

## Potenzial hämatopoetischer Stammzellen als Ausgangsmaterial für Arzneimittel für neuartige Therapien

An Arzneimittel für neuartige Therapien (Advanced Therapy Medicinal Products, ATMP) [1] sind erhebliche Hoffnungen geknüpft. Zu diesen Arzneimitteln gehören sowohl Gentherapeutika als auch die in der Regel mit aufwendigen Techniken hergestellten somatischen Zelltherapeutika und biotechnologisch bearbeiteten Gewebeprodukte. Letztere können, auch ohne substanziiell bearbeitet zu sein (wie beispielsweise durch In-vitro-Expansion oder Apoptose-Induktion), den ATMP zugeordnet werden, wenn ihr Einsatz Therapieziele verfolgt, die sich von der vermeintlich „natürlichen“ Aufgabe der Ausgangszelle wesentlich unterscheidet. Darunter fällt beispielsweise der Einsatz hämatopoetischer Stammzellen für andere Indikationen als für die hämatopoetische Rekonstitution nach myeloablativer Radio- und/oder Chemotherapie. Da es sich um Medikamente handelt, die für jeden einzelnen Patienten individuell hergestellt werden, bedarf es besonderer Anstrengungen, die zum Teil auf die Generikaherstellung ausgerichteten gesetzlichen Anforderungen aus dem Arzneimittelgesetz (AMG) [2], die Verordnung über ATMP sowie die Anforderungen unter anderem aus den Leitlinien für gute Herstellungspraxis [3] für diese neuartigen Zelltherapeutika zu erfüllen. Eine wichtige Voraussetzung für die Herstellung von Zelltherapeutika gleichbleibender Qualität, das heißt mit vergleichbaren pharmakologischen Eigenschaften für jedes individuell hergestellte Präparat, ist

unter anderem die Kontrollierbarkeit der Ausgangsmaterialien, insbesondere der dem Therapeutikum zugrunde liegenden Zellpräparate. Zudem ist es erforderlich, Prüfmethode für den Nachweis des therapeutischen Effekts der Zelltherapeutika zu etablieren. Ist die für den therapeutischen Effekt verantwortliche Zellfunktion (noch) nicht bekannt, so kann die grundsätzliche Funktionalität der Zellen durch Surrogatmarker dargestellt werden. Wichtig für den Nachweis der gleichmäßigen Qualität der ATMP ist außerdem die differenzierte Beschreibung der eingesetzten Zellpopulation zum Beispiel durch Oberflächenmarker oder Enzymausstattung. Auch muss es möglich sein, Veränderungen dieser Zelleigenschaften nach der für den therapeutischen Effekt durchgeführten In-vitro-Manipulation mittels In-vitro-Untersuchungen zu belegen.

Der vorliegende Übersichtsartikel diskutiert zunächst auf der Basis von Eigenschaften hämatopoetischer Stammzellen ihre grundsätzliche Eignung als Ausgangsprodukt für ATMP und gibt im weiteren Verlauf Beispiele für auf diesen Zellen basierende Zelltherapeutika.

### Eigenschaften hämatopoetischer Stammzellen, die ihre Eignung für die Herstellung neuartiger Zelltherapeutika unterstreichen

Die Blutbildung findet jenseits der Fetalperiode ausschließlich im roten Knochenmark statt, das sich beim Erwachsenen in

platten Knochen (Rippen, Schädelkalotte und Becken) sowie in den Wirbelkörpern findet. Sie geht von unreifen hämatopoetischen Zellen aus, die die Fähigkeit zur nicht-differenzierenden, selbsterneuernden Zellteilung oder zur asymmetrischen Zellteilung in eine primitive und eine ausdifferenzierende Zelle haben, also von Zellen, die definitionsgemäß Eigenschaften einer Stammzelle besitzen. Die Zahl dieser Zellen im Knochenmark bleibt über die gesamte Lebenszeit weitgehend konstant. Sie sind für den kontinuierlichen, geregelten Nachschub an reifen Blutzellen verantwortlich. Obwohl die ursprüngliche Blutstammzelle wohl von einem Hämangioblasten ausgeht, also von einer gemeinsamen Vorläuferzelle für Blut und Blutgefäße, ist die adulte, aber auch schon die fötale hämatopoetische Stammzelle in ihrem Repertoire auf die Generierung von Blutzellen aller Zelllinien beschränkt. Im Knochenmark befinden sich die hämatopoetischen Stammzellen in räumlicher Nähe zu Knochenmarkstromazellen [Osteoblasten, Knochenmarkfibroblasten, CAR (CXCL12 abundant reticular)-Zellen, Knochenmarkmakrophagen etc.], das heißt in der sogenannten Stammzellnische. Die Stammzellnische unterdrückt über lösliche und oberflächengebundene Faktoren einerseits die Differenzierung der Stammzellen und bewahrt gleichzeitig ihre konstante Anzahl, andererseits kann sie durch im Einzelnen nicht definierte Faktoren die selbsterneuernde Zellteilung oder den Proliferations-Differenzierungs-

weg in Stammzellen induzieren (ausgewählte aktuelle Übersichtsartikel zum Thema [4, 5, 6]). Der Verlust von Stammzellen durch Knochen trauma, Chemikalien/Toxine oder Bestrahlung wird durch eine vermehrte selbsterneuernde Stammzellteilung im erheblichen Maß ausgeglichen, das heißt, die hämatopoetische Nische besitzt eine große Plastizität und Regenerationsfähigkeit.

