

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. Mai 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/40645 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 5/06, 5/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/12852

(22) Internationales Anmeldedatum:  
7. November 2001 (07.11.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 56 465.8 14. November 2000 (14.11.2000) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: DAIG, Rosemarie [DE/DE]; Otto-Hahn-  
Strasse 16, 93053 Regensburg (DE).

(74) Anwalt: ACKERMANN, Joachim; Postfach 11 13 26,  
60048 Frankfurt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,  
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/40645 A2

(54) Title: CELL CONSTRUCTS WHICH CAN BE OBTAINED FROM MESENSCHYMAL STEM CELLS AND CELLS  
DERIVABLE THEREFROM AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: ZELLKONSTRUKTE ERHÄLTLICH AUS MESENCHYMALEN STAMMZELLEN UND DAVON ABLEIT-  
BAREN ZELLEN UND IHRE VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to cell constucts containing a polymer matrix and mesenchymal stem cells from hair follicles  
or connective tissue cells derivable therefrom, in addition to methods for the production of said cell constucts and the use thereof.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Zellkonstrukte enthaltend eine Polymermatrix und mesenchymale Stammzellen  
aus Haarfollikeln oder daraus ableitbarer Zellen des Bindegewebes sowie Verfahren zur Herstellung solcher Zellkonstrukte und die  
Verwendung dieser Zellkonstrukte.

5 Zellkonstrukte erhältlich aus mesenchymalen Stammzellen und davon ableitbaren Zellen und ihre Verwendung

#### Beschreibung

10 Die Erfindung betrifft Zellkonstrukte erhältlich aus mesenchymalen Stammzellen und von diesen ableitbaren Zellen des Bindegewebes, wie z. B. Knochen-, Knorpel-, Fett- oder Muskelzellen, die Verwendung solcher Zellkonstrukte sowie Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung.

15 Die Erzeugung von differenzierten Geweben aus pluripotenten Stammzellen, z. B. zur Herstellung von Transplantaten, ist seit längerem Gegenstand intensiver Entwicklungsarbeit. Grundlage dieser Bemühungen ist die Fähigkeit solcher Stammzellen sich durch wiederholte mitotische Teilung selbst zu erneuern sowie die Fähigkeit dieser Stammzellen, in Abhängigkeit bestimmter Faktoren, sich in  
20 morphologisch und physiologisch unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren.

So ist die Differenzierung von Knochen-, Knorpel-, Muskel-, Fettgewebe, Dermis, Sehnen, Bändern und Knochenmark-Stromazellen aus mesenchymalen Stammzellen aus Periosteum und vor allem aus dem Knochenmark bereits  
25 gelungen (US 5,486,359, US 5,736,396).

In US 5,486,359, US 5,197,985, US 5,226,914, US 5,811,094, US 5,736,396, WO99/03973 und WO98/32450 sind z. B. vorteilhafte Methoden zur Implantation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Periosteum und aus  
30 dem Knochenmark zur Behandlung von Muskel-, Skelett-, Knorpel- oder anderen Bindegewebsschäden beschrieben. Dazu wird dem Patienten Knochenmark entnommen und in vitro auf mesenchymale Stammzellen über die Adhärenz und geeignetes Medium selektioniert. Nachteilig dabei ist, daß der Anteil an pluripotenten

mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark mit 0.001% bis 0.01% sehr gering ist. Deshalb müssen relative große Mengen an Knochenmark entnommen werden, um genügend Ausgangsmaterial für eine in vitro Kultur zu erhalten. Auch die Gewinnung reiner Kulturen aus mesenchymalen Stammzellen und damit auch der davon abgeleiteten Bindegewebezellen ist aus diesem Grunde schwierig. Aufgrund des hohen Anteils anderer Zelltypen in der entnommenen Probe ist die Abtrennung der Stammzellen von Zellen anderen Typs über die spezifische Adhärenz von mesenchymalen Stammzellen bzw. Wahl des geeigneten Mediums problematisch. Als letztes ist die Probenentnahme durch Knochenmarkpunktion ein aufwendiger, für den Patienten mit einem gewissen Risiko behafteter Eingriff.

