



Dr. rer. nat. Karen Bieback

Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie
Mannheim¹

Dr. med. Halvard B. Bönig

Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie
Frankfurt a. M.¹

PD Dr. med. Reinhard Henschler

Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie
Frankfurt a. M.¹

Prof. Dr. med. Torsten Tonn

Institut für Transfusionsmedizin Dresden²

Prof. Dr. med. Hubert Schrezenmeier

Institut für Klinische Transfusionsmedizin und
Immunogenetik Ulm¹

¹DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg -
Hessen gemeinnützige GmbH

²DRK-Blutspendedienst Ost gemeinnützige GmbH

Zusammenfassung

Nachdem sich die Bereitstellung von Blutstammzellpräparaten zu einer Kernkompetenz vieler Blutspendedienste entwickelt hat, wurde die Entwicklung von Verfahren zur Herstellung und Anwendung neuartiger Zelltherapien vorangetrieben. In vielen Projekten stehen humane Blut- und Blutstammzellen im Vordergrund. Ausgehend von der klassischen Anwendung der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen zur hämatopoetischen Rekonstitution werden optimierte Methoden zur Stammzellmobilisierung evaluiert. Zellen aus dem Knochenmark werden aber auch für andere Indikationen, z. B. für die Therapie von akutem Herzinfarkt, eingesetzt. Weiterhin werden andere Zelltypen, z. B. die mesenchymalen Stammzellen, als regenerative Therapie oder immunmodulatorische Therapie angewendet. Sobald diese Zellen substanziiell bearbeitet werden oder nicht dazu bestimmt sind, im Empfänger im Wesentlichen dieselbe Funktion auszuüben wie im Spender, werden sie als „Arzneimittel für neuartige Therapien“ klassifiziert.

Summary

The provision of blood stem cell preparations has emerged as a key competence of many blood donor services. Based on this expertise, the development of procedures to manufacture and apply innovative cell therapies has been promoted. In a variety of protocols blood or blood stem cells are key cell types under investigation. Although already routine application, methods are optimised to mobilize blood stem cells to promote hematopoietic reconstitution. Furthermore, cells derived from the bone marrow are investigated for other indications, for example treatment of acute myocardial infarction. Other cell types, like mesenchymal stem cells are employed in regenerative therapies or immune therapies. In case, cell types are substantially manipulated or not intended to be used for the same essential function in the recipient as in the donor these novel cell therapies are classified as Advanced Therapy Medicinal Products.

Einleitung

Arzneimittel für neuartige Therapien

Neuartige Zelltherapie-Produkte gemäß den europäischen Richtlinien für Arzneimittel für neuartige Therapien (Advanced Therapy Medicinal Products, ATMP) (**Textbox 1**) müssen in der europäischen Union ab 2012 zentral als Arzneimittel zugelassen werden (**1**). Mit der 15. AMG Novelle (Juli 2009) wurde das Arzneimittelgesetz an die EU-Verordnung Nr. 1394/2007 angepasst. Aufgrund der Besonderheiten und Komplexität dieser neuartigen Zelltherapien wird den Blutspendediensten innerhalb von Deutschland besondere Bedeutung zukommen (**Abbildung 1**). Neben der Schlüsselstellung zwischen Grundlagen-, translationaler und klinischer Forschung stellen die Institute den Kontakt zu den Aufsichtsbehörden her. In vielen Instituten stehen

insbesondere auch Reinnräume zur Verfügung, um zellbasierte Präparate unter GMP-Maßgaben zu produzieren.

