



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 29 681 T2 2006.10.26

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 066 052 B1

(51) Int Cl.⁸: A61K 39/00 (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 29 681.1

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/05548

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 913 876.1

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1999/047163

(86) PCT-Anmeldetag: 12.03.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 23.09.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 10.01.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 01.02.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 26.10.2006

(30) Unionspriorität:

78463 P 18.03.1998 US

89964 P 19.06.1998 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

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

(72) Erfinder:

McINTOSH, R., Kevin, Ellicott City, MD 21042, US;
MOSCA, D., Joseph, Ellicott City, MD 21042, US;
KLYUSHNENKOVA, N., Elena, Baltimore, MD
21236, US

(74) Vertreter:

LOUIS, PÖHLAU, LOHRENTZ, 90409 Nürnberg

(54) Bezeichnung: MESENCHYMALE STAMMZELLEN FÜR DIE PRÄVENTION UND BEHANDLUNG VON IMMUNANT-WORTEN BEI TRANSPLANTATIONEN

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Inhibieren einer T-Zell-Antwort auf ein Alloantigen und betrifft weiterhin das Inhibieren und/oder Verhindern der erneuten Aktivierung zuvor aktivierter T-Zellen. Spezifischer ausgedrückt, betrifft die vorliegende Erfindung das Gebiet des Verhinderns, Reduzierens oder Behandeln einer durch Immuneffektorzellen ausgelösten Immunantwort gegen fremde(s) Gewebe und/oder Zellen und/oder Organe. Die Erfindung betrifft weiterhin das Verhindern, Reduzieren oder Behandeln von Transplantatabstoßung und/oder Graft-versus-Host-Reaktion.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Toleranz ist das erworbene Fehlen spezifischer Antwortbereitschaft auf ein Antigen, auf das normalerweise eine Immunantwort erfolgen würde. Typischerweise muss zum Induzieren von Toleranz eine Exposition gegenüber einem Toleranz erzeugenden Antigen stattgefunden haben, die zum Tod oder einer funktionellen Inaktivierung bestimmter Lymphozyten führt. Vollständige Toleranz ist charakterisiert durch das Fehlen einer detektierbaren Immunantwort, entweder Antikörper- oder Zell-vermittelt, auf die zweite Antigen-Belastung. Partielle Toleranz ist durch die quantitative Verringerung einer Immunantwort gekennzeichnet.

[0003] Die Funktion des Immunsystems besteht darin, Fremdkörper zu eliminieren, die Pathogene enthalten könnten, und die Reaktionslosigkeit oder Toleranz gegenüber Selbstantigenen aufrecht zu erhalten. T-Zell-Toleranz wird erreicht 1) im Thymus, wo Thymuszellen, die für eigene Peptide reaktiv sind, durch klonale Deletion eliminiert werden (zentrale Toleranz) und 2) in der Peripherie durch Exposition gegenüber Selbstantigenen unter tolerant machenden Bedingungen (periphere Toleranz). Die klonale Deletion kann auch aus der Expression von Zelltodmolekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen resultieren. Klassische Beispiele für Zelltod-Moleküle sind Fas-Ligand (FasL) und TRAIL-Ligand, die mit ihren Rezeptoren, Fas bzw. DR4, auf aktivierten T-Zellen in Verbindung treten, wodurch die Apoptose der T-Zellen induziert wird. Die Interaktion von CD27, einem Mitglied der TNFR-Superfamilie, und CD27-Ligand (CD70) induziert ebenfalls T-Zell-Apoptose.

[0004] Unglücklicherweise unterscheidet das Immunsystem nicht zwischen nützlichen Eindringlingen, wie etwa transplantiertem Gewebe, und denen, die schädlich sind, und somit stößt das Immunsystem transplantierte Gewebe oder Organe ab. Die Abstoßung transplantieter Organe wird in signifikanter Weise durch alloreaktive T-Zellen vermittelt, die im Wirt vorhanden sind und die Donor-Alloantigene oder Xenoantigene erkennen.

[0005] Derzeit werden Patienten mit starken immunsuppressiven Arzneimitteln behandelt, um eine Immunantwort gegen ein Transplantat zu verhindern oder zu reduzieren. Das bei den Individuen erfolgende Infundieren von Arzneimitteln, die die T-Zellimmunantwort verhindern oder unterdrücken, hemmt die Transplantatabstoßung, kann jedoch auch zu einer allgemeinen Immunsuppression, Toxizität oder gar zum Tod durch opportunistische Infektionen führen. Aufgrund der Toxizität und der unvollständigen Reaktionsrate gegenüber der konventionellen Behandlung der Donorgewebeabstoßung werden alternative Ansätze benötigt, um Patienten zu behandeln, die auf die derzeitigen Ansätze der Arzneimitteltherapie nicht ansprechen oder diese nicht vertragen können.

[0006] Entsprechend gibt es einen Bedarf für die Verhinderung und/oder Reduzierung einer unerwünschten Immunantwort durch einen Wirt gegenüber einem Transplantat durch Immuneffektorzellen als ein Verfahren, um die Wirtsabstoßung des Donorgewebes abzuwenden. Ebenfalls vorteilhaft wäre ein Verfahren, um eine unerwünschte Immunantwort durch ein Donorgewebe gegen ein Empfängerwebe, bekannt als Graft-versus-Host-Krankheit, zu eliminieren oder zu reduzieren.

[0007] Die WO 97/41863 offenbart, dass Immuntoleranz gegenüber einem Transplantat in einem Empfänger-Säuger dadurch unterstützt werden kann, dass man hämatopoetische Stammzellen verabreicht.

[0008] Die US 5,486,359 offenbart die Isolierung, Reinigung und Kulturvermehrung humaner mesenchymaler Stammzellen, wodurch eine homogene Population mesenchymaler Stammzellen bereitgestellt wird.

[0009] Die WO 96/23058 offenbart, dass die Annahme von Knochenmarktransplantat bei einem Individuum durch die Verabreichung von mesenchymalen Stammzellen und Knochenmarktransplantat gefördert wird.

Zusammenfassung der Erfindung

[0010] Es ist entdeckt worden, dass humane mesenchymale Stammzellen bei Transplantationen verwendet werden können, um eine Antwort durch das Immunsystem derart zu verbessern, dass eine Immunantwort gegen (ein) Antigen(e) reduziert oder eliminiert wird.

[0011] Die Erfindung richtet sich auf ein ex vivo-Verfahren zum Reduzieren einer Immunantwort gegen ein Alloantigen gemäß Anspruch 1. Die Erfindung richtet sich weiterhin auf eine Verwendung gereinigter mesenchymaler Stammzellen für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung nach Anspruch

4. Die Erfindung richtet sich außerdem auf eine Verwendung mesenchymaler Stammzellen für die Herstellung einer Zubereitung nach Anspruch 29. Darüber hinaus richtet sich die Erfindung auf ein ex vivo-Verfahren zum Reduzieren einer durch ein Donor-Transplantat hervorgerufenen Immunantwort nach Anspruch 31.

[0012] Die Erfindung stellt ein ex vivo-Verfahren bereit, um eine durch T-Zellen in Reaktion auf ein Alloantigen verursachte Immunantwort zu reduzieren oder zu unterdrücken, insbesondere gegenüber einem allogenen Gewebe, Organ oder Zellen, wobei die Immunantwort durch die Verwendung mesenchymaler Stammzellen reduziert oder supprimiert wird. Die mesenchymalen Stammzellen können zu den T-Zellen autolog (vom selben Wirt erhalten) oder allogen zu diesen sein. Im Fall mesenchymaler Stammzellen, die zu den T-Zellen allogen sind, können die mesenchymalen Stammzellen autolog zu den Zellen oder dem Gewebe sein, auf das die T-Zellen reagieren (vom gleichen Wirt erhalten sein), oder die mesenchymalen Stammzellen können von einem Wirt erhalten werden, der sowohl gegenüber der Quelle der T-Zellen als auch gegenüber der Quelle der Zellen oder Gewebe, auf die die T-Zellen reagieren, allogen ist.

[0013] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein ex vivo-Verfahren bereitgestellt, um die erneute Stimulation aktivierter T-Zellen (aktiviert gegen ein Alloantigen, insbesondere ein allogenes Organ, Gewebe oder Zellen) zu verhindern, indem man aktivierte T-Zellen mit mesenchymalen Stammzellen in einer Menge in Kontakt bringt, die wirksam ist, eine nachfolgende T-Zell-Antwort auf ein fremdes Antigen zu verhindern und/oder zu reduzieren. Die mesenchymalen Stammzellen, die verwendet werden, können zu den T-Zellen autolog und/oder allogen sein. Wenn allogene mesenchymale Stammzellen verwendet werden, so können die mesenchymalen Stammzellen von demselben Wirt erhalten werden wie die Gewebe oder die Zellen, die die T-Zellen aktiviert haben, oder sie können von einem Wirt erhalten werden, der allogen ist sowohl gegenüber den T-Zellen als auch dem Wirt, der die Zellen oder Gewebe bereitgestellt hat, die die T-Zellen aktiviert haben.

[0014] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden mesenchymale Stammzellen für die Herstellung einer Zubereitung verwendet, um eine Immunantwort gegenüber einem Transplantat (Gewebe, Organ, Zellen, etc.) zu unterdrücken oder abzumildern, indem man dem Transplantatempfänger die Zubereitung mit den mesenchymalen Stammzellen in einer Menge verabreicht, die wirksam ist, eine Immunantwort gegen das Transplantat zu unterdrücken oder zu verbessern. Die mesenchymalen Stammzellen können für den Transplantat-

empfänger autolog oder allogen sein.

[0015] Dementsprechend stellt ein ex vivo-Verfahren der vorliegenden Erfindung das In-Kontakt-Bringen des Empfängers eines Donorgewebes mit mesenchymalen Stammzellen bereit. Bei einer Ausführungsform dieses Aspekts beinhaltet das Verfahren die Verwendung gereinigter mesenchymaler Stammzellen für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Verabreichung an den Empfänger von Donorgewebe. Die pharmazeutische Zubereitung mit den gereinigten mesenchymalen Stammzellen kann dem Empfänger vor, gleichzeitig mit oder nach dem Transplantat verabreicht werden. Die mesenchymalen Stammzellen können für den Empfänger autolog oder allogen sein und können von dem Donor erhalten werden. Bei einem weiteren Aspekt der Erfindung können die allogenen mesenchymalen Stammzellen auch von einer anderen Quelle als dem Donor erhalten werden, und eine solche Quelle muss weder an den Donor- noch an den Empfängertyp angepasst sein.

[0016] Bei einer weiteren Ausführungsform dieses Verfahrens werden als Teil einer Transplantationsprozedur die mesenchymalen Stammzellen modifiziert, um ein Molekül zu exprimieren, das Zelltod induziert. Die mesenchymalen Stammzellen können dafür verwendet werden, um dem Immunsystem ein Molekül zu liefern, das die Apoptose aktiver T-Zellen induziert, die einen Rezeptor für das Molekül tragen. Dies resultiert in der Deletion aktiver T-Lymphozyten und in der Suppression einer unerwünschten Immunantwort gegen ein Transplantat. In Übereinstimmung mit diesem Aspekt der Erfindung werden allogene humane mesenchymale Stammzellen modifiziert, um ein Zelltod-Molekül zu exprimieren. Das Molekül kann für die mesenchymalen Stammzellen exogen oder endogen sein. Bei bevorzugten Ausführungsformen der hier beschriebenen Verfahren exprimieren die mesenchymalen Stammzellen das Zelltod-Molekül Fas-Ligand oder TRAIL-Ligand.

[0017] Die mesenchymalen Stammzellen können auch in einer pharmazeutischen Zubereitung zur Verabreichung als Teil des Transplantats an den Empfänger verwendet werden. Zu diesem Zweck stellt die vorliegende Erfindung ein ex vivo-Verfahren bereit, um eine Immunantwort zu reduzieren oder zu verbessern, indem sie dem Empfänger ein Donorgewebe oder -Organ bereitstellt, das mit mesenchymalen Stammzellen perfundiert ist oder diese enthält, wobei die mesenchymalen Stammzellen vom Donor des Gewebes oder Organs erhalten werden oder mesenchymale Stammzellen einer dritten Partei sind oder mesenchymale Stammzellen sind, die zu den T-Zellen autolog sind. Die mesenchymalen Stammzellen mildern eine von den T-Zellen des Empfängers gegen das Fremdgewebe gerichtete Immunantwort, wenn dieses in den Empfänger transplantiert wird.

[0018] Bei einer weiteren Ausführungsform dieser Erfindung können die in das Organ oder Gewebe pertundierte mesenchymale Stammzellen auch ein Molekül beinhalten, das den Tod aktivierter T-Zellen induziert.

[0019] Bei einer weiteren Ausführungsform stellt das Verfahren der vorliegenden Erfindung die Verwendung gereinigter mesenchymaler Stammzellen zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Behandlung eines Patienten bereit, der ein Transplantat erhalten hat, um den Schweregrad einer Abstoßungsepisode gegen das Transplantat zu reduzieren oder diese zu eliminieren, indem dem Empfänger von Donorgewebe eine pharmazeutische Zusammensetzung mit gereinigten mesenchymalen Stammzellen verabreicht wird, nachdem das Donorgewebe in den Empfänger transplantiert wurde. Die mesenchymalen Stammzellen können für den Empfänger autolog oder allogen sein. Die allogenen mesenchymalen Stammzellen können von dem Donor oder aus der Quelle einer dritten Partei erhalten werden. Die Präsentation mesenchymaler Stammzellen bei einem Empfänger, der eine nachteilige Immunantwort gegenüber einem Transplantat durchmacht, induziert fehlende Antwortbereitschaft bei T-Zellen gegenüber weiterer antigener Stimulation, wodurch eine nachteilige Antwort aktiver T-Zellen auf ein Donorgewebe oder Organ reduziert oder eliminiert wird.

[0020] Bei einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein ex vivo-Verfahren bereitgestellt, um eine Immunantwort durch ein Donorgewebe, ein Donororgan oder Donorzellen gegen einen Empfänger, d.h. eine Graft-versus-Host-Reaktion, zu reduzieren, umfassend das Behandeln des Donorgewebes, Donororgans oder der Donorzellen mit allogenen (für den Donor allogenen) mesenchymalen Stammzellen ex vivo, bevor die Transplantation des Gewebes, Organs oder der Zellen in den Empfänger erfolgt. Die mesenchymalen Stammzellen reduzieren die Antwortbereitschaft von T-Zellen in dem Transplantat, die nachfolgend gegen Antigen-präsentierende Zellen des Empfängers aktiviert werden könnten, sodass das Transplantat in den Körper des Empfängers (Wirt) eingeführt werden kann, ohne dass es zum Auftreten einer nachteiligen Antwort des Transplantats gegen den Wirt kommt bzw. so, dass diese reduziert wird. Somit kann das, was als „Graft-versus-Host-Krankheit“ bekannt ist, abgewehrt werden.

[0021] Bei einer bevorzugten Ausführungsform kann das Donor-Transplantat zunächst ex vivo Ge weben oder Zellen des Empfängers oder einer dritten Partei ausgesetzt werden, um die T-Zellen in dem Donor-Transplantat zu aktivieren. Das Donor-Transplantat wird dann mit mesenchymalen Stammzellen in Kontakt gebracht, die für den Donor autolog oder allogen sind. Dabei können die mesenchymalen

Stammzellen von dem Empfänger oder von einer dritten Partei stammen. Die mesenchymalen Stammzellen werden eine nachteilige sekundäre Immunantwort durch T-Zellen in dem Donor-Transplantat gegen antigenen Stimulation durch den Empfänger reduzieren oder inhibieren, wenn das Donortransplantat nachfolgend in den Empfänger eingesetzt wird.

[0022] Dementsprechend können die mesenchymalen Stammzellen z.B. vor der Transplantation von dem Empfänger erhalten werden. Die mesenchymalen Stammzellen können isoliert und gefroren gelagert werden, bis sie benötigt werden. Die mesenchymalen Stammzellen können auch in Kultur auf gewünschte Mengen vermehrt und gelagert werden, bis sie benötigt werden. Die gereinigten mesenchymalen Stammzellen werden dem Empfänger in einer pharmazeutischen Zubereitung in einer Menge verabreicht, die wirksam ist, um eine vom Donor-Transplantat gegen den Empfänger (Wirt) verursachte ablaufende nachteilige Immunantwort zu reduzieren oder zu eliminieren. Die Präsentation der mesenchymalen Stammzellen gegenüber dem Empfänger, der eine vom Transplantat verursachte negative Immunantwort durchmacht, inhibiert die ablaufende Antwort und verhindert die erneute Stimulation der T-Zellen, wodurch eine nachteilige Antwort durch aktivierte T-Zellen gegen Empfängergewebe reduziert oder eliminiert wird.

[0023] Eine weitere Ausführungsform beinhaltet das Modifizieren der mesenchymalen Stammzellen des Empfängers mit einem Molekül, das den Tod aktiver T-Zellen induziert.

[0024] Somit werden in Übereinstimmung mit bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung humane mesenchymale Stammzellen verwendet, um Transplantatabstoßung und/oder Graft-versus-Host-Krankheit als Ergebnis eines Transplantats zu behandeln, und/oder um die Transplantatabstoßung und/oder Graft-versus-Host-Krankheit zu verhindern oder zu reduzieren. Humane mesenchymale Stammzellen können auch verwendet werden, um die Verwendung von xenogenen Transplantaten bzw. „Grafts“ zu erleichtern.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0025] Fig. 1. Allogene mesenchymale Stammzellen induzieren keine Immunantwort. T-Zellen von A proliferierten in einer Dosis-abhängigen Weise, wenn sie mit verschiedenen Mengen an PBMCs von B gemischt wurden. T-Zellen von A zeigten keine Proliferation in Antwort auf den Kontakt mit mesenchymalen Stammzellen von B, selbst wenn die mesenchymalen Stammzellen manipuliert wurden, um eine volle T-Zell-Aktivierung bereitzustellen (die mesenchymalen Stammzellen wurden mit IFN-γ behandelt und mit den co-stimulierenden Molekülen B7-1 oder B7-2

transduziert).

