

Einführung in das Thema

Peter C. Scriba

Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilian-Universität, Medizinische Klinik (München)

Dies ist das erste Mainzer Symposium nach dem plötzlichen Tod von Prof. Dr. Hans J. Dengler. Wir denken an diesen klugen und kritischen Mann und vermischen ihn. Prof. Dengler hat viel für die klinische Pharmakologie und für die Paul-Martini-Stiftung getan. Die Mainzer Symposien gehören wohl zu den Glanzlichtern in seinem wissenschaftlichen Leben, ebenso wie seine unvergessene Rede als Vorsitzender der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin in Wiesbaden mit dem Thema „Die Medizin im Spiegel der Therapie“.

Mit der Entscheidung für das Thema „Therapie mit Blutprodukten“, für dessen Vorbereitung ich den Münchner Kollegen Endres, Hallek und Schramm danke, hat der Vorstand der Paul-Martini-Stiftung mit den Herren Raff, Baumbauer und Weihrauch einen hochaktuellen Themenkomplex gewählt. Blutprodukte haben sich weiterentwickelt von der einfachen Substitution von Zellen und Plasma hin zu einer immer gezielteren Faktorentherapie und zur Gabe immer präziser spezialisierter Zellen. Die Produktion der therapeutischen Blutprodukte wird der Herstellung von Medikamenten ähnlicher, was den methodischen Aufwand, die Prüfung, die Kosten, die rechtlichen Vorschriften, die Sicherheitsauflagen u. a. betrifft. Auch die medizinökonomische Bedeutung dieses Fortschritts verdient unsere besondere Aufmerksamkeit. Fortschritt bedeutet in der Medizin häufig additive Kosten, insbesondere in der Phase der Diffusion, mit der der Sachverständigenrat für die konzertierte Aktion im Gesundheitswesen die Annahme eines Fortschritts durch die Nichtspezialisten beschreibt. Der Sachverständigenrat mißt den Bereichen Hämophilie und Stammzelltherapie lange Passagen in seinem letzten Gutachten zu und zwar insbesondere im Hinblick auf deren wirtschaftliche Bedeutung.

Medizinischer Fortschritt läßt sich nicht aufhalten, auch nicht durch Budgetierung. Es steht gegebenenfalls vielmehr zu befürchten, daß der Patiententourismus ins Ausland wieder auflebt, wie wir ihn aus der Vergangenheit für die Beispiele Herzchirurgie und Abtreibung kannten, und wie er für die Radiojodtherapie noch existiert. Ein solcher Patiententourismus wird von der Öffentlichkeit nicht lange toleriert: Nach Ansicht des Sachverständigenrates kommt es beim Fortschritt darauf an, den Konsens von allen Beteiligten, einschließlich der Kassen, zu erreichen. Dies gilt für die Prüfung der Wirksamkeit, die gerade mit dem Brit. Med. J. das 50jährige Bestehen der randomisierten kontrollierten Studie feiert und deren Vorkämpfer Paul Martini in einem Artikel von Herrn Sauerbruch in der Deutschen Medizinischen Wochenschrift Nr. 96 gerade gewürdigt wurde. Wirksamer Fortschritt wird auch in der Zukunft bei gesicherter Indikation und gegebener Qualität finanziert werden.

Ich danke Herrn Präsident Zintzen von der Mainzer Akademie der Wissenschaften und der Literatur für seine Gastfreundschaft und freue mich auf unser interessantes Symposium.

Struktur-Funktions-Beziehung von Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren

Wolfram Bode

Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Das fein austarierte Gleichgewicht zwischen Gerinnungs-, antikoagulatorischen und fibrinolytischen Prozessen ist die Voraussetzung für eine funktionierende Hämostase. Blutgerinnsel/Thromben bestehen im wesentlichen aus Blutzellen (vor allem Thrombozyten), die durch quervernetzte Fibrinfasern zusammengehalten werden. Beide enthaltenen Komponenten, das Fibrin-Monomer wie auch die stimulierten Thrombozyten, entstehen durch die aktivierende Spaltung des Plasmaproteins Fibrinogen bzw. des zellständigen Thrombinrezeptors, verursacht durch die lösliche Serinproteinase α -Thrombin.

Thrombin selbst wird zuvor geradezu explosionsartig aus seiner inaktiven Vorstufe, dem membrangebundenen Prothrombin, in das Gefäßlumen entlassen. Diese Thrombinfreisetzung steht am Ende der sogenannten extrinsischen Kaskade, innerhalb der, ausgelöst durch das Zusammentreten von Gerinnungsfaktor VIIa und Gewebefaktor (Tissue Factor) zur extrinsischen Xase infolge einer Gewebsverletzung, nacheinander die membrangebundenen aktiven Serinproteinasen Faktor VIIa, Faktor IXa und Faktor Xa jeweils aus ihren inaktiven Vorstufen in steigenden Mengen entstehen. Diese Aktivierungsschritte erfolgen (kalziumvermittelt) über die membrangebundenen Molekülkomplexe extrinsische Xase (Faktor VIIa-Profaktor IX/X-Tissue Factor), intrinsische Xase (Faktor IXa-Profaktor X-Kofaktor VIIIa) und Prothrombinase (Faktor Xa-Prothrombin-Kofaktor Va), jeweils bestehend aus einer aktivierenden Proteinase, einem zu aktivierenden Profaktor und einem Kofaktor. Ein jeder dieser Aktivierungsschritte wird reguliert durch Proteinaseinhibitoren, große Proteine, die mehr oder weniger spezifisch ihre jeweiligen Zielproteinasen hemmen und so u. U. auch die ganze Gerinnungskaskade stoppen können.

Das letzte Aktivierungsprodukt der Aktivierungskaskade, das α -Thrombin, ist das eigentliche Schlüsselenzym bei der Gerinnung: durch Aktivierung und Stimulierung des Fibrinogens und der Thrombozyten (sowie einer Reihe anderer Zellen), aber auch durch Aktivierungsspaltung des vernetzenden Faktors XIII und der Kofaktoren V und VIII fördert es u. a. die Gerinnung (koagulatorische Wirkung), durch die (thrombomodulinvermittelte) Aktivierung des kofaktoraktivierenden Proteins C schaltet es sie aber gleichzeitig ab (antikoagulatorische Wirkung). Die Auflösung der Blutgerinnsel/Thromben erfolgt im wesentlichen durch zwei Serinproteinasen der fibrinolytischen Kaskade: die fibrinspaltende Serinproteinase Plasmin wird dabei durch Plasminaktivatoren, im wesentlichen durch den Gewebsaktivator (tissue-type plasminogen activator, t-PA), in einer Fibrin-stimulierten Reaktion aus der inaktiven Vorstufe, dem Plasminogen, freigesetzt.

Die beteiligten Gerinnungs-Profaktoren/aktiven Faktoren sind im Prinzip sehr ähnlich aufgebaute Multidomänen-Proteine (für Übersichten siehe [1-3]). Alle

bestehen aus einer membranbindungs-vermittelnden Gla-Domäne, zwei sogenannten EGF- bzw. Kringel-Domänen (die auch von vielen anderen Proteinen/Proteinasen her bekannt sind) und einer endständigen katalytischen Domäne, die der Verdauungsproteinase Trypsin sehr ähnlich sieht. Die verschiedenen Gerinnungsfaktoren besitzen aber sehr unterschiedliche Spezifität, Aktivität und Hemmbarkeit (u. U. extrem abhängig von den jeweiligen Kofaktoren), so daß sie innerhalb der Kaskade ganz bestimmte Funktionen übernehmen können. Die großen Kofaktoren V/Va und VIII/VIIIa sind keine Proteinasen, besitzen aber ebenfalls zueinander ähnliche Multidomänenstruktur.

In den letzten 10 Jahren ist die dreidimensionale Struktur der meisten dieser Gerinnungsfaktoren aufgeklärt worden. Wir haben die erste Struktur einer Gerinnungsproteinase überhaupt, des α -Thrombins [4, 5], und die Raumstrukturen vieler weiterer Thrombinkomplexe aufgeklärt. Wir haben erstmals die Röntgenstrukturen des Faktors Xa [6, 7], des Faktors IXa [8], des aktivierten Proteins C [9], einer Kofaktor-Va-Domäne sowie der fibrinolytischen Proteinasen t-PA (in der ungespaltenen, aber aktiven Proform [10] wie auch in der gespaltenen Form [11]) und des (Micro)Plasmins (zusammen mit dem bakteriellen Aktivator Staphylokinase und einem Plasmin-Substrat [12]) aufgeklärt. Diese Strukturen zeigen von anderen Proteinen her bekannte Grundfaltungsmotive, aber auch Struktur determinanten, welche die jeweils charakteristischen Eigenschaften bedingen und erklären. Komplexe mit synthetischen Inhibitoren (vor allem mit Thrombin und Faktor Xa) zeigen Bindungsgeometrien, die bei der (Weiter)Entwicklung von solchen Inhibitoren zu therapeutisch wirksamen Wirkstoffen grundsätzlich zu beachten sind.

Diese atomaren Raumstrukturen sind unentbehrlich für ein tiefergehendes Verständnis der funktionellen Eigenschaften dieser Gerinnungs- und fibrinolytischen Proteinasen. Sie sind die Grundlage für die Planung rekombinanter Mutageneseexperimente zur Abklärung offengebliebener Fragen über die Bedeutung einzelner Domänen und Aminosäurereste und ein wichtiges Werkzeug für die rationale, d. h. struktur-basierende Wirkstoffentwicklung. In dem Referat sollen einige dieser Strukturen kurz vorgestellt und ihre Bedeutung für das Verständnis der Funktion und für die Wirkstoffentwicklung diskutiert werden.

Literatur

- [1] Stubbs, T. M., Bode, W., Coagulation factors and their inhibitors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 823 (1994)
- [2] Stubbs, M. T., Bode, W., The clot thickens: clues provided by thrombin structure. *Trends in Biol. Sci.* **20**, 23 (1995)

- [3] Bode, W., Brandstetter, H., Mather, T. et al., Comparative analysis of hemostatic proteinases: Structural aspects of thrombin, factor Xa, factor IXa and protein C. *Thromb. Haemost.* **78**, 501 (1997)
- [4] Bode, W., Mayr, L., Baumann, U. et al., The refined 1.9 Å crystal structure of human α -thrombin: Interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion Segment. *EMBO J* **8**, 3467 (1989)
- [5] Bode, W., Turk, D., Karshikov, A., The refined 1.9 Å crystal structure of D-PheProArg chloromethylketone inhibited human α -thrombin. Structure analysis, Overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, structure-function relationships. *Prot. Sci.* **1**, 426 (1992)
- [6] Padmanabhan, K., Padmanabhan, K. P., Tulinsky, A. et al., Structure of human des(1-45) Factor Xa at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **232**, 947 (1993)
- [7] Brandstetter, H., Kühne, A., Bode, W., et al., X-ray structure of active site-inhibited clotting factor Xa. Implications for drug design and substrate recognition. *J. Biol. Chem.* **271**, 29988 (1996)
- [8] Brandstetter, H., Bauer, M., Huber, R. et al., X-ray structure of clotting factor IXa: Active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9796 (1995)
- [9] Mather, T., Oganessyan, V., Hof, P. et al., The 2.8 Å crystal structure of Gla-domaninless activated protein C. *EMBO J.* **15**, 6822 (1996)
- [10] Lamba, D., Bauer, M., Huber, R. et al., The 2.3 Å crystal structure of the catalytic domain of recombinant two-chain human tissue-type plasminogen activator. *J. Mol. Biol.* **258**, 117 (1996)
- [11] Renatus, M., Engh, R. A., Stubbs, T. M. et al., Lysine 156 promotes the anomalous proenzyme activity of tPA: X-ray crystal structure of single-chain human tPA. *The EMBO J.* **16**, 4797 (1997)
- [12] Parry, M. A. A., Fernandez-Catalan, C., Bergner, A. et al., Structure of the ternary microplasmin-staphylokinase-microplasmin complex: a proteinase-cofactor-Substrate complex in action. *Nature Struct. Biol.* **5**, 917 (1998)

Virussicherheit von Arzneimitteln aus Plasma gemäß aktuellem Stand von Wissenschaft und Technik

Roloff Johannsen

Centeon Pharma GmbH, Marburg

Die therapeutische Anwendung von isolierten und stabilisierten Wirkungssubstanzen aus Blutplasma des Menschen nahm ihren Anfang in der Mitte dieses Jahrhunderts. Bis dahin war bei Patienten mit Mangel an Faktoren des Gerinnungs- und Immunsystems die Therapie mit Plasma und später Cryopräzipitat durchgeführt worden. Probleme der Volumenüberladung und mangelhaften Dosierbarkeit konnten erst überwunden werden, als die Herstellung von Faktorkonzentraten im technisch-industriellen Maßstab erfolgte. Das Ergebnis war eine wesentliche Verbesserung der Lebensqualität und Lebenserwartung der Patienten.

In den Jahren 1979 bis 1983 kam es jedoch zu einem dramatischen Rückschlag durch HIV-kontaminierte Faktorkonzentrate. Daraus wurde die Forderung entwickelt, daß nur viursinaktivierte Arzneimittel aus Plasma angewendet werden dürfen. Der jeweils erreichte Sicherheitsstandard, so die Forderung, sei zudem kontinuierlich weiter zu entwickeln. Hersteller und Behörden haben die andauernde Aufgabe, die Sicherheitsmaßnahmen bei der Herstellung von Plasmaprodukten kontinuierlich dem Stand des Wissens

über im Plasma vorkommende Viren und dem technischen Fortschritt anzupassen.

Zur Zeit enthalten die Sicherheitsmaßnahmen im wesentlichen vier Elemente:

1. Maßnahmen bei der Auswahl von Spendern und Testung von Spenden
2. Kontinuierliche Kontrolle von der Einzelspende über die vielfältigen Herstellungsschritte bis zur Abgabe des Endproduktes
3. Validierte Maßnahmen zur Inaktivierung und Eliminierung von Viren
4. Überprüfung und Chargenfreigabe der Produkte durch das Paul-Ehrlich-Institut

Das jetzt eingeführte integrierte Sicherheitssystem für Arzneimittel aus Plasma umfaßt demgemäß Schritte zur Entfernung und Inaktivierung von Viren auf verschiedenen Ebenen und zu verschiedenen Zeitpunkten der Herstellung. Als dezidierte Inaktivierungsschritte sind folgende Methoden im Gebrauch:

- Pasteurisierung
- Solvent Detergent Verfahren
- Trockene Hitze

- Beta-Propiolacton-Behandlung
- Na-Thiocyanat-Behandlung
- Behandlung bei niedrigem pH

Die Methoden unterscheiden sich in ihrem Wirkmechanismus und ihrer Wirksamkeit auf ein mehr oder minder breites Spektrum pathogener Viren. Sie werden gelegentlich miteinander kombiniert eingesetzt und/oder ergänzt durch dezidierte Maßnahmen zur Eliminierung von Viren. Als solche kommen in Betracht:

- Nanofiltration
 - Affinitätschromatographie
 - Verschiedene physikalische und proteinchemische Reinigungsschritte unter definierten Bedingungen
- Effektivität und Reproduzierbarkeit dieser Maßnahmen sind für jedes Präparat in Validierungsstudien zu ermitteln.

Für die Herstellung der labilen Plasmaderivate ist die gewählte Kombination der Sicherheitsschritte und

Prozeßschritte essentiell. Das angestrebte Ziel sind nicht nur die Virussicherheit, sondern, gleichrangig, die physiologische Wirksamkeit und klinische Verträglichkeit der Präparate.

Die klinischen Erfahrungen mit den nach heutigem Stand der Technik hergestellten Plasmaderivaten sind sehr gut. Dennoch, bedingt durch die Verwendung des natürlichen Rohstoffs Plasma mit den inhärenten Risikopotentialen durch epidemiologische Veränderungen Blut-assoziiierter Pathogene, sind weiter andauernde Entwicklungen der Diagnostik und der Herstellverfahren unerlässlich. Das trifft zu für nicht umhüllte Viren mit hoher Resistenz gegen die gebräuchlichen Inaktivierungs- und Eliminierungsmethoden und für den Erreger der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung. Ein effektives Zusammenwirken von universitärer und industrieller Forschung zur Erarbeitung verlässlicher Daten und sachgerechte Entscheidungen der verantwortlichen Überwachungsbehörden sind hier gefordert.

Das neue Transfusionsgesetz

Friedger von Auer

Bundesministerium für Gesundheit, Bonn

Das Transfusionsgesetz vom 1. Juli 1998

Anlaß für ein Transfusionsgesetz

Anlaß des Transfusionsgesetzes sind die unglücklichen und tragischen HIV-Übertragungen durch Blutprodukte Anfang der 80er Jahre bei etwa 2000 Personen. Empfehlungen des 3. Untersuchungsausschusses „HIV-Infektionen durch Blut und Blutprodukte“ der 12. Legislaturperiode haben zunächst zu dem HIV-Hilfegesetz von 1995 geführt. Danach erhalten die Betroffenen finanzielle Hilfe. Den Höhepunkt der fachlichen Diskussion, die den Empfehlungen des Untersuchungsausschusses folgte, bildet das Transfusionsgesetz.

