



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 692 33 029 T2** 2004.03.11

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 592 521 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **692 33 029.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US92/05187**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **92 914 266.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 92/022584**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.06.1992**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **23.12.1992**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.04.1994**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **02.05.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.03.2004**

(51) Int Cl.7: **C12N 5/08**

C12N 5/20, C12P 21/08, G01N 33/53

(30) Unionspriorität:

716917 18.06.1991 US

(73) Patentinhaber:

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

(74) Vertreter:

LOUIS, PÖHLAU, LOHRENTZ, 90409 Nürnberg

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

gleich Anmelder

(54) Bezeichnung: **MENSCHLICHE MESENCHYM-STAMMZELLEN AUS DEM MARK UND MONOKLONALE ANTI-KÖRPER SPEZIFISCH GEGEN DIESE ZELLEN**

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

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

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch für von humanem Knochenmark abgeleitete Mesenchymzellen (d. h. Mesenchym-Stammzellen) sind, sowie die monoklonalen Antikörper, die durch das erfindungsgemäße Verfahren gebildet werden. Ferner ist die Erfindung auf hybride Zelllinien oder Hybridome abgestellt, die diese monospezifischen Antikörper synthetisieren und sezernieren, sowie auf die Verwendung der monoklonalen Antikörper für diagnostische und/oder therapeutische Zwecke.

[0002] Bei aus Knochenmark stammenden Mesenchymzellen handelt es sich um die formativen pluripotenten Hämocytoblasten, die im Knochen auftreten und von denen angenommen wird, daß sie zur Differenzierung zu beliebigen spezifischen Typen von Bindegewebe befähigt sind (d. h. die Gewebe des Körpers, die spezialisierte Elemente stützen; insbesondere adipöse, areolare, knochenartige, knorpelartige, elastische und faserige Bindegewebe), und zwar je nach verschiedenen Umgebungseinflüssen. Obgleich diese Zellen normalerweise im Knochenmark mit sehr geringer Häufigkeit auftreten, haben die Erfinder der vorliegenden Anmeldung ein Verfahren zur Isolierung, Reinigung und hochgradigen Replikation dieser Zellen in Kultur, d. h. in vitro, aufgefunden. Dieser Befund ist Gegenstand einer gleichzeitig anhängigen US-Patentanmeldung.

[0003] Die vorliegende Erfindung betrifft die Erzeugung von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch für Zelloberflächen-Determinanten der aus dem Knochenmark stammenden, humanen Mesenchymzellen sind. Da derzeit keine spezifischen Marker für aus dem Knochenmark stammenden Mesenchymzellen, wie Enzymaktivität, extrazelluläre Matrixmoleküle oder eine charakteristische Morphologie, bekannt sind, stellen die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper (die die Oberflächendeterminanten von aus dem Knochenmark stammenden Mesenchymzellen, jedoch nicht bestimmte andere Zellen wie hämatopoetische Zellen erkennen) wirksame, monospezifische Sonden dar, die zum Identifizieren, quantitativen Bestimmen und/oder Reinigen von aus den Knochenmark stammenden, humanen Mesenchymzellen aus Gewebeproben, wie Knochenmark, verwendet werden können.

[0004] Obgleich die Bildung von monoklonalen Antikörpern durch Fusionierung von Milzzellen immunisierter Mäuse und Myelomzellen, die in kontinuierlicher Kultur gezüchtet worden sind, beschrieben wurde (vgl. z. B. Kohler et al., Nature, Bd. 256 (1975), S. 495–497; Kohler et al., European Journal of Immunology, Bd. 6 (1976), S. 511–519; Galfre et al., Nature, Bd. 266 (1977), S. 550–552; und "Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis, Herausgeber R. Kennett, T. McKeam, K. Bechtol, Plenum Press, NY und London (1980)) und die Techniken für die chemische Auswahl von aus einer derartigen Fusion entstehenden Hybridomen sowie die anschließende Isolierung von einzelnen, Antikörper-sezernierenden Zellklonen für die Bildung von monoklonalen Antikörpern bekannt sind, wurden bisher keine Zelllinien erzeugt, die zur Synthese und Sekretion von monoklonalen Antikörpern befähigt sind, die nicht nur selektiv an aus dem Knochenmark stammende Mesenchymzellen und nicht an hämatopoetische Zellen sowie an andere eng verwandte Zellen binden, sondern auch selektiv zwischen aus dem Knochenmark stammenden und aus der Knochenhaut stammenden Stammzellen differenzieren. Die Fähigkeit dieser Antikörper zur selektiven Bindung an spezifische Typen von Mesenchym-Stammzellen macht sie zu hervorragenden Sonden zum Identifizieren, quantitativen Bestimmen, Isolieren und/oder Reinigen der Mesenchym-Stammzellen in Knochenmarkproben und dgl. Goshima et al. (Clin. Orthopedics and Related Research, Bd. 262 (1991), S. 298–311) beschreiben eine isolierte heterogene Population von Mesenchym-Stammzellen aus dem Knochenmark der Ratte.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

[0005] Die vorliegende Erfindung betrifft einen monoklonalen Antikörper, der eine humane Mesenchym-Stammzelle erkennt, die sich zu Zellen von mehr als einem Bindegewebetyp differenzieren können, wobei es sich bei dem Antikörper um den gleichen Antikörper handelt, wie er von der Hybridom-Zelllinie SH2 (hinterlegt bei ATCC unter der Hinterlegungsnummer HB 10743) oder von der Hybridom-Zelllinie SH3 (hinterlegt bei ATCC unter der Hinterlegungsnummer HB 10744) oder von der Hybridom-Zelllinie SH4 (hinterlegt bei ATCC unter der Hinterlegungsnummer HB 10745) gebildet wird. Die Antikörper erkennen ein Antigen an der Zelloberfläche von aus Knochenmark stammenden Mesenchym-Stammzellen, erkennen aber nicht ein Antigen an hämatopoetischen Zellen. Ferner ist die vorliegende Erfindung auch auf Hybridome abgestellt, die diese monoklonalen Antikörper synthetisieren und sezernieren, sowie auf ein Verfahren zur Gewinnung von humanen Mesenchym-Stammzellen, sowie auf eine isolierte homogene Population von humanen Mesenchym-Stammzellen, die durch dieses Verfahren isoliert worden ist.

[0006] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft verschiedene Verfahren zur Verwendung von humanen Mesenchym-Stammzellen, des monoklonalen Antikörpers gegen diese humanen Mesenchym-Stammzellen und einer therapeutischen Zusammensetzung, die diese humanen Mesenchym-Stamm-

zellen enthält.

[0007] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine isolierte homogene Population von humanen Mesenchym-Stammzellen sowie eine Zusammensetzung, die diese humanen Mesenchym-Stammzellen enthält.

Beschreibung der Zeichnung

[0008] Nachstehend findet sich eine kurze Beschreibung der Zeichnung, die zur Erläuterung der Erfindung vorgelegt wird und den Umfang der Erfindung nicht beschränken soll.

[0009] **Fig. 1** ist eine Phasenkontrastmikroskop-Aufnahme einer Monoschichtkultur von aus Knochenmark stammenden fibroblastenartigen Zellen (100 ×).

[0010] **Fig. 2** stellt eine Reihe von mikroskopischen Aufnahmen (Mallory-Heidenhain-Färbung) eines histologischen Schnittes eines Verbundstoffes, der gezüchtete humane Knochenmark-Fibroblasten und keramisches Material enthält, nach zweiwöchiger Inkubation in einer Nacktmaus dar. **Fig. 2A** zeigt die Bildung von neuem Knochen (B), der die Poren des keramischen "Geistes" (G) auskleidet (40 ×). **Fig. 2B** zeigt, daß das faserige Gewebe (F) in den meisten Poren vorlag, während Wirts-Gefäßgewebe (V) nur in einigen Poren, jedoch nicht in den anderen Poren vorlag (100-fache Vergrößerung des Kästchens von **Fig. 2A**). **Fig. 2C** zeigt, daß die Osteozyten (C) in klar sichtbarer Weise in der Knochenmatrix eingebettet waren. Mutmaßliche Osteoblasten (OB) kleideten die innere Oberfläche der neuen Knochenmatrix aus (400-fache Vergrößerung des Kästchens von **Fig. 2B**).

[0011] **Fig. 3** zeigt eine Reihe von mikroskopischen Aufnahmen (Mallory-Heidenhain-Färbung) eines histologischen Schnittes eines Verbundstoffes, der gezüchtete humane Knochenmark-Fibroblasten in keramischem Material enthält, nach 3-wöchiger Inkubation in einer Nacktmaus. **Fig. 3A** zeigt, daß Knochen (B) festgestellt wurde, der eine größere Anzahl von Poren des keramischen Geistes (G) als in **Fig. 2** (2-wöchige Inkubation) auskleidete (40 ×). **Fig. 3B** belegt, daß faseriges Gewebe (F) noch in den Innenräumen der meisten Poren verblieb. Ferner waren auch Wirtsgefäße (v) in einigen Poren vorhanden (100-fache Vergrößerung des Kästchens von **Fig. 3A**).

[0012] **Fig. 4** zeigt zwei mikroskopische Aufnahmen (Mallory-Heidenhain-Färbung) eines histologischen Schnittes von gezüchteten humanen Knochenmark-Fibroblasten in keramischem Material nach 6-wöchiger Inkubation in einer Nacktmaus. **Fig. 4A** zeigt, daß Knochen (B) festgestellt wurde, der den Großteil der Poren des keramischen Geistes (G) auskleidete (40 ×).

[0013] **Fig. 4B** zeigt faseriges Gewebe (F), das in den Innenräumen einiger Poren festgestellt wurde, jedoch hatten Knochenmark (M) und Gefäße (v) das faserige Gewebe in einem Großteil der Poren ersetzt (100-fache Vergrößerung des Kästchens von **Fig. 4A**).

[0014] **Fig. 5** ist eine photographische Aufnahme, die die positiven Ergebnisse des IgG ELISA-Tests von Beispiel 2 (III) (A) zeigt.

[0015] **Fig. 6A–6H** sind photographische Aufnahmen eines typischen Gefrierschnittes von pelletisierten, durch Kultur expandierten, von humanem Knochenmark abgeleiteten Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz (400 ×). Die **Fig. 6A** (Phase) und **6B** (Fluoreszenz), **6C** (Phase) und **6D** (Fluoreszenz) und **6E** (Phase) und **6F** (Fluoreszenz) und **6G** (Phase) und **6H** (Fluoreszenz) stellen die SB-1-Kontrolle, SH2-, SH3- und SH4-Antikörper dar, die positiv in bezug auf die Spezifität der IgG-Sekretion und die Spezifität gegenüber gefrorenen, pelletisierten Kultur-Knochenmarkzellen getestet wurden.

[0016] **Fig. 7A–7H** sind mikroskopische Aufnahmen, die die typischen positiven Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenzanalyse von lebenden, gezüchteten, aus Knochenmark stammenden Mesenchymzellen in Mikromasse zeigen (400 ×). **Fig. 7A** (Phase) und **7B** (Fluoreszenz), **7C** (Phase) und **7D** (Fluoreszenz) und **7E** (Phase) und **7F** (Fluoreszenz) und **7G** (Phase) und **7H** (Fluoreszenz) stellen die SB-1-Kontrolle, SH2-, SH3- und SH4-Antikörper dar, die positiv auf die Spezifität gegenüber lebenden, gezüchteten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen getestet wurden.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0017] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf den Befund, daß durch ein recht genaues Verfahren die Vorläuferzellen für verschiedene Typen von Bindegeweben aus Gewebe, wie Knochenmark, isoliert und gereinigt werden können. Diese Zellen werden vom Erfinder als "aus dem Knochenmark abgeleitete Mesenchymzellen" und/oder "Mesenchym-Stammzellen" bezeichnet. Diesbezüglich wurde festgestellt, daß zwar diese Vorläufer-Mesenchymzellen normalerweise im Knochenmark in sehr geringen Mengen vorhanden sind und daß diese Mengen mit dem Alter stark abnehmen (d. h. von etwa 1/10 000 Zellen bei einem relativ jungen Patienten auf 1/1 000 000 Zellen bei einem älteren Patienten), daß aber die Vorläuferzellen oder Mesenchym-Stammzellen bei Züchtung in einem speziellen Medium aufgrund ihrer selektiven Haftung an Substraten aus Gewebe isoliert und gereinigt werden können. Dieser Befund ist, wie vorstehend erläutert, Gegenstand

der gleichzeitig anhängigen US-Patentanmeldung.

[0018] Ferner wurde festgestellt, daß die isolierten und gereinigten, aus Knochenmark stammenden Mesenchymzellen in einem undifferenzierten Zustand durch mitotische Expansion in einem spezifischen Medium gezüchtet werden können. Diese Zellen können sodann geerntet und aktiviert werden, um sie durch eine Anzahl von Faktoren, einschließlich mechanische, zelluläre und biochemische Reize, zu Knochen, Knorpel und verschiedene andere Typen von Bindegewebe zu differenzieren.

[0019] Im Ergebnis wurde festgestellt, daß die vom Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen das Potential zur Differenzierung zu Zellen besitzen, die eine große Anzahl von Bindegewebe, wie Osteoblasten und Chondrozyten und möglicherweise Sehnen, Bänder und Haut bilden, und daß dieses Potential nach Isolierung und mehreren Populationsexpansionen in Kultur erhalten bleibt. Somit ergibt sich aufgrund der Möglichkeit zur Isolierung, Reinigung, starken Vermehrung und anschließenden Aktivierung der vom Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen (oder Mesenchym-Stammzellen) unter Differenzierung zu speziellen Typen von angestrebten Bindegewebe, wie knochenbildenden Osteoblastenzellen und dgl., ein sehr wirksames Verfahren zur Behandlung von Störungen des Skeletts und anderen Bindegewebe. Diese Befunde sind Gegenstand einer weiteren, ebenfalls gleichzeitig anhängigen US-Patentanmeldung.

[0020] Die vorliegende Erfindung ist auf die in vitro-Bildung von monoklonalen Antikörpern abgestellt, die spezifisch für die vorstehend beschriebenen isolierten, gereinigten und durch Kultur expandierten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen sind. Ferner ist die Erfindung auf die Verwendung der monoklonalen Antikörper und assoziierter Hybridome (d. h. fusionierte Myelom-Lymphozyten-Zellen, die die monoklonalen Antikörper und assoziierte Hybridome bilden) für diagnostische und/oder therapeutische Zwecke abgestellt. Die monoklonalen Antikörper können nicht nur zum Identifizieren, Zählen, Lokalisieren und Isolieren von Mesenchym-Stammzellen durch verschiedene Maßnahmen, wie Immunofluoreszenz, sondern auch zur Abgabe verschiedener pharmazeutischer Produkte und dgl. herangezogen werden.

A. Isolierung und Reinigung von aus Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen

[0021] Knochenmark ist das weiche Gewebe, das die medullären Hohlräume langer Knochen, einige Havers-Kanäle und Zwischenräume zwischen Bälkchen der Spongiosa oder des schwammartigen Knochens ausfüllt. Es gibt zwei Typen von Knochenmark: rotes, das in sämtlichen Knochen im frühen Lebensstadium und bei Erwachsenen an begrenzten Stellen (z. B. in schwammartigen Knochen) auftritt und mit der Bildung von Blutzellen (d. h. Hämatopoese) und Hämoglobin (d. h. roter Blutfarbstoff) befaßt ist; und gelbes Knochenmark, daß größtenteils aus Fettzellen (daher die gelbe Färbung) und Bindegewebe besteht.

[0022] Insgesamt ist Knochenmark ein komplexes Gewebe, das besteht aus: roten und weißen Blutkörperchen, ihren Vorstufen und einer Gruppe von Zellen, die aus Fibroblasten, Retikulozyten, Adipozyten und Endothelzellen, die ein als "Stroma" bezeichnetes Bindegewebe-Netzwerk bilden, bestehen. Zellen aus dem Stroma regulieren morphologisch die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen durch direkte Wechselwirkung über Zelloberflächenproteine und die Sekretion von Wachstumsfaktoren und sind an der Gründung und Stützung der Knochenstruktur beteiligt. Untersuchungen an Tiermodellen legen es nahe, daß Knochenmark "prästromale" Zellen enthält, die die Fähigkeit zur Differenzierung von Knorpel-, Knochen- und anderen Bindegewebezellen haben (J. N. Beresford, "Osteogenic Stem Cells and the Stromal System of Bone and Marrow", Clin. Orthop., Bd. 240 (1998), S. 270). Neuere Befunde weisen darauf hin, daß diese Zellen, die als pluripotente stromale Stammzellen oder Mesenchym-Stammzellen bezeichnet werden, die Fähigkeit besitzen, sich bei Aktivierung in mehrere verschiedene Typen von Zelllinien (Osteozyten, Chondrozyten, Adipozyten und dgl.) zu differenzieren. Jedoch sind die Mesenchym-Stammzellen im Gewebe nicht nur in äußerst geringen Mengen unter einer großen Vielzahl von anderen Zellen (d. h. Erythrozyten, Blutplättchen, Neutrophile, Lymphozyten, Monozyten, eosinophile, basophile, adipöse Zellen und dgl.) in einem mit dem Alter inversen Anteil vorhanden, sondern sie sind auch in Abhängigkeit vom Einfluß einer Anzahl von bioaktiven Faktoren zur Differenzierung in einem Sortiment von Bindegewebe befähigt.

[0023] Im Ergebnis haben die Erfinder ein Verfahren zum Isolieren und Reinigen der vom Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen aus Gewebe vor der Differenzierung und zum anschließenden Expandieren durch Kultur der vom Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen entwickelt und dadurch ein wertvolles Werkzeug zur Skeletttherapie geschaffen. Das Ziel einer derartigen Handlungsweise besteht darin, die Anzahl an potentiellen Reparaturzellen zu erhöhen und diese Zellen dazu zu verwenden, sie dem normalen Reparaturvermögen des Körpers zuzuführen und/oder dieses zu verstärken. Diesbezüglich können die vom Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen anschließend in großer Anzahl geerntet und auch auf Bereiche von Bindegewebebeschädigungen angewandt werden, um ein in vivo-Wachstum zur Regeneration und/oder Reparatur zu verstärken oder zu stimulieren, um die Implantathaftung an verschiedenen prothetischen Vorrichtungen durch anschließende Aktivierung und Differenzierung zu verbessern, um die hämatopoetische Zellbildung zu verstärken und dgl.

[0024] Dieser Linie folgend, haben die Erfinder verschiedene Verfahren zum Übertragen, Immobilisieren und

Aktivieren der durch Züchtung expandierten, gereinigten, vom Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen am Ort der Reparatur, Implantation und dgl. in Betracht gezogen, einschließlich die Injektion der Zellen am Ort eines Skelettdefekts, das Inkubieren der Zellen mit einer Prothese und das Implantieren der Prothese und dgl. Somit können durch Isolieren, Reinigen und erhebliches Vergrößern der Anzahl an Zellen vor der Differenzierung und durch anschließendes aktives Steuern des Differenzierungsvorgangs die durch Züchtung vermehrten, undifferenzierten, vom Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen für verschiedene therapeutische Zwecke herangezogen werden, beispielsweise um zelluläre, molekulare und genetische Störungen bei einer großen Anzahl von metabolischen Knochenkrankungen und Skelettdysplasien aufzuklären.

[0025] Wie im nachstehenden Beispiel 1 speziell erläutert, wurden die erfindungsgemäß isolierten und gereinigten, aus Knochenmark stammenden Mesenchymzellen aus Knochenmark, das aus einer Anzahl von verschiedenen Quellen erhalten wurde, abgeleitet, einschließlich Pfropfen von spongiösen Knochenstücken des Oberschenkelkopfes von Patienten mit degenerativen Gelenkerkrankungen bei Hüft- oder Knieoperationen, und aus abgesaugtem Knochenmark, das von normalen Spendern und onkologischen Patienten, bei denen Knochenmark für eine zukünftige Knochenmarktransplantation gewonnen worden war, stammte. Obgleich das gesammelte Knochenmark für eine Zellkulturtrennung je nach der Quelle des gewonnenen Knochenmarks (d. h. Anwesenheit von Knochenhäuten, peripherem Blut und dgl.) durch eine Anzahl von verschiedenen mechanischen Isolierungsverfahren präpariert wurde, bestand die kritische Stufe bei den Isolierungsvorgängen in der Verwendung eines speziell hergestellten Mediums, das Mittel enthielt, die nicht nur das Wachstum der vom Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen ohne Differenzierung, sondern auch die direkte Haftung ausschließlich der vom Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen an der Kunststoff- oder Glasoberfläche der Kulturschale ermöglichten. Durch Herstellung eines Mediums, das ein selektives Anhaften der erwünschten, vom Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen, die in den Knochenmarkproben in äußerst geringen Mengen vorhanden waren, ermöglichte, gelang es, die Mesenchym-Stammzellen von den übrigen Zellen (d. h. rote und weiße Blutkörperchen und dgl.), die im Knochenmark vorhanden waren, abzutrennen.