Aus oben Gesagtem ergibt sich, dass die Entnahme von Blutstammzellen ohne Zerstörung des blutbildenden Knochenmarks möglich ist. Dies prädestiniert die hämatopoetische Stammzelle für die Herstellung stammzellbasierter Medikamente.

### Welche Quellen für hämatopoetische Stammzellen sind verfügbar?

Wie bereits oben erwähnt, ist der natürliche Aufenthaltsort der hämatopoetischen Stammzelle das Knochenmark. Hämatopoetische Stammzellen können also durch Aspiration direkt aus dem Knochenmark entnommen werden [7]. Im Knochenmarkblut des gesunden Menschen liegt der Anteil der sehr unreifen Zellen an allen kernhaltigen Zellen bei weniger als 1%; die Zahl an echten Stammzellen wird auf etwa 1:3 Millionen Zellen geschätzt. Es ist allerdings zu beachten, dass eine Vielzahl von Krankheiten – nicht nur des Blutsystems – eine zum Teil dramatische akute oder chronische Reduktion des Stamm- und Progenitorzellanteils bewirken kann.

Blutstammzellen können auch mittels geeigneter Medikamente aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf mobilisiert werden; hierdurch steigt bei gesunden Spendern der Anteil an unreifen Zellen im peripheren Blut auf 0,5 bis 1%, und es kann eine Frequenz an Stammzellen von 1:6 Millionen Zellen erreicht werden [8]. Die Mobilisationseffizienz ist jedoch je nach Patient außerordentlich variabel. Die im Blut zirkulierenden Stammzellen können mittels einer routinemäßig durchgeführten Apheresespende entnommen und gleichzeitig angereichert werden.

Als dritte Quelle für Blutstammzellen kann auch Nabelschnur- und Plazentarestblut (Cord blood) genutzt werden [9]. Dieses früher verworfene Produkt ist

– obwohl gering im Volumen und in der absoluten Zellzahl – relativ reich an unreifen hämatopoetischen Zellen (einschließlich Stammzellen in einer geschätzten Frequenz von 1:1 Million). Experimentelle und erste klinische Daten bescheinigen den Plazentarestblutstammzellen eine größere Unreife als den adulten Blutstammzellen. Diese Eigenschaft könnte insbesondere für ihre Differenzierung in nicht-hämatopoetische Zelllinien günstig sein. Die Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen in relevanten Mengen ist somit grundsätzlich unproblematisch.

Im Vergleich zu Stammzellen aller anderen Gewebe ist die hämatopoetische Stammzelle relativ gut phänotypisch definiert. Im klinischen Alltag hat sich zur Quantifizierung und Anreicherung von Blutstammzellen aus Zellsuspensionen die Verwendung des Aktivierungsmarkers unreifer Zellen (CD34) als praktikabel erwiesen [10], obwohl viele Knochenmarkstammzellen in der CD34-negativen Zellfraktion enthalten sind und die CD34-positive Fraktion ganz überwiegend nicht aus Stammzellen besteht, das heißt, dass sich der Großteil der CD34-Zellen in Reifestadien weit jenseits der Stammzelle befindet. Eine genauere phänotypische Definition (unter anderem über das nachweisliche Fehlen von Lineage-Markern oder durch Untersuchung der Expression weiterer Oberflächenmarker wie CD133 und CD38) ist möglich, wenn auch derzeit von geringer praktischer Relevanz [11]. Eine funktionelle In-vitro-Untersuchung der frühen beziehungsweise späten Progenitorzellfunktion zum Beispiel mit dem Cobble-Stone-Area-Forming-Cell (CAFC)-Assay oder dem Colony-Forming-Units (CFU)-Assay ist prinzipiell leicht möglich. Diese Assays erlauben keine Rückschlüsse auf die Stammzellfunktion, insbesondere auch nicht auf die Fähigkeit enthaltener Stammzellen, erfolgreich mit der Stammzellnische zu interagieren, liefern jedoch einen Eindruck von der Viabilität einer Zellpopulation und weisen einen gewissen Gehalt an unreifen hämatopoetischen Zellen in einer Zellpopulation nach. Da ihre Durchführung aber zeitaufwendig ist, sind sie für die Qualitätsprüfung kurzfristig zu applizierender Zellprodukte ungeeignet. Gleiches gilt für den Nach-

