden. Allogene, humane, mesenchymale Stammzellen können auch mit dem Gen für Thrombopoietin transduziert werden. Wenn sie dann einem Individuum mit einem Zustand, der durch eine niedrige Blutplättchenzahl charakterisiert ist, verabreicht werden, führt die Bildung und Sekretion des kodierten Produkts zu einer Stimulation der Blutplättchenenerzeugung.

[0064] Eine weitere Anwendung der vorliegenden Erfindung besteht in der Behandlung von Enzymdefektkrankheiten. In diesem Fall wird nicht das Produkt (Polypeptid), das durch das in die humanen mesenchymalen Stammzellen eingeführte Gen kodiert wird, sezerniert (wie es bei Hormonen der Fall ist); vielmehr wird ein Enzym sezerniert, das innerhalb der Zelle verbleibt. Es gibt zahlreiche Fälle von genetischen Krankheiten, bei denen einem Individuum ein

spezielles Enzym fehlt und die Fähigkeit zur Metabolisierung verschiedener Aminosäuren und anderer Metaboliten nicht gegeben ist. Die korrekten Gene für diese Enzyme könnten in die allogenen mesenchymalen Stammzellen eingeführt und einem Individuum transplantiert werden. Das Transplantat würde dann die Stoffwechselfunktion ausüben. Beispielsweise gibt es eine genetische Krankheit, bei denen den Betroffenen das Enzym Adenosin-desaminase fehlt. Dieses Enzym ist beim Abbau von Purinen zu Harnsäure beteiligt. Es wird als möglich angesehen, unter Einsatz der vorliegenden Erfindung ein subkutanes Transplantat gemäß den vorstehenden Ausführungen zu erzeugen, das zur Bildung des fehlenden Enzyms in ausreichend hohen Konzentrationen befähigt ist, um das Blut, das den Bereich, an dem das Transplantat angebracht ist, passiert, zu entgiften.

[0065] Zu weiteren Anwendungsmöglichkeiten gehören (ohne Beschränkung hierauf): Cytokin-Gene zur Verstärkung der hämatopoetischen Rekonstitution im Anschluss an eine Knochenmarkstransplantation bei Ausfall des Knochenmarks aufgrund von kongenitalen Störungen des Knochenmarks; Knochen-Cytokine zur Verbesserung der Reparatur und Heilung von geschädigten Knochen; bei Knochenmatrixproblemen eine Verbesserung der Reparatur und Heilung von verletzten oder degenerativen Knochen; Korrektur von mesenchymalen genetischen Störungen, wie osteogene, imperfekte und muskuläre Dystrophie; lokalisierte Erzeugung von Proteinen, Hormonen und dergl. unter Bereitstellung von zellulären Therapeutika für zahlreiche verschiedene Verbindungen; und zytotoxische Gene, wie Thymidin-kinase, die Zellen gegenüber Ganciclovir sensibilisiert. Eine Lückenverbindungshaftung an Tumorzellen könnte es den mesenchymalen Stammzellen ermöglichen, für die Krebstherapie zu dienen. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass der Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung nicht auf die speziellen, vorstehend beschriebenen Ausführungsformen beschränkt ist. Die Erfindung kann abweichend von den speziellen Ausführungen im Rahmen des Schutzzumfangs der beigefügten Ansprüche ausgeübt werden. Es ist darauf hinzuweisen, dass die hier beschriebenen Verfahren in einer Vielzahl von Möglichkeiten, die auf dem Gebiet bekannt sind, durchgeführt werden können, wobei zahlreiche Modifikationen und Variationen möglich sind. Es ist ersichtlich, dass irgendwelche Theorien, die in Bezug auf die Wirkungsweise oder Wechselwirkung zwischen Zelltypen aufgestellt worden sind, nicht als eine Beschränkung der Erfindung in irgendeiner Weise anzusehen sind, sondern diese Theorien nur zu einem besseren Verständnis der erfindungsgemäßen Verfahren beitragen sollen.

[0066] Nachstehend wird die vorliegende Erfindung durch Beispiele näher erläutert. Diese Beispiele beschränken aber in keiner Weise die Lehre oder Offenbarung der hier dargelegten Erfindung.

Beispiel 1

Mangel an Alloreaktivität gegen mesenchymale Stammzellen

[0067] Bei Zelloberflächen-Antigenen, die für die Auslösung von Transplantatabstoßungen verantwortlich sind, handelt es sich um MHC-Antigene der Klasse I und der Klasse II. T Zellen sind gegenüber fremden MHC-Antigenen alloreaktiv. MHC-Moleküle der Klassen I und II stimulieren die gemischte Lymphozytenreaktion.

[0068] 1×10^5 T-Zellen eines Individuums A (T_A) wurden in flachbödigen Mikrotitervertiefungen 7 Tage lang mit PBMCs, die mit Mitomycin C behandelt worden waren (um die Proliferation von PBMCs zu T-Zellen zu verhindern), eines Individuums B (mPBMC_B) gezüchtet. Die mPBMC_Bs wurden mit 20K und 100K überimpft. Die Kulturen wurden während der mindestens 18-stündigen Züchtungsdauer mit 3H-Thymidin gepulst, um die T-Zellproliferation zu messen. Die in [Fig. 1](#) dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die T_A -Zellen die PBMC_Bs als fremd erkannten (vergl. die Balken unter " $T_A + mPBMC_B$ "). Wenn mehr PBMC_Bs vorhanden sind, werden mehr T-Zellen gebildet.

[0069] 2×10^4 humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) des gleichen Spenders wie die PBMCs wurden mit 1×10^5 T-Zellen des Individuums A (T_A) koinkubiert. Die Zellen wurden in flachbödigen Mikrotitervertiefungen insgesamt 7 Tage gezüchtet. Die Kulturen wurden während der mindestens 18-stündigen Kulturperiode mit ³H-Thymidin gepulst, um die T-Zellproliferation zu messen. 2 Tage vor der gemeinsamen Züchtung mit den T-Zellen wurden humane mesenchymale Stammzellen in Mikrotitervertiefungen in der vorstehend angegebenen Anzahl (konfluent) überimpft und mit IFN- γ (50 Einheiten/ml) behandelt, um die Oberflächen-MHC-Expression an mesenchymalen Stammzellen zu stimulieren. Humane mesenchymale Stammzellen oder mit humanen B7-1- oder humanen B7-2-Kostimulationsmolekülen transduzierte humane mesenchymale Stammzellen (K. J. Lafferty, S. J. Prowse und C. J. Simeonovic, Ann. Rev. Immunol., Bd. 1 (1983), S. 143-173) wurden mit den T-Zellen inkubiert.

[0070] Die in [Fig. 1](#) dargestellten Ergebnisse (vergl. [Fig. 1](#) "TA + transduzierte hMSCs") belegen, dass die T-Lymphozyten nicht auf die transduzierten oder untransduzierten, humanen, mesenchymalen Stammzellen reagierten (nicht proliferierten), d. h. sie wurden nicht als fremd erkannt. Somit gab es keine gemischte Lymphozytenreaktion.

[0071] Die Ergebnisse zeigen ferner, dass der Mangel an Reaktion auf die mesenchymalen Stammzellen nicht auf eine genetische Verträglichkeit zwischen den Individuen zurückzuführen war, da die T-Zellen

periphere mononukleare Blutzellen (PBMC_B) des Spenders der mesenchymalen Stammzellen als fremd erkannten.

Beispiel 2

Unterdrückung der gemischten Lymphozytenreaktion

[0072] Um festzustellen, ob mesenchymale Stammzellen in aktiver Weise die allogene Reaktion unterdrückten, wurden gemischte Lymphozytenreaktionen (MLR) in Gewebekulturplatten mit oder ohne anhaftende mesenchymale Stammzellen, die von zwei verschiedenen Spendern erhalten worden waren, angesetzt: ein Spender war in Bezug auf die Ziel- oder Stimulatorzelle bei der MLR abgeglichen, während der andere Spender nicht damit in Beziehung stand.

[0073] 10^5 PBMCs von Individuum A (PBMC_A) wurden mit 10^5 Ziel-PBMCs von Person B (PBMC_B) vermischt. Die PBMC_Bs wurden mit 3000 rad Röntgenstrahlung bestrahlt (Stimulatorzellen), um deren Proliferation aufgrund einer Aktivierung durch PBMC_As zu verhindern. Somit proliferierten nur PBMC_As (Responderzellen). Wenn PBMC_As und PBMC_Bs vermischt wurden, trat eine gemischte Lymphozytenreaktion auf, wobei die PBMC_A-Zellen durch die Oberflächenantigene an den PBMC_Bs aktiviert wurden. Die Kulturen wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen inkubiert und während der letzten 18 Stunden mit ³H-Thymidin gepulst. In Gegenwart der PBMC_Bs vermehrten sich die PBMC_As unter Erzeugung eines Zählwerts von 40 000; vergl. [Fig. 2](#), 1. Balken ("keine" bedeutet, dass keine mesenchymalen Stammzellen vorhanden waren).