[0026] Diesbezüglich wurde festgestellt, daß ein Medium, das aus BGJ_b-Medium (Gibco, Grand Island, NY) mit getesteten und ausgewählten Chargen von 10% fötalem Kälberserum (J. R. Scientific, Woodland, CA oder andere Lieferanten) zur erfindungsgemäßen Verwendung gut geeignet war. Dieses Medium mit der Bezeichnung "komplettes Medium" enthielt Faktoren, die das Wachstum von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen ohne Differenzierung stimulierten und ein selektives Anheften durch spezielle Protein-Bindungsstellen und dgl. ausschließlich der vom Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen an den Kunststoffoberflächen von Petri-Schalen ermöglichten. Der spezielle Funktionsmechanismus des kompletten Mediums zur Erzielung der differentiellen Haftung ist derzeit nicht erklärbar; die Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet werden aber fortgesetzt.

[0027] Die Hauptkomponenten des BGJ_b-Mediums (Fitton-Jackson-Modifikation), das zur Zubereitung des kompletten Mediums verwendet wurde, sind nachstehend angegeben.

GBJ _b -Medium (Fitton-Jackson-Modifikation)	
Komponente	320-2591 1X Flüssigkeit
Anorganische Salze:	(mg/l)
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	90,00
MgSO ₄ · 7H ₂ O	200,00
KCl	400,00
KH ₂ PO ₄	160,00
NaHCO ₃	3500,00
NaCl	5300,00
Weitere Komponenten:	
Calciumlactat	550,00
D-Glucose	10000,00
Phenolrot	20,0
Natriumacetat	50,00
Aminosäuren:	
L-Alanin	250,00
L-Arginin	175,00
L-Arginin · HCl	---
L-Asparaginsäure	150,00
L-Cystein · HCl · H ₂ O	101,00
L-Glutamin	200,00
Glycin	800,00
L-Histidin	150,00
L-Histidin · HCl · H ₂ O	---
L-Isoleucin	30,00
L-Leucin	50,00
L-Lysin	240,00
L-Lysin · HCl	---
L-Methionin	50,00
L-Phenylalanin	50,00
L-Prolin	400,00
L-Serin	200,00
L-Threonin	75,00
L-Tryptophan	40,00
L-Tyrosin	40,00

GBJ _D -Medium (Fitton-Jackson-Modifikation)	
Komponente	320-2591 1X Flüssigkeit
Aminosäuren:	(mg/l)
DL-Valin	65,00
L-Valin	---
Vitamine:	
α -Tocopherolphosphat (Dinatriumsalz)	1,00
Ascorbinsäure	50,00
Biotin	0,20
D-Ca-pantothenat	0,20
Cholinchlorid	50,00
Folsäure	0,20
i-Inosit	0,20
Nicotinamid	20,00
p-Aminobenzoesäure	2,00
Pyridoxalphosphat	0,20
Riboflavin	0,20
Thiamin·HCl	4,00
Vitamin B ₁₂	0,04

[0028] Ferner wurde festgestellt, daß das Medium F-12-Nährstoffgemisch (Ham) (Gibco, Grand Island, NY) die erwünschten Eigenschaften für eine selektive Trennung von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen aufwies. Die Hauptkomponenten des F-12-Nährstoffgemisches (Ham) sind nachstehend angegeben.

F-12-Nährstoffgemisch (Ham)		
Komponente	320-1765 1X Flüssigkeit (mg/l)	430-1700 Pulver (mg/l)
Anorganische Salze:		
CaCl ₂ (wasserfrei)	---	33,22
CaCl ₂ · 2H ₂ O	44,00	---
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,00249	0,00249
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,834	0,834
KCl	223,60	223,60
KH ₂ PO ₄	---	---
MgCl ₂ (wasserfrei)	---	57,22
MgCl ₂ · 6H ₂ O	122,00	---
MgSO ₄ (wasserfrei)	---	---
MgSO ₄ · 7H ₂ O	---	---
NaCl	7599,00	7599,00
NaHCO ₃	1176,00	---
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	---	142,04
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	268,00	---
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,863	0,863
Weitere Komponenten:		
D-Glucose	1802,00	1802,00
Hypoxanthin	4,10	---
Hypoxanthin (Natrium- salz)	---	4,77
Linolsäure	0,084	0,084
Liponsäure	0,21	0,21
Phenolrot	1,20	1,20
Putrescin · 2HCl	0,161	0,161
Natriumpyruvat	110,00	110,00
Thymidin	0,73	0,73
Aminosäuren:		
L-Alanin	8,90	8,90
L-Arginin · HCl	211,00	211,00
L-Asparagin · H ₂ O	15,01	15,01
L-Asparaginsäure	13,30	13,30

F-12-Nährstoffgemisch (Ham)		
Komponente	320-1765 1X Flüssigkeit (mg/l)	430-1700 Pulver (mg/l)
Aminosäuren:		
L-Cystein	---	---
L-Cystein·HCl·H ₂ O	35,12	35,12
L-Glutaminsäure	14,70	14,70
L-Glutamin	146,00	146,00
Glycin	7,50	7,50
L-Histidin·HCl·H ₂ O	20,96	20,96
L-Isoleucin	3,94	3,94
L-Leucin	13,10	13,10
L-Lysin·HCl	36,50	36,50
L-Methionin	4,48	4,48
L-Phenylalanin	4,96	4,96
L-Prolin	34,50	34,50
L-Serin	10,50	10,50
L-Threonin	11,90	11,90
L-Tryptophan	2,04	2,04
L-Tyrosin	5,40	---
L-Tyrosin (Dinatriumsalz	---	7,78
L-Valin		
	11,70	11,70

[0029] Wie vorstehend ausgeführt, kann das komplette Medium je nach dem speziellen Typ der anfänglichen Ernteverfahren in einer Anzahl von verschiedenen Isolierungsverfahren herangezogen werden, um das gern-tete Knochenmark zur Zellkulturtrennung zu präparieren. Wenn dabei Pfropfen von spongiösem Knochenmark verwendet wurden, wurde das Knochenmark zu dem kompletten Medium gegeben und unter Bildung einer Dis-persion aufgewirbelt, die dann zur Abtrennung der Knochenmarkzellen von Knochenstücken und dgl. zentrifu-giert wurde. Die Knochenmarkzellen (die vorwiegend aus roten und weißen Blutkörperchen bestehen und äu-ßerst geringe Mengen an Mesenchym-Stammzellen und dgl. enthalten) wurden sodann durch Passage des kompletten Mediums, das die Knochenmarkzellen enthielt, durch Spritzen, die mit einer Reihe von Nadeln der Nr. 16, 18 und 20 ausgerüstet waren, dissoziiert. Es wird angenommen, daß der Vorteil, der durch die Verwen-dung des mechanischen Trennverfahrens im Gegensatz zu etwaigen enzymatischen Trennverfahren erzielt wurde, darin bestand, daß das mechanische Verfahren nur geringe zelluläre Veränderungen hervorrief, wäh-rend ein enzymatisches Verfahren zu Zellschädigungen führen könnte, insbesondere an den Proteinbindungs-stellen, die für das Anheften und die selektive Abtrennung der Kultur erforderlich waren und/oder an den Pro-teinstellen, die für die Bildung von monoklonalen Antikörpern, die für die von Knochenmark abgeleiteten Mes-enchymzellen spezifisch sind, benötigt wurden. Die einzige Zellsuspension (die aus etwa 50–100 10x⁶ nuklei-erten Zellen bestand) wurde sodann in 100 mm-Schalen ausgestrichen, um die von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen selektiv von den übrigen, in der Suspension vorhandenen Zellen abzutrennen und/oder zu isolieren.

[0030] Wenn abgesaugtes Knochenmark als Quelle für die von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen verwendet wurde, wurden die Knochenmark-Stammzellen (die nur wenig oder gar keine Knochen-späne, je-doch eine große Menge Blut enthielten) zum kompletten Medium gegeben und mit Percoll-Gradienten (Sigma, St. Louis, MO), die im nachstehenden Beispiel 1 näher beschrieben sind, fraktioniert. Die Percoll-Gradienten trennten einen großen prozentualen Anteil der roten Blutkörperchen und die mononukleierten hämatopeti-schen Zellen von der Blutplättchenfraktion niedriger Dichte, die die von Knochenmark abgeleiteten Mesen-

chym-Stammzellen enthielt, ab. Dabei bestand die Blutplättchenfraktion, die etwa $30\text{--}50 \times 10^6$ -Zellen enthielt aus einer unbestimmten Menge von Blutplättchenzellen, $30\text{--}50 \times 10^6$ nukleierten Zellen und nur 50–500 von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen, und zwar je nach dem Alter des Knochenmarkspenders. Die Blutplättchenfraktion von niedriger Dichte wurde sodann in der Petri-Schale zur selektiven Trennung auf der Grundlage der Zellhaftung ausgestrichen.

[0031] Dabei wurden die Knochenmarkzellen, die entweder aus spongiösem Knochen- oder Darmbeinaspirat (d. h. die primären Kulturen) erhalten wurden, in komplettem Medium gezüchtet und 1 bis 7 Tage unter den im nachstehenden Beispiel 1 aufgeführten Bedingungen zur Haftung an der Oberfläche der Petri-Schalen gebracht. Da nach dem dritten Tag keine Zunahme der Zellhaftung festgestellt wurde, wurde ein Zeitraum von 3 Tagen als Standardzeitraum gewählt, nachdem die nicht-haftenden Zellen von den Kulturen entfernt wurden, indem man das ursprüngliche komplette Medium durch frisches komplettes Medium ersetzte. Anschließende Austauschvorgänge des Mediums wurden jeweils nach 4 Tagen durchgeführt, bis die Kulturschalen einen konfluenten Zustand erreichten, was normalerweise 14 bis 21 Tage dauerte. Es ergab sich eine 10^3 - bis 10^4 -fache Zunahme an undifferenzierten Mesenchym-Stammzellen.

[0032] Die Zellen wurden sodann von den Kulturschalen unter Verwendung eines Trennmittels, wie Trypsin mit EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (0,25% Trypsin, 1 mM EDTA ($1 \times$), Gibco, Grand Island, NY) oder eines Chelatbildungsmittels, wie EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), abgelöst. Der durch die Verwendung eines chelatbildenden Mittels im Vergleich zur Verwendung von Trypsin erzielte Vorteil bestand darin, daß Trypsin möglicherweise eine Anzahl der Bindungsproteine von den Mesenchym-Stammzellen abspalten könnte. Da diese Bindungsproteine Erkennungsstellen enthalten, wurde dann, wenn die Erzeugung von monoklonalen Antikörpern angestrebt wurde, ein Chelatbildungsmittel, wie EGTA, und nicht Trypsin als Trennmittel verwendet. Das Trennmittel wurde sodann inaktiviert und die abgelösten, gezüchteten, undifferenzierten Stammzellen wurden für die weitere Verwendung mit komplettem Medium gewaschen.

[0033] Dabei wurde das Knochen- und Knorpel-Auskleidungspotential (d. h. das osteochondrogene Potential) von frischen und vermehrten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen unter dem Einfluß verschiedener biologisch aktiver Faktoren unter Anwendung zwei verschiedener in vivo-Tests an Nacktmäusen bestimmt (vgl. das nachstehende Beispiel 1). Ein Test beinhaltete die subkutane Implantation von poröser Calciumphosphat-Keramik, die mit gezüchteten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen beladen war. Der andere Test beinhaltete die peritoneale Implantation von Diffusionskammern, die mit gezüchteten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen inokuliert waren. Vollständiges Knochenmark und mit Percoll-Gradient abgetrennte Aspiratfraktionen wurden mit diesen in vivo-Tests analysiert. Eine histologische Bewertung zeigte eine Knochenbildung in der implantierten Keramik mit den gezüchteten Mesenchym-Stammzellen, die vom Oberschenkelkopf und vom Darmbeinkamm stammten. Bei keiner der keramischen Transplantate wurde Knorpel festgestellt. Im Gegensatz dazu gelang es den gleichen Zellen nicht, in den Diffusionskammern Knochen oder Knorpel zu bilden. Während von vollständigem Knochenmark nunmehr gezeigt wurde, daß es Knochen bildet, wenn es als Verbundtransplantat mit keramischen Material bei Nacktmäusen an einer subkutanen Stelle plaziert wird, ist die Menge an gebildetem Knochen erheblich niedriger als bei Verwendung der durch Kultur vermehrten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen.

[0034] Diese Ergebnisse zeigten, daß unter bestimmten Bedingungen durch Kultur vermehrte Mesenchymzellen die Fähigkeit besitzen, bei Inkubation als Transplantat in porösen Calciumphosphat-Keramikmaterialien zu Knochen zu differenzieren. Obgleich die internen Faktoren, die die Mesenchym-Stammzellen zur Differenzierung zu Knochenzellen anstatt zu Knorpelzellen beeinflussen, nicht bekannt sind, hat es den Anschein, daß die Tatsache, daß für die Mesenchymzellen Wachstums- und Nährstoffaktoren, die durch das Gefäßsystem in den porösen Calciumphosphat-Keramikmaterialien zugeführt wurden, verfügbar waren (was in der Diffusionskammer nicht der Fall war), die Differenzierung der Mesenchym-Stammzellen zu Knochen beeinflusste.

[0035] Somit lassen sich die isolierten und durch Kultur vermehrten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen unter bestimmten spezifischen Bedingungen und/oder unter dem Einfluß von bestimmten Faktoren dazu heranziehen, den angestrebten Zellphänotyp, der für die Bindegewebe-reparatur oder -regeneration und/oder für die Implantation verschiedener Prothesevorrichtungen erforderlich ist, zu differenzieren und zu erzeugen. Beispielsweise wurden unter Verwendung von porösen Keramikwürfeln, die in Kultur gezüchteten, humanen, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchym-Stammzellen gefüllt waren, eine Knochenbildung im Inneren der Poren des keramischen Materials nach subkutaner Inkubation in immunologisch verträglichen Wirten erreicht. In einer neueren Untersuchung, die im Laboratorium des Erfinders durchgeführt wurde (H. Ohgushi, V. Goldberg und A. Caplan, Acta Scandia, Bd. 60 (1989), S. 334–339) wurde Ratten-Knochenmark in einem Verbundtransplantat mit poröser Keramik zum Auffüllen eines Segmentdefekts im Oberschenkel der Ratte verwendet. Es zeigte sich, daß Knochenmasse die Poren des keramischen Materials füllte und das Keramik-Knochenmark-Transplantat am Wirtsknochen verankerte.

B. Herstellung von für von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen spezifischen, monoklonalen Antikörpern

[0036] Die vorliegende Erfindung ist auf die in vitro-Bildung von monoklonalen Antikörpern abgestellt, die für die von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen (Mesenchym-Stammzellen) spezifisch sind. Diese Mesenchymzellen wurden auf die vorstehend angegebene Weise isoliert, gereinigt und durch Züchtung vermehrt. Ferner ist die Erfindung auf die Verwendung der monoklonalen Antikörper und assoziierter Hybridome (d. h. fusionierte Myelom-Lymphozyten-Zellen, die die monoklonalen Antikörper bilden) für diagnostische und/oder therapeutische Zwecke abgestellt. Die monoklonalen Antikörper können nicht nur zum Identifizieren, Zählen, Lokalisieren und Isolieren von Mesenchym-Stammzellen durch verschiedene diagnostische Maßnahmen, wie Immunofluoreszenz, verwendet werden, sondern auch zur Abgabe verschiedener pharmazeutischer Produkte und für weitere therapeutische Anwendungen.

[0037] Die erfindungsgemäß zur Immunisierung verwendeten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen wurden gemäß dem vorstehend erläuterten Verfahren isoliert und gereinigt, mit der Ausnahme, daß nach der ersten Passage von Zellen, die bis zum konfluenten Zustand gezüchtet worden waren, die Zellen von der Oberfläche der Petri-Schale mit 0,5 mM EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in Moscona-Salzlösung (Ca-Mg-freie Tyrode-Salzlösung) unter einstündiger Behandlung abgelöst wurden. Da dabei EGTA als Freisetzungsmittel möglicherweise durch die Chelatbildung mit Mg^{+2} - und Ca^{+2} -Ionen wirkt, wurden die von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen zunächst mit Moscona-Reagens (Kochsalzlösung ohne Gehalt an Mg^{+2} - oder Ca^{+2} -Ionen) eingeweicht, um die im kompletten Medium vorhandenen Mg^{+2} - und Ca^{+2} -Ionen zu entfernen. Anschließend wurden sie eine Stunde in EGTA inkubiert. Die von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen wurden sodann mit Tyrode-Salz (Katalog Nr. T-2145, ohne Natriumbicarbonat, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) gespült, d. h. mit einer ausgewogenen Salzlösung, die bestimmte physiologische Faktoren, die für die in vitro-Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität von Zellen erforderlich sind, liefert, und in Tyrode-Salzlösung zur Injektion an eine Maus zur Bildung von Antikörpern rekonstituiert.

[0038] Dabei wurden vor der Immunisierung (oder Stimulierung) die von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen durch Passage durch eine Nadel Nr. 20 zu Einzelzellen dissoziiert. Eine weibliche Maus (CBGF1/j, Jackson Labs, Bar Harbor, Maine), die zu Beginn des Immunisierungsvorgangs etwa 14 Wochen alt war, wurde mit den durch Züchtung vermehrten, isolierten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen durch peritoneale Injektion gemäß dem im nachstehenden Beispiel 2 näher beschriebenen Immunisierungsverfahren immunisiert. Da dabei mindestens ein vorhergehender Versuch während der Immunisierung zur Bildung von monoklonalen Antikörpern, die für die von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen spezifisch sind, fehlgeschlag, wurden mehrere Faktoren in bezug auf das optimale Immunisierungsverfahren untersucht, um anti-Mesenchym-Stammzellen sezernierende Hybridome zu erzeugen. Zu diesen Faktoren gehörten: (1) Zelldissoziation (d. h. die Zellen wurden mit EGTA und anderen Mitteln anstelle von Trypsin dissoziiert) und (2) Konzentration des immunisierenden Antigens, (3) Quelle der verwendeten gereinigten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen (d. h. Zellen von mehreren verschiedenen Knochenmarkspendern wurden dazu verwendet, den Anteil von gemeinsamen Antigenen gegenüber spenderspezifischen Antigenen zu maximieren) und dgl. Das dabei aufgefundene Verfahren, das optimale Ergebnisse liefert, wird in Beispiel 2 ausführlich dargelegt.

[0039] Kurz zusammengefaßt, wurden etwa $2,0 \times 10^6$ durch Züchtung vermehrte, von Knochenmark abgeleitete Mesenchymzellen zunächst intraperitoneal der Maus injiziert. Der anfänglichen Injektion folgten vier Auffrischungsinjektionen von Knochenmarkzellen, die von mehreren humanen Spendern erhalten und in ähnlicher Weise zubereitet worden waren, im Abstand von jeweils einer Woche. Knochenmarkzellen von mehreren Spendern wurden verwendet, um monoklonale Antikörper zu erzeugen, die spezifisch für gemeinsame Epitope sind, die auf der Oberfläche von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen auftreten. Nach 25 Tagen wurden den Mäusen Blut entnommen. Serum aus diesem Blut wurde durch indirekte Immunofluoreszenz getestet, um festzustellen, daß der Immunisierungsvorgang erfolgreich eine Immunreaktion auf die gezüchteten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen in der Maus hervorgerufen hatte.

