

ПРЕРАБОТКА НА КОСТНОМОЗЪЧНИ КЛЕТКИ ЗА ЛЕЧЕНИЕ НА ОСТЪР МИОКАРДЕН ИНФАРКТ В СЪОТВЕТСТВИЕ С ДОБРАТА ПРОИЗВОДСТВЕНА ПРАКТИКА

Доц. Любомир Арсениев

Сайтонет, Хановер

Клиника по хематология, хемостазеология и онкология,

Медицински университет Хановер, Германия

Интракоронарната или интрамиокардната инфузията на костномозъчни клетки (КМК) при лечението на остър миокарден инфаркт (ОМИ) понастоящем се проучва интензивно. Съобразно действащите относително строги и тесни законови рамки по отношение на терапевтичната клетъчна продукция и съответните клинични проучвания, групата **Cytonet** целеше и осъществи преработката на КМК за лечение на ОМИ, спазвайки принципите за добрата производствена практика (ДПП). Освен изпълнението на стандартните изисквания на ДПП и другите директиви и закони, вкл. производствен лиценз, беше изискано и валидиране на преработката. За целите на това валидиране венозна кръв (n=6) беше подложена на утаяване с помощта на **Celafundin**. Целта беше да се намали еритроцитната и тромбоцитната контаминация, да се редуцира обемът и да се постигнат спецификациите, споменати по-долу. Специално внимание беше обърнато на нивото на свободния калий (<6 mmol/l), реологичните характеристики на кръвта (хематокрит <0,45, тромбоцити <450 x10⁶/ml) и стерилността на крайния продукт. За целите на студията 45 проби от КМК за клинична употреба бяха приготвени в съответствие с методологията и валидираните стандарти (BOOST study). В 3 допълнителни случая бе проведена и селекция на CD34-положителни КМК за инфузия в инфарктната зона на миокарда. На всеки етап бяха поставени спецификационни ограничения. Проверка на данните и съвместимостта им с ДПП бе извършена и потвърдена от регионалните власти (Германия, PEI). В заключение, подготовката на нативни или обработени по друг начин костномозъчни клетки е осъществима в съгласие с правилата за ДПП. Тъй като резултатите от теста за стерилност може да не са налични към момента на приложението на клетъчната суспензия в некротичната инфарктна зона на миокарда, трябва да бъдат приложени тахимално високи стандарти за предотвратяване на бактериалните и другите инфекции. Адаптирането на процедурата към изискванията на ДПП води до неизбежно увеличаване на

разходите, необходими за правилното ѝ осъществяване, което обаче е свързано с подобрен контрол и повишена сигурност.

Ключови думи: костномозъчни ядрени клетки, cd34-позитивни клетки, остър миокарден инфаркт, клетъчна терапия, добра производствена практика.

Клетъчната терапия на острия миокарден инфаркт (ОМИ) понастоящем е едно от новите полета на експерименталната и клиничната кардиологична наука (1-5). Проучванията с животни и проучванията in vitro подкрепят тезата, че вкарването на стволови и прогениторни клетки може да подобри тъканната пролиферация и контрактилната способност на сърцето след ОМИ (2;5-12). Въпреки че механизъмът на регенерация на сърдечната тъкан не е добре изяснен, като възможни се дискутират а) стабилната клетъчна трансплантация и трансдиференциацията на инжектираните или инфузирани клетки в кардиомиоцити и/или ендотелни клетки или б) освобождаването на паракринни медиатори, спомагащи за постигането на тези благоприятни ефекти (13;14). Според предварителните данни за клинична ефективност стволовите клетки имат потенциала да подобрят контрактилната способност на миокарда при пациенти с ОМИ (11;15-19). В цитираните проучвания са използвани нативни костномозъчни ядрени (КМ-ЯК) или мононуклеарни клетки, костномозъчни мезенхимни или ендотелни клетки, костномозъчни CD133⁺ клетки, както и циркулиращи прогениторни клетки (5;8;9;12;15;20-22).

Отговорните органи в Европа и Съединените щати (FDA, EMEA, ICH, националните европейски власти) насочват усилията си към създаването на адекватна юридическа рамка за регулиране на производството на клетъчни терапевтични средства, съобразена със съвременните стандарти за производство на медикаменти и със специфичните научни достижения в тази област. Съответните професионални и научни организации (ISCT, AABB, EBMT и др.) **участват активно в тези правни процеси** и установяват стандартите и акредитационните процедури (FACT, JACIE). В резюме, налице е тенденция за съгласуване на продукцията на клетъчни лекарства с правилата на добрата производствена практика (ДПП) във всички развити страни (23;24). Успоредно с това се въвеждат много строги регулаторни изисквания за провеждане на клинични проучвания, независимо от това дали институцията-спонсор е с индустриален, университетски или друг характер (25-27).

Cytonet Hannover GmbH и Cytonet Heidelberg GmbH (Cytonet) **в качеството си** на дружества с фармацевтичен производствен лиценз са законово задължени да съблюдават препоръките на Европейския съюз за ДПП при доставката на клетки за проучването BOOST и следващите проучвания, провеждани в Медицинския университет в Хановер. Данните, представени тук, са получени при преработката на КМ-ЯК и изолирането на CD34-положителни клетки в рамките на BOOST, както и при допълнителното проучване с цел маркиране (15;28). И двете проучвания са публикувани и всички клинични данни са представени в съответните статии.

Целта на тази статия е да представи процес на валидиране и продукция на костномозъчни препарати за лечението на пациенти с остър миокарден инфаркт.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Като притежател на лиценз за продукцията на препарати от костен мозък и други хемопоеични клетъчни присадки, включително изолиране на CD34-положителни клетки, Cytonet произвежда фармацевтичните си продукти в съответствие с немския закон за лекарствата и европейските препоръки за добра производствена практика (26;27). Администрацията на всеобхватна система за качествен контрол

осигурява високо качество и сигурност на отделните продукти (клетъчни терапевтици, медицински продукти). Организационната структура, квалификацията и нивото на подготовка на персонала и специално проектираните, инсталирани, подготвени и използвани за целта помещения и оборудване съответстват на стандартите на ДПП. Всички данни се документират и пазят в съгласие със стандартите на добрата документационна практика. Всяка производствена и контролна процедура, включително производството и анализите, се съхраняват постоянно в утвърден вид и се преутвърждават годишно или при необходимост (големи промени). Контролът на всички системи се осигурява чрез вътрешни и външни инспекции.

Тъй като преработката на костномозъчните клетки включва работа с „отворени продукти“ по време на свързването на трансферните опаковки, филтри, спринцовки, буфери или вземането на проби за изследване, съответните стъпки се извършват в ламинарни боксове с клас А в чиста зона на помещение от клас В, според препоръките за ДПП. Пресният краен продукт трябва да бъде използван непосредствено след приготвянето му и преди получаване на резултатите от тестовете за стерилност, поради което се провежда непрекъснат мониторинг на персонала и работните помещения.

Всички пациенти дават писмено информирано съгласие за описаните процедури, одобрени от етническата комисия на Медицинския университет, Хановер.

Валидационни тестове: Въпреки че преработката на костномозъчни клетки бе вече част от лиценза за фармацевтична продукция, с цел да се гарантира качеството и да се изпълнят изискванията на отговорните немски власти (PEI) се проведе разширено валидиране на процеса чрез симулиране с венозна кръв. Основните изисквания бяха отправени към общите спецификации на крайния продукт (табл. 1) и главно към съдържанието на свободен калий, който може да провокира евентуални ритъмни промени. Спецификациите бяха дефинирани съобразно нормалните стойности на параметрите в циркулиращата кръв с цел постигане на подобни или по-добри реологични характеристики, за да не бъде предизвикана коагулационна активност и за да се предотвратят евентуалните рискове от тромбоза. Изключването на микробиално замърсяване по време на цялата процедура също трябваше да бъде валидирано.

За целта на валидирането три проби от 160 ml (висок обем) и три проби от 40 ml (нисък обем) бяха вземани по начина, предвиден при вземането на костномозъчни проби: 10 ml венозна кръв бяха изтегляни с помощта на 20-милитрова спринцовка и антикоагуланти с 10 IU Na-Heparin/ml (Liquemin, Roche). Пробите бяха транспортирани до Cytonet при контролирана температура (2-8°C) по валидиран начин. Венозната кръв беше съхранявана за една нощ (симулация на най-лоши условия) при температура 4°C и след това подлагана на обработката, предвидена за КМ-ЯК (вж. по-долу).

Крайният продукт беше съхраняван допълнително поне 6 часа след завършване на преработката. След това интракоронарната инфузия беше симулирана през съответния катетър (Booster catheter, Occam International).

Качественият контрол, включително контрол за стерилност, беше извършван на всеки основен етап от преработката и съхранението (вж. по-долу).

Вземане на костен мозък: Както е описано вече (15), предвиденото количество костен мозък (приблизително 120 ml, табл. 1) беше аспирирано от crista iliaca (10 ml в 20 ml спринцовки) и антикоагулирано с 10 IU Na-Heparin/ml по време на краткотрайна обща анестезия с midazolam (0,03 to 0,05 mg/kg i.v.) и etomidate (0,3 to 0,4 mg/kg i.v.). Средното време от началото на симптоматиката на ОМИ до вземането на костен мозък беше 6 дни (интервал от 4 до 8 дни). Взетата проба костен мозък

беше транспортирана до Cytonet по описания по-горе начин.

Преработка на костномозъчни ядрени клетки (КМ-ЯК): Отделните дози костен мозък биваха обединявани, филтрирани през 200 μm кръвно-инфузионен филтър и разреждени допълнително с 50 обемни % желатин-полисукцинат (Gelafundin 4%, B. Braun). Проведено беше плътностно-градиентно утаяване при 1 g с цел да се намали обема за инфузията и да се редуцира еритроцитната и тромбоцитната контаминация. Клетъчната суспензия беше промивана чрез центрофугиране на 250 g за 10 мин. на стайна температура. Утайката беше ресуспендирана в хепаринизиран (10 IU/ml) солеви разтвор (табл. 2).

CD34-клетъчна селекция: Ядрените костномозъчни клетки бяха обработвани по посочения в предходния параграф начин, след което се провеждаше стандартно изолване на CD34-положителни клетки със системата CliniMACS в съответствие с инструкциите на производителя (Miltenyi) и валидираните процедури на Cytonet (28).

Качествен контрол: Количеството на ядрените клетки, хематокритът и тромбоцитният брой в кръвната проба, в първоначалния костномозъчен аспират или в крайния костномозъчен продукт се определяха с помощта на автоматизиран хемоцитометър (Sysmex K1000, Sysmex). Жизнеспособността на ядрените клетки се оценяваше чрез оцветяване с трипаново синьо (Merck). Броят на CD34-положителните клетки се определяше с поточен цитометричен анализ (FACSCalibur, BD Biosciences) при използване на директни антитела срещу човешките CD34, CD3, CD14 и CD45 антитела (Beckman-Coulter) и в съответствие с препоръките на ISCTW-<http://www.celltherapy.org/> (29;30). Растежът на кръвотворните колония-образуващи клетки се определяше с метилцелулозен тест (Stem Cell Technologies).

Стерилността на крайния продукт се контролираше чрез инжектиране на проби от 1 ml в бутилки Bactec (BD) за инкубиране на аероби и анаероби. Резултатите се отчитаха автоматично в рамките на 7 дни. Означеният по съответен начин краен продукт се доставяше при контролирани условия за приложение в клиниката.

Съдържанието на свободен калий се измерваше чрез йонно-селективен електрод (Dept. clin. Chem., Medical University School Hannover).

Спецификации: Следните спецификации бяха въведени при валидирането на цяла кръв.

параметър	Целева стойност (интервал)	Във връзка с
K ⁺ (mmol/l)	≤6	сърдечна функция
Обем (ml)	30 (20-40)	количество и продължителност на интракоронарната апликация
Левкоцити (per ml)	≥1×10 ⁵ - ≤1×10 ¹⁰	реология и функция на присадката
Възстановяване на жизнеспособните левкоцити (%)	≥50	успех на преработката
Жизнеспособност на левкоцитите (%)	≥90	функция на присадката
Хематокрит (%)	30 (15-40)	реология
Тромбоцити (×10 ⁶ /ml)	≤450	реология и хемостаза
Стерилност	инокулирана	резултати като последваща информация след минимум 2 дни (краен срок 7 дни)

Табл. 1: Спецификации на крайния продукт

Същите параметри се оценяваха и за препаратите от КМ-ЯК, с изключение на калиевата концентрация по технически причини. Други параметри, измервани

при КМ-ЯК и изолираните CD34-положителни клетки, като брой CD34-положителни клетки, CFU-растеж и гр., се съобщаваха само като съпровождаща информация. CD3- и CD14-положителните клетки се използваха като сурозагати (индиректен) маркер за възможното намиране на CD34-положителни клетки при валидирането с венозна кръв.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Избраният метод на еритроцитна и тромбоцитна редукция чрез утаяване в плътностен градиент не води до специфично отстраняване на отделна клетъчна субпопулация, което се наблюдава при градиентното центрофузиране с Ficoll.