weis der Zellfunktion in Tierversuchen (In-vivo-NOD/SCID-Repopulating-Cell-Assay): Die Dauer des Assays (zwölf Wochen), sein Standardisierungsgrad und sein Preis [Transplantation limitierender Dosen (mindestens vier Dosen, mindestens zehn Empfänger)] schließen seinen Einsatz für die routinemäßige Stammzellquantifizierung aus [12, 13, 14]. Schließlich gibt es Hinweise aus Primatenexperimenten, dass selbst die SCID-repopulierende Zelle nicht mit der Stammzelle identisch ist [15]. Dennoch kann durch die Kombination phänotypischer und funktioneller Assays eine für den klinischen Gebrauch hinreichend genaue Quantifizierung hämatopoetischer Stammzellen erreicht werden [16].

Da hämatopoetische Stammzellen als Suspensionszellen gewonnen und somit ohne Zellzerstörung durchflusszytometrisch charakterisiert werden können, ist ihre qualitative und quantitative Analyse technisch unproblematisch. Die Expression von CD34 auf allen hämatopoetischen Stammzellen im Plazentarestblut und in Apheresaten aus peripherem Blut nach medikamentöser Stammzellmobilisierung erlaubt ihre einfache, nahezu homogene Anreicherung aus heterogenen Gemischen reifer und unreifer Zellen für weitere Manipulationen mittels immunomagnetischer Selektion [17]. Als Suspensionszellen können hämatopoetische Zellen darüber hinaus einfach in Kulturflaschen oder -beuteln kultiviert werden. Dabei ermöglichen heute bereits marktübliche, speziell für hämatopoetische Zellen geeignete Wachstumsfaktoren ihre weitgehend kontrollierte Proliferation und Differenzierung in vitro. Diese vergleichsweise gute Handhabbarkeit hämatopoetischer Stammzellen bedingt, dass sie Stammzellen aus anderen Geweben überlegen sind. Geeignete Kulturbedingungen für den längerfristigen Erhalt der Stammzeleigenschaften (Stemness) in vitro sind allerdings bisher nicht verfügbar.

Als natürlicherweise itinerante (wandernde) Zellen sind hämatopoetische Stammzellen besonders leicht therapeutisch zu applizieren. Nach Injektion in den Blutstrom gelangt ein klinisch relevanter Teil der Zellen ins Knochenmark, wo sie sich einnisten und langfristig reife häma-

topoetische Zellen generieren können. Diese Tochterzellen sind auch nicht sesshaft und erreichen mit dem Blutstrom alle Körperregionen [18]. Im Gegensatz dazu ist davon auszugehen, dass andere gewebespezifische Stammzellen direkt in ihren späteren Wirkort appliziert werden müssen und bei ihnen systemische Effekte schwieriger zu erzielen sind.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass sich Blutstammzellen aufgrund einer Reihe von Eigenschaften besonders gut als Ausgangsmaterialien für Arzneimittel für neuartige Therapien eignen: Blutstammzellen sind phänotypisch gut charakterisiert, ihr natürlicher Aufenthaltsort ist genau definiert, und eine Entnahme auch großer Dosen hämatopoetischer Stammzellen bewirkt keine irreversible Schädigung des Ursprungsgewebes. Die In-vitro-Kultivierung hämatopoetischer Zellen gelingt leicht, da gut charakterisierte Wachstumsfaktoren zur Verfügung stehen, die die Differenzierung entlang aller Zelllinien bis nahezu zur vollständigen Reife erlauben. Erste Erfolge bei der In-vitro-Expansion unter weitgehendem Erhalt der Stammzeleigenschaften (Stemness) lassen hoffen, dass mittelfristig eine unbegrenzte In-vitro-Vermehrung hämatopoetischer Stammzellen möglich sein wird.

Aus hämatopoetischen Stammzellen erzeugte Therapeutika sind leicht zu applizieren, in aller Regel in den Blutstrom, da die Zellen das erforderliche molekulare Repertoire besitzen, um aus dem Blutstrom heraus mit ihrem natürlichen Zielorgan, dem Knochenmark, zu interagieren. Lokale Entzündungsreaktionen elaborieren Faktoren, die die Interaktion unreifer hämatopoetischer Zellen mit Entzündungsfoci begünstigen, sodass über chemotaktische Stimuli auch eine relative Anreicherung dieser Zellen in Entzündungsherden erreicht werden kann [19].