[0040] Nach erfolgreicher Beendigung des vierwöchigen Immunisierungsverfahrens wurde die Maus getötet. Milzzellen (insbesondere die Antikörper sezernierenden Plasmazellen, d. h. Lymphozyten, die Antikörper mit Spezifität für die von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen erzeugen) wurden mit SP 2/0-Myelomzellen (unsterbliche, Antikörper-sezernierende Tumorzellen, die von Dr. Douglas Fambrough, Carnegie Institute, Baltimore, Maryland erhalten worden waren) gemäß dem nachstehenden, sehr speziellen Fusionierungsverfahren fusioniert. Die verwendeten SP 2/0-Myelomzellen waren gegenüber einem Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT)-Medium aufgrund des Fehlens von Enzymen, wie Thymidin-kinase (TK), empfindlich. Infolgedessen starben SP 2/0-Myelomzellen ab, wenn sie einem HAT-selektiven Medium ausgesetzt wurden. Dies ermöglichte eine Selektion auf Hybride durch Züchtung der fusionierten und unfusionierten Zellen in HAT-Medium. Zusätzlich zu ihrer Empfindlichkeit gegenüber HAT-Medium synthetisierten die SP 2/0-Myelomzellen kein Immunoglobulin. Der Vorteil der Verwendung von kein Immunoglobulin sezernierenden Myelomzel-

len für die Fusion bestand darin, daß jegliches Immunglobulin, das mit dem Wachstum der aus der Fusion entstandenen Hybridome auftrat, einen ausschließlichen Beitrag der Milzzellen anzeigt.

[0041] Das für die Zellfusion zur Erzeugung der Hybridome angewandte Verfahren ist ausführlich im nachstehenden Beispiel 2 beschrieben. Im allgemeinen wurden jedoch die Milzzellen zunächst mit einem Drittel der Anzahl der Myelomzellen vermischt und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit Polyethylenglykol (PEG 1500, Boehringer Mannheim, Deutschland), das die Fusion förderte, behandelt. Das PEG wurde anschließend entfernt. Das Fusionsgemisch wurde zentrifugiert und das Pellet in spezifischem Wachstumsmedium (d. h. HAT-Medium, das die Myelomzellen abtötete, während es das Wachstum der Hybridome ermöglichte) mit Feeder-Zellen (z. B. peritoneale Mäuse-Makrophagen, die die Entwicklung von Hybridomen förderten) resuspendiert, in Aliquotanteilen ausgestrichen und gemäß dem im nachstehenden Beispiel 2 dargelegten Zufuhr- und Austauschschema inkubiert. Nach etwa 7 bis 10 Tagen traten in den Vertiefungen kleine Cluster oder Kolonien von Hybridomzellen (d. h. die immortalisierte Nachkommenschaft der Zellfusion zwischen den Tumorzellen und den in der Mäusemilz auftretenden β -Lymphozyten) auf. Da es sich bei der verwendeten Myelom-Zelllinie (d. h. SP 2/0-Myelomzellen) um eine Mutante handelte, die ihre Fähigkeit zur Bildung ihrer eigenen Antikörper verloren hatte, sezernierten die erhaltenen Hybridome nur die Antikörper der Antikörper sezernierenden Plasmazellen (α -Lymphozyten), die aus der immunisierten Maus erhalten worden waren.

[0042] Um nur die Hybridomkolonien zu identifizieren, die Antikörper mit Spezifität für die durch Züchtung vermehrten, isolierten und gereinigten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen synthetisierten und sezernierten, wurde eine Anzahl von vorläufigen Screeningtechniken (d. h. enzymgebundener Immunosorbens-Test, indirekter Immunfluoreszenz-Test und dgl.) zur Charakterisierung der Antikörper, die von den verschiedenen Hybridomen sezerniert wurden, verwendet. Die positiven Kontrollen für sämtliche Tests umfaßten zum Zeitpunkt der Milzentfernung erhaltene Seren der immunisierten Mäuse in verschiedenen Verdünnungen.

[0043] Speziell wurde eine Reihe von Tests durchgeführt, um Hybridome zu identifizieren, die Antikörper mit dem IgG-Isotyp sezernierten. Da dieses Isotyp der hauptsächlich sezernierende Antikörper war und auch am leichtesten zu reinigen und anzuwenden war, wurde er gegenüber IgM- und IgA-Isotypen bevorzugt, die möglicherweise auch die Spezifität für das gewünschte Epitop enthielten. Wie im nachstehenden Beispiel 2 ausgeführt, ergaben von den 764 Vertiefungen, die Hybridomwachstum zeigten (von ursprünglich 960 ausgestrichenen Vertiefungen) 245 Vertiefungen einen positiven Test auf sezernierende Antikörper mit dem IgG-Isotyp.

[0044] Der Kulturüberstand von Kolonien, die sich als positiv in bezug auf die Bildung von IgG-Antikörpern erwiesen, wurden sodann einem Screening mit gefrorenen Schnitten von pelletisierten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen durch indirekte Immunfluoreszenz unterzogen. Dieser Test wurde durchgeführt, um Antikörper zu identifizieren, die ausschließlich eine Bindung an Epitope an den von Knochenmark abgeleiteten Mesenchym-Stammzellen eingingen. von den 245 Vertiefungen, die sich als positiv in bezug auf die Bildung von IgG-Antikörpern erwiesen, ergaben nur 171 einen positiven Test auf die Bindung mit den von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen.

[0045] Da die vorstehende Screening-Stufe mit gefrorenen Schnitten von pelletisierten, gezüchteten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen durchgeführt wurde, gelang keine Differenzierung von Hybridomen, die Antikörper mit ausschließlicher Spezifität für die Zelloberfläche im Gegensatz zum intrazellulären Bereich der Zelle sezernierten. Die Hybridom-Überstände, die in bezug auf Reaktivität auf IgG positiv getestet worden waren, und gefrorene Schnitte von pelletisierten, gezüchteten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen wurden sodann mit lebenden, gezüchteten, humanen, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen in Mikromassenkulturen inkubiert (d. h. die gezüchteten Zellen wurden in kleinen Massen im Zentrum der Gewebekulturschalen ausgestrichen, wo die Zellen lebensfähig blieben und replizierten) und die Reaktivität wurde durch indirekte Immunfluoreszenz gemessen. Da es sich bei den analysierten Zellen um lebende Zellen handelte, identifizierte dieser Test Antikörper, die an die Oberfläche der Zelle banden, und führten zu negativen Ergebnissen, bei Antikörpern, die nur an intrazelluläre Epitope banden. Dies war wichtig, da es für die als wertvolle Differenzierungsmarker zu verwendenden monoklonalen Antikörper erforderlich war, daß sie für die Zelloberfläche spezifisch waren.

[0046] Wie nachstehend ausgeführt, ergaben von den 171 Vertiefungen, die ein positives Testergebnis in bezug auf die Reaktivität mit pelletisierten, gezüchteten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen zeigten, nur 15 Vertiefungen ein positives Testergebnis in bezug auf die Reaktivität mit lebenden, gezüchteten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen.

[0047] Die Hybridome, die jeweils zu einem positiven Testergebnis bei den vorstehenden vorläufigen Absuchvorgängen führten (d. h. 15 von 960 anfänglichen Vertiefungen), wurden sodann durch limitierte Verdünnung geklont, um zu gewährleisten, daß der anschließende Absuchvorgang an Hybridomen durchgeführt wurde, die nur aus einem einzigen Klon stammten. Da mehrfache Zelllinien in den ursprünglichen "parentalen" Vertiefungen vorhanden gewesen sein können (d. h. in der ursprünglichen Fusionsvertiefung können die Hybridomzellen von mehreren Fusionsprodukten abstammen und/oder der allmähliche Verlust von Chromosomen während der ersten Tage nach der Fusion kann eine weitere Heterogenität hervorgerufen haben), war eine Klonierung der Zellen erforderlich, um eine monoklonale Hybridom-Zelllinie zu erhalten. Eine ausführliche Beschreibung

des herangezogenen Klonierungsverfahrens ist im nachstehenden Beispiel 2 dargelegt. Das Klonierungsverfahren beinhaltet im Grundprinzip die Stufe des erneuten Ausstreichens der in den ursprünglichen parentalen Vertiefungen vorhandenen Zellen in einer Dichte von weniger als 1 Zelle pro Vertiefung. Als Folge der Bildung von Einzelzellkulturen handelt es sich bei sämtlichen Kolonien, die in den Vertiefungen gezüchtet wurden, um die Nachkommenschaft ausschließlich der ursprünglichen, erneut ausgestrichenen Zellen. Um die monoklonale Beschaffenheit zu gewährleisten, wurden mehrfache Klonierungen durchgeführt, bis 100% der Subklone über zwei Generationen hinweg positiv waren.

[0048] Die Zelllinien oder Klone wurden sodann in Gewebekulturen oder in vivo in syngenen oder immunoverträglichen Wirten vermehrt, wo sie weiterhin Antikörper gegen gereinigte, von Knochenmark abgeleitete Mesenchymzellen synthetisierten und sezernierten. Diese Antikörper wurden sodann aus den Gewebekulturzellen oder den Aszitesflüssigkeiten durch herkömmliche Techniken, wie Fällung, Ionenaustausch, Affinitätschromatographie und dgl. gewonnen.

[0049] Die geklonten Hybridome wurden anschließend gegen eine Reihe von Geweben mesenchymalen oder nicht-mesenchymalen Ursprungs einem Screening unterzogen, um den Grad der Spezifität der monoklonalen Antikörper gegenüber den gezüchteten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen zu bestimmen. Speziell wurde zur Feststellung, daß die monoklonalen Antikörper nicht gegen die hämatopoetischen Abstammungszellen in Knochenmark spezifisch waren (und somit zur Differenzierung von mesenchymalem Gewebe von den hämatopoetischen Zellen verwendet werden konnten), wurden vollständiges Knochenmark und mehrere Teilfraktionen von Knochenmark durch indirekte Immunfluoreszenz einem Screening gegen den Überstand von Hybridomkulturen unterzogen. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle 4 aufgeführt (vgl. Beispiel 2).

[0050] Um ferner festzustellen, ob die monoklonalen Antikörper mit Epitopen reagierten, die gemeinsam bei von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen und differenzierten Mesenchymgeweben vorlagen, wurden gefrorene Schnitte verschiedener Mesenchymgewebe, die bei chirurgischen Eingriffen oder bei Autopsien erhalten worden waren, durch indirekte Immunfluoreszenz einem Screening gegen den Überstand der Hybridomkultur unterzogen. Die positiven und negativen Reaktivitäten wurden festgehalten und sind in Tabelle 4 aufgeführt.

[0051] Um ferner Hybridome zu identifizieren, die Antikörper sezernierten, die nur für mesenchymale Stammzellen und/oder ihre geradlinigen Abkömmlinge spezifisch waren (d. h. Antikörper, die mit nichtmesenchymalen Gewebe keine Reaktion zeigten), wurden die Hybridomkultur-Überstände mit Schnitten von nicht-mesenchymalen Gewebe inkubiert. Die Antikörperreaktivität wurde durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle 5 aufgeführt.

[0052] Eine Analyse der Daten ergab, daß drei der erfindungsgemäß gebildeten, identifizierten und klonierten Hybridome (d. h. SH2, SH3 und SH4) für die Analyse von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen geeignet waren. Alle diese drei Hybridome sezernierten Antikörper, die mit Zelloberflächen-Epitopen an 99–100% der Zellen bei den Tests der durch Kultur vermehrten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen reagierten. Im Gegensatz dazu sezernierte jedes der drei Hybridome Antikörper, die mit weniger als 1% der Zellen bei Tests von vollständigem Knochenmark reagierten. Die Fähigkeit dieser Antikörper zur selektiven Bindung von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen und nicht von hämatopoetischen Zellen macht sie zu hervorragenden Sonden zur quantitativen Bestimmung der Anzahl von Mesenchym-Stammzellen in Knochenmarkproben und zur Reinigung von Mesenchym-Stammzellen aus Knochenmark.

[0053] Ferner zeigten alle drei Hybridome eine weitgehend negative Kreuzreaktivität beim Screening gegen eine Vielzahl von mesenchymalen und nicht-mesenchymalen Geweben, obgleich jeweils eine gewisse Kreuzreaktivität beobachtet wurde. Interessanterweise kam es zu einer Kreuzreaktion von SH3 und SH4 mit Zelloberflächen-Determinanten an gezüchteten Zellen, die sich von humaner Knochenhaut ableiteten. Diesbezüglich haben die Erfinder früher gezeigt, daß Knochenhaut eine weitere Quelle für Mesenchymzellen darstellt und die Kreuzreaktivität der vorstehenden Antikörper gegen Zelloberflächen-Epitope an Knochenhautzellen eine strukturelle Verwandtschaft zwischen den von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen und von Knochenhaut abgeleiteten Mesenchymzellen nahelegte. Jedoch reagierte der SH2-Antikörper nicht mit von Knochenhaut abgeleiteten Mesenchymzellen, obwohl er an von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen band. Diese Selektivität macht den SH2-Antikörper zur Unterscheidung zwischen von Knochenmark abgeleiteten und von Knochenhaut abgeleiteten Mesenchym-Stammzellen geeignet. Die Selektivität des SH2-Antikörpers läßt in Verbindung mit der Kreuzreaktivität von SH3 und SH4 darauf schließen, daß von Knochenmark und Knochenhaut abgeleitete Mesenchym-Stammzellen verwandt, jedoch nicht identisch sind.

[0054] Als SH2, SH3 und SH4 bezeichnete Zelllinienkulturen wurden bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852, hinterlegt und erhielten die ATCC-Hinterlegungsnummern HB 10743, HB 10744 bzw. HB 10745. Die Hinterlegungen dienen nur der Sicherstellung einer ausreichenden Offenbarung und sollen den Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung nicht auf die speziellen hinterlegten Materialien beschränken.

[0055] Die Ergebnisse zeigten, daß die gebildeten monoklonalen Antikörper Zelloberflächen-Determinanten

an von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen aber nicht an bestimmten anderen, eng verwandten Zellen, wie hämatopoetischen Zellen und dgl. erkannten. Da es keine spezifischen Marken für von Knochenmark abgeleitete Mesenchymzellen gibt, stellen die erzeugten monoklonalen Antikörper nunmehr wirksame monospezifische Sonden dar, die zum Identifizieren, quantitativen Bestimmen und Reinigen von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen verwendet werden können.

[0056] Insbesondere können die gebildeten monoklonalen Antikörper mit geeigneten radioaktiven, enzymatischen oder fluoreszierenden Markierungen gemäß herkömmlichen Verfahren markiert und/oder an geeignete feste Träger gebunden werden, was dem Fachmann geläufig ist. Diesbezüglich erläutert das nachstehende Beispiel 3 die Wirksamkeit der erzeugten monoklonalen Antikörper zum Identifizieren und/oder quantitativen Bestimmen des Vorliegens von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen in biologischen Proben, wie Knochenmark, unter Anwendung herkömmlicher immunologischer Verfahren. Beispielsweise können die monoklonalen Antikörper in Kombination oder Kupplung mit einem immunochemischen Reagens, wie Fluoresceinisothiocyanat, Peroxidase, alkalische Phosphatasen oder andere derartige Marker, verwendet werden. Außerdem können die monoklonalen Antikörper an bestimmte Substrate gebunden oder daran befestigt werden und dazu herangezogen werden, von Knochenmark abgeleitete Mesenchymzellen einzufangen, wenn Gewebeprobe, wie Knochenmark, in Kontakt mit den gebundenen monoklonalen Antikörpern gebracht werden. Die gebundenen Zellen können sodann nach bekannten Verfahren je nach der Natur der festen Phase und des Antikörpers von der festen Phase abgetrennt werden. Die befreiten Zellen können gewonnen und für verschiedene therapeutische Zwecke, z. B. zur Knochenregeneration und dgl., in Abhängigkeit von verschiedenen äußeren und inneren Faktoren verwendet werden.

[0057] Somit betrifft die vorliegende Erfindung beliebige Verfahren zur Verwendung der monoklonalen Antikörper zur Abtrennung von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen von anderen Zellen, wie hämatopoetischen Zellen, im Knochenmark. Beispielsweise ist eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung auf ein Verfahren zur Herstellung einer Population von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen abgestellt, das folgende Stufen umfaßt: Bereitstellen einer Zellsuspension von Gewebe mit einem Gehalt an Knochenmark; Kontaktieren der Zellsuspension mit monoklonalen Antikörpern, die ein Epitop auf den von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen, jedoch nicht ein Epitop an den hämatopoetischen Zellen erkennen; und Abtrennen und Gewinnen der durch die monoklonalen Antikörper gebundenen Zellen aus der Zellsuspension.

[0058] Ferner ist eine weitere Ausführungsform der Erfindung auf ein Verfahren zur Bereitstellung einer Population von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen abgestellt, das die folgenden Stufen umfaßt: Bereitstellen einer Zellsuspension von Gewebe mit einem Gehalt an Knochenmark; Kontaktieren der Zellsuspension mit an einer festen Phase gebundenen monoklonalen Antikörpern, die ein Epitop auf der Zelloberfläche der von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen, jedoch nicht ein Epitop an den hämatopoetischen Zellen erkennen; Abtrennen der nicht-gebundenen Zellen von den mit der festen Phase verknüpften monoklonalen Antikörpern; und Gewinnen der gebundenen Zellen aus der Flüssigkeit mit den verknüpften monoklonalen Antikörpern.

[0059] Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der ausführlichen Stufen der vorliegenden Erfindung.

Beispiel 1

Isolierung, Reinigung und Vermehrung in Kultur von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen

Gewinnen des Knochenmarks

[0060] Knochenmark in spongiösen Oberschenkelkopf-Knochenstücken wurde von Patienten mit degenerativen Gelenkerkrankungen bei Hüftgelenkoder Kniegelenkoperationen erhalten. Ferner wurde Knochenmark auch aus Darmbeinaspirat von normalen Spendern und Onkologiepatienten, deren Knochenmark für eine zukünftige Knochenmarktransplantation gewonnen wurde, erhalten. Sämtliche Onkologiepatienten wiesen maligne Zustände auf, die nicht in Beziehung zu den Stromalen Zellen standen, und die Stromalen Zellen exprimierten normale Karyotypen.

Präparation von Knochenmark für Zellkulturen

A. Aus Pfropfen von spongiösem Knochenmark

[0061] Pfropfen von spongiösem Knochenmark (0,5–1,5 ml) wurde in sterile Röhrchen gebracht und mit 25 ml BGJb-Medium (GIBC O, Grand Island, NY) mit ausgewählten Ansätzen von 10% fötalem Kälberserum (JR Scientific, Woodland, CA) (komplettes Medium) versetzt. Die Röhrchen wurden zum Dispergieren des Kno-

chenmarks aufgewirbelt und sodann 5 Minuten bei mit 1000 U/min zentrifugiert, um Zellen und Knochenstücke zu pelletisieren. Der Überstand und die Fettschicht wurden entfernt. Knochenmark und Knochen wurden in 5 ml komplettem Medium rekonstituiert und zum Suspendieren der Knochenmarkzellen aufgewirbelt. Die suspendierten Zellen wurden mit einer 10 ml fassenden Spritze, die mit einer Nadel Nr. 16 ausgestattet war, aufgezogen und in getrennte Röhrchen gebracht. Knochenstücke wurden in 5 ml komplettem Medium rekonstituiert. Die Knochenmarkzellen wurden auf die vorstehend angegebene Weise gewonnen. Das Gewinnen der Knochenmarkzellen wurde als beendet angesehen, wenn ein Pellet von gelbstichig-weißen spongiösen Knochenstücken den einzigen Rest im ursprünglichen Röhrchen darstellte. Knochenmarkzellen wurden zu einer einzigen Zellsuspension abgetrennt, indem man sie einer Passage durch Spritzen mit den Nadeln Nr. 18 und 20 unterzog. Die Zellen wurden 5 Minuten mit 1000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden die Fettschicht und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden in komplettem Medium rekonstituiert, mit einem Hämocytometer gezählt (rote Blutkörperchen wurden vor dem Zählen mit 4% Essigsäure lysiert) und in 100 ml-Schalen mit 50–100 10^6 nukleierten Zellen/Schale ausgestrichen.

