



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 32 856 T2 2004.05.13**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 679 182 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 32 856.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB94/00354**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 931 150.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/014082**

(86) PCT-Anmeldetag: **14.11.1994**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **26.05.1995**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.11.1995**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **25.06.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.05.2004**

(51) Int Cl.7: **C12N 5/10**
A61K 48/00

(30) Unionspriorität:
153769 17.11.1993 US

(73) Patentinhaber:
**The Jikei University School of Medicine,
Tokio/Tokyo, JP**

(74) Vertreter:
**Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler
Wichmann Huhn, 81675 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, NL, SE

(72) Erfinder:
**KITAMURA, Masanori, 174 Ballards Lane, London
N3 2NT, GB**

(54) Bezeichnung: **ZUFUHR VON GENPRODUKTEN MITTELS MESANGIUM-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

Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft die Abgabe von kultivierten Mesangium-Zellen an eine Niere eines Säugetiers. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verabreichung von kultivierten Mesangium-Zellen über eine Nierenarterie, ausgehend von welcher die Zellen zu den Glomeruli der Niere transportiert werden und sich darin spezifisch anhäufen. Die Erfindung betrifft weiter die Expression eines exogenen Genprodukts ausgehend von solchen verabreichten Mesangium-Zellen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Glomeruläre Krankheit ist eine der Hauptursachen von chronischem Nierenversagen. Während der letzten fünf Jahre ist vermutet worden, dass verschiedene Moleküle, wie Cytokine/Wachstumsfaktoren und proteolytische Enzyme, an der Pathogenese von Schädigungen der Glomeruli wie auch an der Induktion von Proteinurie beteiligt sein könnten. M. Kashgarian und R. B. Sterzel, *Kidney Int.* 41, 524 (1992); W. H. Baricos und S. V. Shah, *Kidney Int.* 40, 161 (1991). Viele neuere Studien haben jedoch kultivierte Zellen oder betroffenes Gewebe verwendet und erzeugen dementsprechend kein Verständnis der pathologischen Rolle von solchen Molekülen bei der Erzeugung von Schädigungen *in vivo*. Eine wichtige Herausforderung auf diesem Gebiet besteht darin, Vermittlermoleküle zu identifizieren, die für verschiedene Arten von glomerulären Schädigungen von zentraler Bedeutung sind, beispielsweise durch die Verwendung eines geeigneten *in vivo*-Systems, um Kandidaten-Moleküle auszuwählen. Gegenwärtig gibt es keine derartigen Verfahren, die für diesen Zweck geeignet wären. Folglich wäre es nützlich, Verfahren zu etablieren, die geeignet sind, um die pathophysiologische Funktion von speziellen Molekülen *in situ*, d. h. innerhalb der Glomeruli der Niere, unter Verwendung von Gentransfer-Technologie zu ermitteln.

[0003] Die am üblichsten zum Einbringen von exogenen Nukleinsäuren in Zellen verwendeten Techniken umfassen die Verwendung von viralen Vektoren. Diese Vektoren sind vorteilhaft, da sie hohe Prozentsätze von Empfängerzellen infizieren können und sich in das Zellgenom integrieren können. Die viralen Vektoren werden oftmals so konstruiert, dass sie Replikations-defekt sind, haben sie einmal eine Zelllinie transfiziert. Andere virale Vektoren, die vorgeschlagen oder verwendet worden sind, um Nukleinsäuren in Zellen einzubringen, umfassen Adenovirus-, Adeno-assoziiertes Virus-, Herpes-Virus- und Poliovirus-Vektoren. Die retroviralen und Adeno-assoziiertes Virus-Vektoren werden am häufigsten für eine *ex vivo*-Gentherapie, d. h. das Einbringen eines exogenen DNA-Konstrukts in Zellen, die zeitweilig aus dem Körper des Patienten entfernt worden sind, vorgeschlagen oder verwendet.

[0004] Im Folgenden bezieht sich exogenes Nukleinsäurekonstrukt oder exogenes Genkonstrukt auf eine Nukleinsäuresequenz, die von außerhalb einer Empfängerzelle her stammt und in eine Empfängerzelle durch eine Nukleinsäureabgabetechnik eingeschleust wird. Eine Nukleinsäure oder ein Genkonstrukt können hergestellt werden unter Verwendung der Technik der *in vitro*-DNA-Rekombination, die in diesem Fachgebiet bekannt ist, oder können ein Nukleinsäurefragment sein, das aus einem Quellenmaterial ohne weitere Manipulation gereinigt worden ist. Das exogene Gen kann vollständig aus homologen Sequenzen, d. h. Sequenzen, die ausgehend von der gleichen Spezies, von der sich die Empfängerzellen ableiten, kloniert, isoliert oder abgeleitet worden sind, zusammengesetzt sein. Alternativ kann die Gesamtheit oder ein Abschnitt des exogenen Gens aus Sequenzen aus anderen Spezies als der Spezies, von welcher sich die Empfängerzellen ableiten, zusammengesetzt sein, welche im folgenden als heterologe Sequenzen bezeichnet werden. Das exogene Genkonstrukt kann natürlich sein, indem keine der regulatorischen Sequenzen und kodierenden Sequenzen, die Teil des Gens sein können, substantiell oder willentlich verändert werden, oder das exogene Genkonstrukt kann chimär sein, indem Sequenzabschnitte aus verschiedenen Quellen in dem endgültigen Genkonstrukt vorhanden sind. Beispiele von exogenen Nukleinsäurekonstrukten, die in Zellen eingeschleust worden sind, umfassen Konstrukte, die bakterielle Proteine, Onkogene, Zelloberflächenmoleküle und Antisinn-Sequenzen exprimieren. Minoru, S., et al., *EMBO J.* 9: 2835 (1990); Gossett, L., *J. Cell Biol.* 106: 2127 (1988); Townsend, S. und Alison, P., *Science* 259: 368 (1993); Trojan, J., et al., *Science* 259: 94 (1993).

[0005] Ein Gentransfer ist in verschiedene Organe, einschließlich Knochenmark, Haut, Gehirn, Herz, Muskel, Lunge, Leber, Niere und die Arterienwand vorgenommen worden. J. W. Larrick und K. L. Burck, *Gene Therapy: Application of Molecular Biology* (Elsevier, New York 1991), Kap. 5–7; H. Lin et al., *Circulation* 82, 2217 (1990); R. J. Bosch, A. S. Woolf, L. G. Fine, *Exp. Nephrol.* 1, 49 (1993). In diesen Fällen sind exogene Gene an das Zielorgan oder -gewebe durch direkte Injektion oder örtliche Instillation von Materialien verabreicht worden. In der Niere sind die Glomeruli jedoch kleine Strukturen (von 100–200 µm Durchmesser), die innerhalb der Nierenrinde verstreut sind, ($3 \times 10^4 - 1 \times 10^6$ Glomeruli/Niere) und können dementsprechend durch herkömmliche Strategien nicht zielgerichtet angesteuert werden. Die direkte Injektion von viralen Vektoren oder DNA-Liposom-Komplexen in den Nierenkreislauf könnte möglicherweise bewirken, dass andere Nierenzelltypen wie

auch andere Organe der exogenen DNA ausgesetzt werden.

