

Schlussbericht

NeuroBOOST (03VP04510)

Zuwendungsempfänger: Charité-Universitätsmedizin Berlin Prof. Dr. med Barbara Steiner Klinik für Neurologie AG Neurale Regeneration und Plastizität Charitéplatz 1, D-10117 Berlin	Förderkennzeichen: 03VP04510
Titel des Vorhabens: Validierung einer zellbasierten, langwirksamen, steuerbaren Therapie für Morbus Parkinson durch „verkapselte“ funktionell regulierbare, den <i>Glial Derived Neurotrophic Factor</i> (GDNF) freisetzende mesenchymale Stammzellen (MSC) - NeuroBOOST	
Projektleiterin: Prof. Dr. med Barbara Steiner E-Mail: barbara.steiner@charite.de Telefon: ++49 30 450 517168	
Laufzeit des Vorhabens: 01.01.2018 bis 31.03.2022	
Berichtszeitraum: 01.01.2018 bis 31.03.2022	

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung
2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde
3. Planung des Vorhabens,
4. dem wissenschaftlichen und technischen Stand, an dem angeknüpft wurde
5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Der Morbus Parkinson ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen, mit aufgrund der demographischen Entwicklung rasant steigenden Zahlen von Erkrankten und Pflegebedürftigen. Dies führt aktuell zu einer hohen sozioökonomischen Belastung, da derzeit lediglich symptomatische und meist recht kurzwirksame Therapien existieren, die zudem vor allem die motorischen Symptome verbessern. Im Verlauf der Erkrankung kommt es jedoch besonders bei älteren Patienten zunehmend zu dementieller Entwicklung und neuropsychiatrischen Symptomen, für die bisher keine Therapie existiert, v.a. weil der rasch fortschreitende Nervenzellverlust nicht kausal aufgehalten werden kann.

In NeuroBOOST soll eine zellbasierte Therapie für Morbus Parkinson durch verkapselte funktionell regulierbare, den *Glial Derived Neurotrophic Factor* (GDNF) freisetzende mesenchymale Stammzellen (MSC) aus dem humanen Fettgewebe hinsichtlich ihrer Langzeitwirksamkeit validiert werden. Es wird erstmalig ein neuroprotektiver und dadurch kausaler Therapieansatz für Morbus Parkinson durch retardierte Langzeitwirkung von GDNF-freisetzenden MSC bereitgestellt. Im Rahmen der Validierung unserer *Proof of Concept* Daten sollen die in einer Trägersubstanz immobilisierten GDNF-MSC über einen mehrmonatigen Zeitraum validiert werden. Die hinsichtlich sicherheits- und zulassungsrelevanter Parameter veränderten GDNF-MSC sollen über mehrere Monate im 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) Rattenmodell für Morbus Parkinson vor Ort gehalten werden. Die GDNF-MSC sind so verändert (*Tet Off System*), dass die GDNF-Expression bei Bedarf beendet werden kann.

Die Validierungsphase ist die Voraussetzung für die spätere PEI-Zulassung und um dann in einer klinischen Phase den *Proof of Technology* zu erbringen. Ziel war es, den von uns entwickelten Therapieansatz gemeinsam mit industriellen Partnern weiterzuentwickeln und zu verwerthen. Dies ist weiterhin zunächst mit KMU, im nächsten Schritt in der klinischen Anwendung dann auch mit größeren Partnern vorgesehen.

Das Projekt wurde in Kooperation mit der AG Prof. Sittinger, Tissue Engineering, Charite Universitätsmedizin Berlin geplant und durchgeführt. Diese Kooperation ermöglichte die Entwicklung des Hydrogels zur Einbettung der MSC. Zusätzlich erfolgte eine Kooperation mit Prof. M. Gossen, an der Charité, der über Expertise in der Transposonentwicklung verfügt, somit war die Entwicklung einer kontinuierlichen Freisetzung von GDNF durch die MSC möglich, sowie gleichzeitig eine steuerbare Freisetzung des Neurotrophins.

Das Projekt wurde mit den Kooperationspartnern im Voraus ausführlich geplant unter Einbeziehung des damaligen technologischen und wissenschaftlichen know how und der kontinuierlichen Verwertung der Ergebnisse der Fachliteratur. Zum Zeitpunkt der Projektplanung und im Verlauf der Experimente zeigte sich ein Alleinstellungsmerkmal der geplanten Hydrogelformulierung für die verkapselten MSC. Die Daten aus der Fachliteratur sowie die Zwischenergebnisse des Projektes wurden im gesamten Verlauf des Projektes validiert. Es fanden wöchentliche Treffen der direkt an der Laborarbeit beteiligten Wissenschaftler, eine ca. vierteljährliche Zusammenfassung und Validierung fand unter Einbeziehung der gesamten Arbeitsgruppe und der Kooperationspartner statt. In diesem Zusammenhang wurden regelmäßig neue Publikationen zum Forschungsthema vorgestellt und im Hinblick auf die eigenen Zwischenergebnisse diskutiert.

Die nachstehenden Abbildungen zeigen den Versuchsaufbau und die wichtigsten Ergebnisse.



Abb1: Die Abb.1 zeigt schematisch den Versuchsaufbau und die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Studie. (aus Stahn et al, 2022 in press)

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Im Folgenden wird dargestellt, für welche Experimente die Zuwendung verwendet wurde und in welcher Weise die vorgegebenen Ziele erreicht wurden.

Zusammenfassend wurde die Zuwendung für die bewilligte Personalfinanzierung von Wissenschaftlern und technischem Hilfspersonal, für die Experimentaltiere sowie Sachkosten wie bewilligt verwendet.

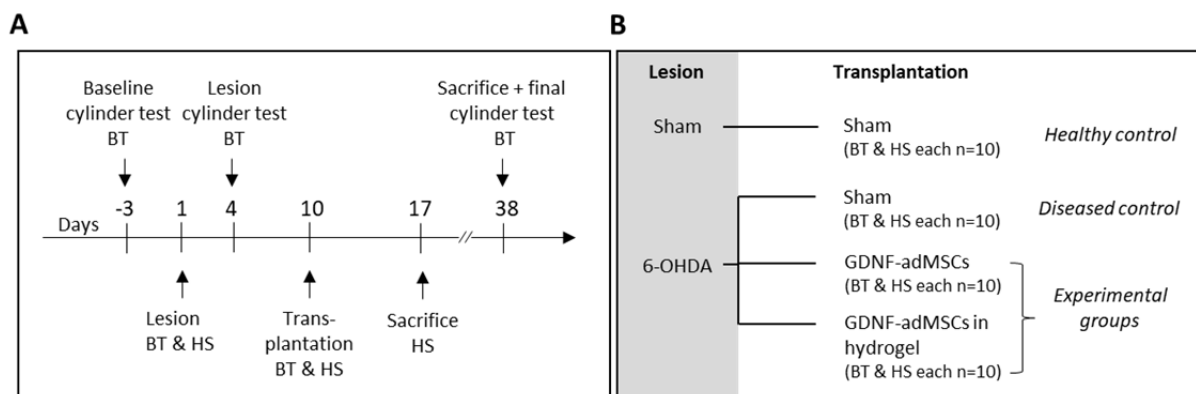


Abb2: (A and B) Tiere wurden in 4 Gruppen eingeteilt, je n=10, Verhaltenstests wurden durchgeführt, (BT), Tötung der Tiere und weitere Analysen nach 1 Monat nach Transplantation, weitere n=10 Tötung nach 1 Woche nach Transplantation für Histologie (HS). Tiere wurden entweder sham operiert (NaCl, healthy control) oder erhielten 6-OHDA, Transplantation entweder als sham (NaCl), freie GDNF-adMSCs oder verkapselte GDNF-adMSCs im Hydrogel .BT Tiere wurden im Zylindertest untersucht 3 Tage vor der Operation, 4 Tage nach der Operation und einen Monat nach Operation/Transplantation. (aus Stahn et al, 2022 in press)

Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ereignisse

Es wurde die injizierbare Hydrogel-Formulierung basierend auf Fibrinogen verkapselt in das Striatum von 6-OHDA lädierten Ratten nebenwirkungsfrei appliziert. Die nebenwirkungssarme Formulierung des Hydrogels und ihre Nachweisbarkeit im Gehirn nach Transplantation erlaubt erstmalig eine nebenwirkungsfreie retardierte Applikation von Zellen oder Substanzen in das Gehirn am Tiermodell.