Ziele des Transfusionsgesetzes

Das Gesetz will zu mehr Sicherheit der Blutprodukte und des Transfusionswesens beitragen. Es will die Versorgung der Bevölkerung mit Blutprodukten sichern. Darüber hinaus soll das Vertrauen der Bevölkerung in ein sicheres Transfusionswesen gestärkt werden.

Strukturen im Blut- und Plasmaspendewesen

Das Transfusionsgesetz nimmt Rücksicht auf die bestehenden Strukturen im deutschen Blut- und Plasmaspendewesen und ändert sie nicht. Es konkurrieren die gemeinnützigen und privatrechtlich organisierten Spendeeinrichtungen miteinander und mit den Plasmapheresezentren der Industrie.

Wesentliches Strukturelement des Transfusionsgesetzes

Das Transfusionsgesetz regelt die elementaren Grundsätze und Pflichten. Die fachlichen Details werden maßgeblich in Richtlinien der Bundesärztekammer und des Paul-Ehrlich-Instituts festgelegt.

Versorgungsauftrag

Die Spendeeinrichtungen erhalten den gesetzlichen Auftrag, Blut und Plasma zur Versorgung der Bevölkerung mit Blutprodukten zu gewinnen. Die Spendeeinrichtungen müssen dazu eng kooperieren und die Zusammenarbeit in einer Vereinbarung festlegen.

Anforderungen an die Spendeeinrichtungen

Die Spendeeinrichtungen haben die GMP-Regeln zu beachten. Die medizinische Leitung muß in den Händen von approbierten Ärzten liegen, die eine besondere Sachkunde besitzen.

Spenderauswahl

Die Blut- und Plasmaspender müssen sorgfältig ausgewählt und dürfen nur durch einen Arzt zur Spende freigegeben werden. Es wird gesetzlich vorgeschrieben, daß die Spender nach dem Stand der medizinischen Wissenschaft und Technik auf HIV-, Hepatitis B- und Hepatitis C-Infektionsmarker untersucht werden müssen. Die Mißachtung der Testvorschriften ist mit Strafe bedroht.

Aufklärung und Einwilligung der Spender

Die Spender müssen über die Spendeentnahme und die damit zusammenhängenden Untersuchungen sachkundig aufgeklärt werden. Die Einwilligung der Spende ist schriftlich festzuhalten. Darüber hinaus müssen die Spender auch darüber aufgeklärt werden, daß ihre persönlichen Daten zu bestimmten Zwecken erhoben und genutzt werden.

Aufwandsentschädigung

Das Transfusionsgesetz läßt die Zahlung einer Aufwandsentschädigung anlässlich der Blut- und Plasmaspende zu. Eine echte Bezahlung ist grundsätzlich nicht erlaubt, weil der menschliche Körper nicht zu einem Handelsobjekt verkommen darf.

Spenderimmunisierung/Vorbehandlung zur Gewinnung von Blutbestandteilen

Das Transfusionsgesetz sieht einen rechtlichen Rahmen für diese ethisch und fachlich anspruchsvollen Methoden der Blut- und Plasmagewinnung vor. Das dient vor allem dem Spenderschutz.

Spenderdokumentation und Datenschutz

Es wird die Dokumentation von Spenderdaten vor allem zum Zwecke der Rückverfolgung und zur Risikovorsorge nach dem Arzneimittelgesetz vorgeschrieben. Es werden auch die Zwecke festgelegt, für die die Daten genutzt werden dürfen. Der Datenschutz ist zu beachten.

Chargenbezogene Dokumentation

Zu den grundlegenden Anforderungen an eine ordnungsgemäße Anwendung von Blutprodukten gehört die chargenbezogene Dokumentation der verwendeten Blutprodukte. Dies dient vor allem dem Zweck der Durchführung von Rückverfolgungsmaßnahmen. Es müssen die Angaben zum Patienten, zum Präparat, einschließlich Chargennummer, und zu seiner Anwendung dokumentiert werden. Die Dokumentation muß mindestens 15 Jahre lang aufbewahrt werden.

Unterrichtspflichten

Die Einrichtungen der Krankenversorgung sind verpflichtet, im Fall des Verdachts einer schwerwiegenden Nebenwirkung eines Blutproduktes sowohl den pharmazeutischen Unternehmer als auch die zuständige Bundesoberbehörde, das Paul-Ehrlich-Institut, zu unterrichten. Die Mitteilung an die Behörde muß Mindestangaben zum Patienten enthalten, um einen Abgleich mit Daten anderer Meldesysteme zu ermöglichen.

Qualitätssicherung

Die Einrichtungen der Krankenversorgung, die Blutprodukte anwenden, müssen ein Qualitätssicherungssystem zum 7. Juli 2000 einrichten. Die Grundlagen dafür werden in Richtlinien der Bundesärztekammer und des Paul-Ehrlich-Instituts festgelegt.

Rückverfolgungsverfahren

Das Gesetz legt Regeln zur Rückverfolgung im Falle eines begründeten Infektionsverdachts bei Spender, Produkt oder Patient fest. Diese Regelungen sind in Voten des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit konkretisiert.

Epidemiologische Daten

Bestätigt positive Testergebnisse müssen jährlich in den Spendeinrichtungen erhoben und der zuständigen Bundesoberbehörde mitgeteilt werden. Dies erlaubt eine zuverlässige Einschätzung der epidemiologischen Situation in den Spenderkollektiven.

Arbeitskreis Blut

Der Arbeitskreis Blut des Bundesministeriums für Gesundheit ist auf eine gesetzliche Grundlage gestellt worden. Seine Aufgaben sind: Mitwirkung bei Verordnungen nach dem Transfusionsgesetz, Beratung der zuständigen Behörden des Bundes und der Länder, rasches Reagieren auf aktuelle (Risiko-)Entwicklungen.

Änderung des Arzneimittelrechts

Die wichtigsten Änderungen sind:

- differenzierte Sachkunderegelung für Herstellungs- und Kontrolleiter je nach Blutprodukt
- gesetzliche Klarstellung der Zulässigkeit der Abgabe von Blutgerinnungspräparaten durch den hämostaseologisch qualifizierten Arzt an seine Patienten im Rahmen der ärztlich kontrollierten Selbstbehandlung von Blutern
- sogenannte kleine Herstellungserlaubnis bei autologen Blutzubereitungen (Herstellungs- und Kontrolleiter in einer Person)
- chargenbezogene Dokumentation der Blutprodukte beim pharmazeutischen Unternehmer, Großhändler und in der Apotheke.

Selbstversorgung mit Blut und Plasma

Das Transfusionsgesetz enthält folgende Regelungen zur Förderung der Selbstversorgung:

- Erhebung von Daten für eine zuverlässige Einschätzung des Grades der Selbstversorgung (Koordiniertes Meldewesen)
- Vorschriften zur Qualitätssicherung der Anwendung von Blutprodukten, die auch zu einem rationalen und sparsamen Gebrauch beitragen sollen
- Förderung der Aufklärung der Bevölkerung über die Blut- und Plasmaspende durch Bund und Länder
- Zulässigkeit der Entschädigung für den Aufwand, den der Spender anlässlich der Blut- und Plasmaspende hat
- Regelungen zur Spenderimmunisierung, die die Gewinnung von Hyperimmunplasma erlauben.

Indikation und Anwendung von rekombinanten Gerinnungsfaktoren (Faktoren VIIa, VIII, IX)

Klaus Lechner

Universitätsklinik Wien, Innere Medizin I, Abteilung für Hämatologie und Hämostaseologie, Wien (Österreich)

Die Herstellung rekombinanter Faktor VIII-Konzentrate wurde möglich durch Aufklärung der Struktur des Faktor VIII-Gens und der In-vitro-Expression von humanem Faktor VIII in Gewebekulturen durch zwei unabhängige Gruppen in 1984. Die ersten klinischen Studien mit rekombinatem Faktor VIII begannen 1988. Es stehen derzeit drei rekombinante Faktor VIII-Konzentrate zur Verfügung, die sich in der Art der Herstellung wesentlich voneinander unterscheiden. Zwei Produkte (Kogenate und Recombinate) enthalten einen Faktor VIII, der dem natürlichen Faktor VIII entspricht, während ein Zweigenerationspräparat (Refacto) ein verkürztes Faktor VIII-Molekül (ohne die mittlere B-Domäne) enthält. Die drei Präparate unterscheiden sich bezüglich der Pharmakokinetik und der klinischen Wirksamkeit nicht von Faktor VIII-Plasmakonzentraten und voneinander. Die gentechnologisch hergestellten Faktor VIII-Konzentrate haben die Hoffnung einer vollkommenen Virussicherheit bisher erfüllt, allerdings enthalten noch zwei Konzentrate Humanalbumin, so daß theoretisch die Möglichkeit einer Virusübertragung noch gegeben ist. Die Präparate sind ausgezeichnet verträglich und gelegentlich auftretende Antikörper gegen Tierprotein haben sich als klinisch irrelevant erwiesen. Das Risiko der Antikörperbildung ist global nach rekombinanten Konzentraten gleich hoch wie nach Plasmakonzentraten, allerdings ist der relative Anteil der niedrigtitrigen und transien-

ten Antikörper bei rekombinanten Konzentraten höher. Die klinischen Studien mit rekombinatem Faktor IX begannen 1995, das Präparat (Benefix) erwies sich als gut verträglich und bei der Untersuchung der Pharmakokinetik zeigte sich, daß die Recovery des rekombinanten Faktor IX etwa 30 % geringer ist im Vergleich zu Plasmafaktor IX. Die Halbwertszeit ist jedoch identisch. Bei Studien bei vorbehandelten und nicht vorbehandelten Patienten hat sich gezeigt, daß das Präparat in seiner klinischen Wirksamkeit identisch dem Plasmafaktor IX und absolut virussicher ist. Eine Antikörperbildung wurde bisher bei zwei Patienten beobachtet (allerdings auch bei einem schon vorbehandelten Patienten). Thromboembolische Komplikationen wurden bisher nicht beobachtet. Rekombinanter Faktor VII wird in Babyhamster kidney cells als einkettige Form sezerniert und wird während der Reinigung zu Faktor VIIa aktiviert. Rekombinanter Faktor VIIa wird zur Behandlung von Patienten mit Inhibitoren gegen Faktor VIII (und IX) verwendet und erwies sich in klinischen Studien als sehr wirksam. Infolge der kurzen Halbwertszeit von Faktor VIIa muß die Einzeldosis (90 µg/kg) alle 2-3 Stunden verabreicht werden. Die Vorteile dieses Präparates gegenüber aktivierten Prothrombinkomplexpräparaten sind die komplette Virussicherheit, die geringere Wahrscheinlichkeit von thromboembolischen Komplikationen und die fehlende Stimulierung des Faktor VIII-Antikörpertiters. Der Nachteil besteht im sehr hohen Preis.

Antithrombin III in der Therapie von Patienten mit Sepsis und septischem Schock

Wolfgang Schramm

Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilian-Universität, Medizinische Klinik, München

Über lange Zeit wurde die systemische Sepsis als direkte Folge einer Überflutung des Organismus mit Edotoxinen und körpereigenen Zytokinen, vor allem Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α) und Interleukin 1 beta (IL-1 β), gesehen. Doch zeigten die Ergebnisse klinischer Studien mit monoklonalen Antikörpern gegen diese Stoffe keinen klinischen Nutzen.

Nach heutigem Verständnis kommt sowohl bakteriellen Partikeln wie auch endogenen Zytokinen lediglich die Funktion eines Auslösers zu. Der weitere Verlauf des septischen Prozesses, vor allem aber die Entwicklung eines progredienten Organversagens, ist von anderen, nachgeschalteten Mechanismen des endogenen Entzündungssystems abhängig. Hier wird zunehmend

eine unkontrollierte Aktivierung des Gerinnungssystems in der Mikrozirkulation der Organe diskutiert [1]. Der septische Prozess führt zu einer fortwährenden, endogenen Aktivierung des Gerinnungssystems, so daß sich das körpereigene Kontrollpotential (insbesondere Antithrombin III (AT III) allmählich erschöpft und ein gerinnungsspezifischer Circulus vitiosus entsteht. Die Gefahr wird am eindrucksvollsten dadurch dokumentiert, daß der Abfall der AT III-Aktivität eng mit der Letalität der Patienten korreliert. Ein Abfall unter 50 % der Norm prognostiziert den späteren Tod des Patienten mit einer Sensitivität von 95 % und einer Spezifität von 76 % ($p < 0,001$) [2].

AT III gilt als der wichtigste physiologische Regulator der Blutgerinnung, da er die Gerinnung auf mehreren Ebenen zu inhibieren vermag. Neben der Gerinnungsendstrecke (Faktor (F) Xa, Thrombin) inhibiert AT III auch den intrinsischen (F XIa, F IXa) und den extrinsischen (an Gewebethromboplastin gebundenen F VIIa) Schenkel der Gerinnung [3].

Bei Patienten mit Sepsis wurde die Indikation zum Einsatz von AT III über lange Jahre hinweg vorwiegend unter gerinnungsspezifischen Gesichtspunkten gestellt. Zahlreiche klinische Studien belegen den therapeutischen Nutzen von AT III in der Therapie und Prophylaxe der Verbraucherkochagulopathie bei diesen Patienten.

Neuere präklinische Untersuchungen legen jedoch den Schluß nahe, daß sich der therapeutische Nutzen von AT III nicht allein auf seine gerinnungshemmenden Eigenschaften beschränkt. AT III scheint einen zusätzlichen anti-inflammatorischen Wirkmechanismus zu besitzen.

Eine Erklärung für das anti-inflammatorische Potential von AT III könnten Erkenntnisse zur AT III-Endothel-Interaktion in der Mikrozirkulation der Organe liefern. Es wurde sowohl *in vitro* als auch im Rattenmodell gezeigt, daß die Bindung von AT III an Glykosaminoglykane des Gefäßendothels (über das Heparin-bindende Zentrum) zur unmittelbaren Freisetzung von Prostacyclin (PGI₂) führte.

Die Freisetzung von PGI₂ hatte verschiedene eindeutig anti-inflammatorische Reaktionen zur Folge:

PGI₂ reduzierte die Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus Zytokin/Endotoxin-aktivierten Neutrophilen, es verminderte die Freisetzung von TNF α aus Zytokin/Endotoxin-aktivierten Monozyten und setzte die Aggregabilität von Thrombozyten in der Mikrozirkulation herab. Hierdurch verbesserte sich nicht zuletzt die Sauerstoffversorgung der Organe [4-6].

In einem weiteren Modell konnte gezeigt werden, daß AT III das durch Thrombin induzierte „rolling“ von Leukozyten sowie deren Adhäsion ans Gefäßendothel verhindern kann. Als Folge daraus wurde die Rekrutierung von Leukozyten sowie die Extravasation reduziert [7]:

Wenn AT III einen anti-inflammatorischen Effekt auslöst, müßte die Praxis der AT III Therapie seine Interaktion mit dem Endothel berücksichtigen. Die postulierte Bindung von AT III an die Glykosaminoglykane des Endothels vollzieht sich über dessen Heparin-bindendes Zentrum. Das anti-inflammatorische Potential von AT III wird durch gleichzeitige Gabe von Heparin aufgehoben, da Heparin das Heparin-bindende Zentrum blockiert und damit die Interaktion von AT III mit dem Endothel unterbindet. Daher ist in der Therapie der Sepsis mit AT III die

gleichzeitige Gabe von Heparin nur in prophylaktischer Dosierung indiziert.

Um eine gültige Antwort für das Vorgehen in Zukunft zu geben, wurde eine Reihe von klinischen Studien der Phase II an Patienten mit schwerer Sepsis durchgeführt. Alle drei Studien waren multizentrisch, prospektiv, randomisiert, doppelblind und Placebo-kontrolliert. Die Definition der Patientenpopulation orientierte sich an den anerkannten Kriterien von Bone [8]. Primäre Zielgröße aller drei Studien war das Überleben bis Tag 30.

AT III wurde über 5-7 Tage verabreicht. Die Bolusgabe lag bei 3000 bzw. 6000 IE AT III, die Gesamtdosierung lag zwischen 18 000 und über 30 000 IE AT III

In allen drei Studien war die 30-Tage-Sterblichkeit in der Primäranalyse („Intention-to treat“ Population) in der AT III-Gruppe geringer im Vergleich zur Placebo-Gruppe. Die Resultate waren aufgrund der kleinen Fallzahlen (35-45 Patienten) statistisch nicht signifikant.

Die Ergebnisse dieser drei klinischen Prüfungen gingen in eine Metaanalyse ein und stellten die Auswertung auf eine breitere Patientenbasis [9]. Die Metaanalyse umfaßte 122 Patienten (AT III 60; Placebo 62). Die Verteilung der Patienten unter der Berücksichtigung des Schweregrades ihrer Erkrankung (APACHE II und SAPS) sowie weiterer demographischer Charakteristika war in beiden Gruppen vergleichbar. Primäres Zielkriterium der Metaanalyse war die 28-Tage-Sterblichkeit. Während 45% der mit Placebo behandelten Patienten innerhalb von 28 Tagen verstarben, trat der Tod bei den mit AT III behandelten Patienten in diesem Zeitraum nur in 35 % der Fälle ein. Dies entspricht einer relativen Senkung der 24-Tage-Letalität um 22.5 % (nicht signifikant).