B. Aus abgesaugtem Knochenmark

[0062] Abgesaugtes Knochenmark (5–10 ml) wurde in sterile Röhrchen gebracht und mit 20 ml komplettem Medium versetzt. Die Röhrchen wurden 5 min mit 1000 U/min zentrifugiert, um die Zellen zu pelletisieren. Der Überstand und die Fettschicht wurden entfernt. Die Zellpellets (2,5 bis 5,0 ml) wurden auf 70% Percoll-Gradienten (Sigma, St. Louis, MO) aufgesetzt und 15 min mit $460 \times g$ zentrifugiert. Die Gradienten wurden mit einer Pipette in drei Fraktionen aufgetrennt: obere 25% des Gradienten (Fraktion mit Zellen geringer Dichte – Blutplättchen), gepoolte Dichte = 1,03 g/ml; mittlere 50% des Gradienten (Zellen hoher Dichte – mononukleierte Zellen), gepoolte Dichte = 1,10 g/ml; und untere 25% des Gradienten (rote Blutkörperchen), gepoolte Dichte = 1,14 g/ml. Bei Vorversuchen wurde jeder dieser drei Pools getrennt in komplettem Medium in 100 mm-Schalen ausgestrichen. Es wurde beobachtet, daß anhaftende Zellen sich bei den Zellen geringer Dichte befanden. Zur Bildung von anhaftenden Zellkulturen für sämtliche anschließenden Versuche wurden nur Zellen mit geringer Dichte ausgestrichen.

Züchtung und Passage von stromalen Knochenmarkzellen

[0063] Knochenmarkzellen entweder aus dem spongiösen Oberschenkelkopfknochen oder dem Darmbeinaspirat wurden in komplettem Medium (d. h. BGJ_b-Medium mit 10% fötalem Kälberserum) bei 37°C in angefeuchteter Atmosphäre mit einem Gehalt an 95% Luft und 5% CO₂ gezüchtet. Bei Vorversuchen ließ man die Zellen 1, 3 oder 7 Tage vor dem anfänglichen Mediumtausch anhaften. Nach 1 Tag wurde keine Zunahme der Zellhaftung festgestellt. Daher wurde der Zeitraum von 1 Tag als Standardzeitspanne gewählt, bei der nicht-haftende Zellen von den Kulturen entfernt wurden, indem man das ursprüngliche Medium durch 7 ml frisches komplettes Medium ersetzte. Anschließende Austauschvorgänge des Mediums wurden alle vier Tage durchgeführt. Sobald die Kulturschalen einen konfluenten Zustand erreicht hatten, wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin mit einem Gehalt an 0,1 mM EDTA (GIBC O) 10–15 Minuten bei 37°C abgelöst. Die Wirkung von Trypsin wurde mit 1/2 Volumenteilen fötalem Kälberserum gestoppt. Die Zellen wurden gezählt, im Verhältnis 1 : 3 aufgeteilt und in 7 ml komplettem Medium erneut ausgestrichen. Aliquotmengen der Zellen wurden in 90% fötalem Kälberserum mit 10% DMS O (Einfriermedium) kryokonserviert.

Präparation von Kulturen für in vivo-Inkubationen in keramischen Materialien und Diffusionskammern

[0064] Gezüchtete Zellen wurden von den Platten auf die vorstehend für die Subkulturzüchtung angegebene Weise abgelöst. Nach Inaktivieren des Trypsins wurden die Zellen zweimal mit 10 ml serumfreiem BGJ_b-Medium gewaschen, gezählt und sodann mit serumfreiem BGJ_b auf die geeignete Konzentration eingestellt. Vollständiges Knochenmark und Percoll-Fraktionen wurden zweimal mit 10 ml serumfreiem BGJ_b gespült und mit serumfreiem BGJ_b auf die geeignete Konzentration eingestellt. Poröse Keramikwürfel (3 mm³), die aus 60% Hydroxylapatit + 40% β -Tricalciumphosphat zusammengesetzt waren (Zimmer Corporation, Warsaw, Indiana) wurden den Zellsuspensionen unter leichtem Vakuum zugesetzt und vor der chirurgischen Implantation etwa 90 Minuten eingeweicht.

[0065] Diffusionskammern wurden aus Lucit-Ringen und Millipore-Filtern gemäß Literaturangaben (Asthon et al., 1980) gebaut. Die Zellen wurden auf die vorstehend beschriebene Weise präpariert und den Kammern in 100–140 μ l serumfreiem BGJ_b-Medium zugegeben. Die Kammern wurden mit einem Tropfen Zement verschlossen und vor der chirurgischen Implantation 90 Minuten in serumfreies BGJ_b getaucht.

Chirurgische Implantation von keramischen Materialien und Diffusionskammern

[0066] Keramische Materialien: Nacktmäuse (National Institute of Health, nu/nu-Stamm) wurden mit Ether betäubt und auf den Bauch gelegt. Am Rücken wurden vier schmale Längsschnitte (5 mm) vorgenommen. Keramik-Knochenmark-Transplantate wurden in die Taschen eingeführt und möglichst weit lateral in den Taschen angeordnet. Die Schnitte wurden mit Autoclips (Becton Dickenson and Company, Parsippany, NJ) verschlossen. Jedes Paar von Taschen erhielt ein unterschiedliches Paar von Keramik-Knochenmark-Transplantaten, so daß vier verschiedene Proben (zwei Keramikwürfel pro Probe) pro Maus inkubiert wurden.

[0067] Diffusionskammern: Nacktmäuse wurden mit Ether betäubt und auf den Rücken gelegt. Schnitte wurden durch Haut und Peritoneum vorgenommen. Diffusionskammern wurden in die Peritonealhöhle eingeführt. Die Peritonea wurden mit Nahtmaterial und die Haut mit Autoclips verschlossen. Pro Maus wurde nur eine einzige Kammer eingeführt. Sie enthielt die identischen Zellen, wie sie in einem der vier Paare der Keramik-Knochenmark-Transplantate, die der gleichen Maus implantiert worden waren, zugesetzt waren.

Histologische Bewertung

[0068] 1 bis 8 Wochen nach der Implantation wurden die Nacktmäuse getötet und die Keramik-Knochenmark-Transplantate gewonnen (Tabelle 1 und Tabelle 3). Das keramische Material wurde in 10% gepuffertem Formalin fixiert, 7 Stunden in einem RD O-Rapid Bone Decalcifier-Gerät (Dupage Kinetics Laboratories, Inc., Plainfield, Illinois) entmineralisiert, in Paraffin eingebettet, seriell geschnitten (Dicke 5 µm) und mit Mallory-Heidenhain oder Toluidinblau gefärbt.

[0069] Die Diffusionskammern wurden 3–10 Wochen nach der Implantation gewonnen (Tabelle 2 und Tabelle 3). Die Kammern wurden in 10% gepuffertem Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, seriell geschnitten und mit Mallory-Heidenhain oder Toluidinblau gefärbt.

Tabelle 1
Inkubation von Verbundtransplantaten aus gezüchteten humanen Knochenmarkzellen und keramischem Material in
Nacktmäusen

Spender #	Alter/ Geschlecht	Ort	Durchgang #	Konzentration	1	2	3	4	5	6	7	8
1	50/M	FH	4	20x10 ⁶						+		
1	50/M	FH	5	2x10 ⁶			-		+	+		
1	50/M	FH	6	0,7x10 ⁶			+	+				+
2	65/M	FH	1	5x10 ⁶					++	+++		
2	65/M	FH	2	4x10 ⁶			+++			+++		+++
3	65/M	FH	P	6x10 ⁶	-	+				+++	+++	+++
4	66/M	FH	1	10x10 ⁶			+		+++	+++		+++
5	64/M	FH	P	8x10 ⁶	-	+	++			+++		+++
6	64/M	FH	1	4x10 ⁶		+				+++		+++
7	67/M	FH	P	7x10 ⁶	-	+	++	+++				
8	34/F	IC	1	4x10 ⁶			-		+			
9	42/M	IC	P	4x10 ⁶			-		-			
10	38/M	IC	P	4x10 ⁶			-		++			
11	45/M	IC	P	4x10 ⁶			+		++			

Durchgang #: Anzahl der Subkulturen Konz.: Konzentration der Zellen in Zellen/ml

Ort: Ort der Knochenmarkentnahme. FH: Oberschenkelkopf IC: Darmbeinkamm P: Primärkulturen.

- = Keine der Poren enthielt Knochen

+ = 0-30 % der Poren enthielten Knochen.

++ = 30-70 % der Poren enthielten Knochen

+++ = Mehr als 70 % der Poren enthielten Knochen.

Tabelle 2

Inkubation von gezüchteten humanen Knochenmarkszellen in Diffusionskammern

Spender #	Alter/ Geschlecht	Ort	Durchgang #	Zellen/ Kammer	3	6	8	10
1	50/M	FH	4	4x10 ⁶		-		
2	65/M	FH	1	3x10 ⁶		-		
3	65/F	FH	P	4x10 ⁶		-	-	
4	66/F	FH	1	4x10 ⁶	-			-
5	64/M	FH	P	4,5x10 ⁶		-		

P: Primärkultur

Durchgang #: Anzahl der Subkulturen

Ort: Ort der Knochenmarkentnahme.

FH: Oberschenkelkopf.

IC: Darmbeinkamm.

- = Keine der Kammern enthielt Knochen.

+ = 0-30 % der Kammern enthielten Knochen.

++ = 30-70 % der Kammern enthielten Knochen.

+++ = Mehr als 70 % der Kammern enthielten Knochen.

Ergebnisse

In vitro-Kulturen

[0070] Anhaftende, von Knochenmark abgeleitete Mesenchymzellen aus spongiösem Oberschenkelkopfknochen oder Darmbeinmaspirat weisen eine ähnliche Morphologie auf, sind fast vollständig fibroblastisch und weisen wenige adipozytische, polygonale oder runde Zellen auf (**Fig. 1**). Eine histochemische Färbung auf alkalische Phosphatase ergibt eine variable positive Reaktivität ohne feststellbaren Unterschied zwischen Zellen, die sich von spongiösem Knochenmark oder von Aspirat-Knochenmark ableiten. Anhaftende Zellen von beiden Erntestellen können keine extrazelluläre Matrix bilden, die metchromatisch mit Toluidinblau gefärbt wird oder positiv gemäß von Kossa ist. Eine positive Färbung würde die Möglichkeit anzeigen, daß Knorpel oder Knochengewebe in dieser Kultur gebildet worden war.

In vivo-Inkubation von gezüchteten Knochenmarkzellen mit keramischen Materialien

[0071] Calciumphosphat-Keramikblöcke wurden in Kulturmedium mit einem Gehalt an verschiedenen Konzentrationen von gezüchteten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen, die entweder aus spongiösem Oberschenkelkopfknochen oder Darmbeinmaspirat stammten, eingeweicht. Die Knochenmarkspender umfaßten sowohl männliche als auch weibliche Personen im Alter von 34 bis 67 Jahren (Tabelle 1). Zellen aus der primären Kultur und der ersten bis sechsten Passage wurden getestet, wobei die Zellbeladungskonzentration im Bereich von $0,7 \times 10^6$ bis 20×10^6 Zellen/ml lag. Keramikblöcke, die mit von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen beladen waren, wurden chirurgisch subkutan Nacktmäusen implantiert und 1 bis 8 Wochen inkubiert. Bei der Ernte wurden die keramischen Materialien fixiert und entmineralisiert. Die Anwesenheit von Knochen und Knorpel wurde durch histologische Bewertung festgestellt. Die Daten sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

[0072] Knochen (jedoch nicht Knorpel) wurde in den Poren in den einzelnen Keramik-Transplantaten festgestellt, sowie gezüchtete, von Knochenmark abgeleitete Mesenchymzellen aus spongiösem Oberschenkelkopfknochen. Die früheste Knochenbildung wurde nach zwei Wochen bei weniger als 30% der Poren der einzelnen keramischen Materialien festgestellt (**Fig. 2**). Nach 3 Wochen variierte die Anzahl an Poren, die Knochen enthielten, von weniger als 30% bis mehr als 70% (**Fig. 3**). Nach 6 Wochen enthielten bei einem Großteil der keramischen Materialien mehr als 70% der Poren Knochen (**Fig. 4**). Zwischen dem Alter der Spender und der Knochenbildung bestand kein offensichtlicher Zusammenhang. Im Gegensatz dazu hatte offensichtlich die Passagenanzahl einen gewissen Einfluß auf die Menge der Knochenbildung, wobei primäre Kulturen und Zellen aus frühen Passagen (1. bis 2. Passage) eine stärkere Knochenbildung als Zellen von späten Passagen (4. bis 6. Passage) ergaben. Die Knochenbildung scheint mit der Osteoblasten-Differenzierung und Knochenabscheidung auf den Oberflächen der keramischen Poren zu beginnen und schreitet offensichtlich in die Porenmitte fort, während Zellen die Oberfläche des neuen Knochenmatrix-Sekretosteooids oben auf der vorher abgeschiedenen Matrix verkleiden. Die Aufrechterhaltung von Transplantaten aus keramischem Material und aus von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen für Zeitspannen von 6 bis 8 Wochen ergab eine Knochenremodellierung. Es wurden Knochenmarkelemente in den Innenräumen der einzelnen Poren identifiziert (**Fig. 2C**).

[0073] Transplantate aus keramischen Materialien und gezüchteten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen aus Darmbeinmaspirat erzeugten in drei der vier getesteten Proben Knochen (Tabelle 1). In keinem der Transplantate wurde Knorpel festgestellt. Die Knochenbildung in den drei positiven Transplantaten war geringer als bei den keramischen Materialien, die mit gezüchteten Zellen aus Knochenmark aus spongiösem Oberschenkelkopf gepropft waren. Nach drei Wochen war Knochen in weniger als 30% der Poren enthalten. Nach 6 Wochen enthielten 30 bis 70% der Poren Knochen. Der Rest der Poren enthielt faseriges Gewebe und Gefäße, die mit hoher Wahrscheinlichkeit vom Wirt stammten.

In vivo-Inkubation von gezüchteten Knochenmarkzellen in Diffusionskammern

[0074] Das osteo-chondrogene Potential von gezüchteten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen wurde auch durch Beladen von Diffusionskammern mit Zellen und chirurgisches Implantieren auf intraperitonealem Wege in Nacktmäuse getestet. Die Zellen wurden aus den gleichen Kulturen, wie sie bei den keramischen Tests verwendet wurden, erhalten (Tabelle 2). Die Diffusionskammern wurden in die Peritonea der gleichen Nacktmäuse, die auf subkutanem Wege Transplantate aus Keramik und von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen erhalten hatten, implantiert. Nach 3- bis 10-wöchiger Inkubation wurden die Kammern gewonnen. Knochen- und Knorpelbildung wurde durch histologische Bewertung festgestellt. Im Gegensatz zum Vorliegen von Knochen in Transplantaten aus keramischem Material und gezüchteten Zellen aus spongiösem Knochen wurde bei keiner der Diffusionskammern, die gezüchtete, von spongiösem Knochenmark abgeleitete

Mesenchymzellen enthielten, nach 10-wöchiger Inkubation Knochen- oder Knorpelbildung festgestellt (Tabelle 2). Gezüchtete, von Darmbeinaspirat-Knochenmark abgeleitete Mesenchymzellen bildeten ebenfalls in den Diffusionskammern weder Knochen noch Knorpel. Statt dessen wurde in den meisten der Kammern spärliches hypozelluläres faseriges Gewebe festgestellt.

Erörterung

[0075] In diesem Beispiel wird gezeigt, daß humane, von Knochenmark abgeleitete Mesenchymzellen in reproduzierbarer Weise ein osteogenes Potential im Anschluß an ihre mitotische Vermehrung in Kultur aufweisen, wenn Sie in Nacktmäusen in poröser Calciumphosphat-Keramik getestet wurden. Eine Osteogenese wurde nicht festgestellt, wenn die gleichen Zellen in Diffusionskammern in den gleichen Nacktmäusen inkubiert wurden. Insgesamt belegen diese Daten, daß humanes Knochenmark Zellen enthält, die selektiert und in Kultur vermehrt werden können und das Potential zur Differenzierung zu Knochen aufweisen, wenn sie in vivo als ein Transplantat in poröser Calciumphosphat-Keramik inkubiert werden.

[0076] Die fehlende Knochenbildung in Diffusionskammern läßt darauf schließen, daß der Keramiktest ein empfindlicherer Test auf die Differenzierung von Knochen zu Knochenmarkzellen darstellt. Bab et al. (I. Bab, L. Passi-Even, D. Gazit, E. Sekeles, B. A. Ashton, N. Peylan-Ramu, I. M. Ulmanky, Ziv. und Osteogenesis in in vivo diffusion chamber culture of human marrow cells, *Bone and Mineral*, Bd. 4 (1988), S. 373) stellten fest, daß Knochen in vier von acht Diffusionskammern, die mit humanem Knochenmark von zwei Kinderspendern implantiert waren, auftrat. Jedoch konnten diese Autoren keinen Knochen feststellen, wenn vollständiges Knochenmark von älteren Spendern in Diffusionskammern in Nacktmäusen inkubiert wurden. Ferner konnte Davies (J. E. Davies, Human bone marrow cells synthesize Collagen, in diffusion chambers, implanted into the normal rat, *Cell. Biol. Int. Rep.*, Bd. 11 (2), (1987), S. 125) keine Knochenbildung in Diffusionskammern, die mit frischen Knochenmark eines 5 Jahre alten weiblichen Spenders inokuliert worden waren, feststellen. Auch von Ashton et al. (B. A. Ashton, F.A. Cave, M. Williamson, B. C. Sykes, M. Couch und J. W. Poser, Characterization of cells with high alkaline phosphates activity derived from human bone and marrow, preliminary assessment of their osteogenicity, *Bone*, Bd. 5 (1985), S. 313–319) konnten in Diffusionskammern, die mit gezüchteten Fibroblasten aus Verbundstücken aus Knochen und Knochenmark von Kindern und jungen Erwachsenen inokuliert worden waren, keine Knochenbildung feststellen.

[0077] Im vorliegenden Beispiel wurde in Diffusionskammern, die mit gezüchteten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen mehrerer älterer Spender inokuliert worden waren, keine Knochenbildung festgestellt. Jedoch wurde eine Knochenbildung in keramischen Materialien, die mit gezüchteten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen aus den gleichen Präparaten älterer Spender (34–67 Jahre) gefüllt waren, beobachtet, wobei mit diesen Zellen eine Knochenbildung in Diffusionskammern nicht stattfand. Diese Faktoren, die offensichtlich keramische Materialien zu empfindlicheren Vehikeln für die Knochendifferenzierung aus von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen machen, sind nicht geklärt, es kann jedoch eine direkte Zugangsmöglichkeit von Wachstums- und Nährstoffaktoren, die vom Gefäßsystem oder durch eine direkte Wechselwirkung mit Gefäßzellen bereitgestellt werden, zu den vom Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen gegeben sein, wobei diese Zugangsmöglichkeiten aufgrund der Diffusionskammergeometrie beschränkt sind (H. J. Jaroma und V. A. Rotsila, Effect of diffusion chamber pore size on differentiation and proliferation of periosteal cells, *Chlin. Orthop.*, Bd. 236 (1988), S. 258; J. E. Villanueva und M. E. Nimni, Promotion of calvarial cell osteogenesis by endothelial cells in diffusion chambers, *J. Cell. Biol.*, Bd. 109 (4), Teil 2, S. 42a (Zusammenfassung).

[0078] Die Frage des Ursprungs des in den keramischen Poren gebildeten Knochens ist wichtig, da die vom Spenderknochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen nicht physikalisch von den Wirtszellen getrennt sind, wie es bei Diffusionskammern der Fall ist. Neuere Daten von Goshima et al. (Jun Goshima, Victor M. Goldberg und Arnold I. Caplan, "The Origin of Bone Formed in Composite Grafts of Porous Calcium Phosphate Ceramic and Marrow Cells", (1989), zur Veröffentlichung eingereicht) belegen, daß es sich bei der Knochenbildung in keramischen Transplantaten um eine biphasische Erscheinung handelt, wobei die anfängliche Knochenbildung vom Spender stammt. Wenn dieser vom Spender abgeleitete Knochen partiell die Poren des keramischen Materials gefüllt hat, beginnen die vom Spender abgeleiteten Zellen den Spenderknochen zu remodellieren, womit die zweite Phase der vom Wirt abgeleiteten Knochenbildung einsetzt. Schließlich bildet sich in der Mitte ein Knochenmarkhohlraum, der mit vom Wirt abgeleiteten Knochen umhüllt ist, der sich auf die partiell remodellierten inneren Oberflächen des ursprünglichen Spenderknochen gelegt hat. Um den Ursprung des mit humanem Knochenmark gebildeten Knochens zu bestätigen, testeten die Erfinder gegenwärtig keramische Transplantate mit Spezies-spezifischen monoklonalen Antikörpern, die gegen humane Osteozyten gerichtet sind. Vorläufige Daten zeigen eine Antikörperreaktivität gegenüber den Osteozyten innerhalb der Transplantate, was darauf schließen läßt, dass der im porösen keramischen Material gebildete Knochen humanen Ursprungs ist und nicht von der Maus stammt.

[0079] Gezüchtete, von Knochenmark abgeleitete Mesenchymzellen, die aus spongiösem Oberschenkel-

kopfknochen stammen, sind offensichtlich stärker osteogen als gezüchtete von Knochenmark abgeleitete Mesenchymzellen aus abgesaugtem Darmbein-Knochenmark. 9 von 9 spongiösen Knochenmarkproben bildeten in keramischen Materialien Knochen, während 3 von 4 abgesaugten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellproben Knochen in keramischem Material bildeten. Ferner war Knochen in weniger Poren von keramischem Material vorhanden, das mit abgesaugten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen gepfropft war, als bei keramischem Material, das mit von Oberschenkelkopf-Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen gepfropft war. Die Gründe für die Unterschiede sind unklar, können jedoch mit der Nähe der geernteten stromalen Knochenmarkzellen mit der Knochenoberfläche im ursprünglichen Gewebe im Zusammenhang stehen. Ashton et al. (B. A. Ashton, E. C. C. Eaglesom, I. E. Bab und M. Owen, Distribution of fibroblastic colonyforming cells in rabbit Bone marrow and assay of their osteogenic potential by an in vivo diffusion chamber method, *Calcif. Tissue Int.*, Bd. 36 (1984), S. 83) zeigten, daß gezüchtete stromale Zellen von Kaninchen-Knochenmark sich je nach der ursprünglichen Nähe zur endostealen Oberfläche in bezug auf ihr in vitro-Kolonienbildungspotential und ihr osteogenes Potential in Diffusionskammern unterscheiden. von Zellen, die der endostealen Oberfläche am nächsten liegen, wurde gezeigt, daß sie eine 4-fach höhere Kolonienbildungswirkung im Vergleich zu Zellen des Kerns aufweisen. In der vorliegenden Untersuchung wurde Knochenmark aus spongiösem Knochen durch heftiges Aufwirbeln geerntet, um den spongiösen Knochen von den Knochenmarkzellen zu trennen. Dies ergibt vermutlich eine Population von Knochenmark, das in bezug auf Zellen, die vom Nahbereich der endostealen Oberfläche abgeleitet sind, angereichert ist, verglichen mit Aspirat-Knochenmark, wo eine heftige Trennung von Knochenmarkzellen von spongiösem Knochen nicht möglich ist. Die Erfinder stellten übereinstimmend eine höhere anfängliche Anzahl an anhaftenden Zellen aus Knochenmark von spongiösem Knochen, verglichen mit Aspirat-Knochenmark fest, was den Beobachtungen von Ashton et al. entspricht (B. A. Ashton, C. C. Eaglesom, I. E. Bab und M. Owen, Distribution of fibroblastic colony-forming cells in rabbit Bone marrow and assay of their osteogenic potential by an in vivo diffusion chamber method, *Calcif. Tissue Int.* Bd. 36 (1984), S. 83).

[0080] Im Fall von Knochenmark von erwachsenen Spendern wurde weder in dieser Untersuchung noch in der Untersuchung von Bab et al. (I. Bab, L. Passi-Even, D. Gazit, E. Sekeles, B. A. Ashton, N. Peylan-Ramu, I. Ziv und M. Ulmanky, Osteogenesis in in vivo diffusion chamber cultures of human marrow cells, *Bone and Minerals* Bd. 4 (1988), S. 373) eine Knorpelbildung festgestellt. Möglicherweise liegt eine altersabhängige Determination von von Knochenmark abgeleiteten Zellen für die osteogene Abstammung gegenüber der chondrogenen Abstammung vor. Alternativ können die Züchtungsbedingungen in der vorliegenden Untersuchung selektiv für Osteoprogenitorzellen gegenüber Mesenchym-Stammzellen sein oder können Mesenchym-Stammzellen vor einer in vivo-Analyse in keramischen Material zu einer osteogenen Abstammung treiben. Bezüglich dieser Möglichkeiten werden derzeit Untersuchungen durchgeführt.

[0081] Der wichtigste Befund aus den im vorstehenden Beispiel dargelegten Untersuchungen besteht darin, daß die Keramik-Transplantationstechnik einen empfindlichen Test zum Identifizieren des osteogenen Potentials von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen bietet. Von Bedeutung ist, daß derartige osteogene Zellen von humanen Spendern aus einem breiten Altersbereich erhalten werden können. Diese Beobachtungen zeigen, daß die ex vivo-Vermehrung von Zellen, die ein osteogenes Potential besitzen, in klinischen Situationen, bei denen eine Erhöhung der Osteogenese erforderlich ist, eingesetzt werden kann.

Beispiel 2

Herstellung von klonierten Hybridomen von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen

I. Immunisierung

[0082] Eine weibliche Maus (CB6F/J Jackson Labs, Bar Harbor, Maine), die zu Versuchsbeginn ein Alter von etwa 14 Wochen aufwies, wurde durch peritoneale Injektionen von gezüchteten, von humanem Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen, die von mehreren Spendern erhalten worden waren, immunisiert (vergleiche die nachstehende Tabelle 3). An die anfängliche Injektion schlossen sich vier Auffrischungsinjektionen im Abstand von 1 Woche an. Knochenmarkzellen von mehreren Spendern wurden zur Erzeugung von monoklonalen Antikörpern, die für gemeinsame Erkennungsstellen an den Mesenchym-Stammzellen spezifisch waren, verwendet.

Tabelle 3

Hintergrundinformation über Knochenmarkspender, die bei der Mäuseimmunisierung eingesetzt wurden				
Präparat #	Spendedatum	Geburtsdatum	Typ des Präparats	Klinische Diagnose
H-20	12/16/88	04/09/37	Pfropfen	DJD
H-21	01/05/89	01/01/38	Pfropfen	DJD
H-23	01/12/89	02/23/09	Pfropfen	DJD
H-27	01/17/89	12/12/25	Pfropfen	DJD
H-31	01/19/89	etwa 1929	Pfropfen	DJD

Pfropfen = ein Pfropfen von spongiösem Knochen und Knochenmark, der bei einer operativen Hüfttransplantation aus dem verworfenen Oberschenkelkopf ausgestochen wird

DJD = Degenerative Gelenkerkrankung

Immunisierungsschema

A. Tag 0: Die anfängliche Injektion bestand aus Zellen vom Spender H-20, die gemäß dem in Beispiel 1 dargestellten Verfahren isoliert und gereinigt worden waren. Zellen von Primärkulturen wurden bis zur konfluenten Beschaffenheit gezüchtet und erneut ausgestrichen (1 : 3). Diese der ersten Passage unterworfenen Zellen wurden ebenfalls bis zur konfluenten Beschaffenheit gezüchtet und sodann von der Platte mit 0,5 mM EGTA in Moscona eine Stunde abgelöst. Die Zellen wurden zweimal mit Tyrodes gespült und sodann in 500 µl Tyrodes zur Injektion an die Maus rekonstituiert. Die Zellen wurden durch Passage durch eine 1 ml fassende Spritze, die mit einer Nadel Nr. 20 ausgerüstet war, in einzelne Zellen dissoziiert und sodann in die Peritonealhöhle der Maus injiziert. Etwa $2,0 \times 10^6$ Zellen wurden verwendet. Sämtliche anschließenden Auffrischungsinjektionen wurden auf ähnliche Weise zubereitet.

B. Tag 7: Die Zellen stammten von den Spendern H-21 und H-23 und wurden nach konfluenten Beschaffenheit der Primärkulturen gesammelt. Von jedem Spender wurde in etwa eine gleiche Anzahl an Zellen bei einer Gesamtzellzahl von $1,5 \times 10^6$ verwendet.

C. Tag 15: Die Zellen stammten vom Spender H-27 nach Primärkultur. Gesamtzellzahl = $1,0 \times 10^6$.

D. Tag 22: Die Zellen stammten vom Spender H-31 im konfluenten Zustand nach der ersten Passage. Gesamtzellzahl = $1,0 \times 10^6$.

E. Tag 29: Die Zellen stammten von Spender H-31. Die Zellen wurden nach der ersten Passage in konfluentem Zustand geerntet und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Unmittelbar vor der Injektion wurden die Zellen aufgetaut und zubereitet und gemäß den Angaben zum Tag 0 injiziert. Gesamtzellzahl = $2,0 \times 10^6$.

[0083] Am Tag 25 wurde Blut aus der Schwanzvene der Maus entnommen. Serum wurde durch Abzentrifugieren der Blutzellen hergestellt. Das Serum wurde mit einem gefrorenem Schnitt von pelletisierten, gezüchteten humanen Knochenmarkzellen inkubiert und durch indirekte Immunofluoreszenz getestet. Das Serum reagierte positiv mit den Zellen im gefrorenen Schnitt, was darauf hindeutet, daß die Immunisierungsbehandlung in erfolgreicher Weise eine Immunreaktion der Maus gegen die gezüchteten Zellen hervorgerufen hatte.

II. Fusion

[0084] Nach erfolgreicher Beendigung des vierwöchigen Immunisierungsvorgangs wurde die immunisierte Maus getötet. Ihre Milzzellen wurden mit SP 2/0-Myelomzellen (erhalten von Dr. Douglas Fambrough, Carnegie Institute, Baltimore, Maryland) gemäß den nachstehend dargelegten speziellen Verfahren fusioniert. Um jedoch konditioniertes Medium für die während des Fusionsvorgangs gebildeten Hybridomzellen bereitzustellen, war es erforderlich, mindestens einen Tag vor der Fusion eine "Feeder-Schicht", die konditioniertes Medium und peritoneale Makrophagen umfaßte, herzustellen. Die peritonealen Makrophagen wurden zugesetzt, um die Kulturschalen durch phagozytische Wirkung zu reinigen. Die folgenden Verfahren wurden zur Herstellung der Feeder-Schicht und zur Herstellung der SP 2/0-Myelomzellen für die Fusion herangezogen.

A. Herstellung von Feeder-Zellen

[0085] Da lymphoide Zellen häufig bei Züchtung in geringer Dichte schlecht wachsen oder absterben (die Gründe hierfür sind nicht klar ersichtlich, können aber mit den Anforderungen in Bezug auf "Wachstumsfaktoren" oder mit den Problemen durch toxische Nebenprodukte des Gewebekulturgefäßes im Zusammenhang stehen), war die Zugabe einer langsam wachsenden oder nicht-wachsenden Population von Zellen (üblicherweise als "Feeder" bezeichnet) erforderlich. Die beim vorliegenden Verfahren verwendeten Feeder-Zellen wurden gemäß dem folgenden Verfahren hergestellt.

1. 0,34 M (11–64 g/100 ml) Saccharose-Lösung wurde steril filtriert. Die Lösung wurde in 15 ml-Aliquotanteilen bei 4°C aufbewahrt.
2. Eine Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet und vollständig in 70% Et OH getaucht. Nach mehreren Minuten in Et OH wurde die Maus entnommen und in supiner Stellung auf ein Styrolschaum-Reagenzglasgestell gelegt.
3. In der abdominalen Haut wurde ein Mittellinienschnitt vorgenommen. Durch stumpfe Austrennung wurde die Haut vom Peritoneum weggezogen, um sicherzustellen, daß die dünne Membran nicht punktiert wurde.
4. Unter Verwendung einer Nadel Nr. 20 wurden 5 ml Saccharose in das Peritoneum injiziert.
5. Die Nadel wurde entfernt und das Abdomen vorsichtig massiert, um die Makrophagen freizusetzen. Sodann wurde eine Nadel Nr. 23 in das Abdomen eingeführt und die 5 ml Saccharose wurden langsam gewonnen.
6. Die Stufen 4 und 5 wurden zweimal wiederholt. Die Makrophagen wurden vereinigt.
7. Die Zellen wurden 5 Minuten mit 1000 U/min (200 g) an einem Sorvall GLC-4-Gerät mit einem H1000-Rotor (r = 18,6 cm) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 15 ml D-MEM (nach Dulbecco modifiziertes Eagle-Medium, Gibco, Grand Island, NY, #430-2100)/10% FBS (fötales Kälberserum, Gibco, #430-2100) resuspendiert und zentrifugiert.
8. Das Pellet wurde in 2 ml Medium gegeben. Die Zellzahl wurde ermittelt. Es ergab sich eine durchschnittliche Ausbeute von 3 bis 6 Millionen Zellen.
9. Die Zellen wurden in Super-HAT-Medium in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml resuspendiert. Super-HAT-Medium bestand aus 400 ml D-MEM, 120 ml FBS, 60 ml NCTC-109-Hybridoma-Growth-Supplement (M. A. Bioproducts #12-923A), 12 ml 50 × HAT oder H + T (Boehringer Mannheim, #644579 oder #623091), 6 ml Lösung I (ergänzt D-MEM, um einen geeigneten pH-Wert und ein verstärktes Wachstum der Hybridome zu erzielen, mit einem Gehalt an 0,2 Einheiten/ml Insulin, 0,5 mM Na-Pyruvat und 1,0 mM Oxalessigsäure), 6 ml L-Glutamin (Gibco #320-5030) und 0,6 ml Gentamicin (M. A. Bioproducts #17-5182).
10. 0,1 ml der Suspension wurden sodann jeweils in eine Vertiefung von 10 Kulturschalen mit 96 Vertiefungen gegeben. 10 Schalen wurden für die Fusion verwendet.
11. Die Vertiefungen wurden in einem Feuchtigkeitsinkubator bei 37°C mit 5% Kohlendioxid und 95% Luft aufbewahrt.

B. Präparation von SP 2/0-Myelomzellen

[0086] Die von Dr. Fambrough erhaltenen Myelomzellen wurden bewertet, um sicherzustellen, daß sie in Kultur vor dem Fusionsvorgang mindestens zwei Monate ein gutes Wachstum zeigten. Die Zellen wurden einer Passage in D-MEM-Medium (gemäß Dulbecco modifiziertes Minimal-Eagle-Medium)/10% FBS/8-Azaguanin (Gibco, Grand Island, NY) unterzogen, um eine Selektion auf HAT-empfindliche Zellen durchzuführen. Eine Passage von Myelom- oder Hybridomzellen wurde durch serielle Verdünnung eines Aliquotanteils über 12 Vertiefungen einer Platte mit 48 Vertiefungen erreicht.

[0087] Zwei Wochen vor der Fusion wurde das Medium stufenweise auf 20% FBS eingestellt. Eine Woche vor der Fusion wurden mehrere große Kolben (75 cm², 20 ml Medium) von SP 2/Os initiiert. Zu diesem Zeitpunkt wurden zwei Reihen einer Platte mit 24 Vertiefungen mit SP 2/Os in niedriger Dichte beimpft. Einen Tag später wurde das Medium in einer Reihe durch das gleiche Super-HAT-Medium, das für die Fusion verwendet wurde, ausgetauscht. (Vor der Verwendung eines jeden Mediums wurde eine Probe aus jeder Flasche auf Sterilität und bakterielles Wachstum getestet). Innerhalb von 24 Stunden war ein Großteil der mit HAT versorgten Zellen abgetötet. Nach 72 Stunden waren sämtliche mit HAT (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin) versorgten Zellen abgetötet. Mit SP 2/0-Wachstumsmedium versorgte Zellen blieben gesund.

[0088] Zwei Tage vor der Fusion wurden die SP 2/Os in drei neue Flaschen mit verschiedenen Verdünnungen (d. h. 1 : 20, 1 : 10, 1 : 8, 1 : 4) aufgeteilt. Die Zellen in den verschiedenen Verdünnungen wurden genau beobachtet. Für die Fusion wurden nur die Zellen ausgewählt, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. In der ausgewählten Population gab es keine abgetöteten oder sterbenden Zellen. Eine Flasche, die eine gute Dichte in der logarithmischen Phase aufwies, enthielt Zellen in einer Gesamtzahl von 1 bis 10 Millionen Zellen.

C. Fusionsverfahren

Materialien – pro Milz

[0089] Schneideschere, große Pinzette, Schneidepinzette #5, alle in 70% Et OH
 Gefrostete Glas- Objektträger in 70% Et OH
 Ein großes Uhrglas (steril) mit Korkständer
 Mehrere 100 ml-Petri-Schalen
 Zehn Kulturschalen mit 96 Vertiefungen mit Feeder-Zellen (auf die vorstehende weise hergestellt)
 SP 2/0-Myelomzellen (auf die vorstehende Weise hergestellt)
 Wasserbad mit 37°C
 1 ml PEG 1500 mit 37°C (Polyethylenglykol, 2 g in 75 mM HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)
 10 ml D-MEM/10% FBS/2X Antibiotikum
 100 ml D-MEM (serumfrei) auf Eis
 25 ml D-MEM (serumfrei) mit 37°C
 Zwei 50 ml fassende Kunststoff-Zentrifugenröhrchen (steril)
 Hämozytometer
 Super-HAT mit 37°C
 4% Essigsäure
 Zell-Einfriermedium mit 37°C.

Verfahren

1. Zwei gefrostete Objektträger wurden aus dem Et OH entnommen und unter einem Abzug in einer sterilen Petri-Schale gelegt und an der Luft getrocknet.
2. Die Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet und in 70% Et OH getaucht. Nach mehreren Minuten wurde die Maus mit ihrer linken Seite nach oben auf das Uhrglas gelegt.
3. Eine sterile 100 mm-Petri-Schale mit 5 ml D-MEM/10% FBS/2 × Antibiotikum wurde für die Aufnahme der Milz bereitgestellt.
4. Die Haut und anschließend die abdominale Wand wurden am linken oberen Quadranten der Maus geöffnet.
5. Die Milz wurde entfernt und in die Petri-Schale gelegt. Unter Verwendung der Schneidepinzette wurde so viel weißes, faseriges Bindegewebe wie möglich entfernt. Die gereinigte Milz wurde in eine weitere Petri-Schale mit D-MEM/10% FBS/2X Antibiotikum gelegt.
6. Etwaiges restliches Et OH wurde von den Glasobjektträgern durch Flammbehandlung abgetrocknet. Die Objektträger wurden sodann zum Aufschneiden der Milz in drei Stücke verwendet. Jedes dieser Stücke wurde zwischen den gefrosteten Enden der Objektträger vorsichtig gerieben, um die Milzzellen freizusetzen. Die Zellsuspension wurde sodann mit einer Pipette angesaugt. Große Stücke von Bindegewebe sanken sofort zur Spitze. Diese wurden sodann verworfen. Die restliche Zellsuspension wurde in ein steriles 50 ml-Zentrifugenröhrchen übertragen.
7. Weitere 5 ml D-MEM/10% FBS/2X Antibiotikum wurden in die Petri-Schale gegeben. Diese Schale wurde zur Aufnahme der restlichen Zellen verwendet. Die Lösung wurde auf die vorstehend angegebene Weise pipettiert. Die Zellen wurden in ein 50 ml-Zentrifugenglas gegeben und auf Eis gestellt.
8. Die SP 2/0-Myelomzellen wurden durch Zentrifugation in einem sterilen, 50 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt. Gleichzeitig wurden die Zellen 5 Minuten bei 1000 U/min pelletisiert.
9. Beide Sätze von Zellen wurden dreimal mit 5 ml kaltem, serumfreiem D-MEM gewaschen (Serum stört nämlich die Fusion dieser-beiden Zelltypen).
10. Beide Sätze von Zellen wurden sodann in 5 ml eiskaltem, serumfreiem D-MEM durch vorsichtiges Klopfen und Pipettieren resuspendiert. Diese Zellsuspensionen wurden auf Eis kühl gehalten.
11. Die Milzzellen wurden sodann unter Verwendung des Hämozytometers gezählt. Ein 30 µl-Aliquotanteil von Zellen wurde entnommen und zu 30 µl 4% Essigsäure gegeben. Die Säure führte zur Lysis der RBCs und erleichterte die Zählung der Splenozyten. Die Probe wurde in den Hämozytometer gebracht. Die Zellen wurden in 25 großen Quadraten gezählt. Dieser Zahlenwert X ergab bei Division durch 50 die Zellkonzentration in Millionen pro ml. Es lagen insgesamt etwa 100 Millionen Milzzellen vor. Für die Fusion wurden nur 10 Millionen Milzzellen verwendet. Der Rest wurde eingefroren. Diese Zellen wurden sodann aufgetaut, zweimal mit serumfreiem D-MEM gewaschen und für eine weitere Fusion verwendet. Aus diesem Grund wurden die Zellen in Aliquotanteilen von 10 bis 20 Millionen Zellen pro Fläschchen eingefroren.
12. Das Fusionsverfahren wurde unter Anwendung eines 3 : 1-Verhältnisses von Milzzellen zu SP 2/ Os durchgeführt (d. h. die Sp 2/ Os wurden gezählt und etwa 3 Millionen Zellen wurden verwendet, was etwa 700-800 Vertiefungen mit Wachstum von den ursprünglich beimpften 960 Vertiefungen ergab). Die SP 2/0-Zellsuspension

sion wurde sodann zu den Milzzellen gegeben und das Gemisch wurde 5 Minuten mit 1000 U/min zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde entfernt, wobei das Pellet so trocken wie möglich belassen wurde. Das Pellet wurde durch festes Klopfen des Röhrchens gelockert. Es war wichtig, das Pellet aufzubrechen, so daß das PEG in Kontakt mit möglichst vielen Zellen kommen konnte.