[0006] Woolf et al., *Kidney Int.* 43 (Suppl. 39): S116–S119 (1993) offenbarten zwei Strategien für eine Gentherapie der Niere. Die erste Strategie umfasste die Transplantation von embryonalem metanephrogenem Gewebe, das mit einem Reporter-gen, welches in einem retroviralen Vektor enthalten ist, transduziert worden ist. Im Gegensatz zu erwachsenem Gewebe enthält das embryonale Metanephros mitotisch aktive Zellen, die für eine Integration und Expression des retroviralen Vektors benötigt werden. Stücke des transduzierten embryonalen Gewebes wurden unter die Nierenkapsel von erwachsenen Mäusen oder in die Nierenrinde von neugeborenen Mäusen transplantiert. Die Autoren gaben zu, dass das Überleben der Metanephros-Transplantate über lange Zeit hinweg durch Ischämie und Immunabstoßung begrenzt war. Diese Strategie hängt von einer Quelle von verträglichem embryonalem Gewebe ab und erfordert einen chirurgischen Eingriff an der Niere des Patienten.

[0007] Die zweite Strategie umfasste eine direkte Injektion von Retrovirus-Vektoren in Nieren von erwachsenen Mäusen. Es wurde festgestellt, dass einige Tage nach der Injektion von Retrovirus eine kleine Anzahl von proximalen Tubuluszellen ein Reporter-gen exprimierten. Eine solche direkte Verabreichung von Virus erzeugt die Möglichkeit, dass Nicht-Nieren-Gewebe und -Organe dem Vektor ausgesetzt werden. Da Retroviren für eine Integration und Expression über längere Zeit hinweg sich teilende Zellen benötigen, mussten Woolf et al. darüber hinaus eine proliferative Umgebung in der erwachsenen Niere erzeugen. Sie bewerkstelligten dies, indem die Empfänger-Mäuse mit Folsäure behandelt wurden, um eine generalisierte und subakute Schädigung an der Niere zu erzeugen. Dies erzeugte wiederum eine Runde von der Reparatur dienender Proliferation, die die Integration der Retrovirus-Vektoren erleichterte. Woolf et al. legten dar, dass diese Strategie „clearly ... would be unacceptable if gene transfer into human kidneys was contemplated, unless the injury phase could be tightly controlled“ („eindeutig ... inakzeptabel wäre, wenn in Gentransfer in menschliche Nieren in Betracht gezogen würde, sofern nicht die Schädigungsphase sehr stark kontrolliert werden könnte“.)

[0008] Kitamura, M., et al., *Journal of the American Society of Nephrology*, Band 4, Nr. 3, September 1993, S. 468, beschreiben einen Gentransfer in den Glomerulus über einen Mesangium-Zellen-Vektor. Replikations-defekte kultivierte Mesangium-Zellen werden nicht offenbart.

[0009] Kitamura, M., et al., *Journal of Clinical Investigation*, Band 94, Nr. 2, August 1994, S. 497–505, ist als Stand der Technik unter Art. 54(2) EPÜ nicht anwendbar.

Zusammenfassung der Erfindung

[0010] Die Erfindung stellt Replikations-defekte kultivierte Mesangium-Zellen, wie weiter in den Ansprüchen definiert, bereit. Zusätzlich stellt die Erfindung die Zellen für eine Verwendung in der Human- und Veterinärmedizin und insbesondere zur Prävention oder Behandlung von Nierenkrankheiten, wie fortschreitender Sklerose der Nierenglomeruli oder Proteinurie, bereit.

[0011] Hier wird ein Verfahren zum Einführen eines exogenen Gens in eine Niere eines Säugetiers offenbart, welches die Schritte umfasst: eine Mehrzahl der gewünschten kultivierten Mesangium-Zellen, die immunologisch mit dem Säugetier verträglich sind und die ein Nukleinsäurekonstrukt, welches das exogene Gen umfasst, enthalten, bereitzustellen und die das Konstrukt enthaltenden Mesangium-Zellen an die Nierenarterie der Niere zu verabreichen unter Bedingungen, wo die Zellen in den Glomeruli der Niere eingefangen werden. Das Nukleinsäurekonstrukt kann ferner eine Replikations-defekte retrovirale Sequenz umfassen und in die kultivierten Mesangium-Zellen durch Transfektion eingeführt werden.

[0012] Das exogene Gen kann eine für ein Genprodukt kodierende Sequenz umfassen. Das Genprodukt kann exprimiert werden, sekretiert werden und in das Kreislaufsystem, das Interstitium oder den Harnweg des Säugetiers eintreten oder das Genprodukt kann exprimiert werden, sekretiert werden und in der Niere des Säugetiers oder auf der Oberfläche der Mesangium-Zellen lokalisiert sein. Das exogene Gen kann ferner eine lange terminale Wiederholung des Moloney-Maus-Leukämievirus umfassen. Die gewünschten Mesangium-Zellen können an eine oder beide Nierenarterien des Säugetiers verabreicht werden.

[0013] Es wird auch ein anderes Verfahren zum Einführen der gewünschten kultivierten Mesangium-Zellen in eine Niere eines Säugetiers offenbart, (welches) die Schritte umfasst: eine Mehrzahl der gewünschten kultivierten Mesangium-Zellen, die immunologisch mit dem Säugetier verträglich sind, bereitzustellen und die kultivierten Mesangium-Zellen an die Nierenarterie der Niere zu verabreichen unter Bedingungen, wo die Zellen in den Glomeruli der Niere eingefangen werden, und die in situ vorhandenen Mesangium-Zellen der Niere selektiv mit einem mesangiolytischen Mittel zu schädigen. Die selektive Schädigung der in situ vorhandenen Mesangium-Zellen kann vor oder nach dem Infundierungsschritt stattfinden. Die kultivierten Mesangium-Zellen können ein Nukleinsäurekonstrukt, welches ein exogenes Gen umfasst, enthalten. Das mesangiolytische Mittel kann einen anti-Mesangium-Zellen-Antikörper umfassen und kann einen monoklonalen anti-Mesangium-Zellen-Antikörper umfassen. Ein geeignetes mesangiolytisches Mittel umfasst den monoklonalen Antikörper 1-22-3.

[0014] Es wird ein Verfahren zum Einführen der gewünschten kultivierten Mesangium-Zellen in eine Niere ei-

nes Säugetiers offenbart, welches die Schritte umfasst: eine Mehrzahl der gewünschten kultivierten Mesangium-Zellen, die mit dem Säugetier immunologisch verträglich sind, bereitzustellen und die kultivierten Mesangium-Zellen an die Nierenarterie der Niere zu verabreichen unter Bedingungen, wo die Zellen in den Glomeruli der Niere eingefangen werden.

[0015] Es wird ein Herstellungserzeugnis, welches Verpackungsmaterial und eine Mehrzahl der gewünschten kultivierten Mesangium-Zellen, die innerhalb des Verpackungsmaterials enthalten ist, umfasst, offenbart. Die kultivierten Mesangium-Zellen sind für eine Verabreichung an eine Nierenarterie eines Säugetiers wirksam unter Bedingungen, wo die Zellen in Glomeruli der Niere eingefangen werden und mit dem Säugetier immunologisch verträglich sind. Das Verpackungsmaterial enthält ein Etikett oder einen Beipackzettel, welches bzw. welcher angibt, dass die kultivierten Mesangium-Zellen an die Nierenarterie unter Bedingungen, wo die Zellen in Glomeruli eingefangen werden, verabreicht werden können.

