

» Zelltherapie mit Granulozyten, Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen

4

Prof. Dr. med. Hubert Schrezenmeier

Dr. med. Markus Wiesneth

Dr. med. Peter Reinhardt

Institut für Klinische Transfusionsmedizin
und Immungenetik Ulm und
Abteilung Transfusionsmedizin,
Universitätsklinikum Ulm

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg-Hessen gGmbH

Helmholtzstraße 10
D-89081 Ulm

h.schrezenmeier@blutspende.de

m.wiesneth@blutspende.de

p.reinhardt@blutspende.de

Dr. med. Torsten Tonn

Prof. Dr. med. Erhard Seifried

Institut für Transfusionsmedizin
und Immunhämatologie

Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-
Universität Frankfurt am Main

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg – Hessen gGmbH

Sandhofstraße 1
D-60528 Frankfurt

ttonn@bsdhessen.de

e.seifried@blutspende.de

Gewinnung, Eigenschaften und Klinische Anwendung

Einleitung

In vorhergehenden Ausgaben der **hämotherapie** wurde ausführlich die somatische Zelltherapie beschrieben. Der Schwerpunkt lag auf den Stammzellen der Hämatopoiese und anderen Stammzellarten zum therapeutischen Einsatz in der hämatopoietischen Stammzelltransplantation und zum regenerativen Gewebeersatz. Aber auch reife, ausdifferenzierte Zelltypen, die aus dem peripheren Blut durch Zytapherese gewonnen werden können, spielen eine immer wichtigere Rolle in der Therapie maligner Erkrankungen und schwerer Infektionen bei immunkompromittierten Patienten. Dieser Beitrag beschäftigt sich deshalb mit Granulozyten-Transfusionen, welche in den letzten Jahren durch G-CSF eine Renaissance erleben, Spender-Lymphozyten-Infusionen, welche zunehmend Bedeutung in komplexen Stammzelltransplantations-Verfahren erlangen, und natürlichen Killerzellen, welche noch ein großes Entwicklungspotential für innovative Therapieansätze besitzen.

Granulozytentransfusionen

Funktion neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind wesentliche Träger der Abwehr von Bakterien- und Pilzinfektionen. Die Lebensdauer neutrophiler Granulozyten ist kurz: Nach einer Entwicklungszeit von 5-7 Tagen im Knochenmark, befinden sie sich etwa 7 Stunden in Zirkulation im peripheren Blut und wandern dann ins Gewebe und auf Schleimhautoberflächen aus. Dort überleben sie noch etwa 3 Tage in ihrer Funk-

tion zur Infektabwehr. Die tägliche Neuproduktion bei Erwachsenen beträgt etwa 10^{11} neutrophile Granulozyten und kann bei Infektionen auf 10^{12} pro Tag steigen. Der Blutpool entspricht mit ca. 5×10^{10} Zellen etwa 50 % der normalen Tagesproduktion.

Granulozyten wandern durch Chemotaxis an den Ort von Entzündungen und Infektionen. Hierfür ist eine komplexe Interaktion zwischen Oberflächenrezeptoren der Granulozyten und Gefäßendothelien erforderlich, um die Adhäsion, das „Rolling“ und schließlich die Diapedese ins Gewebe

zu vermitteln. Durch spezifische Interaktionen können die Granulozyten Partikel binden und phagozytieren. Die Phagozytose von Bakterien wird durch Opsonisation (z. B. Bindung von Antikörpern oder Komplementfaktoren an die Bakterien) verbessert. Die phagozytierten Organismen werden durch nicht-oxidative Mechanismen (Enzyme wie z. B. Elastase, Proteinase 3, Cathepsine, saure Phosphatase u. a.) oder oxidative Mechanismen (z. B. Bildung freier Sauerstoff-Radikale) abgetötet. Durch Sekretion von Zytokinen (Interleukin-8 [IL-8], IL-1, IL-6, Tumor-Nekrose-Faktor) aktivieren die Granulozyten weitere an der Entzündungsreaktion beteiligte Zellen (z. B. Makrophagen). Für einen therapeutischen Effekt transfundierter Granulozyten ist es zwingend, dass diese komplexen Funktionen der Granulozyten von der Chemotaxis über Phagozytose bis hin zu den oxidativen und nicht-oxidativen mikro-bioziden Mechanismen intakt bleiben.

Entwicklung der Granulozytentransfusion

Die Idee einer Granulozyten-Therapie bei neutropenischen Patienten wurde schon seit den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts in

verschiedenen Ansätzen verfolgt. In den 60er Jahren wurden erste systematische Studien zur Leukozytentransfusion bei neutropenischen Patienten durchgeführt. Die Indikation einer Granulozytentransfusion ergibt sich besonders bei Patienten mit schwerer Neutropenie und lebensbedrohlichen Infektionen nach allogener Stammzelltransplantation oder nach intensiver Chemotherapie wie bei akuten Leukämien. Trotz Therapie mit Antibiotika, Antimykotika und hämatopoetischen Wachstumsfaktoren sind Infektionen in der Neutropenephase für etwa 40 % der Todesfälle bei diesen Patienten verantwortlich.

Allerdings enthielten die bis Ende der 80er Jahre verfügbaren Granulozytenpräparate nur etwa $2-3 \times 10^{10}$ Zellen. Die transfundierten, markierten Zellen konnten auf den Schleimhautoberflächen, z. B. im Mund, nachgewiesen werden, führten jedoch kaum zu einem signifikanten Anstieg im peripheren Blut (1). Um die Zahl zirkulierender Granulozyten zumindest passager in den Normbereich anzuheben, sind mindestens $4-6 \times 10^{10}$ Granulozyten erforderlich. Erst durch verbesserte Vorbehandlung der Spender mit rekombinantem Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF) und Weiterent-

wicklungen in der Apheresetechnik konnte das Blutprodukt Granulozytenkonzentrat entscheidend verbessert werden, so dass nun Dosierungen erreichbar sind, die beim Empfänger zu einem relevanten Anstieg der Granulozytenzahl auf $>500/\mu\text{l}$ führen und einen klinischen Effekt erwarten lassen (2).

Granulozytapherese: Vorbehandlung des Spenders und Durchführung der Apherese

Nur von Spendern mit einer durch Vorbehandlung induzierten neutrophilen Leukozytose kann mit einer Granulozytapherese eine therapeutisch ausreichende Dosis von Granulozyten gewonnen werden. Zur Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten wird derzeit G-CSF alleine oder in Kombination mit Corticosteroiden (z. B. Dexamethason) eingesetzt. Die bis in die 90er Jahre noch übliche alleinige Gabe von Corticosteroiden ist inzwischen obsolet, da die hiermit induzierbare Granulozytose des Spenders meist nicht ausreicht, um ein Präparat mit der angestrebten Zieldosis zu erhalten (Abbildung 1). In randomisierten Studien wurde gezeigt, dass durch die Gabe von 5-10 μg G-CSF pro kg KG (alleine oder in Kombination mit Corticos-

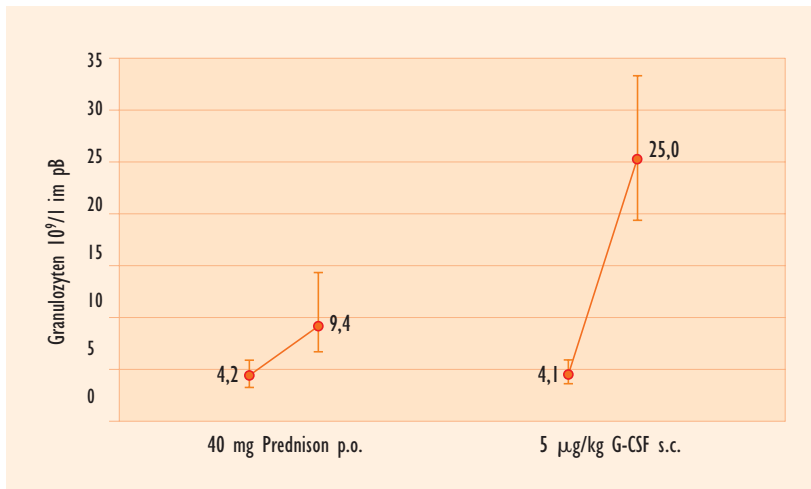


Abbildung 1

Granulozytenzahl im peripheren Blut (pB) von Spendern vor Granulozytenmobilisierung und 12 Stunden nach Vorbehandlung mit Prednison (40 mg) oder G-CSF (5 µg/kg).