Darüber hinaus ist die für den Patienten risikolose Nutzung und Kultivierung epidermaler Stammzellen aus Haaren und deren Verwendung zur Behandlung von Hautdefekten bekannt (US 5,968,546). Demgegenüber wurde bisher, trotz großem Bedarf, noch kein für den Patienten risikoloses Verfahren zur Herstellung von mesenchymalen Stammzellen oder daraus ableitbarer Bindegewebstypen beschrieben.

Davon ausgehend liegt der Erfindung die Aufgabe zu Grunde einfach herstellbare Zellkonstrukte aus patientenschonend gewinnbarem mesenchymalen Zellmaterial oder daraus ableitbarer Gewebetypen sowie effiziente Verfahren zu ihrer Herstellung bereitzustellen.

Es kann überraschend gezeigt werden, dass Zellkonstrukte aus mesenchymalen Stammzellen und davon ableitbaren Geweben, einfach, mit aus Haarfollikeln isolierten mesenchymalen Stammzellen, die auf einer polymeren Matrix in vitro kultiviert werden, hergestellt werden können.

Somit betrifft die Erfindung Zellkonstrukte enthaltend eine Polymermatrix und mesenchymale Stammzellen aus Haarfollikeln oder davon durch Differenzierung ableitbarer Zellen.

Mesenchymale Stammzellen des Haarfollikels können z. B. durch Mikrodissektion oder überraschend auch durch Zupfen von Körperhaaren gewonnen werden.

Insbesondere ist das Zupfen eine schnelle, nicht-invasive Methode zur Gewinnung von mesenchymale Stammzellen des Haarfollikels . So können die Zellen einfach, ohne qualifiziertes medizinisches Personal, ohne Risiko und bei geringen Schmerzen für den Patienten entnommen werden.

5

Darüber hinaus ist der Anteil von mesenchymalen Stammzellen in der Haarwurzel sehr groß. Die aus den Haarwurzeln einfach isolierbaren Haarfollikel enthalten neben den mesenchymalen Stammzellen nur epitheliale Stammzellen in nennenswertem Umfang. Das ist die Grundlage für die Herstellung sehr reiner Gewebekulturen unter Verwendung einfacher Selektionsmethoden aus kleinen Probenmengen.

10

Um die Gewinnung mesenchymaler Stammzellen aus Haarfollikel durch Zupfen von Haaren, z. B. aus der Kopfhaut eines Probanden, zu ermöglichen, wird die Entnahmestelle mit einer die Haut aufweichenden Lösung behandelt. Danach können die Haare mit weitestgehend intaktem Haarfollikel mit einer Pinzette gezupft werden.

15

Um die mesenchymalen Stammzellen in Kultur zu nehmen werden die Haarfollikel vom Resthaar entfernt und in einer bevorzugten Ausführungsform kurz in einer antibakteriell wirkenden Lösung gebadet. Die Haarfollikel können auf einer festen oder gelartigen Adhäsionsoberfläche in Gegenwart eines FGF enthaltenden Mediums kultiviert werden, wobei bFGF der bevorzugt zu verwendende Faktor ist. Die Kultivierung erfolgt bei einer Temperatur zwischen 25 und 40°C, bis die Follikel auswachsen und konfluent werden. Als Medium kann z. B. Changs-Medium DMEM/Ham's F12, M199, E199, MEM, EMEM oder DMEM Grundmedium gegebenfalls mit weiteren Zusätzen verwendet werden. Im Komplettmedium sollten bevorzugt folgende Mediumszusätze enthalten sein: bFGF, Serum, IGF-I, Insulin, Hydrocortison, Pyruvat, Retinsäure, nicht essentielle Aminosäuren, Triiodthyronin (T3), Transferrin, Selen und/oder Glucagon. Die Kultivierung der Haarfollikel erfolgt bevorzugt in feuchter Luft bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Zur weiteren Kultivierung können die ausgewachsenen Zellen von der Oberfläche abgelöst und in einem geeigneten Medium, bevorzugt in obigem Medium propagiert werden.