Des Weiteren wurde eine pharmakokinetische Studie mit AT III in Patienten mit schwerer Sepsis durchgeführt. Zum einen sollte die Pharmakokinetik zweier verschiedenen Therapieschemata mit AT III bei Patienten mit schwerer Sepsis charakterisiert werden. Zum anderen sollten die beiden Hochdosis-Therapieschemata daraufhin untersucht werden, ob die funktionellen AT III-Plasmaspiegel von niedrigen Ausgangswerten auf über 120 % angehoben werden und über mindestens 4 Tage auf dem erhöhten Spiegel gehalten werden können.

Die Studie war offen, randomisiert kontrolliert und multinational angelegt. Die Patienten erhielten randomisiert eine von zwei Hochdosisbehandlungen (30 000 IE AT III über 4 Tage) beginnend mit einem Bolus über 6000 IE dann entweder 6000 IE/Tag als Dauerinfusion oder als intermittierende intravenöse Bolusinfusionen. Die 28-Tage-Gesamtletalität betrug 30 %, die mit dem SAPS II-Score vor Therapiebeginn vorhergesagte 28-Tage-Gesamtletalität betrug 45 %. Damit wurden die Ergebnisse der Metaanalyse untermauert.

Bei beiden Therapieschemata erhöhten sich die AT III-Plasmaspiegel gegenüber den niedrigen Ausgangswerten auf über 120 % (median 200 %) und blieben bei diesen Werten bis zum Ende der Behandlungsphase von 4 Tagen. Die mittlere Eliminationshalbwertszeit bei Patienten mit schwerer Sepsis (vergleichbar bei beiden Dosierungsschemata) war etwas kürzer als bei gesunden Freiwilligen (18,9 vs. 21,7 Stunden). Außerdem wurde die Dauerinfusion im Hinblick auf die Praktikabilität von den Untersuchern leicht bevorzugt.

Aufgrund der Ergebnisse der bisher durchgeführten Phase II-Studien wurde eine Phase III-Studie geplant, um die Wirksamkeit von AT III bei Patienten mit schwerer Sepsis in Form einer Senkung der 28-Tage-Letalität statistisch signifikant zu belegen. Das Design der Studie ist prospektiv, multinational, doppelblind, randomisiert und plazebo-kontrolliert. Es sollen 2300 auswertbare Patienten mit schwerer Sepsis aus 200 Zentren in Europa, Südafrika, Israel, USA, Brasilien, Australien und Neuseeland in die Studie eingeschlossen werden. Das primäre Studienziel ist die Senkung der 28-Tage-Gesamtletalität. Wie in allen vorangegangenen Studien soll auch die Sicherheit von AT III vs. Plazebo bei Patienten mit schwerer Sepsis untersucht werden. Die Dosierung richtet sich nach der Hochdosistherapie der Pharmakokinetikstudie mit der von den Prüfern bevorzugten Dauerinfusion (Gesamtdosis 30 000 IE. 6000 IE als Bolus + 6000 IE/Tag für 4 Tage). Die Einschlußkriterien orientieren sich wie bei den Vorgängerstudien an den Kriterien von Bone [8].

Die Studie verläuft bisher nach Plan. Das Design wurde von den wichtigsten Behörden (z. B. FDA und MCA) akzeptiert. Der erste Patient wurde wie ge-

plant eingeschlossen, die Rekrutierung verläuft voraussichtlich bis Ende 1999. Die erste Zwischenauswertung ist in Vorbereitung und nach drei Sicherheitsauswertungen von einem unabhängigen Gremium (Data and Safety Monitoring Board) bestehen keine Sicherheitsbedenken. Bisher wurden mehr als 1000 Patienten aus über 150 aktiven Zentren weltweit rekrutiert.

Literatur

- [1] Thijs, L. G. et al., *Intensive Care Med.* **19**, 8 (1993)
- [2] Fourrier, F. et al., *Chest* **101**, 816 (1992)
- [3] Rao, L. V. M. et al., *Blood* **85**, 121 (1995)
- [4] Yamanouchi, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **163**, 1404 (1989)
- [5] Horie, S. et al., *Thromb. Res.* **59**, 895 (1990)
- [6] Okajimna, K. et al., in: J. L. Vincent (ed.), *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine*, p. **457** (1995)
- [7] Ostrovsky, L. et al., *Circulation* **96**, 7 (1997)
- [8] Bone, R. C., *Hosp. Pract.* **26**, 101 (1991)
- [9] Eisele, B. et al., *Intensive Care Med.* **24** (1998)

Current Status of Gene Therapy in Haemophilia A and B

Ian Peake

Division of Molecular and Genetic Medicine, University of Sheffield, Royal Hallamshire Hospital, Sheffield (Great Britain)

The cloning and expression of the factor IX (FIX) and factor VIII (FVIII) genes was reported in the 1980's and a cure for haemophilia B and A by gene therapy then became a possibility. In spite of considerable hurdles still to be overcome this goal is still attainable. In this short review I shall summarise the important advances that have been made, particularly in gene delivery technology.

Gene delivery vectors can be divided into viral and non-viral based constructs. The most popular have been those based on viruses, in particular retroviruses, adenoviruses and more recently adeno-associated viruses (parvo-viruses). Non viral based constructs have, in the main, proved to be inefficient. Most retroviral based constructs have been based on amphotrophic murine leukaemia viruses (MLV). Although retrovirus based vectors have the advantage of stably transducing cells by genomic integration, drawbacks and limitations include a requirement for cell division, a size limitation on the incorporated gene (cDNA) of < 7.0 kb, low viral stock titres and associated difficulties in concentration for production purposes and inefficient cell targeting. There is also a concern that the integrated Vector could lead to the inappropriate expression of other gene(s) to produce a disease state.

Adenoviral based vectors have no cell division requirement for transduction and do not result in genomic integration. However they are pathogenic and can lead to cell death. Even so high copy numbers can be transduced into cells resulting in high levels of transient gene expression. Restrictions to insert size also apply (maximum 8.0 kb).

Adeno-associated viruses (AAV) based vectors have recently been introduced. These are based on a non-pathogenic (in humans) Virus, do not require recipient cell division for transduction and, in the wild type, integrate into human chromosome 19. AAVs have been described as a defected parasite, requiring a helper Virus (adenovirus) for a normal life cycle. The AAV has a broad host range, but the helper Virus is species specific.

DNA in the form of plasmids can be used to transfect cells. This process of endocytosis is however inefficient, although it can be enhanced by forming complexes with other Proteins (e.g. polylysine) which allows the DNA to be condensed and stabilised [1]. The Contents of the endosome are also rapidly destroyed by the action of lysozymal enzymes, although this process can be reduced to some extent by the incorporation of a replication defective adenoviral particle.

In vitro and in vivo experiments have shown that most cells, once transduced with the FIX or FVIII cDNA will produce and release biologically active clotting factor. However the introduction of the complete FVIII cDNA into the viral based vectors is not possible in most cases because of insert size limitations. A shortened FVIII cDNA, lacking the region encoding the B domain (del B FVIII) has been successfully used and the recombinant equivalent of this molecule has been shown to be clinically effective in treating haemophilia A [2]. Most cells appear to be able to undertake the post translational modifications necessary to produce FVIII and FIX with normal biological activity. However, it is also apparent that certain tissues are less efficient than others in releasing the clotting factor into the blood, e.g. FVIII release from muscle is poor [3].

Gene therapy can be performed using either ex vivo or in vivo approaches. The latter procedure is naturally more convenient, but because of the requirement for active cell division to allow successful retroviral transduction, the former procedure was used for most of the initial experiments. Once fibroblasts from both normal and haemophilic dogs had been shown to produce in vitro biologically active FIX after transduction with a retroviral construct containing the canine FIX gene [4], a series of publications, reviewed by Thompson [5], appeared in which a variety of cell types were transduced and shown to produce FIX both in culture and after re-transplantation. The levels seen in vivo were however very low, often they were transient and many of the experiments involved cross-species studies in which allo-antibody production only served to complicate the results. Switching off of the promoter sequence used to drive FIX production (often a promoter sequence from human cytomegalovirus) was also noted. These studies were, however, enough to encourage Hsueh and colleagues in Shanghai, PR of China to perform the, as yet, only human gene therapy experiment in two brothers with mild/moderate haemophilia B (2.0 % FIX) [6]. Autologous skin fibroblasts were obtained from each individual and were genetically modified ex vivo by retroviral mediated gene transfer of the human FIX gene. After in vitro studies had demonstrated FIX production, the cells were mixed with Collagen and injected back into the donor subcutaneously. A series of such injections were performed over a period of 2.5 years. A doubling of the plasma FIX levels was seen in both boys and an improvement in Clinical Symptoms was reported for up to 420 days. These studies have yet to be confirmed.

The initial in vivo gene therapy experiments in large animals were performed on a colony of haemophilia B dogs. Experiments were performed on partially hepatectomised (to induce hepatocyte cell division and so allow for retroviral transduction of the hepatocytes) severely affected haemophilia B dogs [7]. They were injected via the hepatic portal vein with a retroviral based construct containing the canine FIX cDNA. About 1 % of the liver cells were transduced and prolonged FIX expression was reported, but at sub-clinical plasma levels (about 0.1 %). This was however sufficient to reduce the whole blood clotting time significantly. In a second series of experiments an adenoviral based vector was used (partial hepatectomy was not necessary) [8]. A 25 % cellular transduction rate was achieved, resulting in rapid haemophilia cure (300 % FIX). However this was short last-

ing and levels had fallen to < 1.0 % after 3 weeks. This experiment could not be repeated in the same dogs since they had produced antibodies to adenoviral antigens expressed by the FIX Vector. These two series of experiments served to highlight the essential problems with such vectors: low expression with retroviral Systems and transient expression with adenoviral systems which could not be repeated.

Most of the early studies utilised FIX cDNA for two reasons; the size of the cDNA (1.8 kb) and the stability of the FIX product. Because of the size restriction noted above for viral vectors, a truncated FVIII cDNA has been used in FVIII gene therapy studies. However there are DNA sequences within the FVIII cDNA which appear to limit the ability to produce high titre retroviral FVIII cDNA preparations [9], and sequences are also present in the FVIII cDNA which impair release of FVIII from transduced cells by binding it to intracellular molecules, in particular BiP [10]. It has been shown that mutant FVIII F309S shows increased cellular release presumably resulting from reduced intracellular binding [11]. Attempts have been made to overcome many of the problems highlighted in the initial experiments. These include the inclusion of better tissue specific promoters, the pseudotyping of retro- and adenoviruses to improve cell targeting and efficiency and the blocking of the immune response seen with adenoviral vectors.

The Tissue specific promoters have been isolated for several tissues including the albumin gene promoter (liver) [12], the beta-actin promoter plus the muscle creatine kinase enhancer sequence (muscle) [12] and the keratin 14 promoter (skin) [13]. Dwarki et al. in 1995 [14] reported a significant advance with a retroviral based MFG vector system and the human del B FVIII cDNA. This vector permitted the efficient transduction of the majority of primary cells in culture and high levels of FVIII were produced. Following transplantation of primary fibroblasts into mice therapeutic levels of FVIII were seen in plasma for > 7 days. Greengard and colleagues have recently reported sustained high level FVIII expression in immunocompetent rabbits and dogs following peripheral intravenous injection of another retroviral based vector [15]. In several rabbits therapeutic levels of FVIII were present after 400 days. Wang and colleagues have used myoblast gene transfer to demonstrate the efficacy of a plasmid based vector based on a retroviral frame [16]. A construct containing a human FIX mini-gene under the control of the beta actin promoter and MCK enhancers was used to transduce isolated myoblasts which were then transplanted back into the recipient. Long term expression of low levels of FIX was observed.

Most retroviruses will only transduce dividing cells. However the human immunodeficiency lentivirus (HIV) will transduce cells blocked in cell cycle and terminally differentiated. Verma and colleagues [17] have recently shown that lentiviruses pseudotyped with vesicular stomatitis virus G glycoprotein will transduce a broad range of tissues and cell types, and can introduce genes directly into liver and muscle.

Progress with adenoviral based vectors has focused on the immunological problems seen [18]. Immunosuppressive drugs can be used but this approach would probably be unacceptable in a haemophilic who may be already immunocompromised. Removal of further adenoviral genes from the Vector construct can im-

prove the Situation (guttated viruses). Connelly and associates [19] have recently reported on the use of an adenoviral based human del B FVIII cDNA vector which gives, following intravenous injection, high levels of human FVIII in normal and haemophilia A mice and in FVIII deficient dogs. This response was, however again only transitory in the dog, due to cross species anti human FVIII antibody production. The recent cloning of the canine FVIII gene will provide a much better model for these dog studies [20].

The most exciting developments in the field of viral vectors appear to be those concerning the use of AAV based vectors. They have been shown to readily transduce both dividing and non-dividing cells and to be non-pathogenic in humans. Although their preparation is complicated and contamination with pathogenic helper adenovirus is still a possibility, encouraging results have been seen. Herzog and colleagues [21] have shown stable gene transfer and expression of human FIX in immunocompromised mice following direct muscle injection of an AAV based human FIX cDNA Vector. Similar expression in liver has also been reported following hepatic portal vein injection by Snyder and colleagues [22]. Monahan and colleagues have now reported sustained expression of FIX in a dog model of haemophilia B following direct intramuscular injection of a recombinant AAV Vector carrying the human FIX cDNA [23].

Immunology still has a significant role to play, not only in understanding and controlling the immunological responses seen in particular with adenoviral based Systems, but in anticipating problems within the patients themselves when exposed to foreign antigens both within the transduced-cells and in the circulation. Our understanding of the immunology of inhibitor production seen in up to 30 % of haemophilia A patients is incomplete. Other problems might include the fact that up to 80 % of humans will have pre-existing antibodies to AAV

References

[1] Cristiano, R. J., Smith, L. C., Kay, M. A. et al., Hepatic gene therapy: Efficient gene delivery and expression in primary hepatocytes utilizing a conjugated adenovirus - DNA complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11548 (1993)

[2] Fijnvandraat, K., Berntorp, E., tenCate, J. W. et al., Recombinant, B-domain deleted factor VIII (r-VIII SQ): Pharmacokinetics and initial safety aspects in hemophilia A patients. *Thromb. Haemost.* **77**, 298 (1997)

[3] Zatloukal, K., Cotten, M., Berger, M. et al., In vivo production of human factor VIII in mice after intrasplenic implantation of primary fibroblasts transfected by receptor-mediated, adenovirus-augmented gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5148 (1994)

[4] Axelrod, J. H., Read, M. S., Brinkhous, K. M. et al., Phenotypic correction of factor IX deficiency in skin fibroblasts of hemophilic dogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5173 (1990)

[5] Thompson, A. R., Progress towards gene-therapy for the Hemophilias. *Thromb. Haemost.* **74**, 45 (1995)

[6] Xinfang, Q., Daru, L., Jiemin, Z. et al., Implantation of autologous skin fibroblast genetically modified to secrete clotting factor IX partially corrects the hemorrhagic tendencies in two hemophilia B patients. *Chin. Med. J.* **109**, 832 (1996)

[7] Kay, M. A., Rothenberg, S., Landen, C. N. et al., In vivo gene therapy of Hemophilia B: Sustained partial correction in factor IX-deficient dogs. *Science* **262**, 117 (1993)

[8] Kay, M. A., Landen, C. N., Rothenberg, S. R. et al., In vivo hepatic gene therapy: Complete albeit transient correction of factor IX deficiency in hemophilia B dogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2353 (1994)

[9] Koeberl, D. D., Halbert, C. L., Krumm, A. et al., Sequences within the coding regions of clotting factor VIII and CFTR block transcriptional elongation. *Hum. Gene Ther.* **6**, 469 (1995)

[10] Marquette, K. A., Pittman, D. D., Kaufman, R. J., A 110 amino acid region within the A1-domain of coagulation factor VIII inhibits secretion from mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 10297 (1995)

[11] Swaroop, M., Moussalli, M., Pipe, S. et al., Mutagenesis of a-potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of Coagulation factor VIII. *J. Biol. Chem.* **272**, 24121 (1997)

[12] Wang, J. M., Zheng, H., Sugahara, Y. et al., Construction of human factor IX expression vectors in retroviral vector frames optimized for muscle cells. *Hum. Gene Ther.* **7**, 1743 (1996)

[13] Wang, A. M., Zinkel, S., Polonski, K. et al., Transgenic studies with a keratin promoter-driven growth hormone transgene: Prospects for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 219 (1997)

[14] Dwarki, V. J., Belloni, P., Nijjar, T. et al., Gene therapy for hemophilia A: Production of therapeutic levels of human factor VIII in vivo in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1023 (1995)

[15] Proceedings of the International Symposium on Gene Therapy for Haemophilia. The University of North Carolina, Chapel Hill (USA), Sept. 4-6, 1997

[16] Wang, J.-M., Zheng, H., Blaivas, M. et al., Persistent systemic production of human factor IX in mice by skeletal myoblast-mediated gene transfer. Feasibility of repeat application to obtain therapeutic levels. *Blood* **90**, 1075 (1997)

[17] Karfi, T., Blomer, U., Peterson, D. A. et al., Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat. Gen.* **17**, 314 (1997)

[18] Dai, Y., Schwarz, E. M., Gu, D. et al., Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: Tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1401 (1995)

[19] Connelly, S., Mount, J., Mauser, A. et al., Complete short-term correction of canine hemophilia A by in vivo gene therapy. *Blood* **88**, 3846 (1996)

[20] Cameron, C., Notley, C., Hoyle, S. et al., The canine Factor VIII cDNA and 5' Flanking sequence. *Thromb. Haemost.* **79**, 317 (1998)

[21] Herzog, R. W., Hagstrom, J. N., Kung, S. H. et al., Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5804 (1997)

[22] Snyder, R. O., Miao, C. H., Patijn, G. A. et al., Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat. Genet.* **16**, 270 (1997)

[23] Monahan, P. E., Samulski, R. J., Tazelaar, J. et al., Direct intramuscular injection with recombinant AAV vectors results in sustained expression in a dog model of hemophilia. *Gene Ther.* **5**, 40 (1998)

Therapie mit Fresh Frozen Plasma (FFP) statt Einzelfaktoren?