[0016] Die innerhalb des Verpackungsmaterials enthaltenen, gewünschten, kultivierten Mesangium-Zellen, können ein Nukleinsäurekonstrukt enthalten, welches ein exogenes Gen umfasst. Die das Konstrukt enthaltenden Mesangium-Zellen können die Zelllinie RM4/BG715 umfassen.

[0017] Auch offenbart wird ein Herstellungserzeugnis, welches Verpackungsmaterial und ein mesangiolytisches Mittel, welches innerhalb des Verpackungsmaterials enthalten ist, umfasst. Das mesangiolytische Mittel ist wirksam, um die in situ vorhandenen Mesangium-Zellen einer Niere eines Säugetiers selektiv zu schädigen. Das Verpackungsmaterial enthält ein Etikett oder einen Beipackzettel, welches oder welcher angibt, dass das mesangiolytische Mittel zum Einführen der gewünschten kultivierten Mesangium-Zellen in die Niere des Säugetiers verwendet werden kann durch Schritte, welche umfassen: eine Mehrzahl von kultivierten Mesangium-Zellen bereitzustellen, die mit dem Säugetier immunologisch verträglich sind, die kultivierten Mesangium-Zellen an die Nierenarterie der Niere zu verabreichen unter Bedingungen, wo die Zellen in Glomeruli der Niere eingefangen werden, und die in situ vorhandenen Mesangium-Zellen der Niere selektiv mit einem mesangiolytischen Mittel zu schädigen. Das mesangiolytische Mittel kann ein anti-Mesangium-Zellen-Antikörper, wie der monoklonale anti-Mesangium-Zellen-Antikörper 1-22-3, sein.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0018] Diese Erfindung beschreibt eine ortsgerichtete Genabgabe an Glomeruli von einer oder beiden Nieren eines Säugetiers. Speziell werden renale glomeruläre Mesangium-Zellen, wie in den Ansprüchen definiert, kultiviert und außerhalb des Körpers transfiziert, um ein Gen oder mehrere Gene von Interesse einzuführen, und derartige Zellen werden dann über die Nierenarterie an eine Niere verabreicht. Die verabreichten Mesangium-Zellen steuern spezifisch zielgerichtet Glomeruli an und es wird ein Genprodukt innerhalb der Glomeruli exprimiert. Diese Vorgehensweise kann des weiteren umfassen, eine Niere einem Mittel auszusetzen, das eine Mesangiolyse induziert, gefolgt von einer Mesangium-Regeneration. Wenn die gewünschten gentechnisch modifizierten Mesangium-Zellen in eine Nierenarterie infundiert werden, die eine solche selektiv geschädigte Niere versorgt, wird die Expression eines exogenen Gens in den Glomeruli dramatisch verstärkt und die Expression wird für wenigstens 8 Wochen aufrechterhalten. Zusätzlich wird festgestellt, dass in höheren Anzahlen von Glomeruli die gewünschten gentechnisch modifizierten Mesangium-Zellen vorhanden sind, als ausgehend von einer Infusion von Mesangium-Zellen ohne Mesangiolyse erwartet würde.

[0019] Die vorliegende Offenbarung beschreibt ein Verfahren, das verwendet werden kann, um (i) ein exogenes Gen in spezielle mikroskopische Strukturen innerhalb eines Organs zu transferieren und (ii) um das eingeführte Gen und dessen Produkt in situ in einer ortsgerichteten Weise zu amplifizieren. Das Verfahren hat mehrere Vorteile verglichen mit einem herkömmlichen in vivo-Gentransfer unter Verwendung von viralen Vektoren oder Liposomen, z. B. hohe Effizienz, hohe Ortsspezifität der Genabgabe und stabile Expression. Dieses System erlaubt, eine hochentwickelte gentechnologische Modifizierung von Zellen in vitro vor einer Injektion auszuführen, und ermöglicht den Transfer einer Mehrzahl von Genen, um eine Mehrzahl von therapeutischen Genprodukten oder eine Mehrzahl von Stoffwechselweg-Komponenten ausgehend von den Glomeruli zu exprimieren.

[0020] Das Verfahren verwendet die renalen glomerulären Mesangium-Zellen zur ortsspezifischen Lokalisierung. Im Ratten-Glomerulus reicht der Durchmesser der Kapillaren von 5 bis 25 µm (zuführende Arteriole: 25 µm). A. Remuzzi et al., *Am. J. Physiol.* 263, F562 (1992). Der Durchmesser der gewünschten kultivierten Ratten-Mesangium-Zellen beträgt ungefähr 15–25 µm. Wenn solche Mesangium-Zellen in die Nierenarterie injiziert werden, bleiben die Zellen innerhalb der glomerulären Kapillaren stecken oder werden darin eingefangen. Folglich ist der Ort der Geneinführung auf die Glomeruli beschränkt. Auf diese Weise können Glomeruli (mit 100–200 µm Durchmesser), die innerhalb der gesamten Nierenrinde verstreut sind, zielgerichtet angesteuert werden. Bei Menschen ist der Durchmesser der gewünschten Mesangium-Zellen in entsprechender Weise höher als der Durchmesser der glomerulären Kapillaren. Siehe z. B. Brenner und Rector (Hrsg.), *The Kidney*, Band I, S. 10–11 (1991). Die Verfahren sind ortsspezifisch im Gegensatz zu möglichen Alternativen, die eine direkte Injektion von viralen Vektoren oder DNA-Liposom-Komplexen in den Nierenkreislauf verwenden. Alter-