[0074] Wenn jedoch PBMC_As und PBMC_Bs in Gegenwart von mesenchymalen Stammzellen vermischt wurden, wurde die gemischte Lymphozytenreaktion unterdrückt. 10^5 PBMC_As wurden mit 10^5 PBMC_Bs in Mikrotiterplattenvertiefungen, die mit einer Monolayer von humanen mesenchymalen Stammzellen beschichtet waren, vermischt. Die mesenchymalen Stammzellen wurden in den Vertiefungen in Mengen von 7 500 bis 22 500 mesenchymalen Stammzellen pro Vertiefung ausgestrichen. Zwei mesenchymale Stammzellpopulationen wurden getestet: humane mesenchymale Stammzellen wurden von einem Individuum, das mit dem MHC-Typ des Individuums B abgeglichen war, erhalten; und humane mesenchymale Stammzellen wurden von einem Individuum, das weder mit dem MHC-Typ des Individuums A noch mit dem des Individuums B abgeglichen war, erhalten. Die Kulturen wurden für einen Zeitraum von 7 Tagen inkubiert und während der letzten 18 Stunden mit ³H-Thymidin gepulst. In Gegenwart der humanen mesenchymalen Stammzellen wurde die MLR unterdrückt; vergl. [Fig. 2](#). Somit unterdrückten unabhängig vom MHC-Ursprung der mesenchymalen Stammzellen die mesenchymalen Stammzellen die ge-

mischte Lymphozytenreaktion.

[0075] Die in [Fig. 2](#) dargestellten Ergebnisse zeigen ferner, dass die humanen mesenchymalen Stammzellen die gemischte Lymphozytenreaktion in dosisabhängiger Weise verringerten. Mesenchymale Stammzellen von beiden Spendern unterdrückten die Proliferation gleichermaßen gut, was zeigt, dass es keine Spezifität der Unterdrückung in Bezug auf den MHC-Typ gibt. Diese Ergebnisse zeigen, dass mesenchymale Stammzellen in aktiver Weise die gemischte Lymphozytenreaktion unterdrückten, wenn die Zellen miteinander gezüchtet wurden.

Beispiel 3

Allogene, subkutane Hundestudie

[0076] Der Zweck dieser Studie bestand darin, festzustellen, ob eine subkutane Implantation von allogenen, MSC-beladenen HA/TCP-Proben zu einer Immunreaktion bei Hunden führte und ob diese Reaktion einen Einfluss auf die MSC-vermittelte Osteogenese hatte.

[0077] Für diese allosubkutane Implantation wurden zwei Hunde herangezogen. Jedem Hund wurden in einem Schenkel 6 autogene MSC-Implantate und in den kontralateralen Schenkel drei allogene Implantate von jeweils zwei allogenen Spendern eingesetzt. Drei der autogenen Implantate und sämtliche Alloproben wurden in serumfreiem, phenolfreiem DMEM mit geringem Glucosegehalt angesetzt. Die übrigen drei autogenen Proben wurden in serumfreiem DMEM mit hohem Glucosegehalt angesetzt. Nur kryokonservierte MSCs wurden bei der Studie verwendet. Die Proben wurden 24 Stunden vor der Implantation angesetzt. Zwei Proben eines jeden Typs wurden für eine histologische Bearbeitung und eine Probe für eine RNA-Extraktion vorgesehen. Ferner wurden begrenzte Mengen an Blut und Lymphknoten zur Bestimmung der Immunreaktion gewonnen. Die Endpunkte lagen bei 2 Wochen und 6 Wochen. Bei dem Hund mit der 2-wöchigen Versuchsdauer war eine bilaterale Sehnenoperation vorgenommen worden, während der Hund mit der 6-wöchigen Versuchsdauer eine unilaterale Sehnenoperation an der Gliedmaße, an der die autogenen subkutanen Implantate eingesetzt worden waren, unterzogen worden war. Die Hunde in dieser Studie stammten nicht aus dem gleichen Wurf.

Ergebnisse

[0078] Eine grobe Betrachtung des Implantatbettes beim Töten und auch der allgemeine Gesundheitszustand ergaben keine größere Immunreaktion auf die Alloimplantate nach der 2-wöchigen oder 6-wöchigen Versuchsdauer. Die poplitealen Lymphknoten waren zu beiden Endpunkten in beiden Gliedmaßen vergrößert.

Die inguinalen Lymphknoten konnten nicht identifiziert werden. Vorläufige MLR-Daten unter Verwendung von PBMCs aus einer Kombination des Spender-Wirt-Paares ergaben eine positive Reaktion mit einem Zählwert von 15K beim Proliferationstest, was darauf hinweist, dass dieses Paar nicht abgeglichen ist. Die histologischen Schnitte der Auto- und Alloproben nach 2 Wochen waren voneinander nicht unterscheidbar. In sämtlichen Proben war loses Bindegewebe vorhanden und bei keiner der Proben war eine Knochenbildung sichtbar (wie nach 2 Wochen zu erwarten). Histologische Daten wurden von einer der beiden Proben von jeder Gruppe nach 6 Wochen gewonnen. Die in DMEM-LG verarbeitete autologe Probe nach 6 Wochen zeigte eine erhebliche Knochenmenge in der Probe (**Fig. 3**). Die Alloprobe von jedem der beiden Allospender war ebenfalls in Bezug auf Knochen positiv (**Fig. 4 & 5**) und das Muster der Gewebebildung war ähnlich wie bei der Autoprobe. Die Menge der Knochenbildung in Alloproben war geringer als in der Autoprobe. Jedoch kann aufgrund der Variabilität der Menge der Knochenbildung, die bei diesem Test auftritt, auf der Basis der begrenzten Probengröße kein Schluss gezogen werden. Es konnte keine Immunreaktion in einer der Alloproben mit H & E-Färbung beobachtet werden.

[0079] Die Knochenbildungsdaten bei diesen vorläufigen Studien zeigen klar, dass Hunde-MSCs ihr osteogenes Potential bei einem allogenen Ansatz behalten und keine stärkere Immunreaktion hervorbringen.

Beispiel 4

[0080] Der Zweck der Studie bestand darin, für Hunde den Nachweis der Machbarkeit und Sicherheit einer Infusion einer mäßig hohen Dosis von kaninen mesenchymalen Stammzellen (cMSC) von in Bezug auf Spenderhund-Leukozytenantigen (DLA) identischen Hunden des gleichen Wurfs bei 10×10^6 Zellen/kg bei einem allogenen Knochenmarkstransplantat-Ansatz zu erbringen. Ein zweites Ziel bestand darin, die Verteilung und Funktion von Spender-neo- und GFP-markierten cMSCs 50 und 100 Tage nach der Transplantation zu prüfen.

Materialien und Methoden

Versuchstiere

[0081] Für diese Studie wurden Beagle-Hunde herangezogen. Zwei männliche und zwei weibliche DLA-identische Tiere des gleichen Wurfs, die am Tag 0 der Studie ein Alter von 7 oder 9 Monaten aufwiesen, wurden herangezogen. Das verwendete Typisierungsverfahren beinhaltet die Verwendung von hochgradig polymorphen Mikrosatelliten-Markern, um die Vererbung der Klasse II-DRB-Region im Hunde-Leukozyten-Antigen (DLA), dem Hunde-Äquiva-

lent des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes, zu verfolgen. Bei den Mikrosatelliten handelte es sich um kleine Di-, Tri- oder Tetranucleotid-Wiederholungssequenzen, die eine ausreichende Längenvariation in Allelen aufweisen, so dass sie zur Verfolgung der Vererbung von chromosomalen Segmenten durch Multigenerationskreuzungen verwendet werden können. Eine Segregation von Allelen wird typischerweise unter Durchführung einer einstufigen Polymerase-Kettenreaktion mit Primern, die von besonderen DNA-Sequenzen, die jede Wiederholungssequenz umgeben, abgeleitet sind, überwacht. Ferner wurden gemischte Leukozytenreaktionen an den DLA-identischen Hundepaaren des gleichen Wurfs, die für die Untersuchung ausgewählt worden waren, durchgeführt, um eine Bestätigung der Testergebnisse für den PCR-Mikrosatellitenmarker zu erhalten.

Konzept der Studie

[0082] Die Hunde erhielten eine Transplantation von cMSC und Knochenmark des gleichen DLA-identischen Spenders des gleichen Wurfs. Das Knochenmark wurde von jedem der beiden DLA-identischen Wurfgefährten am Tag 0 vor der Gesamtkörperbestrahlung (TBI) gewonnen und ausgetauscht. Eine Myeloablation wurde herbeigeführt, indem man die Hunde am Tag 0 einer einzigen TBI-Dosis von 920 Centigray (cGy) aussetzte (Mittellinien-Luft-Belastung aus zwei gegenüberliegenden ^{60}Co -Quellen; Abgabe mit einer Geschwindigkeit von 7 cGy (9,3R)/min). In Kultur expandierte cMSCs, die aus abgesaugtem Spenderknochenmark 4 oder mehr Wochen vor der Transplantation isoliert worden waren, wurden mit Papp@OT-24 transduziert, das die Gene für grünes Fluoreszenzprotein (GFP) und Neomycin-phosphotransferase (neo) enthielt. Die cMSCs wurden nach Passage 1 (P1) oder Passage 2 (P2) kryokonserviert. Im Anschluss an die TBI wurden die cMSCs aufgetaut und intravenös über eine tragbare Infusionspumpe innerhalb von 15 Minuten abgegeben. Innerhalb von 1 oder 2 Stunden nach der cMSC-Infusion wurde das Knochenmark mit einer intravenösen Infusion von $\geq 1 \times 10^8$ gesamten nukleierten Zellen (TNC)/kg versehen.

