

# Extrakorporale Photopherese – Prinzipien und klinische Anwendungen

## Zusammenfassung

Die Extrakorporale Photopherese (ECP) hat in den letzten Jahrzehnten einen festen Platz in der Behandlung von T-Zell-assoziierten Erkrankungen eingenommen. Das Konzept der ECP basiert auf der intravenösen Gabe von autologen, mittels Apherese gesammelten, Leukozyten, die *ex vivo* mit einer Kombination von 8-Methoxypsoralen und UV-A-Bestrahlung behandelt wurden. Diese Therapie hat sich als klinisch wirksam und sicher erwiesen, allerdings besteht noch Forschungsbedarf bezüglich genauer Wirkmechanismen, aussagekräftiger Qualitätskontrollparameter und Biomarkern, die Therapieansprechen zuverlässig vorhersagen und überwachen.

## Summary

In the past decades extracorporeal photopheresis (ECP) has been implemented in treatment strategies of T-cell-associated diseases. The concept involves the reinfusion of autologous leukocytes being collected with apheresis and treated *ex vivo* with the combination of 8-Methoxypsoralen and UV-A irradiation. ECP therapy has been proven clinically efficacious and safe. Yet, there is still need for research to elucidate all relevant mechanisms of action, to define meaningful quality control parameters and to identify reliable biomarkers that predict and monitor therapy response.

## EINLEITUNG

Inspiziert durch Beobachtungen aus der frühen Medizingeschichte, dass die Kombinationsanwendung von Heilkräutern mit Sonnenlicht die Symptomatik von bestimmten Hauterkrankungen positiv beeinflussen kann sowie der Beschreibung der Photosensibilisierung der Haut, das heißt der erhöhten Lichtempfindlichkeit durch sogenannte Photosensibilisatoren, entwickelte sich das Konzept der Photochemotherapie, die ab den 1950er Jahren erfolgreich zur Behandlung der Vitiligo eingesetzt wurde<sup>1</sup>. Hierbei wird explizit die Kombination von Licht mit photosensibilisierenden Agentien therapeutisch genutzt, wobei vor allem die Gruppe der Furocoumarine (Psoralene) eingehend untersucht wurde. Ein Vertreter dieser Substanzen ist – das auch natürlich in bestimmten Pflanzen vorkommende – 8-Methoxypsoralen (8-MOP), auch Methoxysalen oder Xanthotoxin genannt. Insbesondere wurde beobachtet, dass die Psoralene eine reversible Photosensibilisierung der Haut induzieren, die nach Exposition gegenüber langwelligem (320–400 nm) ultraviolettem (UV-A) Licht einerseits eine Linderung der Vitiligo-Symptome bewirkte, andererseits aber auch „Sonnenbrand“ (erythemogenes Potenzial) mit konsekutiver Hyperpigmentierung zur Folge hatte<sup>2,3</sup>. Die Kombinationsanwendung von systemisch (oral) verabreichtem Psoralen mit nachfolgender UV-A-Bestrahlung wird seitdem als PUVA bezeichnet. In mehreren *in vitro*- sowie *in vivo*-Studien konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Psoralenmoleküle nach UV-A-Bestrahlung kovalente Bindungen mit Pyrimidinbasen eingehen und so die DNA-Syn-

these hemmen<sup>4,5</sup>. Diese Erkenntnisse führten dazu, dass die Photochemotherapie (PUVA) auch bei der Psoriasis ab den 1970er Jahren erfolgreich zum Einsatz kam<sup>2,6</sup>, nicht zuletzt da nach Alternativen zum Folsäure-Antagonisten Methotrexat, der als DNA-Synthese-Inhibitor zur Suppression der gesteigerten Proliferation von epidermalen Zellen verwendet wurde, aufgrund dessen Nebenwirkungsprofils gesucht wurde. Die Erfolge der PUVA-Therapie bei der Psoriasis sowie die Beobachtung, dass Exposition gegenüber Sonnenlicht in frühen Stadien des kutanen T-Zell-Lymphoms (Mycosis Fungoides) positive Effekte auf die Hautläsionen hat, führten dazu, dass PUVA auch beim kutanen T-Zell-Lymphom klinisch getestet und als wirksam befunden wurde<sup>7–9</sup>. Dennoch blieben die genauen Wirkmechanismen der Therapie unbekannt, zudem es unklar war, ob die systemische Gabe von Psoralen mit nachfolgender UV-A-Bestrahlung von größeren Hautarealen die optimale Therapieoption für Patienten mit T-Zell-vermittelten Erkrankungen darstellte, oder ob eine gezielte UV-A-Bestrahlung von zuvor photosensibilisierten Zellen (wenn ja, welche?) vorteilhafter wäre. Weiterhin zeigten sich auch die nachteiligen Effekte vor allem einer länger andauernden PUVA-Therapie wie beispielsweise ein erhöhtes Risiko für Aktinische Keratose und Malignome der Haut<sup>10,11</sup>.

Basierend auf präklinischen *in vivo*-Daten, die darauf hinweisen, dass die Infusion von zuvor autoreaktiven T-Lymphozyten, die mittels Gammabestrahlung oder Mitomycin C-Behandlung „geschwächt“ wurden, Versuchstiere resistent gegenüber der Induktion von denselben

Autoimmun-Pathologien machten, welche die autoreaktiven T-Lymphozyten im unbehandelten Zustand auslösten<sup>12,13</sup>, entwickelte die Gruppe um Richard Edelson an der Yale University die Hypothese, dass T-Zell-vermittelte Erkrankungen durch die Gabe von „geschwächten“ autologen T-Lymphozyten behandelt werden könnten, indem letztere eine „klon-spezifische Immunreaktion“ induzieren, um somit die Aktivität der autoreaktiven T-Zell-Klone zu vermindern<sup>14</sup>. Als ideale Weise, um die autoreaktiven T-Zellen vor Reinfusion zu behandeln, wurde 8-MOP mit nachfolgender UV-A-Bestrahlung identifiziert, um so deren DNA-Synthese zu hemmen und sie zu „schwächen“. In der zweiten Hälfte der 1980er Jahre erfolgte im Rahmen einer multizentrischen Studie an der Columbia University, der University of Pennsylvania, der University of California in San Francisco sowie an den Universitätsklinika Wien und Düsseldorf die klinische Überprüfung dieser Hypothese. Hierbei kam erstmalig nach der üblichen oralen 8-MOP-Gabe das Prinzip der Leukapherese, das heißt die zentrifugations-basierte, maschinelle Anreicherung von Leukozyten, zur Anwendung. Das aus der Schicht des Buffy Coats gesammelte Leukapheresat, das nun photosensibilisierte autologe Lymphozyten, enthielt, wurde *ex vivo* mit UV-A Licht bestrahlt und danach reinfundiert. Nach der UV-A-Bestrahlung war die Viabilität der autologen Lymphozyten um über 80 % reduziert. Das neuartige Verfahren, *Extrakorporale Photochemotherapie* benannt, wurde allgemein gut vertragen und zeigte eine Ansprechrate von 73 % bei Patienten mit kutanen T-Zell-Lymphomen, die gegenüber vorherigen Therapien resistent waren<sup>14</sup>.