20

25

30

Durch weitere Zusatzstoffe im Medium, wie z. B. das Wachstum von epithelialen Stammzellen spezifisch hemmende Faktoren, kann eine optimale Reinigung der mesenchymalen Stammzellen gewährleistet werden.

5 Die Zellkultur kann z. B. über immunologische Separationsverfahren (FACS) oder immunologisch/magnetische Separation über an Beads befestigte Antikörper gereinigt werden. Dabei haben sich Antikörper bewährt, die sich gegen Antigene richten, die für mesenchymale Stammzellen spezifisch sind, wie z. B. die Antigene CD13, CD49e, CD29, CD105 oder das smooth-muscle-alpha-actin.

10

Ebenso besteht zur Reinigung der Zellkultur von epithelialen Stammzellen die Möglichkeit einer immunologischen Negativ-Selektion über CD24- oder Cytokeratin 16 Antikörper. Die Negativ-Selektion besitzt den Vorteil, daß Veränderungen in den mesenchymalen Stammzellen durch Antikörper induzierbare Signale wirksam vermieden werden und somit ein möglichst naiver Zustand der Zellen erhalten bleibt.

15

Alternativ oder additiv zu den eben beschriebenen Verfahren besteht allerdings auch die Möglichkeit die entnommenen und im Medium propagierten mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikeln über Dichtegradientenzentrifugation, z. B. in einem Percoll-Gradienten, von anderen Bestandteilen mit anderer Dichte insbesondere anderen Zellen, abzutrennen.

20

Über die immunologischen Separationsverfahren lassen sich, ausgehend von einer im wesentlichen nur mesenchymale und epitheliale Stammzellen enthaltende Zellkultur, die schon während der Kultivierung vorselektioniert sein kann, hoch homogene Zellkulturen aus mesenchymalen Stammzellen gewinnen. Insbesondere die Herstellung von hoch homogenen Zellkulturen mit Negativ-Selektion ist aufgrund der definierten Zusammensetzung des für die Selektion verwendeten Ausgangszellmaterials möglich.

25

30

Die so gewonnenen und aufgereinigten mesenchymalen Stammzellen können nun zur Herstellung von Zellkonstrukten verwendet werden.

Dazu werden die mesenchymale Stammzellen in einem geeigneten Medium suspendiert und bei einer Temperatur zwischen 25 und 40 °C auf eine

Polymermatrix aufgebracht. Bevorzugt kann direkt die aus der Reinigung der Zellkultur erhaltene Suspension verwendet werden.

Als Matrix kommen auf die mesenchymalen Stammzellen adhäsiv bzw.

5 immobilisierend wirkende feste oder gelförmige Polymere in Frage, wobei die Matrixbildung gelierender Polymere bevorzugt zu Beginn der Zellkonstruktherstellung nach Inkubation mit den Stammzellen erfolgt. Synthetische Polymere werden dagegen bevorzugt als fertige Matrix zur Inkubation mit den Stammzellen vorgelegt. Als Matrixmaterialien sind z. B. natürlich vorkommende

10 Biopolymere, wie Collagen, Gelatine, Alginat, Agarose, Laminin, Fibronectin, Fibrin, Matrigel, Polysaccharide, Glycosaminoglykanen oder Proteoglykane, geeignet, aber auch synthetische Polymere, wie z. B. Poly-?-Hydroxysäuren, Polycarbonat, Polyamide, Polyanhydride, Polyester, Polyurethane, Polyglycole, Polyoxyethylen, Polyoxypropylen, Polyacrylate, Polymethacrylate, Polycyanoacrylate, Polyacetale,

15 Polyvinylchloride, -flouride, -imidazole, Polyhydroxyvinyle, Polyvinylacetate, Polyethylenvinylacetate, chlorosulfinierte Polyolefine, Polyanhydride, Polyorthoester, Polycaprolactone, Polylactide, Polyphosphine, Milchsäure-Polymerisate oder Glycolsäure-Polymerisate. Es können auch Copolymere dieser Verbindungen oder andere Copolymere, wie z. B. Polylactid-co-glycolid oder Polyethylenglykol-

20 Polylactid, oder Mischungen dieser Polymere, bevorzugt Fibrin-Collagen, Fibrin-Alginat-, Alginat-Collagen-Mischungen. Die Polymere Matrix kann dabei als 2-dimensionaler Film oder als 3-dimensionaler-Körper aus einem oder mehrerer dieser Polymere ausgebildet sein.