Zielsetzung (Meilenstein) 1:

In vivo Nachweis von verkapselten MSC und Nachweisbarkeit der Viabilität der MSC nach Transplantation.

Ergebnisse

AP1 Bereitstellung langfristig überlebender und funktionaler Doxyzyklin-regulierbarer GDNF-MSC

Zu Beginn der Analysen konnte kein sicherer Nachweis von GDNF in den transfizierten MSC durchgeführt werden. Nachdem die technischen Schwierigkeiten behoben wurden (Findung eines passenden Vectors, verwendet wurde pCMV(CAT)T7-SB100, Überlassung von Zsuzsanna Izsavak (Addgene plasmid #34879; <http://n2t.net/addgene:34879>; RRID:Addgene_34879 Auswahl der Zellen (s. Abb.3), Inkubationszeit (1d- 8 Wochen) konnte im transfizierten XLone-PB-TetOFF-PlusFlag-Puromycin-hGDNF-MSC Medium GDNF nachgewiesen werden.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Daten zur Zelldifferenzierung und Charakterisierung durch FACS, sowie den Nachweis der GDNF-Freisetzung in vitro.

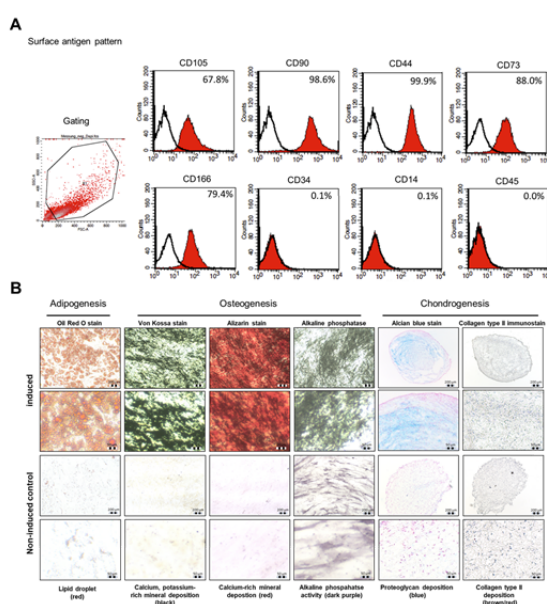


Abb.3: Charakterisierung und Differenzierung humaner adMSCs. (A) Anhand typischer MSC Oberflächenantigene isolierte adMSC, FACS Analysen. (B) Multilineage- Differenzierungsassay zeigt das adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierungspotential.

(aus Stahn et al, 2022, in press)

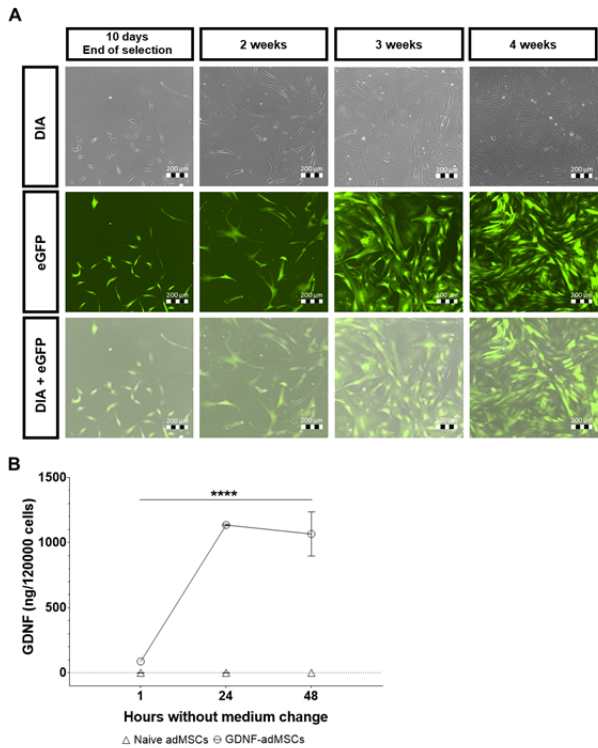


Abb 4: *In vitro* Analyse der GFP- und GDNF-adMSCs. (A) SB-transposon Stabilität und Funktionalität der eGFP-adMSCs mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie. Puromycin-selektiert eGFP positive adMSCs waren bis 4 Wochen nach Transfektion darstellbar. (B) Evaluation der GDNF secretion durch Messung der GDNF-Konzentration im GDNF-adMSCs Medium. GDNF-adMSCs produzierten deutlich mehr GDNF als naive adMSCs. Die gepunktete Linie zeigt das Detektionslimit des Assay (0.00274 ng/ml). Es wurden 120000 GDNF-adMSCs pro Eingriff transplantiert, Ergebnis ist in ng/120000 Zellen angegeben (mean ± SD). **** $p < 0.0001$.

adMSCs: adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells; DIA: transmitted light; GDNF: glial cell line-derived neurotrophic factor; eGFP: enhanced green fluorescent protein; SB: Sleeping Beauty. (aus Stahn et al, 2022, in press).

Die MSC konnten in den Proben mindestens 72 h lang GDNF produzieren, die Zellen waren über eine lange Beobachtungszeit viabel (Nachweis bis 8w *in vitro*) und haben GDNF (kontinuierliche Nachweisbarkeit im FACS *in vitro* vor der Transplantation in das Gehirn der Ratte produziert.

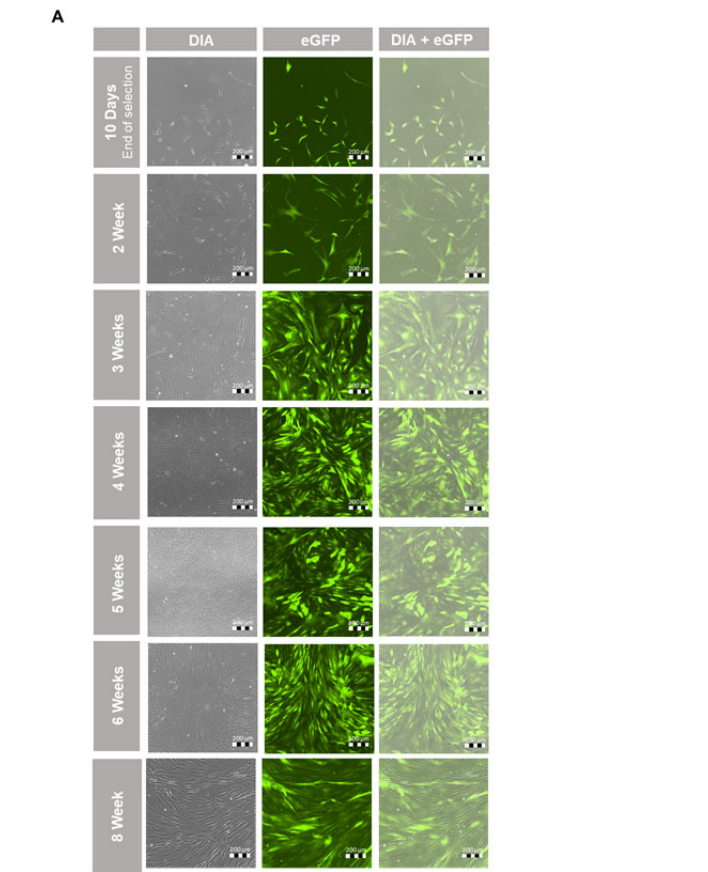


Abb. 5: Langzeit SB-transposon Stabilität und Funktionalität der eGFP-adMSCs. Puromycin-selektierte eGFP positive adMSCs waren bis 8 Wochen nach Transfektion nachweisbar. (eGFP: enhanced green fluorescent protein; SB: Sleeping Beauty). (aus Stahn et al, 2022 in press).

AP2 Bereitstellung einer injizierbaren Formulierung aus regulierbaren GDNF-MSC in einer langsam abbaubaren synthetischen Hydrogelmatrix

Im Laufe des aktuellen Berichtszeitraums konnte nun die Transplantation wie zuvor berichtet optimiert werden, die Zellen werden in einer Fibrin-basierten Gelformulierung in das Striatum transplantiert. Hydrogel-Zusammensetzung: kommerzielles Fibrin Hydrogel (TISSEEL, Baxter) 2 Komponenten, 22-gauge syringe Hamilton-Spritze befüllt mit 2ul Fibrinogen-Komponente (wo adMSCs drin gelöst wurden), danach 1ul PBS-Schicht, danach 1ul Thrombin-Komponente (PBS-Schicht notwendig, damit Hydrogel nicht vorzeitig in Spritze polymerisiert).