Generell gilt die Stammzellforschung derzeit als Schlüsseltechnologie der regenerativen Medizin und Biotechnologie und integriert zahlreiche Fachrichtungen zu einem hoch interdisziplinären Forschungsfeld (**2**). Mit Ausnahme der hämatopoetischen Stammzelltransplantation bewegt sich die adulte Stammzellforschung noch in einer Phase der Erforschung. Therapeutisch liegt das Ziel darin, funktionsgestörte Zellen, Gewebe oder Organe durch den Einsatz zellbasierter Verfahren zu reparieren, zu regenerieren oder zu ersetzen. Nachdem in den 80er Jahren die große Hoffnung auf den embryonalen Stammzellen ruhte, revolutionierte die Entdeckung gewebespezifischer Stammzellen in zahlreichen Geweben von Erwachsenen (sogenannte adulte Stamm-

Begriffdefinitionen

Die Definition eines Arzneimittels für neuartige Therapien (Advanced Therapy Medicinal Product; ATMP) ergibt sich aus der Verordnung (EG) 1394/2007 in Verbindung mit den Richtlinien 2001/83/EC und 2009/120/EG.

Arzneimittel für neuartige Therapien sind

- Gentherapeutika
- Somatische Zelltherapeutika
- Biotechnologisch bearbeitete Gewebeprodukte.

Im Rahmen der 15. Novelle vom 17.07.2009 wurde der Begriff „Arzneimittel für neuartige Therapien“ auch in das Arzneimittelgesetz (AMG) eingeführt.

Textbox 1

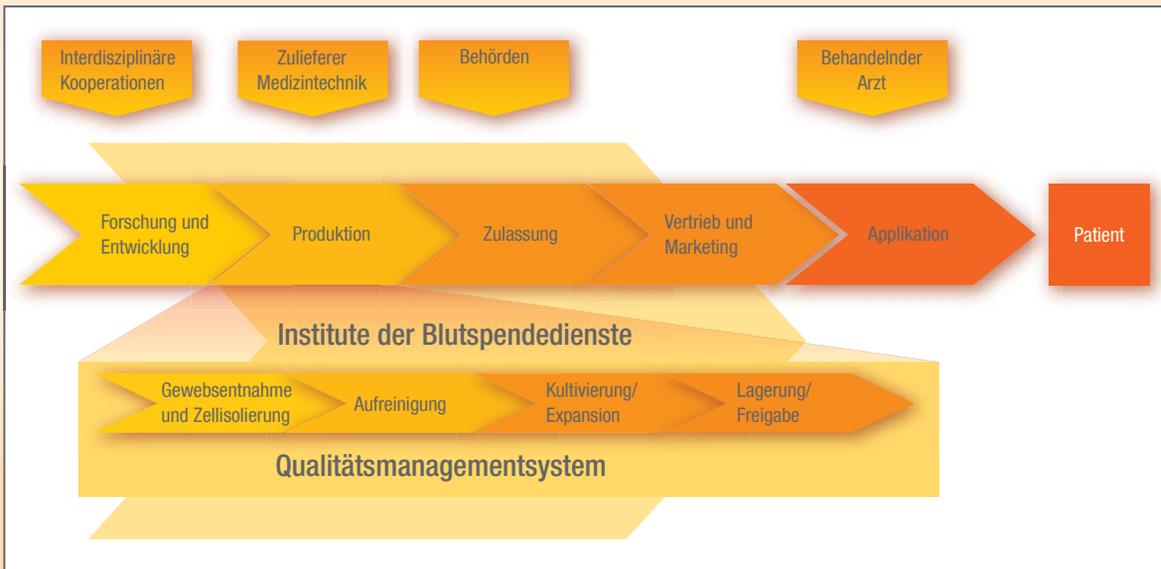


Abbildung 1

zellen) das Gebiet der regenerativen Medizin. Es zeigte sich, dass in vielen adulten Organen Stammzellen residieren, die ein breites Differenzierungspotential in zahlreiche Richtungen zeigen. Sie dienen im Erwachsenenstadium als Reservoir für den Ersatz von Zellen, die aufgrund limitierter Lebensdauer, Verletzung oder degenerativen Veränderungen zugrunde gehen oder in ihrer Funktion gestört sind. Stammzellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in Nachfolger mit eingeschränktem, spezialisiertem Potential besitzen (3, 4).

Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen

Im Steady-state ist die Zahl der im Blut zirkulierenden hämatopoeti-

schen „Stammzellen“ gering; praktisch alle Stammzellen werden in der Stammzellnische im Knochenmark, dem natürlichen Aufenthaltsort der hämatopoetischen Stammzelle, zurückgehalten (5). Die Mechanismen, die für die Retention und die Wahrung der Stemness (Fähigkeit zur selbsterneuernden Teilung ohne Differenzierung, Fähigkeit lebenslanger Generierung von Blutzellen aller lymphoiden und myeloischen Zellreihen) verantwortlich sind, sind noch immer nur unvollständig bekannt. Hämatopoetische Stammzellen können folgerichtig aus dem Knochenmark durch Aspiration gewonnen werden. Ein alternativer Zugang ist die forcierte Stammzellmobilisation, in aller Regel mit dem hämatopoetischen Wachstumsfaktor G-CSF. Diese Methode findet inzwischen bei mehr als 95 % der autologen und mehr als 80 % der allogenen Stammzelltransplantationen Anwendung.

Unter G-CSF, typischerweise gegeben als zweimal-tägliche subkutane Gabe in einer Tagesdosis von 7-10 µg/kg, kommt es innerhalb weniger Stunden zu einer Mobilisation von Neutrophilen aus dem Knochenmark. Weiterhin kommt es im Knochenmark zu einer dramatischen Proliferation unreifer Zellen der myeloischen Reihe.

Ab Tag 3 werden zunehmend unreife Zellen, darunter auch Stammzellen, in der Zirkulation gefunden. Das Maximum wird typischerweise an Tag 5 erreicht. Insgesamt sind die akuten Nebenwirkungen in aller Regel gering und nach Absetzen von G-CSF rasch rückläufig. Langzeitschäden durch G-CSF sind keine bekannt. Das Risiko einer peripheren Stammzellapherese ist somit nicht höher, als das einer Knochenmarkentnahme (6). Zu den akuten Nebenwirkungen von G-CSF zählen



insbesondere Knochen-, Muskel- und Kopfschmerzen, welche möglicherweise durch die Proliferation der Blutzellen und die vermehrte Durchblutung des Knochenmarks, die Knochenstoffwechselaktivierung, aber auch durch Induktion sekundärer Zytokine bedingt sein könnten. Das theoretisch mögliche Risiko einer Aktivierung eines unerkannten malignen Zellklons durch G-CSF konnte in Langzeitstudien nicht beobachtet werden, kann jedoch aufgrund der geringen Nachbeobachtungsfallzahlen weiterhin nicht sicher ausgeschlossen werden.

Mechanismen der Stammzellmobilisation und rationale Entwicklung alternativer Mobilisationsmedikamente

Die molekularen Mechanismen der G-CSF induzierten Stammzellmobilisation sind nur unvollständig aufgeklärt. Bemerkenswert ist, dass Stammzellen keinen G-CSF Rezeptor exprimieren, so dass indirekte Wege anzunehmen sind. Experimentelle Daten deuten auf kritische Rollen reifer, aktivierter Neutrophiler hin und damit einhergehend freigesetzter Proteasen, welche dramatische Veränderungen der Stammzellnische zur Folge haben. Unter anderem werden die Ankerproteine VCAM1 (Ligand für VLA-4) und CXCL12 (Ligand für CXCR4) von

Stromaproteinen abgespalten. Die Identifikation der Rollen spezifischer Moleküle für die Retention von Stammzellen in der Nische hat erstmals die rationale Entwicklung alternativer Mobilisationsstrategien erlaubt, nämlich Blockade von VLA-4 (7) beziehungsweise CXCR4 (8, 9). Beide Modalitäten sind als Mobilisationsmedikamente erheblich weniger potent als G-CSF in Kombination jedoch synergistisch und dann von klinisch relevanter Potenz.