[0026] [Fig. 2](#). Mesenchymale Stammzellen unterdrückten aktiv die „Reaktion gemischter Lymphozyten“ (MLR) zwischen Lymphozyten zweier verschiedener Individuen. hMSCs, die allogen für einen Empfänger sind (dritte Partei oder Donor), waren bei der MLR entweder sowohl zu den Stimulator- als auch zu den Antwortgeber-Zellen nicht passend (offene Balken) oder die hMSCs waren passend zu den Stimulator-Zellen in der MLR (Donor) ausgewählt (schraffierte Balken). Somit supprimierten die mesenchymalen Stammzellen die MLR ohne Spezifität im Bezug auf den MHC-Typ. Die mesenchymalen Stammzellen supprimierten die MLR in einer dosisabhängigen Weise.

[0027] [Fig. 3](#) zeigt die sekundäre Antwort von Responder-T-Zellen (Antwort-gebende T-Zellen), die durch Stimulator-PBMCs (allogen) instruiert wurden, keiner Exposition gegenüber MSCs ausgesetzt waren, und dann autologen PBMCs, allogenen PBMCs (Stimulator oder dritte Partei) oder keinen Zellen ausgesetzt wurden.

[0028] [Fig. 4](#) zeigt die sekundäre Antwort von Responder-T-Zellen, die durch Stimulator-PBMCs (allogen) aktiviert wurden, nachfolgend mit allogenen MSCs (Stimulator) kultiviert wurden und dann autologen PBMCs, allogenen PBMCs (Stimulator oder dritte Partei) oder keinen Zellen ausgesetzt wurden.

[0029] [Fig. 5 \(Fig. 5A–Fig. 5D\)](#) zeigt, dass die sekundäre Antwort von Responder-T-Zellen supprimiert wurde, wenn diese zuvor durch allogene Stimulator-PBMCs aktiviert wurden, nach der Aktivierung mit allogenen MSCs (gleicher Donor ([Fig. 5B](#)) oder dritte Partei ([Fig. 5D](#))) oder mit autologen MSCs ([Fig. 5C](#)) kultiviert und dann autologen oder allogenen (gleicher Donor oder dritte Partei) Stimulatorzellen ausgesetzt wurden.

[0030] [Fig. 6 \(Fig. 6A–Fig. 6D\)](#) zeigt die Suppression einer primären MLR im Hundemodell durch MSCs. autol = autolog; ident = DLA-identische Geschwistertiere; unrel = nicht verwandt.

[0031] [Fig. 7](#) zeigt die Suppression einer primären MLR durch nicht-anhaftende MSCs.

[0032] [Fig. 8](#) zeigt eine schematische Karte des EGFP pOT24-Plasmids, das in Beispiel 8 verwendet wird.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0033] Wie hier definiert, wird eine allogene mesenchymale Stammzelle von einem anderen Individuum derselben Spezies wie der Empfänger erhalten. „Donor-Antigen“ bezieht sich auf Antigene, die durch das

in den Empfänger zu transplantierende Donorgewebe exprimiert werden. Alloantigene sind Antigene, die sich von den vom Empfänger exprimierten Antigenen unterscheiden. Donorgewebe, Donororgane oder Donorzellen stellen das zu transplantierende Transplantat. Als Beispiele für Transplantate können Haut, Knochenmark und solide Organe, wie etwa Herz, Pankreas, Niere, Lunge und Leber einbezogen werden.

[0034] Die Erfinder haben entdeckt, dass allogene T-Zellen (T-Lymphozyten) nicht proliferieren, wenn diese *in vitro* mit humanen mesenchymalen Stammzellen in Kontakt gebracht werden. Normalerweise resultiert das Co-Kultivieren von Zellen aus verschiedenen Individuen in einer T-Zell-Antwort, manifestiert durch die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen, bekannt als gemischte Lymphozyten-Reaktion (MLR).

[0035] Diese unerwarteten Ergebnisse zeigen, dass T-Zellen auf nicht passende mesenchymale Stammzellen nicht reagieren. Das Fehlen einer proliferativen Antwort allogener T-Zellen auf humane mesenchymale Stammzellen war unerwartet, da humane mesenchymale Stammzellen Oberflächenmoleküle exprimieren, die sie immunogen machen sollten, d.h. sie exprimieren allogene Klasse I MHC-Moleküle. Diese Entdeckung zeigt, dass die mesenchymalen Stammzellen für das Immunsystem nicht immunogen sind.

[0036] Die Erfinder haben auch entdeckt, dass mesenchymale Stammzellen eine MLR zwischen allogenen Zellen supprimieren können. Mesenchymale Stammzellen reduzierten aktiv die allogene T-Zell-Antwort bei gemischten Lymphozytenreaktionen in einer dosisabhängigen Weise. Zusätzlich zeigten mesenchymale Stammzellen von verschiedenen Spendern keine Spezifität oder reduzierte Antwort im Hinblick auf den MHC-Typ. Somit ist es nicht erforderlich, dass die mesenchymalen Stammzellen im Hinblick auf den MHC passend zur Zielzellpopulation bei der gemischten Lymphozytenreaktion sind, um die proliferative Antwort der alloreaktiven T-Zellen gegenüber mesenchymalen Stammzellen zu reduzieren.

[0037] Demzufolge stellt die vorliegende Erfindung eine Verwendung gereinigter mesenchymaler Stammzellen für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zum Reduzieren, Inhibieren oder Eliminieren einer Immunantwort durch Verabreichung allogener mesenchymaler Stammzellen an den Empfänger eines Donorgewebes, Donororgans oder von Donorzellen bereit. Bei einer Ausführungsform werden die mesenchymalen Stammzellen dem Empfänger gleichzeitig mit dem Transplantat verabreicht. Alternativ können die humanen mesenchymalen Stammzellen vor der Verabreichung des Trans-

plantats appliziert werden. Beispielsweise können die humanen mesenchymalen Stammzellen dem Empfänger etwa 3 bis 7 Tage vor der Transplantation des Donorgewebes verabreicht werden.

[0038] Somit können mesenchymale Stammzellen für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zum Konditionieren des Immunsystems eines Empfängers gegenüber Donor- oder Fremdgewebe verwendet werden, indem man dem Empfänger vor oder zur gleichen Zeit mit der Transplantation des Donorgewebes mesenchymale Stammzellen in einer Menge verabreicht, die wirksam ist, um eine von den Empfänger-T-Zellen ausgelöste Immunantwort gegen das Transplantat zu reduzieren oder zu eliminieren. Die mesenchymalen Stammzellen beeinflussen die T-Zellen des Empfängers derart, dass die T-Zell-Antwort reduziert oder eliminiert wird, wenn eine Präsentation gegenüber Donor- oder Fremdgewebe erfolgt. Somit kann die Wirtsabstoßung des Transplantats vermieden oder deren Schweregrad reduziert werden.

[0039] Die Erfinder haben weiterhin entdeckt, dass, wenn T-Lymphozyten, die bereits einer antigenen Stimulation ausgesetzt, d.h. aktiviert wurden, nachfolgend mesenchymale Stammzellen ausgesetzt werden, die T-Zellen keine oder eine reduzierte Immunantwort auf die nachfolgende antigene Stimulation durch allogene Zellen erzeugen. Somit induzieren mesenchymale Stammzellen einen Zustand der herabgesetzten Antwortbereitschaft bei den T-Zellen.

[0040] Diese unerwarteten Ergebnisse zeigen, dass aktivierte T-Zellen durch die Exposition prä-aktivierter T-Zellen gegenüber humanen mesenchymalen Stammzellen gegenüber weiterer allogener Stimulation antwortlos gemacht wurden. Die mesenchymalen Stammzellen können für die T-Zellen autolog oder allogen sein.

[0041] Dementsprechend stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung gereinigter mesenchymaler Stammzellen für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Behandlung eines Patienten, der eine schädliche Immunantwort gegen ein Transplantat durchmacht, bereit, indem man einem solchen Patienten mesenchymale Stammzellen in einer Menge verabreicht, die wirksam ist, um die Immunantwort zu reduzieren oder zu unterdrücken. Die mesenchymalen Stammzellen werden von dem GeWEBEDONOR, dem Transplantatempfänger oder einer dritten Partei erhalten.

[0042] Die mesenchymalen Stammzellen können weiter modifiziert werden, um ein Zelltod-Molekül zu exprimieren, um die Eliminierung aktiver T-Zellen zu steigern. Beispielsweise kann das Zelltod-Molekül durch die mesenchymalen Stammzellen exprimiert werden, die hergestellt wurden, um das exogene

Zelltod-Molekül zu exprimieren.

[0043] Bei einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein ex vivo-Verfahren bereit, um eine Immunantwort durch ein Donortransplantat gegen einen Empfänger hiervon (Graft-versus-Host) zu reduzieren oder zu inhibieren oder zu eliminieren.

[0044] Demzufolge stellt die Erfindung das Inkontaktbringen eines Donororgans oder -Gewebes mit mesenchymalen Stammzellen vor der Transplantation bereit. Die mesenchymalen Stammzellen verbessern, inhibieren oder reduzieren eine nachteilige Antwort durch das Donor-Transplantat gegen den Empfänger.

[0045] Bei einer bevorzugten Ausführungsform, vor der Transplantation, wird das Donor-Transplantat mit allogenem (Empfänger)-Gewebe oder -Zellen behandelt, die die T-Zellen in dem Donor-Transplantat aktivieren. Das Donor-Transplantat wird dann mit mesenchymalen Stammzellen (autolog oder allogen) behandelt, bevor die Transplantation stattfindet. Die mesenchymalen Stammzellen verhindern eine erneute Stimulierung oder Induzieren eine herabgesetzte Antwortbereitschaft der T-Zellen gegenüber nachfolgender antigener Stimulation.

[0046] Für die Prä-Konditionierung eines Donor-Transplantats können die mesenchymalen Stammzellen weiter modifiziert werden, um ein Zelltod-Molekül zu exprimieren, so dass aktivierte T-Zellen, die mit den mesenchymalen Stammzellen in Kontakt kommen, eliminiert werden.

[0047] Somit kann im Zusammenhang einer Transplantation von Knochenmark (hämatopoetischen Stammzellen) der Angriff des Wirts durch das Transplantat reduziert oder eliminiert werden. Das Donor-Knochenmark kann vor der Implantation von Knochenmark oder peripheren Blutzellen in den Empfänger mit mesenchymalen Stammzellen des Empfängers vorbehandelt werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird das Donor-Knochenmark zunächst Empfängergewebe bzw. Empfängerzellen ausgesetzt und dann mit mesenchymalen Stammzellen behandelt. Ohne diesbezüglich eingeschränkt zu sein, wird angenommen, dass der erste Kontakt mit Empfängergewebe oder Empfängerzellen die Funktion hat, die T-Zellen in dem Mark zu aktivieren. Die nachfolgende Behandlung mit den mesenchymalen Stammzellen inhibiert oder eliminiert eine weitere Aktivierung der T-Zellen in dem Mark, wodurch eine schädigende Wirkung durch das Donorgewebe reduziert oder eliminiert wird, d.h. die Therapie reduziert oder eliminiert eine Graft-versus-Host-Antwort.

[0048] Bei einer weiteren Ausführungsform kann ein Transplantatempfänger, der an der Graft-ver-

sus-Host-Krankheit leidet, behandelt werden, um den Schweregrad hiervon zu reduzieren oder zu eliminieren, indem man einem solchen Empfänger eine pharmazeutische Zubereitung mit gereinigten mesenchymalen Stammzellen verabreicht, die für den Donor autolog oder allogen sind, wobei die allogenen Zellen mesenchymale Stammzellen sein können, die für den Empfänger oder eine dritte Partei autolog sind, in einer Menge, die wirksam ist, eine Transplantatabstoßung in dem Wirt zu reduzieren oder zu eliminieren. Die mesenchymalen Stammzellen inhibieren oder unterdrücken die aktivierte T-Zellen in dem Donorgewebe dabei, eine Immunantwort gegen den Empfänger zu erzeugen, wodurch eine Graft-versus-Host-Antwort reduziert oder eliminiert wird.

[0049] Die mesenchymalen Stammzellen des Empfängers können vor der Transplantation von dem Empfänger erhalten werden und können gelagert und/oder in Kultur vermehrt werden, um eine Reserve an mesenchymalen Stammzellen in hinreichenden Mengen bereitzustellen, um einen ablaufenden Angriff des Transplantats gegen den Wirt zu behandeln.

[0050] Bei wiederum einem anderen Verfahren der vorliegenden Erfindung wird das Donorgewebe den mesenchymalen Stammzellen so ausgesetzt, dass sich die mesenchymalen Stammzellen in das Organtransplantat selbst integrieren, bevor die Transplantation stattfindet. In dieser Situation würde eine Immunantwort gegen das Transplantat, hervorgerufen durch irgendeine alloreaktive Empfängerzelle, die der Standardbehandlung zum Verhindern von Transplantatabstoßung, z.B. einer durch Arzneimittel vermittelten Immunsuppression, entgangen ist, durch die mesenchymalen Stammzellen, die in dem Transplantat vorliegen, unterdrückt werden. Die mesenchymalen Stammzellen sind bevorzugt allogen für den Empfänger und können mesenchymale Donor-Stammzellen oder mesenchymale Stammzellen sein, die aus einer anderen Quelle als dem Donor oder dem Empfänger erhalten wurden. In einigen Fällen können mesenchymale Stammzellen, die für den Empfänger autolog sind, verwendet werden, um eine Immunantwort gegen das Transplantat zu unterdrücken.

[0051] Bei einer weiteren Ausführungsform dieses Verfahrens werden die mesenchymalen Stammzellen so gestaltet, dass sie Zelltod-Moleküle exprimieren, sodass jedwede alloreaktive Wirts-T-Zelle beim Kontakt mit diesen mesenchymalen Stammzellen eliminiert werden wird.

[0052] Man nimmt weiter an, dass, zusätzlich zum Verhindern oder Verbessern einer anfänglichen Immunantwort, die mesenchymalen Stammzellen, die an der lokalen Stelle verbleiben, auch jede nachfolgende T-Zell-Antwort, die auftreten könnte, ebenfalls

supprimieren würden.

[0053] Wie hier verwendet ist ein „Zelltod-Molekül“ ein Molekül, das mit seinem zugehörigen Rezeptor an einer stimulierten T-Zelle interagiert oder an diesen bindet, wobei T-Zell-Tod oder Apoptose induziert werden. Fas vermittelt Apoptose bei jüngst aktivierten T-Zellen, die erneut einer Stimulation ausgesetzt wurden (van Parijs et al., *Immunity* 4: 321–328 (1996)). Fas ist ein Typ I-Membranrezeptor, der, wenn er durch seinen zugehörigen Liganden „vernetzt“ wird, Apoptose bei einer breiten Vielzahl von Zellen induziert. Die Interaktion zwischen dem Fas-Molekül (CD95) auf den Ziel-T-Zellen und seinem Liganden FasL auf mesenchymalen Stammzellen resultiert in einer Rezeptor-Aggregation, die Signale transduziert, die zur Apoptose der Zielzelle führen. Es ist für das Fas-System gezeigt worden, dass es an einer Anzahl von Zellfunktionen in vivo beteiligt ist, einschließlich der negativen Selektion von Thymuszellen, der Aufrechterhaltung immun-privilegieter Stellen im Körper und der zytotoxischen, von T-Lymphozyten (CTL)-vermittelten Zytotoxizität (Green und Ware, *Proc Natl Acad Sci*, 94(12).5986-90 (1997)).

[0054] Andere Mitglieder der Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)-Familie besitzen Rollen im programmierten Zelltod. TRAIL-Ligand, der mit seinem Rezeptor DR4 interagiert, kann Apoptose bei einer Vielzahl transformierter Zelllinien induzieren (G. Pan et al., *Science*, 277: 815–818 (1997)), und die Expression von CD27 und seinem Liganden CD70 (Prasad et al., *Proc Natl Acad Sci*, 94: 6346–6351 (1997)) induziert ebenfalls Apoptose. Die Expression von Fas ist auf stimuliert T-Zellen und Stellen mit Immunprivileg beschränkt. TRAIL wird in vielen normalen Geweben detektiert.

[0055] Sowohl TRAIL-Ligand als auch CD27, nicht jedoch Fas-Ligand, werden auf unmanipulierten humanen mesenchymalen Stammzellen exprimiert. Aktivierte, nicht jedoch ruhende T-Zellen, exprimieren den TRAIL-Rezeptor und CD70. Die meisten der im Körper befindlichen T-Zellen befinden sich im ruhenden Zustand; T-Zellen werden aktiviert, wenn sie Körperfzellen sowohl im Kontext von MHC als auch einem geeigneten co-stimulierenden Molekül, wie etwa B7-1 oder B7-2, begegnen.

[0056] Somit resultiert die Interaktion von Zelltod-Rezeptoren auf aktivierte T-Zellen mit ihren auf mesenchymalen Stammzellen exprimierten Liganden in T-Zell-Tod über Apoptose. Liganden und ihre Rezeptoren, auch andere als die oben spezifisch genannten, die entweder bei der mesenchymalen Stammzelle vorhanden sind oder in die mesenchymale Stammzelle eingeführt werden, können diese Funktion erfüllen. Daher beseitigen mesenchymale Stammzellen, die einem Individuum verabreicht wer-

den, aktivierte T-Zellen, reduzieren die Schwere oder das Auftreten der Transplantat-Abstoßungserkrankung.

[0057] In Übereinstimmung mit den hier beschriebenen Verfahren der vorliegenden Erfindung wird darüber nachgedacht, dass die mesenchymalen Stammzellen der vorliegenden Erfindung zusammen mit derzeitigen Behandlungsweisen von Donorgewebeabstoßung oder Graft-versus-Host-Erkrankung verwendet werden können. Ein Vorteil einer solchen Verwendung besteht darin, dass durch die Milderung des Schweregrades der Immunantwort bei einem Transplantatempfänger die Menge des bei der Behandlung verwendeten Arzneimittels und/oder die Häufigkeit der Verabreichung der Arzneimitteltherapie reduziert werden kann, was in einer Milderung der allgemeinen Immunsuppression und unerwünschter Nebenwirkungen resultiert.