### Neuartige Therapien auf Basis hämatopoetischer Stammzellen

#### Blutstammzellen als Zielzellen für therapeutische Gene

Blutstammzellen sind konzeptionell sowie praktisch sehr gut für den therapeutischen Gentransfer geeignet. Unter den

Bundesgesundheitsbl 2011 · 54:791–796 DOI 10.1007/s00103-011-1305-2  
© Springer-Verlag 2011

### H. Böning · M. Heiden · J. Schüttrumpf · M.M. Müller · E. Seifried Potenzial hämatopoetischer Stammzellen als Ausgangsmaterial für Arzneimittel für neuartige Therapien

#### Zusammenfassung

Individualisierte, (stamm)zellbasierte Therapien für angeborene und erworbene Erkrankungen gehören zu den vielversprechenden, neuen Behandlungsoptionen des 21. Jahrhunderts. Bevor das Potenzial derartiger Therapien aber ausgeschöpft werden kann, sind zahlreiche grundlagenwissenschaftliche und verfahrenstechnische Fragen zu lösen. Eine dieser Fragen ist die nach der idealen Zelle für die Generierung derartiger Zellmedikamente. In vielerlei Hinsicht erfüllen hämatopoetische Stammzellen die Anforderungen, die an Stammzellen als Ausgangsprodukt für neuartige Zelltherapeutika gestellt werden. Hierzu zählen ihre relativ einfache Gewinnung in hohen Zelldosen, ihre gute phä-

notypische Definierbarkeit, die eine prospektive Anreicherung ermöglicht, sowie bereits vorliegende Erfahrungen zur In-vitro-Manipulation dieser Zellen. Das vorliegende fokussierte Perspektiven-Manuskript diskutiert die grundsätzliche und spezielle Eignung hämatopoetischer Stammzellen als Ausgangsprodukt für neuartige Zelltherapeutika und gibt Beispiele für ihre mögliche hämatologische und nicht-hämatologische therapeutische Anwendung.

#### Schlüsselwörter

ATMP · Neuartige Therapien · Hämatopoetische Stammzelle · Gentherapie · Somatische Zelltherapie

### Potential of hematopoietic stem cells as the basis for generation of advanced therapy medicinal products

#### Abstract

Individualized, (stem) cell-based therapies of congenital and acquired illnesses are among the most exciting medical challenges of the twenty-first century. Before the full potential of such therapies can be achieved, many basic scientific and biotechnological questions remain to be answered. What is the ideal source for the generation of such cellular drugs is one of those issues. In many respects, hematopoietic stem cells fulfill the requirements for stem cells as starting material for novel cellular therapeutics, including the simple access to large amounts of stem cells, the availability of good phenotypic mark-

ers for their prospective isolation, and an extensive body of knowledge about the in vitro manipulation of these cells. This manuscript discusses the general and specific usability of hematopoietic stem cells as starting material for novel cellular therapeutics and presents some examples of hematological and nonhematological therapeutic approaches which are based on hematopoietic stem cells.

#### Keywords

ATMPs · Advanced therapy medicinal products · Hematopoietic stem cells · Gene therapy · Somatic cell therapy

CD<sub>34</sub>-positiven, unreifen hämatopoetischen Zellen befinden sich bona fide Stammzellen, sodass über eine Transduktion therapeutischer Gene in diese Zellen einerseits eine zeitlich unbegrenzt genkorrigierte Zelle generiert wird, andererseits die exponentielle Proliferationsfähigkeit hämatopoetischer Stammzellen zu einer großen Zahl an Zellen führen kann, die das therapeutische Gen exprimieren. Ihre Anwendung für die Gentherapie monogen bedingter Erbkrankheiten, bei der keine Regulation der Genexpression erforderlich, eine geringe Genaktivität für einen therapeutischen Effekt hinreichend und das therapeutische Genprodukt entweder in den hämatopoetischen Zellen oder sezerniert im Plasma aktiv ist, ist ohne Weiteres möglich [20, 21, 22, 23, 24]. Die Möglichkeit, Blutstammzellen auch wiederholt ohne permanente Gewebeschädigung entnehmen zu können, erlaubt es, viele der potenziell gefährlichen Schritte des Gentransfers, insbesondere des viralen Gentransfers, ex vivo durchzuführen. Eine Anreicherung der erfolgreich transduzierten Zellen ist grundsätzlich möglich.

Als Ausgangsmaterial für den Ex-vivo-Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen eignen sich insbesondere Zytokinmobilisierte, immunomagnetisch CD<sub>34</sub>-angereicherte Zellen, da sie in großer Zahl und mit hoher Reinheit generiert werden können. Da sich mobilisierte Peripherblutstammzellen überwiegend in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus befinden, aber mit geeigneten Zytokincocktails rasch und weitgehend synchron in den Zellzyklus rekrutiert werden können, wird die Integration des Gentransfervektors (Provirus) in die zelluläre DNA begünstigt [25]. Die nahezu homogene Anreicherung von Zielzellen erlaubt einen wirtschaftlichen Umgang mit den Kulturmedien und Vektoren. Es ist bekannt, dass die Insertion lentiviraler Gentransfervektoren präferenziell in transkriptionell aktive Bereiche erfolgt, sodass das Risiko für eine Insertionsmutagenese besteht. Aufgrund der bei hämatopoetischen Stammzellen relativ einfachen Zellelektion ist es möglich, die Anzahl von Nicht-Zielzellen im Therapeutikum auf ein Minimum zu begrenzen und damit das Risiko-Nutzen-Verhältnis der viralen Gentherapie posi-

tiv zu beeinflussen. Genetisch veränderte Stammzellen werden – in der Regel nach „Konditionierung“ des Empfängers – in den Blutstrom appliziert.