- native Verfahren führen zu einer Exposition des gesamten Gefäßsystems der Niere wie auch anderer Organe gegenüber Virus-Vektoren oder DNA-Liposom-Komplexen.
- [0021] Für die Zwecke der Erfindung werden aus einer Niere Biopsien entnommen und aus dem Biopsie-Material werden Mesangium-Zellen isoliert. In die isolierten Mesangium-Zellen werden durch Transfektion exogene Nukleinsäurekonstrukte, die ein gewünschtes Gen oder Gene enthalten, eingeschleust. Diese Transfektionen mit oder Einschleusungen von exogenen Genen in die Zellen werden unter Verwendung von Techniken, die dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt sind, ausgeführt.
- [0022] Die gewünschten transfizierten Mesangium-Zellen werden an eine Empfänger-Niere über eine Nierenarterie verabreicht. Zellen können durch ein jegliches geeignetes Mittel oder eine jegliche geeignete Maßnahme, wie Infusion oder Injektion, verabreicht werden. Zellen werden vorzugsweise durch Injektion verabreicht. Da die Durchmesser der Mesangium-Zellen ähnlich zu den oder geringer als die Innendurchmesser der zuführenden Arteriolen von Glomeruli, aber größer als die Kapillaren innerhalb eines Glomerulus sind, werden injizierte Zellen innerhalb von glomerulären Kapillaren eingefangen oder zurückgehalten; in anderen Teilen der Niere oder in anderen Organen wird ein Einfang nicht nachgewiesen. Dementsprechend bevölkern die transfizierten Mesangium-Zellen Glomeruli in einer ortsspezifischen Weise.
- [0023] Renale glomeruläre Mesangium-Zellen der Erfindung können syngen, allogenen oder xenogenen sein. Bevorzugte Zellen sind syngen oder allogenen, um die Möglichkeit von Immunabstoßungsphänomenen zu minimieren. In einer Ausführungsform werden autologe Zellen im Rahmen der Erfindung verwendet. Das heißt, Mesangium-Zellen können ausgehend von Biopsie-Gewebe von einer Niere kultiviert werden, in vitro mit einem speziellen Gen transfiziert werden und die gewünschten stabilen Transfektanten in die entgegengesetzte Niere desselben Patienten injiziert werden. Alternativ können die gewünschten transfizierten Mesangium-Zellen sogar an dieselbe Niere, aus welcher das ursprüngliche Biopsie-Gewebe entnommen worden ist, verabreicht werden. Andererseits ist bekannt, dass viele Immunabstoßungsphänomene durch Mittel oder Maßnahmen, die in diesem Fachgebiet bekannt sind, kontrolliert oder in anderer Weise unterdrückt werden können. Dementsprechend können sogar xenogene Zellen immunologisch verträglich gemacht werden, sofern erforderlich, indem eine jegliche Immunabstoßung, die möglicherweise auftreten könnte, wenn die Verfahren der Erfindung praktisch ausgeführt werden, kontrolliert oder in anderer Weise unterdrückt wird.
- [0024] Ein exogenes Gen kann eine für ein Genprodukt, z. B. ein Polypeptid, kodierende Sequenz umfassen. Eine für ein Genprodukt kodierende Sequenz kann unter die Kontrolle von regulatorischen Elementen gestellt werden, um eine wirksame Produktion der Substanz sicherzustellen. Regulatorische Elemente können Promotoren, Repressoren, Verstärkungselemente (Enhancer), Polyadenylierungsregionen und ähnliches umfassen. Regulatorische Elemente werden in geeigneter Weise in Bezug auf eine kodierende Sequenz positioniert, um eine wirksame Produktion des Genprodukts zu erzielen. Es kann erforderlich sein, dass einige regulatorische Elemente in Hinblick auf die kodierende Sequenz ziemlich präzise positioniert werden müssen, wohingegen die genaue Position für andere regulatorische Elemente weniger restriktiv ist. Beispielsweise müssen Promotoren 5' zu einer kodierenden Sequenz angeordnet werden, um eine korrekte Initiation der Transkription zu erhalten. Im Gegensatz dazu können Enhancer-Elemente aktiv sein, wenn sie entweder 5' oder 3' zu einer transkribierten Sequenz angeordnet sind. Majors, J. und Varmus, H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 5866 (1983); Chandler, V., et al., Cell 33: 489 (1983); Ponta, H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1020 (1985).
- [0025] Wenn ein exogenes Gen eine für ein Genprodukt kodierende Sequenz umfasst, kann das Genprodukt exprimiert werden und kann innerhalb der Zelle verbleiben, d. h. das Genprodukt kann innerhalb der exprimierenden gewünschten Mesangium-Zelle lokalisiert sein. Darüber hinaus kann ein Genprodukt zu bestimmten zytoplasmatischen oder nukleären Abschnitten oder Kompartimenten der Mesangium-Zelle dirigiert werden. Alternativ kann ein Genprodukt zu der Oberfläche der Mesangium-Zelle dirigiert werden oder kann sekretiert oder in anderer Weise zu anderen Nierenzelltypen dirigiert werden. Die in den Kapillaren von Glomeruli eingefangenen oder zurückgehaltenen gewünschten Mesangium-Zellen sind in idealer Weise positioniert, um eine Diffusion von sekretierten Proteinen zwischen den Glomeruli über das kapillare Lumen, Endothelfenster und mesangiale Bahnen zu ermöglichen. Diese Bahnen ermöglichen sekretierten therapeutischen Produkten den Zugang zum Körperkreislauf, dem renalen Interstitium und dem Harntrakt. Eingefangene Zellen sollten die Nierenfunktion nicht beeinträchtigen, da die glomerulären Kapillaren komplexe Netzwerke mit zahlreichen Verbindungen darstellen, welche ungefähr 400 Kapillarabschnitte mit 250 Verbindungen pro Glomerulus umfassen. A. Remuzzi et al., Am. J. Physiol. 263, F562 (1992). Ein Genprodukt kann auch zum Kreislaufsystem des den Empfängerorganismus darstellenden Säugetiers dirigiert werden. Sequenzen, die nützlich sind, um ein Genprodukt zu bestimmten zellulären Positionen oder zu einem Sekretionsweg zu dirigieren, sind in diesem Fachgebiet bekannt.
- [0026] Die Erfindung kann verwendet werden, um eine Gentherapie von somatischen Zellen auszuführen, indem therapeutische Gene spezifisch in Glomeruli der Niere eingeführt werden. Ein solcher Ansatz ist nützlich für die Prävention oder Behandlung von solchen Krankheiten, wie fortschreitender Sklerose der Nierenglomeruli oder Proteinurie. Da die gewünschten Mesangium-Zellen sich in dem Gefäßsystem ansiedeln, können die Zellen Polypeptide, DNA, RNA oder andere therapeutische Substanzen an den Körperkreislauf zusätzlich zu

einer örtlichen Abgabe an die Niere abgeben.

[0027] Unter Verwendung dieser Methodik wird eine Expression eines exogenen Gens nur ausgehend von Glomeruli der Niere unmittelbar stromabwärts vom Injektionsort nachgewiesen. In der entgegengesetzten Niere oder in anderen Organen, wie den Lungen, wo man erwarten könnte, dass intravenös injizierte Zellen eingefangen werden, wenn sie aus der Niere entkommen wären, wird keine Expression nachgewiesen.

[0028] In einer alternativen Ausführungsform werden die gewünschten kultivierten Mesangium-Zellen an die Nierenarterie einer Niere verabreicht, die einem Mittel ausgesetzt worden ist, welches eine vorübergehende Mesangium-Regeneration induziert. Ein mesangiolytisches Mittel kann ein jegliches Mittel sein, das selektiv in situ vorhandene Nieren-Mesangium-Zellen, d. h. jene Mesangium-Zellen, die in einem Empfänger-Säugetier vor der Verabreichung von kultivierten Mesangium-Zellen vorhanden sind, schädigt. Ein anti-Mesangium-Zellen-Antikörper kann beispielsweise in einen Empfänger über den venösen Kreislauf eingeführt werden, wobei dieser wenigstens eine der in situ vorhandenen Mesangium-Zellen durch Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) oder durch natürliche Killerzell-Mechanismen schädigt oder tötet. Einige Tage vor oder nach der Behandlung mit dem mesangiolytischen Mittel werden die gewünschten kultivierten Mesangium-Zellen, die ein gewünschtes exogenes Genkonstrukt aufweisen, in die Niere über die Nierenarterie eingeschleust. Der Erfinder hat entdeckt, dass unter diesen Bedingungen die Expression eines exogenen Gens in situ dramatisch verstärkt wird und dass eine Expression auf hohem Niveau für längere Zeitdauern anhält. Dieses Phänomen könnte zumindest teilweise eine Zunahme der Anzahl von kultivierten Mesangium-Zellen, die in den Glomeruli vorhanden sind, widerspiegeln.