[0083] Sämtliche vier Hunde erhielten Cyclosporin zur Graft-versus-host-Krankheit (GVHD)-Prophylaxe auf intravenösem Wege an den Tagen 0 bis 5 in einer Dosis von 10 mg/kg BID (20 mg/kg/Tag) (Sandimmune[®] Injection Solution, Novartis Pharmaceuticals Corporation). An den Tagen 6 bis 50 (Ende der Studie) für die Gruppe I.1.a oder an den Tagen 6 bis 100 für die Gruppe I.1.b wurde Cyclosporin in einer Dosis von 10 mg/kg BID oral verabreicht (20 mg/kg/Tag) (Neoral[®]-Weichgelatine kapseln, Novartis Pharmaceuticals Corporation). Die übliche unterstützende Behandlung mit oralen Antibiotika begann für die Empfänger am Tag -5 und mit systemischen Antibiotika am Tag 0 und wurde bis zum Erreichen des En-

graftments fortgesetzt. Gegebenenfalls wurde flüssiges Unterstützungsmittel verabreicht. Bei keinem der vier Hunde war während der Erholungsphase eine Transfusion von Blutplättchen erforderlich. Die übliche Vorgehensweise bei Hunden erfordert eine Transfusion von Vollblut, wenn die Blutplättchenzahl übereinstimmend unter $10\,000/\text{mm}^3$ sinkt oder wenn das Behandlungspersonal Blutungsanzeichen beobachtet. Transfusionen von Blutplättchen wurden gegebenenfalls in Form von 50 ml bestrahltem (2 000 cGy) Vollblut von einem willkürlichen Spender verabreicht. Ein Engraftment wurde zum Zeitpunkt der ersten von drei aufeinanderfolgenden Messungen von >500 absoluten neutrophilen Zellen/ mm^3 , $>1\,000/\text{mm}^3$ und Blutplättchen $>10\,000/\text{mm}^3$, $50\,000/\text{mm}^3$ und $>100\,000$ festgestellt.

[0084] Um die hämatopoetische Erholung zu verfolgen, wurden an den Tagen 0 bis 50 vollständige Blutzählwerte (CBCs) und im Anschluss daran 2-mal wöchentlich für die Studiengruppe mit 100 Tagen verfolgt. Eine chemische Serumanalyse wurde an den Tagen 0 und 2 und anschließend in wöchentlichem Abstand durchgeführt. Periphere Blutproben wurden am Tag 0 vor der MSC-Infusion und zu den Zeitpunkten 5 und 15 Minuten, 1 und 2 Stunden und 1, 2, 3 und 4 Tage für die DNA-Isolierung entnommen. Die DNA wurde auf das Vorliegen von GFP-markierten Zellen durch einen anti-EGFP-DNA-PCR-ELISA-Test, wobei dem Produkt Digoxigenin einverleibt war, und in einer zweiten Stufe mit einem kolorimetrischen anti-Digoxigenin-Test bewertet. Abgesaugtes Knochenmark wurde gewonnen, wenn die Blutplättchenzahlen übereinstimmend $50\,000/\text{mm}^3$ erreicht hatten und unter Anwendung des gleichen PCR-Verfahrens einer Prüfung auf die Anwesenheit von GFP-markierten Zellen unterzogen. cMSC-Kulturen wurden durchgeführt, um die kolonienbildenden Einheiten (CFU) zu bestimmen und um die cMSCs für eine weitere anti-EGFP-PCR-Analyse zu expandieren. Bei der Nekropsie wurden peripheres Blut, abgesaugtes Knochenmark und Knochenmark-Biopsieproben für eine anti-EGFP-PCR-Analyse gewonnen. CFU-Tests wurden am abgesaugten Knochenmark durchgeführt. Die anti-EGFP-PCR-Analyse wurde an in Kultur expandierten cMSCs durchgeführt. Eine histologische Analyse auf die Anwesenheit von GFP in verschiedenen Geweben wurde vorgenommen.

cMSC-Isolierung, Expansion in Kultur, Transduktion und Kryokonservierung

[0085] Bilaterale Knochenmarkaspirate wurden für die cMSC-Isolierung und für die Kulturbildung in der Woche -4 für die Hunde CAN-07-01 und CAN-07-02 und in der Woche -9 für die Hunde CAN-07-03 und CAN-07-04 gewonnen. 15 ml Knochenmark (7 ml aus jedem Humerus) wurden von jedem Hund gewonnen. Die Hunde wurde durch Injektion von Butorphanol und anschließende Injektion eines Gemisches

aus Diazepam und Ketamin-hydrochlorid (Aveco Co., Inc., Fort Dodge, IA) betäubt. Die Einstichstellen der Nadeln wurden mit Povidon-Iod abgerieben und sodann mit Alkohol gespült. Aspirate wurden von jedem Humerus-Gelenkkopf von jedem der Hunde unter Verwendung einer 2 Zoll-Knochenmarknadel Nr. 16 gewonnen. Eine Spritze war an der Nadel angebracht. 8 ml Knochenmark wurden von jedem Humerus abgesaugt. Knochenmarkaspirate wurden unter Steriltechnik in 15 ml fassende konische Polypropylenröhrchen übertragen. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Hunde zur Erholung auf ein warmes Kissen gesetzt. Aliquotanteile des Knochenmarks mit einem Volumen von 5 bis 10 ml wurden in Dulbecco-phosphatgepufferter Kochsalzlösung (DPBS) in einem Polypropylen-Kulturröhrchen auf 50 ml verdünnt. Die Zellsuspensionen wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 000 U/min zentrifugiert. Die gesamten nukleierten Zellzahlen wurden in 4 % Essigsäure bestimmt. Sodann wurden die Zellen in DPBS auf eine Endkonzentration von 20×10^6 Zellen/ml verdünnt. Anschließend wurden 10 ml oder 200×10^6 Zellen auf 20 ml Percoll (spezifisches Gewicht 1,073 g/ml) in einem 50 ml fassenden konischen Röhrchen aufgesetzt und 20 Minuten mit 1 300 U/min zentrifugiert. Die Zellgrenzfläche, die mononukleare Zellen enthielt, wurde in DPBS gewaschen, in komplettem Medium resuspendiert und zur Ermittlung der prozentualen Erholung gezählt. Sodann wurden die Zellen in komplettem Medium verdünnt. Kulturen wurden auf die vorstehend beschriebene Weise hergestellt und in einen Inkubator mit 37 °C und 5 % CO₂ gestellt.

Konstruktion von bicistronischem retroviralem MuLV-Vektor

[0086] Retrovirus mit grünem fluoreszierendem Protein (EGFP) wurde durch Isolierung des EGFP-1-Gen aus der Qualle *Aequorea victoria* (Clontech, CA) konstruiert. Das EGFP-Gen wurde in den retroviralen Vektor pJM573-neo kloniert (wodurch man das Plasmid mit der Bezeichnung pOT-24 erhielt). Das Plasmid pJM573-neo wurde von pN2 (Keller et. al., Nature, Bd. 318 (1985), S. 149) unter Einhaltung der folgenden Modifikationen abgeleitet: die murine, retrovirale gag-Initiationsstelle wurde durch ein Stoppcodon innerhalb des Rasters ersetzt; 5'LTR und 3'LTR wurden in der gleichen Kassetten konstruiert; Neomycin-Phosphotransferase-Gen (neo) und eine interne ribosomale Zugangsstelle (IRES) wurden in pN2 inseriert. Eine schematische Karte des EGFP-pOT24-Plasmids ist in [Fig. 6](#) dargestellt.

Herstellung von rekombinantem Retrovirus

[0087] pOT-24 wurde unter Verwendung von DO-TAP (Boehringer Mannheim) gemäß den Empfehlungen des Herstellers in ökotrope GP & E86-Erzeuger-

zellen transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden in DMEM-Medium mit hohem Glucosegehalt (HG), das mit 10 % hitzeinaktiviertem FBS, Penicillin-Streptomycin (Life Technologies) und 0,5 mg/ml Protaminsulfat G418 (Sigma) als selektivem Marker ergänzt war, gezüchtet. Die Kulturen wurden bis zu 70 % Konfluenz gehalten, wonach das Medium durch frisches retrovirales Medium (ohne G418) ersetzt wurde und die Zellen 2 Tage bei 32 °C gehalten wurden. Das Kulturmedium, das das Retrovirus enthielt, wurde gewonnen, durch ein 0,45 µm-Filter filtriert und bei -70 °C aufbewahrt. Amphotroper Retrovirus wurde unter Anwendung eines zentrifugalen Transduktionsverfahrens und unter anschließender Selektion mit G418 (0,5 mg/ml) durch 2-malige Transduktion von PA317-Zellen mit ökotropem Virus hergestellt. Retroviraler Überstand wurde gewonnen. Der Titer des gepoolten EGFP-Retrovirus an 3T3-Zellen betrug $1,2 \times 10^6$ CFU/ml. GFP-retrovirale Überstände wurden bei -70 °C kryokonserviert.

CAN-07-01 und CAN-07-02

[0088] Die gewaschenen mononuklearen Zellen, die an der Percoll-Grenzfläche erhalten worden waren, wurden in 10 T-185-Kolben mit einem Gehalt an 30 ml komplettem Medium und 10×10^6 Zellen/Kolben gebracht.