Валидиране: Всички резултати във връзка със спецификациите са представени в табл. 2. Тестовите за стерилност от всички проби бяха отрицателни за растеж на микроорганизми.

параметър (обем на пробата)		Проба				
		начална	сегментирана	6 ч. съхранение	12 ч. съхранение	приложение
K ⁺ (mmol/l)	160	5,04 4,58 - 5,58	3,81 3,68 - 4,49	4,55 3,92 - 4,70	5,29 4,31 - 5,36	5,51 4,47 - 5,51
	40	5,17 4,59 - 5,82	4,31 4,06 - 4,40	4,07 3,98 - 4,29	4,14 4,03 - 4,36	4,48 4,27 - 4,87
Обем (ml)	160	160 148 - 168	36 31 - 42	35 31 - 42		
	40	40 37 - 43	29 20 - 44	25 20 - 30		
*Левкоцити (×10 ⁶ /ml)	160	5,9 4,4 - 9,3	29,9 15,2 - 39,3	35,1 17,6 - 38,8	34 17,9 - 37,6	35,3 17,4 - 38
	40	6,5 5,9 - 9,2	6,9 4,3 - 7,2	7, 4,2 - 9,7	7, 4,0 - 9,7	7,0 4,0 - 9,6
*Намиране на жизнеспособни левкоцити (%)	160		92 73 - 100	84 83 - 98	86 81 - 94	84 81 - 98
	40		90 21 - 100	80 21 - 96	82 21 - 96	81 20 - 95
Жизненост (%)	160	100	99 98 - 100	99 91 - 99	99 90 - 99	99 92 - 99
	40	100 99 - 100	100 99 - 100	100 99 - 100	99	99
Хематокрит (%)	160	34,2 31,7 - 36,2	25,7 22,0 - 31,5	23,2 22,2 - 31,5	23,2 21,8 - 31,7	23,6 21,6 - 31,6
	40	32,2 30,8 - 34,0	18,7 13,7 - 19,5	19,2 13,3 - 19,7	19,2 13,7 - 19,7	19,0 13,4 - 19,6
Тромбоцити (×10 ⁶ /ml)	160	61 18 - 164	153 68 - 374	162 133 - 179	201 138 - 214	205 148 - 219
	40	87 39 - 110	34 12 - 77	54 13 - 59	53 11 - 59	70 11 - 86

Табл. 2: Резултати от валидиране със 160 ml (n=3) и 40 ml (n=3) проби венозна кръв (медиа-на, интервал). * - клетки от левкаферезен продукт бяха добавени към една 160 ml проба, за да могат да бъдат измерени CD34-положителните клетки. При една от 40 ml проби бяха загубени част от клетките по технически причини; * - пресметнато спрямо входящия препарат.

Калиевите нива бяха подгържани в рамките на определените от спецификацията – по-ниски от 6 mmol/ml във всички проби по време на цялостната преработка и дори след симулация на приложение чрез интракоронарна инфузия. Същото се отна-

ся и за стерилността, обема, жизнеността, броя на левкоцитите и тромбоцитите. Стойността на хематокрита съответстваше на спецификациите при пробите с висок обем и беше по-ниска при пробите с нисък обем, което не се отчита като критично. Критерият за успех при утаяването, а именно намирането на жизнеспособните левкоцити, беше в рамките на предвидения интервал във всички случаи с изключение на един, при който клетките бяха загубени в началото на преработката.

Определянето на CD34-положителните клетки в пробите от венозна кръв е свързано със съществена грешка поради много ниските нива на циркулиращите клетки, подлежащи на измерване. Измерването на CD14-положителните клетки (моноцити) и на CD3-положителните клетки (лимфоцити) като сурогатен маркер за предполагаемото намиране на CD34-положителните клетки разкри стойности, по-високи съответно от 60% и 72%. Следователно можеше да се очаква, че CD34-положителните клетки, които са подобни по размер и форма, с което и по поведение при утаяване с тези две клетъчни популации, биха могли да бъдат намерени в същата степен.

Може да се спекулира, че левкоцитните пелени (buffy coats), получени при стандартната преработка на гарена за кръвопреливане кръв, представляват по-добър сравнителен материал за валидиране в сравнение с венозната кръв, използвана при описаното валидиране. Някои от критичните параметри на венозната кръв обаче (брой на левкоцити и тромбоцити, хематокрит) са по-сходни с тези на костния мозък, отколкото при buffy coat. **Освен това венозната кръв може по-лесно да бъде вземана на порции и антикоагулирана по начин, подобен на този, по който се вземат пробите костен мозък.** Двата различни обема на контролния материал бяха подбрани с цел да покрият относително широк обхват при симулацията и валидирането.