Marcel U. Heim

Universitätsklinikum Otto-von-Guericke, Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie mit Blutbank, Magdeburg

Im FFP sind alle Stoffe des Humanplasmas, insbesondere die Gerinnungsfaktoren und deren Inhibitoren enthalten und zwar je 1 Einheit pro Milliliter. Daher können in den heute *üblicherweise nur 200 ml Plasma enthaltenden „FFP-Beuteln“ maximal 200 Einheiten an Faktoren enthalten sein; eine Tatsache, die meist nicht beachtet wird. Da bei der perioperativen FFP-Gabe neben dem Ersatz von Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren auch der gleichzeitige „physiologische“ Volumenersatz als günstig betrachtet wird („da ist alles drin“), kommt diese Therapie auch bei spezifischen Gerinnungsstörungen zum Einsatz. Demgegenüber fordern zurecht die Leitlinien zur Hämotherapie der Bundesärztekammer (BÄK) als alleinige Indikation zur FFP-Gabe die globale Gerinnungsstörung. Streng genommen zeigen allerdings viele Studien, daß das FFP als gerinnungsaktives Produkt nur in seltenen Fällen indiziert ist und zudem seine hämostaseologische Wirkung meist maßlos überschätzt wird („Hämotherapie nach Maß!“). Bei vergleichenden Untersuchungen zwischen FFP und reinen Volumenersatzlösungen (Albumin oder Kolloide) lassen sich i.d. R. bei den Patienten keine Unterschiede für den klinischen Nutzen nachweisen, so daß bis auf wenige Ausnahmen dem reinen Volumenersatz der Vorzug gegeben werden sollte. Außerdem

konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, daß selbst bei massiven Blutverlusten mit hohem Substitutionsbedarf an Erythrozyten durch eine strenge normovolämische Substitution das Auftreten von Gerinnungsstörungen verhindert werden kann. Nach den Erfahrungen beim therapeutischen Plasmaaustausch läßt sich zudem zeigen, daß das Ausmaß einer intraoperativen Verdünnungskoagulopathie von den Ärzten häufig übertrieben eingeschätzt wird. Interessanterweise verzichten auch einzelne Transplantationszentren bei Patienten mit Leberversagen trotz stark eingeschränkter Syntheseleistung an Gerinnungsfaktoren auf die intraoperative Gabe von FFP ohne erkennbare Nachteile für ihre Patienten.

Die spezifischen Gerinnungsfaktorenkonzentrate sind nach dem derzeitigen Kenntnisstand nicht nur zumindest mit dem FFP vergleichbar frei von möglichen Infektionserregern, sondern können auch perioperativ ohne Volumenbelastung die notwendige Menge an Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren ersetzen. Nicht zuletzt stünde jedes in den Kliniken nicht mißbräuchlich verwendete FFP für die industrielle Fraktionierung von Gerinnungsfaktoren- und Inhibitorkonzentraten zur Verfügung, wodurch auch der Import ausländischen Plasmas entlastet werden könnte („Nationale Selbstversorgung“).

Therapie mit polyvalenten Immunglobulinen

Volker Wahn

Universitätskinderklinik, Düsseldorf

Immunglobuline sind die Effektormoleküle der spezifischen humoralen Immunität. Sie werden von Plasmazellen sezerniert, welche sich im Zuge eines komplizierten Differenzierungsvorganges aus B-Vorläuferzellen entwickeln. Jeder Mensch bildet im Laufe seines Lebens eine große Zahl verschiedener Antikörper, die dann durch geeignete technologische Verfahren aus Blutplasma gereinigt und konzentriert werden können. Durch Bildung von Spenderpools wird erreicht, daß in einem Immunglobulinkonzentrat Antikörper gegen praktisch alle vorkommenden Viren und

Bakterien vorhanden sind, insbesondere dann, wenn die Pools von einheimischen Spendern gewonnen wurden. Derzeit verfügbare Konzentrate enthalten praktisch nur Immunglobulin G (IgG)-Antikörper, die das Produkt einer humoralen Sekundärantwort auf ein Antigen repräsentieren. Physiologischerweise sind solche IgG-Antikörper verantwortlich für bleibende humorale Immunität.

Die Hauptfunktionen des IgG-Moleküls lassen sich den wichtigsten Strukturen zuordnen: Über das F(ab)₂-Fragment (ab = Antigen-Bindung) werden

Neutralisation, Agglutination und Präzipitation von Fremdanthigenen vermittelt, über das FC-Fragment (c = constant, crystallizable) die Komplementaktivierung und die Bindung an Fc-Rezeptoren. Letztere hat erhebliche Bedeutung für die immunmodulatorische Potenz der Präparate.

Entsprechend ihren Funktionen können polyvalente Immunglobulinpräparate (IVIG) mit zwei Hauptzielsetzungen klinisch eingesetzt werden: Substitution fehlender Antikörper und Modulation bestimmter immunpathologischer Prozesse.

Antikörpermangel kann im menschlichen Organismus aus zwei Gründen vorliegen:

1. Der Organismus ist zwar immunkompetent, hat aber noch keinen Antigenkontakt gehabt. Ein Beispiel für die Anwendung von IVIG in einer solchen Situation ist die passive Immunprophylaxe gegen Hepatitis A, z. B. bei Touristen.
2. Der Organismus ist für humorale spezifische Immunreaktionen absolut oder relativ inkompetent. Beispiele sind das primäre Antikörpermangelsyndrom oder der relative Antikörpermangel bei HIV-Infektion.

Während zur Substitution von Antikörpern vergleichsweise niedrige Dosierungen erforderlich sind (meist 300-400 mg/kg KG/Monat), werden für die Immunmodulation Dosierungen von bis zu 2 g/kg KG benötigt.

Bei einigen Erkrankungen ist eine klinische Wirkung in Plazebo-kontrollierten Studien zweifelsfrei belegt. Dabei gibt es mit großer Wahrscheinlichkeit nicht einen Mechanismus, über den die Immunglobuline wirken, sondern mehrere. Am Beispiel der Immunthrombopenie werden einige der experimentell überprüften Mechanismen erläutert.

Hochdosiertes IVIG (HDIVIG) ist inzwischen bei einer sehr großen Zahl von Erkrankungen erprobt wor-

den, bei denen pathogenetisch Immunprozesse vermutet werden. Bei relativ wenigen Erkrankungen liegen Plazebo-kontrollierte Studien vor. In einigen Studien wurden unbehandelte Kontrollgruppen mit analysiert, oder aber Dosis-Wirkungs-Beziehungen untersucht. Überwiegend liegen aber offene Studien oder anekdotische Fallmitteilungen vor, die eine Wirkung vermuten lassen, aber nicht belegen. Einige der Publikationen beziehen sich dabei auf derart seltene Erkrankungen, daß hier der Ruf nach Plazebo-Studien unsinnig wäre. So erfolgt die Therapie auf der Basis von trial and error, was insbesondere in der Pädiatrie legitim erscheint, ist doch die Verträglichkeit der Immunglobuline erfahrungsgemäß gut. Bei häufigeren Erkrankungen bleibt zu hoffen, daß in Zukunft qualitativ bessere und aussagekräftigere Studien folgen werden.

Bisher wurde HDIVIG in folgenden Bereichen der Medizin eingesetzt:

- hämatologische Erkrankungen
- rheumatische Erkrankungen
- Vaskulitiden
- neurologische Erkrankungen
- allergische Erkrankungen
- wenige andere.

Ein Expertenkommittee der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Immunologie (API) hat versucht, den vorliegenden Datenbestand bei pädiatrischen Erkrankungen zu sichten und zu bewerten. Die Ergebnisse dieser Diskussionen werden vorgestellt. Bei der Bewertung sind die Autoren davon ausgegangen, daß die derzeit auf dem Markt befindlichen Präparate höchsten Sicherheitsanforderungen insbesondere im Hinblick auf Virussicherheit genügen. Sollten Fälle von Übertragungen etwa von Hepatitis C über die Immunglobuline nachgewiesen werden, müßte eine Neubewertung der Nutzen/Risiko-Relation vorgenommen werden.

Sozioökonomische Evaluation der Therapie mit Blut- und Plasmaprodukten am Beispiel der Hämophilie

Thomas Szucs und Wolfgang Schramm

Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität, Medizinische Klinik, München

Einleitung

In den letzten Jahrzehnten konnten durch eine, den Bedürfnissen des Patienten angepaßte Substitutionstherapie eine durchschnittliche Lebenserwartung bei hämophilen Patienten erzielt werden. Auch die soziale und berufliche Integration und die Lebensqualität konnte entscheidend verbessert werden. Vor dem Hintergrund der stetig wachsenden Ausgaben im Gesundheitswesen, müssen Therapiekonzepte zunehmend im Hinblick auf die wirtschaftliche Belastung

des Arzneimittelbudgets geprüft werden. Die Bedeutung einer ökonomischen Untersuchung der Hämophiliebehandlung wird besonders deutlich, berechnet man den jährlichen Faktorverbrauch in Deutschland. Eine Hochrechnung aufgrund der Konsensusempfehlung zur Substitutionstherapie der Hämophilie von 1993 ergab einen geschätzten Verbrauch an Faktor VIII von 200 Millionen Einheiten pro Jahr. Eine Einheit Faktor VIII kostet ca. 1 DM. Im Rahmen einer ökonomischen Evaluation werden verschiedene The-

rapieschemata entsprechend ihrem Nutzen und ihren Kosten miteinander verglichen. Ziel dieser Studie war die wirtschaftlichen Aspekte der Hämophiliebehandlung, die Nutzwertfunktionen und die Lebensqualität hämophiler Patienten erstmals in einer großangelegten Europäischen Studie zu untersuchen.

Fragestellung

Folgende Fragen wurden in unserer Münchner Pilotstudie zur sozioökonomischen Analyse der Hämophilie untersucht: 1. Was läßt sich über die sozioökonomischen Kosten und den sozioökonomischen Nutzen unterschiedlicher Therapieschemata aussagen? 2. Wie hoch ist der Ressourcenverbrauch bei diesen Patienten? 3. Was kann über die Nutzwertfunktion bei Hämophilen ausgesagt werden? 4. Welchen Einfluß hat die Therapie auf die Lebensqualität?

Methode

In einer retrospektiven Kohortenstudie wurden konsekutive Patienten mit schwerer oder mittelschwerer Hämophilie A oder B erfaßt, die im Hämophiliezentrum behandelt und betreut werden. Folgende Parameter wurden bei allen Patienten erhoben: Demographie und sozialer Status (Arbeitsverhältnis während der letzten sechs Monate, das monatliche Bruttoeinkommen und die Erwerbsquote), Substitutionstyp (Behandlung bei Bedarf, Prophylaxe und modifizierte Prophylaxe), Status der mit den Gerinnungsfaktoren übertragenen Erkrankungen, physischer Status der Gelenke, Lebensqualität mittels SF-36 Instrument, individuellen Nutzwerte (Utility) nach Torrance, Ressourcenverbrauch (Arztbesuche, Hospitalisationen, Faktorverbrauch), Länge der Arbeitsunfähigkeit aufgrund der Hämophilie.

Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden total 1042 Patienten untersucht. Insgesamt wurden 338 (33 %) der Patienten mit prophylaktischer Therapie behandelt, wogegen fast zwei Drittel (674 Patienten) eine Therapie bei Bedarf erhielten. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 34.7 ± 13.8 Jahre das Gewicht 72.1 ± 15.6 kg. Insgesamt 83 % der Patienten litten unter einer Hämophilie A, 31 % waren HIV positive und

8 % litten unter einer symptomatischen AIDS-Infektion. Der überwiegende Anteil der Patienten (82 %) hatten eine schwere Hämophilie mit Faktor VIII-Aktivität unter 2 %. Bei 16 % lag eine mittelschwere Hämophilie vor. Bezüglich der Erwerbsquote fanden wir keine Unterschiede zwischen Patienten mit prophylaktischer Therapie und solchen, welche bei Bedarf behandelt wurde. Hingegen wiesen die prophylaktisch behandelten Patienten signifikant weniger Gelenksblutungen auf (3.4 ± 6.3) versus 7.7 ± 11.1 , $p = 0.0001$). Dieser Unterschied war verstärkt bei Patienten mit schwerer Hämophilie und HIV negativen Patienten. Im Durchschnitt betrug der stationäre Aufenthalt auf der Normalstation 0.29 ± 3.3 Tage und 0.1 ± 1.5 Tage auf der Intensivstation. Die mittlere Anzahl von Arztbesuchen betrug 0.2 ± 1.1 beim Hausarzt und 0.9 ± 3.3 im Hämophiliezentrum. Die mittlere Anzahl Arbeitsunfähigkeitstage betrug 3.0 ± 13.9 bei den Patienten und 0.1 ± 1.1 bei den Angehörigen. Die Bestimmung der Nutzwerte ergab einen Mittelwert von 0.75 ± 0.17 . Der Faktor VIII-Verbrauch betrug 47.2 ± 53.3 U/kg/Woche im gesamten Kollektiv, 24.6 ± 46.2 U/kg/Woche bei Bedarfstherapie sowie 63.2 ± 53.9 U/kg/Woche bei Patienten mit Prophylaxe.

Diskussion

In Anbetracht des stark belasteten Gesundheitshaushaltes werden sozioökonomische Analysen verschiedener Therapieprinzipien in Zukunft vermehrt an Bedeutung gewinnen. Die Kosten der akuten Therapie einer frischen Gelenksblutung und der chronischen Therapie hämarthrotischer Gelenke belasten deutlich die Ressourcen des Gesundheitsbudgets. Die Höhe der Ausgaben zur Therapie der Hämophilie wird v. a. von den Kosten für die Gerinnungsfaktoren und von dem Therapieschema bestimmt. Die bedarfsgerechte und die prophylaktischen Substitutionstherapie mit Gerinnungsfaktoren, sollen die Aufwendungen für ambulante / stationäre Klinikbesuche und zusätzliche Medikamente, wie z. B. Antiphlogistika oder Analgetika, deutlich reduzieren. Da Patienten, die gemäß einer modifizierten Prophylaxe substituieren, seltener eine Gelenksblutung erleiden, sind Folgekosten geringer. In Kenntnis der Kosten und des wirtschaftlichen Nutzens der Vermeidung einer zusätzlichen Gelenksblutung, ist eine prophylaktische Therapie v. a. im Kindes- und Jugendalter auch aus gesundheitsökonomischer Sicht empfehlenswert.

Pre-clinical and Early Clinical Experience Using Dendritic Cells to Treat Human Malignancy

Lothar Kanz, Peter Brossart, Gernot Stuhler, Volker Reichardt, Annette Kleihauer, Stefan Scheduling, Stefan Stefanovic, Hermann Einsele, Hans-Georg Rammensee, and Wolfram Brugger

University of Tübingen, Department of Hematology, Oncology and Immunology, and Institute for Cell Biology, Department of Immunology, Tübingen (Germany)

Dendritic cells (DC) are key regulators in immune responses, capable of priming naive resting T cells and initiating primary T cell responses when pulsed with antigenic peptides or proteins. In vitro, DC can be generated from human CD34⁺ bone marrow and peripheral blood progenitor cells after culture with different cytokine combinations including Flt3 ligand, SCF, GM-CSF and either IL-4 or TNF- α . Recently it was demonstrated that DC can also develop from peripheral blood CD14⁺ monocytes when grown in the presence of GM-CSF and IL-4. These cells have the characteristics of immature DCs and can be further induced to mature by inflammatory stimuli like TNF- α , IL-1, LPS or by monocyte conditioned medium. We have analyzed the effect of CD40L and different cytokines on the development of DC from peripheral blood monocytes in the absence of GM-CSF. CD40 ligation promoted differentiation of peripheral blood monocytes into functional DC in absence of GM-CSF and IL-4. Analysis of surface markers showed that cells cultured in presence of CD40L expressed high levels of MHC class II molecules, CD80, CD86, CD40, CD54 and CD83. In line with high expression of adhesion and costimulatory molecules, corresponding to phenotypic characteristics of mature DC, CD40L induced DC were potent stimulatory cells in allogeneic MLR and in priming of MHC class I restricted CTL responses. These findings provide further evidence for the importance of CD40-CD40L interaction for initiation and maintenance of T cell responses and confirm the emerging concept that monocytes provide an additional source of DC, depending on external stimuli.