25 Die adhäsiv bzw. immobilisierend wirkende polymere Matrix kann auch weitere Trägermaterialien umfassen, so z. B. poröse Träger, wie Hydroxyapatite oder Zeolithe. Aber auch polymere Trägermaterialien sind verwendbar, die mit Adhäsionsmolekülen beladen werden können, so daß eine selektive Anlagerung der Zellen auf der polymeren Matrix mit den mesenchymalen Stammzellen oder der von

30 ihnen abgeleiteten Zellen zustande kommt.

Unter den gegebenen Bedingungen wachsen die mesenchymalen Stammzellen auf der vorgegebenen adhäsiven Oberfläche. Feste Polymermatrizen ergeben somit

vorgeformte Zellkonstrukte, elastische oder gelartige Matrizen ergeben dagegen flexible Zellkonstrukte.

Die Matrix und/oder das Medium können weitere Zusatzstoffe, insbesondere  
5 bioaktive Faktoren, wie z. B. Wachstumsfaktoren, Wachstumshemmer, Hormone, Arzneimittelwirkstoffe, insbesondere Antibiotika, Cytostatika oder entzündungshemmende Stoffe, selektiv wirkende Zelladhäsiva, die Proliferation oder Differenzierung induzierende und fördernde bioaktive Faktoren,  
10 Vaskularisierungsfaktoren oder Immunmodulatoren, enthalten. Bevorzugt sind bioaktive Faktoren die das Wachstum und die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen nicht oder nur wenig beeinträchtigen. So können z. B. neben wachstumsfördernden Faktoren auch spezifisch epitheliale Stammzellen hemmende Substanzen zugesetzt werden.

15 Bevorzugt sind die bioaktiven Faktoren kovalent oder adsorptiv an die polymere Matrix oder an zusätzlich eingebrachte Trägermaterialien, insbesondere an poröse Träger gebunden.

Es können zum einen Zellkonstrukte enthaltend mesenchymale Stammzellen aber  
20 auch Zellkonstrukte enthaltend differenzierte Bindegewebszellen hergestellt werden.

Die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikeln zu Bindegewebszellen für die Herstellung solcher Bindegewebszellkonstrukten kann im Wachstumsmedium vor Inkubation der polymeren Matrix oder nach Inkubation direkt  
25 im Zellkonstrukt erfolgen.

Bevorzugt werden Zellkonstrukte, die mesenchymalen Stammzellen stammend aus Haarfollikeln enthalten unter Verwendung geeigneter Differenzierungsfaktoren und Kultivierungsbedingungen im matrixfixierten Zustand in daraus ableitbare  
30 Bindegewebszellkonstrukte umgewandelt.

Die Differenzierung kann dabei in vitro oder nach Reimplantation des Zellkonstrukts in vivo erfolgen. Im letzteren Fall werden die Differenzierungsfaktoren bevorzugt auf der polymeren Matrix angebracht. Für die in vivo Differenzierung können allerdings

auch endogen vorhandene Differenzierungsfaktoren ausreichend sein, so daß auch Zellkonstrukte aus mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikeln ohne weitere Zusatzstoffe implantiert werden können.