Potenziell durch Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen therapierbare Krankheiten sind zum einen hämatopoetisch-immunologische Krankheiten, zum anderen Stoffwechselerkrankungen, bei denen ein toxisches Metabolit aufgrund eines erblichen Enzymdefekts kumuliert [21]. Zur ersteren Gruppe zählen unter anderem schwere kombinierte Immundefekte, Thalassämien, das Wiskott-Aldrich-Syndrom oder die chronische Granulomatose. Einzelfallberichte über grundsätzlich erfolgreiche Behandlungen liegen für alle diese Entitäten vor. Zur zweiten Gruppe zählt eine Vielzahl monogen bedingter Stoffwechselerkrankungen wie die Phenylketonurie, die Ahornsirupkrankheit (MSUD) oder die Gaucher-Krankheit, aber auch die schwere Hämophilie [26, 27, 28]. Einzelfallberichten über erfolgreiche autologe Gentherapien folgten in jüngster Vergangenheit regelmäßig Berichte über sekundär auftretende Leukämieerkrankungen, verursacht durch Insertionsmutagenese [27, 29, 30, 31]. Es sind erhebliche Anstrengungen bei der Vektorentwicklung erforderlich, bevor die autologe Gentherapie klinische Relevanz erlangen kann.

### Regenerative Therapie mit autologen hämatopoetischen Stammzellen

Die Anwendung autologer hämatopoetischer Stammzellen zur Behandlung von Gefäßkrankheiten wird in nicht ganz logischer Auslegung ebenfalls zu den „neuartigen Therapien“ gezählt, obwohl die Zellen in ein erkranktes Gefäßgebiet injiziert werden, das heißt sich dort an ihrem „normalen“ Aufenthaltsort befinden und ihre „normalen“ Funktionen erfüllen. Hier beruht der therapeutische Effekt nicht auf der Umwandlung der Zellen in Gefäßzellen oder in parenchymale Zellen [32], sondern auf ihren transienten Interaktionen – wohl über sezernierte Faktoren – mit dem geschädigten Gewebe. Rechtlich wird davon ausgegangen, dass diese Interaktion der hämatopoetischen Stammzellen mit den erkrankten

Gefäßregionen nicht mit einer Blutbildung gleichzusetzen ist. Obwohl also diesem Verfahren keine substanzielle Bearbeitung vorangeht, werden sie hier den ATMP zugeordnet, konkret den somatischen Zelltherapeutika.

Eine Vielzahl von Studien hat die Anwendung autologer hämatopoetischer „Stammzellen“ beim Herzinfarkt untersucht [33, 34]. Die bloße Erhöhung der Zahl unreifer hämatopoetischer Zellen im geschädigten Gewebe durch Gabe von Zytokinen (zum Beispiel G-CSF) war nicht von einem therapeutischen Erfolg gekrönt: Dies mag daran liegen, dass der endogene G-CSF-Spiegel nach einem Herzinfarkt ohnehin erhöht ist, therapeutisch ungünstige Zellpopulationen komobilisiert werden und die lokale Dosis an therapeutischen Zellen zu gering ist [35].

Erfolgreich waren letztlich Studien mit mononukleären Zellsuspensionen aus Knochenmarkblut, die unmittelbar in die Koronargefäße injiziert wurden. Danach wurde ein Stopp-flow angelegt, um den injizierten Zellen die Möglichkeit zu geben, mit dem rekanalisierten Infarktareal zu interagieren. In der REPAIR-AMI-Studie, bei der Patienten mit Herzinfarkt randomisiert nach revaskularisierender Therapie einer Placebo- oder Zelltherapie zugeführt wurden, war die Wiederherstellung der Kontraktilität des linken Ventrikels in der Zelltherapie-Gruppe signifikant besser. Im Langzeit-Follow-up zeigte sich bei ihnen eine signifikant verbesserte Flussreserve und eine höhere Gesamtüberlebensrate [36]. Allerdings waren andere Studien mit ähnlichen Zellpräparationen erfolglos, zum Teil wurden auch negative Effekte berichtet [37]. Detaillierte Untersuchungen lassen vermuten, dass hierfür subtile Unterschiede bei der Herstellung der Zellsuspensionen verantwortlich sein könnten. Therapeutische Effekte wurden auch bei Patienten mit Kardiomyopathien beschrieben, hier nach direkter Injektion der Zellen in den Herzmuskel. Weitere potenzielle Zielerkrankungen sind unter anderem periphere arterielle Verschlusskrankheiten, schwere Vaskulitiden, die Post-Infarkt-Herzinsuffizienz und die chronische koronare Herzkrankheit. Die Bedeutung der autologen Knochenmarkzelltherapie bei diesen und ähn-

lichen Entitäten wird in den nächsten Jahren geklärt werden.