Тази стратегия на валидиране и съответните резултати бяха одобрени от съответните власти (PEI).

Преработка на КМ-ЯК. Данните от 45 преработки за периода 2002-2004 г. са систематизирани в табл. 3. Всички спецификации, вкл. контролът върху стерилността, бяха спазени без изключение.

Параметър	начален материал		краен продукт	
	мед.	min. - max.	мед.	min. - max.
Обем (ml)	131	69 - 228	26	21 - 36
Левкоцити ($\times 10^6/ml$)	26,5	9,5 - 43,5	92,1	42,3 - 165,5
Намиране (recovery) на жизнеспособните левкоцити (%)			70,9	64 - 100
Жизнеспособност (%)	100	96 - 100	100	92 - 100
Хематокрит (%)	36,7	21,8 - 45,8	31,5	16,5 - 54
Тромбоцити ($\times 10^6/ml$)	81	39,5 - 157,0	182	70 - 445

Табл. 3: Резултати от преработката на КМ-ЯК (медиана, интервал)

Повторното намиране (recovery, yield) на CD34-положителните клетки беше средно 75% (30-100%) и средно $7,7 \times 10^6$ (2,5 - 29,9) CD34-положителни клетки бяха измерени в крайния продукт. CFU- и VFU-E растежът, сметнат като процент от клоногенността на CD34-положителните клетки (брой колонии за 100 изолирани CD34-положителни клетки), беше средно 47% (8,5-60%) и 52,5% (14,5-90%) съответно.

Средните резултати за качеството и количеството на преработките съ-

ответстват с други публикувани данни и отговарят на клиничните изисквания (5;11;15;18;28).

В костния мозък присъстват както диференцирани, така и прогениторни клетки. Поради това **CD34-експресията варира от незначителна до изразена**, което затруднява точната и възпроизводима оценка на CD34-положителните клетки в пробите от костен мозък. Въпреки че не е ясно дали CD34-положителните клетки или други хемопоеични прогениторни клетъчни популации играят роля в процеса на възстановяване на миокарда след ОМИ, представените данни корелират с някои резултати, наблюдавани *in situ*. **В допълнение, базирайки се на знанията за разпределението на отделните клетъчни субпопулации, могат да бъдат извършени екстраполации.** За тази цел са необходими обаче допълнителни клинични данни с по-голям брой случаи.

CD34-клетъчна селекция. Данните от три изолации на CD34-положителни клетки са представени в табл. 4. Всички крайни продукти бяха стерилни. Тъй като този процес не представлява стандартна процедура, допълнителни спецификации не бяха подготвени.

Параметър	Проба	№. 1	№. 2	№. 3
Обем (ml)	Костен мозък	336	320	277
	Фракция след утаяване с gelafundin	88	90	90
	CD34-позитивна фракция	3	3	3
	CD34-негативна фракция	90	110	60
Жизнеспособност (%)	Костен мозък	100	100	100
	Фракция след утаяване с gelafundin	100	100	100
	CD34-позитивна фракция	96	96	95
	CD34-негативна фракция	100	100	100
Левкоцити $\times 10^9$	Костен мозък	68,88	60,00	86,29
	Фракция след утаяване с gelafundin	49,28	41,85	48,15
	CD34-позитивна фракция	0,30	0,20	0,22
	CD34-негативна фракция	45,51	42,46	41,82
CD34%	Костен мозък	0,15	0,27	0,46
	CD34-позитивна фракция	70,30	74,42	55,04
CD34 $\times 10^6$	Костен мозък	9,99	16,20	39,26
	Фракция след утаяване с gelafundin	20,20	10,88	8,43
	CD34-позитивна фракция	21,28	14,67	12,00
	CD34-негативна фракция	6,37	1,27	5,23
CFU за 100 CD34 ⁺ -клетки	CD34-позитивна фракция	30	4,75	21,25
	CD34-негативна фракция	60	60	19,5
BFU за 100 CD34 ⁺ -клетки	CD34-позитивна фракция	45	6,75	9,25
	CD34-негативна фракция	55	90	11

Табл. 4: Резултати от селекцията на CD34-позитивни костномозъчни клетки.