[0058] Es wird weiterhin erwogen, dass nur eine einzige Behandlung mit den mesenchymalen Stammzellen der vorliegenden Erfindung notwendig sein kann, was die Notwendigkeit einer anhaltenden immunsuppressiven Arzneimitteltherapie beseitigt. Alternativ können mehrere Verabreichungen mesenchymaler Stammzellen verwendet werden.

[0059] Dementsprechend stellt die hier beschriebene Erfindung das Verhindern oder Behandeln von Transplantatabstoßung bereit, indem man die mesenchymalen Stammzellen in einer prophylaktisch oder therapeutisch wirksamen Menge zum Verhindern, Behandeln oder Mildern der Transplantatabstoßung eines Organs, Gewebes oder von Zellen derselben Spezies oder eines Xenotransplantat-Organs oder -Gewebetransplantats und/oder einer Graft-versus-Host-Krankheit verabreicht.

[0060] Die Verabreichung einer Einzeldosis mesenchymaler Stammzellen kann wirksam sein, um die T-Zellantwort gegenüber Gewebe, das zu den T-Zellen allogen ist bzw. gegenüber „Nicht-selbst“-Gewebe zu reduzieren oder zu eliminieren, insbesondere in dem Fall, bei dem die T-Lymphozyten ihren nicht-antwortbereiten Charakter (d.h. Toleranz oder Anergie) gegenüber allogenen Zellen beibehalten, nachdem sie von den mesenchymalen Stammzellen getrennt wurden.

[0061] Die Dosierung der mesenchymalen Stammzellen variiert innerhalb weiter Grenzen und wird natürlich in jedem speziellen Fall an die individuellen Erfordernisse angepasst werden. Im allgemeinen, im Fall einer parenteralen Verabreichung, ist es gebräuchlich, von etwa 0,01 bis etwa 5 Millionen Zellen pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers zu verabreichen. Die Anzahl der verwendeten Zellen wird vom Gewicht und dem Zustand des Empfängers, der Anzahl oder Häufigkeit der Verabreichun-

gen und anderen Variablen abhängen, die Fachleuten bekannt sind. Die mesenchymalen Stammzellen können über eine Route verabreicht werden, die für das/die zu transplantierende(n) Gewebe, Organ oder Zellen geeignet ist. Sie können systemisch, d.h. parenteral, durch intravenöse Injektion oder zielgerichtet auf ein bestimmtes Gewebe oder Organ, wie etwa Knochenmark, verabreicht werden. Die humanen mesenchymalen Stammzellen können über eine subkutane Implantation von Zellen oder durch Injektion von Stammzellen in Bindegewebe, z.B. Muskel, verabreicht werden.

[0062] Die Zellen können mit Konzentrationen von etwa 0,01 bis etwa 5×10^6 Zellen/ml in einem geeigneten Verdünnungsmittel suspendiert werden. Geeignete Arzneiträger für Injektionslösungen sind solche, die mit den Zellen und dem Empfänger biologisch und physiologisch kompatibel sind, wie etwa gepufferte Salinelösung oder andere geeignete Arzneiträger. Die Zusammensetzung für die Verabreichung muss gemäß Standardverfahren, die eine korrekte Sterilität und Stabilität einhalten, formuliert, produziert und gelagert werden.

[0063] Mesenchymale Stammzellen können isoliert werden, bevorzugt aus Knochenmark, gereinigt und in Kultur, d.h. in vitro vermehrt werden, um hinreichende Zahlen an Zellen für die Verwendung bei den hier beschriebenen Verfahren zu erhalten. Mesenchymale Stammzellen, die bildenden pluripotenten Vorläuferzellen, die sich im Knochen finden, sind im Knochenmark (1:100.000) und anderen mesenchymalen Geweben normalerweise in sehr geringer Häufigkeit vorhanden (siehe Caplan und Haynesworth, US-Patent Nr. 5,486,359). Die Gen-Transduktion mesenchymaler Stammzellen wird offenbart in Gerson et al., US-Patent Nr. 5,591,625.

[0064] Solange nicht anderweitig vermerkt, werden genetische Manipulationen durchgeführt wie beschrieben in Sambrook und Maniatis, „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, 2. Auflage; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

Beispiel 1

Fehlen der Alloreakтивität mesenchymaler Stammzellen

[0065] Die gemischte Lymphozytenreaktion misst die Kompatibilität der Oberflächenantigene des Donors und ist ein Indikator für die Wahrscheinlichkeit der Abstoßung von Donorgewebe. Zelloberflächenantigene, die für das Auslösen einer Transplantatabstoßung verantwortlich sind, sind die Klasse I und Klasse II MHC-Antigene. T-Zellen sind alloreaktiv gegenüber fremden MHC-Antigenen. Klasse I und II MHC-Moleküle stimulieren die gemischte Lympho-

zyten-Reaktion.

[0066] Normale freiwillige Testpersonen wurden einer Leukophorese auf einem COBE SPECTRA™ Apherese-System (COBE, Lakewood, CO) unterzogen. 1×10^5 T-Zellen von Individuum A (T_A) wurden in Flachboden-Mikrotiterwells mit Mitomycin C behandelten allogenen PBMCs (um die Proliferation der PBMCs zu T-Zellen zu verhindern) von Individuum B ($mPBMC_B$) für 7 Tage kultiviert. Die $mPBMC_B$ wurden bei 20K und 100K ausgesät. Die Kulturen erhielten einen Puls mit ^3H -Thymidin für die letzten 18 Stunden der Kulturphase, um die T-Zell-Proliferation zu messen. Die in [Fig. 1](#) dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die T_A -Zellen die $PBMC_B$ als fremd erkannten (siehe Balken unter „ $T_A + mPBMC_B$ “). Je mehr $PBMC_B$ s vorhanden waren, umso mehr proliferierten die T-Zellen.

[0067] 2×10^4 humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) von demselben Donor wie die PBMCs wurden mit 1×10^5 T-Zellen von Individuum A (T_A) co-inkubiert. Die Zellen wurden für eine Gesamtheit von 7 Tagen in Flachboden-Mikrotiterwells kultiviert. Die Kulturen erhielten einen Puls mit ^3H -Thymidin für die letzten 18 Stunden der Kulturphase, um die T-Zell-Proliferation zu messen. Zwei Tage vor der Co-Kultivierung mit den T-Zellen wurden die humanen mesenchymalen Stammzellen mit den oben angegebenen Zahlen (konfluent) in Mikrotiter-Wells ausgesät und mit IFN-γ (50 Units/ml) behandelt, um die Oberflächenantigen-Expression der MSCs zu stimulieren. Es wurden nicht-transduzierte hMSCs oder hMSCs, die mit den humanen Co-Stimulationsmolekülen B7-1 oder B7-2 transduziert worden waren, mit den T-Zellen inkubiert. Die Kontrollzellen wurden mit Neo transduziert.

[0068] Die in [Fig. 1](#) dargestellten Ergebnisse (siehe [Fig. 1](#) „ $T_A +$ transduzierte hMSCs“) zeigen, dass die T-Lymphozyten gegenüber den humanen mesenchymalen Stammzellen nicht antwortbereit waren (nicht proliferierten), d.h. diese wurden nicht als fremd erkannt.

[0069] Die Ergebnisse zeigen auch, dass das Fehlen einer Antwort auf die mesenchymalen Stammzellen nicht durch genetische Kompatibilität zwischen den Individuen bedingt war, da die T-Zellen periphere einkernige Blutzellen (PBMC_B) des hMSC-Donors als fremd erkannten.

Beispiel 2

Suppression der gemischten Lymphozyten-Reaktion

[0070] Um zu bestimmen, ob mesenchymale Stammzellen die allogene Antwort aktiv unterdrückten, wurden gemischte Lymphozytenreaktionen (MLR) in Gewebekulturplatten angesetzt, und zwar

mit oder ohne anhaftende mesenchymale Stammzellen, die von 2 verschiedenen Spendern erhalten wurden: ein Spender stimmte mit den Stimulatorzellen in der MLR überein, und der andere Spender war sowohl zu den Stimulator-Zellen als auch zu den Responder-Zellen (Antwort-gebenden Zellen) unverwandt.

[0071] 10^5 PBMCs von Individuum A ($PBMC_A$) wurden mit 10^5 PBMCs von Ziel-Individuum B ($PBMC_B$) gemischt. Die $PBMC_B$ s wurden mit 3000 rad Röntgen-Bestrahlung bestrahlt, um ihre Proliferation aufgrund einer Aktivierung durch die $PBMC_A$ s zu verhindern. Somit würden nur die $PBMC_A$ s proliferieren. Wenn die $PBMC_A$ s und die $PBMC_B$ s gemischt wurden, fand eine gemischte Lymphozytenreaktion statt, bei der die $PBMC_A$ -Zellen (Responder-Zellen) durch die Oberflächenantigene auf den $PBMC_B$ s (Stimulator-Zellen) aktiviert wurden. Die Kulturen wurden über eine Zeitspanne von 7 Tagen inkubiert und erhielten während der letzten 18 Stunden einen Puls von ^3H -Thymidin. In Gegenwart der $PBMC_B$ s proliferierten die $PBMC_A$ s und ergaben Zahlenwerte von 40.000 (siehe [Fig. 2](#), 1. Balken; „KEINE“ bezieht sich darauf, dass keine mesenchymalen Stammzellen vorliegen).

[0072] Wenn jedoch die $PBMC_A$ s und die $PBMC_B$ s in Gegenwart mesenchymaler Stammzellen gemischt wurden, so wurde die gemischte Lymphozytenreaktion unterdrückt. 10^5 $PBMC_A$ s wurden mit 10^5 $PBMC_B$ s in Mikrotiterplatten-Wells gemischt, die mit einer anhaftenden Einfachschicht (Monolayer) aus humanen mesenchymalen Stammzellen beschichtet waren. Die mesenchymalen Stammzellen waren in den Wells in Mengen ausplattiert worden, die von 7500 bis 22.500 mesenchymalen Stammzellen pro Well reichten. Es wurden zwei mesenchymale Stammzellpopulationen getestet: es wurden humanen mesenchymale Stammzellen von einem Individuum B erhalten, und es wurden humanen mesenchymale Stammzellen von einem Individuum erhalten, das weder mit dem MHC-Typ von Individuum A noch von Individuum B übereinstimmte (eine dritte Partei). Die Kulturen wurden über eine Zeitspanne von 7 Tagen inkubiert und wurden während der letzten 18 Stunden einem ^3H -Thymidinpuls unterzogen. In Gegenwart der humanen mesenchymalen Stammzellen wurde die MLR unterdrückt (siehe [Fig. 2](#)). Somit unterdrückten die mesenchymalen Stammzellen die gemischte Lymphozytenreaktion unabhängig von der MHC-Beschaffenheit der mesenchymalen Stammzellen.

[0073] Die in [Fig. 2](#) dargestellten Ergebnisse zeigen auch an, dass die humanen mesenchymalen Stammzellen die gemischte Lymphozytenreaktion in einer dosisabhängigen Weise herabsetzen. Die mesenchymalen Stammzellen von beiden Spendern unterdrückten die Proliferation gleich gut, was anzeigt,

dass es keine Spezifität der Suppression im Hinblick auf den MHC-Typ gab. Diese Ergebnisse zeigen, dass mesenchymale Stammzellen die gemischte Lymphozyten-Reaktion aktiv supprimierten, wenn die Zellen zusammen kultiviert wurden.

Beispiel 3

Fehlende Antwortbereitschaft bei der sekundären gemischten Lymphozytenreaktion

[0074] Diese Versuche wurden durchgeführt, um zu bestimmen, ob die Suppression präaktivierter T-Zellen durch MSCs zu einer spezifischen Antwortlosigkeit bei sekundärer Stimulation führen würde.

[0075] A. T-Zellen von Donor 248 (d248) wurden durch allogene PBMCs von Donor 273 (d273) für 7 Tage instruiert und dann für weitere 3 Tage alleine oder in Gegenwart von IFN-γ-behandelten MSCs aus dem gleichen Spender (d273) kultiviert. Die Zellen wurden dann durch PBMCs aus demselben Spender (d273), durch autologe PBMCs (d248) oder durch PBMCs einer „dritten Partei“ (d244) erneut stimuliert.

Lymphozyten-Präparation

[0076] Periphere einkernige Blutzellen (PBMC) wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation auf Ficoll-Paque (Pharmacia) präpariert. Aliquots der Zellen wurden in 90% FCS mit 10% DMSO eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen zweimal mit MSC-Medium (DMEM mit wenig Glukose und 10% FCS) gewaschen und in Testmedium (ISCOVES'S mit 25 mM Hepes, 1 mM Natriumpyruvat, 100 μM nicht essentielle Aminosäuren, 100 U/ml Penicillin, 100 μg/ml Streptomycin, 0,25 μg/ml Amphotericin B, $5,5 \times 10^{-5}$ M 2-Mercaptoethanol (alle Reagenzien von GIBCOBLR) und 5% humanem AB-Serum (Sigma, MLR-getestet)) resuspendiert.

[0077] Um die für T-Zellen angereicherte Fraktion herzustellen, wurden die PBMCs durch immunomagnetische negative Selektion von den Monozyten und B-Zellen befreit. Man inkubierte die PBMCs mit Maus-anti-Mensch monoklonalen CD19- und CD14-Antikörpern (Format ohne Azid, mit wenig Endotoxin (NA/LE)), gefolgt von Biotin-konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG (multiple Adsorption)-Antikörper (alle Reagenzien von Pharmingen) und Streptavidin Microbeads (Miltenyi Biotec). Die Zellen wurden dann unter Verwendung eines magnetischen Zell-Sortierer (MACS, Miltenyi Biotech) abgetrennt. Die für T-Zellen angereicherte Fraktion enthielt etwa 70–90% CD3+-Zellen.

MSC-Kultur

[0078] Humane MSCs wurden aus Knochenmark

isoliert, wie im US-Patent 5,486,359 beschrieben, wurden mit MSC-Medium in Kultur gehalten und wurden bei Passage 3 bis 6 verwendet. Die Zellen wurden unter Verwendung von 0,05% Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, einmal mit MSC-Medium gewaschen und bei 70–80% konfluenter Dichte ausplattiert, was 1×10^6 /Platte für 10 cm Gewebekulturschalen entsprach. Am Tag nach dem Ausplattieren wurde IFN-γ (Boehringer Mannheim) bei 500 U/ml hinzugegeben, und die Zellen wurden für weitere 3 Tage inkubiert. Vor dem Transfer der T-Zellen wurden die MSC-Platten 4-mal mit HBSS und 1-mal mit ISCOVES gewaschen, und es wurde Testmedium mit 10 ml/Well in 10 cm Gewebekulturschalen hinzugegeben.

Primäre (1.) MLR

[0079] T-Zellen (d248) wurden durch bestrahlte PBMCs (d273) aktiviert. Die für die Stimulierung verwendeten PBMCs wurden mit 3000 rad unter Verwendung eines Cabinet Röntgenstrahlen-Systems (Faxitron X ray, Buffalo, Grove, IL) röntgenbestrahlt. Für die primäre Stimulation wurden 2×10^7 Responder mit 2×10^7 Stimulatoren in 20 ml Assay-Medium in 10 cm Gewebekulturschalen gemischt. Die Zellen wurden bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre für 7 Tage inkubiert.

Aktivierte T-Zell/MSC-Kulturen

[0080] T-Zellen, die bei der 1. MLR aktiviert worden waren, wurden gesammelt, einmal mit MSC-Medium gewaschen und in Testmedium bei 10^6 /ml in 10 ml resuspendiert und in 10 cm-Gewebekulturschalen gegeben, die autologe oder allogene MSCs oder Medium alleine enthielten, und wurden für weitere 3 Tage inkubiert.

Test mit erneuter Stimulierung

[0081] T-Zellen, die mit MSCs oder Medium kultiviert worden waren, wurden gesammelt, einmal mit MSC-Medium gewaschen und mit bestrahlten PBMCs des ursprünglichen Donors, eines nicht verwandten Donors oder mit autologen PBMCs erneut stimuliert. Für den Test wurden 5×10^4 instruierte Responder und 5×10^4 bestrahlte Stimulatoren in 96-Well-Platten inkubiert. Die Assays wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Die Kulturen wurden für 18 Stunden vor der Ernte einem Puls mit 1 μCi an [³H]-Thymidin (Amersham) unterzogen. Die Kulturen wurden unter Verwendung des Harvester 96 (Tomtec) gesammelt, und die Filter wurden unter Verwendung des Microbeta Trilux Flüssigszintillations- und Lumineszenz-Zählers (E.G. & G. Wallac) analysiert. Die Daten sind als mittlere cpm ± Standardabweichung von drei Wiederholungen dargestellt.

[0082] Alleine kultivierte T-Zellen (Positivkontrolle) zeigten eine beschleunigte Antwort auf die erneute

Stimulation mit „demselben“ Donor mit einem Spitzenwert an Tag 2. Die Antwort auf die „dritte Partei“ war ebenfalls beschleunigt, praktisch mit derselben Kinetik wie bei „demselben Donor“, jedoch mit einem geringeren Maximalwert und einem leicht verzögerten Start ([Fig. 3](#)). Auf allogenen MSCs kultivierte T-Zellen zeigten nachfolgend sowohl bei PBMCs von „demselben Donor“ als auch von der „dritten Partei“ keine Antwort während 6 Tagen der Kultur ([Fig. 4](#)).

Beispiel 4

Fehlende Antwortbereitschaft bei der sekundären gemischten Lymphozyten-Reaktion

[0083] T-Zellen von Donor 413 wurden für 7 Tage mit bestrahlten PBMCs von Donor 273 stimuliert (jeweils $1,5 \times 10^6/\text{ml}$, Kulturgröße von 20 ml). Die MSCs der verschiedenen Donoren 413, 418 und 273 wurden mit $1 \times 10^6/\text{Schale}$ in 10 cm-Gewebekulturschalen ausplattiert, für 3 Tage mit IFN-γ vorbehandelt und gewaschen, bevor das Mischen mit den prä-aktivierten T-Zellen erfolgte.