As protocols for expansion and maintenance of human DC generated from bone marrow derived progenitors or peripheral blood monocytes have recently been established, it is now possible to generate sufficient numbers of DC from patients and apply them in vaccination strategies for malignant and infectious diseases. When DC are pulsed with antigenic peptides and these cells are then reinfused, this approach can lead to specific immunity and protection in animals against tumors and infections. At present similar studies are carried out in patients. Many approaches for the delivery of antigens to DC are being analyzed: viral vectors, naked and plasmid DNA and RNA, tumor lysates, apoptotic cells, fusions of tumor cells with DC, proteins and peptides. We use DC pulsed with peptides (HER-2/neu oncogene, MUC1 tumor antigen, CMV pp65 protein), protein (idiotype immunoglobulin from multiple myeloma patients) or DC fused with tumor cells (when the antigen is not defined) for induction of a protective immunity in vitro and in vivo.

The Her-2/neu proto-oncogene is a 185-kDA transmembrane protein with homology to the epidermal growth factor receptor. It is overexpressed in 30-40 % of breast and ovarian cancers and this overexpression was shown to correlate with aggressiveness of malignancy and poor prognosis. To analyze whether Her-2/neu epitopes are tumor associated antigens for different tumors, we induced Her-2/neu peptide-specific CTL responses by primary in vitro immunization and used these CTL to determine the presentation of Her-2/neu epitopes on human tumor lines. Autologous DC generated from peripheral blood monocytes were pulsed with Her-2/neu derived peptides E75 and GP2 and used as APC for CTL priming. CTL induced with DC generated in presence of TNF- α elicited a higher cytotoxic activity when stimulated with the cognate peptide compared to CTL induced with DC grown in GM-CSF and IL-4 alone. The cytotoxicity of induced CTL was antigen specific and HLA-A2 restricted. Furthermore, these CTL lysed not only breast cancer cells but colon and renal cell carcinoma (RCC) cell lines expressing Her-2/neu.

Recently, it was demonstrated that MHC-unrestricted cytotoxic T cells can recognize epitopes of the MUC1 tumor associated antigen. There is increasing evidence now that MHC-restricted T cells can also be induced after immunization with the MUC1 protein or segments of the core tandem repeat. However, little is known about the epitopes recognized by MUC1 specific MHC restricted CTL. Using a computer analysis of the MUC1 amino acid sequence, we identified two novel peptides with a high binding probability to the HLA-A2 molecule. CTL were generated from several healthy donors by primary in vitro immunization using peptide pulsed dendritic cells.

The peptide induced CTL lysed tumors endogenously expressing MUC1 in an antigen specific and HLA-A2 restricted fashion, including breast and pancreatic tumor cells, showing that these peptides are shared among many epithelial tumors.

In order to generate CMV-specific CTL we used a similar approach as described above. Several CMV-specific HLA-A2 restricted peptide epitopes derived from the immunodominant pp65 protein were predicted by computer analysis. CMV-specific CTL were induced in vitro in seropositive and seronegative patients against a peptide with the highest binding probability. The cytotoxic activity of these CTL lines was MHC-restricted and antigen specific, as they only lysed CMV-infected fibroblasts from HLA-A2 expressing donors. No lysis was observed when a CMV strain with pp65 deletion was used for infection.

Vaccination with DC pulsed with antigenic peptides has already been shown to be effective in patients

with malignant lymphoma and melanoma. The use of DC pulsed with antigenic peptides could reverse the observed immunosuppression and tolerance in cancer patients and provide an additional broadly applicable approach to established therapies of malignancies.

References of our own group

- [1] Kleihauer, A., Brossart, P., Hebart, H. et al., Generation of CMV-specific CTL lines by peptide pulsed dendritic cells from stem cell donors. *Blood* **92**, 653a (1998)
- [2] Brossart, P., Stuhler, G., Heinrich, K. S. et al., Identification of HLA-A2 binding peptides derived from the

MUC1 protein for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* **92**, 499a (1998)

- [3] Stuhler, G., Zobiwalski, A., Grunebach, F. et al., Immune regulatory loops determine productive interactions within human T lymphocyte-dendritic cell clusters. *PNAS*, in press (1999)

[4] Brossart, P., Stuhler, G., Flad, T. et al., Her-2/neu derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* **58**, 732 (1998)

- [5] Brossart, P., Grunebach, F., Stuhler, G. et al., Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood mononuclear cells by CD40 ligation in the absence of GM-CSF *Blood* **92**, 4238 (1998)

Isolierung und Aktivierung von humanen dendritischen Zellen mit CpG-Oligonukleotiden

Gunther Hartmann

University of Iowa, Department of Internal Medicine, Iowa City, Iowa (USA)

Dendritische Zellen stellen als zentrale Antigen-präsentierende Zellen die Verbindung her zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Dendritische Zellen werden in klinischen Studien als zelluläres Adjuvans zur Immunisierung gegen schwach immunogene Antigene wie beispielsweise Tumor-Antigene getestet. Oligonukleotide mit definierten CpG-Motifen (kurzkettige DNA mit Cytidin-(Phosphatbindung)-Guanosin Dinukleotiden in einem definierten Sequenz-Kontext) wurden in tierexperimentellen Studien als potente Adjuvantien identifiziert. Der Adjuvans-Wirkung von CpG-Oligonukleotiden liegt vermutlich die CpG-vermittelte Stimulation von dendritischen Zellen zugrunde.

Die Häufigkeit von unmethylierten CpG-Motifen in der DNA von Wirbeltieren ist gering. In bakterieller DNA hingegen sind CpG-Motife zahlreich und unmethyliert. Unmethylierte CpG-Motife werden vom Immunsystem der Wirbeltiere als „Gefahrensignal“ erkannt [1]. Eine Reihe von Studien zeigen, daß CpG in vivo als potentes Adjuvans eingesetzt werden kann. In der Maus induziert CpG bei der therapeutischen Immunisierung gegen Lymphomzellen eine stärkere Th 1 -gewichtete Antwort als das Freund'sche Adjuvans und ist weniger toxisch [2]. CpG verstärkt die Wirkung von tumorspezifischen Antikörpern beim Lymphom [3]. Bei der Immunisierung mit HBsAg (Hepatitis B) in der Maus wird mit CpG eine 5fach stärkere Immunisierung erreicht als mit „Alum“, dem Standard Adjuvans beim Menschen. Die Kombination von CpG und Alum zeigte einen 35fach stärkeren Effekt als Alum allein [4]. Bei Verwendung von CpG kann eine Immunantwort gegenüber Influenza-

Virus selbst bei der Immunisierung über die Schleimhaut erreicht werden [5]. Zudem konnte gezeigt werden, daß auch die Immunisierung mit „nackter“ DNA von der Anwesenheit von CpG-Motifen in der Plasmid-DNA abhängt [6].

Wir stellen hier erstmalig die Wirkung von CpG auf humane dendritische Zellen vor. Dendritische Zellen sind eine heterogene Population mit einer Reihe von Unterformen, die noch nicht vollständig charakterisiert sind und sich in der Expression von Oberflächenmarkern unterscheiden [7]. In mononuklearen Zellen aus peripherem Blut befinden sich wenigstens zwei Subpopulationen von dendritischen Zellen, die zusammen 0,1 bis 0,4 % aller Zellen ausmachen. Dendritische Zellen können im wesentlichen über folgende Methoden präpariert werden: a) direkte Isolation von dendritischen Vorläuferzellen aus peripherem Blut und Inkubation mit GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) für 2 Tage; b) Generierung aus CD34-positiven Stammzellen (Knochenmark, peripheres Blut, Nabelschnurvenenblut) über mehrtägige Inkubation mit GM-CSF und TNF (Tumor-Nekrose-Faktor); oder c) Generierung über Inkubation von CD14-positiven Monozyten aus peripherem Blut mit GM-CSF und Interleukin (IL)-4. Insbesondere die Generierung aus Monozyten hat kürzlich große Aufmerksamkeit erregt. Es ist aber anzumerken, daß zur Generierung IL-4, ein Th₂-Zytokin, erforderlich ist, und daß die Zellen in Abwesenheit von IL-4 spontan wieder in Richtung Makrophagen differenzieren [8]. Beides ist für die In-vivo-Applikation dieser Zellspezies zur Immuntherapie ungünstig. Wir haben die direkte Isolation von dendriti-

schen Vorläuferzellen aus peripherem Blut verwendet, da diese 1. kein IL-4 zur Ausreifung benötigen; 2. nicht spontan ihre Eigenschaften verlieren; und 3. schon nach zwei Tagen Inkubation mit GM-CSF zu dendritischen Zellen ausreifen.

Mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) werden dabei über einen Dichtegradienten isoliert und mit einem immunomagnetischen Verfahren von „lineage“-Marker-positiven Zellen (T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten) depletiert. Die CD4-positive Zellen der verbleibenden Zellsuspension sind unreife dendritische Zellen und werden immunomagnetisch positiv selektioniert. Diese Zellen werden anschließend mit GM-CSF (800 U/ml) und CpG-Oligonukleotiden allein oder in Kombination inkubiert. Nach zwei Tagen Inkubation mit GM-CSF zeigt sich im Mikroskop eine für dendritische Zellen charakteristische Morphologie mit dendritischen Fortsätzen der Zellmembran. Die Zellen sind „lineage“-Marker-negativ, stark positiv für MHC 11, schwach positiv für die kostimulatorischen Moleküle B7-2 (CD86) und CD40, und zeigen elektronenmikroskopisch die charakteristische ultrastrukturelle Morphologie.

Als Endpunkte zur Bestimmung der Effekte von GM-CSF und CpG werden die Viabilität der dendritischen Zellen, die Expression der kostimulatorischen Marker CD54 (ICAM-1), CD86 (B7-2) und CD40 (Indikatoren für die Aktivierung der Zellen), und die Reifung der dendritischen Zellen (CD83 als spezifischer Marker reifer humaner dendritischer Zellen) verwendet. Die vorgestellten Studien bilden die Grund-

lage für die klinische Testung von CpG- und Tumor-Antigen-gepulsten dendritischen Zellen bei der therapeutischen Immunisierung gegen Tumorerkrankungen.

Literatur

- [1] Krieg, A. M. et al., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546 (1995)
- [2] Weiner, G. J. et al., Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10833 (1997)
- [3] Wooldridge, J. E., Ballas, Z., Krieg, A. M. et al., Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood* **89**, 2994 (1997)
- [4] Davis, H. L. et al., CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* **160**, 870 (1998)
- [5] Moldoveanu, Z., Love-Homan, L., Huang, W. Q. et al., CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza Virus, *Vaccine* **16**, 1216 (1998)
- [6] Sato, Y et al., Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* **273**, 352 (1996)
- [7] Hart, D. N., Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* **90**, 3245 (1997)
- [8] Hausser, G. et al., Monocyte-derived dendritic cells represent a transient Stage of differentiation in the myeloid lineage. *Immunobiology* **197**, 534 (1997)

Stammzelltherapie

Norbert Schmitz

Christian-Albrechts-Universität, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Kiel

Die Hochdosis-Chemoradiotherapie mit anschließender Transplantation hämatopoetischer Progenitorzellen stellt eine anerkannte Therapiemodalität für eine Reihe hämatologischer Systemerkrankungen dar. Bis vor wenigen Jahren diente das Knochenmark als Quelle der hämatopoetischen Stammzellen, die nach einer Hochdosistherapie notwendig sind, um die Hämatopoese wieder in Gang zu bringen bzw. ihre Regeneration zu beschleunigen. Zunächst im autologen Bereich, zunehmend aber auch auf dem allogenen Sektor ist die Knochenmarkstransplantation durch die Transplantation hämatopoetischer Zellen, die aus Zytokin-mobilisiertem Vollblut gewonnen wurden, ersetzt worden. Im autologen Setting kann damit eine schnellere Regeneration der Hämatopoese, eine Verkürzung des stationären Aufenthalts sowie eine Kostenreduktion erzielt werden. Auch eine allogene Transplantation hämatopoetischer Blutstammzellen führt zu einer verbesserten Regenerationskinetik von Granulozyten und Thrombozyten; hier bleibt jedoch

abzuwarten, ob potentiell negative Effekte der allogenen Blutstammzelltransplantation, wie eine Verstärkung der chronischen Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (graft-versus-host disease, GVHD) die positiven Effekte der Blutstammzelltransplantation aufheben. Über viele Jahre hinweg wurde der wesentliche Effekt einer Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation darin gesehen, daß ohne Rücksichtnahme auf die Knochenmarkfunktion eine Dosisescalation therapeutisch wirksamer Medikamente zu einem verbesserten Ansprechen der jeweiligen Tumorerkrankung führte. Verschiedene Entwicklungen haben dazu geführt, daß derzeit der Antitumoreffekt des Transplantats selbst (graft-versus-tumor oder leukemia (GVL) effect) in den Mittelpunkt des Interesses gerückt ist und weltweit an der Instrumentalisierung des GVL-Effektes zur verbesserten Leukämie- und Tumorbehandlung gearbeitet wird. Neuere Arbeiten zeigen, daß Veränderungen der Hochdosisprotokolle unter Betonung der Immunsuppression und weniger der

myeloablativen Komponente solcher Regimes eine verminderte Toxizität erwarten läßt. Damit kann nicht nur die Transplantations-assoziierte Mobidität und Mortalität gesenkt, sondern auch das maximale Lebensalter, bis zu dem eine allogene Transplantation möglich ist, angehoben werden. Die Verfügbarkeit großer Zahlen hämatopoetischer Progenitorzellen, wie sie in peripheren Blutstammzelltransplantaten enthalten sind, hat es möglich gemacht, extensive Selektions- und Depletionsverfahren zu entwickeln, mit denen gezielt reine Progenitorzellpopulationen gewonnen werden können. Diese hämatopoetischen Progenitorzellen können gemeinsam mit oder vor der Gabe von hochgereinigten immunmodulatorischen Zellen, wie dendritischen Zellen, T-Zellen und NK-Zellen transplantiert werden, die in der Lage sind, im-

muntherapeutische Wirkung zu entfalten. Die Beantwortung der Frage, wie erfolgreich solche Strategien in Zukunft sein werden und welche therapeutischen Gewinne damit letztlich erzielt werden können, wird davon abhängen, inwieweit das immuntherapeutische Potential aufgereinigter T- und NK-Zellfraktionen erhalten oder sogar gesteigert werden kann, während gleichzeitig die unerwünschten Wirkungen dieser Zellpopulationen, und hier insbesondere die GVHD verhindert oder zumindest abgeschwächt werden können. Experimentelle und erste klinische Befunde weisen darauf hin, daß eine solche Separation von GVL- und GVH-Reaktionen durch Manipulationen im afferenten bzw. efferenten Schenkel der entsprechenden immunologischen Reaktionen möglich sein sollte.

Adoptive Immuntherapie bei Chimären

Hans-Jochem Kolb

und Klinische Kooperationsgruppe Hämatopoetische Zell-Transplantation (Hans-Jochem Kolb, Evi Weissinger, Claudia Lange, Ute Schultz, Georg Ledderose, Christoph Schmid, Michael Schleuning, Monika Franz, Alexander Muth, Christoph Salat, Marie Roskrow, Maike Humann, Ernst Holler)

Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität, Medizinische Klinik III, München

Die Knochenmarkstransplantation von gesunden Spendern hat selbst bei Leukämie in fortgeschrittenen Stadien langfristige Remissionen und sogar Heilungen erzielt, wenn die herkömmliche Therapie versagte. Die intensive Chemotherapie und Bestrahlung vor der Transplantation tragen zur Elimination der Leukämie ebenso bei wie das Transplantat mit seiner Immunreaktion gegen die Leukämie - die sog. Graft-versus-Leukämie Reaktion (GVL). Allerdings geht die Immunreaktion gegen die Leukämie meist mit einer Reaktion gegen gesunde Organe des Patienten, einer sog. Graft-versus-Host Reaktion (GVH) einher. Die GVH Reaktion kann den Körper des Patienten so stark schädigen, daß der Patient daran sterben kann. Daher sind Maßnahmen zur Verhütung einer GVH-Reaktion unerlässlich neben einer prophylaktischen immunsuppressiven Behandlung zeigte die Entfernung von T-Zellen aus dem Transplantat die besten Ergebnisse. Leider ging die bessere Verhütung der GVH-Reaktion mit einer erhöhten Rate an Leukämie rezidiven einher, so daß das gesamte Überleben nicht verbessert wurde. Wir versuchen daher, beide Reaktionen zu trennen, indem zuerst mit T-Zell-Depletion eine Toleranz des Transplantates gegen den Empfänger erzeugt und in einem zweiten Schritt immunreaktive Zellen des Spenders auf die tolerante Chimäre übertragen wurden.