(Daten: Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik Ulm)

teroiden) etwa 12 Stunden vor der Apherese Präparate mit einem Granulozytengehalt von $5-7 \times 10^{10}$ Zellen hergestellt werden können (**Tabelle 1**). Die maximal erreichbare Granulozytenzahl ist mit 5 µg/kg G-CSF nicht wesentlich niedriger als mit 10 µg/kg G-CSF (**3**). In einer Vergleichsstudie wurde eine äquivalente Mobilisierung mit entweder 3 µg/kg glycosyliertem G-CSF plus Dexamethason (8 mg) oder hochdosiertem glycosyliertem G-CSF mit 12 µg/kg erreicht (**4**). Zur besseren Separation der Granulozyten von den Erythrozyten und somit Reduktion der Erythrozytenkontamination des Präparates wird bei der Aphe-

rese Hydroxyethylstärke (HES) zugegeben. Hochmolekulare HES führt dabei zu einer deutlich effizienteren Separation und Sedimentation der Erythrozyten als niedermolekulare HES (**5**) (**Tabelle 1**).

Nach den Hämotherapie-Richtlinien der Bundesärztekammer sind pro Jahr 4 Granulozytapheresen erlaubt, wenn Sedimentationsbe-

schleuniger eingesetzt werden (**6**). Die Durchführung an aufeinander folgenden Tagen ist möglich. Ohne Sedimentationsbeschleuniger richtet sich die Spendefrequenz nach dem Erythrozytenverlust, welcher das Erythrozytenvolumen einer Vollblutspende nicht überschreiten sollte (**6**).

Es wird eine Zieldosis von mindestens 2×10^8 Granulozyten/kg Empfängergewicht bei Erwachsenen und 1×10^9 Granulozyten/kg Empfängergewicht bei Neugeborenen angestrebt (Vamvakas et al., 1996) (**7, 8**). Der durchschnittliche Zellgehalt und das Volumen von Granulozytenpräparaten, welche nach 5 µg/kg G-CSF-Vorbehandlung der Spender mit nieder- und hochmolekularem HES gewonnen wurden, sind in **Tabelle 1** dargestellt.

Tabelle 1

Zellgehalt und Volumen von Granulozytenkonzentraten gewonnen von G-CSF-vorbehandelten Spendern (5 µg/kg KG) mit dem COBE Spectra Zellseparator und unterschiedlichen Sedimentationsbeschleunigern (Hydroxyethylstärke; HES)

(Daten: Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik Ulm)

HES 200.000 (n = 27)

$5,0 \pm 1,2 \times 10^{10}$	Leukozyten \cong 50% Tagesumsatz
$4,0 \pm 1,1 \times 10^{10}$	Granulozyten ($81 \pm 5\%$)
$1,1 \pm 0,4 \times 10^{11}$	Thrombozyten
44 ± 17 ml	Erythrozyten
252 ± 29 ml	Plasma

HES 400.000 (n = 25)

$7,5 \pm 2,6 \times 10^{10}$	Leukozyten
$5,8 \pm 2,0 \times 10^{10}$	Granulozyten ($79 \pm 3\%$)
$1,6 \pm 0,4 \times 10^{11}$	Thrombozyten
26 ± 12 ml	Erythrozyten
350 ± 82 ml	Plasma verteilt auf 2 Portionen

Bei repetitiven täglichen Gaben von G-CSF (5 µg/kg, 12 Stunden vor Apherese) über 5 Tage und täglichen Granulozytapheresen konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Gesamtleukozytenzahl sowie der Granulozytenausbeute verzeichnet werden ($4,9 \times 10^{10}$ Granulozyten im Apheresat am Tag 1 und $6,7 \times 10^{10}$ am Tag 5) (9).

Granulozyten sollten von Anti-CMV negativen Spendern gewonnen werden, da auch bei gesunden positiven Spendern in einem Teil der Leukozyten Cytomegalieviren nachweisbar sind und somit für die meist immunkompromittierten Empfänger ein hohes Risiko einer Infektionsübertragung besteht (10). Die Notwendigkeit einer ausschließlichen Gewinnung der Granulozytenkonzentrate von CMV-negativen Spendern wird in einer neueren Studie hinterfragt (11, 12). Die Empfängersituation und die hohe Kontamination mit Lymphozyten erfordern grundsätzlich eine Bestrahlung der Granulozytenpräparate mit 30 Gy zur Prophylaxe einer transfusionsassoziierten Spender-gegen-Wirt-Reaktion (6).

Die Kryokonservierung von Granulozyten mit ausreichender Viabilität nach Auftauen ist mit den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden nicht möglich. Es wird

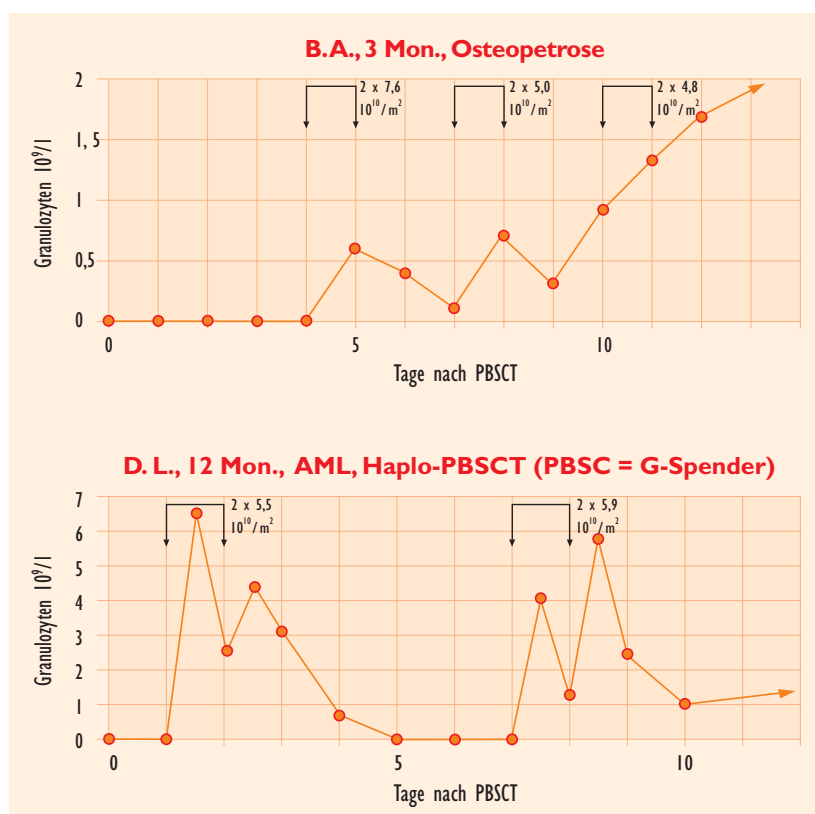


Abbildung 2

Verlauf der Granulozytenzahl im peripheren Blut bei einem Patienten mit Osteopetrose (oben) und AML (unten), welche in Neutropenie nach allogener peripherer Blutstammzelltransplantation (PBSCT) Transfusion von „Split“-Granulozytenpräparaten (□) aus jeweils einer Granulozytapherese erhielten.

empfohlen, Granulozytenpräparate unmittelbar nach Herstellung und Freigabe zu transfundieren. Die Hämotherapie-Richtlinien geben eine Lagerungsdauer von maximal 24 Stunden an (6). Neuere Daten zeigen jedoch, dass eine Lagerung der Präparate von G-CSF +/- Dexamethason-vorbehandelten Spendern bei Temperaturen von $+22 \pm 2$ °C bis 48 h möglich ist, ohne dass die Granulozytenzahl im Präparat signifikant abnimmt (13). Auch das nach Transfusion erreichbare Inkrement der Granulozyten fällt bei bis zu 24 Stunden gelagerten Präparaten nicht geringer aus, so dass insbesondere für

pädiatrische Patienten Doppelpräparate zur „Split-Transfusion“ möglich sind (Abbildung 2). Für die verbesserte Lagerfähigkeit der Granulozyten ist möglicherweise die G-CSF-Vorbehandlung entscheidend, da G-CSF die Apoptose in Granulozyten hemmt. Allerdings kommt es bei Präparaten mit hoher Zellzahl bei zunehmender Lagerungsdauer zu einem deutlichen Abfall des pH-Wertes ($pH < 6$ nach 48 Stunden) und zu einer Zytokinfreisetzung, die zu vermehrten Transfusionsreaktionen führen könnte (14). Die Konzentration von IL-6 und TNF ändert sich bis zu einer Lagerungsdauer von 48 Stun-



den nicht (13, 15). Dagegen kommt es während der Lagerung zu einem Anstieg der IL-1 β - und vor allem der IL-8-Konzentration (15). Da IL-8 zahlreiche Granulozytenfunktionen (Chemotaxis, Exozytose, „Respiratory burst“) stimuliert, könnte diese Veränderung auch von Vorteil sein. Die Lagerung muss bei $+22 \pm 2$ °C ohne Agitation erfolgen, da Kälte Adhäsionsmoleküle aktiviert und eine Spontanaggregation der Granulozyten fördert. Kältegelagerte Granulozytenkonzentrate zeigen eine geringere Chemotaxis, höhere Adhäsion an Endothel, geringere Wiederfindungsraten in der Zirkulation nach Transfusion und geringere Migration in-vivo (16, 17). **Abbildung 3** zeigt beispielhaft Viabilität und Wiederfindung von kernhaltigen Zellen in einem Granulozytapherese-Präparat nach 24-stündiger Lagerung.