Hierunter kommt es bisher nicht zu gesundheitlichen Beeinträchtigung der Tiere, insbesondere keine Zeichen von Inflammation, Fieber, epileptischen Anfällen oder Veränderungen des Hirndrucks. Der gesundheitliche Zustand wurde klinisch untersucht.

Einbettung von GDNF in Fibrin

Zur Bestimmung der Freisetzung von GDNF aus der Fibrin kapsel, wurde GDNF in Fibrinogen/Thrombin eingebettet, 5 µl Tropfen wurden in eine *non-tissue* behandelte Kultur (48-well-plate) eingesetzt. Die Tropfen wurden mit Kultivierungsmedium oder PBS benetzt, der Überstand wurde entfernt und eingefroren (-20 °C nach 1 h, 3 h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h nach Applikation).

Die Freisetzung von GDNF aus dem Hydrogel wurde in einer von 4.55 mg/ml Fibrinogen and 125 m.I.U./ml Thrombin gemessen. GDNF wurde in einer Konzentration von 200 pg/μl eingesetzt, so dass jeder Tropfen 1 ng GDNF enthielt. Auflösung von GDNF in 0.1% w/v Kalbsserum albumin (BSA) auf seiner 10 μg/ml Lösung. Fibrinogen und Thrombin Lösungen wurden einzeln vorbereitet durch Lösung in 0.9% NaCl in *low-binding reaction vessels* mit einem Volumen von 100 μl. Preparation der Fibrinogen Komponente: 10 μl Fibrinogen (91 mg/ml) + 16 μl GDNF (2.5 ng/μl) + 74 μl 0.9% NaCl. Präparation der Thrombin Komponente: 5 μl Thrombin (5 I.U./ml, in 0.9% NaCl) + 95 μl 0.9% NaCl. Die Thrombin Komponente wurde zu der Fibrin Komponente hinzugefügt. Tropfen von 5 μl wurden in eine *non-tissue* Kultur behandelte t48-well-Platte überführt und mit 500 μl Kulturmedium bedeckt. Zu festen zuvor bestimmten Zeitpunkten wurden die Überstände abgenommen und durch neues Medium ersetzt. Überstände wurden bei -20 °C eingefroren. Negativkontrollen ohne GDNF in den Tropfen.

Positivkontrolle (100% value), GDNF in Kulturmedium (2ng/ml 500 μl in 14 wells je 48-well-Plate. Dies entspricht 1 ng pro Tropfen in 500 ml Kulturmedium. Diese Kontrollen wurden ebenfalls abgeschöpft und bei -20 °C eingefroren.

Freisetzung von GDNF

Freisetzung von GDNF aus Fibrinotropfen (4.55 mg/ml Fibrinogen and 125 m.I.U./ml Thrombin) im Kulturmedium. Hydrogel polymerisierte für 30 min, um ein stabiles Gel für die Dauer des Experiments zu erhalten (5 μl Tropfen Fibrin, enthielt 1 ng GDNF).

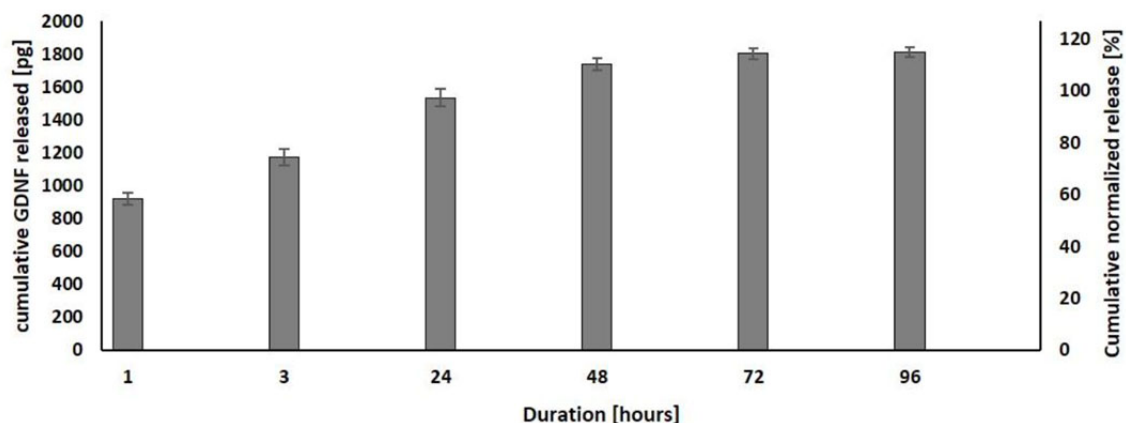


Abb 6: Kumulative Freisetzung von GDNF aus Fibrinotropfen ins Kulturmedium bis 96 h. 1 GDNF pro Tropfen. Freisetzung in pg (absolut), normalisierte Mengen freigesetzten GDNFs.

Diese Ergebnisse zeigen, dass GDNF aus den Fibrinotropfen in einer relevanten Konzentration freigesetzt wird.

Zielsetzung (Meilenstein) 2:

Kenntnis der langfristigen klinisch relevanten therapeutischen Effekte von retardierten steuerbaren GDNF-MSK bei Morbus Parkinson als Grundlage für die Entwicklung präklinischer Studienprotokolle für die Anwendung langzeitstabiler Hydrogelmatrizes.

Ergebnisse

AP3 Identifikation der in retardierter Form transplantierten GDNF-MSK im Gehirn und Quantifizierung dopaminerger Neurone im Langzeitverlauf nach Transplantation im Früh- und Spätstadium der Parkinson Erkrankung

Histologisch wurde im Areal der dopaminergen Neurodegeneration in der Substantia nigra und im Striatum die Viabilität der MSC nach Transplantation der Kapsel ins Gehirn als zusätzlicher Nachweis einer erfolgreichen Transplantation in der Fibrinkapsel gezeigt.

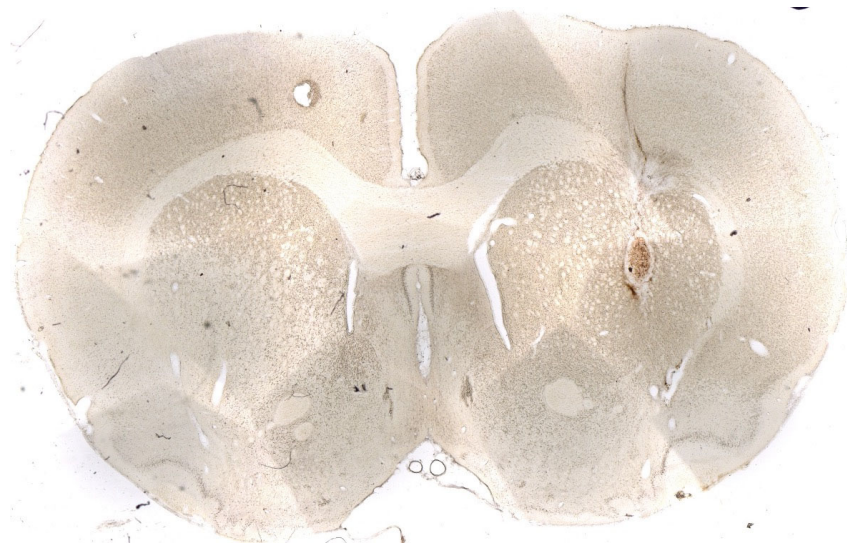


Abb. 7: Exemplarischer Nachweis der Fibrin-basierten Hydrogelkapsel im Striatum der Ratte