[0084] Die bei der MLR für 7 Tage prä-aktivierten T-Zellen wurden alleine oder mit MSCs für weitere 3 Tage inkubiert ($1,0 \times 10^6/\text{ml}$ an T-Zellen, 10 ml/Schale). Nach 3 Tagen der Inkubation mit den MSCs wurden die T-Zellen gesammelt und mit bestrahlten PBMC 273 (Originalspender), 413 (autolog), PBMC10 (dritte Partei) oder PHA (5 µg/ml) in Gegenwart oder Abwesenheit autologer (d413) PBMC erneut stimuliert. Die Zellen wurden mit $5 \times 10^4/\text{Well}$ zugegeben, und die Kulturen wurden an den angegebenen Zeitpunkten für weitere 18 Stunden einem Puls mit [³H]-Thymidin unterzogen.

[0085] Die Ergebnisse zeigen an, dass die Behandlung der aktivierten T-Zellen mit autologen MSCs (d413) ([Fig. 5C](#)), vom selben Spender stammenden MSCs (d273) ([Fig. 5B](#)) und MSCs einer dritten Partei (d418) ([Fig. 5D](#)) bei den T-Zellen eine fehlende Antwortbereitschaft gegen antigene Stimulation induzierte. Die Kontrollkultur ([Fig. 5A](#)) ohne MSC-Behandlung zeigte eine erneute Stimulierung der Zellen bei Exposition gegenüber allogenen PBMCs.

Beispiel 5

Suppression der primären MLR durch canine MSCs

[0086] Canine PBMCs wurden aus dem peripheren Blut durch Zentrifugation auf einem Ficoll-Paque-Gradienten (1,077) gereinigt. Die Stimulator-PBMCs wurden bei 2200 rad (7 min, 70 kV) röntgenbestrahlt. 10^5 bestrahlte Stimulatoren wurden mit 10^5 Responder-PBMCs in 96-Well-Platten gemischt, dieses in Anwesenheit oder Abwesenheit zuvor plattierter caniner MSCs (E647, $2 \times 10^4/\text{Well}$). Die Kulturen wurden für 6 Tage inkubiert und für weitere

16 Stunden einem Puls mit [³H]TdR (5 Ci/mmol, 1 µCi/Well) unterzogen. Die Ergebnisse sind in den [Fig. 6A–Fig. 6D](#) gezeigt. E647 und E645 waren Geschwistertiere (DLA-identisch). Die Ergebnisse zeigten, dass autologe ebenso wie allogene MSCs die primäre MLR supprimierten.

Beispiel 6

Suppression der primären MLR durch nicht-anhaftende MSCs

[0087] T-Zellen von d273 ($2 \times 10^5/\text{Well}$) wurden mit bestrahlten PBMCs von d244 ($2 \times 10^5/\text{Well}$) und verschiedenen Anzahlen an MSCs gemischt. Die MSCs von d244 oder d273 wurden mit IFN-γ (900 U/ml für 3 Tage) vorbehandelt oder unbehandelt gelassen, am Tag des Versuchs trypsinisiert und zur selben Zeit zugegeben wie T-Zellen und PBMCs. Die Kulturen wurden für 7 Tage inkubiert, und es wurde für weitere 16–18 Stunden [³H]TdR (5 Ci/mmol, 1 µCi/Well) hinzugegeben. Die Ergebnisse sind in [Fig. 7](#) dargestellt und zeigen, dass nicht-anhaftende MSCs eine primäre MLR ebenfalls supprimierten.

Beispiel 7

Allogene MSCs unterstützen das Überleben von Haut-Allotransplantat

Studienpopulation

[0088] Es wurden junge Paviane (Papio anubis) untersucht. Die männlichen und nicht schwangeren weiblichen Paviane wogen 7–20 kg und hatten ein Alter von 3–16 Jahren. Sie wurden auf Tuberkulose-Papillomavirus durchgetestet, im Bezug auf Cytomegalievirus (CMV) titriert und mit dem Primaten-Virus-Screen, bestehend aus dem Test auf Simianvirus und unter Einschluss fäkaler Flotation und Abstrichen, getestet. Donor- und Rezipientenpaare wurden über die Unterschiedlichkeit des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (MHC) durch PCR-Typisierung bestimmt. Während der Studienphase waren die Paviane in einem individuellen Bereich neben einem Gesellschaft leistenden Tier untergebracht.

Ernte von Donor-Knochenmark für die MSC-Isolierung und Kultur-Vermehrung

[0089] Mit der Nadel gewonnene Knochenmark-Absaugungen für die Isolierung und Kulturvermehrung der MSCs wurden aus dem Darmbeinkamm erhalten. Die Knochenmarkabsaugungen wurden einmal die Woche an einer abwechselnden Stelle für vier aufeinander folgende Wochen erhalten. Das Volumen der Absaugung wurde über eine Schätzung mit 10% des Blutvolumens des Tiers bestimmt. Das Blutvolumen (Liter) wird mit 7% des Körpergewichts eingeschätzt. Ein 10 kg schwerer Pavian hätte folglich ein ge-

schätztes Blutvolumen von 0,7 Litern. Eine Absaugung von 10% des Blutvolumens würde dann 70 Milliliter ausmachen.

[0090] Vor der Prozedur wurden 500 mg Cefazolin intramuskulär (IM) für die perioperative antibakterielle Prophylaxe verabreicht. Die Paviane wurden für die Prozedur mit 10 mg/kg an Ketamin IM und 1 mg/kg an Xylazin IM sediert und betäubt. Die Stellen der Nadeleinführung wurden mit Povidon-Iod abgerieben und dann mit Alkohol abgespült. Die Absaugungen wurden aus dem Darmbeinkamm unter Verwendung einer 16-Eichmaß 2-Inch-Knochenmarknadel erhalten. Es wurde eine Spritze an die Nadel angeschlossen, und es wurde Saugwirkung appliziert, um das Mark zu entnehmen. Gegen den postoperativen Schmerz wurde das Analgetikum Buprenorphin mit 0,03 mg/kg IM Q12 × 2 Dosen verabreicht.

Versand der Donor-Knochenmark-Absaugungen

[0091] Die Knochenmarkabsaugungen wurden aus der Spritze in einen sterilen Vacutainer®, der Natrium-Heparin enthielt, überführt. Die Röhrchen wurden in einen Styrofoam™-Container eingebracht und mittels Über-Nacht-Transport bei Raumtemperatur (RT) zu der die Zellen verarbeitenden Einrichtung transportiert.

Isolierung und Kultur-Etablierung von MSCs

[0092] Fünf bis 10 ml-Aliquots von Knochenmark wurden in Dulbeccos Phosphat-gepufferter Saline (DPBS) in einem Polypropylen-Kulturröhrchen auf 50 ml verdünnt. Die Zellsuspensionen wurden bei 2200 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Die Auszählung der kernhaltigen Zellen wurde in 4% Essigsäure bestimmt. Die Zellen wurden dann in DPBS auf eine Endkonzentration von 20×10^6 Zellen/ml verdünnt. Zehn Milliliter oder 200×10^6 Zellen wurden auf 20 ml Percoll (sp. gr. 1,073 g/ml) in einem konischen 50 ml-Röhrchen geladen und wurden für 20 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Die Zellgrenzschicht, die die einkernigen Zellen enthielt, wurde in DPBS gewaschen, in Vollmedium resuspendiert und ausgezählt, um einen Ertrag zu erhalten. Die an der Percoll-Grenzschicht erhaltenen, gewaschenen einkernigen Zellen wurden dann in T-185-Kolben mit 30 ml Vollmedium und $15-20 \times 10^6$ Zellen/Kolben ($8,1 \times 10^4$ MSC/cm²) etabliert und in einen 37°C Inkubator bei 5% CO₂ eingesetzt.

Ernte von MSC

[0093] Das Medium in den Dreifachkolben wurde dekantiert, und die Kolben wurden mit 50 ml DPBS gespült. Nach Abdekantieren des DPBS wurden 23 ml an 0,05% Trypsin zu jedem der Dreifachkolben hinzugegeben. Die Kolben wurden für 3 Minuten in einen 37°C-Inkubator gestellt. Nach Ablösen der Zel-

len wurden 23 ml Vollmedium zu jedem Kolben hinzugegeben. Die Zellsuspensionen wurden auf konische 50 ml-Röhrchen überführt, und die Kolben wurden mit 30 ml HBSS gewaschen. Die Röhrchen wurden bei 2200 rpm für 5 Minuten bei RT zentrifugiert.

Formulierung/Verpackung

[0094] Die geernteten MSCs wurden mit etwa 10×10^6 Zellen pro ml in Gefrierschutzlösung, bestehend aus 85% Plasma-Lyte A (Baxter IV Therapy), 10% DMSO und 5% MSC-Donorserum, formuliert, und in Beuteln, die 15 bis 20 ml enthalten, cryo-konserviert.

Markierung/Lagerung/Versand

[0095] Die Zellen wurden unter Verwendung eines mit kontrollierter Geschwindigkeit laufenden Gefriergeräts (Cryomed, Forma Scientific) bei 1–2°C pro Minute bis auf –90°C cryo-konserviert. Die Proben wurden dann in ein mit flüssigem Stickstoff versehenes Lagergefriergerät in der Dampfphase (–120°C bis –150°C) überführt.

Dosis

[0096] Um eine MSC-Dosis von 20×10^6 Zellen/kg zu erreichen, wurde das Endprodukt am Infusionstag mit 115% der erforderlichen Dosis präpariert.

Hauternte

[0097] Vor dem chirurgischen Eingriff wurden dem Pavian 500 mg IM Cefazolin als perioperative antibakterielle Prophylaxe verabreicht. Der Pavian wurde mit Ketamin (10 mg/kg, IM) sediert und durch intravenöse Verabreichung von Thiopental, einem 1–2% Isofluran-Inhalations-Anästhetikum, betäubt. Es wurde Haut von der anterioren Unterleibswand geerntet und auf ein vorab markiertes befeuchtetes Saline-Gaze-Pad gelegt. Die Wundverletzung wurde dann verschlossen. Der Pavian wurde nach dem Aufwachen zu seiner Kolonie zurückgebracht. Gegen den postoperativen Schmerz wurden das Analgetikum Buprenorphin mit Q12 × 2 Dosen und Ancef täglich für 2 Tage verabreicht.

Empfänger-Hauttransplantation und MSC-Infusion

[0098] Vor dem chirurgischen Eingriff wurden dem Pavian perioperativ 500 mg IM Cefazolin als antibakterielle Prophylaxe verabreicht. Der Pavian wurde mit Ketamin (10 mg/kg, IM) sowie durch intravenöse Verabreichung von Thiopental, einem 1–2% Isofluran-Inhalations-Anästhetikum, sediert und betäubt. Es wurde Haut von der anterioren Unterleibswand geerntet und auf ein vorab markiertes befeuchtetes Saline-Gaze-Pad gelegt. Diese Haut wurde auf 2 Transplantate aufgeteilt; eines wurde als dritte Partei-Kontrolle für einen anderen Empfänger-Pavian

verwendet, und eines wurde als autologe Kontrolle für dasselbe Tier verwendet. Das Tier wurde dann in eine lang hingestreckte Position gebracht. Es wurden drei 3×2 cm-Schnitte von Haut am Rücken, entlang des Rückgrats, zwischen den Schulterblättern, entnommen. Die zuvor geernteten Hauttransplantate des MSC-Donors, einem Donor einer dritten Partei und die Selbst-Haut wurden entfettet, zurechtgeschnitten, um auf die erzeugten Hautdefekte zu passen und in Position angenäht.

[0099] Nach der Transplantation erhielt der Pavian eine intravenöse Infusion von MSC bei einer Dosis von 20×10^6 Donor-MSC/kg. Periphere Blutproben wurden erhalten vor den MSC, 1 Stunde und an den Tagen 1–3 nach den MSC; Knochenmarkabsaugungen wurden an Tag 0 nach den MSC und den Tagen 3, 14 und 30 gewonnen.

[0100] Gegen den postoperativen Schmerz wurden das Analgetikum Buprenorphin mit Q12 × 2 Dosen und Ancef täglich für 2 Tage verabreicht. Das Tier wurde täglich begutachtet, und die Transplantate wurden jeden zweiten Tag, beginnend an Tag 7 nach der Transplantation, photographiert.

Physikalische Untersuchungen und diagnostische Tests

[0101] Jeder Pavian wurde mit Ketamin (10 mg/kg) IM für die Untersuchung sediert. Während des sedierten Zustands wurden zwei – drei Milliliter Mark durch Nadelabsaugung aus dem Darmbeinkamm gewonnen und an den Tagen 4, 13 und 30, dem Ende der Studie, in Natrium-Heparin gesammelt. An denselben Tagen, an denen Knochenmarkabsaugungen erhalten wurden, wurde eine Hautbiopsie geerntet.

ERGEBNISSE

Wirkungen der MSC-Infusion auf das Überleben von Haut-Allotransplantat

[0102] Unbehandelte Kontrolltiere ($N = 2$) besaßen eine mittlere Haut-Allotransplantat-Überlebenszeit von $8,0 \pm 0$ Tagen. Die Infusion der von einem nicht-verwandten MSC-Donor stammenden Donor-MSCs ($N = 2$) führte zu einer Verlängerung der Überlebensdauer des Hauttransplantats auf eine mittlere Überlebenszeit von $11,5 \pm 0,71$ Tagen (Mann-Whitney U-Test, $P < 0,05$). Die Infusion der von einem Donor einer unverwandten dritten Partei stammenden MSCs bei den Donorallotransplantaten ($N = 4$) führte zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit der Hauttransplantate bis auf eine mittlere Überlebenszeit von $12,3 \pm 0,96$ Tagen (Mann-Whitney U-Test, $P < 0,003$).

[0103] Die Empfänger 6140 und 6200 erhielten Allotransplantate von dem MSC-Donor 6243, von einan-

der (Transplantat einer dritten Partei) und von sich selbst (Auto-Transplantat). 24 Stunden vor der Ernte des Hauttransplantats bei dem MSC-Donor, 6243, wurden MSCs aus 6243 unter die anteriore Unterleibshaut injiziert, die für die Transplantation mit einer Skizzierung versehen worden war. Nach der Transplantation erhielten die Empfänger eine intravenöse Infusion von 20×10^6 MSC/kg (6243). Beide Allotransplantate einer dritten Partei wurden an Tag 13 abgestoßen. Die Allotransplantate aus dem MSC-Donor (6243) wurden an Tag 4 als hämorrhagisch ermittelt, ein Befund, der gewöhnlich einem technischen Fehler zugeschrieben wird. Bei der pathologischen Überprüfung wurde festgestellt, dass Keratin in einer spurartigen Weise unterhalb der Dermis eingedrungen war: Die Natur dieser Spuren legt nahe, dass diese durch die Nadel zum Zeitpunkt der subkutanen MSC-Injektion erzeugt wurden. Die Anwesenheit dieser Zellen hatte eine heftige entzündliche Reaktion ausgelöst. Diese entzündliche Reaktion nahm den Hauttransplantaten die Möglichkeit, korrekt anzuhafeln/"anzunehmen", und diese Transplantate waren um Tag 7 herum vollständig nekrotisiert. Die Autotransplantate wurden nicht abgestoßen.

[0104] Die Empfänger 6654 und 6659 erhielten Allotransplantate des MSC-Donors 6593, von einander (Transplantat einer dritten Partei) und von sich selbst (Auto-Transplantat). Nach der Transplantation wurden den Empfängern intravenöse Infusionen von 20×10^6 MSC/kg verabreicht. Die MSC-Donor-Allotransplantate wurden an Tag 11 und 12 abgestoßen, und die Donor-Allotransplantate der dritten Partei wurden an den Tagen 11 und 12 abgestoßen. Die Autotransplantate wurden nicht abgestoßen.

[0105] In entsprechender Weise erhielten die Empfänger 6663 und 6658 Allotransplantate des MSC-Donors, 6656, voneinander (Transplantat einer dritten Partei) und von sich selbst (Auto-Transplantat). Nach der Transplantation wurden den Empfängern intravenöse Infusionen von 20×10^6 MSC/kg verabreicht. Die MSC-Donor-Allotransplantate wurden an Tag 11 abgestoßen, und die Donor-Allotransplantate der dritten Partei wurden an den Tagen 10 und 12 abgestoßen. Die Autotransplantate wurden nicht abgestoßen.

[0106] Die Empfänger 6532 und 6720 im Kontrollzweig der Studie erhielten Auto- und Allotransplantate ohne eine Verabreichung von MSC durch Infusion oder Injektion. Ihre Allotransplantate wurden an Tag 8 abgestoßen. Die Autotransplantate wurden nicht abgestoßen.

[0107] Es gab keine identifizierbaren Toxizitäten, die mit der allogenen MSC-Infusion verbunden waren und keine nachteiligen klinischen Krankheitsfolgen im nachfolgenden 30-tägigen Intervall. Blutproben

wurden vor den MSC, 1 und 2 Stunden, sowie an den Tagen 1, 2 und 3 nach der Transplantation und MSC-Infusion erhalten. Markabsaugungen wurden an den Tagen 4 und 13 nach der Transplantation und MSC-Infusion erhalten.

[0108] Diese Ergebnisse zeigen, dass eine einzige Infusion allogener Pavian-MSCs die Abstoßung allogener Hauttransplantate hinauszögern kann. Es wurde keine andere immunsuppressive Therapie verabreicht. Eine Dosis an allogenem MSCs oder MSCs einer dritten Partei erhöhten die Zeit bis zur Abstoßung um 50% (die Standardabstoßungszeit bei diesem Modell beträgt 8 Tage (siehe Goodman et al., Am Surg 62(6): 435–42 (1996)).

Beispiel 8

[0109] Der Zweck dieser Studie bestand darin, bei Hunden die Durchführbarkeit und Sicherheit der Infusion einer mäßig hohen Dosis an caninen mesenchymalen Stammzellen (cMSC) bei 10×10^6 Zellen/kg bei der Situation einer allogenen Markübertragung zu zeigen; dabei stammten die cMSC von Donoren, die im Bezug auf Hundeleukozyten-Antigen (DLA) identische Geschwistertiere darstellten. Eine zweite Zielsetzung bestand darin, die Verteilung und Funktion von Donor- neo- und GFP-markierten cMSC an den Tagen 50 und 100 nach der Transplantation zu untersuchen.

MATERIALIEN UND METHODEN

Versuchstiere

[0110] Es wurden Beagles für die Studie verwendet. Es wurden zwei männliche und zwei weibliche DLA-identische Geschwistertiere, die an Tag 0 der Studie 7 oder 9 Monate alt waren, bei der Studie verwendet. Das verwendete Typisierungsverfahren beinhaltet die Nutzung hochgradig polymorpher Mikrosatellitenmarker, um die Vererbung der Klasse II DRB-Region bei dem Hunde-Leukozyten-Antigen (DLA), dem Hunde-Äquivalent des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes, zu verfolgen. Mikrosatelliten sind kleine, Di-, Tri- oder Tetranukleotid-Wiederholungen, die bei den Allelen eine hinreichende Variabilität der Länge zeigen, sodass sie verwendet werden können, um die Vererbung chromosomal Segmente über Mehrgenerationen-Kreuzungen zu verfolgen. Die Segregation von Allelen wird typischerweise unter Verwendung einer Einzelschritt-Polymerasekettenreaktion mit Primern überwacht, die von singulären DNA-Sequenzen abgeleitet sind, die jede Wiederholungssequenz umgeben. Zusätzlich wurden gemischte Leukozytenreaktionen bei den für die Studie ausgewählten DLA-identischen Geschwisterpaaren durchgeführt, um die Ergebnisse des PCR-gestützten Mikrosatellitenmarker-Tests zu bestätigen.

Aufbau der Studie

[0111] Die Hunde erhielten eine Transplantation von cMSC und Knochenmark von dem gleichartigen, DLA-identischen Geschwister-Donor. Das Knochenmarktransplantat wurde von jedem der beiden DLA-identischen Geschwister am Tag 0 vor der Gesamtkörperbestrahlung (TBI) erhalten und ausgetauscht. Die Myeloablation wurde induziert, indem man die Hunde am Tag 0 einer einzigen TBI-Dosis von 920 Centigray (cGy) aussetzte (Mittellinien-Luft-Exposition von zwei gegenüberliegenden ^{60}Co -Quellen, zugeführt mit einer Rate von 7 cGy (9,3 R)/min). In Kultur vermehrte cMSC, die aus einer Donor-Knochenmarkabsaugung 4 oder mehr Wochen vor der Transplantation isoliert wurden, wurden mit Papp@OT-24, das die Gene für Grünes Fluoreszenzprotein (GFP) und Neomycin-Phosphotransferase (neo) enthält, transduziert. Die cMSC wurden nach Passage 1 (P1) oder Passage 2 (P2) cryokonserviert. Nach der TBI wurden die cMSC aufgetaut und über eine tragbare Infusionspumpe über eine 15 Minuten-Zeitspanne intravenös zugeführt. Innerhalb von ein bis zwei Stunden nach der cMSC-Infusion wurde das Knochenmark-Transplantat mit einer Dosis von $\geq 1 \times 10^8$ kernhaltigen Gesamtzellen (TNC)/kg intravenös infundiert.

[0112] Zur Prophylaxe gegen die Graft-versus-Host-Erkrankung (GVHD) wurde allen vier Hunden an den Tagen 0 bis 5 Cyclosporin (Sandimmune® Injektionslösung, Sandoz Pharmaceuticals Corporation) intravenös mit einer Dosis von 10 mg/kg BID (20 mg/kg/Tag) verabreicht. An den Tagen 6 bis 50 (Ende der Studie) für die Gruppe I.1.a, oder 6 bis 100 für die Gruppe I.1.b wurde Cyclosporin (Neoral® Weichgeltinekapseln, Sandoz Pharmaceuticals Corporation) mit 10 mg/kg BID PO (20 mg/kg/Tag) verabreicht. Die übliche unterstützende Betreuung mit oralen Antibiotika für den Empfänger begann an Tag -5, und systemische Antibiotika begannen an Tag 0 und wurden fortgeführt, bis ein Anwachsen des Transplantats erreicht war. Wo nötig, wurde unterstützend Flüssigkeit verabreicht. Während der Erholung wurden bei keinem der vier Hunde Blutplättchen-Transfusionen benötigt. Auf Hunde abgestimmte Standardprozeduren fordern, dass eine Gesamtblut-Transfusion zu verabreichen ist, wenn der Zahlenwert für die Blutplättchen konsistent unter $10.000/\text{mm}^3$ abfällt, oder wenn das Behandlungsteam Anzeichen von Bluten beobachtet. Die Blutplättchentransfusionen waren, wenn nötig, als 50 ml an bestrahltem Gesamtblut (2000 cGy) aus einem zufälligen Spender zu verabreichen.

[0113] Das Anwachsen des Transplantats wurde als Zeit der ersten von drei aufeinander folgenden Messungen mit > 500 , $> 1000/\text{mm}^3$ an neutrophilen Gesamtzellen/ mm^3 und $> 10.000/\text{mm}^3$, $50.000/\text{mm}^3$ und $> 100.000/\text{mm}^3$ an Blutplättchen bestätigt.

[0114] Um die hämatopoetische Wiederherstellung zu verfolgen, wurden Vollblutauszählungen (CBCs) von Tag 0 bis Tag 50 erhalten, und danach zwei-wöchentlich für die 100-Tage-Studiengruppe. Die Analyse der Serumchemie wurde an den Tagen 0,2 und danach wöchentlich durchgeführt. Peripherie Blutproben wurden an Tag 0 vor der MSC-Infusion abgenommen, mit Zeitpunkten von 5 und 15 Minuten, 1 und 2 Stunden und 1, 2, 3 und 4 Tagen für die DNA-Isolierung. Die DNA wurde durch einen Anti-EGFP-DNA-PCR-ELISA mit in das Produkt eingebautem Digoxigenin und einen colorimetrischen Assay auf Anti-Digoxigenin im zweiten Schritt auf Anwesenheit von GFP-markierten Zellen bewertet. Eine Markabsaugung wurde vorgenommen, wenn die Blutplättchenzahlen konsistent $50.000/\text{mm}^3$ erreichten, und es wurde unter Verwendung desselben PCR-Verfahrens auf das Vorkommen GFP-markierter Zellen hin getestet. Es wurden cMSC-Kulturen angelegt, um auf die Koloniebildenden Einheiten (CFU) hin zu testen und um die cMSC für weitere Anti-EGFP PCR-Analysen zu vermehren. Bei der Neukropsie wurden peripheres Blut, Knochenmarkabsaugungen und Knochenmarkbiopsien für die Anti-EGFP PCR-Analyse erhalten. Es wurden CFU-Assays an den Knochenmarkabsaugungen durchgeführt, und die Anti-EGFP-PCR-Analyse wurde an in Kultur vermehrten cMSC durchgeführt. Es wurde eine histologische Analyse auf Gegenwart von GFP an verschiedenen Geweben durchgeführt.

cMSC-Isolierung, Kulturvermehrung, Transduktion und Cryokonservierung

[0115] Beidseitige Knochenmarkabsaugungen wurden für die cMSC-Isolierung und Kulturretablierung bei Woche -4 für die Hunde CAN-07-01 und CAN-07-02 und bei Woche -9 für die Hunde CAN-07-03 und CAN-07-04 erhalten. Fünfzehn Milliliter Mark (7 ml von jedem Humerus) wurden von jedem Hund erhalten. Die Hunde wurden betäubt durch die Injektion von Butorphanol, gefolgt von der Injektion eines Gemisches von Diazepam und Ketaminhydrochlorid (Aveco Co., Inc., Fort Dodge, IA). Die Stellen der Nadeleinführung wurden mit Povidon-Iod abgerieben und dann mit Alkohol abgespült. Absaugungen wurden von jedem der humeralen Gelenkköpfen jedes Hundes unter Verwendung einer 16-Eichmaß-2-Inch-Knochenmarknadel erhalten. Es wurde eine Spritze auf die Nadel aufgesetzt und Sogwirkung appliziert, um 8 ml Mark aus jedem Humerus zu entnehmen. Die Knochenmarkabsaugungen wurden unter Verwendung steriler Technik in konische 15 ml-Polypropylenröhren überführt. Nach der Prozedur wurde der Hund dann auf ein Wärmepolster gesetzt, um sich zu erholen.

[0116] Fünf bis 10 ml-Aliquots von Knochenmark wurden in Dulbeccos Phosphat-gepufferter Saline (DPBS) in einem Polypropylen-Kulturröhren auf 50

ml verdünnt. Die Zellsuspensionen wurden bei 2200 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Die Auszählung der kernhaltigen Gesamzellen wurde in 4% Essigsäure bestimmt. Die Zellen wurden dann in DPBS auf eine Endkonzentration von 20×10^6 Zellen/ml verdünnt. Zehn Milliliter oder 200×10^6 Zellen wurden auf 20 ml Percoll (sp. gr. 1,073 g/ml) in einem konischen 50 ml-Röhrchen geladen und wurden für 20 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Die Zellgrenzschicht, die die einkernigen Zellen enthielt, wurde in DPBS gewaschen, in Vollmedium resuspendiert und ausgezählt, um einen prozentualen Ertrag zu erhalten. Die Zellen wurden dann in Vollmedium verdünnt, es wurden Kulturen etabliert, wie unten beschrieben, und in einen 37°C Inkubator bei 5% CO₂ eingesetzt.

Konstruktion eines bicistronischen retrovirusalen MuLV-Vektors

[0117] Das Grüne Fluoreszenzprotein (EGFP)-Retrovirus wurde konstruiert, indem man das EGFP-1-Gen aus der Qualle Aequorea victoria isolierte (Clontech, CA). Das EGFP-Gen wurde in den retrovirusalen Vektor pJM573-neo kloniert (das resultierende Plasmid wurde pOT-24 genannt). Das Plasmid pJM573-neo wurde von pN2 (Keller et al., 1985, Nature 318:149) abgeleitet, wobei es die folgenden Modifikationen gab: Die murine retrovirale gag-Initiationsstelle wurde durch ein im Leseraster liegendes Stopcodon ersetzt; es wurden 5'-LTR und 3'-LTR in derselben Kassette konstruiert; ein Neomycin-Phosphotransferase-Gen (neo) und eine interne Ribosomen-eintrittsstelle (IRES) wurden in pN2 inseriert. Eine schematische Karte von EGFP pOT24-Plasmid ist in [Fig. 8](#) dargestellt.

Herstellung von rekombinantem Retrovirus

[0118] pOT-24 wurde in ektope GP&E86-Produzentenzellen transfiziert, wobei DOTAP (Boehringer Mannheim), wie vom Hersteller vorgeschlagen, verwendet wurde. Die Anzucht der transfizierten Zellen erfolgte in DMEM-Hochglukose-Medium (HG-Medium), das mit 10% hitzeaktiviertem FBS, Penicillin-Streptomycin (Life Technologies) und 0,5 mg/ml an Protaminsulfat-G418 (Sigma) als Selektionsmarker supplementiert war. Die Kulturen wurden bis zu einer Konfluenz von 70% gehalten, wobei das Medium zu diesem Zeitpunkt durch frisches retrovirales Medium (ohne G418) ersetzt wurde, und die Zellen wurden bei 32°C für 2 Tage gehalten. Das das Retrovirus enthaltende Kulturmedium wurde gesammelt, durch einen 0,45-Filter filtriert und bei -70°C gelagert. Amphotropes Retrovirus wurde hergestellt, indem man PA317-Zellen zweimal mit ektotropem Virus transduzierte, wobei hierfür ein zentrifugales Transduktionsverfahren, gefolgt von Selektion mit G418 (0,5 mg/ml) verwendet wurde. Der retrovirale Überstand wurde gesammelt. Der Titer des vereinten

EGFP-Retrovirus auf den 3T3-Zellen betrug $1,2 \times 10^6$ CFU/ml. Die GFP-retroviralen Überstände wurden bei -70°C cryokonserviert.

CAN-07-01 und CAN-07-02

[0119] Die an der Percoll-Grenzschicht erhaltenen, gewaschenen einkernigen Zellen wurden in 10 T-185-Kolben, die 30 ml Vollmedium und 10×10^6 Zellen/Kolben enthielten, etabliert.

[0120] An den Tagen 2, 6 und 9 der Kultur wurde das Medium in den Kolben vollständig durch frisches Vollmedium ersetzt. An Tag 12 der primären Kultur wurden Photographien aufgenommen, und die Zellen wurden von Passage 0 (P0) zu Passage 1 (P1) gebracht. Das Medium wurde abgesogen, und die Kolben wurden zweimal mit 8 ml DPBS gewaschen. Es wurden 8 ml an Trypsin hinzugegeben, und die Kolben wurden für 3 Minuten bei 37°C in einen Inkubator gestellt. Nachdem die Zellen abgelöst waren, wurde die Reaktion durch die Zugabe von 8 ml Vollmedium abgestoppt. Die Zellen wurden transferiert und in konischen 50 ml-Röhrchen vereint. Die Kolben wurden mit DPBS gewaschen, und die vereinten Zellen wurden bei RT bei 2000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, und die Zellpellets wurden in Vollmedium resuspendiert. Die Zellen wurden vereint, ausgezählt und auf Lebensfähigkeit hin getestet. Die Zellen wurden in 15 T80-Kolben, enthaltend 18 ml an Vollmedium und $0,4 \times 10^6$ Zellen pro Kolben, plattierte.

[0121] An Tag 15 in Kultur wurde die erste Transduktion bei 15 der 18 Kolben durchgeführt. Das Medium wurde entfernt. Aliquots des retroviralen Überstands wurden aufgetaut, und es wurde Polybrene bis zu einer Endkonzentration von 8 µg/ml hinzugegeben, um einen Transduktionscocktail herzustellen. Das Zellmedium wurde durch 10 ml des Transduktionscocktails ersetzt, und die Kolben wurden für 1 Stunde bei 32°C bei 3000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 10 ml Vollmedium, hergestellt unter Verwendung von hitzeinaktiviertem fetalem Rinderserum (FBS), zu jedem Kolben (mit dem Transduktionscocktail) hinzugegeben, und die Kolben wurden in den Inkubator zurückgestellt. Drei Kolben wurden nicht transduziert, und es erfolgte Ersatz mit frischem Medium. An Tag 16 der Kultur erfolgte Ersatz des Mediums durch frisches Vollmedium. An Tag 17 der Kultur wurde die Transduktionsprozedur wiederholt.

[0122] An Tag 18 der Kultur wurden die Zellen, wie oben beschrieben, geerntet, und von P1 zu P2 gebracht. Es wurden 3×10^6 Zellen zu 100 ml Vollmedium gegeben, und in Dreifachkolben (500 cm^2) gegossen. Es wurden 15 Dreifachkolben mit transduzierten Zellen präpariert, und drei Kolben wurden mit untransduzierten Zellen präpariert. Alle verbleibenden

Zellen wurden cryokonserviert. Es wurde eine Gefrierlösung hergestellt, die 10% DMSO und 90% FBS enthielt. Es wurden 10×10^6 Zellen in 1 ml Gefrierlösung resuspendiert. Die Gefäße wurden markiert und in einem Nalgene Cryo Container für mindestens 4 Stunden bei -70°C cryokonserviert und bei -70°C gelagert.

[0123] An Tag 22 der P2-Kultur wurden Photographien aufgenommen, um die Zellverteilung und Morphologie aufzuzeichnen, und die P2-Zellen wurden, wie unten beschrieben, geerntet und cryokonserviert.

CAN-07-03 und CAN-07-04

[0124] Die gewaschenen einkernigen Zellen, die an der Percoll-Grenzschicht erhalten wurden, wurden in 15 T-75-Kolben, enthaltend 20 ml an Vollmedium und 12×10^6 Zellen/Kolben, etabliert.

[0125] An Tag 2 der Kultur wurde das Medium in den Kolben und Schalen vollständig durch frisches Vollmedium ersetzt. An Tag 6 der Primärkultur für cMSC wurde die erste Transduktion gemäß obiger Beschreibung durchgeführt. Drei Kolben wurden nicht transduziert, und das Medium wurde an Tag 6 durch frisches Medium ersetzt. An Tag 7 der Kultur wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt.

[0126] An Tag 8 der Kultur wurde die Transduktionsprozedur wiederholt. An Tag 9 in der Kultur wurden Photographien aufgenommen, und die Zellen wurden von P0 zu P1 geleitet, wie oben beschrieben. Es wurden 3×10^6 Zellen zu 100 ml Vollmedium gegeben und in Dreifachkolben gegossen. Fünfzehn Dreifachkolben wurden mit den transduzierten Zellen präpariert, und drei wurden mit untransduzierten Zellen präpariert.

[0127] Die 15 ml der Knochenmarkabsaugungen erbrachten 910, 1212, 856 und 1948×10^6 kernhaltige Zellen bei den Donoren CAN-07-01, CAN-07-02, CAN-07-03 bzw. CAN-07-04. Die Auszählungen der einkernigen Zellen, die an der Percoll-Grenzschicht erhalten wurden, betrugen 612, 666, 588 und 462×10^6 , was in Ausbeuten von 67,2; 55; 68,7 und 23,7% resultiert. Bei P1 besaß die Zelllebensfähigkeit einen Mittelwert von 97,1 (Bereich 93,3 bis 100%). Bei P2 für die Donoren CAN-07-01 und CAN-07-02 und den P1-Zellen für die Donoren CAN-07-03 und CAN-07-04 besaß die Zelllebensfähigkeit der transduzierten Zellen einen Mittelwert von 96,7 (Bereich 96,3 bis 97,9 %). Die untransduzierten Zellen waren zu 95,4 (Bereich 93,3 bis 96,9%) lebensfähig. Bei der Ernte der cMSCs für die Cryokonservierung besaß die Lebensfähigkeit der transduzierten Zellen einen Mittelwert von 99,4 (Bereich 97,4 bis 100%), und die untransduzierten Zellen waren zu 99,4 (Bereich 97,6 bis 100%) lebensfähig (Tabelle 4).