Beide Ansätze interferieren zwar mit der Retention der Stammzellen, beeinflussen aber die Proliferation der Stammzellen nicht (10, 11). Ein Synergismus mit G-CSF wurde beschrieben (9). Ein small-molecule Inhibitor von CXCR4, AMD3100 ist unter dem Namen Mozobil® seit einigen Monaten zugelassen, für die Mobilisation G-CSF refraktärer Patienten in Kombination mit G-CSF (Abbildung 2). Im Gegensatz zur inzwischen exzellenten Datenlage bei adäquat mobilisierenden Patienten (Synergismus zwischen G-CSF und AMD3100), ist die Erfahrung mit Mozobil® bei schlechten Mobilisierern (zirkulierende CD34+ Zellen < 10/μl) noch unzureichend. Erste Ergebnisse sind allerdings vielversprechend (12, 13). Wir verwenden Mozobil® derzeit ausschließlich bei Patienten, die einen früheren Mobilisationsversuch mit G-CSF ohne

Gewinnung eines adäquaten Stammzellpräparats abbrechen mussten.

Therapie mit Knochenmark bei akutem Koronarsyndrom

Das akute Koronarsyndrom subsummiert einen fließenden Übergang von der instabilen Angina pectoris über den Nicht-ST-Hebungsinfarkt zum akuten ST-Hebungsinfarkt. Die resultierende progrediente Ischämie und damit verbundene Degeneration des infarzierten Gewebes sind ursächlich für die schweren Folgeschäden, an deren Ende das Herzversagen stehen kann. Eine Vielzahl klinischer Studien konnte zeigen, dass adulte Stammzellen aus dem peripheren Blut oder dem Knochenmark zu einer Regeneration des geschädigten Herzmuskels beitragen können.

In einer Metaanalyse aller bis zum Jahr 2007 veröffentlichten randomisierten Studien bei Patienten mit akutem Herzinfarkt (N=13) zeigte sich bei Patienten, die mit Knochenmarkzellen behandelt wurden, nach 6 Monaten eine signifikante Zunahme der linksventrikulären Auswurfleistung (LVEF). So zeigte sich bei Patienten, die autologe Knochen-

markzellen erhalten hatten (N=366), in dieser Metaanalyse eine im Vergleich zu der Kontrollgruppe (N=349) statistisch signifikante Steigerung der LVEF um 2,99 % (95 % CI, 1,26-4,72 %; P=0,0007) (14). Darüber hinaus führte die Stammzelltherapie in den klinischen Studien zu einer Verminderung der linksventrikulären Dilatation. Dies deutet daraufhin, dass der Nutzen einer Stammzelltherapie bei akutem Herzinfarkt möglicherweise nicht nur mit einer Steigerung

der Auswurfleistung, sondern auch mit einem vorbeugenden Effekt gegenüber Spät komplikation in Form eines chronischen Herzversagens einhergeht. So zeigte sich in der jetzt über 2-jährigen Verlaufsbeobachtung der REPAIR-AMI Studie (15, 16) ein signifikant geringeres Auftreten schwerer kardiovaskulärer Ereignisse (Reinfarkt, Tod, Revaskularisierung) bei Patienten, die autologe Knochenmarkvorläuferzellen erhalten hatten (17).

Der Pathomechanismus, der diesem therapeutischen Nutzen zu Grunde liegt, ist bisher nicht im Detail geklärt. Bei Infarkt-Patienten, die einer Stammzelltherapie zugeführt wurden, konnte jedoch eine substantielle Verbesserung des Blutflusses in den betroffenen Arealen festgestellt werden (18), was darauf hindeutet, dass die applizierten Stammzellpräparationen zur Vaskulogenese beitragen. Letztlich führt eine Verbesserung des Endothels mit

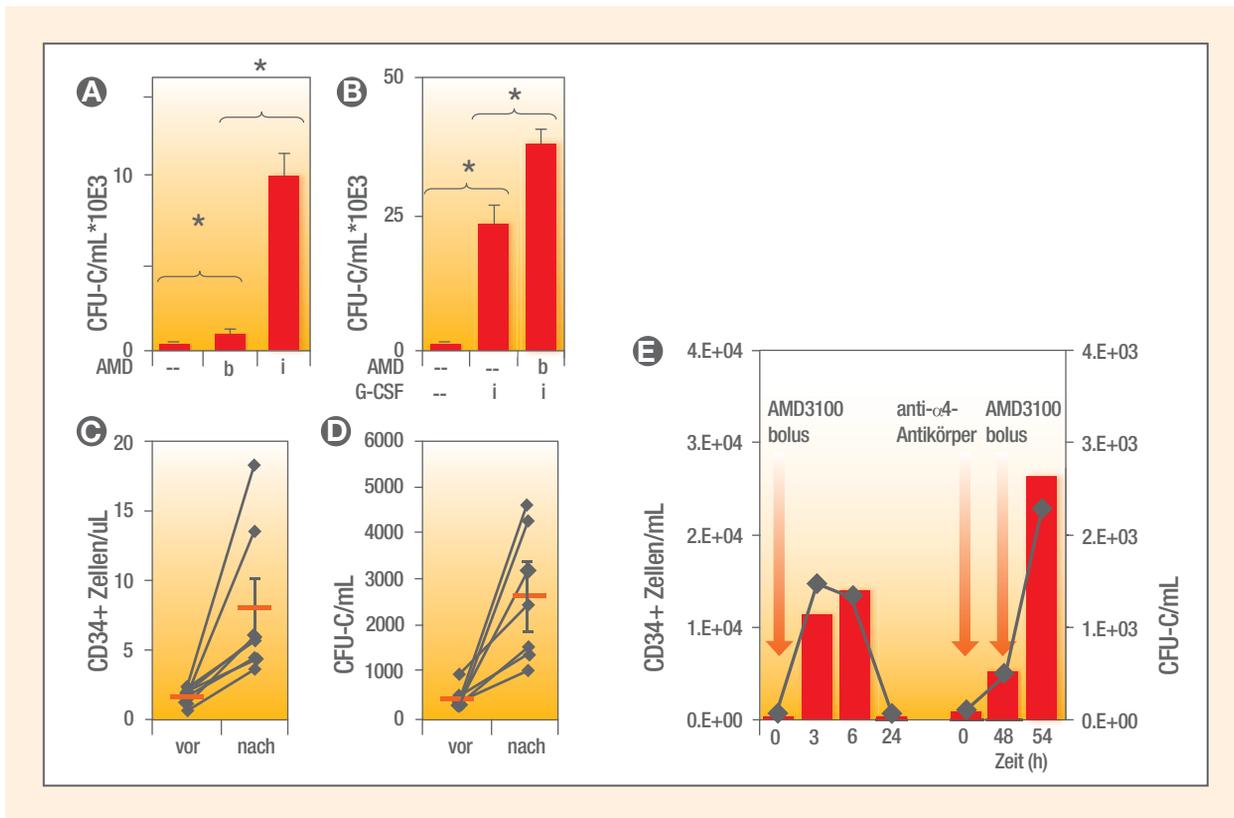
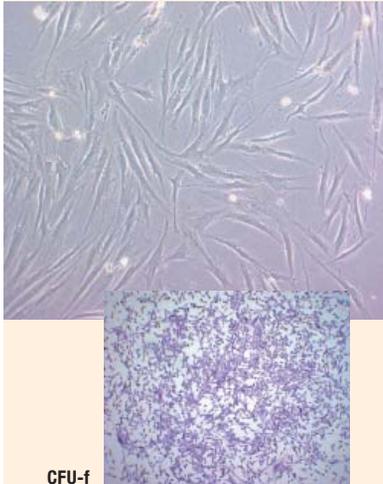