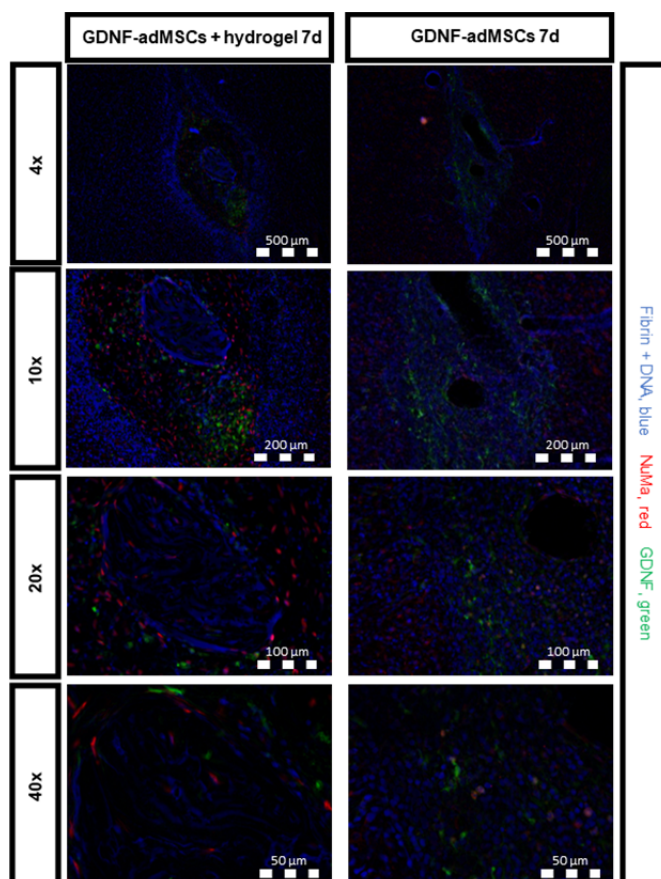


Abb. 8: Nachweis der GDNF-adMSCs (rot, NuMa) und des freien GDNF (grün) in beiden experimentellen Gruppen nach 1 Woche, DAPI (blau) markiert Zellkerne, blau ebenfalls für Fibrin. Residuelles Hydrogel im Transplantationsspalt von Tieren der GDNF-adMSCs + Hydrogel Gruppe, jedoch nicht in der GDNF-adMSCs Gruppe. Vergrößerung bis 40x dargestellt. (DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole, NuMa: Nuclear mitotic apparatus protein 1) (aus Stahn et al, 2022, in press).

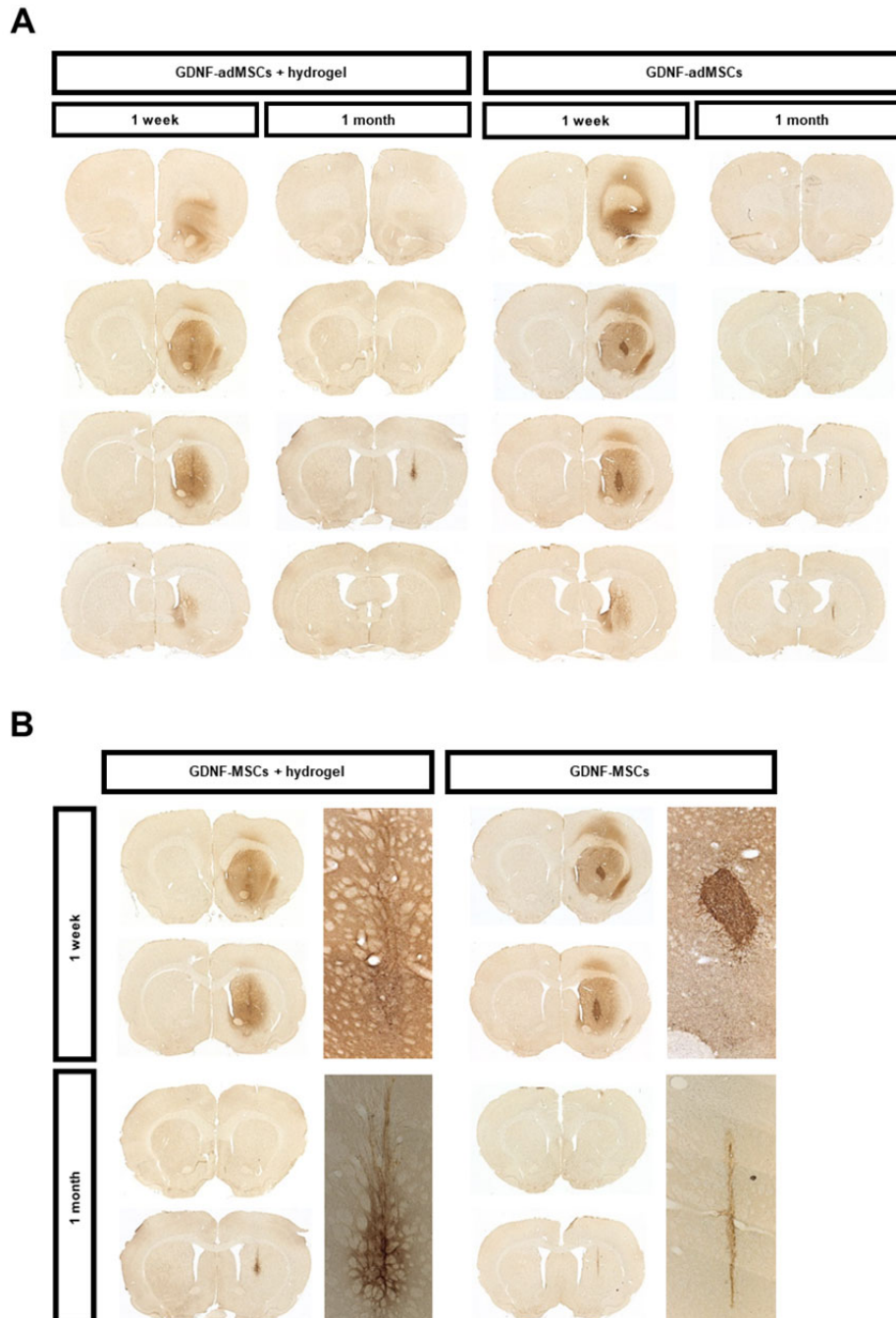


Abb. 9: DAB-GDNF Färbung sequentieller Hirnschnitte durch das Striatum (A) Verteilung von GDNF 1 Woche und 1 Monat nach Transplantation. (B) Detaillierte Darstellung der Transplantationsstelle. (DAB: 3,3'-Diaminobenzidine) (aus Stahn et al, 2022, in press)