Unerwünschte Wirkungen bei Vorbehandlung der Granulozytenspender

Die Vorbehandlung mit G-CSF wird von den Spendern in der Dosis von 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ meistens gut toleriert. Es kann zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen des G-CSF mit Knochen- und Kopfschmerzen kommen, insbesondere wenn G-

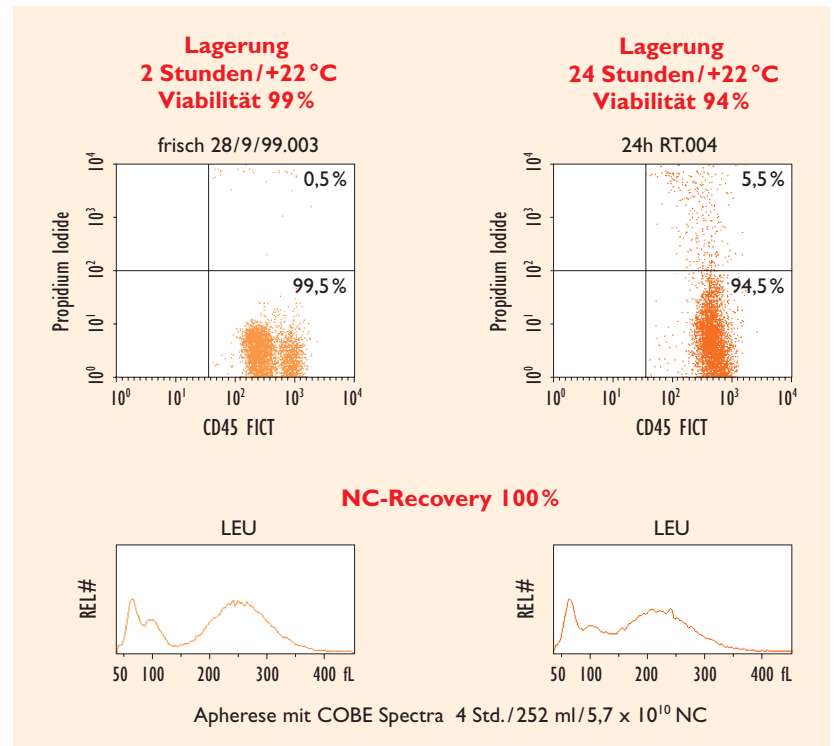


Abbildung 3

Viabilität (gemessen mit Propidium-Iodid-Färbung in Verbindung mit Doppelmarkierung mit CD45) und Wiederfindung kernhaltiger Zellen in Granulozytenkonzentraten nach 2 und 24 Stunden Lagerung bei $+22$ °C ohne Agitation.

CSF wegen konsekutiven Apherese über mehrere Tage fortgesetzt wird (18). Bei höherer Dosis von G-CSF (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) bestand in einer klinischen Studie ein Trend zu häufigerer und stärkerer Myalgie sowie Arthralgie (3) (ausführlichere Darstellung der G-CSF-Nebenwirkungen im Beitrag „Hämatopoetische Stammzelltransplantation“, hämotherapie 3/2004) (19).

Der Zusatz von HES bei der Apherese kann Juckreiz verursachen. Diese dosisabhängige Nebenwirkung ist einer der Gründe für die Beschränkung der maximal zulässigen Zahl von 4 Granulozytapheresen pro Jahr bei Einsatz von Sedimentationsbeschleunigern (6).

In einer multizentrischen Studie der DGTI erklärten 85 % der 183 befragten Spendern, dass sie erneut Granulozyten spenden würden (18). Nachuntersuchungen (2-4 Wochen und 2 Jahre nach Granulozytapherese) erbrachten keinen Hinweis auf späte, G-CSF-bedingte, unerwünschte Wirkungen (18).

Unerwünschte Wirkungen bei Anwendung der Granulozytenkonzentrate

Die Verträglichkeit von Granulozytentransfusionen war in neueren Studien sehr gut. Etwa 75-80 % der Empfänger zeigten auch bei



mehreren Transfusionen keine unerwünschten Wirkungen. Eine routinemäßige Prämedikation wird daher nicht empfohlen. Bei den unerwünschten Wirkungen handelte es sich vor allem um Fieber, Schüttelfrost und Exanthem, deren Inzidenz und Schweregrad durch langsame Transfusionsgeschwindigkeit (1×10^{10} Granulozyten pro Stunde) reduziert werden kann. Pulmonale Komplikationen waren dagegen selten, wurden in früheren Jahren jedoch insbesondere in Kombination mit Amphotericin B beschrieben (20).

Ursache für die niedrigere Nebenwirkungsrate könnte die veränderte Expression von Membranglykoproteinen auf Granulozyten von G-CSF vorbehandelten Spendern sein. Die G-CSF-Mobilisation scheint die klinische Wirksamkeit durch Steigerung der Chemotaxis, Phagozytose und Bakterizidie zu verbessern, die Halbwertszeit der Granulozyten zu verdoppeln und die Alloimmunisierungsrate nach Granulozytentransfusion zu senken (21). Insbesondere die L-Selektin Expression ist durch die G-CSF-Vorbehandlung deutlich vermindert (22).

Eine Alloimmunisierung tritt bei etwa 25 % der Patienten auf, wenn Granulozytentransfusionen nach starker Immunsuppression

gegeben wurden (z. B. Stammzelltransplantation, intensive Chemotherapie). Etwa ein Viertel dieser Patienten entwickelte Anti-HLA-Antikörper und/oder Antikörper gegen humane neutrophile Antigene (HNA) (18). Höhere Alloimmunisierungsraten mit bis zu 78 % wurden bei Patienten mit aplastischer Anämie oder kongenitalen Granulozytenfunktionsdefekten (chronische Granulomatose) berichtet (23). Neben der ABO- und Rhesus-Kompatibilität wegen des relevanten Erythrozytenanteils der Präparate sollte deshalb bei Granulozytentransfusionen zusätzlich eine HLA-Kompatibilität angestrebt und zumindest bei Transfusionsreaktionen eine Granulozytenkreuzprobe mit Agglutinations- (GAT) oder Immunfluoreszenztest (GIFT) erfolgen.

Klinische Wirkung der Granulozytentransfusion

Strauss hat 1995 insgesamt 32 Studien mit Granulozytentransfusionen bei neutropenischen Patienten analysiert. 62 % der Patienten mit bakterieller Sepsis und 83 % der Patienten mit lokalisierten bakteriellen Infektionen haben auf die Therapie angesprochen. Allerdings fand sich bei 71 % der Patienten mit invasiven Pilzinfektionen

kein Erfolg. Diese früheren Berichte bezogen sich jedoch vielfach auf kleine Fallzahlen mit Heterogenität in Bezug auf Grunderkrankung und begleitender antimikrobieller Therapie. Vor allem aber lag die Granulozytenzahl weit unter den heute geforderten Zellzahlen.

Durch mehrere Studien ist belegt, dass durch die Transfusion ausreichend hoher Granulozytenzahlen (Empfehlung $> 2 \times 10^8$ /kg KG) ein vorübergehender Anstieg der Granulozytenzahl in den Normbereich erreicht werden kann (24). Dies führte in den neueren Studien zu vielversprechenden Ergebnissen, auch bei Patienten mit langdauernder Neutropenie und schweren bakteriellen Infektionen oder Pilzinfektionen, die unter anti-infektöser Therapie progredient waren. Trotz dieser ungünstigen Ausgangsbedingungen wurden durch Granulozytentransfusionen bei diesen Patienten Ansprechraten von 40 bis 70 % erreicht (siehe Tabelle 2) (24-32).