- 5 Die Differenzierung kann dabei gemäß dem Fachmann bekannter Verfahren erfolgen. So sind z. B. Verfahren zur Herstellung von differenzierten Bindegewebszellen, wie z. B. Knochen- oder Knorpelzellen aus US 5,486,359, US oder aus 5,827,740 bekannt.
- 10 Zur Herstellung von Zellkonstrukten aus Fettgewebe werden z. B. die selektionierten mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikel mit einem FGF enthaltenden Medium auf einer polymeren Matrix ausgesät und kultiviert. Danach werden die Zellen einige Tage, bevorzugt unter serumfreien Bedingungen, in einem geeigneten Medium, z. B. DMEM/Ham's F12 mit FGF gegebenenfalls unter Zusatz weiterer Faktoren, gehalten, wobei bevorzugt anfänglich Retinsäure zugesetzt wird. Nach Erlangen der  
15 Konfluenz können die Zellen mit 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), Hydrocortison, Indomethacin oder einer Mischung daraus differenziert werden.
- Das Arbeiten unter serumfreien Differenzierungsbedingungen ist dabei von Vorteil,  
20 da im Blutserum neben Albumin noch einige weitere Faktoren enthalten sind, die eine problemlose und effektive Differenzierung zu Fettzellen hemmen können.
- Zur Herstellung von Zellkonstrukten aus Knorpelzellen werden z. B. die selektionierten und an eine polymere Matrix immobilisierten mesenchymalen  
25 Stammzellen aus Haarfollikeln in Gegenwart von DMEM mit Insulin, Dexamethason und/oder T3 zu Chondrozyten differenziert.
- Die erfindungsgemäßen Zellkonstrukte können vor allem zur patientenschonenden Herstellung von patientenspezifischen Transplantaten verwendet werden. Die  
30 Verwendung der Zellkonstrukte gemäß dem Hauptanspruch zur Herstellung von Transplantaten ist somit ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Dabei können je nach Bedarf formstabile Konstrukte unter Verwendung von festen polymeren Matrizen oder formflexible Konstrukte unter Verwendung von elastischen oder gelförmigen polymeren Matrizen erzeugt werden.

In einer speziellen Ausführungsform besteht die polymere Matrix aus biokompatiblen und bioabbaubaren Materialien, so daß nach einer Implantation des Zellkonstruktes keine unerwünschten Reaktionen des Körpers erzeugt werden und nur die  
5 gewünschten differenzierten Gewebezellen übrigbleiben.

Mit der Fixierung weiterer Zusatzstoffe, wie z. B. von Immunsuppressiva oder entzündungshemmenden Wirkstoffen, im Transplantat können die Erfolgsaussichten einer Transplantation weiter erhöht werden. Auch Faktoren die eine  
10 Geweberegeneration fördern, können zusätzlich im Transplantat enthalten sein, insbesondere um die Einbettung des Transplantates in das umliegende Gewebe zu fördern.

Die erfindungsgemäßen Zellkonstrukte können darüber hinaus als  
15 Ausgangsprodukte zur Herstellung gentechnisch veränderter Zellen verwendet werden. Von besonderem Interesse sind hier die Transfektion von Zellen mit Genen, die Wachstumsfaktoren, wie z. B. von IGF, TGF-beta, oder von Hormonen, wie z. B. Insulin oder des Parathyroid-Hormons, exprimieren oder regulieren. Von  
20 besonderem Interesse ist auch die Transfektion mit Genen, die Gendefekte kompensieren können und somit Krankheiten lindern können. So können die transformierten Zellkonstrukte pharmazeutische Wirkstoffe nach einer Implantation produzieren und freisetzen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der  
25 erfindungsgemäßen Zellkonstrukte zur Herstellung von analytischen oder diagnostischen Assays. Unter Verwendung von mesenchymalen Stammzellen enthaltenden Zellkonstrukten kann z. B. ein Assay zur Identifikation geeigneter Differenzierungsfaktoren und Bedingungen betrieben werden bzw. die Wirkung bereits Bekannter testen. Zellkonstrukte, die bereits stark differenzierte Zelltypen  
30 enthalten, werden dagegen bevorzugt in Assays zur Identifikation geeigneter Arzneimittelwirkstoffe eingesetzt.

Im folgenden werden zur Verdeutlichung der Erfindung einige Ausführungsbeispiele beschrieben.