[0029] In einer dritten Ausführungsform werden die gewünschten kultivierten Mesangium-Zellen ohne ein exogenes DNA-Konstrukt in eine Nierenarterie einer Niere injiziert. Die Mesangium-Zellen können durch Verfahren, die in diesem Fachgebiet bekannt sind, Gewebe- oder HLA-typisiert werden, damit sie immunologisch so gut wie möglich der Niere entsprechen. Diese Zellen werden in Glomeruli der Niere eingefangen, siedeln sich wieder im Mesangium an und beginnen, die normalen Funktionen von Mesangium-Zellen auszuüben. Solche Zellen können dementsprechend nützlich sein, um Nierenkrankheiten zu behandeln, bei denen ein Mangel an Mesangium-Zellen, was Anzahl oder Funktion betrifft, besteht.

[0030] Die Erfinder haben einen histologischen Nachweis für eine Glomerulus-Schädigung beobachtet, wenn Reporterzellen in geschädigte und sich regenerierende Glomeruli injiziert werden. Dies bedeutet, dass kultivierte Mesangium-Zellen sich in der normalen Umgebung von Glomeruli ruhig verhalten, aber wenigstens unter einigen Umständen sklerogene Eigenschaften innerhalb von sich regenerierenden Glomeruli zeigen können. Dementsprechend kann ein Transfer von Mesangium-Zellen in einige Formen von erkrankten Glomeruli die zugrundeliegende Schädigung beschleunigen. Um diese Reaktion zu eliminieren, hat der Erfinder entdeckt, dass Replikations-defekte (z. B. mit Mitomycin C behandelte), aber ansonsten lebensfähige Mesangium-Zellen eine solche glomeruläre Schädigung nicht induzieren. Dementsprechend kann die Verwendung solcher Zellen zu einer erfolgreichen Abgabe eines fremden Gens und von dessen Produkt in den nephritischen Glomerulus ohne eine Schädigung aufgrund der Mesangium-Zellen per se führen.

[0031] Es wird angenommen, dass Mesangium-Zellen bedeutende Faktoren bei der Pathogenese von glomerulärer Krankheit darstellen. M. Kashgarian und R. B. Sterzel, *Kidney Int.* 41, 524 (1992); W. H. Baricos und S. V. Shah, *Kidney Int.* 40, 161 (1991). Da durch Antikörper induzierte Glomerulus-Schädigung und Proteinurie akut und reversibel ist, bietet das offenbarte Verfahren zur Antikörperbehandlung und Mesangium-Zellen-Injektion ein neues chronisches und progressives System zur Schädigung von Glomeruli für die Untersuchung von i) dem in vivo-Verhalten von kultivierten Mesangium-Zellen, ii) phänotypischen Unterschieden zwischen Mesangium-Zellen innerhalb des Glomerulus und iii) zugrundeliegenden Mechanismen einer Glomerulus-Schädigung. H. Kawachi et al., *Clin. Exp. Immunol.* 88, 399 (1992); H. Kawachi et al., *Clin. Exp. Immunol.* 90, 129 (1992). Die offenbarten Vorgehensweisen sind auch nützlich, um spezielle Genprodukte zu identifizieren, die den Glomerulus vor einer fortschreitenden Sklerose retten oder eine Proteinurie verhindern können.

[0032] Die Erfindung ermöglicht auch eine nicht-lokale (z. B. systemische) Abgabe von therapeutischen Produkten. Der Grund dafür besteht darin, dass Genprodukte, die durch die gewünschten Mesangium-Zellen in die glomerulären Kapillaren freigesetzt werden, dadurch Zugang zu dem Körperkreislauf, dem renalen Interstitium und dem Harntrakt erlangen, wie oben beschrieben.

[0033] Die Erfindung wird weiter unter Bezugnahme auf die folgenden, der Veranschaulichung dienenden Ausführungsformen, die rein exemplarisch sind und nicht als Einschränkung des wahren Umfangs der Erfindung, wie er in den Ansprüchen beschrieben wird, aufgefasst werden sollten, verstanden.

BEISPIEL 1 (Vergleichsbeispiel)

Ortsgerichtete Abgabe von kultivierten Mesangium-Zellen an die Niere

[0034] Ein Replikations-defekter retroviraler Vektor, BAG, wurde verwendet, um ein Reportergen in Mesangium-Zellen einzuführen. J. Price, D. Turner, C. Cepko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 156 (1987). Dieser Vektor

enthält eine für *Escherichia coli*- β -Galactosidase kodierende Sequenz (Lac-Z) unter der Kontrolle einer langen terminalen Wiederholung des Moloney-Maus-Leukämievirus und eine für Neomycinphosphotransferase kodierende Sequenz (neo) unter der Kontrolle eines frühen Promotors des Simian Virus 40. Die β -Galactosidase-Aktivität wurde als Reporter für die Lage von verabreichten Mesangium-Zellen verwendet und das neo-Genprodukt, das Resistenz gegen G418 verleiht, wurde als selektierbarer Marker verwendet.

[0035] BAG-DNA wurde durch Elektroporation in eine Helfer-freie ökotrope Verpackungslinie Ω E eingeführt. J. P. Morgenstern, H. Land, *Nuc. Acids Res.* 18, 3587 (1990). Eine Virusstammlösung mit ungefähr $4,4 \times 10^4$ X-gal cfu (Kolonie-bildende Einheiten)/ml wurde aus dem konditionierten Medium von stabilen Transfektanten hergestellt, wie in C. Cepko, *Methods in Neurosciences* (Academic Press, 1989), Band 1, Kapitel 21, beschrieben. Die Virusstammlösung wurde getestet und es wurde gezeigt, dass sie frei von Helfer-Virus war.

[0036] Mesangium-Zellen wurden aus Glomeruli einer männlichen Sprague-Dawley-Ratte (250 g) durch Standardmethoden, beschrieben in M. Kitamura et al., *Kidney Int.* 40, 653 (1991), isoliert und kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde Dulbecco's modified Eagle's-Medium (DMEM), welches 10% fötales Kälberserum enthielt, verwendet. Nach 4 Passagen in Kultur wurden die Mesangium-Zellen mit BAG-Virus infiziert. Stabile Transfektanten wurden in Gegenwart von 500 μ g/ml G418 selektiert.

[0037] Um eine Zelllinie zu identifizieren, die β -Galactosidase exprimiert, wurden Proben von ausgewählten Mesangium-Zellklonen 15 min bei Raumtemperatur in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS), welche 0,5% Glutaraldehyd, 2 mM $MgCl_2$ und 1,25 mM EGTA enthielt, fixiert. Nach wiederholtem Waschen mit eiskalter PBS wurden Zellproben 2 h bei 37°C in X-gal-Lösung inkubiert. Die X-gal-Lösung enthält 1 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (Sigma), 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, 2 mM $MgCl_2$, 0,01% Natriumdesoxycholat und 0,02% Nonidet P40 in PBS (pH 7,4). Durch diese Vorgehensweise wurde ein β -Galactosidase stark exprimierender Klon, RM4/BG715 identifiziert und für eine Verwendung in den nachfolgend beschriebenen Experimenten ausgewählt. Nicht-transfizierte, kultivierte Mesangium-Zellen exprimieren keine β -Galactosidase-Aktivität.