13. Das Röhrchen wurde in ein Wasserbad von 37°C gestellt. 1 ml PEG-Lösung von 37°C (Fusionspromotor) wurde tropfenweise direkt auf das Pellet innerhalb von 1 Minute gegeben. Das Röhrchen wurde während der Zugabe des PEG gedreht. Zum Suspendieren der Zellen wurde das Röhrchen vorsichtig aufgewirbelt. Sodann ließ man das Gemisch in einem Wasserbad etwa 1 Minute absetzen.

14. Unter Drehen wurde das Röhrchen mit 1 ml serumfreiem D-MEM-Medium von 37°C innerhalb von 1 Minute versetzt.

15. 20 ml serumfreies D-MEM-Medium von 37°C wurden sodann innerhalb von 4 Minuten zugegeben.

16. Das Gemisch wurde 5 Minuten mit 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort entfernt und das Pellet wurde in 100 ml Super-HAT-Medium resuspendiert. 0,1 ml wurden in jede Vertiefung der zehn Platten, die die Makrophagen enthielten, gegeben.

Versorgungsschema

[0090] Die Kulturen wurden nach der Fusion durch Ersatz eines Teils des Kulturmediums mit frischem Medium versorgt. Infolgedessen führte die Versorgung allmählich zu einer Verdünnung von etwaigen Antikörpern, die durch normale (unfusionierte), Antikörper sezernierende Milzzellen erzeugt wurden, während ferner Abfallprodukte entfernt und Nährstoffe ergänzt wurden.

1. Nach 3 Tagen wurde 0,1 ml Medium aus jeder Vertiefung entfernt (wobei darauf geachtet wurde, daß die Zellschicht nicht gestört wurde) und durch frisches Super-HAT ersetzt.

2. Das Medium wurde nach 5 Tagen erneut ausgetauscht. Bei einem Großteil der Zellen (d. h. unfusionierte Milzzellen und unfusionierte Myelomzellen) handelte es sich zu diesem Zeitpunkt um abgestorbene oder sterbende Zellen. Nach einer Woche in Super-HAT-Medium wurde angenommen, daß sämtliche parentalen Myelom- oder Milzzellen abgestorben waren und es sich bei wachsenden Zellen um Hybride handelte. Die Makrophagen bewirkten eine Klärung eines Großteils der im Medium vorhandenen Bruchstücke. Sobald sich das Medium gelb färbte und keine Kolonien von Hybridomzellen beobachtet wurden, wurde das Medium erneut nach 7 Tagen ausgetauscht. Sobald sich das Medium gelb färbte und keine Kolonien von wachsenden Zellen beobachtet wurden, wurde das Medium einem Screening auf die Anwesenheit von Antikörpern unterzogen.

3. 7 bis 10 Tage nach der Fusion traten schöne Kolonien von Hybridomzellen auf. An der Peripherie der einzelnen Vertiefungen wurde kein Wachstum beobachtet. Von den 960 ausgestrichenen Vertiefungen entwickelten 744 Vertiefungen Hybridome.

4. Der Kulturüberstand (50 µl) wurde dann für ein Screening entfernt, wenn 1/4 bis 1/3 der einzelnen Vertiefungen mit wachsenden Zellen bedeckt waren.

III. Vorläufiges Screening vor der Klonierung

[0091] Es gibt zwei allgemeine Screening-Verfahren zur Charakterisierung der Antikörper, die durch die verschiedenen Hybridome sezerniert wurden: Enzym-gebundener Immunosorbent-Test (oder ELISA-Test) und indirekter Immunfluoreszenz-Test. Nachstehend findet sich eine zusammenfassende Darstellung über die Anwendung dieser Tests zum Screening der in den 764 Vertiefungen vorhandenen Hybridom-Kolonien, um die Hybridome zu identifizieren, die Antikörper mit Spezifität für die gezüchteten Knochenmark-Mesenchym-Stammzellen bilden.

[0092] A. IgG-ELISA: Wenn die Kolonien zu Beginn sichtbar wurden, wurde der Kulturüberstand einem ELISA-Screening-Test gegen Ziegen-anti-Mäuse-IgG unterzogen. Dieser Screening-Test war zum Identifizieren von etwaigen Kolonien bestimmt, die aus Hybridomen bestanden, die Antikörper gegen den IgG-Isotyp sezernierten. Da dieser Isotyp den hauptsächlich sezernierenden Antikörper darstellt und auch am leichtesten zu reinigen und anzuwenden ist, wurde er gegenüber IgM- und IgA-Isotypen, die ebenfalls eine Spezifität für das gewünschte Epitop enthalten können, bevorzugt und zum Screening verwendet.

Ausführliche Beschreibung der Vorgehensweise zur Durchführung des Ziegen-anti-Maus-IgG-ELISA-Tests

Herstellung von Ziegen-anti-Maus-IgG-ELISA-Platten

1. 500 µl Ziegen-anti-Maus-IgG (Organon Teknika, Katalog# 06110081) wurde in 100 ml Dulbecco' PBS (D-PBS) (GIBC O) verdünnt. 50 µl wurden in jede Vertiefung von Vinyl-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (GIBC O) gegeben.

2. Man ließ den Antikörper eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.

3. Die Platten wurden sodann zweimal mit D-PBS mit einem Gehalt an 1% Rinderserumalbumin (BSA) gespült und anschließend mit D-PBS mit einem Gehalt an 1% BSA eine Stunde inkubiert, um nicht-spezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren.
4. Die Platten wurden einmal mit D-PBS mit einem Gehalt an 0,1% BSA gespült, in Kunststoffbeutel verschlossen und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Durchführung des ELISA-Tests

1. 50 µl Aliquot-Anteile von Antikörper-Kulturüberständen wurden in die Vertiefungen von ELISA-Platten gegeben und in einer befeuchteten Kammer eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
2. Die Platten wurden 4-mal mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) mit einem Gehalt an 0,1% BSA gespült.
3. Mit alkalischer Phosphatase konjugierter Ziegen-Antikörper mit Spezifität für Mäuse-IgG, -IgM und -IgA (Organon Teknika, Katalog #86110231) wurde 1 : 100 bis 1 : 250 in TBS mit einem Gehalt an 0,1% BSA verdünnt. 50 µl wurden eine Stunde bei Raumtemperatur in jede Vertiefung (in einer befeuchteten Kammer) gegeben.
4. Die Platten wurden 4-mal mit TBS mit einem Gehalt an 0,1% BSA gespült.
5. 0,0093 g Phosphatase-Substrat (Sigma) wurde in 10 ml Substratpuffer gelöst, der aus 50 mM Glycin und 1 mM MgCl₂ vom pH-Wert 10,5 zusammengesetzt war. Jeweils 50 µl wurden in die Vertiefungen gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Eine Gelbfärbung in den Vertiefungen wurde als positive Antikörper-Reaktivität interpretiert.
6. Positive und negative Kontrollen bestanden aus einer identischen Analyse von immunisiertem Mäuseserum bzw. Kulturmedium. [0100] Die Testergebnisse zeigten, daß von den 764 Vertiefungen, bei denen Hybridom-Wachstum auftrat, nur 245 Vertiefungen einen positiven Test auf die Sekretion von Antikörpern mit dem IgG-Isotyp ergaben. Dies wird durch die photographische Aufnahme der ELISA-Testergebnisse von **Fig. 5** belegt.

[0093] B. Test von gefrorenen Schnitten von pelletisierten Zellen durch indirekte Immunofluoreszenz: Kulturüberstand von Kolonien, die ein positives Screening auf IgG zeigten, wurden sodann einem Screening gegen gefrorene Schnitte von pelletisierten, gezüchteten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen durch indirekte Immunofluoreszenz unterworfen. Dieser Test war dazu bestimmt, Antikörper zu identifizieren, die an Epitope an den gezüchteten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen banden.

[0094] Ausführliche Beschreibung der Vorgehensweise der Antikörperbindung an pelletisierte, gezüchtete, humane Knochenmarkzellen durch den indirekten Immunofluoreszenztest.

Herstellung von gefrorenen Schnitten von durch Kultur vermehrten, humanen, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen

1. 4 ml 0,25% Trypsin mit 1 mM EDTA (GIBC O) wurde zu konfluenten Kulturen von humanen, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen in 100 ml/Kulturschalen gegeben und 5 Minuten bei 37°C inkubiert.
2. Die enzymatische Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von 2 ml Kälberserum gestoppt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000 × g pelletisiert. Der Überstand wurde verworfen. Die pelletisierten Zellen wurden zweimal mit PBS gespült.
3. Nach dem zweiten Spülen wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet wurde in einem kleinen Gefäß, das OCT Tissue Tek Compound (Miles Inc.) enthielt, dispergiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Gefrorene Blöcke von Zellen wurden bis zum Schnitt bei 0°C in Kunststoffbeuteln aufbewahrt.
4. Die Gewebeblöcke wurden zu Schnitten von 6 µm/Schnitt geschnitten und auf mit Gelatine beschichtete Objektträger gelegt. Die Objektträger wurden bis zum Bedarf bei 0°C in Objektträgerkästen aufbewahrt.

Indirekte Immunofluoreszenzfärbung

1. Objektträger wurden aus dem Gefrierschrank entnommen und vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.
2. Die Schnitte wurden mit 50–100 µl Antikörper-Kulturüberstand bedeckt und 1 Stunde in einer befeuchteten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Sodann wurden die Objektträger 4-mal mit 0,1% BSA-PBS gespült.
3. Sodann wurden die Schnitte mit 50 µl FITC-konjugiertem Ziegen-Antimaus-IgG (Organon Teknika, Katalog #1211-0231), das mit 0,1% BSA-PBS im Verhältnis 1 : 100 bis 1 : 200 verdünnt worden war, bedeckt und eine Stunde bei Raumtemperatur in einer befeuchteten Kammer inkubiert.

4. Die Objektträger wurden 4-mal mit 0,1% BSA-PBS gespült und nach Aufbringen von 1 Tropfen PPD-Immunofluoreszenz-Montiermedium mit einem Deckel versehen. Sodann wurden sie mit einem Olympus-BH-2-Epifluoreszenz-Mikroskop betrachtet.
5. Negative Kontrollobjektträger bestanden aus einer identischen Analyse von Zellen mit Kulturmedium, das keinen Antikörper enthielt.

[0095] Die Testergebnisse identifizierten die Antikörper, die an Epitope in der Kultur von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen banden. Die **Fig. 6A-6H** sind mikrophotographische Aufnahmen typischer gefrorener Schnitte von pelletisierten, in Kultur vermehrten, humanen, von Knochenmark abgeleiteten Zellen. Ferner ergab eine genaue Betrachtung des Färbemusters einen Hinweis über die zelluläre Position des Antigens: intrazellulär, an der Zelloberfläche oder beides. Von Interesse waren nur die Antikörper, die mit der Zelloberfläche reagierten. Da jedoch eine Interpretation des Immunofluoreszenzmusters in bezug auf eine intrazelluläre Position oder eine Zelloberflächenposition nicht zu 100% genau war, wurden sämtliche Antikörper, die mit beliebigen Teilen der gezüchteten Knochenmarkzellen reagierten, genommen. Die Antikörper, die eine negative Reaktion ergaben, wurden ausgesondert. Von den 245 Vertiefungen, die eine positive Reaktion in bezug auf eine IgG-Sekretion zeigten, ergaben 171 Vertiefungen einen positiven Test auf gefrorene Schnitte von pelletisierten, gezüchteten Knochenmarkzellen.

[0096] C. Indirekte Immunofluoreszenz bei lebenden Zellen in Mikromasse-Kulturen: gezüchtete, humane, von Knochenmark abgeleitete Mesenchymzellen wurden in einer geringen Masse in der Mitte einer Gewebekulturschale ausgestrichen. Dieser Kulturtyp wird als "Mikromasse" bezeichnet. Die Zellen bleiben normalerweise lebensfähig, verteilen sich und vermehren sich in diesen Massen. Hybridom-Überstände, die eine positive Reaktivität bei den Screeningvorgängen in den vorstehenden Abschnitten A und B zeigten, wurden mit den Zellen in diesen Mikromasse-Kulturen inkubiert. Die Reaktivität wurde durch indirekte Immunofluoreszenz gemäß dem nachstehend dargelegten Verfahren gemessen. Da es sich bei den durch diesen Test analysierten Zellen um lebende Zellen handelte, identifizierte dieser Test Antikörper, die nur eine Bindung mit der Zelloberfläche der Zelle eingingen und negative Ergebnisse mit Antikörpern, die mit intrazellulären Epitopen eine Bindung eingingen, ergaben.

Ausführliches Verfahren der Antikörper-Bindung an lebende, durch Kultur vermehrte, von Knochenmark abgeleitete Zellen in Mikromasse

Herstellung der Mikromasse-Kulturen

1. Zellen aus konfluenten von Knochenmark abgeleiteten Mesenchym-Zellkulturen wurden mit 0,25% Trypsin mit einem Gehalt an 1 mM EDTA gemäß den vorstehenden Angaben freigesetzt. Nach Stoppen der Aktivität des Trypsins mit Kälberserum wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletisiert. Der Überstand wurde entfernt.
2. Die Zellen wurden einmal mit 5–10 ml BGJ₆-Komplettmedium gespült und sodann im Komplettmedium in einer Konzentration von 500 000 Zellen pro 1 ml resuspendiert. 50 µl der Zellsuspension wurden in die Mitte einer 35 ml-Gewebekulturschale (Falcon) übertragen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Indirekte Immunofluoreszenzfärbung

1. Die 35 mm-Schalen wurden dreimal mit PBS gespült. 100 µl Aliquotanteile von Antikörper-Kulturüberständen wurden zu jeder Schale gegeben. Sodann wurde eine 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur in einer befeuchteten Kammer durchgeführt.
2. Die Schalen wurden dreimal mit 0,1% BSA-PBS gespült. Sodann wurden 100 µl eines FITC-konjugierten Ziegen-Antikörpers, der spezifisch für Mäuse-IgG war, zu jeder Platte in einer Verdünnung im Verhältnis von 1 : 100 bis 1 : 200 mit 0,1% BSA-PBS zugesetzt. Die Schalen wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer befeuchteten Kammer inkubiert.
3. Die Schalen wurden dreimal mit 0,1% BSA-PBS gespült und nach Aufbringen eines Tropfens PPD-Immunofluoreszenz-Montiermedium mit einem Deckel versehen. Die Immunofluoreszenz-Färbung wurde unter Verwendung eines Olympus BH-2-Epifluoreszenz-Mikroskops betrachtet.

[0097] Unter Anwendung des vorstehend beschriebenen Verfahrens ergaben von den 171 Vertiefungen, die ein positives Testergebnis sowohl in bezug auf IgG-Sekretion als auch in bezug auf die Spezifität gegenüber gefrorenen pelletisierten, gezüchteten Knochenmarkzellen zeigten, nur 15 dieser Vertiefungen ein positives Ergebnis in bezug auf eine Spezifität für lebende, gezüchtete, von Knochenmark abgeleitete Mesenchymzellen. Die in **Fig. 7A–7H** gezeigten mikrophotographischen Aufnahmen belegen die typischen Ergebnisse einer indirekten Immunofluoreszenzanalyse von lebenden, gezüchteten von Knochenmark abgeleiteten Mesenchym-

zellen in Mikromasse.

IV. Klonierung durch Grenzverdünnung von ausgewählten Kolonien

[0098] Die Hybridome, die bei den drei vorläufigen Screening-Vorgängen ein positives Testergebnis zeigten (d. h. 15 Vertiefungen), wurden gemäß dem folgenden Verfahren kloniert, um zu gewährleisten, daß die anschließenden Screening-Stufen an Hybridomen durchgeführt wurden, die aus einem einzigen Klon stammten. Da üblicherweise in der ursprünglichen "parentalen" Vertiefung mehrere Zelllinien vorhanden sind, war eine Klonierung der Zellen erforderlich, um eine monoklonale Hybridom-Zelllinie zu erhalten. Beim Ausstreichen von Zellen in einer Dichte von weniger als 1 Zelle pro Vertiefung sollte es sich bei sämtlichen Kolonien, die in einer Vertiefung wuchsen, um die Nachkommen dieser Zelle handeln. Wenn sämtliche Vertiefungen mit Wachstum den infrage stehenden Antikörper über zwei serielle Klonierungen hinweg enthielten, wurde die Zelllinie als monoklonal angesehen. Ferner wurde die Klonierung durch Grenzverdünnung auch durchgeführt, um die Gefahr eines übermäßigen Wachstums von Nichterzeuger-Zellen zu verringern.

Präparation von Feeder-Schicht-Zellen und konditioniertem Medium

1. Mäuse-Splenozyten wurden in dieser Stufe anstelle von Makrophagen verwendet. Obgleich die Splenozyten leichter zu gewinnen waren, trugen sie zu den Bruchstücken in den Vertiefungen bei, während die Makrophagen tatsächlich die Bruchstücke beseitigten.
2. Eine Maus wurde getötet. Ihre Milz wurde auf die vorstehend angegebene Weise entnommen.
3. Die Zellen wurden gemäß den vorstehenden Angaben freigesetzt, gezählt und zu Super-HAT von 37°C so zugegeben, daß ihre Konzentration 1 Million pro 1 ml betrug.
4. Bei Verwendung von Platten mit 96 Vertiefungen für den Ausstreichvorgang wurden 0,1 ml dieser Suspension in jede Vertiefung gegeben. Bei Verwendung von Platten mit 24 Vertiefungen für den Ausstreichvorgang wurden in jede Vertiefung 0,5 ml dieser Suspension gegeben.
5. Alternativ wurde diese Zellsuspension auch in großen Kulturflaschen (20 ml) bis zu 3 Tagen gezüchtet. Während dieser 3 Tage wurde die Suspension zur Erzeugung von Feeder-Schichten verwendet. Wenn die Zellen nicht innerhalb dieser drei Tage verwendet wurden, wurde das Medium durch Passage der Suspension durch ein steriles 0,22 µm-Filter gewonnen. Dieses Medium, das mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden konnte, stellte ein geeignetes Additiv für schlecht wachsende Kulturen dar. Jedoch wurde dieses Medium nicht anstelle von Feeder-Schichten verwendet.