Im Rahmen der Weiterentwicklung des Verfahrens wurde die orale Psoralengabe verlassen und durch die direkte Zugabe von 8-MOP in das Leukapheresat ersetzt, womit der Begriff *Extrakorporale Photopherese* (ECP) geprägt wurde.

Hierdurch konnte die 8-MOP-Dosis substanziell unter Aufrechterhaltung einer konstanteren Wirkdosis auf die Zellen reduziert werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die photoaktivierten 8-MOP-Moleküle einen zweistufigen Rückgang ihres Energielevels für jeweils  $10^{-8}$  beziehungsweise  $10^{-3}$  Sekunden hin zu ihrem Ausgangszustand durchlaufen und somit bis zur Reinfusion wieder weitestgehend biologisch inert sind, solange sie nicht wieder UV-Licht ausgesetzt werden<sup>15</sup>. Diese technische Verbesserung konnte die Nebenwirkungsrate nach oraler Psoralengabe (z. B. Übelkeit) sowie auch das Malignomrisiko senken<sup>16</sup>.

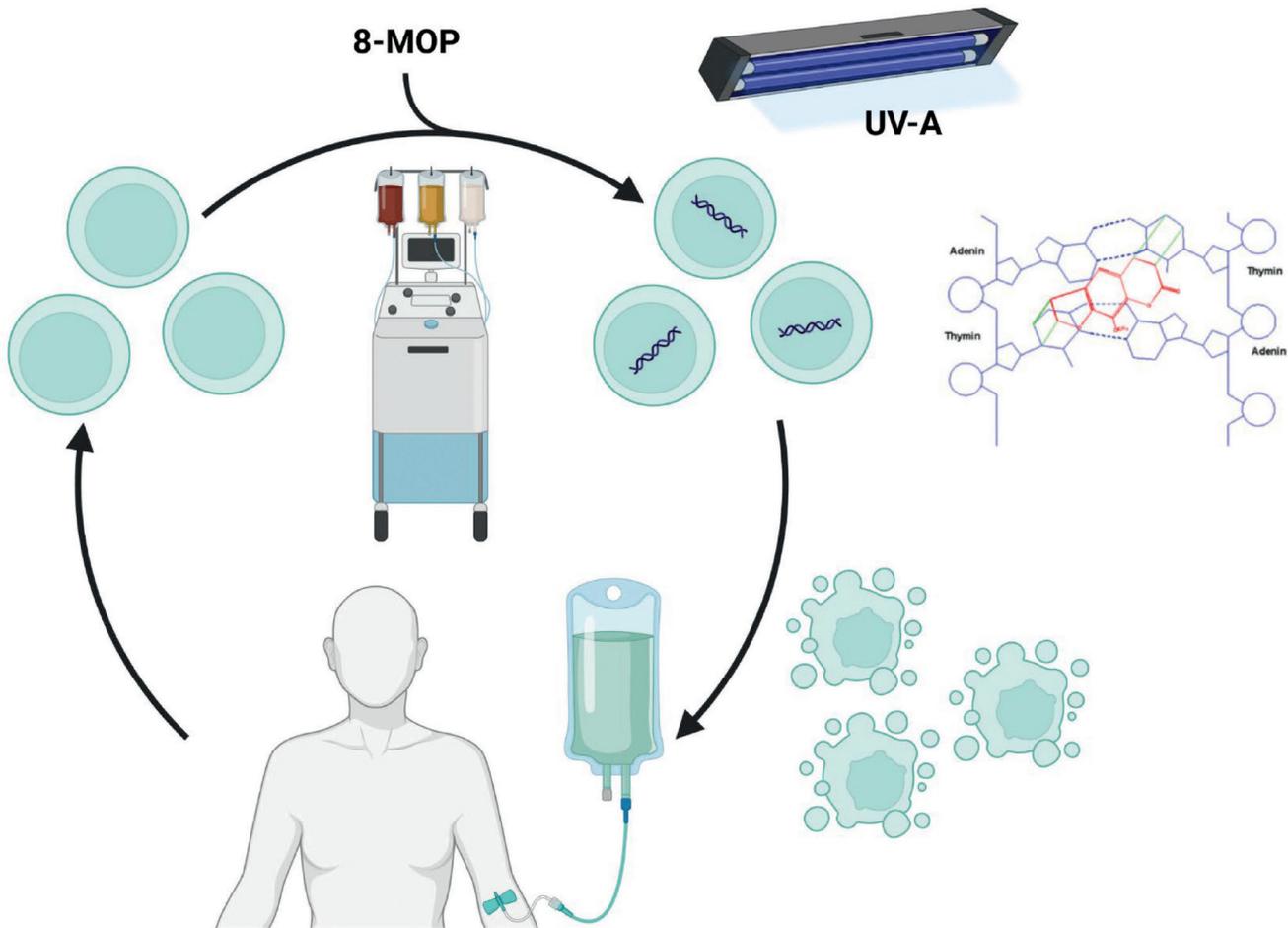
## TECHNIKEN

Bis heute haben sich zwei technische Varianten der ECP etabliert:

a. Das Originalkonzept von Edelson et al. bestand aus einer Apparatur, in welcher der Zellseparator zur Auftrennung der Blutbestandteile und Anreicherung der mononukleären Zellfraktion bereits mit der UV-A-Bestrahlungseinheit kombiniert war. Hierbei wurde das mittels diskontinuierlicher Apherese gewonnene Leukapheresat nach Zugabe von autologem Plasma und Kochsalzlösung in eine sterile Kassette geleitet, dort mit UV-A Licht bestrahlt und danach komplett reinfundiert<sup>14</sup>. Nach Implementierung der *ex vivo*-8-MOP-Zugabe während der Verarbeitung entwickelte sich hieraus das heute gebräuchliche „Inline-Verfahren“ der Firma Therakos, bei dem alle Schritte, das heißt Zellsammlung, 8-MOP-Inkubation (8-MOP-Endkonzentration: 320 ng/ml), UV-A-Bestrahlung und Reinfusion in einem Gerät im geschlossenen System (Therakos® CellEx® Photopherese-System) durchgeführt werden. Typischerweise werden hierbei 1.500 ml Vollblut prozessiert. Ein weiteres System, das dem Inline-Verfahrensprinzip zugerechnet werden kann, ist das Amicus Blue® ECP System (Fresenius Kabi), bei dem der Amicus-Zellseparator mit der Phelix® Photoaktivierungseinheit mittels eines funktionell geschlossenen Einmal-Schlauchsets verbunden ist. Beide Systeme arbeiten mit einer UV-A-Bestrahlungsenergie von  $1,5 \text{ J/cm}^2$ .