[0128] Die Ausbeute an transduzierten cMSC pro Kolben für die Donoren CAN-07-01 und CAN-07-02, geerntet 4 Tage nach Passage 2 und ausplattiert mit 3×10^6 pro Kolben, betrug 5,9 und $6,7 \times 10^6$, und die Ausbeute der untransduzierten cMSC pro Kolben betrug 8,4 und $7,5 \times 10^6$. Die Ausbeute an transduzierten cMSC pro Kolben für die Donoren CAN-07-03 und CAN-07-04, geerntet 4 Tage nach Passage 1 (unterschiedliches Design der Transduktion und Passage) und ausplattiert mit 3×10^6 pro Kolben, betrug 20,0 und $14,0 \times 10^6$, und die Ausbeute der untransduzierten cMSC pro Kolben betrug 25,3 und $18,0 \times 10^6$.

CFU-Assays an cMSC aus P0-Kulturen

[0129] CFU-Kolonie-Assays wurden zum Zeitpunkt der Etablierung der Primärkultur präpariert, indem man $0,5 \times 10^6$ Zellen im Dreifachansatz in 100 mm Schalen, enthaltend 10 ml Vollmedium, ausplattierte. Die Schalen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Medium wurde alle 2 bis 4 Tage durch frisches Medium ersetzt. An Tag 10 in Kultur wurden die CFU-Assay-Schalen zweimal mit HBSS abgespült, für 15 Minuten mit 1% Glutaraldehyd fixiert, zweimal mit HBSS abgespült und an der Luft getrocknet. Die cMSC in den Schalen wurden dann mit 0,1% Kristallviolett angefärbt, dreimal mit deionisiertem Wasser abgespült und an der Luft getrocknet. Die Kolonien wurden ausgezählt, um die Anzahl der sich bildenden Kolonien pro ausplattierten 10^6 Zellen zu berechnen.

[0130] Die CFU-Assays, die am Tag der Isolierung der einkernigen Zellen und der Kulturetablierung ausplattiert wurden und am Tag 10 geerntet wurden, ergeben 56; 46,7; 114 und 72 Kolonien pro 10^6 Zellen für die Hunde CAN-07-01, CAN-07-02, CAN-07-03 bzw. CAN-07-04.

[0131] An Tag 13 der P1-Kultur wurden Photographien aufgenommen, um die Zellverteilung und Morphologie aufzuzeichnen, und die P1-Zellen wurden gemäß unten stehender Beschreibung durch Trypsinisierung geerntet und cryokonserviert.

[0132] Das Medium in den Dreifachkolben wurde abdekantiert, und die Kolben wurden mit 50 ml DPBS gespült. Nach dem Abdekantieren des DPBS wurden 23 ml an 0,25% Trypsin zu jedem Dreifachkolben hinzugegeben. Die Kolben wurden für 3 Minuten in einen 37°C-Inkubator eingesetzt. Nach der Ablösung der Zellen wurden 23 ml Vollmedium zu jedem Kolben hinzugegeben. Die Zellsuspensionen wurden auf konische 50 ml-Röhrchen überführt, und die Kolben wurden mit 30 ml HBSS gewaschen. Die Röhrchen wurden bei 2200 rpm für 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Die Pellets, die die transduzierten bzw. untransduzierten Zellen enthielten, wurden vereint und ausgezählt. Ein Aliquot von 1×10^7 Zellen wurde für die Bestimmung des Transduktions-Prozentsatzes durch

einen Anti-EGFP DNA PCR ELISA-Assay zur Seite gestellt.

[0133] Nach der Ernte wurden die wiedergewonnenen, aus P1 oder P2 stammenden, transduzierten und in Kultur vermehrten cMSCs für 5 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert und in 1 ml-Aliquots mit 1×10^7 cMSC/ml in eiskalter Gefrierschutzlösung, enthaltend 85% Plasma-Lyte A (Baxter IV Therapy), 10% DMSO und 5% autologes Hundeserum, resuspendiert. Die Zell-Aliquots wurden in getrennte Cryo-Gefäße abgefüllt, die jeweils 1 ml enthielten. Die Röhrchen wurden mit der Hunde-Donornummer und der Gesamtzahl lebensfähiger Zellen markiert. Die cMSCs wurden cryokonserviert, indem man die Zellgefäße in einen Nalgene Gefrier-Container einsetzte und diesen dann für 4 Stunden in einen -70°C Gefrierschrank einsetzte und dann bei -70°C in die Lagerung verbrachte.

[0134] Bei der Zellernte für die Cryokonservierung des Produkts wurden Aliquots von 1×10^7 Zellen erhalten, um die Transduktionseffizienz zu bestimmen. Die Analyse der Transduktionseffizienz erfolgte durch einen Anti-EGFP DNA PCR ELISA mit Digoxigenin-Einbau in das Produkt und einen Anti-Digoxigenin-Colorimetrie-Assay im zweiten Schritt.

cMSC-Infusionsprodukt

[0135] Eine bis zwei Stunden vor der Infusion wurden die Gefäße mit den cMSC durch Wirbeln in einem 37°C Wasserbad aufgetaut, mit 70% Ethanol besprüht und in einem Biosicherheits-Kabinett geöffnet. Das cMSC-Produkt wurde in 50 ml Infusionsmedium, enthaltend DMEM-LG plus 30% zum Zelldonor autologes Serum, suspendiert. Die Lebensfähigkeit des cMSC-Produkts wurde durch Ausschluss von Trypan-Blau bestimmt, um die tatsächliche lebensfähige Dosis zu bestimmen. Ein Aliquot jedes cMSC-Produkts wurde für ein Hefe-Isolat, für aerobes und nicht-aerobes Wachstum bereitgestellt. Die cMSCs wurden im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Anheftung an Gewebekultur-Kunststoff und zur Proliferation in P2-Kultur (P3 für CAN-07-01 und CAN-07-02) bewertet. Aliquots von 1×10^6 und $0,16 \times 10^6$ cMSCs wurden in Hundekultur-Vollmedium im Dreifachansatz in T-25-Kunststoffkulturkolben plattiert. Nach 24 Stunden wurden die mit 1×10^6 cMSCs plattierten Kolben und an Tag drei die mit $0,16 \times 10^6$ cMSCs plattierten Kolben durch Trypsinisierung geerntet und ausgezählt.

[0136] Nach der TBI wurde die cMSC-Suspension über einen in die Kopfvene eingesetzten Katheter infundiert, wobei ein manuell gehaltener Harvard Bard Mini-Infuser zur Zufuhr der 50 ml über eine Zeitspanne von 15–20 Minuten verwendet wurde.

[0137] Den Hunden CAN-07-01, CAN-07-02,

CAN-07-03 und CAN-07-04 wurden an Tag 0 mäßig hohe Dosen von 7,49, 7,35, 10,0 bzw. 10,0 (Mittelwert: $8,7 \times 10^6$) lebensfähige cMSC/kg infundiert. Diese Dosen stellen eine 4- bis 10-fache Steigerung gegenüber der typischen Dosis dar, die ein Patient erhalten würde. Die Gesamtzahl der infundierten lebensfähigen cMSC reichte von 67,7 bis 129 (Mittelwert $93,9 \times 10^6$) cMSC. Die Lebensfähigkeit der Zellen reichte von 92,1 bis 97,6 (Mittelwert 94,9), wie durch Trypan-Blau-Ausschluss bestimmt. Die cMSC-Infusionen wurden zwischen 71 und 146 (Mittelwert 110) Minuten nach der TBI gegeben.

Blutprobengewinnung nach der Infusion

[0138] Es wurden Blutproben (2 ml) vor (prä) und während der cMSC-Infusion bei fünf und fünfzehn Minuten nach dem Start der Infusion erhalten, sowie ebenso zu den Zeitpunkten 1 und 2 Stunden und 1, 2, 3 und 4 Tagen. Zelllysate wurden unter Verwendung des Puregene™ (Genta Systems, Inc.) DNA-Isolierungskits hergestellt, dies zur Verwendung in einem Anti-EGFP DNA PCR ELISA mit in das Produkt eingebautem Digoxigenin und einem zweiten Schritt mit einem Anti-Digoxigenin colorimetrischen Assay zum Detektieren des Mengenniveaus der GFP-markierten cMSC im Blutstrom.

Knochenmarkerne und Transplantat-Infusion

[0139] Knochenmark, das als Transplantat verwendet werden soll, wurde vor der TBI aus dem DLA-identischen Geschwister gewonnen. Die Absaugungen wurden aus jedem Humerus unter Verwendung einer 11 Eichmaß 4–6 Inch großen, mit Kugelspitze versehenen Markgewinnungsnadel aus rostfreiem Stahl gewonnen, wobei die Nadel an einen Polyvinylschlauch, hervorgehend aus einem Vakuumkolben mit 100 ml Gewebekulturmedium 199 und 4 ml (4000 U) an Heparin, angeschlossen ist. Das Mark wird durch eine Porengröße von 300 und 200 μm geleitet und wird bei 4°C in einem Transfer-Verpackungsbehälter, markiert mit dem Donor und dem Empfänger, gelagert, bis die Infusion später am Tag stattfindet. Die Gesamtzahl der kernhaltigen Knochenmarkzellen (BM-TNC) des Marks wird korrigiert, um jedeweile kernhaltige Zelle auszuschließen, die im Volumen des peripheren Bluts, erhalten während der Markerne, vorhanden sein könnte.

[0140] Die Gesamtzahl der kernhaltigen Zellen (TNC) des Knochenmarks wird korrigiert, um jedeweile TNC auszuschließen, die im Volumen des peripheren Bluts, erhalten während der Markerne, vorhanden sein könnte. Die korrigierten Dosen für das Mark waren $4,3, 3,5, 3,1$ und $2,0$ (Mittelwert $3,2 \times 10^8$) TNC/kg bei den Hunden CAN-07-01, CAN-07-02, CAN-07-03 bzw. CAN-07-04. Die unkorrigierten Knochenmarkdosen betrugen $5,6, 4,2, 4,5$ und $2,7$ (Mittelwert $4,3 \times 10^8$) TNC/kg.

[0141] Zwanzig Minuten vor der Infusion wurde das Mark auf Raumtemperatur gebracht. Eine Stunde nach der cMSC-Infusion wurde das Mark intravenös über eine in die Kopfvene eingesetzte Schmetterlingsnadel infundiert, indem über 1 bis 2 Minuten ein Druck auf den Beutel ausgeübt wurde.

Unterstützende Pflege

[0142] An Tag -5 wurden orale Antibiotika (Neomycinsulfat und Polymyxinsulfat) dreimal täglich verabreicht. Diese oralen Antibiotika wurden verabreicht, bis die absolute Neutrophilen-Anzahl $500/\text{mm}^3$ erreichte. An Tag 0 wurde das systemische Antibiotikum Baytril zweimal täglich intravenös verabreicht, und dies wurde fortgesetzt, bis die absolute Neutrophilen-Anzahl konsistent $1.000/\text{mm}^3$ erreichte. Flüssigkeits- und Elektrolytverluste als Ergebnis der vorübergehenden Bestrahlungstoxizität wurden durch eine subkutane Zufuhr von 500 ml Ringer-Lösung, zweimal täglich, ersetzt, bis Nahrung und Wasser angenommen wurden.

Differentielle Blutzell-Zählungen

[0143] Blutproben (2 ml) wurden entweder aus der Drosselvene oder aus der Kopfvene gesammelt, und zwar am Morgen der Markabsaugung für die Isolierung der cMSC, an den Tagen 0 bis 50 und danach zweiwöchentlich bis zum Ende der Studie. Das Blut wurde in einen Vacutainer mit EDTA überführt. Die Gesamtzahlen der weißen Blutzellen (WBC) und der Blutplättchen pro mm^3 werden unter Verwendung eines Sysmex E2500 bestimmt, und differenzielle Zellzahlen wurden manuell bestimmt, nachdem eine Fixierung und Anfärbung mit dem Wrights-Stamm erfolgt war.

Nekropsie

[0144] Es wurden Blutproben für die CBC, die Chemie-23-Analyse und die PCR-Bewertung erhalten. Die Hunde wurden mit Butorphanol, gefolgt von einem Gemisch aus Diazepam und Ketaminhydrochlorid, sediert. Nach der Sedierung wurden Biopsien und zweiseitige Knochenmarkabsaugungen von den Humeri, den Femora und den Darmbeinkämmen erhalten. Die Euthanasie wurde dann mit einer Überdosis des Beruhigungsmittels Natrium-Pentobarbital abgeschlossen. Die Tag-50-Gruppe der Hunde (CAN-07-01 und CAN-07-02) wurde an Tag 43 der Studie getötet; die Tag-100-Gruppe der Hunde (CAN-07-03 und CAN-07-04) wurden an Tag 100 der Studie getötet. Bei der Nekropsie der Tiere wurden vollständige Gewebesätze gesammelt.

[0145] Das Sammeln von Gewebe für die histologische Untersuchung folgte unmittelbar. Eine Untergruppe von Geweben wurde für die Anti-EGFP DNA PCR ELISA-Analyse verwendet. Die Knochenmar-

kabsaugungen und Biopsien wurden für die Anti-EGFP DNA PCR ELISA-Analyse verwendet, die Kulturvermehrung für weitere PCR-Analyse und CFU-Assays.

[0146] Die Gewebe wurden auf Stücke von etwa 1 Inch-Quadrat zurechtgeschnitten und in getrennte, markierte, konische 50 ml-Röhrchen, die mit 10% neutral gepuffertem Formalin (pH 6,8–7,2) gefüllt waren, eingebracht. Die Gewebe wurden in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die Knochenmarkproben wurden mittels Period-Schiffsäure-Färbung angefärbt.

[0147] Vor der Nekropsie erhaltene Knochenmarkabsaugungen wurden in markierten 15 ml-Röhrchen aus den linken und rechten Humeri, den Femora und den Darmbeinkämmen jedes Hundes gewonnen. Eine Untergruppe der Gewebeproben wurde bei der Nekropsie erhalten und auf Stücke von etwa 1/4 Inch-Quadrat zurechtgeschnitten, in mit PBS voll gesogener Gaze verpackt und separat in einen markierten „Reißverschlussbeutel“ eingebracht. Die Knochenmarkabsaugungen wurden auf Eis gehalten.

Präparation von Knochenmarkabsaugungen für den CFU-Assay

[0148] Aliquots der Knochenmark-Absaugungen aus dem linken und rechten Humerus, dem Femur und dem Darmbeinkamm jedes Hundes, die für die PCR-Analyse erhalten wurden, wurden in getrennte markierte 15 ml-Röhrchen allquotiert. Die Knochenmark-Proben wurden auf Eis gehalten.

CFU-Assay bei cMSC aus bei der Nekropsie erhaltenem Knochenmark

[0149] Die CFU-Kolonie-Tests, die an cMSC, erhalten aus Knochenmark bei der Nekropsie, durchgeführt wurden, wurden vorbereitet, indem man $0,5 \times 10^6$ Zellen im Dreifachansatz in 100 mm-Schalen mit 10 ml Vollmedium ausplattierte. Die Schalen wurden bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. Das Medium wurde alle 2–4 Tage durch frisches Medium ersetzt. An Tag 10 in Kultur wurden die CFU-Assay-Platten zweimal mit HBSS abgespült, mit 1% Glutaraldehyd für 15 Minuten fixiert, zweimal mit HBSS abgespült und an der Luft getrocknet. Die cMSC in den Schalen wurden dann mit 0,1% Kristallviolett angefärbt, dreimal mit deionisiertem Wasser abgespült und an der Luft getrocknet. Die Kolonien wurden gezählt, um die Anzahl an Kolonien pro 10^6 platierte Zellen zu berechnen.

Isolierung und Reinigung von DNA

[0150] DNA wurde aus einem Teil jedes der Gewebe isoliert. Das verbleibende Stück der Probe wurde cryokonserviert und bei -70°C in einem Gefrierschrank gelagert. DNA wurde dadurch isoliert, dass

man Proben in Phosphat-gepufferte Saline (PBS) brachte, Proteinase K-Lösung hinzugab und bei 55°C für 3 Stunden bzw. bis zu einer Auflösung des Gewebes inkubierte. Die Proben wurden nachfolgend bei 37°C für 60 min mit RNase behandelt. Die Proben wurden auf Raumtemperatur abgekühlt, und das Protein wurde präzipitiert. Die Proben wurden zentrifugiert, und die wässrige Phase wurde vorsichtig in 100% Isopropanol gesammelt. Die Proben wurden gemischt und zentrifugiert, und das Pellet in 70% Ethanol gewaschen. Die Röhrchen wurden zentrifugiert, wonach man den Überstand abtropfen ließ und die Pellets für etwa 1 bis 6 Stunden trocknen ließ. Man ließ die DNA über Nacht bei Raumtemperatur hydratisieren und lagerte diese nachfolgend bei 4°C.

[0151] Proben aus peripherem Blut und Knochenmark wurden zunächst mit RBC-Lyse-Lösung (Ammoniumchlorid-Puffer) lysiert. Die DNA wurde dann gemäß obiger Beschreibung aus den Lysaten isoliert. Die DNA wurde durch die Zugabe von 998 µl deionisiertem Wasser und 2 µl DNA der Probe in eine Küvette und Vortexen quantifiziert. Es wurde ein Spektrophotometer verwendet, um die optische Dichte (OD) zu bestimmen. Die OD wurde bei 260 und 280 nm abgelesen, und die Konzentration von DNA wurde in µg/ml berechnet. Die DNA-Konzentration wurde unter Verwendung von deionisiertem Wasser auf 1 µg/ml eingestellt.