Klonierung

1. In sämtlichen nachstehenden Fällen wurden die Zellen in Vertiefungen, die bereits eine Feeder-Schicht (vgl. die vorstehenden Ausführungen) enthielten, ausgestrichen.
2. Die Zellen und das Medium wurden von den ausgewählten parentalen Vertiefungen einer Platte mit 96 Vertiefungen in eine Vertiefung einer Platte mit 24 Vertiefungen übertragen.
3. 200 µl Medium wurden in die parentalen Vertiefungen zurückgegeben, so daß die restlichen parentalen Zellen ihr Wachstum fortsetzen konnten. Die parentalen Zellen dienten im Fall von Fehlern als Reserve.
4. Das Zellwachstum in der Platte mit 24 Vertiefungen wurde überwacht. Im allgemeinen waren bei einer wachsenden Kolonie etwa 3 bis 7 Tage erforderlich, um die Hälfte der Vertiefung zu bedecken. In den Vertiefungen, die ein langsames Wachstum zeigten, wurde weiteres konditioniertes Medium zugesetzt.
5. Bei einem guten Wachstum der Zellen wurde das Medium erneut auf Antikörper abgesucht. Da beim Klonieren dieser Zellen kein Punkt vorlag, der zeigte, daß die Sekretion des Antikörpers beendet war, stellte dies eine notwendige Stufe dar.
6. Wenn der infrage stehende Antikörper vorhanden war, wurde eine geringe Aliquotmenge (50 µl) Zellen vom Kolonienrand entnommen. Dies stellte normalerweise die Stelle dar, an der sich die Zellen mit dem aktivsten Wachstum befanden.
7. 10 µl dieser Aliquotmenge wurden zu 30 µl 0,5% Trypanblau-Farbstoff gegeben. Die lebensfähigen Zellen wurden gezählt. Abgetötete Zellen waren blau gefärbt. Es ist wichtig, die Verdünnung mit Trypan bei der Bestimmung der endgültigen Zellkonzentration zu berücksichtigen.
8. Die restliche 40 µl-Aliquotmenge wurde so behandelt, daß mit Sicherheit 100 Zellen entnommen wurden.
9. Diese 100 Zellen wurden zu 20 ml Super-HAT gegeben. Die Suspension wurde vermischt und gleichmäßig in zwei Platten mit 96 Vertiefungen ausgestrichen. Dies ergab zwei Platten von Zellen mit 0,5 Zellen pro Vertiefung.
10. Innerhalb von 5 bis 10 Tagen entwickelten sich in etwa der Hälfte der Vertiefungen Kolonien. Die rasch wachsenden Kolonien wurden auf Antikörper abgesucht. wenn positive Kolonien gefunden wurden, wurden vier der Kolonien in neue Vertiefungen einer Platte mit 24 Vertiefungen übertragen.

11. 200 µl Medium wurden in die Platte mit 96 Vertiefungen zurückgegeben. Die neue Platte mit 24 Vertiefungen wurde genau auf die gleiche Weise wie die ursprüngliche Platte mit 24 Vertiefungen behandelt. Dies ergab eine weitere Quelle für eine Zellreserve, wenn die Klonierung (oder irgendein anderer Vorgang) fehlschlug. Etwa 3 Millionen Zellen wurden pro Fläschchen eingefroren.
12. Etwa zwei Wochen nach der Fusion wurden die Zellen von Super HAT auf Super H + T-Medium übertragen.
13. Die Klonierung wurde unter Anwendung der vorstehenden Techniken fortgesetzt, bis 100% der Subklone über zwei Generationen hinweg positiv waren.
14. Die nach und nach stärker "klonalen" Zellen wurden aus Vorsichtsgründen ebenfalls eingefroren.
15. Nachdem die Bedingung erfüllt war, daß die Zelllinie eine monoklonale Beschaffenheit aufwies, wurde das Kulturmedium in Hybridoma-20% abgeändert. Dieses Medium, das ein verstärktes Zellwachstum ermöglicht, bestand aus 78 ml D-MEM, 20 ml FBS, 1 ml Glutamin (Gibco #320-5030), 1 ml Lösung I (vgl. die vorstehenden Ausführungen), 0,1 ml Gentamicin (M. A. Bioproducts #17-5187).

V. Gewinnung der durch die Hybridome sezernierten monoklonalen Antikörper

[0099] Die von den klonierten Hybridomen sezernierten monoklonalen Antikörper wurden entweder durch Züchten der klonierten Hybridome (individuell) in Hybridoma-20% -Medium und Gewinnen des Antikörpers aus dem Medium oder durch intraperitoneale Züchtung der klonierten Hybridome in Mäusen und Gewinnen von maligner Aszitesflüssigkeit oder Serum, die den Antikörper enthielten, von den Mäusen gewonnen. Diesbezüglich bildeten bei Anwendung des nachstehenden Verfahrens Hybridomzellen, die in der Peritonealhöhle der Mäuse gezüchtet worden waren, eine Aszitesflüssigkeit, die reich an monoklonalen Antikörpern war.

1. Die Empfängermaus wurde 5 bis 10 Tage vor der Inokulation mit Tumorzellen einem "Priming" unterworfen, indem jeder Maus intraperitoneal 0,5 ml Pristane (2,6,10,14-Tetramethylpentadecan; Sigma, Katalog #T-7640) verabreicht wurden. Die Mäuse, die zur Züchtung der Tumoren verwendet wurden, waren vom gleichen Stamm, wie er zu Beginn zur Erzeugung der Hybridom-Zelllinien verwendet wurde. Die verwendeten Mäuse wiesen ein Alter von etwa 8 bis 12 Wochen auf. Eine Tumorminie wurde jeweils in 6 Mäusen gezüchtet.
2. In der Kultur wurde die gebildete monoklonale Zelllinie in logarithmischer Phase gezüchtet. Etwa 30 Millionen Zellen wurden gewonnen.
3. Die Zellen wurden mit 1000 U/min 5 Minuten zentrifugiert und sodann vom Kulturüberstand entfernt.
4. Da das Serum die Tumorbildung stört und die Aszitesflüssigkeit verunreinigt, wurden die Zellen in serumfreiem Medium gewaschen und erneut zentrifugiert.
5. Die Zellen wurden in serumfreiem Medium (d. h. DMEM-HG, Gibco, Grand Island, NY) so resuspendiert, daß die endgültige Zelldichte 10 Millionen pro ml betrug.
6. Unter Verwendung einer Nadel #23 wurden 0,5 ml (5 Millionen Zellen) der Suspension in das Peritoneum der einzelnen Empfängermäuse injiziert.
7. Etwa 1 Woche später hatten die Mäuse offensichtlich "geblähte" Bauchhöhlen. Nachdem sich diese etwa auf die Größe einer Pflaume vergrößert hatten, wurde die in der Peritonealhöhle vorhandene Aszitesflüssigkeit abgezogen.
8. Während des Abziehens wurden die Mäuse leicht unter Verwendung von Metafan (Methoxyfluran, Pitman-Moore, Inc. Katalog #NDC 11716-5943-4) betäubt. Unter Verwendung einer Nadel Nr. 22 wurde die Bauchhaut so eingestochen, daß sie sich im Peritoneum deutlich an der Oberfläche befand. Die Aszitesflüssigkeit wurde sodann aus der Nadel in ein bereitstehendes Gefäß getropft. Durch Bewegen von Maus- und/oder Nadel war es möglich, eine Menge von 5 ml Flüssigkeit zu gewinnen. Diese Flüssigkeit ergab Antikörper im Bereich von 0,5 bis 5 mg/ml.
9. Die Tiere wurden zur Erholung und zum weiteren Abziehen von Flüssigkeit in die Käfige zurückgebracht.
10. Bei Tieren, die sich von der Anästhesie in einer beliebigen Stufe des Versuchs nicht mehr erholten, wurde die restliche Aszitesflüssigkeit durch chirurgische Öffnung des Abdomens gewonnen. Die gepoolte Flüssigkeit wurde entnommen. Dabei ist es wichtig, daß die Flüssigkeit von Mäusen, die bereits mehr als 1 Stunde tot waren, nicht gewonnen wurde.
11. Die gewonnene Flüssigkeit wurde 5 Minuten mit 3000 U/min zentrifugiert, um die RBCs und andere unerwünschte Zellen zu pelletisieren.
12. Sodann wurde Natriumazid in einer Endkonzentration von 0,02% zugegeben. Diese Aszitesflüssigkeit wurde sodann in kleinen Aliquotmengen bei -70°C aufbewahrt. Die Stabilität der einzelnen Antikörper gegen Einfrieren und Auftauen wurde getestet, bevor das gesamte Aszitespräparat eingefroren wurde.

VI. Screening auf klonierte Hybridome

[0100] Die klonierten Hybridome (15 Vertiefungen) wurden einem Screening gegen eine Reihe von mesenchymalen und nicht mesenchymalen Geweben unterzogen, um den Spezifitätsgrad der monoklonalen Antikörper gegenüber den gezüchteten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen festzustellen.

[0101] Die Testergebnisse dieser drei optimalen Hybridome, d. h. SH2, SH3 und SH4, wurden gegen eine Kontrolle für das Hintergrundrauschen bewertet. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle 4 aufgeführt. Dabei bedeutet in Tabelle 4 das Symbol (-) keine sichtbare Reaktivität mit der Kontrolle; (\pm) bedeutet weniger als 1% Reaktivität über der Kontrolle und wurde für Bewertungszwecke als (-) angesehen; und (+) bedeutet eine erheblich über der Kontrolle liegende Reaktivität. Die negative Kontrolle bei jedem Versuch beinhaltete eine Inkubation der infrage stehenden Zellen oder Gewebe mit SB-1, einem monoklonalen Antikörper gegen alkalische Phosphatase von Hühnern, der nicht mit humanen Zellen (ohne Antikörper) reagiert, und ein anschließendes Spülen des Inkubationsgemisches mit FITCmarkiertem zweitem Antikörper.

[0102] A. Der erste und wichtigste Grad der Spezifität bestand darin, daß die monoklonalen Antikörper nicht mit Zellen hämatopoetischer Abstammung im Knochenmark reagierten. Um dies festzustellen, wurden vollständiges Knochenmark und mehrere partielle Fraktionen von Knochenmark gegen Hybridoma-Kulturüberstand einem Screening durch indirekte Immunofluoreszenz gemäß dem nachstehenden Verfahren unterzogen. Mit Fluorochromisothiocyanat (FITC) wurden die positiven Zellen und der prozentuale Anteil an positiven Zellen festgestellt. Jedoch wurden sämtliche Hybridome zum Screening in der nächsten Stufe aufbewahrt.

Präparation von Knochenmark

[0103] Vollständiges Knochenmark und Percoll-Fraktionen niedriger Dichte wurden gemäß den Angaben in Beispiel 1 präpariert und zu gefrorenen Schnitten gemäß den vorstehenden Angaben für durch Kultur vermehrte, von Knochenmark abgeleitete Mesenchymzellen verarbeitet.

Indirekte Immunofluoreszenzfärbung

[0104] Schnitte von vollständigem Knochenmark und Percoll-Fraktionen niedriger Dichte wurden einem Screening mit Antikörper-Kulturüberstand aus Klonierung durch Hybridome gemäß dem vorstehend beschriebenen Verfahren zum Absuchen von durch Kultur vermehrten, Mesenchymzellen in gefrorenen Schnitten unterzogen.

[0105] B. Screening von monoklonalen Antikörpern gegen von Mesenchym abgeleitetes Gewebe: Eine Vielzahl von Mesenchymgeweben wurde durch chirurgische Eingriffe oder Autopsie erhalten und zur Feststellung verwendet, ob die monoklonalen Antikörper mit Epitopen, die bei von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen und differenzierten Mesenchymgeweben gemeinsam waren, reagierten. Gefrorene Schnitte der Gewebe wurden einem Screening gegen Hybridoma-Kulturüberstand unterworfen und durch indirekte Immunofluoreszenz gemäß dem folgenden Verfahren analysiert.

Ausführliches Verfahren zum Screening von Gewebeschnitten gegenüber klonierten Hybridoma-Überständen durch indirekte Immunofluoreszenz Präparation des Gewebeschnittes

1. Die folgenden Gewebe wurden in Form von chirurgischen Biopsiematerialien oder bei der Autopsie von humanen Patienten erhalten: Haut, Vorhaut, Darm, Herz, Skelettmuskel, Lunge, Leber, Hirn, Sehnen, Bänder, Gallenblase, Gelenkknorpel, Oberschenkel, Rippenknorpel und Knochenhaut.
2. Die folgenden tierischen Gewebe wurden ebenfalls für Screening-Vorgänge erhalten: Knochen und Knochenmark von Hühnern, Knochen und Knochenmark von Kaninchen, Rattenknochen und Knorpel und Knochen von Rindern.
3. Die Gewebe wurden jeweils in OCT-Tissue Tek Freezing Medium (Miles, Inc.) eingebettet und in flüssigem Stickstoff zu Blöcken eingefroren und bis zur Verwendung bei 0°C aufbewahrt.
4. Die Gewebelöcke wurden zu Schnitten von 6 μ m geschnitten, auf mit Gelatine beschichtete Objektträger gelegt und bis zur Verwendung bei 0°C aufbewahrt.

Indirekte Immunofluoreszenzfärbung

[0106] Gewebeschnitte wurden einem Screening gegen Hybridoma-Kulturüberstand von klonierten Hybridomen unter Anwendung des vorstehend für das Absuchen von durch Kultur vermehrten Zellen in gefrorenen Schnitten unterworfen.

[0107] Die positiven und negativen Reaktivitäten wurden aufgezeichnet. Die Reaktivitätsmuster wurden beschrieben (Tabelle 4). Sämtliche klonierten Hybridomen wurden für ein Screening in der nächsten Stufe aufbewahrt.

[0108] C. Screening von monoklonalen Antikörpern gegen Nicht-Mesenchymgewebe. Das Gesamtziel dieses Screeningverfahrens bestand in der Identifizierung von Hybridomen, die Antikörper sezernierten, die spezifisch für von Knochenmark abgeleitete Mesenchymzellen und/oder ihre Abkömmlinge in direkter Linie waren. Ein Antikörper, der mit Nicht-Mesenchymgewebe reagierte, war daher nicht ebenso spezifisch oder einzigartig.

Zahlreiche nicht-Mesenchymgewebe wurden durch Autopsie gewonnen. Gefrorene Schnitte wurden hergestellt. Der Hybridoma-Kulturüberstand wurde mit diesen Schnitten inkubiert. Die Antikörper-Reaktivität wurde durch indirekte Immunfluoreszenz gemäß den vorstehenden Angaben analysiert. Die positive und negative Reaktivität sowie das Reaktivitätsmuster wurden identifiziert.

Tabelle 4

Reaktivität von optimalen Hybridomen und damit verbundenen monoklonalen Antikörpern mit verschiedenen Gewebezellen				
Monoklonale Antikörper				
		SH2	SH3	SH4
A	Vorscreening			
1.	IgG-ELISA	+	+	+
2.	Pelletisierte gezüchtete Zellen	+	+	+
3.	Mikromasse von gezüchteten Zellen	+	+	+
B	Hämatopoetische Knochenmarkzellen			
1.	Frisches vollständiges Knochenmark	-	±a	±a
2.	Percoll-Fraktion niedriger Dichte	±a	-	-
C.	Von Mesenchym abgeleitete Gewebe			
1.	Oberschenkelkopf (Knochen) (HCl)	-	-	-
2.	Rippenknochen und -mark (RDO)	±b	-	-
3.	Rippenknorpel	-	+	-
4.	Skelettmuskel	-	-	-
5.	Gezüchtete Knochenhautzellen	-	+	+
6.	Gezüchtete Knochenhautzellen (Mikromasse)	-	+	+
7.	Bänder	±b	±b	-
8.	Sehnen	-	-	±b
9.	Gelenkknorpel	-	+	+

a weniger als 1 % über der Kontrolle

b Reaktivität gegenüber Gewebematrix, die nicht im Zusammenhang mit den Zellen stand.

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Reaktivität von optimalen Hybridomen und damit verbundenen monoklonalen Antikörpern mit verschiedenen Gewebezellen				
Monoklonale Antikörper				
		SH2	SH3	SH4
C	Vom Mesenchym abgeleitete Gewebe			
10.	Oberschenkelknochenschaft (RDO, HCl)	-	-	-
D.	Nicht-Mesenchymgewebe			
1.	Vorhaut	-	-	-
2.	Brusthaut	-	-	-
3.	Darm	±b	-	-
4.	Herz	±b	-	-
5.	Lunge	±b	-	-
6.	Leber	±b	±b	-
7.	Hirn	-	-	-
8.	Gallenblase	-	-	+

b Reaktivität gegenüber Gewebematrix, die nicht im Zusammenhang mit den Zellen stand.

[0109] Die vorstehenden Ergebnisse zeigen klar, daß drei Hybridome, d. h. SH2, SH3 und SH4, identifiziert und kloniert worden sind. Diese Hybridome eignen sich zur Analyse von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen. Sämtliche drei Hybridome sezernieren Antikörper, die mit den Zelloberflächen-Epitopen an 99–100% von Zellen bei Tests von in Kultur vermehrten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen reagieren. Dagegen sezerniert jeder der drei Hybridome Antikörper, die mit weniger als 1% der Zellen bei Tests auf vollständiges Knochenmark reagieren. Die Fähigkeit dieser Antikörper zur selektiven Bindung von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen und nicht von hämatopoetischen Zellen macht sie zu hervorragenden Sonden zur quantitativen Bestimmung der Anzahl von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen in Knochenmarkproben sowie zur Reinigung derartiger Zellen aus Knochenmark.

[0110] Ferner zeigten sämtliche drei Hybridome eine weitgehend negative Kreuzreaktivität beim Screening gegen eine Vielzahl von mesenchymalen und nicht-mesenchymalen Geweben, obgleich jeweils eine gewisse Kreuzreaktivität beobachtet wurde. Besonders interessant ist, daß SH3 und SH4 eine Kreuzreaktion mit Zelloberflächen-Determinanten an gezüchteten Zellen, die von humaner Knochenhaut abgeleitet waren, zeigte. Da die Erfinder früher dargelegt haben, daß Knochenhaut eine weitere Quelle für von Knochenmark abgeleitete Mesenchymzellen darstellt, läßt die Kreuzreaktivität der vorstehenden Antikörper gegen Zelloberflächen-Epitope an Knochenhautzellen auf eine strukturelle Verwandtschaft zwischen den von Knochenmark abgeleiteten Mesenchym-Stammzellen und den von Knochenhaut abgeleiteten Mesenchym-Stammzellen schließen. Der SH2-Antikörper reagierte jedoch nicht mit von Knochenhaut abgeleiteten Mesenchym-Stammzellen obgleich er eine Bindung mit von Knochenhaut abgeleiteten Mesenchym-Stammzellen einging. Diese Selektivität macht den SH2-Antikörper zu einem wertvollen Werkzeug zur Unterscheidung zwischen von Knochenmark abgeleiteten und von Knochenhaut abgeleiteten Mesenchym-Stammzellen. Die Selektivität des SH2-Antikörpers in Verbindung mit der Kreuzreaktivität von SH3 und SH4 läßt darauf schließen, daß von Knochenmark abgeleitete und von Knochenhaut abgeleitete Mesenchym-Stammzellen verwandt, jedoch nicht identisch sind.

Beispiel 3

[0111] Die vorstehend gebildeten monoklonalen Antikörper können auch zur Unterscheidung zwischen von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen und von Knochenmark abgeleiteten hämatopoetischen Zellen herangezogen werden. Die Fähigkeit zur Durchführung einer derartigen Unterscheidung ist wertvoll zur Ent-

wicklung von diagnostischen Reagenzien, die eine quantitative Bestimmung der Anzahl von Mesenchymzellen in Proben von gesamtem Knochenmark ermöglichen. Somit können diagnostische Reagenzien, die die monoklonalen Antikörper enthalten, zum Identifizieren von Patienten, die eine abnormal niedrige Anzahl von Mesenchymzellen aufweisen, verwendet werden. Ein niedriges Niveau von Mesenchymzellen kann einen Indikator von abnormal geringer Knochensynthese, die zu Osteoporose führt, darstellen.