Indikationen für Granulozytentransfusionen

Aufgrund der kleinen Fallzahlen und fehlender Vergleichsgruppen in den Studien kann die Wertigkeit der Granulozytentransfusion der-



zeit nicht definitiv beurteilt werden. Es besteht in der Literatur Konsens, dass eine Indikation in folgenden Situationen gegeben sein kann:

1. Therapeutische Granulozytentransfusion bei Patienten mit

- › lebensbedrohlichen Infektionen (pulmonale Infiltrate, Weichteilinfektionen wie nekrotisierende Fasziiitis, neutropenische Typhlitis, gramnegative Sepsis) und
- › Resistenz auf anti-mikrobielle Therapie und
- › schwerer Neutropenie ($< 0.2 - 0.5 \times 10^9/\mu\text{l}$) und
- › voraussichtlich weiterer Neutropenie-Dauer von zumindest 5 Tagen.

(24-32)

2. Prophylaktische Granulozytentransfusion bei Patienten mit

- › invasiver pulmonaler Äsper-

gillose in der Anamnese und
› erneuter intensiver Therapie (Hochdosis-Chemotherapie; Stammzelltransplantation) mit schwerer Neutropenie von mindestens 10 Tagen.

(33)

Eine besondere Situation ist die neonatale Sepsis. Auch hier sind die Daten insgesamt aufgrund kleiner Fallzahlen inkonklusiv, aber einzelne Berichte sprechen für einen Vorteil von Granulozytentransfusion im Vergleich zur Immunglobulin-Therapie (31).

Auch bei der seltenen septischen Granulomatose, einer angeborenen Störung der Sauerstoffradikalbildung in den Granulozyten, wurde beschrieben, dass durch Granulozytentransfusionen schwere infektiöse Komplikationen be-

herrscht werden konnten (34) (siehe auch Abbildung 4).

Ausblick

Die G-CSF-Mobilisation der Granulozytenspender hat zu einer quantitativen und qualitativen Verbesserung der Granulozytentransfusion geführt. Die neueren klinischen Daten sind deshalb vielversprechend und weisen darauf hin, dass die Granulozytendosis ein wichtiger Faktor für die Wirksamkeit von Granulozytentransfusionen ist. Es fehlen allerdings prospektive randomisierte Studien mit großer Fallzahl, um die Indikation und die optimale Granulozytengabe zu definieren. In klinischen Studien muss die Wirksamkeit bei verschiedenen Indikationen (prophylaktische/therapeutische

Patienten (Anzahl)	Granulozytentransfusionen (Anzahl)	Granulozyten pro Transfusion	Ansprechen (n/n Patienten)	Literatur
30	301	$0,5 \times 10^9/\text{kg KG}$	21/30 Überleben 19/30 Kontrolle der Infektion	Peters et al., 1999
19	165	$82 \pm 2,3 \times 10^9^*$	8/11 Besserung der invasiven bakteriellen Infektion oder Pilzinfektion	Price et al., 2000
13	70	$31 \times 10^9^{**}$	9/15 Infektionsepisoden Besserung oder Überwindung der Infektion	Cesaro et al., 2001
25	55	$66 \times 10^9^{***}$	10/25 Insgesamt Besserung der 4/16 bakteriellen Infektion 6/9 Pilzinfektionen	Lee et al., 2001
32	120	$82 \times 10^9^{***}$	19/32 Ansprechen der Infektion	Lee et al., 2004

* Mittelwert +/- Standardabweichung ** Leukozytenzahl (mit ca. 90-95 % Granulozyten); Median *** Mittelwert



vor



nach



◀ **Abbildung 4**
Leberabszesse vor und nach Granulozytentransfusionen bei einem Patienten mit septischer Granulomatose

Lymphozyten des Stammzellspenders für den Transplantatempfänger, spielen in der modernen Stammzelltransplantationsmedizin hämato-/onkologischer Patienten eine zunehmend wichtigere Rolle. Spenderlymphozyteninfusionen können eine effektive Transplantat-gegen-Leukämie bzw. Tumor („graft-versus-leukemia“; GvL) Reaktion vermitteln, die zu einer lang anhaltenden Vollremission führt, aber auch eine Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion („graft-versus-host disease“; GvHD) hervorrufen.

1990 berichteten Kolb et al. (36) erstmalig über die klinische Anwendung von DLI zur Behandlung von Rezidiven der chronischen myeloischen Leukämie (CML) nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation. Seitdem sind Spenderlymphozyten fester Bestandteil vieler allogener hämatopoetischer Progenitorzell-Transplantationsprotokolle (37, 38). In den letzten Jahren sind Therapiekonzepte mit reduzierter, nicht myeloablativer Konditionierung des Patienten entwickelt worden, welche vor allem auf einer Immunsuppression des Empfängers basieren, ohne residuelle Tumorzellen zwingend beseitigen zu wollen (39). Durch dieses Konzept wird eine lang dauernde Aplasie vermieden, die Rekonstitution der Hämatopoese er-

leichtert und die Eradikation der restlichen malignen Zellen den transplantierten oder in Form von Spenderlymphozyteninfusionen applizierten Lymphozyten überlassen. Die damit verbundene Risikoreduktion macht die allogene Stammzelltransplantation inzwischen auch für ältere Patienten zugänglich.

Spenderlymphozyten: Gewinnung durch Vollblutspende oder Apherese

Grundsätzlich bestehen zwei Möglichkeiten Spenderlymphozyten zu gewinnen:

1. durch Isolation der in einer Vollblutspende (500 ml) enthaltenen Leukozyten (Buffy coat) oder
2. durch eine selektive Anreicherung mononuklearer Leukozyten aus dem zirkulierenden Blut durch eine Leukozytapherese.

Der Vorteil der Vollblutspende liegt in der Einfachheit der Entnahme und dem geringen Aufwand und Spenderrisiko. Allerdings ist die Menge der therapeutisch verfügbaren Lymphozyten bei diesem Entnahmemodus sehr begrenzt, da technisch bedingt nur ca. 60 %

Gabe; Bakterien- / Pilzinfektionen) weiter evaluiert werden. Wichtig ist dabei auch, prädiktive Faktoren für das Ansprechen auf die Therapie zu entwickeln. Die kürzlich berichtete Beobachtung, dass die szintigraphisch nachgewiesene Anreicherung von 99mTc-HMPAO-markierten Granulozyten in Pilzinfektionsherden mit dem Ansprechen korreliert, bietet hierzu einen interessanten Ansatz (35).

Spenderlymphozyteninfusion

Entwicklung der Spenderlymphozyten-Therapie

Spenderlymphozyten („Donor Lymphocyte Infusions“; DLI), i. e.



der in den 500 ml Vollblut vorhandenen Leukozyten separiert werden können. Wegen der großen Menge an Granulozyten und Erythrozyten im Buffy coat ist zur Herstellung eines Lymphozytenkonzentrates ein weiterer Aufreinigungsschritt (z. B. mit einem Dichtegradienten) erforderlich, der in einem GMP-gerechten Reinraum durchgeführt werden muss. Aus 500 ml Vollblut eines Spenders mit Leukozyten von z. B. 5 G/l und 30 % Lymphozyten können etwa $1-2 \times 10^8$ CD3⁺ T-Zellen gewonnen werden. Für DLI-Therapieansätze mit Dosis-escalation ist diese Menge bei Erwachsenen unzureichend.

Bei der Leukozytapherese kann direkt eine angereicherte Lymphozytenpopulation aus dem zirkulierenden Blut des Spenders entnommen werden (**Abbildung 5 und 6**). Hierbei wird etwa das 1,5-2fache des Gesamtblutvolumens des Spenders über einen geeigneten Zellseparator prozessiert, so dass nach ca. 180 Minuten ein GMP-gerecht hergestelltes Präparat mit 0,5 bis $1,5 \times 10^{10}$ Leukozyten vorliegt. Bei adäquater Einstellung des Verfahrens enthält ein solches Präparat (**Abbildung 7**) zwischen 50-65 % CD3⁺ T-Lymphozyten, etwa 10-13 % CD19⁺ B-Lymphozyten, ca. 8-12 % CD56⁺ NK-Zellen, 10-25 % Monozyten und nur 1-4 %

Granulozyten sowie einen Erythrozytenanteil von 0,2-2 % HK (**Abbildung 8**).