[0089] An den Züchtungstagen 2, 6 und 9 wurde das Medium in den Kolben vollständig durch frisches Kompletmedium ersetzt. Am Tag 12 wurden Photographien der primären Kultur aufgenommen. Die Zellen wurden von der Passage 0 (PO) zur Passage 1 (P1) entnommen. Das Medium wurde abgesaugt und die Kolben wurden 2-mal mit 8 ml DPBS gewaschen. 8 ml Trypsin wurden zugegeben und die Kolben wurden 3 Minuten in einen Inkubator von 37 °C gebracht. Nachdem die Zellen nach oben gekommen waren, wurde die Umsetzung durch Zugabe von 8 ml Kompletmedium gestoppt. Die Zellen wurden in 50 ml fassende, konisch zulaufende Röhrchen gebracht und vereinigt. Die Kolben wurden mit DPBS gewaschen und die vereinigten Zellen wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 000 U/min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurden die Zellpellets in Kompletmedium resuspendiert. Die Zellen wurden vereinigt, gezählt und auf Lebensfähigkeit geprüft. Sodann wurden die Zellen in 15 T80-Kolben mit einem Gehalt an 18 ml Kompletmedium und $0,4 \times 10^6$ Zellen pro Kolben ausgestrichen. Am 15. Züchtungstag wurde die erste Transduktion an 15 der 18 Kolben vorgenommen. Das Medium wurde entfernt. Aliquotmengen des retroviralen Überstands wurden aufgetaut und mit Polybrene in einer Endkonzentration von 8 µg/ml versetzt, um den Transduktionscocktail herzustellen. Das Zellmedium wurde mit 10 ml des Transduktionscocktails ersetzt und die Kolben wurden 1 Stunde bei 32 °C mit 3 000 U/min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 10 ml Kom-

pletmedium, das unter Verwendung von hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum (FBS) hergestellt worden war, in jeden Kolben (mit dem Transduktionscocktail) gegeben. Sodann wurden die Kolben in den Inkubator zurückgebracht. Bei 3 Kolben wurde keine Transduktion durchgeführt, sondern nur das Medium durch frisches Medium ersetzt. Am 16. Züchtungstag wurde das Medium durch frisches Komplettmedium ersetzt. Am 17. Züchtungstag wurde das Transduktionsverfahren wiederholt.

[0090] Am 18. Züchtungstag wurden die Zellen auf die vorstehend beschriebene Weise geerntet und von P1 auf P2 entnommen. 3×10^6 Zellen wurden zu 100 ml Komplettmedium gegeben und in Dreifachkolben (Triple-flasks) (500 cm^2) gegossen. 15 Dreifachkolben wurden mit transduzierten Zellen und 3 mit nicht-transduzierten Zellen zubereitet. Verbleibende Zellen wurden kryokonserviert. Eine gefrorene Lösung wurde mit einem Gehalt an 10 % DMSO und 90 % FBS hergestellt. 10×10^6 Zellen wurden in 1 ml Gefrierlösung resuspendiert. Die Fläschchen wurden markiert und in einem Nalgene-Kryobehälter mindestens 4 Stunden bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ kryokonserviert und sodann bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

[0091] Am 22. Tag der P2-Kultur wurden photographische Aufnahmen gemacht, um die Zellverteilung und die Morphologie festzuhalten. Die P2-Zellen wurden geerntet und auf die vorstehend angegebene Weise kryokonserviert.

CAN-07-03 und CAN-07-04

[0092] Die gewaschenen, mononuklearen Zellen, die an der Percoll-Grenzfläche erhalten worden waren, wurden in 15 T-75-Kolben mit einem Gehalt an 20 ml Komplettmedium und 12×10^6 Zellen/Kolben gebracht.

[0093] Am 2. Züchtungstag wurde das Medium in den Kolben und in den Schalen vollständig durch frisches Komplettmedium ersetzt. Am 6. Tag der Primärkultur für cMSC wurde die erste Transduktion auf die vorstehend angegebene Weise durchgeführt. 3 Kolben wurden keiner Transduktion unterzogen, sondern nur am 6. Tag einem Austausch mit frischem Medium unterzogen. Am 7. Züchtungstag wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt.

[0094] Am 8. Züchtungstag wurde das Transduktionsverfahren wiederholt. Am 9. Züchtungstag wurden photographische Aufnahmen gemacht. Die Zellen wurden auf die vorstehend angegebene Weise von P0 auf P1 passagiert. 3×10^6 Zellen wurden zu 100 ml Komplettmedium gegeben und in Dreifachkolben gegossen. 15 Dreifachkolben wurden mit transduzierten Zellen und 3 mit nicht-transduzierten Zellen vorbereitet.

[0095] Die 15 ml Knochenmarkspirat ergaben 910, 1212, 856 bzw. 1948×10^6 nukleisierte Zellen für die Spender CAN-07-01, CAN-07-02, CAN-07-03 bzw. CAN-07-04. Die Zählergebnisse der mononuklearen Zellen an der Percoll-Grenzfläche betragen 612, 666, 588 und 462×10^6 , was Ausbeuten von 67,2, 55, 68,7 bzw. 23,7 % entspricht. Bei P1 betrug die Lebensfähigkeit der Zellen durchschnittlich 97,1 (Bereich von 93,3 bis 100) %. Bei P2-Zellen betrug für die Spender CAN-07-01 und CAN-07-02 und bei P1-Zellen für die Spender CAN-07-03 und CAN-07-04 die Lebensfähigkeit der transduzierten Zellen durchschnittlich 96,7 (Bereich 96,3 bis 97,9) %. Die nicht-transduzierten Zellen waren zu 95,4 (Bereich 93,3 bis 96,9) % lebensfähig. Nach der Ernte für die Kryokonservierung der cMSC betrug die Lebensfähigkeit der transduzierten Zellen durchschnittlich 99,4 (Bereich 97,4 bis 100) % und die nicht-transduzierten Zellen waren zu 99,4 (Bereich 97,6 bis 100) % lebensfähig (Tabelle 4).

[0096] Die Ausbeute an transduzierten cMSCs pro Kolben betrug für die Spender CAN-07-01 und CAN-07-02 bei Ernte nach 4 Tagen im Anschluss an Passage 2 und bei Ausstreichen mit 3×10^6 pro Kolben 5,9 bzw. $6,7 \times 10^6$. Die Ausbeute an nicht transduzierten cMSCs pro Kolben betrug 8,4 bzw. $7,5 \times 10^6$. Die Ausbeute an transduzierten cMSCs pro Kolben betrug für die Spender CAN-07-03 und CAN-07-04 bei Ernte 4 Tage nach Passage 1 (unterschiedliche Transduktions- und Passagekonzeption) und bei Ausstreichen mit 3×10^6 pro Kolben 20,0 bzw. $14,0 \times 10^6$ und die Ausbeute an nicht-transduzierten cMSCs pro Kolben betrug 25,3 bzw. $18,0 \times 10^6$.

CFU-Tests an cMSCs von P0-Kulturen

[0097] CFU-Kolonientests wurden zum Zeitpunkt der Durchführung der Primärkultur durch Ausstreichen von $0,5 \times 10^6$ Zellen als Dreifachversuch in 100 mm-Schalen mit einem Gehalt an 10 ml Komplettmedium vorgenommen. Die Schalen wurden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert. Das Medium wurde alle 2 bis 4 Tage durch frisches Medium ersetzt. Am 10. Züchtungstag wurden die CFU-Testschalen 2-mal mit HBSS gespült, 15 Minuten mit 1 % Glutaraldehyd fixiert, 2-mal mit HBSS gespült und an der Luft getrocknet. Die cMSCs in den Schalen wurden sodann mit 0,1 % Kristallviolett gefärbt, 3-mal mit entionisiertem Wasser gespült und an der Luft getrocknet. Die Kolonien wurden gezählt, um die Anzahl der sich bildenden Kolonien pro 10^6 ausgestrichenen Zellen zu berechnen.

[0098] CFU-Tests, die am Tag der mononuklearen Zellisolierung und der Kulturerstellung ausgestrichen und am 10. Tag geerntet worden waren, ergaben 56, 46,7, 114 bzw. 72 Kolonien pro 10^6 Zellen für die Hunde CAN-07-01, CAN-07-02, CAN-07-03 bzw. CAN-07-04.

[0099] Am 13. Tag der P1-Kultur wurden photographische Aufnahmen gemacht, um die Zellverteilung und Morphologie festzuhalten. Die P1-Zellen wurden gemäß den nachstehenden Angaben durch Trypsinierung geerntet und kryokonserviert.

[0100] Das Medium in den drei Kolben wurde dekantiert. Die Kolben wurden mit 50 ml DPBS gespült. Nach Dekantieren des DPBS wurden 23 ml 0,25 % Trypsin zu jedem der drei Kolben gegeben. Die Kolben wurden 3 Minuten in einen Inkubator von 37 °C gestellt. Nach Ablösen der Zellen wurden 23 ml Komplettmedium in jeden Kolben gegeben. Die Zellsuspensionen wurden sodann in 50 ml fassende, konisch zulaufende Röhrchen übertragen und die Kolben wurden mit 30 ml HBSS gespült. Sodann wurden die Röhrchen 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 200 U/min zentrifugiert. Die Pellets, die die transduzierten bzw. nicht-transduzierten Zellen enthielten, wurden vereinigt und ausgezählt. Ein Aliquotanteil von 1×10^7 Zellen wurde zur Bestimmung des prozentualen Transduktionsanteils durch einen anti-EGFP-DNA-PCR-ELISA-Test beiseite gestellt.