So günstig die Datenlage zum therapeutischen Nutzen einiger Knochenmarkzellpräparate für die Therapie im kardiovaskulären Bereich auch ist, so wenig ist über die Zellen bekannt, die für den therapeutischen Nutzen verantwortlich sind. Deutlich ist, dass die Zellen allenfalls vorübergehend mit der pathologischen Läsion assoziiert bleiben und interagieren. Ihre Integration in den Gewebeverband oder in das Gefäßsystem ist nach heutigem Stand des Wissens auszuschließen. So ist unklar, ob die therapeutische Wirkung überhaupt von einer unreifen Zellpopulation vermittelt wird. Während diese Frage aus klinischer Sicht von geringer Bedeutung ist – „Wer heilt, hat Recht“, stehen die Hersteller vor der schwierigen Aufgabe, relevante Prüfparameter zur Messung der therapeutischen Potenz dieser Zellmedikamente zu finden.

### Reife Blutzellen aus hämatopoetischen Stammzellen

Die Idee, reife Blutzellen als Blutersatz (Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, potenziell sogar autologe Lymphozyten) aus Blutstammzellen herzustellen, ist verlockend. Die Deckung des wachsenden Blutbedarfes aus der freiwilligen Spende wird immer schwieriger [38]. Bei Krankheitsepidemien oder in Ferienzeiten fehlen Spendewillige, und es kann zu Engpässen bei der Versorgung mit Blutkomponenten kommen. Die Herstellung reifer Blutzellen aus Stammzellen würde hingegen einen ausreichenden Bestand an Blutkomponenten garantieren. Folgende wissenschaftliche und technologische Probleme sind in diesem Zusammenhang zu überwinden:

Um nicht ständig neue Stammzellspender anwerben zu müssen – was mit Sicherheit deutlich schwieriger wäre als Vollblutspender zu akquirieren – müsste es gelingen, Stammzellen in vitro in einem Zustand der „Stemness“ – also sich unendlich selbsterneuernd teilend – zu halten. Hierfür geeignete Zytokin-Matrix-Kombinationen sind bislang nicht etabliert; die Immortalisierung geeigneter Vorläuferzellen könnte hier Abhilfe schaffen [39]. Die In-vitro-Inkuba-

tion hämatopoetischer Stammzellen mit Zytokincocktails kann sie zur Proliferation und Differenzierung anregen, das heißt, mittels geeigneter Zytokingemische kann die Generierung von Zellen einer angestrebten Lineage erreicht werden – allerdings ist dieses Verfahren extrem teuer. Granulozyten können in vitro bis annähernd zur vollen Reife gezüchtet werden. Die Enukleation von Erythrozyten wird – auch bei Kokultur mit Makrophagen, die in vivo die erythropoetische Nische bilden – in der Regel nicht vollständig erreicht. Dennoch ist es gelungen, in vitro einige µl hämoglobinhaltige, zum Sauerstofftransport befähigte Zellen zu produzieren, die Erythrozyten entsprachen [40, 41]. Ebenso gelang es, CD34<sup>+</sup>-Zellen zu (Pro-)Megakaryozyten auszureifen beziehungsweise Megakaryozyten in vitro dazu zu bringen, Abschnürungen zu generieren. Jedoch konnte nicht belegt werden, dass diese Abschnürungen funktionellen Plättchen entsprechen [42, 43, 44]. Die Zahl der Erythrozyten in einem Erythrozytenkonzentrat veranschaulicht, wie schwierig die hier gestellte Aufgabe ist: Ein typisches Erythrozytenkonzentrat enthält circa  $25 \times 10^{11}$  Erythrozyten, beziehungsweise in Deutschland werden täglich  $25 \times 10^{15}$  Erythrozyten benötigt. Selbst unter optimistischsten Bedingungen wird also die Blutversorgung noch lange von der Blutspende abhängig sein. Potenziell interessant für die In-vitro-Blutgenerierung wären entweder „universelle“ Erythrozyten (tatsächlich universelle Erythrozyten gibt es bekanntermaßen nicht, aber für den klinischen Gebrauch wäre o Rh-negativ eine adäquate Approximation). Klinisch bedeutend wären andererseits Erythrozyten von Menschen mit sehr seltenen Blutgruppen, die gezielt hergestellt werden müssten, wenn sich eine Transfusionsbedürftigkeit bei einem solchen Patienten „elektiv“ abzeichnet.

Unklar ist dabei, welche Stammzellquelle sinnvollerweise genutzt werden sollte. Eine Stammzellspende ist deutlich invasiver als die Spende reifer Blutzellen, und der Erhalt der „Stemness“ in vitro ist nicht absehbar, sodass auch Stammzellspender für die In-vitro-Generierung von Blutzellen wiederholt aufgerufen werden müssten.

Kritisch bei der Anwendung in vitro generierter Blutzellen wird auch die Verträglichkeit beziehungsweise die Antigenität sein. Veränderungen an klassischen Blutgruppenantigenen sowie anderer zellständiger Antigene – beides bedingt durch die Kulturbedingungen – haben das Potenzial, Empfänger zu sensibilisieren.

Zusammenfassend ist anzumerken, dass trotz erheblicher Bemühungen seit mehr als 40 Jahren eine Versorgung mit biotechnologisch hergestelltem Blut nicht nur aus Gründen der mangelnden Wirtschaftlichkeit noch in weiter Ferne liegt.

### Regenerative Therapie mit reprogrammierten hämatopoetischen Stammzellen

Kürzlich ist die Rückführung hämatopoetischer Stammzellen in einen Zustand der Pluripotenz durch Verwendung der Yamanaka-Faktoren gelungen [45, 46]. Potenziell lässt sich aus diesen induzierten pluripotenten Stamm (iPS)-Zellen jedes beliebige Gewebe züchten; vorausgesetzt, die hierfür kritischen Faktoren sind hinreichend bekannt, was für die meisten Gewebe jedoch nicht der Fall ist. Hämatopoetische Stammzellen unterscheiden sich von anderen Stammzellen dadurch, dass sie besonders leicht zugänglich und in hoher Zahl generierbar sind. Autologe iPS-Zellen wären potenziell einer Genreparatur oder Genaddition zugänglich und könnten so – analog zur autologen Gentherapie mit hämatopoetischen Stammzellen (siehe oben) – für die Reparatur genetischer Defekte verwendet werden. Der Fantasie sind bei Auswahl der Indikationen keine Grenzen gesetzt, jedoch steckt die In-vitro-Generierung reifer Zellen und insbesondere komplexer Gewebe aus iPS-Zellen derzeit noch in den Kinderschuhen.

### Fazit

**Hämatopoetische Stammzellen besitzen aufgrund einer Reihe günstiger Eigenschaften erhebliches Potenzial zur Generierung allogener und autologer Zellmedikamente für neuartige Therapien. Mit Ausnahme vielversprechender Ansätze zur kardiovaskulären Regeneration und**

erster Erfolge nach mehr als 20 Jahren intensiver Forschung bei der Gentherapie monogen bedingter Erbkrankheiten ist ein Einsatz derartiger Zellmedikamente in der klinischen Routine kurzfristig nicht erkennbar.

### Korrespondenzadresse

**Dr. H. Böning**

Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main und DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gemeinnützige GmbH, Frankfurt Sandhofstr. 1, 60528 Frankfurt h.boenig@blutspende.de