Bei Geschwisterhunden gelang es, mit Ganzkörperbestrahlung und Transplantation von T-Zellen depletierten Knochenmarks DLA-identischer Spender einen stabilen gemischten Chimärismus zu erzeugen. In Blut und Knochenmark waren Zellen von Spender und Empfänger nachweisbar, GVH-Reaktionen waren nicht festzustellen. Die Transfusion von Blutleukozyten des Knochenmarkspenders in den ersten Tagen und Wochen erzeugte GVH-Krankheit, die unbehandelt zum Tode führte. Zwei Monate nach Transplantation konnten ebenso wie zu späteren Zeitpunkten Spenderleukozyten transfundiert werden, ohne daß GVH-Reaktionen auftraten. Dennoch wurde der gemischte Chimärismus durch die Transfusion in einen kompletten umgewandelt. Mit Spenderleukozyten konnte eine Immunität gegen Tetanus vom Spender auf den Empfänger übertragen werden. Gleichzeitig wurde die Reaktion gegen neue Antigene wie Diphtherie-Toxoid durch die Transfusion verbessert. Aufbauend auf den Versuchen an Geschwisterhunden wurden seit 1988 Patienten mit leukämischem Rückfall mit Spenderleukozyten behandelt. Die besten Ergebnisse wurden bei chronischer myeloischer Leukämie erzielt, mehr als 70 % der Patienten mit einem Rückfall in chronischer Phase oder mit zytogenetischem Rezidiv, d. h. erneutem Auftreten von Leukämiezellen mit dem Philadelphia-Chromosom sprachen

auf die Transfusion von Spenderleukozyten ohne weitere Strahlen- oder Chemotherapie an. Akute myeloische Leukämie (AML) und myelodysplastische Syndrome (MDS) sprachen bei einem Teil der Fälle, akute lymphatische Leukämie (ALL) sprach nur selten an. Bei multiplem Myelom ist die Ansprechrate noch nicht klar. Während bei akuter Leukämie und multiplem Myelom die Remissionen meist von kurzer Dauer sind, bleiben Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie lange in Remission ohne weitere Therapie.

Komplikationen von Spenderleukozytentransfusionen sind GVH-Krankheit und Myelosuppression. GVH-Krankheit tritt bei etwa 60 % der Patienten auf und ist bei etwa 40 % behandlungsbedürftig. Schwere Knochenmarkversagen mit Panzytopenie wurde bei etwa 20% der Patienten beobachtet, häufiger bei Patienten in chronischer Phase der CML als bei solchen mit zytogenetischem Rezidiv. Das Knochenmarkversagen kann mit der Transfusion von Knochenmark oder Stammzellen des Spenders erfolgreich behandelt werden. Patienten mit GVH-Krankheit sprechen häufiger mit einer Remission an als Patienten ohne GVH-Reaktion, aber selbst Patienten ohne GVH-Krankheit sprechen in der Hälfte der Fälle auf die Behandlung an. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die GVL-Reaktionen auch unabhängig von einer GVH-Reaktion vorkommt. Allerdings zeigten 4 Patienten mit einem eineiigen Zwillingsgeschwister als Spender kein Ansprechen auf die Therapie. Offensichtlich spielen Histokompatibilitätsunterschiede eine entscheidende Rolle bei der GVL-Reaktion.

Nachdem Histokompatibilitätsantigene, die nicht von der HLA-Region kodiert sind, eine entscheidende Rolle spielen, stellt sich die Frage, warum Leukämiezellen einer GVL-Reaktion ausweichen können „immune escape mechanism“. Eine Möglichkeit ist die verminderte Präsentation von Nicht-HLA-Antigenen durch verminderte Expression von HLA-Antigenen, die die Nicht-HLA-Antigene präsentieren. Ein kompletter Verlust der HLA-Antigene dürfte nach vorläufigen Untersuchungen jedoch selten sein. Eine weitere Möglichkeit ist die verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM, LFA-3, LFA-1 sowie kostimulatorischen Faktoren wie B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) und CD40. Die Produktion von inhibitorischen Zytokinen wie TGF- β und IL-10 könnte die GVL-Reaktion hemmen. Schließlich könnte die verminderte Expression von FAS bzw. die Expression eines defekten FAS auf der Oberfläche die Leukämiezelle vor einer FAS-vermittelten GVL-Reaktion schützen. Die Expression von FAS-Ligand auf der Leukämiezelle könnte die T-Zelle inaktivieren. Bei

mehreren Patienten, die nicht auf die Behandlung ansprachen, wurden stark erhöhte IL-10 Spiegel und verminderte TNF- α Spiegel im Serum gefunden. Eine Screening-Untersuchung von Patienten mit akuter Leukämie im Vergleich zu Gesunden zeigt jedoch keine eindeutigen Unterschiede. Auf RNS-Ebene wurden keine Unterschiede gesehen, während die Spiegel im Zellüberstand bei Patienten mit und ohne Stimulation mit Lipopolysaccharid stärker variierten als bei Gesunden.

Das bessere Ansprechen myeloischer Formen von Leukämie führten wir darauf zurück, daß dendritische Zellen als professionelle Antigen-präsentierende Zellen von myeloischen Vorläuferzellen abstammen. Bei CML wurde in der Zwischenzeit gezeigt, daß dendritische Zellen das Philadelphia-Chromosom aufweisen und damit dem leukämischen Klon angehören. Somit sind sie in der Lage, Histokompatibilitätsantigene und leukämie-spezifische Antigene wirkungsvoll zu präsentieren. Aus diesem Grunde wurde versucht, AML-Zellen zu Antigen-präsentierenden Zellen zu differenzieren. Nach einer 6-Tage-Kultur von AML-Zellen mit GM-CSF und IL-4 sind die kostimulatorischen Moleküle B7.1 und B7.2 auf der Zelloberfläche exprimiert. Die Zellen sind nach der Kultur in der Lage, allogene Zellen zu stimulieren. Andererseits können aber auch transfundierte Zellen des Spenders durch GM-CSF stimuliert werden, Antigen der Leukämie aufzunehmen und den T-Zellen des Spenders zu präsentieren. Mittlerweile wurden Patienten mit AML, ALL und transformierter CML mit Spenderleukozyten, angereichert mit Stammzellen, und GM-CSF behandelt. Bei 7 von 10 AML-Patienten und einer CML-Patientin wurden ohne intensive Chemotherapie Remissionen induziert, die z. T. mehr als ein Jahr ohne weitere Erhaltungsthe-

rapie anhalten. Bei ALL-Patienten waren intensive Vorbehandlungen erforderlich. Komplikationen waren akute und chronische GVH-Krankheit sowie akute und chronische Lungenkomplikationen in Form von VOD und Bronchiolitis obliterans. Bei manchen Patienten wächst die Leukämie so schnell, daß der GVL-Reaktion keine Zeit zur Entwicklung bleibt.

Eine Möglichkeit zur Umgehung der Komplikationen und Beschleunigung der GLV-Reaktion besteht in der Immunisierung des Spenders gegen Histokompatibilitätsantigene, die nur auf hämatopoetischen Zellen des Empfängers vorkommen. Hierzu werden Versuche beim Hund durchgeführt, da unter Umständen mit fulminanten Reaktionen gerechnet werden muß. Eine Möglichkeit zur Kontrolle der Reaktion bietet die Transduktion von sogenannten Suizid-Genen in die T-Zellen des Spenders. Eine Form von Suizid-Gen ist das Thymidinkinase-Gen des Herpes-simplex-Virus, das mit Hilfe von retroviralen Vektoren in T-Zellen eingebaut werden kann. Im Falle einer gefährlichen GVH-Krankheit können die T-Zellen als Verursacher ausgeschaltet werden, indem der Patient mit Ganciclovir behandelt wird. In den transduzierten T-Zellen kommt es zu einer Hemmung der DNS-Synthese und zum Absterben der T-Zellen. Beim Hund konnten erfolgreich T-Zellen mit dem HSV-TK-Konstrukt infiziert und das Überleben der Zellen im Empfänger für einige Zeit nachgewiesen werden. Es bleibt zu klären, ob die Zellen zu einer GVH-Reaktion in der Lage sind und auf die Behandlung mit Ganciclovir ansprechen. Weitere Fragen betreffen die Verteilung dieser Zellen in vivo und die Möglichkeit einer Immunreaktion gegen die transduzierten Zellen. Schließlich steht die Charakterisierung der Histokompatibilitätsantigene der hämatopoetischen Zellen bei Hund und Mensch aus.

EBV-Vektoren und Zelltherapie

Wolfgang Hammerschmidt

Institut für Klinische Molekularbiologie, GSF-Forschungszentrum, München

Ubiquitäres Herpesvirus

Epstein-Barr Virus (EBV) ist ein ubiquitäres Herpes-Virus, mit dem mehr als 90 % der Erwachsenen lebenslang infiziert sind. In der Regel erfolgt die primäre Infektion ohne klinische Symptome im frühen Kindesalter und mündet in eine lebenslange Koexistenz von Virus und Wirt. Selbst im peripheren Blut sind virusinfizierte Zellen nachzuweisen, wobei ruhende B-Lymphozyten - möglicherweise Memory-B-Zellen - die Zellpopulation darstellen, die EBV tragen. Diese B-Zellen sind ausschließlich latent infiziert, Virus wird intermittierend im Oropharynx ge-

funden, wo es vermutlich in lytisch infizierten Epithelzellen produziert wird. Dieser Zustand der Koexistenz ist sehr stabil, da er im Gesunden immunologisch kontrolliert wird. Die Immunkompetenz des Wirtes besteht vor allem in zytotoxischen Effektor-T-Zellen, die virale Epitope im Kontext von MHC-I-Molekülen erkennen und Zellen lysieren, die bestimmte virale Genprodukte exprimieren. Im Gegenzug besitzt EBV mindestens zwei Gene, die zur Immunevasion beitragen können, um so die latente Infektion lebenslang aufrechtzuerhalten (zur Übersicht s.[1]).

EBV wird aber auch mit einer Vielzahl von Erkrankungen ursächlich in Verbindung gebracht. Eine späte Primärinfektion bei Jugendlichen oder jungen Erwachsenen führt in Europa und den USA in fast jedem zweiten Fall zum Syndrom der Infektiösen Mononukleose (Inzidenz pro Jahr: > 1000 Fälle/100 000 Einwohner). Akut lebensbedrohend sind EBV-induzierte Lymphome bei immunsupprimierten Patienten, etwa nach Organtransplantation oder bei AIDS. Eine Beteiligung des Virus bei der Ätiologie von wenigstens drei Tumorarten (Burkitt Lymphom (10 000 Fälle/Jahr), Nasopharynxkarzinom (80 000 Fälle/Jahr), Hodgkin Lymphom (> 120 000 Fälle/Jahr) gilt als sicher. Bei einer Reihe weiterer Tumorerkrankungen gibt es konkrete Hinweise auf EBV als Kofaktor [2].

Eine hervorstechende Eigenschaft von EBV ist die Immortalisation von primären humanen B-Lymphozyten in vitro. Diese Eigenschaft ist besonders bemerkenswert, da in den immortalisierten und proliferierenden B-Lymphozyten nur einige wenige -der mehr als 80 viralen Gene exprimiert sind und kein Virus freigesetzt wird. Dieser Zustand der Latenz wird sowohl in den EBV-assoziierten Tumoren als auch in anderen EBV-infizierten Zellen beobachtet. In den EBV-assoziierten Tumoren werden einige der EBV Genprodukte gefunden, die immer auch in immortalisierten B-Lymphozyten exprimiert werden. Die in vitro Immortalisation dieser Zellen stellt deshalb ein attraktives und sehr reproduzierbares Modellsystem für die Onkogenese dar.

Der Zugang zu diesem Modellsystem setzt voraus, daß eine genetische Analyse des EBV Genoms möglich ist. Dieser Zugang war weitgehend verbaut, da die komplexe Biologie des Virus es nahezu unmöglich machte, das virale Genom gezielt genetisch zu verändern. Wir haben zur Problemlösung beigetragen und zwei genetische Systeme entwickelt, die diese Limitationen beheben. Diese Systeme, mini-EBVs und EBV-Genvektoren, sollen im folgenden vorgestellt werden.

mini-EBVs

Sogenannte mini-EBVs sind rekombinante Plasmide, die in *E. coli* mit Methoden der Molekularbiologie hergestellt werden [3]. Die genetische Komposition dieser Plasmide besteht im wesentlichen aus subgenomischen EBV Abschnitten. Diese Abschnitte sind so gewählt, daß sie alle EBV Gene umfassen, die bei der B-Zell-Immortalisation eine Rolle spielen. Virale Gene aber, die für die eigentliche Virusproduktion essentiell sind, fehlen mehrheitlich. Die Aufgabe der mini-EBVs besteht darin, B-Lymphozyten in vitro zu immortalisieren, ohne daß diese Zellen EBV freisetzen können. Der Vorteil der Virusfreiheit ist aber nur ein Teilaspekt. Mit diesen mini-EBVs können nämlich von jedem beliebigen Spender B-Lymphozyten-Linien hergestellt werden, die natürlich auch die spendereigenen MHC-Moleküle exprimieren. Eine weitere wichtige Eigenschaft besteht darin, beliebige Gene, die von therapeutischem Interesse sind, mit Hilfe der mini-EBVs in menschliche B-Lymphozyten einführen zu können. Mit der Kombination dieser Eigenschaften ist es möglich, solche B-Zell-Linien als antigenpräsentierende Zellen, sogenannte APCs, einzusetzen. Diese APCs finden Anwendung in der Immuntherapie und in der experimentellen Medizin.

Bei der Immuntherapie sind besonders Antigene interessant, von denen man weiß, daß sie bei der A.b-

wehr von Tumorerkrankungen eine Rolle spielen können. Neben bekannten Antigenen, die z. B. in Melanomen überexprimiert werden und die ein natürliches Ziel für das Immunsystem darstellen, kommen aber auch tumorspezifische Antigene in Frage, die charakteristisch für z. B. Pankreas-, Nieren- oder Mammakarzinome sind. Von diesen tumorspezifischen Antigenen kennt man eine ganze Reihe von Kandidatengenen, z. B. Her-2/neu, Mucin-1, mutiertes Ras, mutiertes p53 und andere. Gegen diese Antigene gerichtet finden sich beim Tumorpatienten zytotoxische T-Lymphozyten, die aber auf Grund der ungenügenden Antigenpräsentation der Tumorzellen selbst zahlenmäßig limitiert sind und deshalb nicht effizient zur Lyse von Tumorzellen in vivo beitragen. Ziel der Immuntherapie dieser Tumorerkrankungen ist es, solche tumorspezifische zytotoxische T-Zellen in vitro zu amplifizieren und diese dann im Rahmen einer adoptiven Immuntherapie wieder dem Patienten zurückzugeben. Dazu sind APCs unabdingbar, die die entsprechenden Antigene im syngenen, bzw. autologen Kontext der MHC-Moleküle des jeweiligen Patienten exprimieren und die nötigen Stimuli für die Proliferation der zytotoxischen T-Zellen in vitro zur Verfügung stellen. In der Regel werden dazu patienteneigene dendritische Zellen verwandt, die aber auch das entsprechende Antigen exprimieren müssen, um es den T-Zellen präsentieren zu können. Diese dendritischen Zellen werden in der Regel mit Hilfe sehr unterschiedlicher Protokolle kurzzeitig in vitro kultiviert. Zur Expression des gewünschten Antigens wird in den meisten Fällen ein entsprechend gestalteter Genvektor eingesetzt. Allerdings proliferieren dendritische Zellen in vitro nicht und stehen auch bei Patienten mit beeinträchtigtem Immunsystem, etwa im Verlauf einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung, nur eingeschränkt zur Verfügung.

Wie dendritische Zellen auch besitzen mini-EBV immortalisierte B-Lymphocyten die nötigen costimulatorischen Zelloberflächenmoleküle, die sie als APCs charakterisieren. Da mini-EBVs so konstruiert werden können, daß sie Tumorantigene von Interesse exprimieren, stellen mini-EBV immortalisierte B-Zellen eine sichere, unbegrenzt proliferierende Zellpopulation dar. Vom jeweiligen Patienten können solche APCs schnell und in einem Schritt etabliert werden, so daß sie zur Generierung von zytotoxischen T-Zellen praktisch unlimitiert zur Verfügung stehen. Mit dem Modellantigen Mucin-1 ist es uns vor kurzem gelungen, das vorgestellte Prinzip zu verwirklichen [4], das sicher auch für andere bereits erwähnte Tumorantigene Verwendung finden kann. Prinzipiell könnten diese patienteneigenen B-Zellen auch als Zellvakzine zur Immuntherapie der angesprochenen Tumorerkrankungen dienen, wobei sicherlich Diskussionsbedarf zu den möglichen Risiken besteht.

EBV-Genvektoren

Eines der größten Probleme der Gentherapie ist die Übertragung des Gens selbst. Verschiedene Vektorsysteme und Methoden sind in den letzten Jahren entwickelt worden, die eine Optimierung des Gentransfers zum Ziel haben. Dabei sind Entwicklungen zu verzeichnen, die zum einen den Transfer rekombinanter „nackter“ Vektor DNA in Zielzellen favorisieren, zum anderen aber die stabile Übertragung dieser Vektoren in bestimmte Zellen des jeweiligen Patienten vorsehen. Dieser sogenannte ex vivo Gentransfer fin-

det sowohl bei der „gene correction therapy“ als auch bei der genetischen Modifikation von Tumorzellen zur Immuntherapie und bei Knochenmarkstammzellen Anwendung.