[0038] Es wurde anhand seiner morphologischen Merkmale und seiner Reaktion mit drei für Mesangium-Zellen spezifischen immunologischen Markern gezeigt, dass der Klon RM4/BG715 ein Mesangium-Zellklon ist. RM4/BG715-Zellen wurden auf Kammerobjektträgern kultiviert und mit kaltem Methanol fixiert. Die Zellen in separaten Kammerobjektträgern wurden bei 4°C über Nacht mit einem der unten angegebenen erster Antikörper-Präparate inkubiert. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und mit einem FITC-konjugierten zweiten Antikörper 1 h bei 37°C inkubiert. Photographien wurden durch Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen. Als erster Antikörper verwendete Präparate waren: Kaninchen-anti-Desmin-Antiserum (Sigma; Verdünnung 1 : 20), monoklonaler Maus-anti-Mesangium-Zellen-Antikörper 1-22-3 (Verdünnung 1 : 20) und monoklonaler Maus-anti-glatte unwillkürliche Muskulatur- α -Actin-Antikörper (Sigma; Verdünnung 1 : 200). H. Kawachi et al., *Clin. Exp. Immunol.* 88, 399 (1992); H. Kawachi et al., *Clin. Exp. Immunol.* 90, 129 (1992). Als zweiter Antikörper verwendete Präparate waren FITC-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin (Sigma; Verdünnung 1 : 32) und FITC-konjugiertes Ziege-anti-Maus-Immunglobulin (Sigma; Verdünnung 1 : 50). Der Klon RM4/BG715 zeigte „Berg-und-Tal“-Bildung und positive Immunfluoreszenzfärbung für Desmin, α -Actin aus glatter unwillkürlicher Muskulatur und Thy 1-assoziiertes Antigen, welche allesamt für kultivierte Mesangium-Zellen typische Merkmale darstellen. In dem konditionierten Medium dieses Klons wurde kein Replikations-kompetentes oder zur Replikation fähiges Virus nachgewiesen und es wurde bei dieser Zelllinie kein Hinweis auf eine Transformation beobachtet anhand eines Weichagar-Koloniebildungs-Assays, der gemäß den Methoden von Rizzino, *Soft Agar Growth Assays for Transforming Growth Factors and Mitogenic Peptides*; in *Methods in Enzymology, Peptide Growth Factors*, Teil A (Barnes und Sirbasku, Hrsg.), Academic Press (1987), ausgeführt wurde.

[0039] Erwachsene männliche Sprague-Dawley-Ratten (250–450 g) wurden mit einer Hypnorm-Diazepam-Mischung anästhetisiert. Die linke Niere wurde durch einen Einschnitt an der linken Flanke freigelegt. Die Niere wurde von dem umgebenden Fettgewebe und der Nebenniere abgetrennt und in eine Nierenschale gelegt. Dann wurde die Nierenarterie freigelegt und von der Nierenvene getrennt. Ein Baumwollfaden wurde um die proximale Seite der Nierenarterie herumgelegt und man ließ die Ratten ungefähr zehn Minuten vor der Zellinjektion liegen. Konfluente RM4/BG715-Zellen ($0,5\text{--}2,5 \times 10^6$ Zellen, 7.-17. Passage) wurden trypsinisiert, einmal gewaschen, in 700 μ l DMEM resuspendiert und in die linke Nierenarterie unter Verwendung einer 27 Gauge-Nadel (50–100 μ l/s) injiziert. Um ein Bluten nach der Injektion zu vermeiden, wurde die Nierenarterie mit einem Faden einige Minuten abgeklemmt und man ließ sie dann reperfundieren.

[0040] Vier der Ratten, die eine Injektion erhalten hatten, wurden nach 4 h getötet. Die restlichen Ratten wurden 1, 2, 4, 8 oder 14 Wochen am Leben erhalten und zu jedem Zeitpunkt wurden zwei Tiere getötet. Beide Nieren wurden aus den Tieren entfernt und ein Teil von jeder Niere wurde für die Isolierung von Glomeruli verwendet und ein anderer Teil wurde zur Herstellung von Gefrierschnitten für die Mikroskopie verwendet. Für die Isolierung von Glomeruli wurden Nierenrinden präpariert, in kleine Stücke geschnitten und durch ein Sieb mit 106 μ m Maschenweite getrieben, was einer Passage durch ein Sieb mit 180 μ m Maschenweite folgte. Das resultierende Filtrat wurde durch ein Sieb mit 64 μ m Maschenweite geleitet und wiederholt mit PBS gewaschen.

Auf dem 64 µm-Sieb zurückbleibende Glomeruli wurden für den nachfolgend beschriebenen X-gal-Assay verwendet. Die Reinheit der isolierten Glomeruli betrug mehr als 95%, wie anhand von Phasenkontrastmikroskopie bewertet wurde.

[0041] Nierengewebe und isolierte Glomeruli wurden bei 4°C über Nacht in 2% Paraformaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd, 2 mM MgCl₂ und 1,25 mM EGTA in 0,1 M Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure] (PIPES)-Puffer (pH 6,9) fixiert. Nierengewebe wurden in 2 mM MgCl₂ und 30% Saccharose in PBS gelegt und bei 4°C aufbewahrt. Die Erzeugung von Kryostat-Schnitten von Nierengeweben erfolgte durch Vorgehensweisen, die in diesem Fachgebiet bekannt sind. Fixierte Glomeruli und fixierte Gefrierschnitte von Nierengewebe wurden wiederholt bei 4°C mit PBS, welche 2 mM MgCl₂ enthielt, gewaschen, einmal mit 2 mM MgCl₂, 0,01% Natriumdesoxycholat und 0,02% Nonidet P40 in PBS gewaschen und dann bei 37°C 2 h in der oben beschriebenen X-gal-Lösung inkubiert. Es wurde der Prozentsatz von Glomeruli, die eine blaue Farbe aufwiesen, was das X-gal-Produkt der β-Galactosidase-Aktivität anzeigt, bestimmt.

[0042] Die Inkubationszeit sollte nicht länger als 2 h sein, da eine endogene β-Galactosidase-Aktivität in glomerulären Makrophagen nach einer zwölfstündigen Inkubation auftritt und in Tubulusepithelzellen nach einer drei- bis vierstündigen Inkubation auftritt. Bei einer zweistündigen Inkubation wurde nur β-Galactosidase-Aktivität aufgrund von injizierten Mesangium-Zellen beobachtet.

[0043] In Tabelle 1 ist der Prozentsatz von X-gal-positiven Glomeruli zu jedem Zeitpunkt gezeigt. Injizierte, kultivierte Mesangium-Zellen waren innerhalb der gesamten linken Niere verteilt und häuften sich spezifisch in den Glomeruli an. Vier Stunden nach der Injektion wurden 39,8% der Glomeruli in dem X-gal-Assay positiv angefärbt. X-gal-positive Glomeruli wurden auch 1, 2, 4, 8 und 14 Wochen nach der Injektion nachgewiesen (Tabelle 1). Die X-gal-Anfärbung wurde nur in den Glomeruli und nicht in anderen Abschnitten der linken Niere nachgewiesen. Keine X-gal-Anfärbung wurde in der entgegengesetzten Niere (Tabelle 1) oder in anderen Organen, wie den Lungen, (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen. Die Injektion des β-Galactosidase-negativen Klons RM4-4 führte zu keinerlei X-gal-positiver Anfärbung in den Glomeruli von Nieren, bei denen eine Injektion vorgenommen wurde (Daten nicht gezeigt), was anzeigt, dass die enzymatische Aktivität, die bei den Glomeruli aus Ratten, denen RM4/BG715 injiziert worden war, sich von dem exogenen β-Galactosidase-Gen, das in RM4/BG715-Zellen vorhanden war, ableitete. Diese Feststellungen zeigen, dass kultivierte Mesangium-Zellen spezifisch in Nierenglomeruli eingefangen werden, wenn sie in eine Nierenarterie injiziert werden. Diese Feststellungen zeigen auch, dass, wenn ein exogenes Nukleinsäurekonstrukt in kultivierte Mesangium-Zellen eingeführt wird, ein Genprodukt aus Konstrukt enthaltenden Zellen in Glomeruli nach einer Injektion solcher Zellen exprimiert wird.