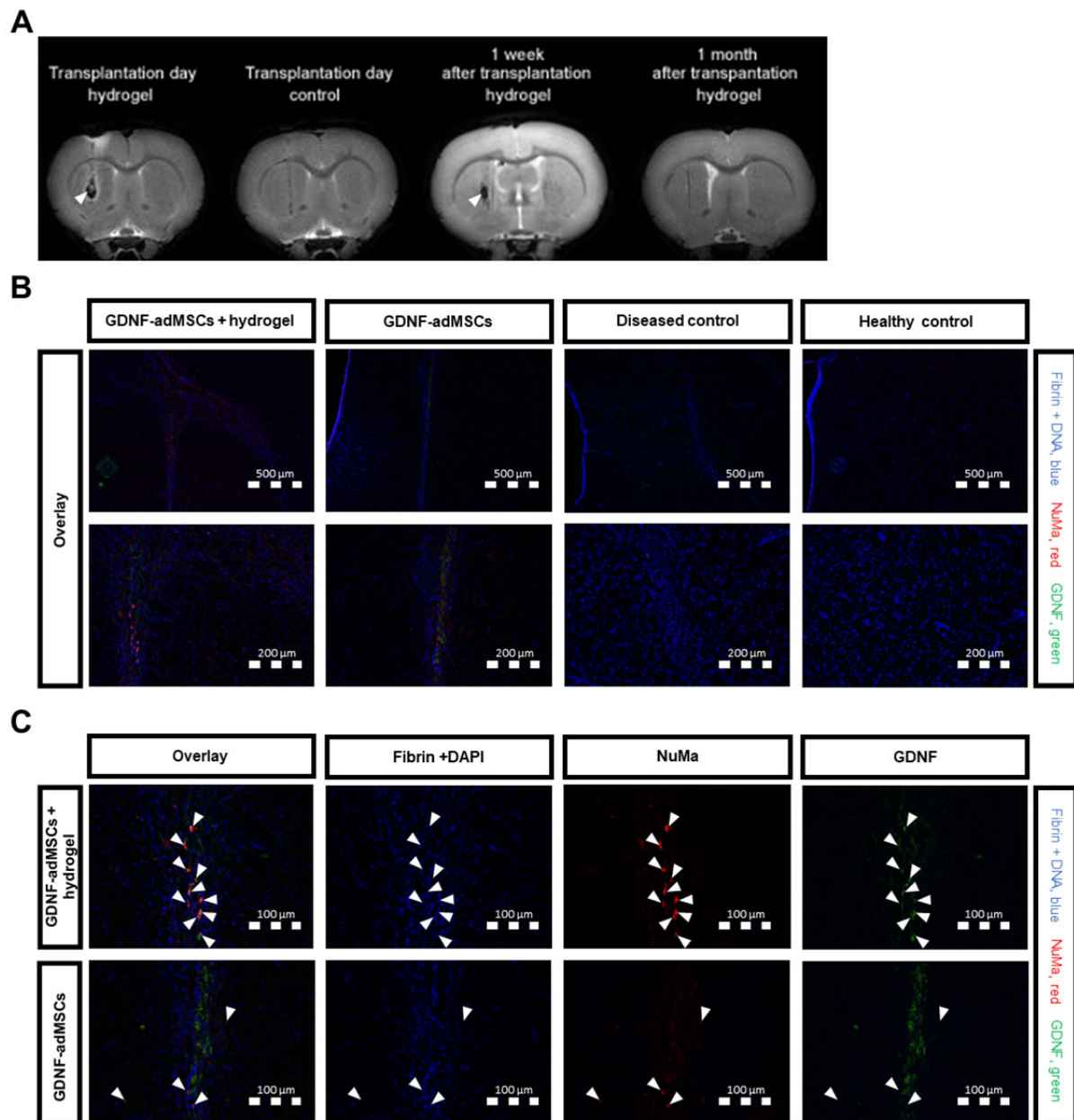


Abb. 10: Darstellung nach Transplantation *in vivo*. (A) Fibrin hydrogel Nachweis in MRI T2 Wichtung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation. Die weißen Pfeile zeigen auf residuelles Hydrogel. (B) Detektion der GDNF-adMSCs (NuMa, rot) und freigesetztem GDNF (grün) in beiden Tiergruppen nach 1 Monat, DAPI (blau) zeigt DNA des Zellkerns o. Fibrin (blau). Kein Nachweis von NuMa oder GDNF in den Kontrollgruppen. (C) Höchste Vergrößerung in beiden Tiergruppen mit Darstellung der einzelnen Kanäle + Overlays. Die weißen Pfeile markieren gefärbte GDNF-adMSCs.

MRI: magnetic resonance imaging
(aus Stahn et al, 2022, in press)

AP4 Bestimmung klinischer Langzeiteffekte der retardierten GDNF-MSC auf Motorik und Kognition in Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium zum Zeitpunkt der Transplantation und der Dauer der Therapie (Verhaltenstests)

In den Verhaltenstests (Zylindertest, s.u.) zeigte sich, dass die motorischen Eigenschaften der Parkinson-erkrankten Tiere durch die Transplantation der verkapselten GDNF-MSC beeinflussbar sind. Die Ratten zeigten im Zylindertest, der die Ausprägung der motorischen Defizite auf der erkrankten Körperseite nachweist, nach der GDNF-MSC Transplantation (5pg/g Striatum) eine deutliche Verbesserung im Vergleich zu Kontrolltieren. Auch in der Langzeitbeobachtung (6 Monate) zeigt sich ein Trend zu einem verbesserten motorischen Verhalten, jedoch zeigt sich, dass ein längerer Zeitraum nach Transplantation eine eher schwächere Wirkung der GDNF-MSC auf die Motorik zeigt, die MSC waren zu diesem Zeitpunkt jedoch weiterhin histologisch nachweisbar.

Zielsetzung (Meilenstein) 3:

Anwendung reproduzierbar hergestellter injizierbarer Formulierungen steuerbarer GDNF-MSC, verkapselt in einer langsam biodegradierbaren natürlichen Hydrogelmatrix.

Ergebnisse

Nachweis der MSC im Gehirn der Ratte über einen langen Zeitraum gelungen, Verhaltenstests zeigen eine mittelfristig anhaltende therapeutische Wirksamkeit auf die Beweglichkeit.

AP5 Bereitstellung einer injizierbaren Formulierung aus regulierbaren GDNF-MSC in einer langsam abbaubaren natürlichen Hydrogelmatrix

Es werden über den gesamten Beobachtungszeitraum relevante Mengen GDNF durch die Kapsel freigesetzt.

Fibrin erfüllt damit die wichtigsten Voraussetzungen zum Einsatz im vorgesehenen Rattenmodell. Zellen lassen sich vital erhalten auch nach Passage einer Kanüle. GDNF kann die Kapsel schnell verlassen.

In den aktuell berichteten Tierversuchen wurden ca. 150 000- 200.000 Zellen je 5 mm³ verkapselt und transplantiert.

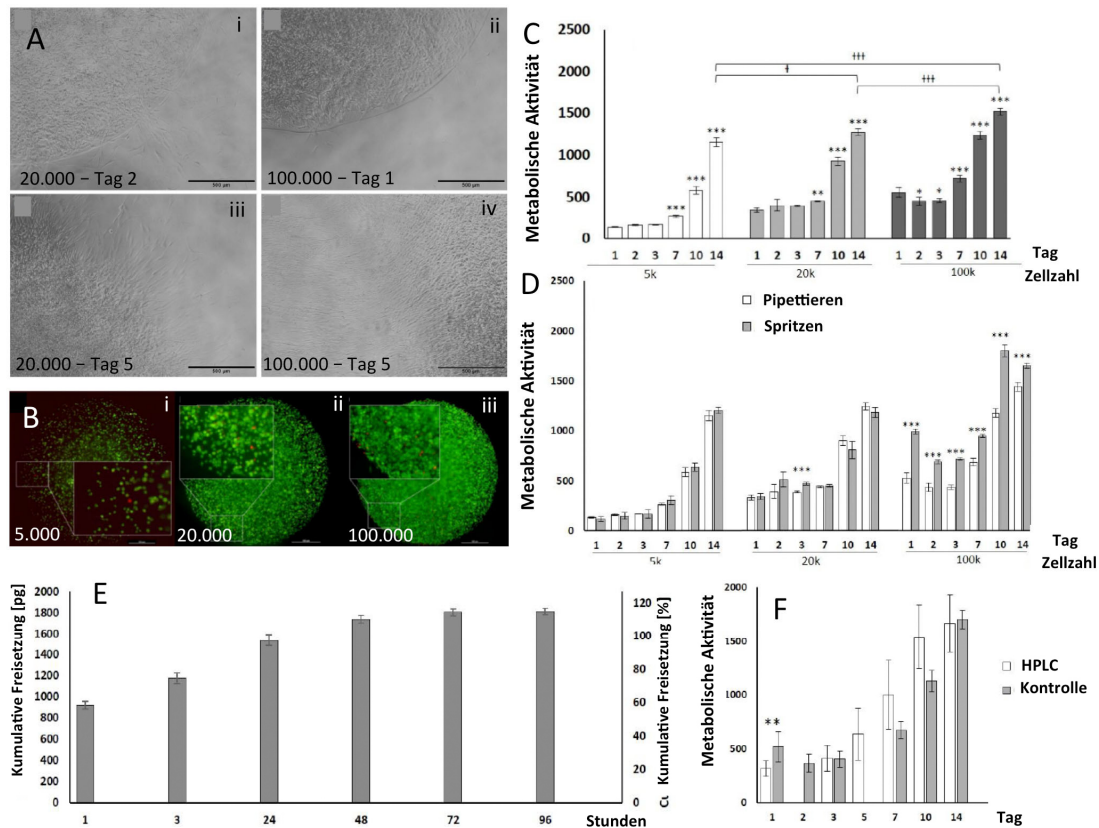


Abb. 11: Verkapselung humaner mesenchymaler Stromazellen in Fibrin. (A) Phasenkontrastaufnahmen von (i,iii) 20.000 und (ii, iv) 100.000 Zellen nach 1 bis 5 Tagen in Kultur. (i, ii) Zellen, die gerade aus der Kapsel auswandern bei noch deutlich integrier Kapsel. (iii) Verlust der Kapselstruktur ohne erkennbare Ränder. (iv) Zellen haben die gesamte Kulturfläche überwachsen, eine hochdichte Zellanhäufung (Aggregation) bleibt erhalten (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen PI/FDA-gefärbter Zellkapseln am Tag 1. Lebende Zellen erscheinen grün, tote Zellen rot. Unabhängig von der Zellzahl, (i) 5.000, (ii) 20.000 oder (iii) 100.000 Zellen ist die Vitalität verkapselter Zellen hoch (>95%). (C) Effekt der Zellzahl auf die metabolische Aktivität, t-test Statistik gegen Tag 1. (D) Einfluss der Injektion auf die metabolische Aktivität. (E) Kumulativer Release von GDNF aus Fibrin-Tropfen in Medium nach 96 Stunden. 1 ng Fibrin wurde in einen 5 mm³-Tropfen eingeschlossen. Nachweis mittels ELISA. Die relative Freisetzung wurde auf die Kontrolle (ohne Kapsel, nur im Medium) bezogen. (F) Effekt der HPLC-Spritze (Injektionspritze für die Behandlung der Ratten) auf die metabolische Aktivität. 20.000 Zellen wurden eingeschlossen. * = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001.