[0101] Nach der Ernte wurden die gewonnenen P1- oder P2-transduzierten und in Kultur expandierten cMSCs 5 Minuten mit 1300 U/min zentrifugiert und in 1 ml-Aliquotanteilen mit 1×10^7 cMSC/ml in eiskalter Kryoschutzlösung mit einem Gehalt an 85 % Plasma-Lyte A (Baxter IV Therapy), 10 % DMSO und 5 % autologem Hundeserum resuspendiert. Zell-Aliquotanteile wurden auf getrennte Kryofläschchen mit einem Gehalt an jeweils 1 ml aufgeteilt. Die Röhrchen wurden mit der Nummer des Hundespenders und der Gesamtzahl an lebensfähigen Zellen beschriftet. Die cMSCs wurden kryokonserviert, indem man die Zellfläschchen in einen Nalgene-Gefrierbehälter brachte und 4 Stunden in einen Gefrierschrank mit -70 °C stellte. Sodann wurden sie entnommen und bei -70 °C gelagert.

[0102] Bei der Zellernte für die Kryokonservierung des Produkts wurden Aliquotanteile von 1×10^7 Zellen zur Bestimmung des Transduktionswirkungsgrads gewonnen. Der Transduktionswirkungsgrad wurde durch einen anti-EGFP-DNA-PCR-ELISA-Test unter Einbau von Digoxigenin in das Produkt und in einer zweiten Stufe durch einen kolorimetrischen anti-Digoxigenin-Test analysiert.

CMSC-Infusionsprodukt

[0103] 1 bis 2 Stunden vor der Infusion wurden die Fläschchen mit cMSC durch Aufwirbeln in einem Wasserbad von 37 °C aufgetaut, mit 70 % Ethanol besprüht und in einem Sicherheitsraum für biologische Zwecke geöffnet. Das cMSC-Produkt wurde in 50 ml Infusionsmedium mit einem Gehalt an DMEM-LG plus 30 % Serum, das für den Zellspender autolog war, suspendiert. Die Lebensfähigkeit des

cMSC-Produkts wurde durch Ausschluss von Trypan-Blau zur Bestimmung der tatsächlichen lebensfähigen Dosis festgestellt. Ein Aliquotanteil von jedem cMSC-Produkt wurde für eine aerobe und nicht-aerobe Züchtung mit Hefeisolat bereitgestellt. Die cMSCs wurden auf ihre Fähigkeit zur Haftung an Gewebekulturkunststoff und zur Proliferation in P2-Kultur (P3 für CAN-07-01 und CAN-07-02) bewertet. Aliquotanteile von 1×10^6 und $0,16 \times 10^6$ cMSC wurden in komplettes Hunde-Züchtungsmedium in einem Dreifachversuch in T-25-Kunststoffkulturkolben ausgestrichen. Nach 24 Stunden wurden die mit 1×10^6 cMSC ausgestrichenen Kolben und am 3. Tag die mit $0,16 \times 10^6$ cMSC ausgestrichenen Kolben durch Trypsinierung geerntet und ausgezählt.

[0104] Im Anschluss an TBI wurde die cMSC-Suspension über einen in die Hirnvene eingeführten Katheter unter Verwendung eines Harvard Bard Mini-Handinfusionsgeräts infundiert, um innerhalb von 15 bis 20 Minuten 50 ml abzugeben.

[0105] Mäßig hohe Dosen von 7,49, 7,35, 10,0 bzw. 10,0 (Mittelwert 8,7) $\times 10^6$ lebensfähigen cMSCs/kg wurden am Tag 0 den Hunden CAN-07-01, CAN-07-02, CAN-07-03 bzw. CAN-07-04 infundiert. Diese Dosen stellen eine 4- bis 10-fache Erhöhung gegenüber der typischen Dosis, die ein Patient erhalten würde, dar. Die gesamten infundierten lebensfähigen cMSCs lagen im Bereich von 67,7 bis 129 (Mittelwert 93,9) $\times 10^6$ cMSCs. Die Lebensfähigkeit der Zellen lag im Bereich von 92,1 bis 97,6 (Mittelwert 94,9), bestimmt durch Trypan-Blau-Ausschluss. CMSC-Infusionen wurden zwischen 71 und 146 (Mittelwert 110) Minuten nach TBI gegeben.

Blutentnahme nach der Infusion

[0106] Blutproben (2 ml) wurden vor (pre) und während der cMSC-Infusion 5 und 15 Minuten nach Infusionsbeginn sowie nach 1 und 2 Stunden und 1, 2, 3 und 4 Tagen entnommen. Zelllysate wurden unter Verwendung des Puregene^R (Gentra Systems, Inc.)-DNA-Isolationskits hergestellt und in einem anti-EGFP-DNA-PCR-ELISA-Test mit in das Produkt eingebautem Digoxigenin und in einer zweiten Stufe in einem kolorimetrischen anti-Digoxigenintest verwendet, um den Anteil an GFP-markierten cMSCs im Blutkreislauf nachzuweisen.

Ernte von Knochenmark und Transplantatinfusion

[0107] Als Transplantat zu verwendendes Knochenmark wurde vor TBI dem DLA-identischen Wurfge-nossen entnommen. Aspirate wurden aus jedem Humerus unter Verwendung einer Knochenmarknadel aus rostfreiem Stahl der Größe 11 mit einer 4-6 Zoll-Kugelspitze entnommen, wobei die Nadel an einem Polyvinylschlauch angeschlossen war, der aus einem Vakuumkolben mit einem Gehalt an 100 ml

Gewebekulturmedium 199 und 4 ml (4 000 U) Heparin kam. Das Knochenmark wurde durch ein Filter der Porengröße 300 und 200 µm gegeben und bei 4 °C in einem für die Übertragung bestimmten Behälter, der mit der Bezeichnung des Spenders und des Empfängers beschriftet war, bis zur späteren Infusion am gleichen Tag aufbewahrt. Die Gesamtzahl an nukleisierten Zellen des Knochenmarks (BM-TNC) wurde korrigiert, um etwaige nukleisierte Zellen auszuschließen, die im Volumen des peripheren Bluts, das während der Knochenmarkernte gewonnen wurde, vorhanden waren.

[0108] Die Gesamtzahl an nukleisierten Zellen (TNC) des Knochenmarks wurde korrigiert, um etwaige TNCs auszuschließen, die im Volumen des peripheren Bluts, das während der Knochenmarkernte erhalten wurde, vorhanden waren. Die korrigierten Knochenmarkdosen betragen 4,3, 3,5, 3,1 bzw. 2,0 (Mittelwert 3,2) $\times 10^8$ TNC/kg für die Hunde CAN-07-01, CAN-07-02, CAN-07-03 bzw. CAN-07-04. Die unkorrigierten Knochenmarkdosen betragen 5,6, 4,2, 4,5 bzw. 2,7 (Mittelwert 4,3) $\times 10^8$ TNC/kg.

[0109] 20 Minuten vor der Infusion wurde das Knochenmark bei Raumtemperatur aufbewahrt. 1 Stunde nach der cMSC-Infusion wurde das Knochenmark intravenös durch eine Schmetterlingsnadel, die in die Gehirnvene eingeführt war, intravenös infundiert, wobei man innerhalb von 1 bis 2 Minuten Druck auf den Beutel ausübte.

Unterstützende Versorgung

[0110] Am Tag -5 wurden 3-mal täglich orale Antibiotika (Neomycinsulfat und Polymyxinsulfat) verabreicht. Diese oralen Antibiotika wurden verabreicht, bis die absolute Zahl an Neutrophilen den Wert von 500/mm³ erreicht hatte. Am Tag 0 wurde das systemische Antibiotikum Baytril intravenös 2-mal täglich verabreicht. Die Verabreichung wurde fortgesetzt, bis die absolute Zahl an Neutrophilen übereinstimmend 1 000/mm³ erreicht hatte. Verlust an Flüssigkeit und Elektrolyt als Folge der vorübergehenden Strahlungstoxizität wurden durch 2-malige tägliche Verabreichung von 500 ml Ringer-Lösung ersetzt, bis die Tiere Futter und Wasser annahmen.

Differenz der Blutzellzahlen

[0111] Blutproben (2 ml) wurden aus der Jugularvene oder der Gehirnvene am Morgen der Knochenmarkabsaugung zur Isolierung von cMSCs sowie an den Tagen 0 bis 50 und anschließend 2-mal wöchentlich bis zum Ende der Studie entnommen. Das Blut wurde in einen Vakuumbehälter mit einem Gehalt an EDTA übertragen. Die Gesamtzahlen an weißen Blutkörperchen (WBC) und Blutplättchen pro mm³ wurden unter Verwendung eines Sysmex E2500-Ge-

räts gemessen. Die Zellzahldifferenzen wurden manuell nach Fixierung und Färbung mit Wright-Färbemittel bestimmt.