[0112] Ferner eignen sich auch diagnostische Techniken auf der Basis von monoklonalen Antikörpern zu Messung der mesenchymalen Zellkonzentration in Knochenmark, das für zukünftige Knochenmarktransplantationen gewonnen worden ist. Eine geringe Konzentration an Mesenchymzellen stellt einen Hinweis auf eine verminderte Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Knochenmarktransplantation dar, da sich das Knochenmark-Stroma nicht rasch und vollständig ohne angemessene Differenzierung von Mesenchymzellen zu Stromalen Zellen entwickelt. Ferner können Tests, die zwischen von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen und von Knochenmark abgeleiteten hämatopoetischen Zellen unterscheiden, zur Reinigung von Mesenchymzellen aus vollständigem Knochenmark verwendet werden. Die gereinigten Zellen können sodann in wirksamer Weise durch Kultur vermehrt und zur Verstärkung der Skelettrepauratur bei Knochenmarktransplantationen verwendet werden.

[0113] Ein Verfahren, mit dem die Wirksamkeit der monoklonalen Antikörper, z. B. der vorstehend hergestellten mesenchymalen, monoklonalen SH2-Antikörper, zur Unterscheidung zwischen von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen und von Knochenmark abgeleiteten hämatopoetischen Zellen verwendet werden kann, umfaßt die folgenden, allgemein definierten Vorgänge:

- (1) indirekte Immunfluoreszenzfärbung von gezüchteten Mesenchymzellen und vollständigen Knochenmarkzellen in Suspension oder Lösung.
- (2) Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten von in Kultur vermehrten Mesenchymzellen und Kryoschnitten von vollständigen Knochenmarkzellen.
- (3) Quantitative Bestimmung (oder Reinigung) durch Durchflußzytometrie von durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung gefärbten, in Kultur vermehrten Mesenchymzellen im Gemisch mit einer Suspension von vollständigen Knochenmarkzellen.

[0114] Ferner können die vorstehend hergestellten monoklonalen Antikörper auch zur Unterscheidung zwischen von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen und von Knochenhaut abgeleiteten Mesenchymzellen verwendet werden. Eine derartige Unterscheidung erweist sich als wertvoll zur Entwicklung eines diagnostischen Tests zur quantitativen Bestimmung der Anzahl von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen in Situationen, wo beide Typen von Mesenchymzellen vorhanden sein können. Beispielsweise eignet sich diese Art von Test zur Bestimmung der relativen Verteilung von von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen oder von Knochenhaut abgeleiteten Mesenchymzellen beim Heilungsvorgang nach verschiedenen Arten von Brüchen.

[0115] Ein Verfahren zum Nachweis der Wirksamkeit der monoklonalen Antikörper, z. B. des monoklonalen SH2-Antikörpers, zur Unterscheidung zwischen von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen und von Knochenhaut abgeleiteten Mesenchymzellen umfaßt die folgenden, allgemein definierten Vorgänge:

- (1) Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von in Kultur vermehrten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen aus einer Suspension, die auch in Kultur vermehrte, von Knochenhaut abgeleitete Mesenchymzellen enthält, unter Verwendung des monoklonalen SH2-Antikörpers.
- (2) Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten einer gemischten Population von bekannten Mengen von in Kultur vermehrten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen und von in Kultur vermehrten, von Knochenhaut abgeleiteten Mesenchymzellen.
- (3) Indirekte Immunfluoreszenzfärbung einer lebenden Kultur von vermehrten, von Knochenmark abgeleiteten Mesenchymzellen und einer lebenden Kultur von vermehrten, von Knochenhaut abgeleiteten Mesenchymzellen in Kultur (in Form einer Mikromasse).

[0116] Vorstehend wurde die Erfindung unter Bezugnahme auf bevorzugte Ausführungsformen beschrieben. Offensichtlich können Dritte beim Lesen und Studium der vorstehenden ausführlichen Beschreibung auf Modifikationen und Abänderungen kommen. Die Erfindung soll alle derartigen Modifikationen und Abänderungen umfassen, sofern sie unter den Umfang der beigefügten Ansprüche fallen.

Patentansprüche

1. Monoklonaler Antikörper, der eine humane Mesenchym-Stammzelle erkennt, die sich zu Zellen von einem oder mehreren Bindegewebetypen differenzieren können, wobei es sich bei dem Antikörper um den gleichen Antikörper handelt, wie er von der Hybridom-Zelllinie SH2, hinterlegt bei ATCC unter der Hinterlegungsnummer HB 10743, oder von der Hybridom-Zelllinie SH3, hinterlegt bei ATCC unter der Hinterlegungsnummer HB 10744, oder von der Hybridom-Zelllinie SH4, hinterlegt bei ATCC unter der Hinterlegungsnummer HB

10745, gebildet wird.

2. Hybridom, das einen monoklonalen Antikörper nach Anspruch 1 bildet, wobei das Hybridom bei ATCC unter der Hinterlegungsnummer HB 10743, HB 10744 oder HB 10745 hinterlegt ist.

3. Verfahren zur Gewinnung von humanen Mesenchym-Stammzellen aus einer Zellpopulation, die humane Mesenchym-Stammzellen und andere Zellen enthält, umfassend:
das Kontaktieren der Zellpopulation mit einem Antikörper nach Anspruch 1, um die humanen Mesenchym-Stammzellen an den Antikörper zu binden.

4. Isolierte homogene Population von humanen Mesenchym-Stammzellen, die sich zu Zellen von einem oder mehreren Bindegewebetypen differenzieren können, mit der Eigenschaft, dass sie an mindestens einen der monoklonalen Antikörper nach Anspruch 1 binden können.

5. Humane Mesenchym-Stammzellen nach Anspruch 4, wobei die humanen Mesenchym-Stammzellen an jeden der Antikörper nach Anspruch 1 binden.

6. Verwendung der humanen Mesenchym-Stammzellen nach Anspruch 4 zur Herstellung einer Zusammensetzung zur Verwendung bei der Behandlung von Bindegewebestörungen.

7. Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit von humanen Mesenchym-Stammzellen in einem Zellgemisch, umfassend das Kontaktieren des Zellgemisches mit einem monoklonalen Antikörper nach Anspruch 1, der selektiv humane Mesenchym-Stammzellen bindet; und das Nachweisen der Anwesenheit des Antikörpers.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die humanen Mesenchym-Stammzellen einer Kulturvermehrung unterzogen worden sind.

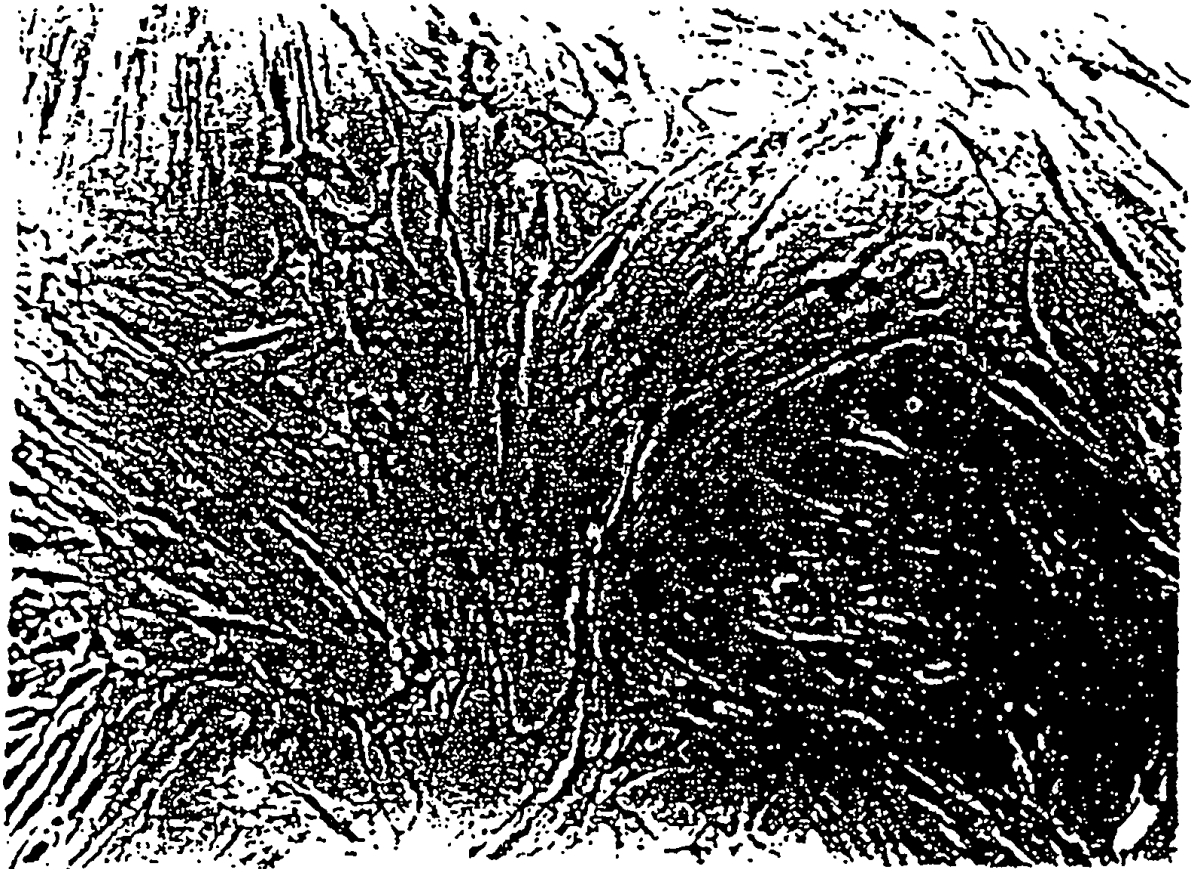
9. Mesenchym-Stammzellen nach Anspruch 4 oder 5, wobei es sich bei einem der Bindegewebetypen um Knochen handelt.

10. Zusammensetzung, enthaltend Mesenchym-Stammzellen nach Anspruch 4 oder 5 und ein Kulturmedium, wobei das Kulturmedium die Mesenchym-Stammzellen vermehrt.

11. Therapeutische Zusammensetzung, enthaltend die Mesenchym-Stammzellen nach Anspruch 4 oder 5 und einen pharmazeutisch verträglichen Träger, wobei die Mesenchym-Stammzellen in einer Menge vorhanden sind, die die Bildung von Bindegewebezellen bewirken.

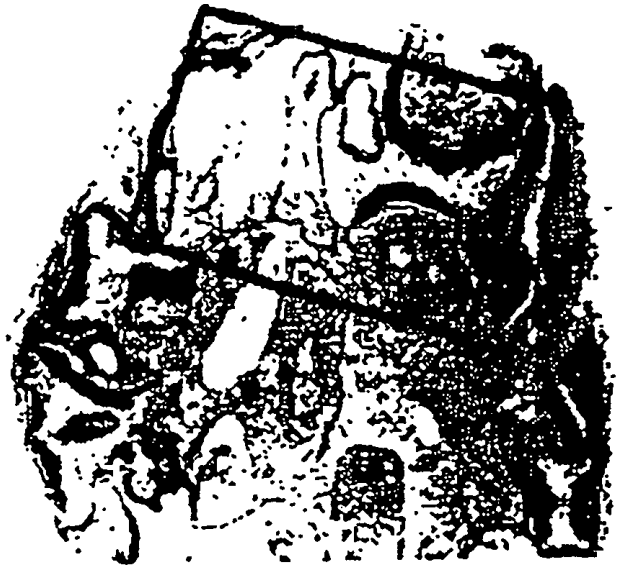
12. Therapeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei es sich beim Bindegewebetyp um Knochen oder Knorpel handelt.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen



FIGUR 1

FIGUR 2A



FIGUR 2B



FIGUR 2C





FIGUR 3B



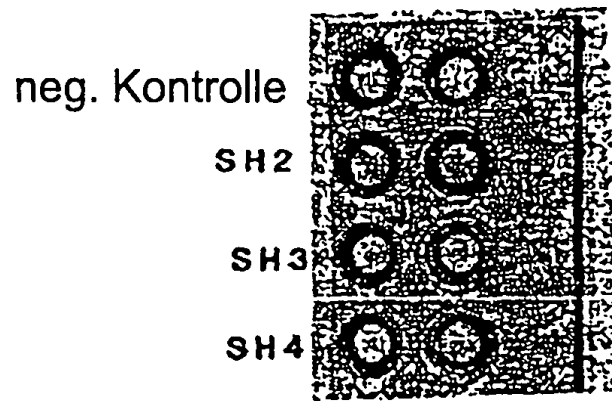
FIGUR 3A



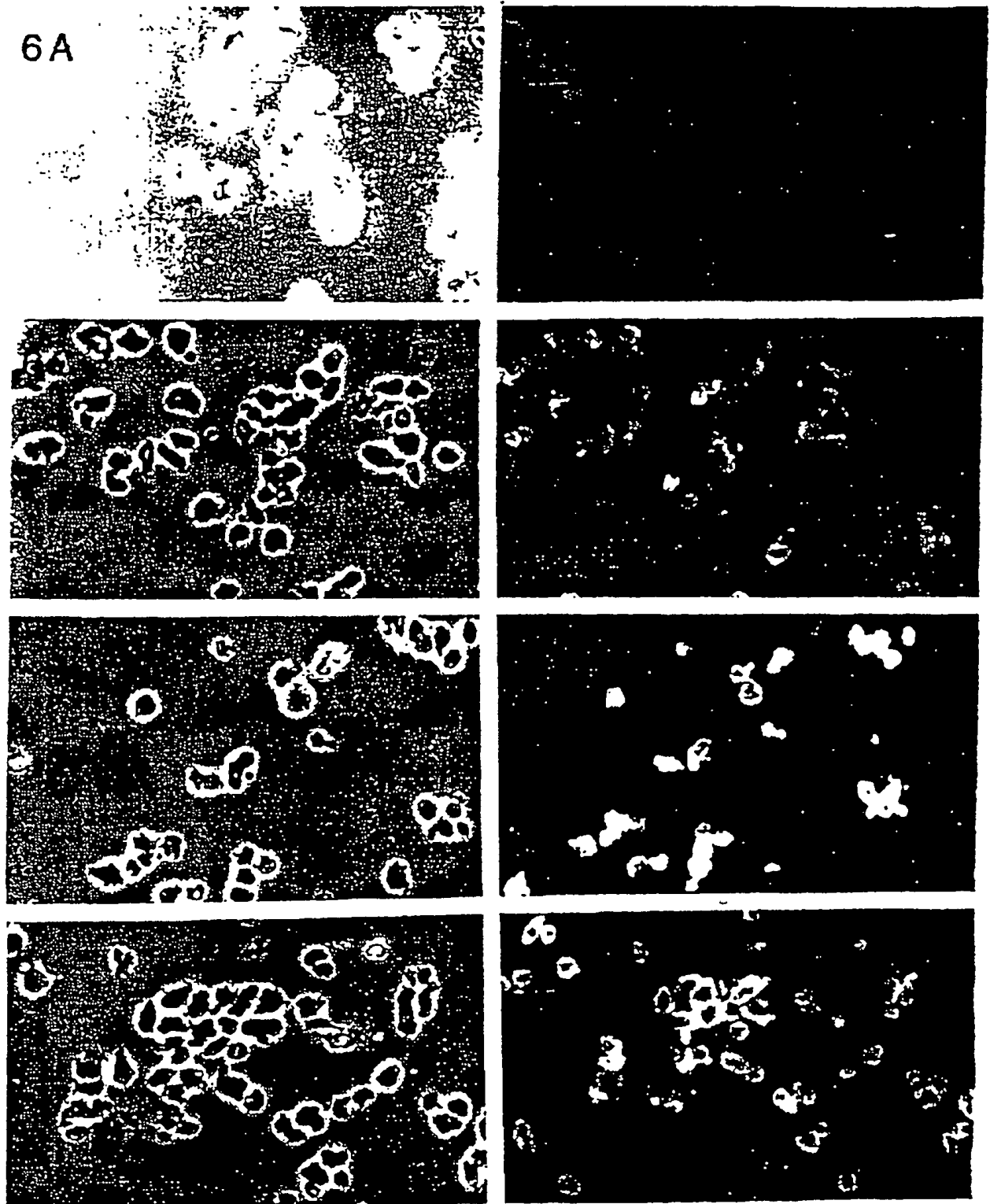
FIGURE 4B



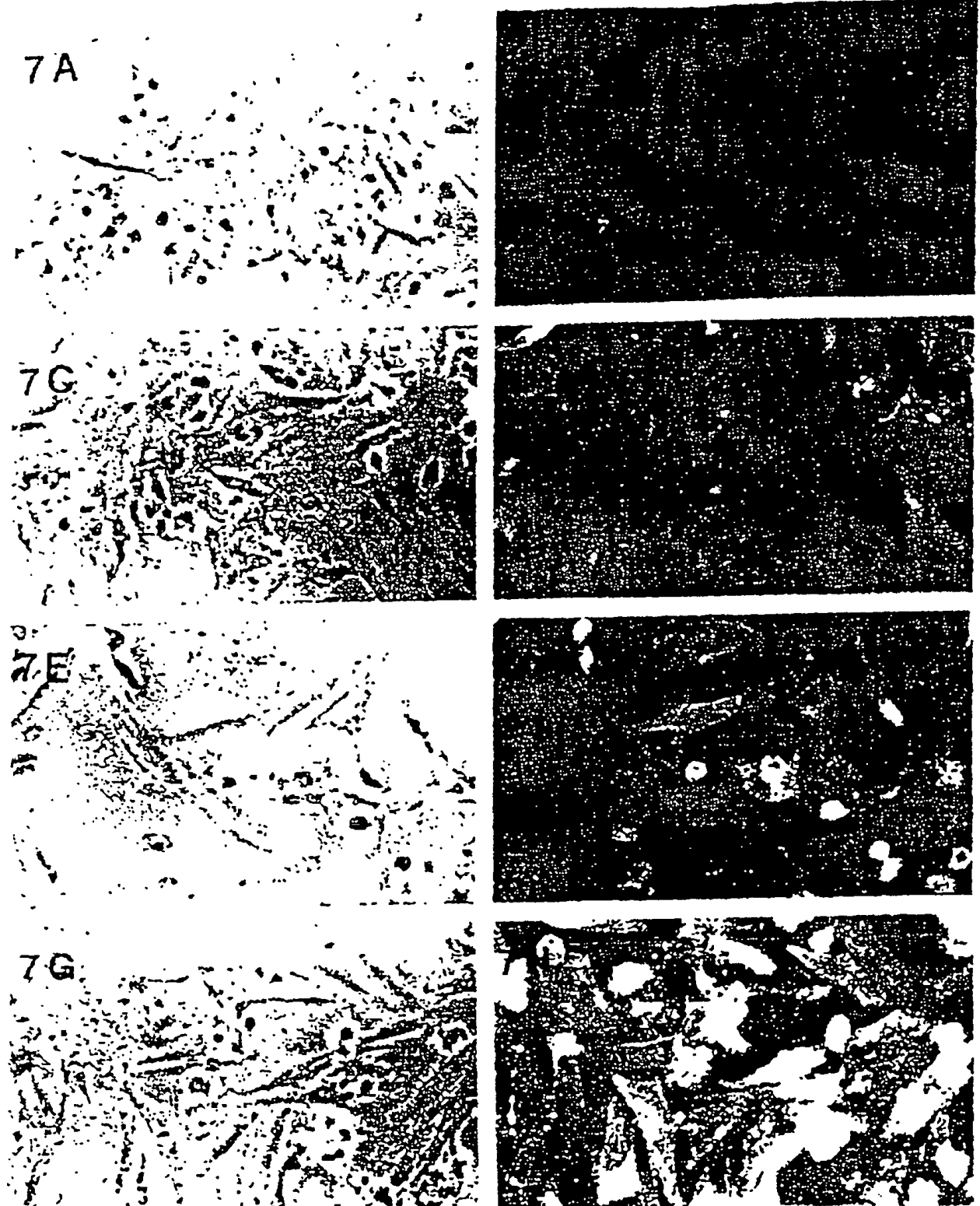
FIGURE 4A



FIGUR 5



FIGUR 6



FIGUR 7