Bei diesen Präparaten ist ohne weitere Manipulation direkt eine therapiegerechte Portionierung

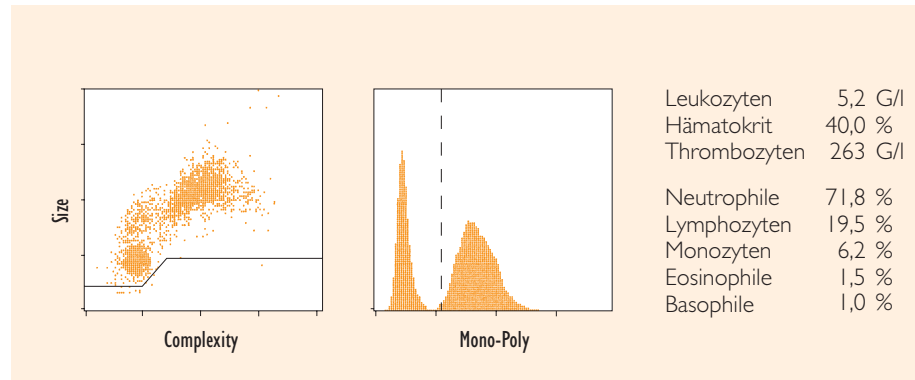


Abbildung 5 ^

Blutbild eines gesunden Lymphozytenspenders vor Apherese

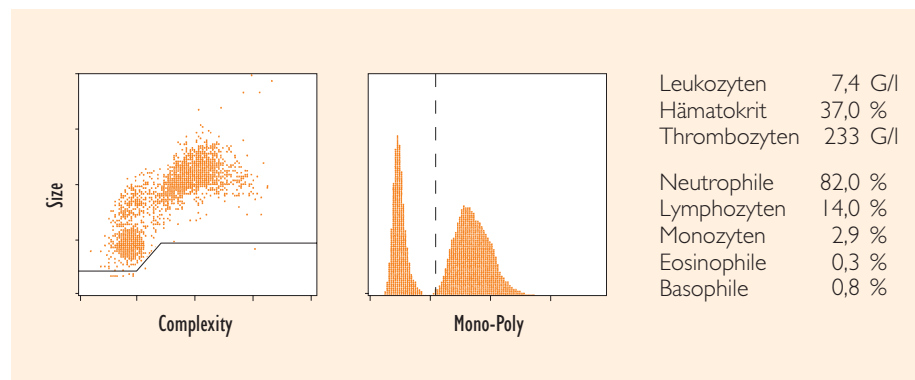


Abbildung 6 ^

Blutbild des selben Lymphozytenspenders nach Apherese

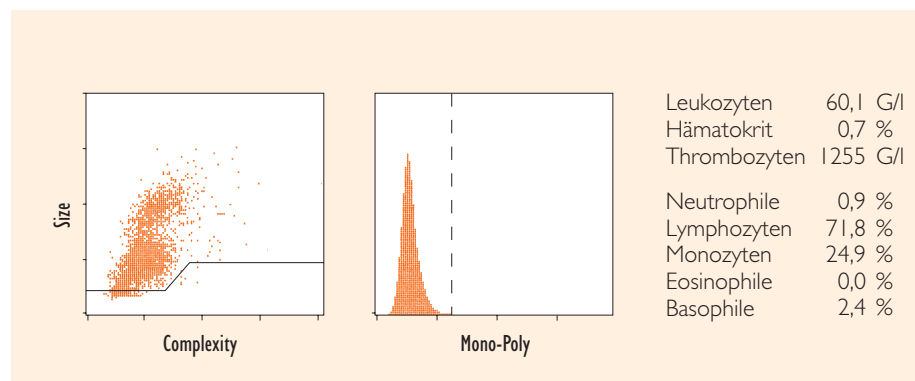


Abbildung 7 ^

Histogramm und zelluläre Zusammensetzung des DL-Apheresepräparates des selben Zellspenders. Auffällig ist die fast reine mononukleare Population im rechten Histogramm bei nahezu vollständiger Abreicherung granulozytärer Zellen im Vergleich zu den Blutbildern in **Abbildung 4 und 5**.



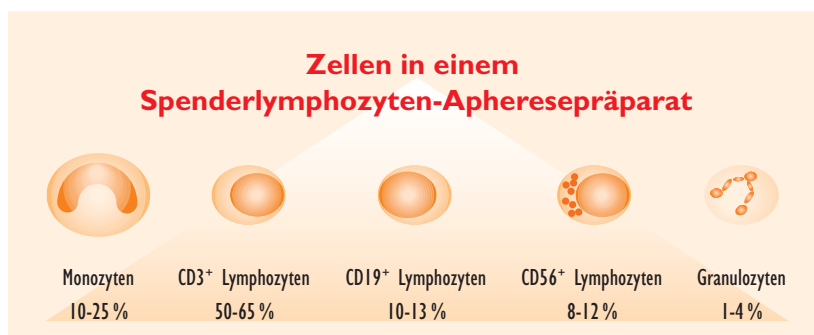
Abbildung 8 >

Zelluläre Zusammensetzung von DL-Apheresepräparaten

und Kryokonservierung möglich, es sei denn, dass Lymphozyten-Subpopulationen mit z. B. Immunmagnetverfahren an- oder abgereichert werden sollen. Dank des geringen Granulozytengehaltes liegt die Viabilität solcher Präparate nach Kryokonservierung zwischen 89 und 97 % bei einer Wiederfindungsrate von 92 bis 97 %. Ein DLI-Apheresepräparat deckt meist vollständig den Bedarf einer kompletten Spenderlymphozyten-therapie ab, die oftmals in halblogarithmischen Schritten eskalierend von 1×10^6 bis 1×10^8 CD3⁺ T-Zellen/kg KG des Empfängers geplant ist.

Unerwünschte Wirkungen beim Lymphozytenspender

Inzwischen werden über 70 % der Spenden allogener hämatopoietischer Stammzellen durch Apheresen und nicht durch Knochenmarkentnahmen gewonnen. Die meisten DLI-Spender kennen somit das Verfahren der Zytapherese bereits aus eigener Erfahrung. Eine G-CSF Mobilisation wie bei der Stammzellspende ist nicht erforderlich, so dass die Spenderisiken denen anderer unstimulierter Apheresen wie z. B. der Thrombozytapherese entsprechen und sich



vorwiegend auf zitratrelevante, passagere Elektrolytverschiebungen und den Lymphozytenverlust begrenzen. Bis auf eine leichte Reduktion der Thrombozyten um ca. 20 % entspricht das Blutbild nach Apherese weitestgehend dem Ausgangsbefund (**Abbildung 5 und 6**), obwohl ca. 8×10^9 Lymphozyten bei einer DLI-Apherese entnommen werden. Bei einem hypothetischen Gesamtblutvolumen eines Spenders von 5 l, Leukozyten von 5 G/l und 30 % Lymphozyten entsprechen 8×10^9 Lymphozyten etwa 107 % der zirkulierenden Lymphozytenmenge und bedeuten somit ein vollständiges Abschöpfen aller zirkulierenden Lymphozyten. Nach der Apherese sind die Absolutwerte für Leukozyten jedoch praktisch unverändert und auch die relativen Werte im Differentialblutbild zeigen bis auf eine geringe Reduktion der Lymphozyten von 2 bis 5 % keine Veränderungen. Es ist also anzunehmen, dass im Rahmen eines physiologischen Fließgleichgewichts, die entnommenen zirkulierenden Lymphozyten durch Rezirkulation aus Lymphknoten und

Milz ersetzt werden. Es gibt bisher klinisch keine Hinweise auf eine kurzfristige oder chronische Beeinträchtigung der Immunität des Lymphozytenspenders. Allerdings liegen bislang auch keine systematischen Untersuchungen zu potentiellen Verschiebungen innerhalb der Lymphozytenpopulationen nach Lymphozytapherese und deren Reaktionsspektrum auf unterschiedliche Stimuli vor. Deshalb sollten Lymphozytapheresespenden vorerst nur einmal bzw. nur nach langen, klinisch unauffälligen Intervallen erfolgen. Entsprechende umfassende klinische und labortechnische Untersuchungen des Spenders zum Schutz des Spenders als auch des Empfängers sind Voraussetzung.

Unerwünschte Wirkungen bei der Anwendung der Spenderlymphozyten

Bei dem GvL-Effekt handelt es sich um eine zytotoxische, durch Spenderlymphozyten vermittelte



Reaktion gegen residuelle Empfänger-Tumorzellen. Der Unterschied zur GvHD liegt lediglich in der Zielzelle. Ein GvL-Effekt ist zwar nicht zwingend mit einer GvHD verbunden, dennoch ist bei der Gabe von Spenderlymphozyten mit einer begleitenden GvHD zu rechnen. Der Schweregrad dieser unter Umständen lebensbedrohlichen unerwünschten Wirkung hängt sowohl von der Menge infundierter T-Zellen, vor allem der CD8-positiven T-Zellen, als auch von der Anzahl und Ausprägung der HLA-Inkompatibilitäten zwischen Spender und Empfänger ab.