Besonders der menschliche B-Lymphozyt ist als Zielzelle der Gentherapie bisher ohne Bedeutung geblieben. Hauptproblem ist dabei das Fehlen von Genvektoren, da „nackte“ Vektor-DNA in diese Zellen nicht effizient genug übertragen werden kann. Wir haben uns zur Aufgabe gemacht, dieses Problem mit Hilfe von Genvektoren zu lösen, die auf EBV-Komponenten beruhen. Solche EBV-Genvektoren haben den Vorteil, daß sie - wie EBV selbst - sehr effizient auch ruhende B-Lymphozyten des Menschen infizieren und dabei therapeutisch interessante Gene übertragen können.

Verschiedene Hürden galt es zu überwinden, um eine erste Generation von EBV-Genvektoren zu konstruieren und sie in eine virale, von EBV abgeleitete Hülle verpacken zu können. Das Haupthindernis war das Fehlen einer sogenannten Verpackungszelllinie, die die EBV-Genvektoren verpackt, aber kein Wildtyp-EBV freisetzt. Mit der Klonierung des Gesamtgenoms von EBV in *E. coli* in Form eines einzigen, sehr großen Plasmids (über 180 kbp) war die Voraussetzung für die Manipulation des Virusgenoms realisiert [5]. Wir haben nun dieses Virusgenom so verändert, daß es - nach Überführen in eine geeignete etablierte Zelllinie - die gewünschten Eigenschaften einer Verpackungszelllinie für EBV-Genvektoren hat. Diese Verpackungszelllinie stellt zwar die erste ihrer Art für Herpesvirusvektoren dar, bedarf aber noch einiger Verbesserungen. So müssen Aspekte der Sicherheit und Effizienz angegangen werden zusammen mit der

Konstruktion von EBV-Genvektoren, die für die verschiedenen therapeutischen Anwendungen geeignet sind. Wir sind allerdings zuversichtlich, daß diese technisch-methodischen Probleme gelöst werden können, so daß in den nächsten Jahren hier mit den ersten klinischen Versuchen begonnen werden kann. Optimistisch sind wir auch hinsichtlich neuer virusfreier Genvektoren auf der Grundlage anderer Herpesviren, die neben B-Lymphozyten auch T-Zellen, hämatopoetische Stammzellen, Nervenzellen und Endothelzellen effizient und teilweise hochselektiv infizieren können. Auf jeden Fall ist damit zu rechnen, daß mit weiteren Innovationssprüngen die bisherigen Limitationen der Gentherapie beim Menschen erfolgreich überwunden werden können.

Literatur

- [1] Rickinson, A. B., Kieff, E., Epstein-Barr Virus, in Virology. B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al. (eds.), pp. 2397-2446, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1996)
- [2] Pisani, P., Parkin, D. M., Munoz, N. et al., Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **6**, 387 (1997)
- [3] Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R. et al., Immortalization of human primary B-lymphocytes in vitro with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5875 (1995)
- [4] Kilger, E., Pecher, G., Schwenk, A. et al., Expression of mucin (MUC-1) from a mini-Epstein-Barr Virus plasmid in Virus-free immortalized B-cells. (submitted)
- [5] Delecluse, H. J., Hilsendegen, T., Pich, D. et al., Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr Virus from prokaryotic to human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8245 (1998)

Therapie mit Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten: Indikation und Sicherheit

Volker Kiefel

Universitätsklinikum Leipzig, Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin

Anwendung von Erythrozytenkonzentraten

Zustände einer akuten oder chronischen Anämie, die zu einer Gefährdung des Patienten führen, sind Indikation für eine Erythrozytentransfusion. „Trigger“-Werte (minimale Hämoglobinkonzentrationen oder Hämatokritwerte, die zur Erythrozytentransfusion veranlassen) sind nach wie vor umstritten. Sie hängen stark von den Erkrankungen der Patienten ab, sowie von der Geschwindigkeit, mit der die Anämie entstand. Vollblut wird praktisch nicht mehr verwendet, stattdessen werden Erythrozytenkonzentrate in Stabilisatorlösung wie z. B. SAGM eingesetzt. Zur Vermeidung einer HLA-Alloimmunisierung oder zur Beherrschung von Transfusionsreaktionen bei bereits

immunisierten Patienten werden durch Filtration leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate verabreicht, in seltenen Fällen werden gewaschene Erythrozytenkonzentrate eingesetzt zur Vermeidung anaphylaktischer Reaktionen.

Anwendung von Thrombozytenkonzentraten

Häufigste Indikationen für den Einsatz von Thrombozytenkonzentraten sind meist durch eine eingeschränkte Thrombozytopenie verursachte Thrombozytopenien, seltener massive Thrombozytenfunktionsstörungen. Eine bei Erwachsenen therapeutisch wirksame Dosis (mindestens 4×10^{11} Thrombozyten)

kann mit Thrombozytapherese von Einzelspendern gewonnen werden oder als „gepooltes“ Thrombozytenkonzentrat aus Vollblutspenden von 4-8 Einzelspendern. Als Trigger für prophylaktische Thrombozytentransfusionen bei Patienten mit hämatologischen oder onkologischen Erkrankungen werden Thrombozytenzahlen zwischen 5000-10 000 Thrombozyten/ μ l diskutiert.

Nebenwirkungen/Risiken

Die gegenwärtig meistdiskutierten potentiellen Risiken stellen durch Transfusion bedingte Übertragungen von Viruskrankheiten wie Hepatitis C, Hepatitis B, sowie HIV-Infektionen dar. Cytomegalie-Virus (CMV)-Infektionen sind dagegen vor allem für immunsupprimierte Patienten (z. B. nach allogener Knochenmarktransplantation) gefährlich, zelluläre Blutkomponenten können durch Filtration „CMV-sicher“ gemacht werden. Akute Bedrohungen gehen von bakteriell verkeimten Blutkonserven aus.

Die Alloimmunisierung von Patienten gegen erythrozytäre Antigene geht mit dem potentiellen Risiko einer akuten hämolytischen Transfusionsreaktion einher. Zu einer nicht immer vermeidbaren verzögerten hämolytischen Transfusionsreaktionen („DHTR: delayed hemolytic transfusion reaction“) kommt es bei

früher alloimmunisierten Patienten, die zu einem Zeitpunkt transfundiert wurden, an dem der zuvor bestehende Alloantikörper nicht nachweisbar war. Febrile, nichthämolytische Transfusionsreaktionen sind meist Folge von Antikörpern gegen HLA-Antigene, bei Thrombozytentransfusionen bewirken HLA-Antikörper und Antikörper gegen plättchenspezifische Antigene darüber hinaus das Problem des Refraktärzustands gegenüber Thrombozytentransfusionen.

Plasmahaltige Blutprodukte, die Antikörper gegen neutrophile Granulozyten enthalten, können ein dem ARDS ähnliches Krankheitsbild: TRALI (transfusion related acute lung injury) verursachen. Die (meist weiblichen) Spenderinnen der entsprechenden Blutprodukte sollten von der Spende ausgeschlossen werden. Durch passive Übertragung von thrombozytären Alloantikörpern im Plasma können passagere alloimmune Thrombozytopenien beim Empfänger ausgelöst werden. Durch Übertragung allogener Lymphozyten bei immunsupprimierten Patienten (z. B. nach Transplantationen) kann es zur transfusionsassoziierten Graft-versus-Host Reaktion (TA-GvHR) kommen, die im Gegensatz zur „Transplantations-GvHR“ eine hohe Letalität aufweist. Die geeignetste Maßnahme zu ihrer Vermeidung besteht in der (γ -) Bestrahlung (30 Gy) der zu transfundierenden zellulären Blutprodukte.

Bispezifische Antikörper zur Tumortherapie

Michael Pfreundschuh, Frank Hartmann und Christoph Renner

Universitätskliniken des Saarlandes, I. Medizinische Klinik, Homburg

Bispezifische monoklonale Antikörper (Bi-Mab) können so konstruiert werden, daß sie immunologische Effektorzellen an Tumorzellen binden und diese in situ aktivieren. Unsere Arbeitsgruppe hat zwei Modelle zur Therapie von Hodgkin-Lymphomen entwickelt:

1. den natürlichen Killer (NK)-Zellen-aktivierenden anti-CD 16/CD30 Bi-Mab A9/HRS-3, der durch Fusion aus den parentalen monoklonalen Antikörpern A9 und HRS-3 etabliert wurde, die an das NK-Zell-Triggermolekül CD16 bzw. an das Hodgkin-assoziierte CD30 Antigen binden.
2. Zur spezifischen Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen gegen Hodgkin-Zellen wurden die beiden anti-CD3/CD30 und antiCD2WCD30 Bi-Mab entwickelt, die die beiden für die Aktivierung von T-Zellen notwendigen Signale spezifisch und ausschließlich durch Kreuzvernetzung der Triggermoleküle an der Tumorzelle vermitteln.

In präklinischen Studien beider Bi-Mab-Strategien konnte das kurative Potential dieser Immuntherapie

bei SCID-Mäusen mit heterotransplantierten menschlichen Hodgkin-Tumoren gezeigt werden, die die entsprechenden Bi-Mab zusammen mit unstimulierten menschlichen Lymphozyten erhielten, beweisen. Auch Tiere mit disseminiert wachsenden Tumoren konnten geheilt werden. Untersuchungen mit NK-Zellen und T-Zellen von Hodgkin-Patienten belegten den bekannten ausgeprägten Defekt dieser immunologischen Effektorzellen bei dieser Patientengruppe. Eine Behandlung mit den jeweiligen Bi-Mab führte jedoch zu einer vollständigen Rekonstitution der entsprechenden zellulären Defekte. Bei den T-Zellen, wo der Defekt mit einer verminderten Expression der c-Kette des T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplexes assoziiert ist, kam es zu einer Anhebung des Expressionsniveaus auf normales Niveau. In einer Phase-III-Studie mit dem NK-Zellaktivierenden CD 16/CD30 Bi-Mab bei 15 Patienten mit therapierefraktärem Morbus Hodgkin wurden keine signifikanten Nebenwirkungen und eindeutiges Ansprechen auf die Immuntherapie mit 1 kompletten Remission (CR), 1 partiel-

len Remission (PR) und fünf „minor responses“ (MR) beobachtet. In einer anschließenden Phase-II-Studie wurden die Patienten randomisiert für eine Therapie mit 25 mg CD16/CD30 pro Tag als kontinuierliche Infusion über 4 Tage oder vier i.v. Bolus-Infusionen jeden 2. Tag. Bei 16 Patienten wurden 1 CR (Dauer: 6 Monate), 2 PR (6+ und 6 Monate), sowie 3 stabile Verläufe (6+, 4 und 3+ Monate) beobachtet. Bei 4 Patienten wurde vor einem 2. Zyklus der Bi-Mab-Gabe eine Therapie mit Interleukin-2 durchgeführt. Diese führte zu einer deutlichen Zunahme zirkulierender NK-Zellen bei allen Patienten und zu ei-

ner Konversion von einem stabilen Verlauf in eine komplette Remission bei einem Patienten. Nebenwirkungen der Therapie mit Bi-Mab A9/HRS-3 beschränkten sich auf Fieber I°/II° bei 6 Patienten. Unsere Ergebnisse bestätigen die klinische Wirksamkeit und Sicherheit dieses immuntherapeutischen Ansatzes und lassen einen zusätzlichen Benefit einer additiven Zytokintherapie als wahrscheinlich erscheinen. Die Verfügbarkeit ausreichender Mengen humanisierter Bi-Mab wird es erlauben, den Stellenwert von Bi-Mab in der Therapie des Morbus Hodgkin zu sichern.

Prionen - zwischen Neuropathologie und Immunologie

Adriano Aguzzi

Universitätsspital, Institut für Neuropathologie, Zürich

Vieles spricht dafür, daß PrP^{sc} identisch ist mit dem Prion, dem übertragbaren Erreger der spongiformen Enzephalopathien [1-3]. Um die Frage der Pathogenese im Zentralnervensystem zu bearbeiten, wurde Neuroektoderm aus transgenen Mäusen, welche PrP^c überexprimieren, in das Gehirn von Scrapie-unempfindlichen PrP-defizienten Mäusen transplantiert und mit Prionen inokuliert. Infizierte Transplantate entwickelten Scrapie und enthielten hohe Mengen an PrP^{sc} und Infektiösität, während benachbarte-Zellen gesund blieben. Die Lebenserwartung der Wirt-Mäuse war nicht reduziert. Daraus ist zu schließen, daß die Verfügbarkeit an endogenen PrP^c für die vom Erreger katalysierte Umwandlung mit der Neurotoxizität des Scrapie-Erregers in vivo korreliert [4, 5]. Es wurde dann die Frage des Transports von Prionen aus der Peripherie in das Zentralnervensystem untersucht, indem Neuroektoderm wiederum in das Gehirn PrP-defizienter Empfänger transplantiert wurde. Scrapie entwickelte sich nicht in Transplantaten nach intraokulärer, intraperitonealer oder subkutaner Inokulation. Eine Immunantwort gegen PrP entwickelte sich in mehreren Tieren kurze Zeit nach der Transplantation, aber anti-PrP-Titer schienen den Verlauf der Erkrankung nicht zu beeinflussen, und kein Transport der Infektiösität nach intraokulärer Verabreichung wurde in Tieren detektiert, welche gegenüber PrP tolerant waren [6]. Ein adoptiver Transfer PrP-exprimierender hämatopoetischer Zellen stellte

die Akkumulation von Prionen in der Milz wieder her, jedoch nicht die Neuroinvasion über die intraperitoneale Route [7]. Diese Ergebnisse zeigen, daß PrP^c die Übertragung des Erregers von der Peripherie in das Zentralnervensystem unterstützt, und daß die Neuroinvasion von einer Neuroimmun-Schnittstelle abhängig ist [8]. Da B-Lymphozyten für diese Neuroinvasion von essentieller Bedeutung sind [9], könnten diese eine potentielle Angriffsfläche für eine Post-expositionsprophylaxe darstellen [10].

Literatur

- [1] Aguzzi, A., *Nature* **381**, 734 (1996)
- [2] Aguzzi, A., Weissmann, C., *Nature* **383**, 666 (1996)
- [3] Aguzzi, A., Weissmann, C., *Nature* **389**, 795 (1997)
- [4] Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A. et al., *Nature* **379**, 339 (1996)
- [5] Brandner, S., Isenmann, S., Kuhne, G. et al., *Brain Pathol.* **8**, 19 (1998)
- [6] Brandner, S., Raeber, A., Sailer, A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13148 (1996)
- [7] Blättler, T., Brandner, S., Raeber, A. J. et al., *Nature* **389**, 69 (1997)
- [8] Aguzzi, A., *Lancet* **349**, 742 (1997)
- [9] Klein, M. A., Frigg, R., Flechsig, E. et al., *Nature* **390**, 687 (1997)
- [10] Aguzzi, A., Collinge, J., *Lancet* **350**, 1519 (1997)

Transplantation peripherer Blutstammzellen — Indikation und Finanzierung

Wolfgang Hiddemann

Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität, Medizinische Klinik III, München

Basierend auf der Annahme einer Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen bestimmten zytostatischen Substanzen und malignen Erkrankungen ist in den letzten Jahren zunehmend versucht worden, die Intensität der antineoplastischen Chemotherapie zu steigern um die Tumoreffektivität zu erhöhen. Wesentlicher limitierender Faktor dieses Konzeptes ist die Hämatotoxizität. Diese kann in Grenzen durch den posttherapeutischen Einsatz hämatopoetischer Wachstumsfaktoren, in jüngster Zeit jedoch vor allem durch die prätherapeutische Gewinnung von Blutstammzellen ausgedehnt werden. Insbesondere durch die Retransfusion peripherer Stammzellen ist der Einsatz myeloablativer Therapieregime in vielen Indikationsbereichen möglich geworden. Durch diese Therapiekonzepte eröffnen sich neue Perspektiven bei Tumorerkrankungen mit ungünstiger Prognose wie beispielsweise den niedrig malignen Lymphomen, den therapieresistenten hochmalignen Lymphomen, dem rezidierten Morbus Hodgkin, aber auch soliden Tumoren wie bei Patientinnen mit Hochrisiko Mammakarzinom, bei Patienten mit rezidierten Hodentumoren und Weichteilsarkomen. Für diese und weitere Indikationsbereiche liegen vielversprechende Ergebnisse klinischer Phase II-Studien vor. Allerdings bedarf es zum endgültigen Beweis der Effektivität prospektiv randomisierter Vergleichsstudien, die bis auf wenige Ausnahmen bisher nicht abgeschlossen sind.

Vor diesem Hintergrund erscheint es dringend erforderlich, Hochdosiskonzepte mit nachfolgender Stammzelltransplantation überwiegend im Rahmen klinischer Studien durchzuführen.

Dieser klinischen und wissenschaftlichen Notwendigkeit stehen die zur Zeit unsichere Rechtslage sowie ungeklärte Fragen der Finanzierung entgegen. So unterliegt die Durchführung klinischer Studien derzeit dem Arzneimittelgesetz, das in erster Linie jedoch mehr für Zulassungsstudien entwickelt wurde. Darüber hinaus besteht eine Unsicherheit, inwieweit klinische Studien von den Kostenträgern, d. h. den gesetzlichen Krankenkassen übernommen werden können.