Nekropsie

[0112] Blutproben wurden für CBC, Chemie-23-Analyse und PCR-Bewertung entnommen. Die Hunde wurden mit Butorphanol unter anschließender Verabreichung eines Gemisches von Diazepam und Ketamin-hydrochlorid sediert. Nach der Sedierung wurden Biopsien und bilaterale Knochenmarkaspirate von den Humeri, Femora und Darmbeinkämmen gewonnen. Anschließend wurde eine Euthanasie mit einer Überdosis an dem Sedativum Natriumpentobarbital vorgenommen. Die Gruppe der Hunde mit einer Versuchsdauer von 50 Tagen (CAN-07-01 und CAN-07-02) wurde am 43. Tag der Studie getötet. Die Hunde mit einer Versuchsdauer von 100 Tagen (CAN-07-03 und CAN-07-04) wurden am 100. Tag der Studie getötet. Vollständige Gewebesätze wurden bei der Nekropsie der Tiere gewonnen.

[0113] Die Gewinnung von Geweben für die histologische Untersuchung schloss sich unmittelbar an. Ein Teil des Gewebesatzes wurde für eine anti-EGFP-DNA-PCR-ELISA-Analyse verwendet. Knochenmarkaspirate und Biopsien wurden für die anti-EGFP-DNA-PCR-ELISA-Analyse, für die Kulturexpansion für eine weitere PCR-Analyse und für CFU-Tests verwendet.

[0114] Die Gewebe wurden auf quadratische Stücke mit einer Kantenlänge von etwa 1 Zoll zugeschnitten und in getrennte, markierte, 50 ml fassende, konisch zulaufende Röhrchen, die mit 10 % neutralgepuffertem Formalin (pH-Wert 6,8-7,2) gefüllt waren, gebracht. Die Gewebe wurden in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Hematoxylin und Eosin gefärbt. Knochenmarkproben wurden mit Periodsäure-Schiff-Färbemittel gefärbt.

[0115] Vor der Nekropsie erhaltene Knochenmarkaspirate wurden in 15 ml fassenden, beschrifteten Röhrchen jeweils links und rechts von den Humeri, Femora und Darmbeinkämmen eines jeden Hundes gewonnen. Ein untergeordneter Satz von Gewebeproben wurde während der Nekropsie gewonnen und auf quadratische Stücke mit einer Kantenlänge von etwa 1/4 Zoll zugeschnitten, mit in PBS eingeweichter Gaze eingewickelt und getrennt in beschriftete, Reißverschlussbeutel gebracht. Die Knochenmarkaspirate wurden auf Eis gehalten.

Zubereitung von Knochenmarkaspiraten für den CFU-Test

[0116] Aliquotmengen der Knochenmarkaspirate von den linken und rechten Humeri, Femora und

Darmbeinkämmen der einzelnen Hunde, die für die PCR-Analyse entnommen worden waren, wurden in Aliquotanteilen auf getrennte 15 ml fassende, beschriftete Röhrchen verteilt. Die Knochenmarkproben wurden auf Eis gehalten.

CFU-Test an cMSCs für bei der Nekropsie erhaltenes Knochenmark

[0117] CFU-Kolonientests wurden an cMSC, die aus bei der Nekropsie erhaltenem Knochenmark gewonnen worden waren, durchgeführt, indem $0,5 \times 10^6$ Zellen in einem Dreifachversuch auf 100 mm-Schalen mit einem Gehalt an 10 ml Komplettmedium ausgestrichen wurden. Die Schalen wurden bei 37 °C und 5 CO₂ inkubiert. Das Medium wurde alle 2 bis 4 Tage durch frisches Medium ersetzt. Am 10. Züchtungstag wurden die CFU-Testschalen 2-mal mit HBSS gespült, 15 Minuten mit 1 % Glutaraldehyd fixiert, 2-mal mit HBSS gespült und an der Luft getrocknet. Die cMSCs in den Schalen wurden sodann mit 0,1 % Kristallviolett gefärbt, 3-mal mit entionisiertem Wasser gespült und an der Luft getrocknet. Die Kolonien wurden gezählt, um die Anzahl an Kolonien pro ausgestrichenen 10^6 Zellen zu berechnen.

Isolierung und Reinigung von DNA

[0118] DNA wurde von einem Teil eines jeden Gewebes isoliert. Das restliche Stück der Probe wurde kryokonserviert und in einem Gefrierschrank bei -70 °C aufbewahrt. DNA wurde isoliert, indem man die Proben in phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) brachte, Proteinase K-Lösung zusetzte und eine Inkubation bei 55 °C für 3 Stunden oder bis zur Auflösung des Gewebes durchführte. Anschließend wurden die Proben 60 Minuten bei 37 °C mit RNase behandelt. Sodann wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Protein wurde ausgefällt. Die Proben wurden zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde vorsichtig in 100 % Isopropanol gewonnen. Die Proben wurden vermischt und zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation der Röhrchen wurde der Überstand abgegossen. Man ließ die Pellets etwa 1 bis 6 Stunden trocknen. Die DNA wurde über Nacht bei Raumtemperatur hydratisiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt.

[0119] Periphere Blutproben und Knochenmarkproben wurden zunächst mit RBC-Lysislösung (Ammoniumchloridpuffer) lysiert. DNA wurde sodann aus den Lysaten auf die vorstehend beschriebene Weise isoliert. Die DNA wurde quantitativ durch Zugabe von 998 µl entionisiertem H₂O und 2 µl DNA aus der Probe in eine Küvette nach Verrühren bestimmt. Ein Spektrophotometer wurde zur Bestimmung der optischen Dichte (OD) verwendet. Der OD-Wert wurde bei 260 und 280 nm abgelesen. Die Konzentration an DNA wurde in µg/ml berechnet. Die DNA-Konzentra-

tion wurde unter Verwendung von entionisiertem Wasser auf 1 µg/ml eingestellt.

anti-EGFP-DNA-PCR-ELISA

[0120] Der bei diesen Studien herangezogene anti-EGFP-DNA-PCR-ELISA-Test erfasst infundierte cMSCs unter Verwendung von für GFP spezifischen Oligonucleotidprimern. Zur Analyse der Genexpression verwendeten wir die PCR-ELISA-Testpackung (DIG-Markierung/Nachweis) (Boehringer Mannheim). Kurz zusammengefasst, eine PCR wurde in Gegenwart von mit Digoxigenin markierten Nucleotiden zur Markierung des amplifizierten Produkts durchgeführt. Anschließend wurden 25 µl des PCR-Produkts denaturiert und in einer Lösung mit einer 5'-biotinylierten Oligonucleotidsonde bei 37 °C in einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte hybridisiert. Das gebundene Sonden-PCR-Produkt wurde durch ein anti-Digoxigenin-Peroxidase-Konjugat und unter Verwendung des kolorimetrischen Substrats 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-sulfonsäure) (ABTS) nachgewiesen. Titrationseichkurven wurden unter Verwendung von transfizierten Kontroll-cMSCs aufgestellt, um sich der Konzentration an DNA pro beim Test verwendeter DNA-Menge zu nähern. Durch eine erste Korrelation mit einem internen Standard für PCR der DLA-Klasse II-Genom-DNA und anschließende Korrelation der DNA-Konzentration mit Zelläquivalenten und unter der Annahme eines einzigen Retrovirus-Integrationsereignisses pro transduzierter Zelle lässt sich eine Schätzung für die Zellzahl erhalten.

[0121] Quantitative Messungen der DNA für GFP wurden in sämtlichen Knochenmarkbehältern/Biopsien aufgezeichnet.

Erholung der roten Blutkörperchen nach der Transplantation

[0122] Die durchschnittliche Anzahl an Tagen bis zum Schwellenwert (bei 3 aufeinanderfolgenden Werten) von Blutplättchen von 10 000/mm³ betrug 12,8 (Bereich 11-17), von 50 000/mm³ 19,8 (Bereich 16-25) und von 100 000/mm³ 23,0 (Bereich 20-27). Die durchschnittliche Anzahl an Tagen bis zu einem Schwellenwert (an 3 aufeinanderfolgenden Tagen) von absoluten neutrophilen Zellen von 500/mm³ betrug 9,3 (Bereich 8-11) und von 1 000/mm³ 10,5 (Bereich 9-13).

Knochenmark-Interimaspirate

[0123] Wenn sich die Blutplättchen übereinstimmend auf Werte von mehr als 50 000 pro mm³ erholt hatten, wurde aus dem Darmbeinkamm ein Knochenmark-Interimaspirat entnommen. Dieses Verfahren wurde am 27. Tag der Studie für CAN-07-01 und CAN-07-02 und am 29. Tag für CAN-07-03 und

CAN-07-04 durchgeführt.

Ergebnisse

[0124] Bei histopathologischer Bewertung sämtlicher Gewebe von CAN-07-01 und CAN-07-02, die am Tag 43 getötet worden waren, waren die Befunde für ektopisches Bindegewebe und für subakutes GVHD negativ.

[0125] Ein nachweisbares DNA-Signal konnte innerhalb von 1 Stunde der Infusion und wieder nach 2 Tagen festgestellt werden. Eine Probe konnte einer quantitativen Messung auf GFP-DNA 3 Tage nach der Infusion unterzogen werden. Der Zeitpunkt stimmt mit früheren Beobachtungen bei der autologen Hunde-Transplantationsstudie überein, bei dem das Signal nach 2 und 3 Tagen festgestellt wurde.