Die Wahrscheinlichkeit eine GvHD zu entwickeln ist bei einem HLA-identen Familienspender geringer als bei HLA-identen Fremdspendern oder Spendern mit HLA-Inkompatibilitäten. Um eine schwere GvHD, die mit einer hohen Mortalität assoziiert ist, zu vermeiden, werden bei Spenderlymphozytengaben je nach Risiko langsam eskalierende Dosierungen von 1×10^5 bis 1×10^8 Lymphozyten pro kg Empfängergewicht appliziert. Bei ausgeprägten HLA-Inkompatibilitäten kann als GvHD-Prophylaxe ggf. auch eine CD8-Depletion der Präparate durchgeführt werden, ohne dass der GvL-Effekt verloren geht (40).

Klinische Wirkung der Spenderlymphozytentherapie

Die größten Erfolge mit DLI wurden bisher in der Behandlung von allogenen transplantierten CML-Patienten erzielt. Hierbei ließen sich bei beginnenden Rezidiven in 60 bis 80 % der Fälle Vollremissionen erreichen (41). Auch bei akuter myeloischer Leukämie, multiplem Myelom, malignem Lymphom, Nierenzellkarzinomen und Brustkrebs zeigen DLI eine Erfolgsrate von ca. 30 bis 40 % (42). Ein deutlich schlechteres Ansprechen weisen Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie auf.

Voraussetzung für die Anwendung von DLI ist eine begleitende oder vorherige allogene Transplantation mit den Stammzellen des Lymphozytenspenders, wobei nach Angehen des Transplantats das GvHD-Risiko abnimmt. Neben der aggressiven und myeloablativen Konditionierung des Patienten, ist die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GvHD) das größte Risiko für den Empfänger einer allogenen Stammzell-Transplantation (40).

Die T-Zelledepletion des Transplantats stellt die effektivste GvHD-Prophylaxe dar, ist allerdings auf Grund des reduzierten GvL-Effektes mit einem höheren Rezidivrisi-

ko verbunden (Wiesneth/Hale). Die Möglichkeit periphere Blutstammzelltransplantate primär von T-Zellen zu reinigen (43, 70) und zu einem späteren Zeitpunkt T-Zellen des Stammzellspenders bzw. T-Zellsubpopulationen gezielt zu transfundieren, erlaubt eine gestaffelte allogene Transplantation mit Reduktion der transplantationsassoziierten Risiken und Beibehaltung des Graft-versus-Tumor-Effektes. **Abbildung 9** zeigt ein Beispiel für eine sequentielle Transplantation mit primär gemischtem Chimärismus nach Transplantation und anschließend komplettem Chimärismus im peripheren Blut nach zusätzlicher DLI-Gabe.

Indikationen für Spenderlymphozytentherapie

Indikationen für Spenderlymphozytentherapie bestehen in folgenden Situationen:

I. Therapeutische DLI bei Patienten mit

- Rezidiven maligner hämatologischer Erkrankungen nach allogener Blutstammzelltransplantation (insbesondere CML, AML, Multiples Myelom) (44, 45).
- Residuellen soliden Tumoren nach allogener

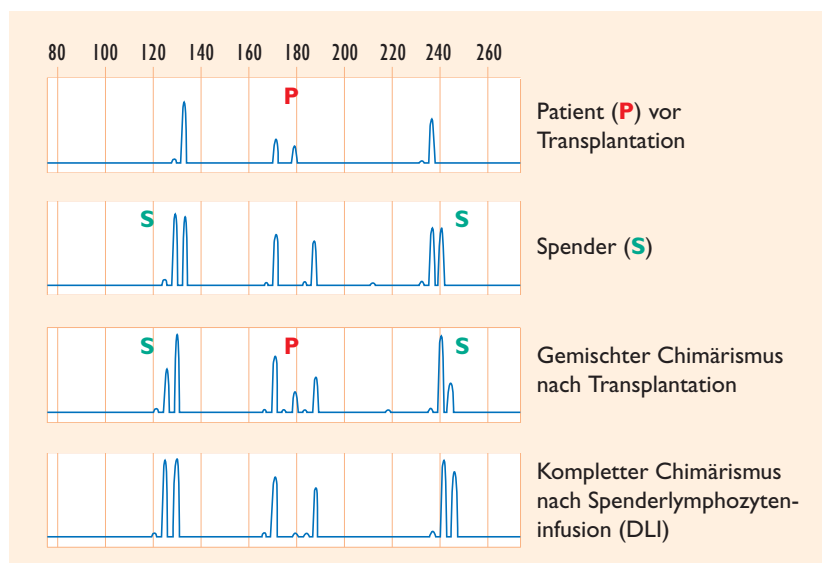


Abbildung 9 ^

Sequentielle Chimärismus-Analyse nach allogener Blutstammzelltransplantation mit reduzierter Konditionierungsintensität und anschließender Lymphozyteninfusion (DLI). Die Analyse der „Single-Tandem-Repeats“ (STR) zeigt, dass bei initialer hämatopoetischer Rekonstitution nach Transplantation sowohl Spender- als auch Empfängerzellen nachweisbar sind (gemischter Chimärismus) und erst nach DLI-Therapie ein kompletter Chimärismus mit ausschließlich spenderspezifischen STRs erreicht wurde.

Transplantation und ausgeschöpfter konventioneller Therapie (z. B. Nierenzellkarzinom; Brustkrebs) (46, 47).

2. Prophylaktische DLI bei Patienten mit

- Hohem Rezidivrisiko bei allogener Transplantation (AML, CML, Multiples Myelom (42, 48) und/oder
- Reduzierter, nicht myeloablativer Konditionierung vor allogener Transplantation

Ausblick

Spenderlymphozyten stellen bereits heute einen festen Bestandteil moderner Therapiekonzepte mit allogener Blutstammzelltransplantation dar und leisten mit ihrem

„Graft-versus-Tumor-Effekt“ und der Absicherung des Transplantats einen wesentlichen Beitrag zum verbesserten Langzeitüberleben dieser Patienten. Immunmagnetische Selektionsverfahren zur Gewinnung von Subpopulationen wie CD4⁺ T-Helferzellen, CD4⁺/CD25⁺ regulatorischen T-Zellen oder CD56⁺/CD3⁻ natürlichen Killerzellen eröffnen ein weites Anwendungsspektrum bis hin zur haploidenten Stammzelltransplantation. Eine vielversprechende Perspektive stellt die Generierung von Tumor- oder virusspezifischen Zellen, wie Anti-CMV spezifischen zytotoxischen T-Zellen oder tumorspezifischen Killerzellen dar, die in-vitro kultiviert und expandiert werden. Zellen für solche Vakzinierungsstrategien könnten von Spendern gewonnen, aber auch mit ent-

sprechenden Zellklonen über Kulturbanken hergestellt werden, wie das Beispiel der NK-Zelllinie NK-92 zeigt (siehe Abbildung 11).

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Funktion von Natürlichen Killerzellen

Das Auftreten und die Progression von malignen Erkrankungen stehen in einem direkten Zusammenhang zur Fähigkeit des körpereigenen Immunsystems Tumorzellen zu erkennen und auszuschalten. Mechanismen, die es Tumorzellen erlauben, der körpereigenen Immunabwehr durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und andere Immunzellen zu entkommen, spielen eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung und Progression maligner Erkrankungen (49, 50). NK-Zellen stellen eine Untergruppe der Lymphozyten dar und bilden als Teil des angeborenen Immunsystems die „erste Welle“ der körpereigenen Immunabwehr gegen virusinfizierte Zellen und Tumore. Ihre Zytotoxizität ist nicht MHC-restringiert und NK-Zellen vermögen ihre Zielzellen spontan und ohne vorherige Sensibilisie-



nung durch Antigen-präsentierende Zellen (APC's) zu zerstören. NK-Zellen töten die Tumorzellen vorrangig durch Freisetzung des Enzyms Perforin, welches die Zellmembran der Zielzellen zerstört und den Zelltod durch die ebenfalls von NK-Zellen freigesetzte Esterase Granzym B einleitet. Zusätzlich zu diesem direkten lytischen Effekt des Granzym/

Perforin-Systems wird eine Abtötung der Zielzellen durch Moleküle der Tumor Nekrose Faktor (TNF) Familie vermittelt, wie z. B. FAS/FASL, TRAIL und TNF-alpha (**Abbildung 10**). Die Aktivität der NK-Zelle gegenüber maligne entarteten Zielzellen hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie z. B. der Bindung der NK-Zelle an die zu lysierende Zielzelle durch Zelladhäsionsmoleküle (LFA-1/ICAM-1), der Regulation der NK-Zellaktivität durch eine Vielzahl aktivierender und inhibierender Rezeptoren (**Tabelle 3**), sowie der Sensitivität der Tumorzellen gegenüber einer Perforin und Granzym vermittelten Lyse (**51, 52**). Nach der Bindung an die Zielzelle wird die Aktivität der NK-Zellen durch ein fein abgestimmtes Gleichgewicht aktivierender und inhibierender Rezeptoren reguliert. MHC Klasse I Moleküle auf Zielzellen dienen als wichtigste Liganden für eine große Zahl inhibitorischer Rezeptoren, die auf NK-Zellen klonal exprimiert werden. Während dieser Mechanismus dazu dient, gesundes Gewebe vor einer Zerstörung durch die körpereigenen NK-Zellen zu schützen, führt eine Hochregulation bestimmter MHC Klasse I Moleküle unter Umständen dazu, dass Tumorzellen der Immunabwehr durch NK-Zellen entkommen können. So konnte z. B. für das monomorphe

HLA-G Molekül gezeigt werden, dass dessen Expression auf sonst für eine Lyse empfänglichen Zielzellen zu einer Resistenz gegenüber NK-Zellen führt (**53, 54**). Im Gegensatz dazu führt ein Mismatch im HLA-C Locus bei haploidenter Stammzelltransplantation zu einer lang anhaltenden Remission der Leukämie, was auf einen durch NK-Zellen vermittelten GvL-Effekt zurückgeführt wird (**55**).