Ein vielversprechender Ansatz zur Lösung dieser offenen Fragen besteht in der Etablierung des Clearing Houses, das als konzertierte Aktion und gemeinsame Einrichtung von Fachvertretern der Deutschen Krebsgesellschaft, den Kostenträgern, dem medizinischen Dienst der Krankenkassen unter Beteiligung der Deutschen Krebshilfe sowie der Bundesministerien für Gesundheit und Forschung und Technologie eingerichtet wurde. Diese Institution verfolgt das Ziel, im gemeinsamen Dialog und Bewertung sowohl eine höhere Transparenz herzustellen als auch die Finanzierung klinischer und wissenschaftlicher aber auch für das Allgemeinwohl relevanter Studien langfristig abzusichern.

Qualitative Anforderungen an Zelltherapie-/Gentherapieprodukte für den klinischen Einsatz aus industrieller und behördlicher Sicht: Notwendigkeit der Interaktion zwischen Industrie und Klinik

Peter Heinrich und Irene Gander

MediGene AG, Martinsried bei München

Die Zeit, in der Gentherapie-Zelltherapie-Behandlungen unter der Rubrik „Heilversuche“ einzuordnen waren, ist vorüber. Die ersten gentherapeutischen Studien 1994 in Freiburg und Berlin wurden unter dieser Kategorie durchgeführt. Nach der Definition aus §§ 40 ff AMG sind die neuen Studien jedoch nicht mehr als Einzelfallbehandlungen anzusehen. Es handelt sich jetzt vielmehr bei klinischen Prüfungen um eine Hypothesengenerierung im Hinblick auf ein Arzneimittel. Zellen als Therapeutikum müssen damit hohen Qualitätsanforderungen gerecht werden. Gleiches gilt für Vektoren, die in Zellen eingebracht werden.

Das gilt für Vektoren, die in Zellen eingebracht werden.

Damit unterliegen klinische Studien und gentherapeutisches Material nun Gesetzen und Richtlinien, wie herkömmliche Therapieformen. In den letzten Jahren sind eine Fülle von Richtlinien herausgegeben worden, die sich speziell mit den Themen Biologische Wirkstoffe und Gentherapie beschäftigen. So gab es in Deutschland eine Bund-Länder-Gruppe zum Thema „Somatische Gentherapie“, in denen die Standards für diese Therapieform und die Qualitätsanfor-

derungen erarbeitet wurden. Ein Abschlußbericht erschien 1997 unter fachlicher Beratung zwischen Bundesinstitut für Arzneimittelhersteller, dem Paul-Ehrlich-Institut und dem Robert-Koch-Institut. Es sei auch auf die Richtlinien der Bundesärztekammer zum Gentransfer in menschliche Körperzellen von 1995 hingewiesen.

Im Hinblick auf die Zulassung eines gentherapeutischen Wirkstoffs liegen wir im Geltungsbereich der EMEA. Um internationalen Standards gerecht zu werden, sollten die ICH-Guidelines berücksichtigt werden sowie die Richtlinien der FDA.

Es ist nicht einfach, aus dieser Fülle von Dokumenten klar die Voraussetzungen für ein bestimmtes Zell-/Gentherapeutikum zu entnehmen, bevor dieses in der Klinik eingesetzt werden darf, ins Besondere im Hinblick auf präklinische Tests und die Sicherheitsaspekte des Therapeutikums.

Eindeutig ist, daß ein gentherapeutisches Arzneimittel unter „Good Manufacturing Practices“ (GMP) hergestellt werden muß. Die Zellen sind als ein steriles Produkt einzustufen und müssen unter hochreinen Bedingungen behandelt werden. Dies erfordert entsprechende Räumlichkeiten (laut Betriebsverordnung pharmazeutischer Unternehmer), mit einem Lüftungssystem, daß hochreine Bedingungen ermöglicht. Es müssen zu diesem Zweck GMP-Labors errichtet werden. Eine andere Möglichkeit ist die Isolorteknik. Die Räumlichkeiten sind aber nur eine kleine, wenn auch kostspielige Komponente des GMP-Systems. Es werden hohe Anforderungen an alle Ausgangsstoffe gestellt. So müssen z. B. die Seren, die für die Zellkultur verwendet werden, aus Ländern kommen, die bisher BSE-frei waren. Die Seren müssen auf Rinderviren getestet und zertifiziert sein. Es muß ein Dokumentationssystem aufgebaut werden. Standard Operating Procedures (SOPs) müssen geschrieben werden. Es muß bindend beschrieben werden, wie Arbeitsschritte durchgeführt werden, wie genau Geräte benutzt und geeicht werden. Es müssen genaue Vorgaben für die Wartung gemacht werden. Benötigt werden ferner SOPs für die Reinhaltung der Räumlichkeiten und SOPs für die Kontrolle der Reinhaltung, um nur ein paar Beispiele zu nennen. Es besteht die Pflicht, daß Personal in der Einhaltung der SOPs zu schulen.

Will man ein Gen-Zelltherapeutikum herstellen, so bedarf man zudem einer Herstellerlaubnis der zuständigen Landesbehörde (§ 13 AMG), sofern das Gentherapeutikum nicht vom behandelnden Arzt selbst hergestellt wird. Bei Gentherapeutika, die Impfstoffe oder Blutzubereitungen sind, entscheidet das Paul-Ehrlich-Institut im Benehmen mit der Landesregierung über diese Erlaubnis.

Der Leiter und Verantwortliche der Herstellung muß spezifische Voraussetzungen mitbringen. Hier unterscheidet der Gesetzgeber zwischen Blutprodukten und Produkten der somatischen Gentherapie. Für Blutprodukte muß der Herstellungsleiter unter anderem eine mindestens dreijährige Erfahrung auf dem Gebiet der medizinischen Serologie oder medizinischen Mikrobiologie nachweisen können. Den Herstellungsprozeß muß ein Kontrolleur begleiten mit vergleichbarer Qualifikation. Für die somatische Gentherapie kann der Herstellungsleiter zugleich Kontrolleur sein. Als praktische Erfahrung wird hier eine zweijährige Tätigkeit auf einem medizinisch relevanten Gebiet der Gentechnik, insbesondere der Mikrobiologie, Virologie oder Molekularbiologie erwartet.

Das gentherapeutische Produkt muß während seiner Entwicklung eine Reihe von Sicherheitstests durchlaufen. Das bedeutet für Vektoren, die ein therapeutisch wirksames Gen einschleusen sollen z. B., daß die DNA-Sequenz sowohl von dem betreffenden Gen, von den Gen-/Vektorübergängen als auch von dem die Expression regulierenden Promoterbereich, zu kontrollieren ist. Ferner muß die genetische Stabilität gewährleistet sein. Eukaryontische Zellen, die für die Vervielfältigung der Vektor-DNA benutzt werden, müssen zunächst unter GMP-Bedingungen herangezogen werden. Von der Zelllinie müssen sogenannte Master-Zell-Bänke angelegt werden. Diese müssen zertifiziert werden. Das bedeutet, daß sie zunächst auf Sterilität und Mykoplasmenfreiheit getestet werden müssen. Die Identität muß mittels Isoenzym-Tests nachgewiesen werden. Des weiteren muß sichergestellt werden, daß die Zellen nicht mit eventuell für den Menschen schädlichen Viren verunreinigt sind. Hierzu müssen eine Reihe von In-vitro- und In-vivo-Tests durchgeführt werden. Handelt es sich bei den Zellen um menschliche beziehungsweise andere Primatenzellen, so sind die Anforderungen hier besonders hoch.

Nur Zellen aus einer zertifizierten Masterzellbank dürfen während der Produktion eingesetzt werden. Beim Einsatz von allogenen Zellen für die Gentherapie sind für diese entsprechende Tests erforderlich. Alle Tests müssen unter GLP-Bedingungen durchgeführt werden. Etwas anders gestaltet es sich, wenn autologe Gentherapie angewendet wird. Hier kann man an den Patientenzellen die zum Teil sehr zeitaufwendigen Tests nicht durchführen. GMP-Bedingungen müssen natürlich auch hier unbedingt eingehalten werden, um eine Kontamination mit z. B. Rhino- oder Adenoviren während der Bearbeitung auszuschließen.

Neben diesen Sicherheitstests müssen präklinische Versuche durchgeführt werden. So sollte z. B. neben der Toxizität, wenn möglich auch gezeigt werden, wohin die Zellen nach der Applikation wandern.

Welche der Tests im Detail für ein bestimmtes Zell-/Gentherapieprodukt erforderlich sind, sollte im Einvernehmen mit der Behörde, dem Paul-Ehrlich-Institut oder BfArM entschieden werden. Rat kann auch bei der zuständigen europäischen Behörde, der EMEA eingeholt werden.

Durch alle die genannten Auflagen wird der Entwicklungsprozeß von zell-/gentherapeutischen Produkten sehr aufwendig, sowohl was die Zeit, die Räumlichkeiten, das Personal als auch was die Kosten betrifft. Die Etablierung der kompletten Sicherheitstestung im eigenen Haus, sei es nun Klinik- oder Industrielabor, ist zudem sicher nicht rentabel. Für die Entwicklung ist somit das „Outsourcing“ im Allgemeinen ein „muß“. Insgesamt ist die Durchführung der Entwicklung, zumal bis zur Marktreife, für ein Klinikum allein nicht möglich. Es ist hier eine enge Kollaboration zwischen Klinik und Industrie erforderlich.

Literatur

Abschlußbericht der Bund-Länder-Arbeitsgruppe „Somatische Gentherapie“, Bundesministerium für Gesundheit

U. Kleeberg, A. G. Hildebrandt in: Arzneimittel und Medizinprodukte, Bewertung - Verahren - Perspektiven, Hrsg. T. Ott, F.-W. Hefendehl und P. Grosdanoff, Bundesministerium für Arzneimittel und Medizinprodukte

Internetadressen für Guidelines: FDA: <http://www.fda.gov/cber>, EMEA: <http://www.eudra.org>, GMP allgemein, mit weiterführenden Links z. B.: <http://www.gmp-navigator.com>

Anschriften der Referenten

Prof. Dr. Adriano Aguzzi
Universitätsspital Zürich
Institut für Neuropathologie
Schmelzbergstr. 12, CH-8091 Zürich

Friedger von Auer
Bundesministerium für Gesundheit
D-53108 Bonn

Prof. Dr. Wolfram Bode
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18a, D-82152 Martinsried

PD Dr. Michael Hallek
Klinikum Großhadern der
Ludwig-Maximilian-Universität
Medizinische Klinik III
Abteilung Hämatologie
Marchioninstr. 15, D-81377 München

Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt
GSF-Forschungszentrum
Institut für Klinische Molekularbiologie
Marchioninstr. 25, D-81377 München

PD Dr. Gunther Hartmann
University of Iowa
Department of Internal Medicine
540 EMRB, Iowa City, IA 52242 (USA)

Prof. Dr. Marcell U. Heim
Universität Magdeburg
Institut für Transfusionsmedizin
und Immunhämatologie mit Blutbank
Leipziger Str. 44, D-39120 Magdeburg

Dr. Peter Heinrich
MediGene AG
Lochhamer Str. 11, D-82152 Martinsried

Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann
Klinikum Großhadern der
Ludwig-Maximilian-Universität
Medizinische Klinik III
Abteilung Hämatologie/Onkologie
Marchioninstr. 15, D-81377 München

Dr. Roloff Johannsen
Centeon Pharma GmbH
Postfach 1230, D-35002 Marburg

Prof. Dr. Lothar Kanz
Direktor der Abteilung Innere Medizin II
Universität Tübingen
Otfried-Müller-Str. 10, D-72076 Tübingen

Prof. Dr. Volker Kiefel
Universitätsklinikum Leipzig
Institut für Klinische Immunologie und
Transfusionsmedizin
Delitzscher Str. 141, D-04129 Leipzig

Prof. Dr. Hans Jochem Kolb
Klinikum Großhadern der
Ludwig-Maximilian-Universität
Medizinische Klinik III
Hämatologische Transplantation
Marchioninstr. 15, D-81377 München

Prof. Dr. Klaus Lechner
Allgemeines Krankenhaus der Stadt Wien
Universitätsklinikum für Innere Medizin I
Klinische Abteilung für Hämatologie
und Hämostaseologie
Währinger Gürtel 18-20, A-1090 Wien

PD Dr. Johannes Löwer
Ständiger Vertreter des Präsidenten
Paul-Ehrlich-Institut
Bundesamt für Sera und Impfstoffe
Paul-Ehrlich-Str. 51, D-63225 Langen

Prof. Dr. Ian Peake
The University of Sheffield
Division of Molecular and
Genetic Medicine
Royal Hallamshire Hospital
Glossop Road, GB-S10 2JF Sheffield

Prof. Dr. Michael Pfreundschuh
Direktor der I. Medizinischen Klinik
Universitätskliniken des Saarlandes
Gebäude 40
Oscar-Orth-Straße, D-66421 Homburg/Saar

Prof. Dr. Norbert Schmitz
Christian-Albrechts-Universität Kiel
II. Medizinische Klinik und Poliklinik
Schwanenweg 20, D-24105 Kiel

Prof. Dr. Wolfgang Schramm
Leiter der Abteilung Transfusionsmedizin
und Hämostaseologie
Klinikum Innenstadt der
Ludwig-Maximilian-Universität
Medizinische Klinik
Ziemssenstr. 1, D-80336 München

Prof. Dr. Dr. h.c. Peter C. Scriba
Direktor der Medizinischen Klinik
Klinikum Innenstadt der
Ludwig-Maximilian-Universität
Ziemssenstr. 1, D-80336 München

Prof. Dr. Thomas Szucs
Klinikum Innenstadt der
Ludwig-Maximilian-Universität
Medizinische Klinik
Ziemssenstr. 1, D-80336 München
und
Zentrum für Pharmakoökonomie
Universität Mailand
I-20133 Mailand

Prof. Dr. Volker Wahn
Universitätskinderklinik Düsseldorf
Moorenstr. 5, D-40225 Düsseldorf

Manuskripte sind an die Redaktion zu senden. Es werden nur Erstveröffentlichungen angenommen. Die Autoren versichern, daß sie allein berechtigt sind, über die urheberrechtlichen Nutzungsrechte an ihren Beiträgen einschl. etwaiger Bilder, Tabellen etc. zu verfügen und daß keine Rechte Dritter verletzt werden. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung geht das Recht für alle Sprachen und Länder sowie für die Verbreitung, Vervielfältigung, Speicherung und Ausgabe durch Datenbanken o.ä. für die Dauer von zehn Jahren ab Erscheinen an den Verlag über. Der Verlag ist berechtigt, anderen den Nachdruck ohne besondere Vergütung des Autors zu gestatten. Fotokopien für den persönlichen und sonstigen eigenen Gebrauch dürfen nur von einzelnen Beiträgen oder Teilen daraus als Einzelkopien hergestellt werden. Jede im Bereich eines gewerblichen Unternehmens hergestellte oder benutzte Kopie dient gewerblichen Zwecken gemäß § 54 (2) des Urheberrechtsgesetzes und verpflichtet zur Gebührenzahlung an die Verwertungsgesellschaft Wort, Abteilung Wissenschaft, Goethestraße 49, D-80336 München (Deutschland). Das Fehlen des Symbols [®] nach Namen bedeutet nicht, daß der Name nicht durch Warenzeichen geschützt ist. Die Verfasser erhalten von ihren Arbeiten 50 Sonderdrucke (Format DIN A 4) unberechnet. Sonderdrucke in kleinerem Format (DIN A 5) werden nur auf Wunsch und gegen Berechnung hergestellt.

Verantwortlich für die Redaktion: Prof. Dr. med. Hans Georg Classen u. Viktor Schramm. Redaktions-Sekretariat: Eveline Dangel. Verantwortlich für Anzeigen: Hella Butscher. Redaktion, Verlag und Anzeigenannahme: ECV · Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, Postfach 12 55, D-88322 Aulendorf (Deutschland); Telefon (00 49) (0) 75 25 940 0; Telefax: (00 49) (0) 75 25 940 180; e-mail: redaktion@ecv.de; Internet: <http://www.ecv.de>. Zur Zeit gilt Anzeigenpreisliste 21. Druck: VEBU Druck GmbH, Am Reutele 18, D-88427 Bad Schussenried (Deutschland). Die Zeitschrift erscheint monatlich und kann vom Verlag oder durch eine Buchhandlung bezogen werden. Das Jahresabonnement (mindestens 12 Hefte) kostet 552,- DM zuzügl. 25,- DM Versandkosten, das Auslands-Jahresabonnement 605,- DM zuzügl. 52,- DM Versandkosten. Das Einzelheft kostet 54,- DM zuzügl. Versandkosten (MwSt. jeweils eingeschlossen). Das Abonnement ist weiter rechtsverbindlich, wenn es nicht mindestens 3 Monate vor Jahresende gekündigt wird. Konten des Verlages: Dresdner Bank Ravensburg (BLZ 650 800 09) 2 824 103; Kreissparkasse Aulendorf (BLZ 650 501 10) 55 205 960; Postcheckkonto Stuttgart (BLZ 600 100 70) 294 87-703.