[0126] Die Nekropsiedaten nach 100 Tagen bei CAN-07-03 und CAN-07-04 für GFP⁺-Zellen ergab ein GFP-Signal (1 GFP⁺-Zelläquivalent pro 10 µg PCR-Einsatz-DNA) im Oberschenkel und Humerus von CAN-07-03 und im Humerus von CAN-07-04. Diese Ergebnisse zeigen, dass allogene MSCs das rasche Engraftment von hämatopoetischen Knochenmarkszellen unterstützen können. Kein Transfusionsträger war erforderlich. Es gab keine klinischen Anzeichen für GvHD. Die Erholung der Blutplättchen verlief rascher als bei früheren Kontrollen. Es gab Anzeichen für Chimerismus in stromalen Zellen nach allogener Transplantation. Die Option zur Transplantation von allogenen Gewebe unter Verwendung von allogenen MSCs erweitert den Bereich von Transplantationsmaterial, das bei klinischen Transplantationsvorgängen verwendbar ist.

Patentansprüche

1. Verwendung von allogenen mesenchymalen Stammzellen zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zum Behandeln oder Reparieren von beschädigtem mesenchymalen Gewebe in einem Patienten, wobei die allogenen mesenchymalen Stammzellen von einem menschlichen Spender erhalten wurden und wobei vor der Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung an einen Patienten kein MHC-Abgleichungsschritt von einem menschlichen Spender zu einem Patienten durchgeführt wird.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung zur Knochenerzeugung dient.

3. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung zum Verbessern eines hämatopoetischen Stammzellen- oder Vorläuferzellen-Engraftments in einem Individuum mit Bedarf dient.

4. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die al-

logenen menschlichen mesenchymalen Stammzellen zum Expressieren von aufgenommenem exogenem genetischen Material befähigt sind.

5. Verwendung von allogenen mesenchymalen Stammzellen gemäß Anspruch 1, wobei es sich bei dem mesenchymalen Gewebe um Bindegewebe handelt.

6. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die allogenen menschlichen mesenchymalen Stammzellen aus menschlichem Knochenmark gewonnen wurden und in einem Zellpräparat, das im Wesentlichen keine Blutzellen aufweist, formuliert werden.

7. Verwendung gemäß Anspruch 6, wobei das Zellpräparat zur Verabreichung in Verbindung mit einem Träger zur Zellpräparation formuliert ist.

8. Verwendung gemäß Anspruch 5, wobei die allogenen mesenchymalen Stammzellen zum Erzeugen von Knochenbildung befähigt sind.

9. Verwendung gemäß Anspruch 5, wobei es sich bei dem Bindegewebe um Knochen handelt.

10. Verwendung gemäß Anspruch 5, wobei es sich bei dem Bindegewebe um Knorpel handelt.

11. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei es sich bei dem mesenchymalen Gewebe um Skelettgewebe handelt.

12. Verwendung gemäß Anspruch 5, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zum Wachsen von Stroma dient.

13. Verwendung gemäß Anspruch 5, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zur systemischen Verabreichung formuliert ist.

14. Verwendung gemäß Anspruch 5, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zur intravenösen Verabreichung formuliert ist.

15. Verwendung gemäß Anspruch 5, wobei die allogenen menschlichen mesenchymalen Stammzellen aufgenommenes exogenes genetisches Material exprimieren.

16. Verwendung gemäß Anspruch 5, wobei es sich bei dem Gewebewuchs um ein hämatopoetisches Stammzellen- oder Vorläuferzellen-Engraftment handelt.

17. Verwendung gemäß Anspruch 16, wobei die allogenen menschlichen mesenchymalen Stammzellen aus menschlichem Knochenmark gewonnen wurden und in einem Zellpräparat, das im Wesentlichen keine Blutzellen aufweist, formuliert werden.

18. Verwendung gemäß Anspruch 17, wobei das Zellpräparat zur Verabreichung in Verbindung mit einem Träger zur Zellpräparation formuliert ist.

19. Verwendung gemäß Anspruch 16, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zur systemischen Verabreichung formuliert ist.

20. Verwendung gemäß Anspruch 16, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zur intravenösen Verabreichung formuliert ist.

21. Verwendung gemäß Anspruch 16, wobei die allogenen menschlichen mesenchymalen Stammzellen aufgenommenes exogenes genetisches Material exprimieren.

22. Verwendung gemäß Anspruch 4, wobei es sich bei dem beschädigten mesenchymalen Gewebe um eine degenerative Muskelerkrankung handelt.

23. Verwendung gemäß Anspruch 5, wobei es sich bei dem Bindegewebe um Muskel handelt.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