Gewinnung und Isolation von natürlichen Killerzellen

Im Gegensatz zu Therapieansätzen mit T-Killerzellen bedürfen NK-Zellen keiner Sensibilisierung gegen spezifische Antigene durch APC's wie z. B. dendritische Zellen. Wie sich von ihrem Namen ableiten lässt, ist ihnen ihre Aktivität gegen virusinfizierte und maligne entartete Zellen „natürlich“ gegeben. Die Aktivität von NK-Zellen hängt allerdings von verschiedenen Zytokinen ab, wobei insbesondere das Interleukin-2 eine wichtige Rolle spielt (**56, 57**). In frühen klinischen Studien wurden NK-Zellen auch als Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK) bezeichnet. Dies leitet sich davon ab, dass NK-Zellen typischerweise aus dem peripheren Blut isoliert wurden, indem

Rezeptor	Ligand
Aktivierende NK-Zellrezeptoren	
2B4	CD48
NKp44	Influenza/ nicht bekannt
NKp30	nicht bekannt
NKp46	Influenza/ nicht bekannt
CD16	IgG
NKG2D	MIC-A, MIC-B
NKp80	nicht bekannt
DNAM	CD112/CD155
Inhibierende NK-Zellrezeptoren	
ILT2	MIC-A,-B,-G
KIR3DL2	MHC-A
KIR3DL1	MHC-B
KIR2DL4	MHC-A,-B,-G
KIR2DL1,2,3	MHC-C
CD94	MHC-C

Tabelle 3

Einige inhibitorische und aktivierende NK-Zellrezeptoren und ihre Liganden

Die Rolle der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) im Immunsystem

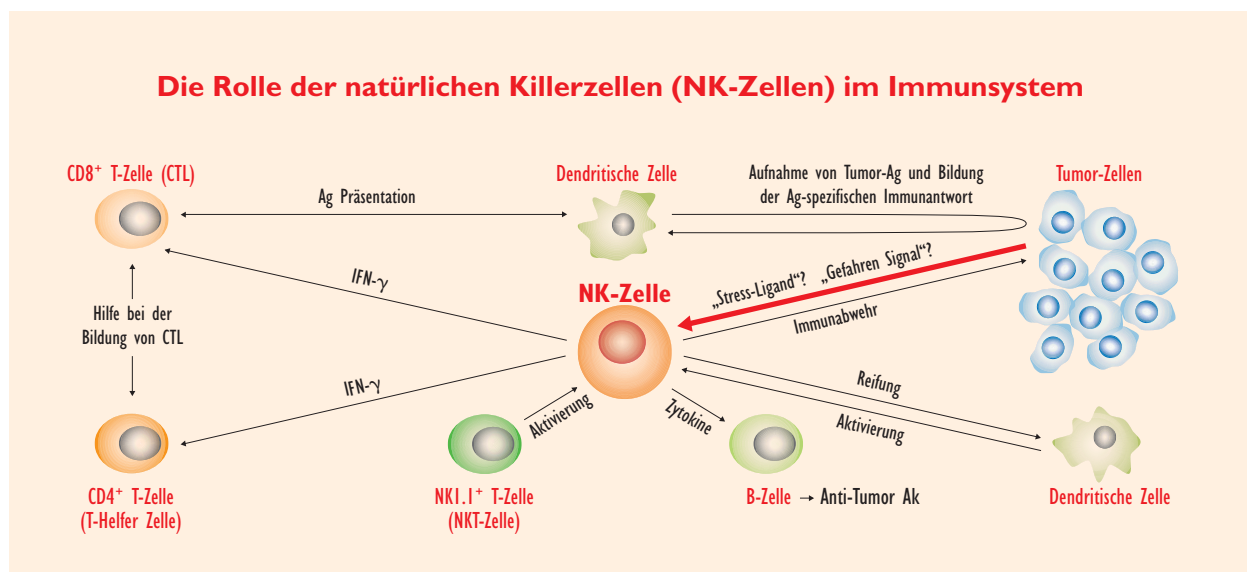


Abbildung 10

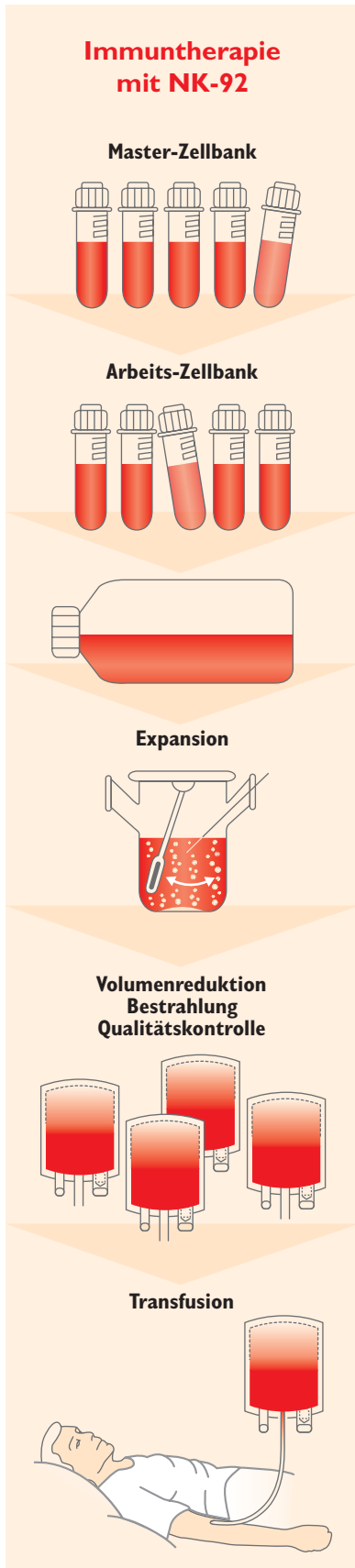
Die Abbildung zeigt ein hypothetisches Schema über die potentielle Rolle von NK-Zellen in der Immunabwehr von Tumoren und die Interaktion mit Komponenten des Immunsystems.

man mononukleäre Zellen unter Zugabe von hohen Konzentrationen Interleukin-2 (IL-2) expandiert hat. Heute weiß man, dass die Mehrzahl (> 90%) der unter diesen Bedingungen expandierten Lymphozyten polyklonale T-Zellpopulationen darstellten und nur zu einem sehr geringen Teil aktivierte NK-Zellen enthielten. Die klinische Anwendung von LAK Zellen mit einem hohen Gehalt an autologen T-Lymphozyten macht nach dem heutigen Kenntnisstand keinen Sinn, weil T-Lymphozyten ihre Wirkung nur nach vorheriger Sensibilisierung durch APC's entfalten können. Für eine allogene Anwendung sind LAK-Zellen grundsätzlich nicht geeignet, weil T-Lymphozyten im Gegensatz zu NK-Zellen alloreaktiv sind und zur Ausbildung einer für den Patienten lebensgefährlichen GvH-Reaktion führen würden. In

den letzten Jahren ist man daher dazu übergegangen, NK-Zellen durch immunmagnetische Verfahren zu isolieren. Ausgangspunkt für eine solche Isolation von NK-Zellen sind mononukleäre Zellpräparate, die durch Apherese gewonnen werden. Da NK-Zellen und T-Lymphozyten gemeinsame Vorläuferzellen haben und man sicherstellen möchte, dass bei der anschließenden Aktivierung und Expansion der NK-Zellen mit IL-2 keine T-Lymphozyten die Zellkultur überwachsen, hat es sich als nützlich erwiesen, der Isolation von NK-Zellen durch CD56-spezifische, immunmagnetisch gekoppelte Antikörper eine Depletion der CD3-positiven T-Lymphozyten vorzuschalten. Auf diese Weise erhält man eine relativ reine Population von CD3-negativen/CD56-positiven NK-Zellen (58).