Anti-EGFP DNA PCR ELISA

[0152] Der Anti-EGFP DNA PCR ELISA-Assay, der für diese Studien verwendet wird, detektiert infundierte cMSCs unter Verwendung von Oligonukleotid-Primern, die für GFP spezifisch sind. Für die Analyse der Genexpression verwendeten wir ein PCR-ELISA-Kit (DIG-Markierung/Detektion) (Boehringer Mannheim). Kurz dargestellt, wurde die PCR in Gegenwart Digoxigenin-markierter Nukleotide durchgeführt, um das amplifizierte Produkt zu markieren. Danach wurden 25 µl des PCR-Produkts denaturiert, und man ließ dieses in Lösung bei 37°C in einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte an eine 5'-biotinylierte Oligonukleotid-Sonde hybridisieren. Das gebundene Sonde-PCR-Produkt wurde durch ein Anti-Digoxigenin-Peroxidase-Konjugat und durch die Verwendung des colorimetrischen Substrats 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-Sulfonsäure) (ABTS) detektiert. Unter Verwendung transfizierter Kontroll-cMSCs wurden Titrationstandardkurven erstellt, um die Konzentration an DNA pro in dem Test verwendeter DNA-Menge näherungsweise zu bestimmen. Eine Schätzung der Zellzahl kann erhalten werden, indem man zunächst eine Korrelation mit einem internen Standard für die PCR der DLA Klasse II genomischen DNA herstellt, dann die DNA-Konzentration mit den Zell-Äquivalenten korreliert und ein Retrovirus-Integrations-Ereignis pro transduzierter Zelle annimmt.

[0153] Quantitative Messungen der DNA für GFP wurden bei allen Knochenmark-Proben/Biopsien beobachtet.

Blutzell-Wiederherstellung nach der Transplantation

[0154] Die mittlere Frist bis zu einem Schwellenwert (3 aufeinander folgende Werte) der Blutplättchen von $10.000/\text{mm}^3$ war 12,8 (Bereich: 11–17), von $50.000/\text{mm}^3$ war 19,8 (Bereich: 16–25) und von $100.000/\text{mm}^3$ war 23,0 (Bereich: 20–27). Die mittlere Frist bis zu einem Schwellenwert (3 aufeinander folgende Werte) der gesamten neutrophilen Zellen von $500/\text{mm}^3$ war 9,3 (Bereich: 8–11), und von $1000/\text{mm}^3$ war 10,5 (Bereich: 9–13).

Knochenmarkabsaugungen in der Übergangsphase

[0155] Als sich die Blutplättchen konsistent auf Werte von über 50.000 pro mm^3 erholt hatten, wurde eine Interims-Knochenmark-Absaugung aus dem Darmbeinkamm gewonnen. Diese Prozedur erfolgte bei der Studie für CAN-07-01 und CAN-07-02 an Tag 27 und für CAN-07-03 und CAN-07-04 an Tag 29.

ERGEBNISSE

[0156] Bei der histopathologischen Bewertung aller Gewebe von CAN-07-01 und CAN-07-02, getötet an Tag 43, waren die Befunde für ektopisches Bindegewebe und für subakute GVHD negativ.

[0157] Ein detektierbares DNA-Signal konnte innerhalb 1 Stunde der Infusion und wiederum an Tag 2 gefunden werden. Eine Probe konnte an Tag 3 nach der Infusion für GFP-DNA quantitativ gemessen werden. Dieser Zeitpunkt stimmt überein mit vorherigen Beobachtungen bei der Untersuchung autologer Hundetransplantate, bei denen sich das Signal an den Tagen 2 und 3 findet.

[0158] Tag 100-Nekropsie-Daten für CAN-07-03 und CAN-07-04 für GFP+-Zellen zeigten GFP-Signal (1 GFP+ Zell-Äquivalent pro 10 Mikrogramm PCR Zugabe-DNA) im Femur und Humerus von CAN-07-03 und im Humerus von CAN-07-04.

[0159] Bei diesem Modell war es möglich, eine Hautgraft (Hauttransplantat)-versus-Host-Erkrankung (GVHD) durch das Beobachten der Rötung der Augen und der Ohren der Tiere festzustellen. Unter Verwendung dieses Indikators wurde bestimmt, dass die Tiere, die mesenchymale Stammzellen erhalten hatten, eine niedrigere Häufigkeit von und/oder einen geringeren Schweregrad der GVHD im Vergleich zu den Kontrolltieren aufwiesen, die nicht mit mesenchymalen Stammzellen behandelt worden waren.

[0160] Diese Ergebnisse zeigen, dass allogene MSCs die rasche Transplantatannahme von hämato-

poetischen Knochenmarkzellen unterstützen können. Es wurde keine Transfusionsunterstützung benötigt. Es gab keine klinischen Anzeichen von GVHD. Die Wiederherstellung der Blutplättchen war schneller als bei den historischen Kontrollen. Es gab Anzeichen von chimärem Charakter bei den Stromazellen nach der allogenen Transplantation. Die Option der Transplantatetablierung von allogenem Gewebe mittels Verwendung allogener MSCs verbreitert das Spektrum von Transplantatmaterial, das in klinischen Transplantationsszenarien verwendbar ist.

Patentansprüche

1. Ex vivo-Verfahren zur Verringerung einer Immunantwort gegen ein Alloantigen, umfassend: Inkontaktbringen von Immuneffektorzellen ex vivo mit mesenchymalen Stammzellen in einer Menge, die wirksam ist, die Immunantwort zu verringern.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Effektorzellen T-Zellen sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Effektorzellen T-Zellen sind, die zuvor durch ein Alloantigen aktiviert wurden, umfassend: Inkontaktbringen der aktivierten T-Zellen mit mesenchymalen Stammzellen in einer Menge, die wirksam ist, um die erneute Stimulierung der aktivierten T-Zellen zu unterdrücken.
4. Verwendung gereinigter mesenchymaler Stammzellen für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, um bei einem Transplantatempfänger eine Immunantwort von Effektorzellen gegen ein Alloantigen für die Effektorzellen zu verringern.
5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die Effektorzellen T-Zellen sind.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die T-Zellen von dem Donor stammen und das Alloantigen von dem Empfänger stammt.
7. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die T-Zellen von dem Empfänger stammen und das Alloantigen von dem Donor stammt.
8. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die T-Zellen in einem Transplantat vorliegen.
9. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die pharmazeutische Zubereitung einem Transplantatempfänger zu verabreichen ist, der an einer Graft-versus-Host-Krankheit leidet.
10. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die mesenchymalen Stammzellen (MSCs) in Kultur vermehrt wurden.

11. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die Effektorzellen T-Zellen sind, die zuvor aktiviert wurden, und wobei die Immunantwort die erneute Aktivierung dieser T-Zellen darstellt.

12. Verwendung nach Anspruch 4, wobei das Transplantat Haut ist.

13. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die pharmazeutische Zubereitung dem Transplantatempfänger zu verabreichen ist, um die Abstoßung des Transplantats durch den Empfänger zu behandeln.

14. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die mesenchymalen Stammzellen humane mesenchymale Stammzellen sind.

15. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die pharmazeutische Zubereitung weiterhin immunsupprimierende Mittel umfasst.

16. Verwendung nach Anspruch 4, wobei das Transplantat ein solides Organ ist.

17. Verwendung nach Anspruch 4, wobei das solide Organ ausgewählt ist aus Herz, Pankreas, Niere, Lunge oder Leber.

18. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die pharmazeutische Zubereitung vor dem Transplantat zu verabreichen ist.

19. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die pharmazeutische Zubereitung gleichzeitig mit dem Transplantat zu verabreichen ist.

20. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die pharmazeutische Zubereitung als Teil des Transplantats zu verabreichen ist.

21. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die pharmazeutische Zubereitung nach dem Transplantat zu verabreichen ist.

22. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die pharmazeutische Zubereitung dem Empfänger intravenös zu verabreichen ist.

23. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die Effektorzellen Zellen eines Empfängers des Donortransplantats sind.

24. Verwendung nach Anspruch 4 zur Behandlung eines Transplantat-Empfängers im Hinblick auf eine Graft-versus-Host-Krankheit zur Verringerung einer vom Transplantat ausgelösten Immunantwort gegen den Empfänger.

25. Verwendung nach Anspruch 24, wobei die

mesenchymalen Stammzellen für den Empfänger autolog sind.

26. Verwendung nach Anspruch 24 oder 25, wobei die mesenchymalen Stammzellen für das Donortransplantat autolog sind.

27. Verwendung nach Anspruch 24, wobei die mesenchymalen Stammzellen sowohl für den Donor als auch für den Empfänger allogen sind.

28. Verwendung nach Anspruch 24, wobei die pharmazeutische Zubereitung weiterhin immunsupprimierende Mittel umfasst.

29. Verwendung mesenchymaler Stammzellen zur Herstellung einer Zubereitung für die Behandlung eines Transplantats, um bei einem Transplantatempfänger eine Immunantwort von Effektorzellen gegen ein Alloantigen für die Effektorzellen zu verringern, nachdem das Transplantat auf den Transplantatempfänger übertragen wurde.

30. Verwendung nach Anspruch 29, wobei die Effektorzellen T-Zellen sind.

31. Ex vivo-Verfahren zur Verringerung einer von einem Donortransplantat hervorgerufenen Immunantwort, umfassend das Inkontaktbringen des Transplantats ex vivo mit Gewebe, das vom Transplantatempfänger erhalten wurde und dann Inkontaktbringen des Donortransplantats ex vivo mit mesenchymalen Stammzellen in einer Menge, die wirksam ist, eine vom Donortransplantat hervorgerufene Immunantwort gegen den Empfänger zu verringern.

32. Verfahren nach Anspruch 31, wobei die mesenchymalen Stammzellen sowohl für das Donortransplantat als auch für den Empfänger des Transplantats allogen sind.

33. Verfahren nach Anspruch 31, wobei die mesenchymalen Stammzellen für den Empfänger des Transplantats autolog sind.

34. Verfahren nach Anspruch 31, wobei die mesenchymalen Stammzellen für das Donortransplantat autolog sind.

35. Verfahren nach Anspruch 31, wobei das Donortransplantat Knochenmark ist.

36. Verfahren nach Anspruch 31, weiterhin umfassend die Verwendung immunsupprimierender Mittel.

37. Verfahren nach Anspruch 31, wobei die mesenchymalen Stammzellen modifiziert werden, um ein Molekül zu exprimieren, das den Tod aktiverter T-Zellen induziert, wobei das Molekül ausgewählt ist

DE 699 29 681 T2 2006.10.26

aus der Gruppe, bestehend aus FasL, CD70, CD27
und TRAIL-L.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

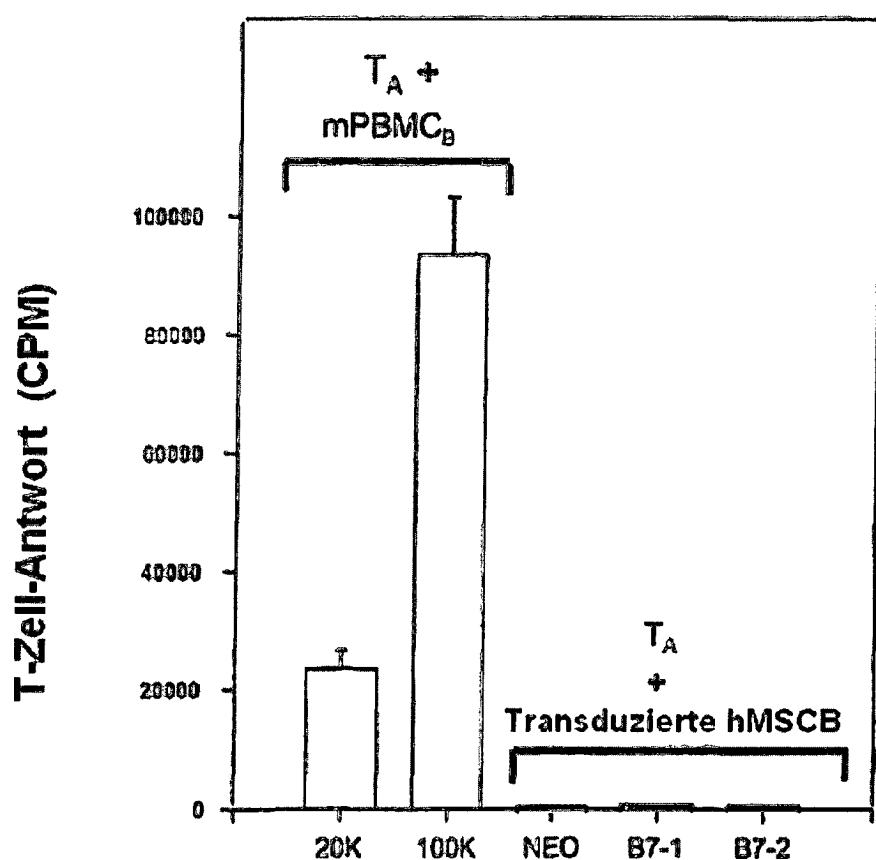


FIG. 2

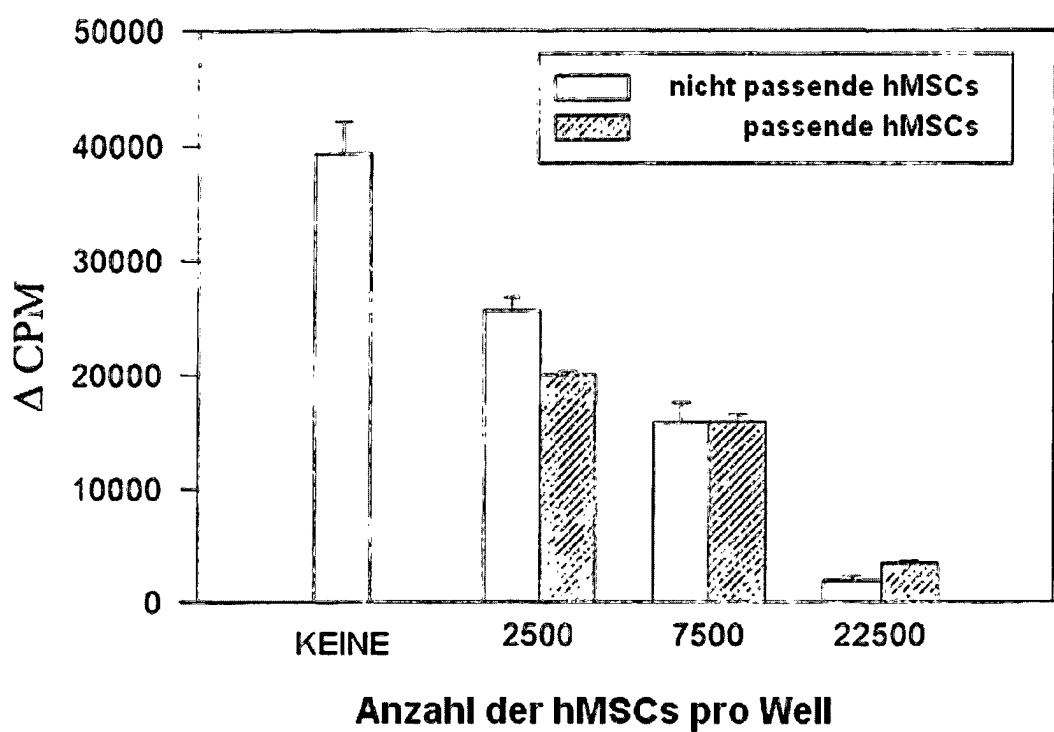


FIG. 3

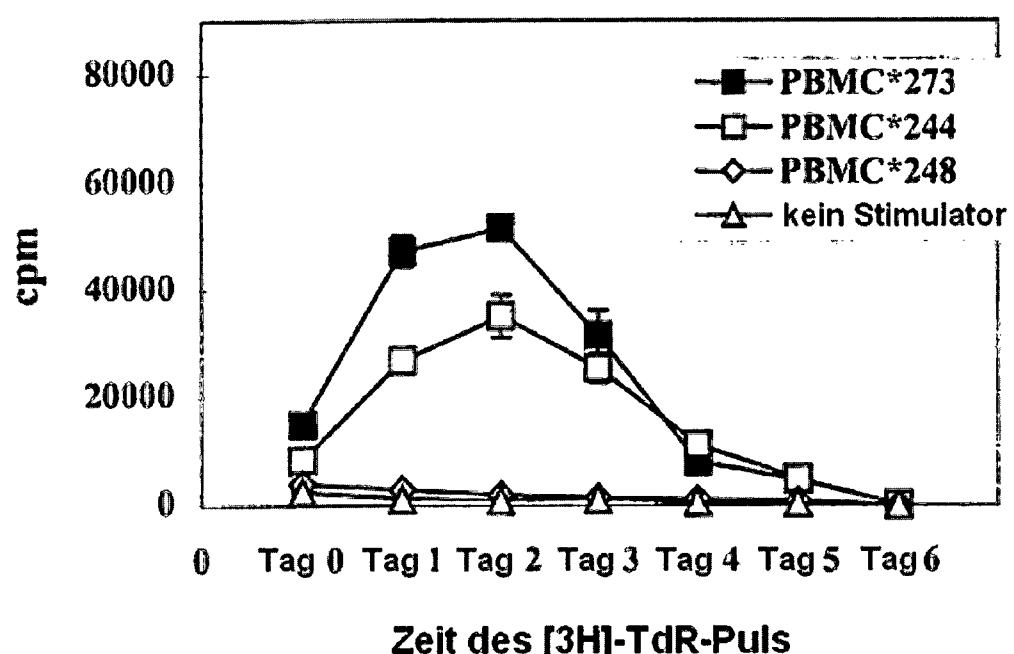
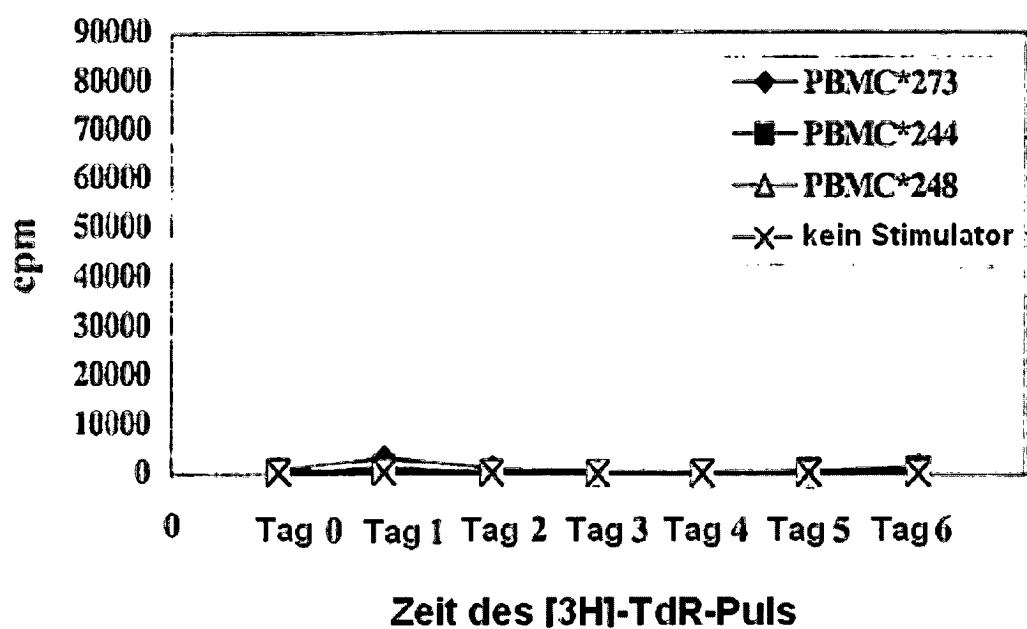