b. Alternativ wurden die sogenannten „Offline-Verfahren“ entwickelt. Deren Prinzip beruht auf der nachgeschalteten Verwendung von unabhängigen Geräten, das heißt eines Zelleseparators zur Leukozytensammlung (beispielsweise Spectra Optia® [Terumo], Amicus® [Fresenius Kabi], MCS® Plus [Haemonetics]) sowie einer UV-A-Bestrahlungseinheit (z. B. MacoGenic [Macopharma], UVA-PIT [MedTechSolutions]). Das prozessierte Blutvolumen ist variabel und in der Regel höher als beim Inline-Verfahren<sup>17,18</sup>. Nach Absammlung in der mononukleären Zellschicht des Buffy Coats wird dem Leukapheresat 8-MOP zugesetzt und in einen UV-A-transparenten Bestrahlungsbeutel überführt, wobei die typische 8-MOP-Endkonzentration 200 ng/ml beträgt<sup>19</sup>. Nach UV-A-Bestrahlung mit einer üblichen Energiedosis von  $2 \text{ J/cm}^2$  erfolgt die Reinfusion. Aufgrund der Notwendigkeit der Überführung in unterschiedliche Beutelsysteme ist auf die Dichtigkeit der Schlauchverbindungen zu achten.

Bei beiden Verfahren (Inline- sowie Offline-) muss bei der Zugabe von 8-MOP in das System sowie bei eventuellen Probenziehungen aus dem System streng darauf



**Abbildung 1:** Technisches Grundprinzip der ECP

Sammlung von autologen Leukozyten aus der Buffy-Coat-Schicht mittels Zellseparator mit nachfolgender 8-MOP-Zugabe in das Leukapheresat. Nach UV-A-Bestrahlung gehen die Psoralenmoleküle kovalente Bindungen mit den Pyrimidinbasen des jeweils komplementären DNA-Strangs ein. Dies führt zur Apoptose der lymphoiden Zellen im Leukapheresat, das als letzter Schritt der jeweiligen ECP-Behandlungssitzung reinfundiert wird. Grafik erstellt mit BioRender.

geachtet werden, das Risiko einer mikrobiellen Kontamination zu minimieren. Als Antikoagulantien werden entweder Heparin und / oder Citrat-Dextrose-Lösung (ACD-A) verwendet<sup>20</sup>.

Die vielseitigen Verwendungsmöglichkeiten des Zellseparators, der bei der Offline-Methode eingesetzt wird, können insbesondere für Zentren vorteilhaft sein, in denen neben der ECP noch weitere Entnahmearten durchgeführt werden.

Beim Inline- sowie Offline-Konzept kann die Vollblutentnahme und Erythrozyten- / Plasma-Rückführung entweder mittels Doppelnadelverfahren oder Einnadelverfahren durchgeführt werden. Beim Einnadelverfahren wird nur ein venöser Zugang benötigt, allerdings ist das extrakorporale Volumen im Vergleich zum kontinuierlichen Zweinadelverfahren, das zudem auch niedrige Blutflussraten erlaubt, höher, so dass letzteres bei Patienten mit geringen Blutvolumina, wie etwa in der Pädiatrie, vorteilhaft sein kann<sup>21</sup>. Zur Aufrechterhaltung von suffizienten Fluss-

raten wird bei Kindern oft ein zentral-venöser Zugang, z. B. Port oder Hickman-Katheter, benötigt<sup>20</sup>. Für beide Verfahren wird bei Kindern mit einem Körpergewicht von unter 35 kg beziehungsweise 25 kg (je nach System) sowie bei einem zu erwartenden Extrakorporalvolumen von über 15 % eine Vorfüllung des Systems (Priming) mit allogenen Erythrozytenkonzentraten empfohlen<sup>20,22</sup>.

Für pädiatrische Patienten mit sehr kleinen Blutvolumina wurde eine spezielle Variante, die sogenannte „Mini-ECP“ entwickelt, um die Risiken des maschinellen Aphereseverfahrens (siehe unten) zu vermeiden. Der Buffy Coat wird aus einer zuvor entnommenen, verhältnismäßig kleinen (100–200 ml) Vollblutmenge offline mittels Zentrifugationsverfahren separiert. Nach Zugabe von Kochsalzlösung zur „Einstellung“ des Hämatokrits unter 3 % erfolgt die 8-MOP-Zugabe mit nachfolgender UV-A-Bestrahlung (3 J/cm<sup>2</sup>) und abschließender Reinfusion zusammen mit dem zuvor entnommenen autologen Plasma, Erythrozyten und Thrombozyten<sup>23,24</sup>.

Im Allgemeinen sind für die Gesamtdauer einer ECP-Sitzung ca. zwei bis vier Stunden zu veranschlagen, wobei die individuelle Dauer der Behandlung vor allem durch die Flussgeschwindigkeit des Blutes bei der venösen Entnahme sowie auch die notwendigen händischen Schritte beeinflusst wird. Im Vergleich zum Inline-Verfahren ist daher die Gesamtdauer des Offline-Verfahrens etwas länger, vor allem aufgrund des höheren prozessierten Blutvolumens, der Notwendigkeit zur Umfüllung des Apheresats in den Bestrahlungsbeutel sowie Verbringung in die externe Bestrahlungseinheit und danach wieder zurück zum Patienten<sup>18</sup>. Bezüglich des letztgenannten Punktes muss beim Offline-Verfahren auch besonders auf die korrekte Patientenidentität geachtet werden, um Fehltransfusionen auszuschließen, vor allem, wenn ECP-Verfahren gleichzeitig bei mehreren Patienten durchgeführt werden. Grundsätzlich ist die Sicherheit von beiden Verfahren jedoch ähnlich hoch<sup>19</sup>. In **Abbildung 1** ist das technische Grundprinzip der ECP illustriert und in **Tabelle 1** sind die jeweiligen Eckpunkte der beiden ECP-Verfahren vergleichend aufgeführt.