Klinische Wirkung von natürlichen Killerzellen:

Verschiedene Studien untersuchten die Wirkung von NK-Zellen bei bösartigen Erkrankungen durch entweder endogene Aktivierung der patienteneigenen NK-Zellen durch Administration von z. B. Interleukin-2 oder durch Rekonstitution der NK-Zellantwort durch adoptiven Transfer von ex-vivo expandierten autologen (59-62) oder allogenen (58, 63, 64) NK-Zellen. Die Sicherheit und Effizienz einer NK-Zelltherapie wurde hierbei bei soliden Tumoren (60-63) und bei hämatologischen Erkrankungen (58, 64) untersucht. Bei der Behandlung von Leukämien wurden NK-Zellen in Kombination mit einer Hochdosis-Chemotherapie eingesetzt, um einen GvL-Effekt zu verstärken, ohne eine potentiell lebensgefähr-



liche GvH-Erkrankung zu induzieren, welche vorrangig durch alloreaktive T-Lymphozyten vermittelt wird. Während sich die systemische Applikation von IL-2 in den Dosierungen, welche für eine immunstimulatorische Wirkung am Tumor benötigt werden, als wenig tolerabel herausgestellt hat (62), führte die wiederholte i. v. Applikation von bis zu 10^{11} NK-Zellen zu keinen Nebenwirkungen und wurde von den Patienten gut toleriert (63). Allerdings ließ sich nur bei einigen Patienten ein therapeutischer Teilerfolg erzielen (65).

Einen neuen Aufwind hat die Therapie maligner Erkrankungen mit NK-Zellen durch Beobachtungen erfahren, die darauf hinweisen, dass die Fähigkeit von Leukämiezellen einer Immunantwort durch NK-Zellen zu entkommen, zu der schlechten Prognose be-

stimmter Leukämien beiträgt. So zeigte eine retrospektive Studie bei Patienten, die zur Behandlung ihrer akuten myeloischen Leukämie (AML) ein Stammzelltransplantat eines Spenders mit einem „Mismatch“ im HLA-C Locus erhalten haben, eine lang anhaltende Remission ihrer Grunderkrankung. Bei NK-sensitiven Leukämien, wie z. B. der AML, könnte der adoptive Transfer von NK-Zellen des Stammzellspenders daher einen potenten antileukämischen Effekt vermitteln (55). Insbesondere im Rahmen von haploidenten Transplantationen, bei denen Spenderlymphozyten wegen der Gefahr einer GvH-Reaktion nicht angewendet werden können, wurden daher mehrere klinische Studien initiiert, die die Sicherheit und Effizienz einer Immuntherapie immunmagnetisch isolierter, CD3-negativer NK-Zellen untersuchen (58, 64). Es bleibt abzuwarten, ob die vorteilhafte Prognose der transplantierten AML Patienten mit einem HLA-C Mismatch in klinisch effiziente Zelltherapien unter der Verwendung von NK-Zellen mündet.

Abbildung 11

Konzept einer, vom Immunstatus des Patienten unabhängigen, Immuntherapie mit NK-92

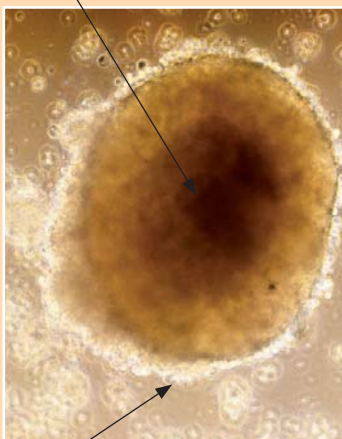
NK-92 sind eine immortalisierte NK-Zelllinie, die vom Immunstatus des Patienten unabhängig, im Sinne einer passiven Immuntherapie intravenös verabreicht werden kann. Zur Expansion von therapeutischen NK-92 Dosierungen, wird eine Charge einer unter GMP-Bedingungen hergestellten Masterzellbank aufgetaut und die Zellen in bis zu 20 L Kulturen expandiert.

Vor einer Anwendung werden die Zellen durch Zentrifugation auf ein Volumen von 300 ml eingengt und mit 10 Gy bestrahlt. Hierdurch wird eine Proliferation der Zellen im Patienten verhindert. Die Zellen sind bei einer Bestrahlung von 10 Gy noch bis zu 72 h aktiv. Die Testung zur Freigabe der Präparate umfasst Untersuchungen zur Zellzahl, Funktion der NK-Zellen und die Untersuchung auf kontaminierende Pathogene (Bakterien/Mykoplasmen)

Klonale NK-Zelllinien zur adoptiven Immuntherapie

Da die Aktivität von NK-Zellen zwar durch MHC Klasse I reguliert,

Harnblasenkarzinom



Natürliche Killerzellen

aber ihre Antwort nicht MHC restringiert ist, lassen sich NK-Zellen potentiell auch ohne besondere Berücksichtigung des HLA-Phänotyps eines Patienten ungerichtet einsetzen. Vor diesem Hintergrund wären NK-Zelllinien geeignet, eine in Bezug auf den Patienten ungerichtete Zelltherapie zu ermöglichen. Zudem braucht man nicht auf die patienteneigenen NK-Zellen zurückgreifen, die durch die immun-suppressiven Behandlungen der Grunderkrankung, wie z. B. Bestrahlung und Chemotherapie, oftmals in ihrer Funktion stark eingeschränkt sind. Idealerweise würden sich für derartige Zelltherapien NK-Zelllinien anbieten, weil diese eine standardisierte und zentralisierte Herstellung des Zellpräparates erlauben würden (**Abbildung 11**). Bisher konnten jedoch nur wenige NK-Zelllinien von Patienten mit Lymphomen der NK-Zellreihe als stabile Zellkultur etabliert werden und diese unterscheiden sich stark in ihrer noch erhaltenen zy-

Abbildung 12

In-vitro Aufnahme von NK-Zellen, die ein Spheroid eines Harnblasenkarzinoms (RT-Zelllinie) umlagern, um es anschließend zu zerstören. (Aufnahme: Dr. W. Glinke, Universitätsklinikum Frankfurt am Main)

totoxischen Aktivität gegenüber virusinfizierten und maligne entarteten Zellen (**66, 67**). Für zelltherapeutische Anwendungen erscheint die Zelllinie NK-92 besonders geeignet, da sie eine hohe Aktivität gegen eine Reihe solider (Harnblasenkarzinom, malignes Melanom) und hämatologischer (AML, Lymphome) Tumore aufweist. NK-92-Zellen wurden in den letzten Jahren systematisch für eine klinische Anwendung weiterentwickelt und stellen die einzige NK-Zelllinie dar, welche derzeit in klinischen Studien Anwendung findet (**68**). Der Mechanismus, der es NK-92-Zellen erlaubt, maligne entartete Zellen effektiv zu erkennen und abzutöten ohne allogenes, gesundes Gewebe oder Zellen anzugreifen, ist nicht bekannt. Man nimmt jedoch an, dass der besondere Phänotyp von NK-92-Zellen zu diesen Eigenschaften beiträgt. So weisen NK-92-Zellen zwar eine hohe Dichte aktivierender NK-Zellrezeptoren auf ihrer Oberfläche auf, die meisten inhibierenden Rezeptoren werden jedoch nicht exprimiert.

Ausblick

In ersten klinischen Studien haben sich wiederholte Gaben von bis zu 10^{10} NK-92-Zellen als überaus verträglich erwiesen und führ-

ten bei den behandelten Patienten zu keinerlei Nebenwirkungen. In diesen derzeit noch laufenden Phase I Studien wurden nur Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren eingeschlossen, dennoch ließ sich die Progredienz der Erkrankung teilweise aufhalten. Die NK-92-Zelle stellt auch eine ideale Plattform für eine zielgerichtete NK-Zelltherapie im Sinne eines „Retargetings“ durch Expression tumorspezifischer chimärer Antigenrezeptoren dar. Die Expression von chimären Antigenrezeptoren in NK-Zellen führt zu einer effizienten Zytolyse NK-resistenter Tumorzellen (**69**). Die genetische Manipulation der NK-Zelllinie NK-92 ermöglicht eine effektive Kombination zellulärer und antikörperbasierter Tumorthera-pien unter Erhalt der Vorteile, die eine – in Bezug auf den Patienten ungerichtete – Herstellung, Gewinnung und Anwendung im Sinne eines Fertigarzneimittels mit sich bringt.

Die Literaturhinweise finden Sie im Internet zum Download www.drk.de/blutspende