Очевидните разлики в процента и броя на CD34-позитивни клетки в началния материал и другите фракции могат да бъдат обяснени с грешката при измерването на тази субпопулация костномозъчни клетки, представена в предишния параграф. Изолираните CD34-положителни костномозъчни клетки изглеждат предлагат някои предимства в сравнение с нативните КМ-ЯК. При тях може да бъде постигнат относително добър процент на намиране и чистота, което има за

резултат по-нисък обем и почти пълна липса на контаминация с еритроцити и тромбоцити за последващата интракоронарна инфузия. Загубата обаче на вероятно значими костномозъчни субпопулации клетки не може да бъде изключена (11;15;18;19;22;28).

В заключение, преработката на нативни или приготвени по друг начин костномозъчни клетки е изпълнима при условията на добрата производствена практика. Критичната точка, която трябва да се вземе под внимание тук, е че резултатите от тестовете за стерилност не са налични към момента на интракоронарната инфузия на клетъчната суспензия в некротичната инфарктна зона на миокарда. Следователно е необходимо приложението на най-високите стандарти за прегледване на бактериални и други инфекции. Повишената цена на тази процедура е оправдана поради по-високата сигурност и по-добрия контрол върху крайния продукт. Описаното валидиране на процесите и обработката на данните съответстват на критериите на Европейския съюз за провеждане на клинични проучвания и рутинна терапия на хора (25).

КНИГОПИС

- 1 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant* 2003; 7 Suppl 3:86-88.
- 2 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(18):10344-10349.
- 3 Chan RJ, Yoder MC. The multiple facets of hematopoietic stem cells. *Curr Neurovasc Res* 2004; 1(3):197-206.
- 4 Shah RV, Mitchell RN. The role of stem cells in the response to myocardial and vascular wall injury. *Cardiovasc Pathol* 2005; 14(5):225-231.
- 5 Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, Fernandez ME, Penarrubia MJ, de la FL et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; 95(7):742-748.
- 6 Kajstura J, Rota M, Whang B, Cascapera S, Hosoda T, Bearzi C et al. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res* 2005; 96(1):127-137.
- 7 Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001; 104(9):1046-1052.
- 8 Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2003; 107(3):461-468.
- 9 Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103(5):634-637.
- 10 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410(6829):701-705.
- 11 Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106(15):1913-1918.
- 12 Leor J, Guetta E, Feinberg MS, Galski H, Bar I, Holbova R et al. Human Umbilical Cord Blood-Derived CD133+ Cells Enhance Function and Repair of the Infarcted Myocardium. *Stem Cells* 2005; .

- 13 Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428(6983):664-668.
- 14 Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004; 428(6983):668-673.
- 15 Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364(9429):141-148.
- 16 Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(8):1690-1699.
- 17 Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003; 108(18):2212-2218.
- 18 Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106(24):3009-3017.
- 19 Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361(9351):45-46.
- 20 Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004; 94(1):92-95.
- 21 Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004; 363(9411):751-756.
- 22 Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P et al. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation* 2005; 112(9 Suppl):I178-I183.
- 23 Commission of the European Communities. Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells. *OJ EC L102*, 48-58. 7-4-2004.
- 24 FDA. 21 CFR Parts 16, 1270, and 1271 Current Good Tissue Practice for Human Cell, Tissue, and Cellular and Tissue-Based Product Establishments; Inspection and Enforcement; Final Rule. *Federal Register* 69, No. 226, 68612-68688. 24-11-2004.
- 25 Commission of the European Communities. Commission Directive 2005/28/EC of 8 April 2005 laying down principles and detailed guidelines for good clinical practice as regards investigational medicinal products for human use, as well as the requirements for authorisation of the manufacturing or importation of such products (Text with EEA relevance). *OJ EC L91*, 13-19. 9-4-2005.
- 26 Commission of the European Communities. Commission Directive 2003/94/EC of 8 October 2003 laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice in respect of medicinal products for human use and investigational medicinal products for human use (Text with EEA relevance). *OJ EC L262*, 22-26. 14-10-2003.

- 27 Commission of the European Communities. Commission Directive 91/356/EEC of 13 June 1991 laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice for medicinal products for human use. OJ EC L193, 30-33. 17-7-1991.
- 28 Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* 2005; 111(17):2198-2202.
- 29 Link H, Arseniev L, Bahre O, Kadar JG, Diedrich H, Poliwoda H. Transplantation of allogeneic CD34+ blood cells. *Blood* 1996; 87(11):4903-4909.
- 30 Serke S, Johnsen HE. A European reference protocol for quality assessment and clinical validation of autologous haematopoietic blood progenitor and stem cell grafts. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27(5):463-470.