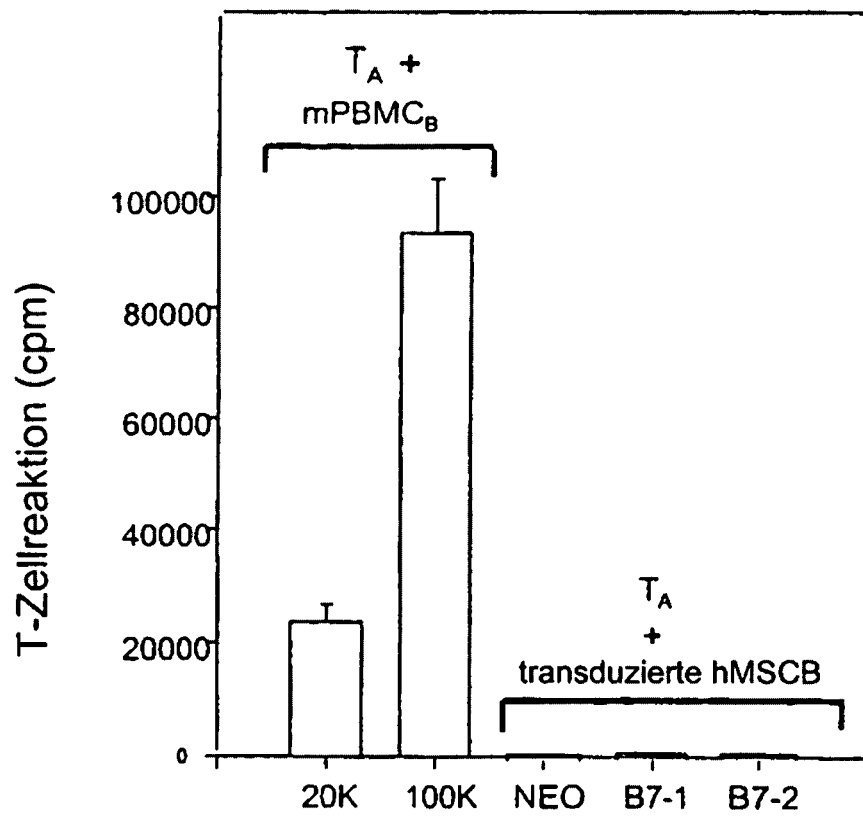


FIG. 2

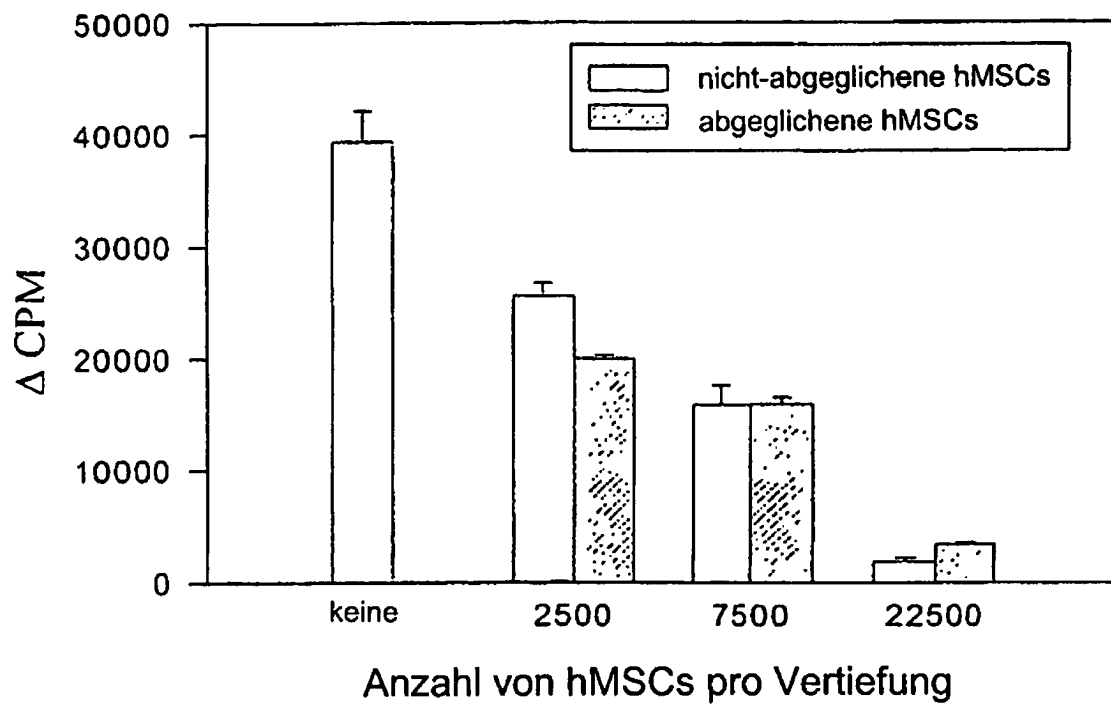


FIG. 3A

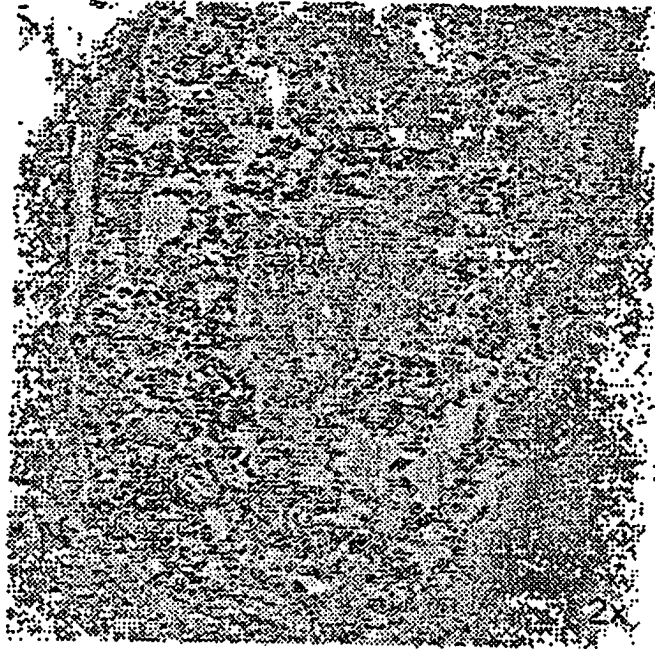
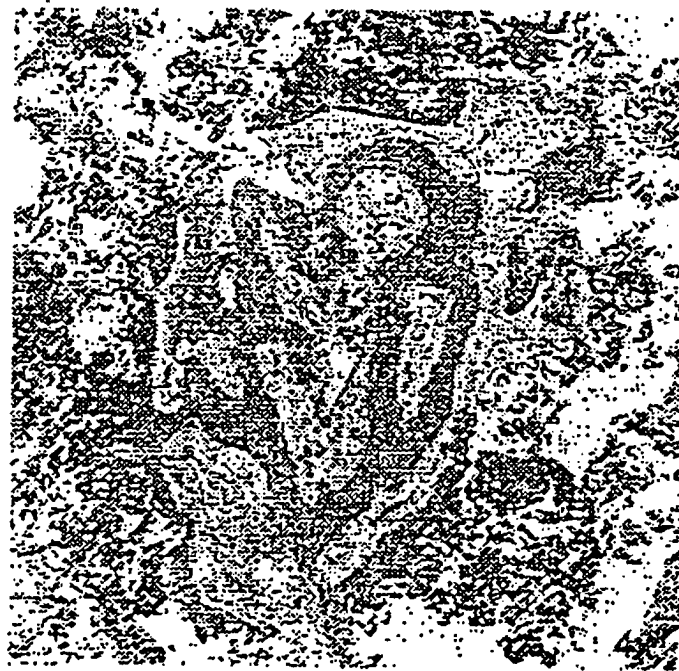


FIG. 3B



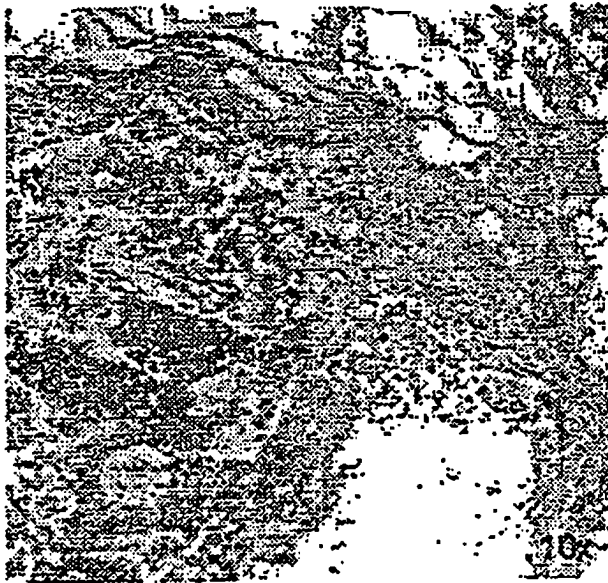


FIG. 3C



FIG. 3D



FIG. 3E

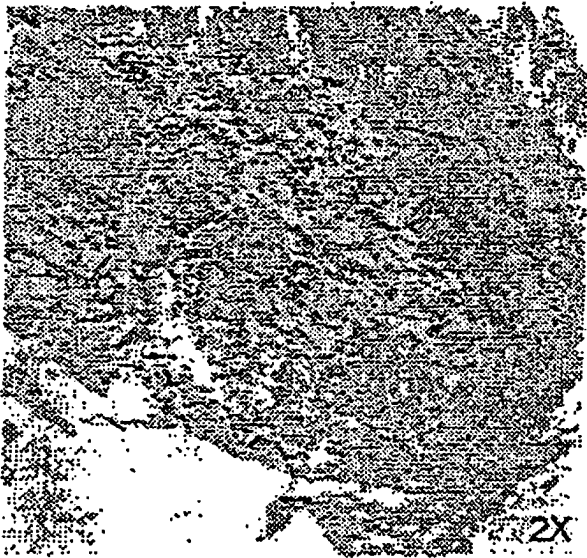


FIG. 4A

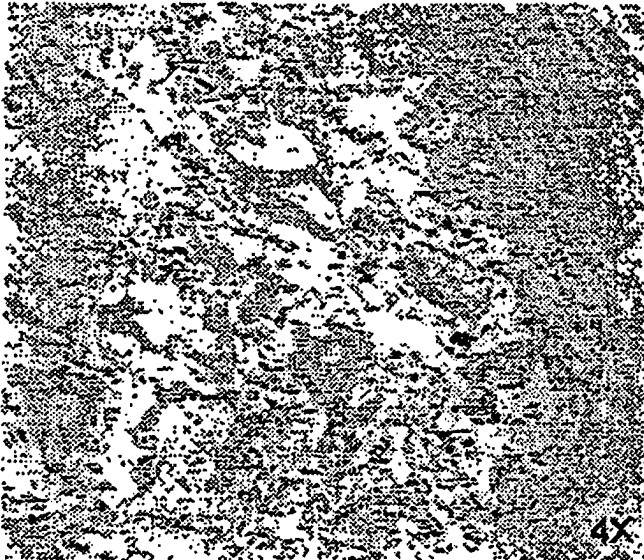


FIG. 4B



FIG. 4C

FIG. 4D



FIG. 4E



FIG. 5A

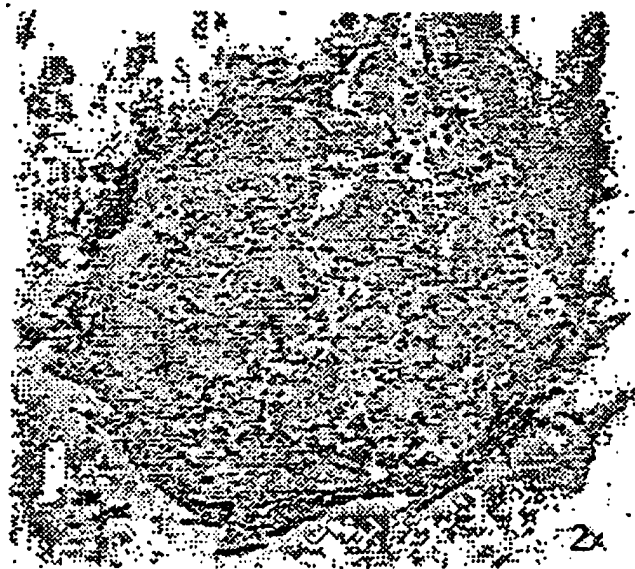


FIG. 5B



FIG. 5C

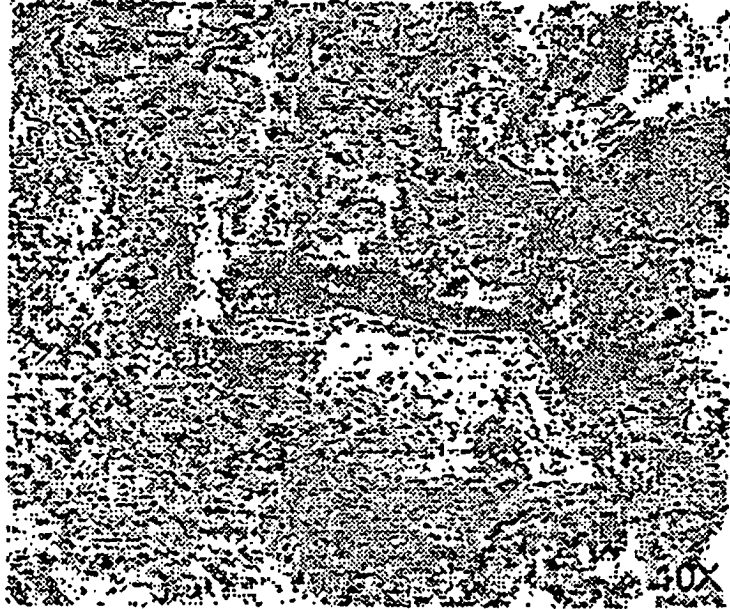


FIG. 5D



FIG. 6