AP6 Identifikation der in retardierter Form transplantierten GDNF-MSC im Gehirn und Quantifizierung dopaminergener Neurone im Langzeitverlauf nach Transplantation im Früh- und Spätstadium der Parkinson Erkrankung nach Modifizierung klinisch eingesetzter biodegradierbarer Materialien

Es ist gelungen, die GDNF-freisetzenden MSC kontinuierlich im Gehirn der Ratte (Striatum, Substantia nigra) nachzuweisen. Die MSC waren auch in den Langzeitbeobachtungen (6 Monate nach Transplantation) nachweisbar. Mit Hilfe von histologischen Färbungen gegen Tyrosinhydroxylase konnten dopaminergene Neurone identifiziert und Quantifiziert werden. Es zeigte sich ein Trend zu einer reduzierten Neurodegeneration in den transplantierten erkrankten Tieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

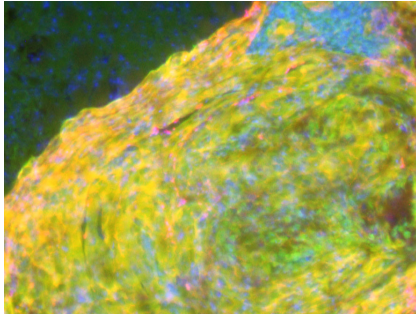


Abb. 12: exemplarischer Nachweis von GNF-MSC in der Fibrinkapsel im Striatum der Ratte in vivo (rot: Fibrin, grün: GDNF)

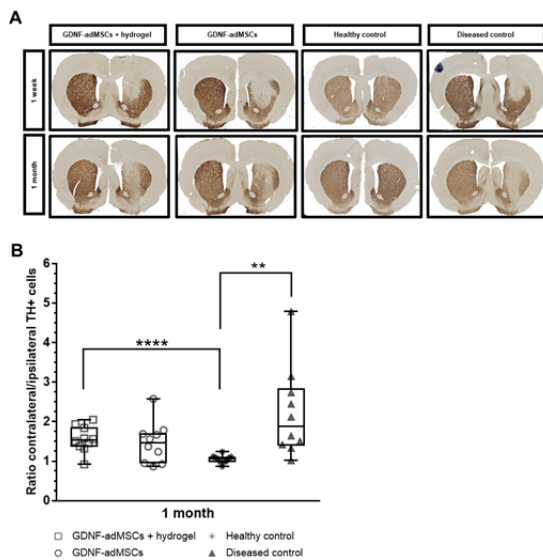


Abb 13: TH-Expression im Striatum (Nachweis durch TH-Färbung und quantitative Stereologie) (A) Die Anzahl von TH-positiven ipsilateral war in den 6-OHDA-Gruppen 1 Woche und 1 Monat nach Transplantation reduziert. Tiere in beiden GDNF-adMSC Gruppen zeigten TH+ Zellen an der Transplantationsstelle als Hinweis dafür, dass die transplantierten Zellen TH exprimierten. Keine TH+ Zellen in den Kontrollgruppen. TH+ Zellen waren in den gesunden Tieren in beiden Hemisphären nachweisbar. (B) Stereologische Quantifizierung der TH+ Neurone. Die Abb. zeigt die ratio der Anzahl der Zellen der kontralateralen zur ipsilateralen Hemisphäre (Boxen = 25gste and 75gste Percentile, ** $p < 0.01$, **** $p < 0,0001$). (aus Stahn et al, 2022, in press)

Zielsetzung (Meilenstein) 4:

Kenntnis der langfristigen klinischen und immunologischen Nebenwirkungen

Ergebnisse

AP7 Durchführung einer Langzeitstudie mit in retardierter Form transplantierten GDNF-MSC zum histologischen und molekularbiologischen Nachweis inflammatorischer Reaktionen im Gehirn und in der Peripherie

In diesem Projektabschnitt konnten keine eindeutigen Hinweise auf eine systemische oder lokale immunologische Reaktion auf das Transplantat nachgewiesen werden, jedoch waren hier im Verlauf des Projektes technische Schwierigkeiten im Vordergrund, so dass dieser Teil der Experimente im Folgeprojekt ausführlich bearbeitet werden wird. Geplant ist der histologische Nachweis von immunkompetenten Zellen im Gehirn *in vivo*, sowie eine systemische Bestimmung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen im Serum, die histologische Färbung der immunkompetenten Zellen konnte bisher nicht mit den kommerziell verfügbaren Antikörpern durchgeführt werden, die Daten waren statistisch aufgrund von Artefakten nicht verwertbar. Sollte ein Folgeprojekt ermöglicht werden, würde hier ein Schwerpunkt der Untersuchungen zur *safety* der MSC-Anwendung liegen. Die Proben hierfür sind vorhanden. Die Analyse der Zytokinfreisetzung ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

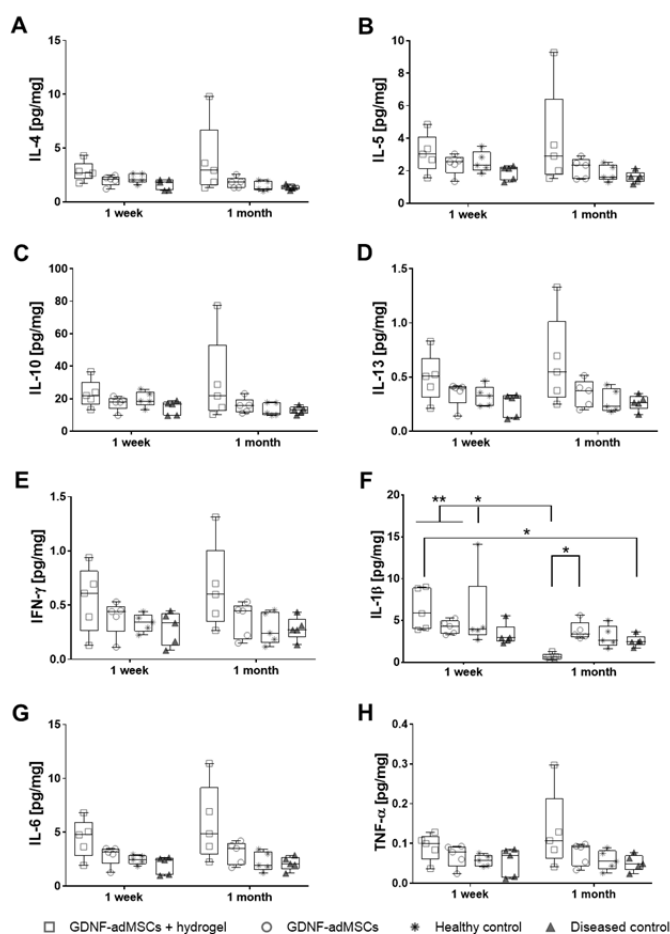


Abb. 14: Nachweis inflammatorischer Zytokine am Ort der Transplantation. Zytokine-level wurden mit Multiplex-ELISA gemessen. Anti-inflammatorische Zytokine (A, B, C, D) zeigten höhere level in den adMSC Gruppen im Vgl.zu den Kontrollgruppen unabhängig vom Zeitpunkt der Analyse. Pro-inflammatorische Zytokine (E, G, H) in adMSC Gruppen zeigten einen Trend zu höheren Leveln als die Kontrollen, außer IL-1 β (F). IL-1 β Level der the GDNF-adMSC + Hydrogel Gruppen 1 Monat nach Transplantation waren significant niedriger als in den Kontrollen und in den experimentellen Gruppen 1 Woche nach Transplantation. Die Zytokinmenge in pg wurde zur Gesamtmenge der Proteine in mg normalisiert. Boxen = 25th and 75th percentiles, median, whiskers = min and max values, *p < 0.05, **p < 0.01.

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; GDNF: glial cell-derived neurotrophic factor; IFN- γ : interferon- γ ; IL: interleukins; TNF- α : tumor necrosis factor- α .

(aus Stahn et al, 2022, in press)

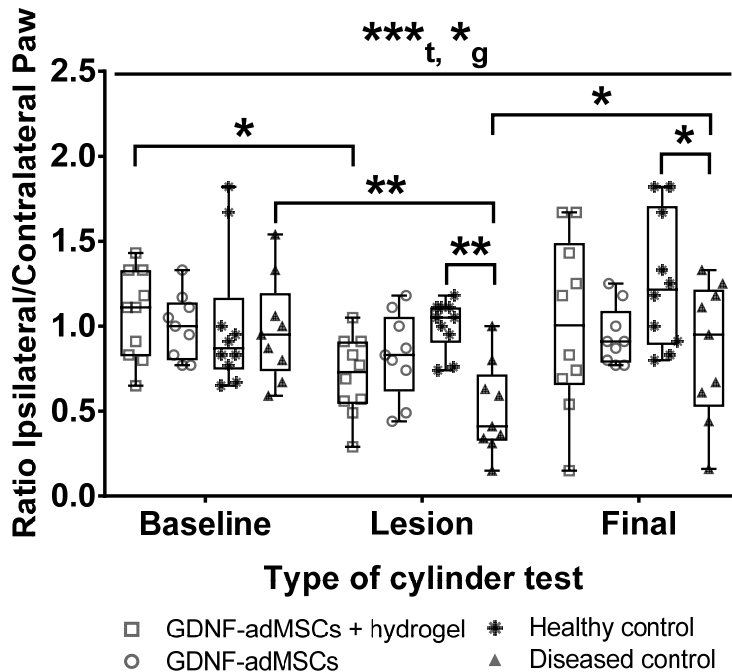


Abb. 15: Evaluation der Bewegungsstörung im Zylindertest. Bewegungsasymmetrie wurde in den Ratten zu 3 Zeitpunkten im Zylindertest gemessen (baseline, 4 Tage nach 6-OHDA, zuletzt 1 Monat nach 6-OHDA). Wandkontakte der kontralateralen rechten Pfote (Läsion linkshemipärisch) wurden gezählt. Boxen = 25 und 75 Perzentile, median, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (t=time (Zeit) *** $p < 0.001$, g=Gruppe* $p < 0.05$ (n=9). (aus Stahn et al, 2022, in press)

AP8 Analyse struktureller und funktioneller Veränderungen im Gehirn nach Langzeitbehandlung mit in retardierter Form transplantierten GDNF-MSC mittels Bildgebung

Aufgrund der Pandemie konnte dieser Abschnitt des Projektes nicht bearbeitet werden. Zur bildgebenden Untersuchung an lebenden Tieren müssen mind. 3-4 Mitarbeiter der verschiedenen beteiligten Arbeitsgruppen gleichzeitig vor Ort sein, um die Experimente durchzuführen. Dies war über einen langen Zeitraum nicht möglich, so dass diese Auswertungen im Folgeprojekt anstehen. Da derzeit aufgrund persönlicher Veränderungen die AG sowie die der Kooperationspartner aufgelöst werden musste, das gesamte Personal die Charité zu Gunsten der Industrieforschung verlassen hat, kann ein Folgeprojekt erst nach erneuter Drittmittelwerbung und nur damit möglicher Neueinstellung von fachkundigem Personal begonnen werden.

Zielsetzung 6:

Produkt- und zulassungsrelevante Kenntnisse zur injizierbaren Formulierung sowie Zusammenfassung und Diskussion der Studienergebnisse für einen zeitnahen Start mit dem klinischen *Proof of Technology*

Aufgrund der Pandemie musste dieser Teil zunächst verschoben werden, da die Daten des Projektes nach der langen Verzögerung zunächst erhoben werden mussten, dies stand aktuell im Vordergrund. Nach Abschluss der Publikationen werden nun diese Aspekte geprüft werden.

AP9 Durchführung produkt- und zulassungsrelevanter in vitro Begleituntersuchungen

AP10 Finale Auswertung der Validierungsstudie und Strategieplanung

1. Rasińska J, Klein C, Stahn L, Maidhof F, Pfeffer A, Schreyer S, Gossen M, Kurtz A, Steiner B, Hemmati-Sadeghi S. 2022. Transposon-mediated glial cell line-derived neurotrophic factor overexpression in human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells: A potential approach for neuroregenerative medicine? *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*
2. Stahn L, Rasińska J, Dehne T, Schreyer S, Hakus A, Gossen M, Steiner B, Hemmati-Sadeghi S. Sleeping Beauty transposon system for GDNF overexpression of encapsulated stem cells in a Parkinson's disease model. *Eingereicht bei Drug Delivery and Translational Research, in press.*

Vergleich des Abschlusses des Vorhabens mit der ursprünglichen (bzw. mit Zustimmung des Zuwendungsgebers geänderten) Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung

Die wesentlichen Meilensteine und Zielsetzungen wurden erfüllt. Die verkapselten GDNF-MSCs wurden transplantiert, die Tiere zeigten in den motorischen Tests (auch in den Langzeitstudien) eine deutliche Verbesserung durch diese Therapie.

Die Auswertung der Langzeitergebnisse ist erfolgt. Die gesetzten Meilensteine wurden im Wesentlichen lediglich mit Verzögerungen erfüllt, da es aufgrund der Pandemie zu einer signifikanten Verzögerung der Präsenzforschung kam. Auch die Zusammenarbeit der AGs konnte in weiten Teilen nur eingeschränkt erfolgen. Zu den Einschränkungen durch den Lockdown kamen vermehrt Krankheitsausfälle der Mitarbeiter. Die noch ausstehenden Untersuchungen zur Darstellung der immunkompetenten Zellen in vivo sind in Planung (anhängig von der Finanzierbarkeit eines solchen Projektes), die Darstellung mit Hilfe von MRT oder der Magnetresonanzelastographie kann aktuell aufgrund von fehlendem fachkundigen Personal nicht durchgeführt werden, da sich alle beteiligten Arbeitsgruppen aufgelöst haben.

Die Ergebnisse des Projektes zeigen erstmalig eine retardierte langwirksame zellbasierte Therapie mit einem Neurotrophin bei M. Parkinson. Aus unserer Sicht wurden die wesentlichen Zielvorgaben erfüllt, aufgrund der Pandemie leider mit einer zeitlichen Verzögerung. Diese wurden kontinuierlich mit dem Projektträger diskutiert und Lösungsmöglichkeiten gesucht.

Dennoch ist aus unserer Sicht das Ergebnis der Experimente eine fundierte Grundlage für Anschlussprojekte, die insbesondere die Sicherheit der Therapie untersuchen und eine klinische Studie vorbereiten sollen. Die Anwendbarkeit des entwickelten Transposon-Zellproduktes auch in anderen Bereichen der Therapien für neurodegenerative Erkrankungen soll ebenfalls in Folgeprojekten von uns oder nach Publikation von anderen Arbeitsgruppen untersucht werden. Die wirtschaftliche Verwertbarkeit wird im Rahmen von Folgeprojekten, soweit diese ermöglicht werden können mit interessierten KMU weiterverfolgt werden.

Bisher sind keine Ergebnisse veröffentlicht, die das Alleinstellungsmerkmal des hier berichteten, potentiellen Produktes minimieren. Eine Teilnahme an Kongressen zur Evaluierung möglicher sich in der Entwicklung befindender Produkte war Pandemie-bedingt und aufgrund des Personalmangels nicht

(oder nur sehr eingeschränkt virtuell mit wenig wissenschaftlichem Austausch, z.B. Jahrestagung der DGN) möglich.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

- a. Personalkosten für Wissenschaftler (Postdoktoranden Dr. T. Dehne, Dr. S. Hemmati-Sadeghi; Naturwissenschaftler L. Stahn, J. Rasinska) und technisches Hilfspersonal über den gesamten Zeitraum der Projektlaufzeit.
- b. Experimentaltiere (Wistar-Ratten)
- c. Sachkosten für Tierexperimente, Zellkultur, Histologie, Bildgebung

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die dargestellten und bereits zum großen Teil publizierten Ergebnisse zeigen einen innovativen Therapieansatz für Morbus Parkinson im Tiermodell mit Hilfe von Stammzellen, die kontrollierbar das Neurotrophin freisetzen. Es handelt sich um die erste Veröffentlichung auf diesem Gebiet mit einem innovativen Ansatz in Bezug auf die Herstellung einer retardierten Formulierung der Neurotrophinfreisetzung aus humanen Stammzellen. Um diese Formulierung zu etablieren war es notwendig, die o.g. Ansätze zu prüfen und zu validieren. Einerseits war es notwendig, ausführliche Zellkulturarbeiten durchzuführen, im zweiten Schritt dann diese im Tiermodell in vivo zu überprüfen. Da es sich um einen neuartigen technologischen Ansatz handelt, war die geleistete Arbeit angemessen und führte zur Veröffentlichung der Daten in wissenschaftlichen *peer reviewed* Zeitschriften im Sinne einer erstmaligen Etablierung einer zellbasierten, retardierten Neurotrophin-Therapie bei Morbus Parkinson. Um dies zu erreichen, war es notwendig, gruppenübergreifend geschultes und technisches versiertes Personal über die gesamte Projektlaufzeit zu beschäftigen und tierexperimentelle sowie aufwendige Zellkulturexperimente durchzuführen.

4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die beschriebenen Ergebnisse des Projekts zeigen, dass erstmalig eine retardierte hydrogelbasierte Formulierung von steuerbaren GDNF-freisetzenden humanen MSC neuroprotektive Effekte im Tiermodell für Morbus Parkinson gezeigt hat. Diese Daten werden künftig genutzt werden können, um die entwickelte Formulierung in zunächst Modellen für andere neurodegenerative Erkrankungen erprobt zu werden. Mittelfristig ist eine klinische Studie in Folgeprojekten möglich. Die Ergebnisse können künftig in Zusammenarbeit mit KMU oder anderen industriellen Partnern zur Weiterentwicklung einer zellbasierten Therapie für neurodegenerative Erkrankungen genutzt werden. Die vorliegenden Daten zeigen erstmalig den Einsatz von humanen MSC, die eine kontrollierbare und langanhaltende Freisetzung von Neurotrophinen ermöglichen und somit einen mittel- bis langfristigen Einsatz zunächst im Tiermodell, perspektivisch auch bei Menschen ermöglichen. Zum ersten Mal wird hier eine kausale Therapieoption für Morbus Parkinson beschrieben.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordene Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Im Verlauf des Projektes wurde regelmäßig die Fachliteratur zum Forschungsthema in Augenschein genommen und innerhalb der Arbeitsgruppe sowie in regelmäßigen Treffen mit den Kooperationspartnern diskutiert. Bisher sind auf dem Forschungsgebiet keine vergleichbaren Studien veröffentlicht worden. Der Einsatz der retardierten, kontrollierbaren humanen GDNF-freisetzenden MSC im Modell für Morbus Parkinson zeigt zum Zeitpunkt der Erstellung dieses Berichts ein Alleinstellungsmerkmal. Aufgrund der Pandemie war ein wissenschaftlicher Austausch im Rahmen von Kongressen nur sehr eingeschränkt möglich, so dass laufende, noch nicht veröffentlichte Projekte auf dem Forschungsgebiet nicht vollständig überschaubar waren.

6. Erfolgte Veröffentlichungen des Ergebnisses

1. Rasińska J, Klein C, Stahn L, Maidhof F, Pfeffer A, Schreyer S, Gossen M, Kurtz A, Steiner B, Hemmati-Sadeghi S. 2022. Transposon-mediated glial cell line-derived neurotrophic factor overexpression in human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells: A potential approach for neuroregenerative medicine? *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*
2. Stahn L, Rasińska J, Dehne T, Schreyer S, Hakus A, Gossen M, Steiner B, Hemmati-Sadeghi S. Sleeping Beauty transposon system for GDNF overexpression of encapsulated stem cells in a Parkinson's disease model. *Eingereicht bei Drug Delivery and Translational Research, in press.*

Berlin, 30.01.2023

Prof. Dr. med. Barbara Steiner
(Projektleiterin)

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Validierung einer zellbasierten, langwirksamen, steuerbaren Therapie für Morbus Parkinson durch „verkapselte“ funktionell regulierbare, den <i>Glial Derived Neurotrophic Factor</i> (GDNF) freisetzende mesenchymale Stammzellen (MSC) - NeuroBOOST	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Steiner, Barbara	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.03.2022
	6. Veröffentlichungsdatum
	7. Form der Publikation Schlussbericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Charité Universitätsmedizin Berlin Chariteplatz 1 10117 Berlin	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen 03VP04510
	11. Seitenzahl 5
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben
	14. Tabellen
	15. Abbildungen
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	

18. Kurzfassung

Der Morbus Parkinson ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen, mit aufgrund der demographischen Entwicklung rasant steigenden Zahlen von Erkrankten und Pflegebedürftigen. Dies führt aktuell zu einer hohen sozioökonomischen Belastung, da derzeit lediglich symptomatische und meist recht kurzwirksame Therapien existieren, die zudem vor allem die motorischen Symptome verbessern. Im Verlauf der Erkrankung kommt es jedoch besonders bei älteren Patienten zunehmend zu dementieller Entwicklung und neuropsychiatrischen Symptomen, für die bisher keine Therapie existiert, v.a. weil der rasch fortschreitende Nervenzellverlust nicht kausal aufgehalten werden kann.

In NeuroBOOST soll eine zellbasierte Therapie für Morbus Parkinson durch verkapselte funktionell regulierbare, den *Glial Derived Neurotrophic Factor* (GDNF) freisetzende mesenchymale Stammzellen (MSC) aus dem humanen Fettgewebe hinsichtlich ihrer Langzeitwirksamkeit validiert werden. Es wird erstmalig ein neuroprotektiver und dadurch kausaler Therapieansatz für Morbus Parkinson durch retardierte Langzeitwirkung von GDNF-freisetzenden MSC bereitgestellt. Im Rahmen der Validierung unserer *Proof of Concept* Daten sollen die in einer Trägersubstanz immobilisierten GDNF-MSC über einen mehrmonatigen Zeitraum validiert werden. Die hinsichtlich sicherheits- und zulassungsrelevanter Parameter veränderten GDNF-MSC sollen über mehrere Monate im 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) Rattenmodell für Morbus Parkinson vor Ort gehalten werden. Die GDNF-MSC sind so verändert (*Tet Off* System), dass die GDNF-Expression bei Bedarf beendet werden kann.

Die Validierungsphase ist die Voraussetzung für die spätere PEI-Zulassung und um dann in einer klinischen Phase den *Proof of Technology* zu erbringen. Ziel war es, den von uns entwickelten Therapieansatz gemeinsam mit industriellen Partnern weiterzuentwickeln und zu verwerten. Dies ist weiterhin zunächst mit KMU, im nächsten Schritt in der klinischen Anwendung dann auch mit größeren Partnern vorgesehen.

19. Schlagwörter

GDNF, Morbus Parkinson, MSC, Transposon

20. Verlag

21. Preis

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. type of document (e.g. report, publication) Final Report
3. title Validation of cell based longterm effective therapy for Parkinsons disease with encapseeled regulated mesenchymal stem cells (MSC) secreting the glial derived neurotrophic factor (GDNF)- NeuroBOOST	
4. author(s) (family name, first name(s)) Steiner, Barbara	5. end of project 31.03.2022
	6. publication date
	7. form of publication Final report
8. performing organization(s) (name, address) Charité Universitätsmedizin Berlin Chariteplatz 1 10117 Berlin, Germany	9. originator's report no.
	10. reference no. 03VP04510
	11. no. of pages
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references
	14. no. of tables
	15. no. of figures
16. supplementary notes	
17. presented at (title, place, date)	
18. Abstract Parkinsons disease is one of the most common neurodegenerative disorders with increasing numbers of affected patients. This leads to enormous socio-economical issues as the current therapies are rather symptomatic than preventive or causal. Most therapies focus on the motor symptoms but the patients suffer more and more from cognitive decline and affective symptoms in the course of the disease with increasing age. In the project NEUROBOOST a novel therapy based on the secretion of the glial derived neurotrophic factor (GDNF) from human mesenchymal stem cells (MSC) was investigated in the rat model of Parkinsons disease. With this new long term effective therapy we show for the first time a causal therapeutic option via the protection of dopaminergic neurons in the Striatum and Substantia nigra. The cells are capable to produce GDNF continuously and remain on the site of transplantation in the rat brain for more than 6 months. We describe a histologically proved neurotrophic effect on the dopaminergic neurons after transplantation and also an improvement in behavioural tests. The validation phase in this project will lead to future projects in this field in cooperation with industrial partners in the Berlin region.	

19. keywords GDNF, Morbus Parkinson, MSC, Transposon	
20. publisher	21. price