Tabelle 1
 Prozentsatz von X-gal-positiven Glomeruli in linken und rechten Nieren nach einer Injektion von RM4/BG715-Zellen

Tier	Zeit nach der Injektion	X-gal-positive Glomeruli (%)	
		Linke Niere	Rechte Niere
1	4 h	62	0
2	4 h	42	0
3	4 h	37	0
4	4 h	18	0
5	1 Woche	82	0
6	1 Woche	65	0
7	2 Wochen	61	0
8	2 Wochen	10	0
9	4 Wochen	76	0
10	4 Wochen	27	0
11	4 Wochen	13	0
12	4 Wochen	4	0
13	8 Wochen	6	0
14	8 Wochen	0	0
15	14 Wochen	3	0
16	14 Wochen	0	0

BEISPIEL 2 (Vergleichsbeispiel)

Verstärkung der Expression durch selektive Schädigung von in situ vorhandenen Mesangium-Zellen

[0044] Um in situ vorhandene Mesangium-Zellen selektiv zu schädigen, wurde ein monoklonaler anti-Mesangium-Zellen-Antikörper, 1-22-3, verwendet. Dieser Antikörper erkennt ein Thy 1-assoziiertes Molekül auf der Oberfläche von Mesangium-Zellen aus der Ratte. H. Kawachi et al., Clin. Exp. Immunol. 88, 399 (1992); H. Kawachi et al., Clin. Exp. Immunol. 90, 129 (1992). Fünfhundert µg eines 1-22-3-Präparats wurden in die Schwanzvene von 10 Ratten injiziert. Die aktive Replikation von Mesangium-Zellen erreichte Spitzenwerte an den Tagen 4–6. H. Kawachi et al., Clin. Exp. Immunol. 88, 399 (1992); H. Kawachi et al., Clin. Exp. Immunol. 90, 129 (1992). Wenn 1-22-3-Antikörper in die Schwanzvene injiziert wurde, trat eine selektive Schädigung des Mesangiums innerhalb von 24 h auf, gefolgt von einer vorübergehenden und spezifischen Replikation von übrigbleibenden Mesangium-Zellen, welche der Rekonstruktion von normalen Glomeruli vorangeht.

[0045] RM4/BG715-Zellen wurden in die linke Nierenarterie 3 Tage nach der Behandlung mit 1-22-3 injiziert. Zwei Ratten wurden 4 h danach und 1, 2, 4 und 8 Wochen nach der Injektion von RM4/BG715-Zellen getötet. Von den Nierengeweben wurden Schnitte hergestellt und aus jeder Ratte Glomeruli isoliert, wie oben beschrieben. Die Ergebnisse von X-gal-Assays an den Geweben und Glomeruli sind in Tabelle 2 gezeigt. Vier Stunden nach der Zelinjektion wurden 43 und 67% der Glomeruli bei den zwei Tieren in dem X-gal-Assay angefärbt (Tabelle 2). Der Prozentsatz von Glomeruli, die nachweisbare β-Galactosidase-Aktivität aufwiesen, blieb bei 43% oder mehr bei den Tieren, die nach 1, 2, 4 und 8 Wochen getötet wurden. Zusätzlich nahm die Fläche jedes Glomerulus, die eine positive Anfärbung in dem X-gal-Assay zeigte, zwischen 4 Stunden und 1 Woche dramatisch zu. Um diesen Unterschied zu quantifizieren, wurde jeder X-gal-positive Glomerulus gemäß dem Prozentsatz an Glomerulus-Fläche, die mit X-gal angefärbt wurde, in Kategorien eingestuft. Es wurden vier Kategorien verwendet: 0–5%, 6–25%, 26–50% und 51–100%. Die Prozentsätze von X-gal-positiven Glomeruli in jeder der vier Kategorien sind in Tabelle 2 gezeigt. Bei keinem der X-gal-positiven Glomeruli wurde 4 h nach

der Injektion die Glomerulus-Fläche mehrheitlich (zu 51 bis 100%) angefärbt. 1, 2, 4 und 8 Wochen nach der Injektion wurde bei mindestens 16% und bis zu 63% der X-gal-positiven Glomeruli die Glomerulus-Fläche mehrheitlich angefärbt.

[0046] Um die erhöhte Expression in mit einem mesangiolytischen Mittel behandelten Nieren weiter zu quantifizieren, wurde ein X-gal-Score (zahlenmäßiges X-gal-Bewertungsergebnis) für jedes Tier unter Verwendung der folgenden Formel berechnet:

$$\text{X-gal-Score} = [(0,025a) + (0,150b) + (0,375c) + (0,750d)][\%X\text{-gal-positiv}\text{e Glomeruli}];$$

wobei:

a = Prozentsatz von X-gal-positiven Glomeruli in der Kategorie 0–5%;

b = Prozentsatz von X-gal-positiven Glomeruli in der Kategorie 6–25%;

c = Prozentsatz von X-gal-positiven Glomeruli in der Kategorie 26–50% und

d = Prozentsatz von X-gal-positiven Glomeruli in der Kategorie 51–100%.

[0047] Wie durch die X-gal-Scores in Tabelle 2 gezeigt, wiesen nach 1 Woche getötete Ratten in situ eine dramatisch erhöhte β -Galactosidase-Aktivität verglichen mit Ratten, die nach 4 Stunden getötet worden waren, auf. Die erhöhte β -Galactosidase-Aktivität wurde nach 2, 4 und 8 Wochen beobachtet, wie durch die X-gal-Scores angegeben wird. Die X-gal-Scores nach 1, 2, 4 und 8 Wochen waren 6- bis 15-fach höher als der mittlere X-gal-Score nach 4 h (Tabelle 2). Diese Ergebnisse zeigen, dass die β -Galactosidase-Expression auf hohem Niveau während des gesamten Verlaufs des Experiment s. aufrechterhalten blieb. Wie erwartet, wurde in anderen Abschnitten der Nieren, bei denen die Injektionen vorgenommen worden waren, oder in den entgegengesetzten Nieren keine X-gal-Anfärbung nachgewiesen. Selektiv geschädigte Ratten-Nieren, in die RM4-4-Zellen anstelle von RM4/BG715-Zellen injiziert worden waren, zeigten keinerlei positive X-gal-Anfärbung (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 2

Prozentsatz von X-gal-positiven Glomeruli in der linken Ratten-Niere nach mesangiolytischer Behandlung und Injektion von RM4/BG715-Zellen

Tier	Zeit	X-gal- positive Glomeruli (%)	Prozentsatz von X-gal- positiven Glomeruli mit einer X-gal-positiven Fläche von:				X-gal- Score	-fache Zunah- me des X-gal- Scores
			0-5%	6-25%	26-50%	51-100%		
17	4 h	67	81	16	3	0	372	-
18	4 h	43	84	14	2	0	213	-
19	1 Wo.	72	15	51	18	16	1928	6,6
20	1 Wo.	66	14	18	18	50	3122	10,7
21	2 Wo.	83	9	12	20	59	4463	15,3
22	2 Wo.	78	10	15	21	54	3968	13,6
23	4 Wo.	47	6	12	19	63	2647	9,0
24	4 Wo.	43	17	15	31	37	1808	6,2
25	8 Wo.	81	6	19	21	54	4162	14,2
26	8 Wo.	58	23	15	22	40	2382	8,1

[0048] Diese Ergebnisse zeigen, dass der Anteil von kultivierten Mesangium-Zellen in einer Niere durch selektives Schädigen von in situ vorhandenen Mesangium-Zellen erhöht wird. Ferner wird die Menge eines Genprodukts, das durch injizierte Mesangium-Zellen produziert wird, durch diese Methode erhöht.