### Beispiel 1: Kultivierung von Zellen des Haarfollikels

Die Kopfhaut gesunder Probanden wurde mit 70 % Ethanol desinfiziert und mit einem mit PBS getränktem Pflaster (10 min) aufgeweicht. Mit einer Pinzette wurden 10-20 Kopfhare langsam gezupft und in DMEM + 10 % FCS + Penicillin/Streptomycin gesammelt. Die anagenen Haare mit deutlich sichtbarem Haarfollikel werden selektiert und das Haar über dem Haarfollikel abgeschnitten. Die Haarfollikel werden kurz in einer Penicillin/Streptomycin-Lösung gebadet, mit Dispase (50 U/ml) behandelt und anschließend in eine mit Matrigel beschichtete 12-well Platte überführt. Um die für das Auswachsen nötige Adhärenz der Follikel an das Matrigel zu gewährleisten, wurden die Follikel mit einem Deckgläschen beschwert. In Gegenwart von DMEM, 20% FCS, bFGF (10 ng/ml), Retinsäure (1µM), 3 x nicht essentielle Aminosäuren, IGF-I (50 ng/ml), Hydrocortison (10 ng/ml), Pyruvat (1mM), T3 (0.1 nM), Transferrin (6.25 µg/ml), Selen (6.25 µg/ml) und Glucagon (1 µg/ml) (im folgenden als Kulturmedium bezeichnet) zugesetzt wurden die Haarfollikel bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach ca. 4 Wochen wuchsen die Follikel aus, so dass die Kulturen nach ca. 2 weiteren Wochen konfluent waren. Zur Subkultivierung wurden die Zellen mit 0.1 % Collagenase abgelöst und in obigem Medium propagiert.

### Beispiel 2: Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus Haarfollikelzellen

Die Selektion auf MSC erfolgt über Antikörper gekoppelte magnetische bead Separation entweder als Positiv- oder als Negativ-Selektionstechnik. Bei der Positiv-Selektion werden spezifische Oberflächenmoleküle der mesenchymalen Stammzellen gesucht, die auch bei mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikel angewendet werden können. Antikörper gegen CD13, CD49e, CD29, CD105 und smooth-muscle-alpha-actin erwiesen sich als geeignet. Mit Hilfe dieser Antikörper wurde über eine immunomagnetische Separation mit Dynabeads eine hochreine Population mesenchymaler Stammzellen aus Haarfollikeln hergestellt.

Um Veränderungen der Zellen bedingt durch das Binden der Antikörper bei der Positiv-Selektion zu verhindern, wurde parallel auch eine Negativ-Selektion mit anti CD24- und anti Cytokeratin 16-Antikörper durchgeführt.

Die gewonnenen Zellpopulationen der mesenchymalen Stammzellen waren bei beiden Selektionsmöglichkeiten in der Morphologie homogen und entsprachen morphologisch einem Fibroblasten-ähnlichen Zelltyp.

5

#### Beispiel 3: Herstellung von 3-dimensionalen Transplantaten in Collagenmatrices

10

In einer 24-well wurden 120  $\mu$ l Collagen (16 mg/ml 0.05% Eisessig) mit 70  $\mu$ l 3x konzentriertem MEM-Medium, 40  $\mu$ l FCS und 19  $\mu$ l 0.1 N NaOH und  $1 \times 10^5$  der selektionierten mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikel (150  $\mu$ l) vermischt. Bei 37 °C gelierte die Collagen-Matrix innerhalb von 10 min. Die Kultivierung der Zellen in der Collagenmatrix erfolgte mit Kulturmedium. Die Zellen nahmen in dieser Matrix eine fibroblastäre Morphologie an.

15

#### Beispiel 4: Herstellung von 3-dimensionalen Transplantaten in Alginatematrices

20

Low viscosity Alginate (1.0 % in 0.9 % NaCl) wurde mit  $4 \times 10^5$ /ml der selektionierten mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikel vermischt und auf ein coverslip pipettiert. Nach vorsichtigem Eintauchen in 100 mM  $\text{CaCl}_2$  gelierte Alginate. Das Alginategel wurde danach mehrmals mit 0.9 % NaCl gewaschen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Kulturmedium. Da Alginate sowohl immobilisierend als auch adhäsiv auf die Zellen wirkt, ist Alginate besonders gut für die Herstellung von Knorpel-Zellkonstrukten geeignet.

25

#### Beispiel 5: Herstellung von 3-dimensionalen Transplantaten in Fibrinmatrices

30

25  $\mu$ l Fibrinogen (21 mg/ml) wurde mit 100  $\mu$ l 300 mM  $\text{CaCl}_2$  und selektionierten mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikel ( $5 \times 10^5$ /ml) vermischt. Die Gelbildung wurde mit 4 U Thrombin gestartet und war nach 10 min bei 37 °C abgeschlossen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Kulturmedium. Fibrinmatrices eigneten sich besonders gut zur Herstellung von Zellkonstrukten mit Adipozyten.

Beispiel 6: Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikel zu Fettzellen.

Die selektionierten mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikel wurden in einer Dichte von 6000/cm<sup>2</sup> ausgesät und in Kulturmedium 2 Tage kultiviert. Danach wurden die Zellen 7 Tage unter serumfreien Bedingungen in DMEM/Ham s F12 3:1 + Panthotenat (4 µg/ml) + Transferrin (2 µg/ml) + Biotin (1µM) + Insulin (6 µg/ml) + bFGF (10 ng/ml), Heparin-Natrium 5000 (20 µg/ml) gehalten, wobei in den ersten 5  
5 Tagen Retinsäure (1 µM) zugesetzt wurde. Nach Erlangen der Konfluenz wurden die Zellen mit 500 µM IBMX und 100 nM Hydrocortison, Indomethacin (100 µM) differenziert. Mit einer Färbung der Fetttropfen mit Oil Red O konnte gezeigt werden,  
10 dass ca. 40 % der Zellen zu Adipocyten differenziert sind.

Beispiel 7: Differenzierung der selektionierten mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikeln zu Knorpelzellen.

15 Die selektionierten mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikeln wurden in Gegenwart von DMEM mit Insulin, Dexamethason und T3 zu Chondrozyten differenziert. Der Differenzierungserfolg wurde mit einer Safranin-O-Färbung überprüft.

## Patentansprüche:

- 5 1. Zellkonstrukte enthaltend eine Polymermatrix und mesenchymale Stammzellen aus Haarfollikeln oder daraus ableitbarer Zelltypen des Bindegewebes.
- 10 2. Zellkonstrukte gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die ableitbaren Zelltypen des Bindegewebes Knochen-, Knorpel-, Muskel-, Fettgewebe-, Bänder- Sehnen- oder Dermiszellen sind.
3. Zellkonstrukte gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymermatrix biokompatibel und bioabbaubar ist.
- 15 4. Zellkonstrukte gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymermatrix Collagen, Alginat, Agarose, Gelatine, Laminin, Fibronectin, Fibrin, Matrigel, Polysaccharide, Glycosaminoglykane, Proteoglykane, Poly-?-Hydroxysäuren, Polycarbonat, Polyamide, Polyanhydride, Polyestern, Polyurethane, Polyglycole, Polylactid-co-glycolid  
20 oder Polyethylenglykol-Polylaktid, Polyoxyethylen, Polyoxypropylen, Polyacrylate, Polymethacrylate, Polycyanoacrylate, Polyacetale, Polyvinylchloride, -flouride, -imidazole, Polyhydroxyvinyle, Polyvinylacetat, Polyethylenvinylacetate, chlorosulfinierte Polyolefine, Polyanhydride, Polyorthoester, Polycaprolactamen, Polylactide, Polyphosphine, Milchsäure-  
25 Polymerisate, Glycolsäure-Polymerisate, Copolymere dieser Verbindungen oder Mischungen dieser Polymere enthalten.
5. Zellkonstrukte gemäß einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzliche Trägermaterialien enthalten sind.
- 30 6. Zellkonstrukte gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche enthaltend weitere Zusatzstoffe.

7. Zellkonstrukte gemäß dem vorherigen Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß als Zusatzstoffe Wachstumsfaktoren, Wachstumshemmer, Hormone, Arzneimittelwirkstoffe, selektiv wirkende Zelladhäsiva, die Proliferation oder Differenzierung induzierende und fördernde bioaktive Faktoren, Vaskularisierungsfaktoren und/oder Immunmodulatoren enthalten sind.
- 5
8. Verfahren zur Reinigung von mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikeln umfassend folgende Verfahrensschritte:
- 10
- a) Separieren der Haarfollikel vom Resthaar,
  - b) Überführen der Haarfollikel auf eine feste oder gelförmige Oberfläche,
  - c) Inkubation mit einem FGF enthaltenden Medium bei einer Temperatur zwischen 25 und 40°C,
  - d) Herstellen einer Einzelzellsuspension durch Ablösen der ausgewachsenen Haarfollikel von der Oberfläche
  - 15 e) Propagierung der mesenchymalen Stammzellen in einem geeigneten Medium.
9. Verfahren gemäß dem vorherigen Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß gezupfte Haarfollikel verwendet werden.
- 20
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß Changs-Medium oder DMEM, DMEM/Ham's F12, M199, E199, MEM oder EMEM als Medium zur Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen verwendet wird.
- 25
11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß dem Medium zusätzlich bFGF, Serum, IGF-I, Insulin, Hydrocortison, Pyruvat, Retinsäure, nicht essentielle Aminosäuren, Triiodthyronin (T3), Transferrin, Selen und/oder Glucagon zugesetzt wird.
- 30
12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß dem Medium Differenzierungsfaktoren zugesetzt werden.

13 Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß eine Selektion der mesenchymalen Stammzellen mittels FACS, mittels immunomagnetischer Verfahren oder mittels Percoll-Dichtegradientenzentrifugation erfolgt.

5

14 Verfahren nach dem vorherigen Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß eine weitere Reinigung mittels immunologischer Negativ-Selektion unter Verwendung von Antikörpern gegen die epithelspezifischen Antigene CD24 oder Cytokeratin 16 erfolgt.

10

15. Homogene Zellkultur aus mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikeln erhältlich nach einem Verfahren gemäß der Ansprüche 8 bis 11 und zusätzlicher Aufreinigung mittels FACS, mittels immunomagnetischer Verfahren oder mittels immunologischer Negativ-Selektion.

15

16. Verfahren zur Herstellung von Zellkonstrukten gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine auf mesenchymale Stammzellen immobilisierend bzw. adhäsiv wirkende polymere Matrix mit einer Suspension enthaltend mesenchymale Stammzellen aus Haarfollikeln oder daraus differenzierten Bindegewebszellen inkubiert wird.

20

17. Verfahren gemäß dem vorherigen Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymerisation vor der Inkubation und/oder das Gelieren der Matrix vor oder während der Inkubation erfolgt.

25

18. Verfahren gemäß dem vorherigen Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellsuspension und/oder die polymere Matrix Differenzierungsfaktoren enthält.

30

19. Verfahren gemäß dem vorherigen Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß durch Verwendung von Differenzierungsfaktoren die mesenchymalen Stammzellen des Haarfollikels in mehr als einen Bindegewebetyp in vitro differenzieren.

20. Verwendung von Zellkonstrukten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung von Transplantaten zur Behandlung von Knochen-, Knorpel-, Muskel-, Fettgewebe-, Dermis-, Bänder- oder Sehnenschäden, -verlust oder Krankheiten.
- 5
21. Verwendung von mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikeln, daraus differenzierten Bindegewebszellen oder von Zellkonstrukten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung oder Durchführung diagnostischer oder analytischer Assays.
- 10
22. Verwendung von mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikeln, daraus differenzierten Bindegewebszellen oder von Zellkonstrukten gemäß dem vorherigen Anspruch zum Screening von Substanzen, die auf mesenchymale Stammzellen, Knochenzellen, Knorpelzellen, Muskelzellen, Fettgewebezellen, Dermiszellen oder sonstigen Bindegewebszellen biologisch aktiv wirken.
- 15
23. Verwendung von mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikeln, daraus differenzierten Bindegewebszellen oder von Zellkonstrukten gemäß den beiden vorherigen Ansprüchen zur Identifizierung von geeigneten Arzneimittelwirkstoffen.
- 20
24. Verwendung von mesenchymalen Stammzellen aus Haarfollikeln oder teilungsfähigen Vorläuferzellen von differenzierten Bindegewebszellen oder von Zellkonstrukten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung gentechnisch veränderter Zellen oder Zellkonstrukte.
- 25