Abbildung 2

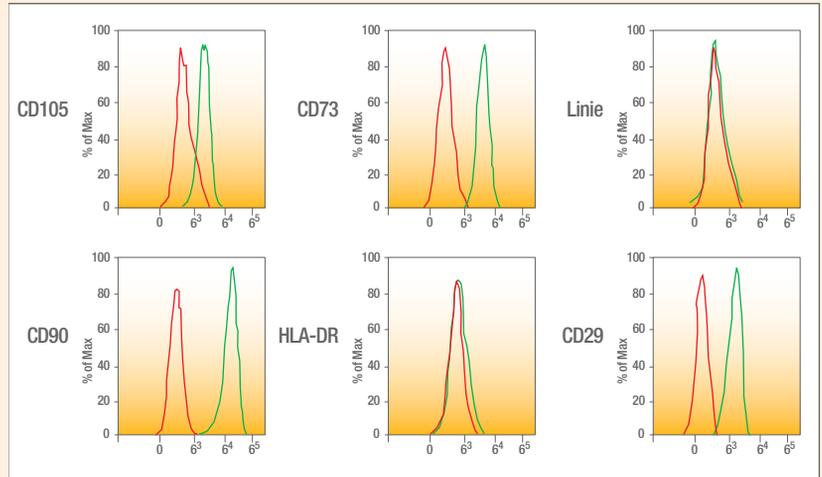
- A: Mobilisation von hämatopoetischen Vorläuferzellen in Mäusen: Mobilisation durch Bolus (b) oder Dauerinfusion (i) von AMD3100; zum Vergleich zirkulierende HPC in der Homöostase (-).
- B: Effekt der Kombination von G-CSF mit AMD3100 (i,b) im Vergleich zur Dauerinfusion alleine (i) und zu unbehandelten Kontrollmäusen (-). (benutzt mit Erlaubnis nach (9))
- C, D: Mobilisation von HPC bei Menschen: Mobilisation durch Infusion VLA-4-blockierender Antikörper – C: CD34+ Zellen; D: Kolonieformende Zellen, CFU-C. (benutzt mit Erlaubnis nach (7))
- E: Mobilisation von HPC in Makaken-Äffchen: Effekt der Kombination von anti-VLA-4 Antikörper mit AMD3100 (rechts) im Vergleich zu AMD3100 alleine (benutzt mit Erlaubnis nach (10)).

Morphologie in vitro

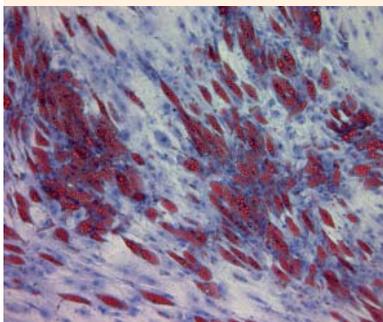


CFU-f

Immunphänotyp



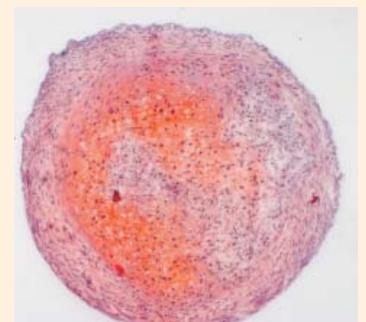
Differenzierung in vitro



Adipogen Nachweis: Öl-rot



Osteogen Nachweis: Von Kossa



Chondrogen Nachweis: Safranin-O

Abbildung 3

Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen in vitro gemäß der Kriterien beschrieben in (25).

konsekutiver Verbesserung der endothelialen Funktion und eine verbesserte Neovaskularisierung dazu, die koronare Flussreserve bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom zu normalisieren. Durch die Entdeckung residenter, kardialer Stammzellen (19) wird zudem deutlich, dass der Herzmuskel selbst ebenfalls über begrenzte Fähigkeiten zur Regeneration verfügt. So geht man heute davon aus, dass der therapeutische Nutzen einer Stammzelltherapie bei akutem Herzinfarkt auf eine Kombination verschiedener Faktoren zurückzuführen ist. Eine wesentliche Rolle scheint hierbei der parakrine

Effekt adulter Stammzellen auf die Neovaskularisation und Kardiomyogenese zu spielen (20). Die ebenfalls beobachtete Transdifferenzierung von Knochenmarkzellen in Endothelzellen oder Kardiomyozyten scheint hierbei therapeutisch nicht ins Gewicht zu fallen.