FIG. 4



Zeit des [³H]-TdR-Puls

FIG. 5A

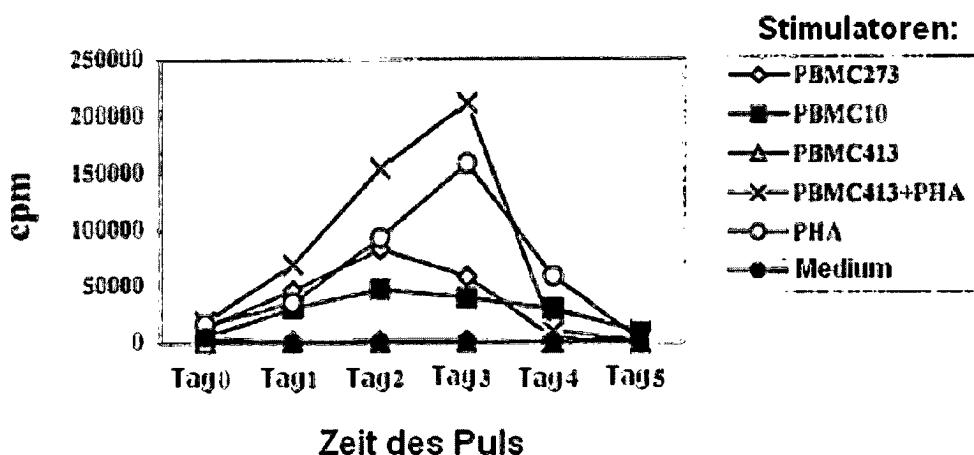


FIG. 5B

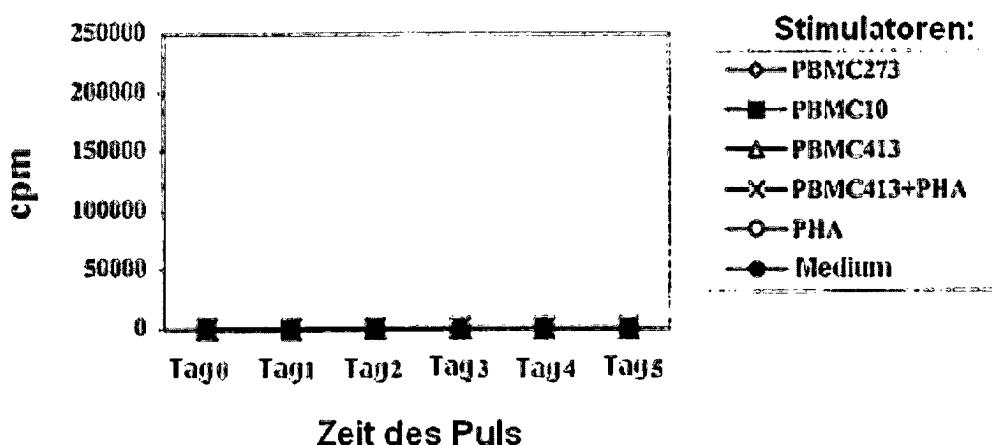


FIG. 5C

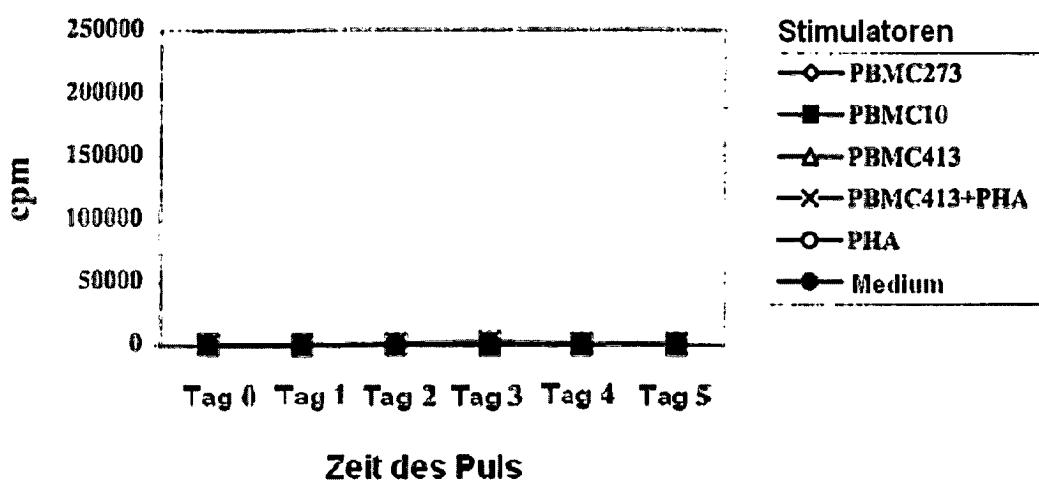


FIG. 5D

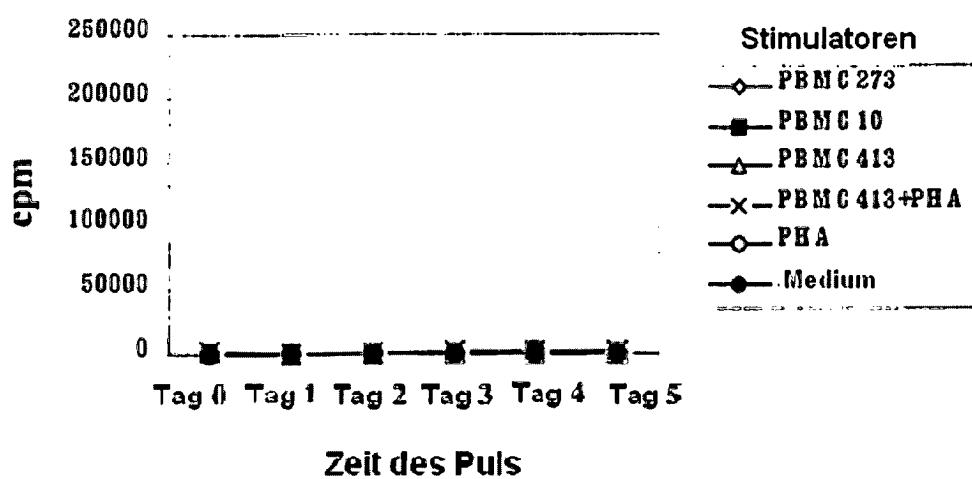


FIG. 6A

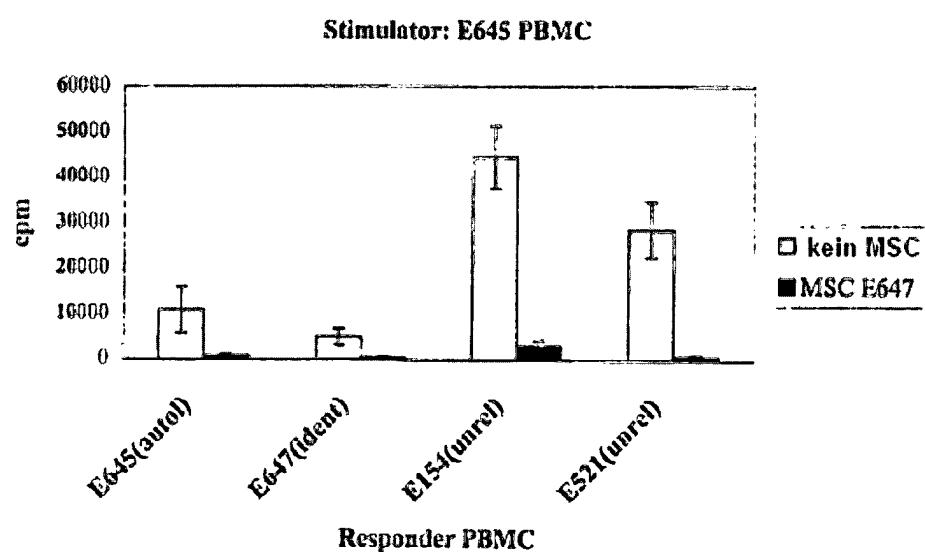
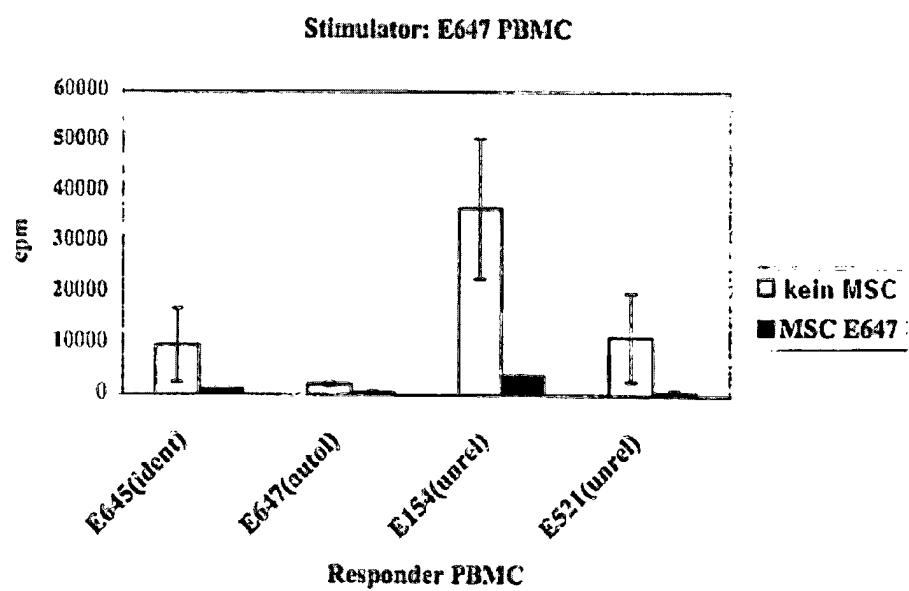


FIG. 6B



unrel = nicht verwandt

FIG. 6C

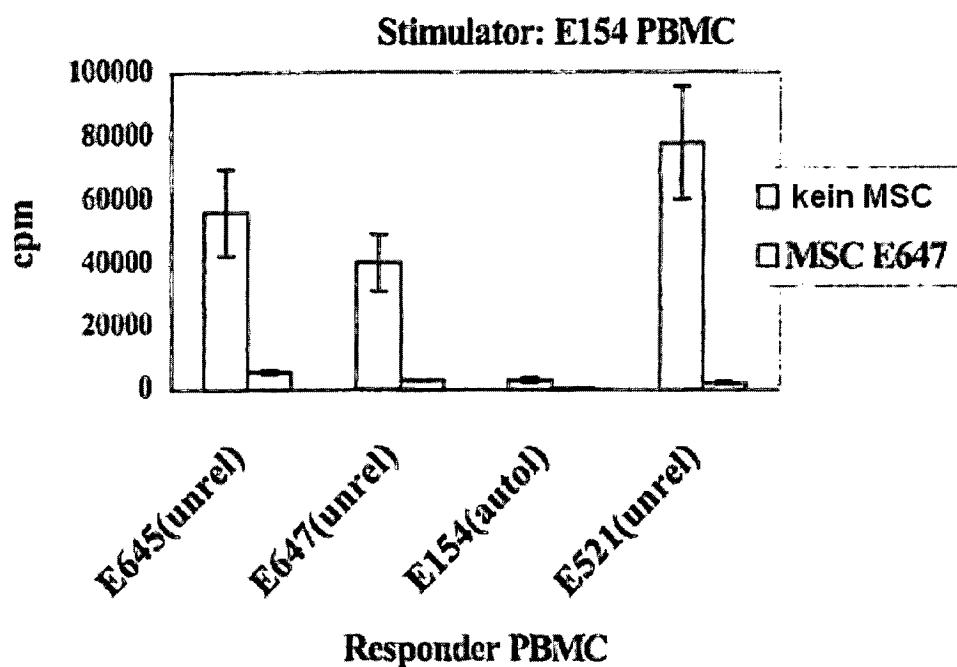
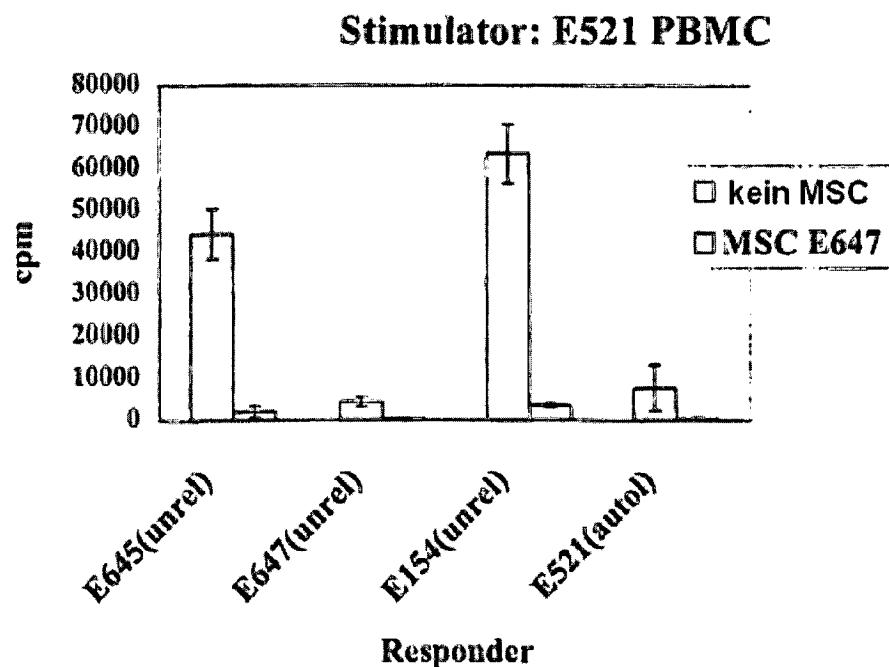


FIG. 6D



unrel = nicht verwandt

FIG. 7

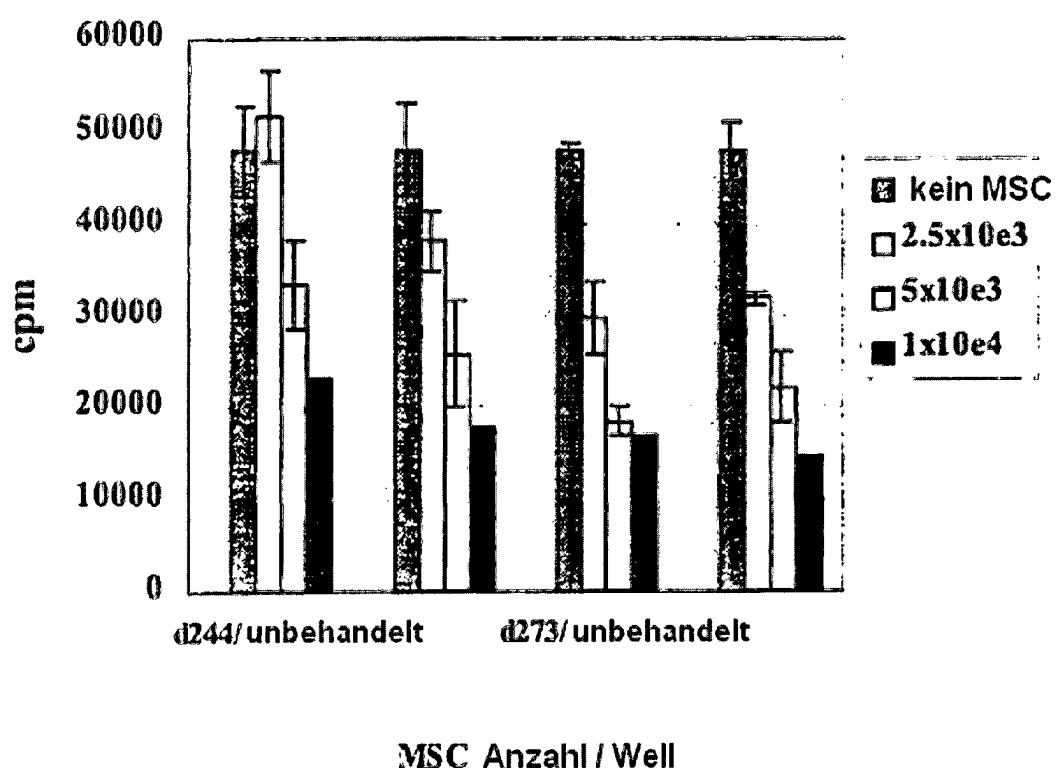


FIG. 8