Um die für die Behandlung suffiziente Menge an Leukozyten zu sammeln, sollte deren Konzentration im peripheren Blut vor der Entnahme bei über  $2 \times 10^9/l$  liegen. Je nach Verfahren werden im Rahmen einer ECP-Sitzung ca. 10 % der im Blut zirkulierenden mononukleären Zellen gesammelt, photoaktiviert und wieder reinfundiert<sup>22,25</sup>.

Mit dem Offline-Verfahren werden üblicherweise mehr Gesamt-Leukozyten beziehungsweise T-Lymphozyten gesammelt als mit dem Inline-Verfahren<sup>16, 17, 26, 27</sup>, wobei der Anteil der CD16+- beziehungsweise CD15+-

Monozyten beim Inline-Verfahren wiederum höher ist<sup>17, 19</sup>. Die berichtete größere Leukozyten-Sammeleffizienz des Inline-Verfahrens ist am ehesten Folge des geringeren prozessierten Blutvolumens (im Nenner der Berechnungsformel)<sup>16, 18</sup>.

Interessanterweise scheint die Apoptoserate der T-Zellen (siehe unten), die mit dem Inline-Verfahren induziert wird, etwas höher zu sein als mit dem Offline-Verfahren<sup>17</sup>. Dies könnte wiederum durch die insgesamt höhere Gesamtzahl der mit dem Offline-Verfahren gesammelten und damit reinfundierten T-Zellen kompensiert werden und somit dazu beitragen, dass bisher keine Unterschiede in der klinischen Wirksamkeit der beiden Verfahren beobachtet wurden<sup>19</sup>.

Ein typisches ECP-Behandlungsregime beginnt mit zwei Sitzungen an zwei Tagen innerhalb einer Woche (= ein Zyklus). Die initiale Praxis, dass die beiden Behandlungstage eines Zyklus direkt aufeinander folgen müssen, wird mittlerweile nicht mehr überall praktiziert, da bislang keine Studien vorliegen, die auf eine verminderte Wirksamkeit des Verfahrens hinweisen, wenn die beiden Tage eines Zyklus nicht direkt aufeinander folgen<sup>28</sup>. Die Zyklen werden üblicherweise alle 14 Tage wiederholt. Im weiteren Verlauf kann das Intervall zwischen den Zyklen je nach Erkrankung und Ansprechen auf die Behandlung verlängert werden (z. B. ein Zyklus alle sechs bis zwölf Wochen)<sup>20, 28</sup>.

Einige technische Aspekte das verwendete Material sowie bestimmte Prozesse die UV-A-Bestrahlung betreffend könnten für die weitere Optimierung der Verfahren von

	Inline-Verfahren	Offline-Verfahren
Dauer einer ECP-Sitzung	kürzer	länger
Prozessiertes Blutvolumen	1.500 ml	> 3.500 ml
Manuelle Überführung in Bestrahlungsbeutel und Verbringung in UV-Bestrahlungseinheit	nein	ja
Aufwand für Handling	weniger	mehr
Reinfusion	Direkt nach UV-A-Bestrahlung ohne Diskonnektion vom ECP-System	Nach Diskonnektion vom Zellseparator und UV-A-Exposition in getrennter Bestrahlungseinheit
Zusätzliche Einsatzmöglichkeit des Zellseparators	nein	ja
Leukozyten-Sammeleffizienz des Zellseparators	größer	geringer
Gesamtzahl der gesammelten Leukozyten	geringer	größer

**Tabelle 1:** Vergleich der ECP-Verfahren

Relevanz sein. Beispielsweise ist die Affinität von 8-MOP zu Kunststoffoberflächen, insbesondere Polyvinylchlorid, das für die Herstellung von Schläuchen und Beuteln verwendet wird, bekannt. Deshalb wird für die Herstellung der Bestrahlungsbeutel Ethylen-Vinylacetat verwendet, zu dem 8-MOP-Moleküle eine geringere Adhäsionsaffinität aufweisen<sup>29</sup>. Das im Apheresat enthaltene Plasma kann an 8-MOP-Moleküle binden und somit einerseits deren Aufnahme in die Zellen erschweren, andererseits die Adhäsion von 8-MOP-Molekülen an die Kunststoffoberflächen vermindern<sup>29</sup>. Zugesezte Kochsalzlösung wiederum kann die Adhäsion von 8-MOP an Kunststoff verringern<sup>29</sup>.

Die zugesezten 8-MOP-Moleküle diffundieren innerhalb weniger Minuten in die Zellen, allerdings wird davon ausgegangen, dass sich ein Equilibrium innerhalb der Zellsuspension erst nach ca. 30 Minuten einstellt. Somit könnte die Inkubationszeit zwischen 8-MOP-Zugabe und Beginn der UV-A-Bestrahlung die Effizienz der Verfahrens beeinflussen<sup>29,30</sup>. Der UV-Bestrahlungsprozess sollte zudem eine gleichmäßige Photoaktivierung möglichst aller Zellen

sicherstellen<sup>25</sup>. Dies wird beispielsweise mittels Agitation oder Rezirkulation in der Bestrahlungseinheit erreicht. Die Bestrahlungseffizienz wird zudem vom Hämatokrit beeinflusst, da Erythrozyten das UV-Licht absorbieren können<sup>29</sup>. Deshalb werden niedrige Hämatokritwerte (< 4 %) im zu bestrahlenden Apheresat angestrebt. Eine *in vitro*-Studie berichtete, dass die Apoptoserate von mittels Offline-ECP-Verfahren photoaktivierten T-Lymphozyten höher war, wenn eine höhere 8-MOP-Konzentration verwendet wurde und die Zellen in Kochsalzlösung anstatt in Plasma resuspendiert wurden<sup>29</sup>.

## KLINISCHE INDIKATIONEN

In den letzten 40 Jahren hat die ECP einen festen Platz in der Behandlung von verschiedenen Erkrankungen, in deren Pathogenese zumeist autoreaktive, alloreaktive oder maligne T-Zellen involviert sind, eingenommen. Die American Society for Apheresis (ASFA) hat ein Richtlinienwerk erstellt, in dem die evidenzbasierten klinischen Indikationen für therapeutische Aphereseverfahren aufge-

Indikation	ASFA-Kategorie	Evidenzgrad	Ansprechrate
Atopische Dermatitis	III	2B	50–70 %
Kutanes T-Zell-Lymphom (erythrodermale Mycosis fungoides [Sézary-Syndrom])	I	1B	60 %
Kutanes T-Zell-Lymphom (nicht-erythrodermale Mycosis fungoides)	III	2B	unklar
Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) (akut & chronisch)	II	1B	65 %
Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa und M. Crohn)	III	2C	unklar
Nephrogene Systemische Fibrose	III	2C	unklar
Pemphigus vulgaris	III	2C	unklar
Psoriasis	III	2B	unklar
Systemische Sklerose	III	2A	unklar
Herztransplantation (zelluläre Abstoßung und Abstossungsrezidiv)	II	1B	unklar
Herztransplantation (Abstoßungsprophylaxe)	II	2A	unklar
Lebertransplantation (antikörpervermittelte Abstoßung und Absetzen der Immunsuppression)	III	2B	unklar
Lebertransplantation (Desensibilisierung bei ABO-inkompatibler Transplantation)	III	2C	unklar
Lungentransplantation (chronisches Transplantatversagen und Bronchiolitis obliterans syndrom)	II	1C	ca. 60 %

**Tabelle 2:** Klinische Indikation für ECP

ASFA-Kategorie	Beschreibung
I	ECP ist akzeptiert als Erstlinientherapie (alleine oder in Kombination mit anderen Therapien)
II	ECP ist akzeptiert als Zweitlinientherapie (alleine oder in Kombination mit anderen Therapien)
III	Der optimale Stellenwert der ECP in der Behandlung ist nicht etabliert. Die Entscheidung zur Anwendung sollte individuell getroffen werden.
IV	ECP ist nachgewiesenermaßen entweder ineffektiv oder schädlich. Wird dennoch der Einsatz der ECP erwogen, sollte ein Ethikvotum eingeholt werden.

**Tabelle 3:** Definitionen der ASFA-Kategorien für ECP

führt werden. Die folgende Übersicht (**Tabelle 2**) basiert auf diesen regelmäßig aktualisierten sogenannten „ASFA Guidelines“<sup>28</sup>, die darüber hinaus zusammen mit der S2k-Leitlinie für ECP der deutschen Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)<sup>20</sup> wertvolle Ressourcen bezüglich technischer und pathophysiologischer Details von therapeutischen Aphereseverfahren inklusive der ECP darstellen.

Die jeweilige Empfehlung für den klinischen Einsatz der ECP basiert auf der sogenannten ASFA-Kategorisierung<sup>28</sup> (**Tabelle 3**), die wiederum auf dem Grading-System gemäß Stärke und Qualität der klinischen Evidenz<sup>28,31,32</sup> beruht (**Tabelle 4**).

## KONTRAINDIKATIONEN

Kontraindikationen für das ECP-Verfahren sind hämodynamische Instabilität, schwere Anämie, bekannte Photosensibilitätserkrankungen (z. B. Porphyrie), bekannte 8-MOP-Unverträglichkeit, Aphakie, Schwangerschaft / Stillzeit, gleichzeitiges Bestehen eines Melanoms, Basalzell- oder Plattenepithelkarzinoms, bekannte Unverträglichkeit von Ethylenoxid (wird zur Sterilisierung von ECP-Kits verwendet).

## UNERWÜNSCHTE WIRKUNGEN

Grundsätzlich können Apherese-assoziierte Komplikationen, wie beispielsweise Hämatom, Paravasat, Throm-

bophlebitis, Infektionen, Blutdruckentgleisungen (Hypobeziehungsweise Hypertonie) und Zitratreaktionen (Hypokalziämie) bei der Verwendung von ACD als Antikoagulans sowie mutmaßlich unspezifische Symptome wie Kopfschmerzen, Schwindel und Dyspnoe auftreten. In den auf den jeweiligen ECP-Zyklus folgenden Tagen berichteten die Patienten häufiger über Müdigkeit und Abgeschlagenheit<sup>20</sup>. Bei Prädisposition bezüglich thromboembolischer Ereignisse sollte die Antikoagulation besonders sorgfältig geplant, durchgeführt und überwacht werden. Besondere Vorsicht gilt auch bei ausgeprägter Leukozytopenie (< 1.000/ $\mu$ L), Anämie (Hb < 7g/dL) sowie Thrombozytopenie (< 40.000/ $\mu$ L). Gegebenenfalls kann die Transfusion von Erythrozyten- beziehungsweise Thrombozytenkonzentraten notwendig sein. Als eine häufige Nebenwirkung bei Langzeit-ECP-Anwendungen ist die Eisenmangelanämie infolge des chronischen Erythrozytenverlusts zu nennen<sup>20</sup>.

Unerwünschte Wirkungen, die unmittelbar mit der Reinfusion des 8-MOP+UV-A-behandelten Leukapheresats in Zusammenhang stehen, wären denkbar, eine gesicherte Kausalität wurde bislang jedoch nicht berichtet. Möglicherweise könnten die (selten) auftretenden leichten Fieberepisoden<sup>20</sup> Ausdruck einer immunologischen Prozessierung der photoaktivierten Leukozyten sein.

Gemäß der aktuellen S2k-Leitlinie der AWMF wird die Nebenwirkungsrate der ECP-Verfahren als gering angegeben<sup>20</sup>. In einer internationalen, multizentrischen Studie mit Daten von 560 Patienten aus dem Register der World Apheresis Association wurden über 13.000 ECP-Anwendungen bei Indikationen wie GvHD, kutane Lymphome und Organtransplantationen, die über einen Zeitraum von 17 Jahren durchgeführt wurden, analysiert. Unerwünschte Wirkungen der ECP wurden bei 5,4 % der Erstanwendungen beziehungsweise 1,2 % der Folgesitzungen registriert, wobei Stechen und Kribbeln am ehesten als Zitratreaktionen beschrieben wurden<sup>33</sup>. Schwere Reaktionen wie etwa Bronchospasmus oder gastrointestinale Blutung waren sehr selten (0,04 %), Todesfälle im direkten Zusammenhang mit der ECP wurden nicht berichtet<sup>33</sup>.

Außer der Eisenmangelanämie liegen bisher keine Berichte über unerwünschte ECP-Langzeitnebenwirkungen vor, dennoch sollten sexuell aktive Männer und Frauen im gebärfähigen Alter während der ECP-Therapie sichere Methoden der Empfängnisverhütung anwenden<sup>20</sup>.

Die Stoffmenge von 8-MOP kann massenspektrometrisch bestimmt werden und es kann daher davon ausge-

Evidenzgrad	Empfehlung	Evidenzqualität	Zu Grunde liegende Studienart
1A	starke Empfehlung	hoch	Randomisierte klinische Studien ohne relevante Limitationen/ Beobachtungsstudien mit überwältigender Evidenz
1B	starke Empfehlung	moderat	Randomisierte klinische Studien mit Limitationen/ Beobachtungsstudien mit sehr starker Evidenz
1C	starke Empfehlung	gering	Beobachtungsstudien/serielle Fallbeschreibungen
2A	schwache Empfehlung	hoch	Randomisierte klinische Studien ohne relevante Limitationen/ Beobachtungsstudien mit überwältigender Evidenz
2B	schwache Empfehlung	moderat	Randomisierte klinische Studien mit Limitationen/ Beobachtungsstudien mit sehr starker Evidenz
2C	schwache Empfehlung	gering	Beobachtungsstudien/serielle Fallbeschreibungen

**Tabelle 4:** Vereinfachtes Grading-System bezüglich Stärke und Qualität der klinischen Evidenz für ECP

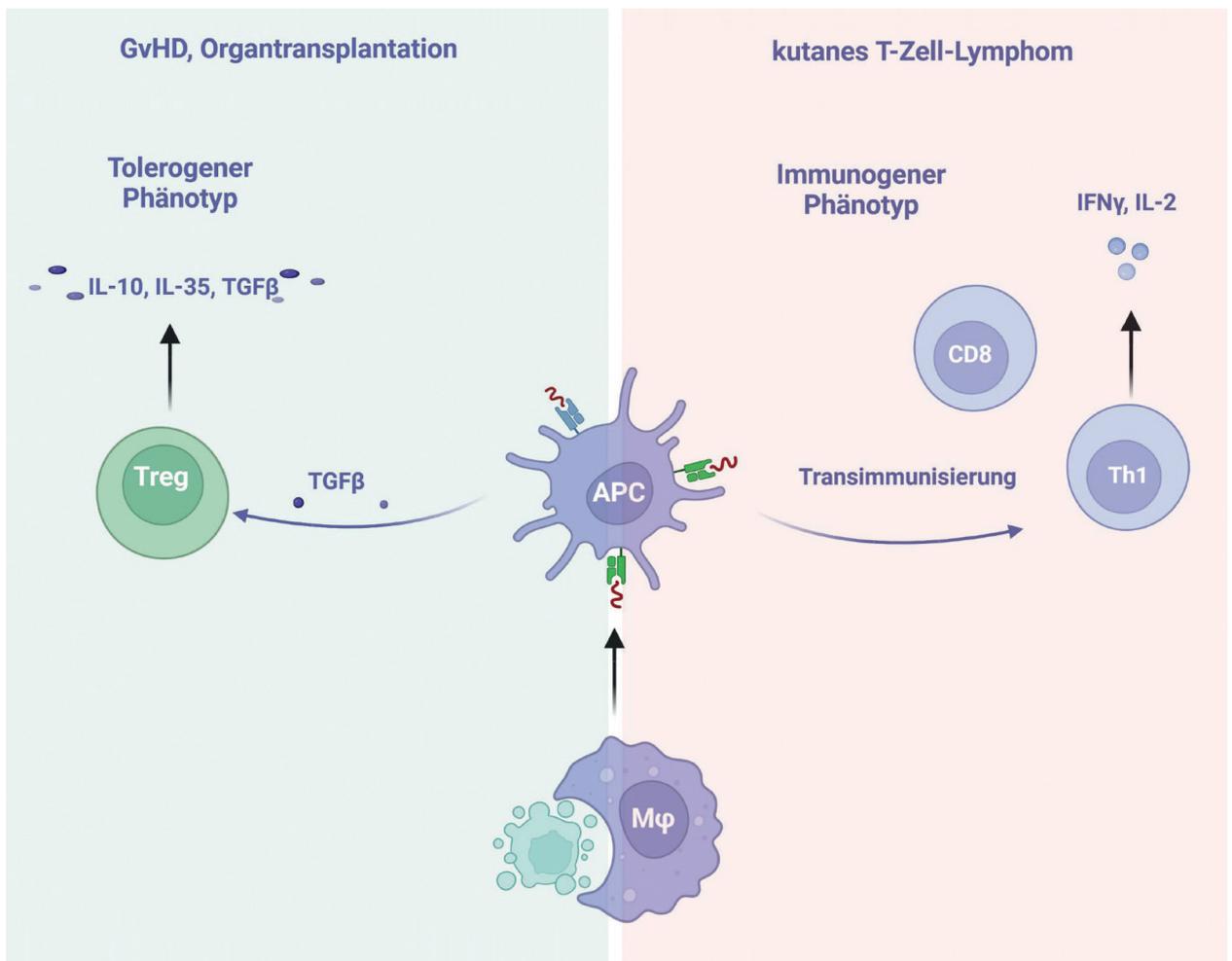
gangen werden, dass mit einem UV-A-bestrahlten Leukapheresat zirka 50 µg 8-MOP reinfundiert werden<sup>29</sup>. Wie oben erwähnt, sind die 8-MOP-Moleküle nach ihrer Photoaktivierung bis zur Reinfusion wieder biologisch inert solange sie nicht wieder UV-Licht ausgesetzt werden<sup>15</sup>. Deshalb sollten sich die Patienten in den ersten Tagen nach der ECP-Behandlung vor (Sonnen-)licht schützen<sup>20</sup>. Hierzu gehört auch das Tragen eines entsprechenden Augenschutzes (Sonnenbrille).

## WIRKMECHANISMEN

Obwohl die ECP seit mehreren Jahrzehnten durchaus erfolgreich klinisch eingesetzt wird, wurden deren Wirkmechanismen bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Wie oben ausgeführt, war bereits zu Beginn der Einführung der ECP bekannt, dass die Psoralenmoleküle nach UV-A-Bestrahlung kovalente Bindungen mit den Pyrimidinbasen des jeweils komplementären DNA-Strangs eingehen<sup>4,5</sup> und dass es somit auch zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA kommt<sup>34,35</sup>. Hiermit sind Transkription sowie auch Replikation der so vernetzten DNA substanziell und dauerhaft inhibiert, so dass es zu Proteinbindungen im Zytosol, zur Zellmembranschädigung und letztendlich zur Apoptose und Nekrose der Zellen kommt<sup>34,35</sup>. Dies wurde auch ausführlich für lymphoide Zellen bei der Anwendung der ECP beim kutanen T-Zell-Lymphom sowie der GvHD beschrieben<sup>35–37</sup>. Wie oben erwähnt, ist die Apoptoserate der Lymphozyten im Beutel nach UV-A-Bestrahlung zudem von der 8-MOP-Konzentration sowie der Beschaffenheit der Suspensionsflüssigkeit (Kochsalzlösung oder Plasma<sup>29</sup>) abhängig. Die Beobachtung, dass alloreaktive und aktivierte T-Zellen sowie maligne Zellen eine höhere Apoptose-Sensiti-

vität als ruhende beziehungsweise nicht transformierte T-Zellen nach Photoaktivierung aufweisen, deutet darauf hin, dass die Apoptoseinduktion eine relevante Rolle beim Ansprechen auf die ECP-Therapie beispielsweise bei den Indikationen CTCL und GvHD haben könnte<sup>20,38</sup>. Zudem wurden bei histologischen Analysen der Hautläsionen von Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom ein Rückgang der Infiltration mit lymphoiden Zellen sowie eine Abnahme von deren Proliferation bei gleichzeitiger Zunahme der Apoptoserate nach ECP-Behandlung beobachtet<sup>39</sup>. *Ex vivo*-Untersuchungen zeigten, dass die Apoptose von 8-MOP+UV-A-behandelten Lymphozyten eine Kinetik mit einer Zunahme innerhalb von 48 Stunden aufweist<sup>29</sup>, wobei auch der Anteil nekrotischer Zellen zunimmt. Hierbei kann, zusätzlich zur Caspase-3- und -7-Aktivität, die *Flip-Flop*-Transposition von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran frühzeitig bei den apoptotischen Zellen beobachtet und mittels Annexin V-Bindung durchflusszytometrisch nachgewiesen werden<sup>29,37</sup>. Zellen in später Apoptose präsentieren ebenfalls Phosphatidylserin und nehmen aufgrund der Membranintegritätsstörung den Farbstoff 7-Aminoactinomycin D (7AAD) auf. Bei nekrotischen Zellen ist die Membranintegritätsstörung voll ausgeprägt (7AAD-Aufnahme) und Phosphatidylserin ist nicht (mehr) auf der Membranoberfläche nachweisbar<sup>40,41</sup>.

Die Reaktionen des Immunsystems auf apoptotische beziehungsweise nekrotische Zellen sind komplex. Vor allem letztere setzen unter anderem sogenannte damage-associated molecular patterns (DAMPs) frei, wie beispielsweise High-Mobility Group Box 1 (HMGB1), Hitzeschockprotein 90 (HSP90) und Calreticulin, die eine pro-inflammatorische Antwort triggern können<sup>41,42</sup>. Makrophagen können nach Phagozytose von nekrotischen Zellen die T-Zell-Prolifera-



**Abbildung 2:** Postulierte Wirkmechanismen der ECP

Nach Phagozytose der reinfundierten apoptotischen Lymphozyten mittels Makrophagen ( $M\phi$ ) erfolgt über antigen-präsentierende Zellen (APC) krankheitsabhängig eine Transimmunisierung mit nachfolgender Ausbildung eines immunogenen Phänotyps, oder über die Induktion von Treg die Ausbildung eines tolerogenen Phänotyps. Grafik erstellt mit BioRender.

tion stimulieren<sup>41</sup>. Nach 8-MOP+UV-A-Behandlung apoptotische T-Zellen werden ebenfalls von Makrophagen phagozytiert, allerdings führte dies weder zur Ausreifung von dendritischen Zellen noch zur T-Zell-Aktivierung<sup>42</sup>. Interessanterweise konnte weiterhin auch gezeigt werden, daß HMGB1 und HSP90 in der Interaktion mit CD24 auf Effektorzellen die Immunstimulation dämpfen können<sup>43</sup>.

Die Exposition von Phosphatidylserin auf der äußeren Zellmembran von apoptotischen Zellen ist ein typisches *Eat-Me*-Signal für phagozytierende Zellen, diese aufzunehmen. Hierbei ist es nicht wahrscheinlich, dass sich alle komplexen Immunmodulationsprozesse im Rahmen der ECP direkt von der verhältnismäßig geringen Anzahl der apoptotischen Leukozyten, die reinfundiert werden, ableiten. Vielmehr wird davon ausgegangen, dass deren primäre antiinflammatorische Stimuli bei Immunzellen, die nicht direkt der *ex vivo*-8-MOP-UV-A-Behandlung ausgesetzt waren, Signale triggern, welche die Verschiebung von einem inflammatorischen hin zu einem tolerogenen

Milieu-induzieren und dieses aufrechterhalten.

Beispielsweise führt die Prozessierung der apoptotischen Zellen zur Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ -abhängigen Induktion von Regulatorischen T-Zellen (Treg)<sup>41</sup>, eine Subpopulation von CD4+ T-Lymphozyten, die den für ihre Entwicklung und Funktion relevanten Transkriptionsfaktor Forkhead Box P3 (Foxp3) produzieren<sup>44–46</sup>. Funktionell können Treg als immunmodulierende Zellen beschrieben werden. Deren vor allem entzündungshemmende und tolerogene Effekte werden über verschiedene Mechanismen vermittelt, wie beispielsweise Modulation von co-stimulierenden Markern von antigen-präsentierenden Zellen (APC) und Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin (IL)-10, TGF- $\beta$  und IL-35 sowie anderen Faktoren, die möglicherweise auch mittels extrazellulären Vesikeln transportiert werden<sup>46</sup>. Dies bewirkt eine Suppression der Th1- sowie Th17-vermittelten Immunantwort<sup>46</sup>. Tatsächlich wurde in mehreren klinischen Studien berichtet, dass die

Frequenz und Aktivität von Treg bei Patienten mit GvHD im Rahmen der ECP-Therapie angestiegen sind<sup>46</sup>. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Apoptose-Induktion von autologen Leukozyten sowie die Aktivierung von Treg zentrale Rollen in der Vermittlung der klinischen Effekte der ECP-Behandlung einnehmen.

Im Gegensatz zu T-Lymphozyten sind Monozyten gegenüber der 8-MOP+UV-A-Behandlung relativ resistent, dennoch können auch nach den *ex vivo*-Prozeduren im Rahmen der ECP Effekte auf Monozyten beobachtet werden. Diese werden beispielsweise durch infolge des Kontakts mit Kunststoffoberflächen (Apherese-Set mit Schlauchsystem, UV-A-Bestrahlungskammer) aktivierten Thrombozyten stimuliert und differenzieren sich zu dendritischen Zellen, welche nach Reinfusion die apoptischen Lymphozyten phagozytieren, gefolgt von Antigenprozessierung und -präsentation<sup>20,47</sup>. Bei T-Zell-Lymphomen können die dendritischen Zellen mit tumor-spezifischen Antigenen beladen sein, die zuvor suboptimal präsentiert wurden („Transimmunisierung“)<sup>48</sup>. ECP-behandelte Monozyten produzierten zwar vermehrt tumor necrosis faktor (TNF)- $\alpha$  und IL-6 *in vitro*, im Serum von Patienten mit GvHD, die auf die ECP-Behandlung ansprachen, wurden jedoch abfallende TNF- $\alpha$ -Konzentrationen gemessen<sup>49</sup>.

Interessanterweise kann die Immunantwort auf die ECP-Behandlung bei verschiedenen Erkrankungen unterschiedlich sein. Dies zeigt sich beispielsweise darin, dass bei Patienten mit kutanen T-Zell-Lymphomen eine Verschiebung hin zu einer Th1-Antwort mit immunogenen Effekten auf neoantigentragende maligne T-Zell-Klone beobachtet wird, wohingegen Patienten mit GvHD unter ECP-Therapie eher zu einer Th2-Antwort mit gesteigerter peripherer Immuntoleranz neigen<sup>20,49</sup>.

Grundsätzlich induziert die ECP keine allgemeine Immunsuppression. Somit besteht für die Patienten kein erhöhtes Risiko für opportunistische Infektionen oder neu auftretende bösartige Erkrankungen<sup>20</sup>. Zudem wurde bei Patienten mit GvHD unter ECP-Therapie die Anzahl und Qualität von antiviralen und antileukämischen Effektorzellen nicht beeinflusst<sup>50</sup>.

## QUALITÄTSKONTROLLE UND BIOMARKER

Zu den typischen Parametern, die am Leukapheresat vor und nach 8-MOP+UV-A-Behandlung bestimmt werden, gehören Hämatokrit, Gesamtzellzahl sowie Anzahl und Viabilität der Lymphozyten und Monozyten<sup>46</sup>. Zusätz-

lich kann, vor allem im Rahmen von Validierungsuntersuchungen, an Proben, die vor der Reinfusion gezogen wurden, die Menge an residuellem 8-MOP bestimmt werden sowie auf mikrobielle Kontamination getestet werden. Allerdings konnten von diesen Parametern bislang keine robusten Aussagen bezüglich der Wirksamkeit des Verfahrens abgeleitet werden. Deshalb werden *in vitro*-Assays zur Bestimmung von Surrogatparametern für die Effekte der 8-MOP+UV-A-Behandlung auf die Lymphozyten evaluiert. Hierzu gehören beispielsweise die Quantifizierung der Inhibition der T-Zell-Proliferation oder der Expression des Transferrinrezeptors (CD71) mittels Durchflusszytometrie<sup>51,52</sup>.

Bislang wurden einige Studien zur Evaluation des prädiktiven Potenzials von Biomarkern bezüglich der Ansprechrate der ECP für die Indikationen GvHD durchgeführt, wobei es sich anbot, Patienten-Kohorten, die auf die Therapie ansprachen (Responder) mit Patienten-Kohorten, die auf die Therapie nicht ansprachen (Non-Responder), zu vergleichen, beziehungsweise bestimmte Parameter mit dem klinischen Ansprechen zu korrelieren. Hierbei zeigte sich, dass im Blut von Respondern vor Behandlungsbeginn expandierte T-Zell-Klone sowie vermehrt dendritische Zellen und zytotoxische T-Zellen nachweisbar waren. Einige Studien berichteten zudem, dass die Anzahl von im Blut zirkulierenden Treg bei Respondern unter ECP-Therapie höher war<sup>46</sup>. Dies konnte in anderen Studien jedoch nicht bestätigt werden. Zudem waren die eingeschlossenen Patientenzahlen verhältnismäßig gering. Weiterhin scheint die individuelle klinische Manifestation der GvHD die Treg-Anzahl mit zu beeinflussen<sup>46</sup>.

Ein weiterer interessanter Ansatz ist die Quantifizierung von sogenannten Neutrophilen Myeloid-derived Suppressor Cells (PMN-MDSC), welche die Th1- und Th17-Antwort dämpfen können. In einer Studie bei Patienten mit GvHD nach Knochenmarktransplantation wurde bei allen Patienten zu Beginn der ECP-Therapie ein Anstieg der PMN-MDSC beobachtet. Dieser blieb jedoch nur bei den Respondern nachhaltig erhöht, wohingegen die Zahl der PMN-MDSC bei Non-Respondern wieder deutlich abnahm<sup>53</sup>.

Weitere Parameter, die als potenzielle Biomarker vor beziehungsweise während der ECP-Behandlung untersucht wurden sind B-cell Activating Factor, CD19+CD21-B-Lymphozyten, sowie CD56bright Natural Killer (NK) Zellen<sup>50</sup>. Multizentrische klinische Studien mit größeren Kohorten könnten helfen, die Robustheit dieser und zukünftig zu identifizierender Marker abschließend bewerten zu können.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich das ECP-Therapiekonzept als wirksam und sicher vor allem für T-Zell-assoziierte Erkrankungen erwiesen hat. Ansprech-raten von ca. 60–70 % sind ermutigend, jedoch bedeut-et dies auch, dass 30–40 % der Patienten nicht auf die Therapie ansprechen, wobei die Gründe hierfür weiter-hin unbekannt sind. Diese zu identifizieren wäre, neben dem wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn, auch kli-nisch von großer Bedeutung, beispielsweise, um die für die Wirksamkeit relevanten Parameter zu definieren und somit aussagekräftige Tests für die Qualitätskontrolle von ECP-Produkten zu entwickeln und das Verfahren weiter zu optimieren. Vor allem jedoch wären dann diejenigen Patientengruppen vor Therapiebeginn identifizierbar, die von dem Verfahren mit hoher Wahrscheinlichkeit profitie-ren werden.

### Der Autor



**Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Richard Schäfer**  
Leitender Oberarzt und Ärztlicher Leiter  
Universitätsklinikum Freiburg, Institut für  
Transfusionsmedizin und Genterapie  
richard.schaefer@uniklinik-freiburg.de

Die Literaturhinweise zu diesem Artikel finden Sie im Internet zum  
Download unter: [www.drk-haemotherapie.de](http://www.drk-haemotherapie.de)