Für die Zukunft gilt es, neben der direkten Gabe von Progenitorzellen auch die Komponenten der physiologischen Reparaturmechanismen (Mobilisation, Homing, Überleben und Differenzierung der Progenitorzellen; Funktion der im Myokard residenten, kardialen Progenitorzel-

len) zu verstärken und in die Zelltherapie zu integrieren. Dabei könnten zukünftig auch besonders effektive Zellpopulationen identifiziert werden. Darüber hinaus sind weitere Studien mit klinischen Endpunkten gerechtfertigt, um einen Einfluss der Progenitorzelltherapie auf die Mortalität und Morbidität bei Patienten mit stark reduzierter LV-Funktion nach akutem Myokardinfarkt nachzuweisen. Bei der Durchführung derartiger Studien ist auf die Verwendung validierter Methoden der Zellpräparation zu achten. Neben der Dosis und dem verwendeten Zelltyp (KM-MNC's, selektionierte CD34+ Zellen oder

mögliche alternative Supplemente sind Komponenten aus humanen Blutprodukten vorgeschlagen worden, autologes Plasma, Serum oder Faktoren aus Thrombozyten. Es ist bekannt, dass Blutplättchen eine Vielzahl von Faktoren enthalten, die förderlich für die Wundheilung und Knochenregeneration sind. Je nach Art der Plättchen-Stimulierung kann sich der Cocktail an freigesetzten Faktoren jedoch unterscheiden. In unseren Studien konnten wir folgende Ergebnisse erzielen:

1. Humane alternative Supplemente können die Isolation von MSCs aus verschiedenen humanen Geweben unterstützen (27, 29). Wichtig ist, dass sie sämtliche untersuchte Charakteristika der MSCs, vor allem die Expansions- und Differenzierungsfähigkeit, unterstützen.
2. MSCs aus verschiedenen Gewebsquellen verhalten sich unterschiedlich gegenüber diesen humanen Supplementen für die ex vivo Expansion, so dass für die kli-

nische Herstellung unterschiedliche Produkte zur Verfügung stehen und vergleichend geprüft werden sollten.

Auch humane Blutprodukte können nicht als Ideallösung angesehen werden, da sie nicht hundertprozentig standardisierbar und chemisch definierbar sind. Aber gegenüber Rinder-serum bieten sie den Vorteil, dass humane Blutprodukte bereits arzneimittelrechtlichen Zulassungskriterien unterliegen und hohe Qualitätsstandards etabliert sind. In der Transfusionsmedizin besteht eine langjährige Expertise in der Herstellung und Anwendung.

Für die Qualitätskontrolle von MSCs als somatische Zelltherapeutika sind zahlreiche Assays etabliert. Nachweis der Vitalität, Proliferation und des Differenzierungspotentials, die detaillierte durchflusszytometrische Charakterisierung von Oberflächenmarkern, Nachweis des Seneszenzverhaltens und Nachweis des Adhäsions-

und Migrationsverhaltens der MSCs. Dieser letzte Aspekt ist relevant, um das Homing und den Verbleib und die anschließende Differenzierung der therapeutisch applizierten Zellen beurteilen und gegebenenfalls modifizieren zu können. Autologe Zellen lassen sich im Gewebe nicht identifizieren, es sei denn, sie wurden vor der Applikation markiert. Um das Migrations- und Homingverhalten in vivo nicht invasiv nachvollziehen zu können, können MSCs mit Partikeln markiert und mittels Kernspintomographie detektiert werden (30). Als duale Reporter können sie neben einem Eisenoxidpartikel auch Fluoreszenz-markiert sein, um eine Analyse über Durchflusszytometrie oder Laser-Scanning Mikroskopie zu ermöglichen. Bei Verwendung von eisenhaltigen Nanopartikeln müssen die Auswirkungen der Nanopartikel auf die Funktion der MSCs kritisch geprüft werden.

Auch in den kommenden Jahren werden Zelltherapeutika im Rahmen der Grundlagenforschung und basierend darauf in der klinischen Anwendung evaluiert. Es wird Aufgabe und Herausforderung für die Blutspendedienste sein, diese Entwicklung aktiv mitzugestalten.



Die Literaturhinweise finden Sie im Internet zum Download unter: www.drk-haemotherapie.de