**Interessenkonflikt.** Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

### Literatur

- Verheugen G (2009) Commission Directive 2009/120/EC of 14 September 2009 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use as regards advanced therapy medicinal products. Text with EEA relevance 2011 Jan 16 Available from <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:242:0003:01:EN:HTML>
- Medicinal Products Act in the version published on 12 December 2005 (Federal Law Gazette [BGBl.] Part I p.3394, last amended by Article 1 of the Ordinance of 28 September 2009 (Federal Law Gazette I p. 3172) 2011 Jan 16
- EudraLex – Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines (last updated 12-01-2011) 2011 Jan 16
- Garrett RW, Emerson SG (2009) Bone and blood vessels: the hard and the soft of hematopoietic stem cell niches. *Cell Stem Cell* 4:503–506
- Lymperi S, Ferraro F, Scadden DT (2010) The HSC niche concept has turned 31. Has our knowledge matured? *Ann N Y Acad Sci* 1192:12–18
- Papayannopoulou T, Scadden DT (2008) Stem-cell ecology and stem cells in motion. *Blood* 111:3923–3930
- McCulloch EA, Till JE (1971) Regulatory mechanisms acting on hemopoietic stem cells. Some clinical implications. *Am J Pathol* 65:601–619
- Weaver CH, Buckner CD, Longin K et al (1993) Syngeneic transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after the administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 82:1981–1984
- Broxmeyer HE, Kurtzberg J, Gluckman E et al (1991) Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells* 17:313–329
- Civin CI (1992) Identification and positive selection of human progenitor/stem cells for bone marrow transplantation. *Prog Clin Biol Res* 377:461–472
- McGuckin CP, Pearce D, Forraz N et al (2003) Multiparametric analysis of immature cell populations in umbilical cord blood and bone marrow. *Eur J Haematol* 71:341–350
- Szilvassy SJ, Lansdorp PM, Humphries RK et al (1989) Isolation in a single step of a highly enriched murine hematopoietic stem cell population with competitive long-term repopulating ability. *Blood* 74:930–939
- Dick JE, Pflumio F, Lapidot T (1991) Mouse models for human hematopoiesis. *Semin Immunol* 3:367–378
- Dick JE, Sirard C, Pflumio F, Lapidot T (1992) Murine models of normal and neoplastic human hematopoiesis. *Cancer Surv* 15:161–181
- Horn PA, Thomasson BM, Wood BL et al (2003) Distinct hematopoietic stem/progenitor cell populations are responsible for repopulating NOD/SCID mice compared with nonhuman primates. *Blood* 102:4329–4335
- Tse W, Bunting KD (2008) The expanding tool kit for hematopoietic stem cell research. *Methods Mol Biol* 430:3–18
- Miltenyi S (1997) CD34+ selection: The basic component for graft engineering. *Oncologist* 2:410–413
- Bönig H, Priestley GV, Oehler V, Papayannopoulou T (2007) Hematopoietic progenitor cells (HPC) from mobilized peripheral blood display enhanced migration and marrow homing compared to steady-state bone marrow HPC. *Exp Hematol* 35:326–334
- Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ et al (2003) HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 112:160–169
- Kohn DB, Kantoff PW, Eglitis MA et al (1987) Retroviral-mediated gene transfer into mammalian cells. *Blood Cells* 13:285–298
- Kohn DB, Anderson WF, Blaese RM (1989) Gene therapy for genetic diseases. *Cancer Invest* 7:179–192
- Kohn DB (1995) The current status of gene therapy using hematopoietic stem cells. *Curr Opin Pediatr* 7:56–63
- Kohn DB (1999) Gene therapy using hematopoietic stem cells. *Curr Opin Mol Ther* 1:437–442
- Ariga T (2006) Gene therapy for primary immunodeficiency diseases: recent progress and misgivings. *Curr Pharm Des* 12:549–556
- Hong Y, Lee K, Choi JY et al (2002) High efficiency gene transfer to human CD34+ cells. *Int J Hematol* 76S1:264–265
- Bigger BW, Siapati EK, Mistry A et al (2006) Permanent partial phenotypic correction and tolerance in a mouse model of hemophilia B by stem cell gene delivery of human factor IX. *Gene Ther* 13:117–126
- Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A et al (2010) Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 363:355–364
- Ohmori T, Ishiwata A, Kashiwakura Y et al (2008) Phenotypic correction of hemophilia A by ectopic expression of activated factor VII in platelets. *Mol Ther* 16:1359–1365
- Hacein-Bey-Abina S, Von KC, Schmidt M et al (2003) A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348:255–256
- Hacein-Bey-Abina S, Von KC, Schmidt M et al (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302:415–419
- Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP et al (2008) Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 118:3132–3142
- Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL (2002) Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297:2256–2259
- Wollert KC, Drexler H (2010) Cell therapy for the treatment of coronary heart disease: a critical appraisal. *Nat Rev Cardiol* 7:204–215
- Dimmeler S, Zeiher AM (2009) Cell therapy of acute myocardial infarction: open questions. *Cardiology* 113:155–160
- Eckman PM, Bertog SC, Wilson RF, Henry TD (2010) Ischemic cardiac complications following G-CSF. *Catheter Cardiovasc Interv* 76:98–101
- Schächinger V, Erbs S, Elsasser A et al (2006) Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 355:1210–1221
- Wohrle J, Merkle N, Mailander V et al (2010) Results of intracoronary stem cell therapy after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 105:804–812
- Seifried E, Kluefer H, Weidmann C et al (2011) How much blood is needed? *Vox Sang* 100:10–21
- Nakamura Y, Hiroyama T, Miharada K, Kurita R (2011) Red blood cell production from immortalized progenitor cell line. *Int J Hematol* 93:5–9
- Lu SJ, Feng Q, Park JS et al (2008) Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood* 112:4475–4484
- Boehm D, Murphy WG, Al-Rubeai M (2009) The potential of human peripheral blood derived CD34+ cells for ex vivo red blood cell production. *J Biotechnol* 144:127–134
- Su RJ, Zhang XB, Li K et al (2002) Platelet-derived growth factor promotes ex vivo expansion of CD34+ cells from human cord blood and enhances long-term culture-initiating cells, non-obese diabetic/severe combined immunodeficient repopulating cells and formation of adherent cells. *Br J Haematol* 117:735–746
- Cortin V, Garnier A, Pineault N et al (2005) Efficient in vitro megakaryocyte maturation using cytokine cocktails optimized by statistical experimental design. *Exp Hematol* 33:1182–1191
- Gekas C, Graf T (2010) Induced pluripotent stem cell-derived human platelets: one step closer to the clinic. *J Exp Med* 207:2781–2784
- Loh YH, Agarwal S, Park IH et al (2009) Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113:5476–5479
- Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M et al (2009) Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 41:968–976