BEISPIEL 3 (Vergleichsbeispiel)

Verabreichung von kultivierten Mesangium-Zellen vor einer selektiven Schädigung von in situ vorhandenen Mesangium-Zellen

[0049] RM4/BG715-Mesangium-Zellen wurden in die linke Nierenarterie von Ratten injiziert, wie oben beschrieben. Drei Tage später wurde der monoklonale Antikörper 1-22-3 in die Schwanzvene jeder Ratte injiziert. Zwei Wochen nach der Zelinjektion wurden die Ratten getötet und X-gal-Assays ausgeführt, wie beschrieben. In diesem Experiment gab es eine 4,2-fache Zunahme des X-gal-Scores nach zwei Wochen im Vergleich zu dem X-gal-Score 4 Stunden nach der RM4/BG715-Injektion.

BEISPIEL 4

Verwendung von Replikations-defekten Mesangium-Zellen für eine ortsgerichtete Genabgabe

[0050] Um die Auswirkungen der Proliferation von kultivierten Mesangium-Zellen auf die Amplifizierung des durch Transfektion eingeführten Gens wie auch auf die Beschleunigung der Glomerulus-Schädigung auszuwerten, wurde das Verhalten von mit Mitomycin C behandelten RM4/BG715-Zellen ausgewertet. Eine Mitomycin C-Behandlung hemmte in vitro die Proliferation von RM4/BG715-Zellen irreversibel, beeinflusste aber die Expression von R-Galactosidase während eines 4-wöchigen Beobachtungszeitraums nicht.

[0051] RM4/BG715-Zellen wurden 20 h mit 0,2 µg/ml Mitomycin C (Sigma) behandelt und dann an die sich regenerierende Niere gemäß den in Beispiel 2 oben erläuterten Methoden verabreicht. Kontrollzellen wurden aus RM4/BG715-Zellen, die nicht mit Mitomycin C behandelt worden waren, (unbehandelten Zellen) gebildet. Nach 7 Tagen war die Ausdehnung von X-gal-positiven Bereichen in jenen Glomeruli, die Mitomycin C-behandelte Zellen erhalten hatten, vollständig unterdrückt im Gegensatz zu jenen Glomeruli, die unbehandelte Zellen erhalten hatten. Die X-gal-positive Fläche in jedem Glomerulus betrug $2,8 \pm 0,1\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) in der Gruppe, die behandelte Zellen erhalten hatte, ($n = 4$) gegenüber $27,5 \pm 5,2$ in der Gruppe, die unbehandelte Zellen erhalten hatte ($n = 5$). Der renale X-gal-Score (siehe Beispiel 2 oben) betrug 61 ± 21 für die Gruppe mit den behandelten Zellen und 2014 ± 288 für die Gruppe mit den unbehandelten Zellen.

[0052] Eine histologische Analyse enthüllte, dass eine durch Replikations-kompetente oder zu einer Replikation fähige Zellen induzierte, beschleunigte Glomerulus-Schädigung im Falle von mit Mitomycin C behandelten Zellen beschränkt war. Bei den Replikations-defekten Zellen wurde kein Hinweis auf eine fortschreitende Glomerulosklerose sogar nach 4 Wochen noch festgestellt, wo eine Expression von β -Galactosidase noch bei $11 \pm 3,5\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 4$) der Glomeruli nachgewiesen wurde.

[0053] Die vorangegangene detaillierte Beschreibung wird nur für ein besseres Verständnis der Erfindung bereitgestellt und daraus sollte keine nicht notwendige Einschränkung abgeleitet werden, da einige Modifikationen den Fachleuten auf diesem Gebiet ersichtlich sein werden, ohne von dem Geist und Umfang der beigefügten Ansprüche abzuweichen.

Patentansprüche

1. Replikations-defekte, kultivierte Mesangium-Zellen zur Verwendung in der Human- und/oder Veterinärmedizin.

2. Zellen zur Verwendung in der Human- und/oder Veterinärmedizin nach Anspruch 1, wobei die Zellen ein Nukleinsäurekonstrukt enthalten, das ein exogenes Gen umfasst.

3. Zellen zur Verwendung in der Human- und/oder Veterinärmedizin nach Anspruch 2, wobei das exogene Gen eine Sequenz umfasst, die für ein Genprodukt kodiert.

4. Zellen zur Verwendung in der Human- und/oder Veterinärmedizin nach Anspruch 3, wobei das Genprodukt exprimiert und sekretiert wird und in das Kreislaufsystem, das Interstitium oder den Harnweg eintritt oder exprimiert wird und in der Niere eines Säugetiers lokalisiert ist.

5. Zellen zur Verwendung in der Human- und/oder Veterinärmedizin nach Anspruch 4, wobei das Genprodukt exprimiert wird und auf der Zelloberfläche der Mesangium-Zellen lokalisiert ist.

6. Zellen zur Verwendung in der Human- und/oder Veterinärmedizin nach Anspruch 3, wobei das Nukleinsäurekonstrukt ferner einen LTR des Moloney-Maus-Leukämievirus umfasst.

7. Zelle zur Verwendung in der Human- und/oder Veterinärmedizin nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Nukleinsäurekonstrukt ferner eine Replikations-defekte retrovirale Sequenz umfasst.

8. Zellen zur Verwendung in der Human- und/oder Veterinärmedizin nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Zellen in eine Niere eines Säugetiers einzuführen sind, welche Niere von einer Nierenarterie versorgt wird.

9. Zellen zur Verwendung in der Human- und/oder Veterinärmedizin nach irgendeinem der vorangehenden Ansprüche, wobei ein mesangiolytisches Mittel vor oder nachdem die Zellen zu verabreichen sind, zu verabreichen ist.

10. Zellen zur Verwendung in der Human- und/oder Veterinärmedizin nach Anspruch 9, wobei das mesangiolytische Mittel ein anti-Mesangium-Zellen Antikörper oder ein monoklonaler anti-Mesangium-Zellen Antikörper ist; insbesondere der monoklonale Antikörper 1-22-3.

11. Zellen zur Verwendung in der Human- und/oder Veterinärmedizin nach irgendeinem der vorangehenden Ansprüche, wobei die kultivierten Mesangium-Zellen autologe Zellen sind.

12. Zellen zur Verwendung in der Human- und/oder Veterinärmedizin nach irgendeinem der vorangehenden Ansprüche zur Prävention oder Behandlung von Nierenkrankheiten; insbesondere fortgeschreitende Sklerose der Nierenglomeruli oder Proteinurie.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen