

VERÖFFENTLICHUNGEN DES INSTITUTS
FÜR DEUTSCHES, EUROPÄISCHES
UND INTERNATIONALES MEDIZINRECHT,
GESUNDHEITSRECHT UND BIOETHIK
DER UNIVERSITÄTEN HEIDELBERG UND MANNHEIM

48

SARA GERKE • JOCHEN TAUPITZ
CLAUDIA WIESEMANN • CHRISTIAN KOPETZKI
HEIKO ZIMMERMANN Herausgeber

Die klinische Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen

Ein Stakeholder-Sammelband

 Springer

Veröffentlichungen des Instituts für Deutsches, Europäisches und Internationales Medizinrecht, Gesundheitsrecht und Bioethik der Universitäten Heidelberg und Mannheim

Band 48

Reihe herausgegeben von

Peter Axer, Heidelberg, Deutschland

Oliver Brand, Mannheim, Deutschland

Gerhard Dannecker, Heidelberg, Deutschland

Ralf Müller-Terpitz, Mannheim, Deutschland

Jan C. Schuhr, Heidelberg, Deutschland

Jochen Taupitz, Mannheim, Deutschland

Weitere Bände in dieser Reihe: <http://www.springer.com/series/4333>

Sara Gerke • Jochen Taupitz
Claudia Wiesemann • Christian Kopetzki
Heiko Zimmermann
Hrsg.

Die klinische Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen

Ein Stakeholder-Sammelband

 Springer

Hrsg.

Sara Gerke
The Petrie-Flom Center for Health Law
Policy, Biotechnology, and Bioethics at
Harvard Law School
Harvard University
Cambridge, USA

Jochen Taupitz
IMGB
Universität Mannheim
Mannheim, Deutschland

Claudia Wiesemann
Institut für Ethik und Geschichte der
Medizin
Universitätsmedizin Göttingen
Göttingen, Deutschland

Christian Kopetzki
Institut für Staats- und Verwaltungsrecht
Universität Wien
Wien, Österreich

Heiko Zimmermann
Fraunhofer-Institut für Biomedizinische
Technik
Sulzbach, Deutschland

Die Kapitel „Naturwissenschaftliche, ethische und rechtliche Empfehlungen zur klinischen Translation der Forschung mit humanen induzierten pluripotenten Stammzellen und davon abgeleiteten Produkten“ und „Herausforderungen innovativer Gewebemedizin aus unternehmerischer Sicht“ werden auf link.springer.com unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>) veröffentlicht. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation im Kapitel.

ISSN 1617-1497

ISSN 2197-859X (electronic)

Veröffentlichungen des Instituts für Deutsches, Europäisches und Internationales
Medizinrecht, Gesundheitsrecht und Bioethik der Universitäten Heidelberg und Mannheim
ISBN 978-3-662-59051-5 ISBN 978-3-662-59052-2 (eBook)
<https://doi.org/10.1007/978-3-662-59052-2>

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Springer

© Springer-Verlag GmbH Deutschland, ein Teil von Springer Nature 2020, korrigierte Publikation 2020
Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von allgemein beschreibenden Bezeichnungen, Marken, Unternehmensnamen etc. in diesem Werk bedeutet nicht, dass diese frei durch jedermann benutzt werden dürfen. Die Berechtigung zur Benutzung unterliegt, auch ohne gesonderten Hinweis hierzu, den Regeln des Markenrechts. Die Rechte des jeweiligen Zeicheninhabers sind zu beachten.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag, noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen. Der Verlag bleibt im Hinblick auf geografische Zuordnungen und Gebietsbezeichnungen in veröffentlichten Karten und Institutionsadressen neutral.

Lektorat: Brigitte Reschke

Springer ist ein Imprint der eingetragenen Gesellschaft Springer-Verlag GmbH, DE und ist ein Teil von Springer Nature.

Die Anschrift der Gesellschaft ist: Heidelberger Platz 3, 14197 Berlin, Germany

Vorwort

Der vorliegende Sammelband analysiert die klinische Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) aus naturwissenschaftlicher, unternehmerischer, patientenorientierter, ethischer und rechtsvergleichender Perspektive. Die Beiträge des Bandes sind systematisch nach Stakeholdern gegliedert, also nach jenen Personen oder Organisationen, die von einem Transfer der Stammzellforschung in die klinische Medizin direkt oder indirekt betroffen sind. Dies ermöglicht eine zielgenaue Suche nach Antworten auf individuelle Fragen zur klinischen Translation der hiPS-Zell-Forschung, das heißt zur Übertragung der Ergebnisse der (Grundlagen-)Forschung in die klinische Praxis.

Des Weiteren enthält dieser Sammelband naturwissenschaftliche, ethische und rechtliche Empfehlungen des deutsch-österreichischen Forschungsverbunds ClinhiPS. In zweijähriger gemeinsamer Arbeit haben deutsche und österreichische Wissenschaftler/-innen aus Naturwissenschaft, Medizinethik und Recht die spezifischen mit der klinischen Translation von hiPS-Zellen und davon abgeleiteten Produkten verbundenen Probleme identifiziert und analysiert. Zusätzlich wurden die naturwissenschaftlichen Herausforderungen für Qualität und Sicherheit im Kontext der klinischen Anwendung am Menschen untersucht und aktuelle Lücken in der ethischen und rechtlichen Regulierung aufgedeckt. Die Empfehlungen richten sich an alle Stakeholder, insbesondere an Forscher/-innen, Kliniker/-innen, Unternehmer/-innen, Spender/-innen, Patienten/Patientinnen, Ethikkommissionen und Regulierungsbehörden sowie an Gesetzgeber. Sie sollen zu einer erfolgreichen Umsetzung der hiPS-Zell-Forschung in die klinische Praxis in Deutschland und Österreich unter Beachtung höchster Qualitäts-, Sicherheits- und Wirksamkeitsstandards beitragen.

Wir bedanken uns beim Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Förderung des Verbundprojekts „ClinhiPS: Eine naturwissenschaftliche, ethische und rechtsvergleichende Analyse der klinischen Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen in Deutschland und Österreich“ (FKZ

01GP1602A, 01GP1602B und 01GP1602C). Ein weiterer Dank geht an alle Autoren/Autorinnen, die einen Beitrag zu diesem Sammelband geleistet haben. Alle Artikel in diesem Sammelband geben ausschließlich die Auffassung der Autoren/Autorinnen wieder.

Cambridge, USA
Mannheim, Deutschland
Göttingen, Deutschland
Wien, Österreich
Sulzbach, Deutschland
Januar 2020

Sara Gerke
Jochen Taupitz
Claudia Wiesemann
Christian Kopetzki
Heiko Zimmermann

Inhaltsverzeichnis

Die klinische Anwendung von hiPS-Zellen: ein Überblick 1
Sara Gerke und Solveig Lena Hansen

Teil I Grundlagenforschung

**Naturwissenschaftliche Grundlagen im Kontext einer klinischen
Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen 19**
Julia C. Neubauer*, Stephanie Bur*, Ina Meiser*, Andreas Kurtz und
Heiko Zimmermann

Teil II Klinische Forschung

**Herzreparatur mit Herzmuskelpflaster aus Stammzellen – Umsetzung
eines präklinischen Konzeptes in die klinische Prüfung 131**
Wolfram-Hubertus Zimmermann

Teil III Industrie

**Bioethik in der Stammzellforschung und der Genom-Editierung am
Beispiel eines Wissenschafts- und Technologieunternehmens 143**
Thomas Herget, Jean Enno Charton und Steven Hildemann

**Herausforderungen innovativer Gewebemedizin aus unternehmerischer
Sicht 157**
Michael Harder

Teil IV Patientenvertretung

Patientenvertretung in der (hiPS-Zell-)Forschung als Herausforderung für Patientenorganisationen	181
Stephan Kruip	

Teil V Ethik

Ethische Analyse der klinischen Forschung mit humanen induzierten pluripotenten Stammzellen	197
Solveig Lena Hansen, Clemens Heyder und Claudia Wiesemann	

Teil VI Recht

Die klinische Translation von hiPS-Zellen in Deutschland	243
Sara Gerke	

Die klinische Translation von hiPS-Zellen in Österreich	329
Christian Kopetzki, Verena Christine Blum, Danielle Noe und Claudia Steinböck	

Eine rechtsvergleichende Analyse der klinischen Translation von hiPS-Zellen in Deutschland und Österreich	421
Sara Gerke, Christian Kopetzki, Verena Christine Blum, Danielle Noe und Claudia Steinböck	

Teil VII Empfehlungen des Verbunds ClinhiPS

Naturwissenschaftliche, ethische und rechtliche Empfehlungen zur klinischen Translation der Forschung mit humanen induzierten pluripotenten Stammzellen und davon abgeleiteten Produkten	459
Sara Gerke, Solveig Lena Hansen, Verena Christine Blum, Stephanie Bur, Clemens Heyder, Christian Kopetzki, Ina Meiser, Julia C. Neubauer, Danielle Noe, Claudia Steinböck, Claudia Wiesemann, Heiko Zimmermann und Jochen Taupitz	

Erratum zu: Die klinische Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen	E1
Sara Gerke, Jochen Taupitz, Claudia Wiesemann, Christian Kopetzki und Heiko Zimmermann	

Autorenverzeichnis

Mag. Dr. Verena Christine Blum Abteilung Medizinrecht des Instituts für Staats- und Verwaltungsrecht der Universität Wien, Wien, Österreich

Dr. Stephanie Bur Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT, Sulzbach, Deutschland

Dr. Jean Enno Charton Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Sara Gerke, Dipl.-Jur. Univ., M. A. Medical Ethics and Law The Petrie-Flom Center for Health Law Policy, Biotechnology, and Bioethics at Harvard Law School, Harvard University, Cambridge, MA, USA

Dr. phil. Solveig Lena Hansen Universitätsmedizin Göttingen, Institut für Ethik und Geschichte der Medizin, Göttingen, Deutschland

Dr. Michael Harder corlife oHG, Hannover, Deutschland

Prof. Dr. Thomas Herget Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Clemens Heyder, M.A. M.mel. Universitätsmedizin Göttingen, Institut für Ethik und Geschichte der Medizin, Göttingen, Deutschland

Prof. Dr. Steven Hildemann Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Univ.-Prof. DDr. Christian Kopetzki Abteilung Medizinrecht des Instituts für Staats- und Verwaltungsrecht, Universität Wien, Wien, Österreich

Stephan Kruip Vorsitzender des Mukoviszidose e.V. Bundesverband Cystische Fibrose (CF), Bonn, Deutschland

Prof. Dr. Andreas Kurtz Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland

Dr. Ina Meiser Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT, Sulzbach, Deutschland

Dr. Julia C. Neubauer Fraunhofer-Projektzentrum für Stammzellprozesstechnik, Würzburg, Deutschland

Mag. Danielle Noe Abteilung Medizinrecht des Instituts für Staats- und Verwaltungsrecht der Universität Wien, Wien, Österreich

Mag. Dr. Claudia Steinböck Abteilung Medizinrecht des Instituts für Staats- und Verwaltungsrecht der Universität Wien, Wien, Österreich

Prof. Dr. Jochen Taupitz Institut für Deutsches, Europäisches und Internationales Medizinrecht, Gesundheitsrecht und Bioethik der Universitäten Heidelberg und Mannheim, Mannheim, Deutschland

Prof. Dr. Claudia Wieseemann Institut für Ethik und Geschichte der Medizin, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, Deutschland

Prof. Dr. Heiko Zimmermann Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT, Sulzbach, Deutschland

Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Biotechnologie/Nanotechnologie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland

Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile

Prof. Dr. med. Wolfram-Hubertus Zimmermann Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, Deutschland

Die klinische Anwendung von hiPS-Zellen: ein Überblick



Sara Gerke und Solveig Lena Hansen

Zusammenfassung Seit mehr als zehn Jahren können differenzierte Körperzellen, wie etwa Hautzellen, im Labor derart verändert („induziert“) werden, dass humane pluripotente Stammzellen entstehen. Diese sogenannten humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) besitzen – ebenso wie humane embryonale Stammzellen (hES-Zellen) – das Potenzial, jeden beliebigen Zelltyp des menschlichen Körpers zu bilden. Sie können beispielsweise in Muskel-, Nieren- oder Herzmuskelzellen differenziert werden. In diesem Kapitel wird ein Überblick über das Potential von hiPS-Zellen für die klinische Anwendung und aktuelle Herausforderungen gegeben. Darüber hinaus wird auf die Wichtigkeit der Einbindung von Stakeholdern im Translationsprozess eingegangen und unter anderem der Begriff „Stakeholder“ definiert sowie ein Beispiel für ein mögliches Verfahren zur Stakeholder-Beteiligung gegeben. Den Abschluss bildet ein Überblick über die Beiträge in diesem Sammelband.

S. Gerke (✉)

The Petrie-Flom Center for Health Law Policy, Biotechnology, and Bioethics at Harvard Law School, Harvard University, Cambridge, USA

E-Mail: sgerke@law.harvard.edu

S. L. Hansen

Universitätsmedizin Göttingen, Institut für Ethik und Geschichte der Medizin, Göttingen, Deutschland

E-Mail: solveig-lena.hansen@medizin.uni-goettingen.de

© Springer-Verlag GmbH Deutschland, ein Teil von Springer Nature 2020
S. Gerke et al. (Hrsg.), *Die klinische Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen*, Veröffentlichungen des Instituts für Deutsches, Europäisches und Internationales Medizinrecht, Gesundheitsrecht und Bioethik der Universitäten Heidelberg und Mannheim 48,
https://doi.org/10.1007/978-3-662-59052-2_1

1 HiPS-Zell-Technologie: Potenzial und aktuelle Herausforderungen

Seit mehr als zehn Jahren können differenzierte Körperzellen, wie etwa Hautzellen, im Labor derart verändert („induziert“) werden, dass humane pluripotente Stammzellen entstehen.¹ Diese sogenannten humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) besitzen – ebenso wie humane embryonale Stammzellen (hES-Zellen) – das Potenzial, jeden beliebigen Zelltyp des menschlichen Körpers zu bilden. Sie können beispielsweise in Muskel-, Nieren- oder Herzmuskelzellen differenziert werden. Unter *hiPS-Zell-basierten Produkten* sind solche Produkte zu verstehen, die auf der Grundlage von hiPS-Zellen und ihren Differenzierungsderivaten hergestellt werden.

Schon heute werden hiPS-Zellen im Labor zum Zweck der Krankheitsmodellierung und des Arzneimittel-Screenings eingesetzt.² In Zukunft sollen sie auch klinisch zur Behandlung von Krankheiten wie Altersbedingte Makuladegeneration (AMD)³ oder Herzmuskelschwäche⁴ genutzt werden. Für eine potenziell klinische Anwendung gibt es zwei denkbare Ansätze: entweder werden die hiPS-Zellen aus *autologen* (patienteneigenen) Zellen oder aus *allogenen* (nicht vom Patienten selbst, sondern von einem Spender stammenden) Zellen generiert.⁵

In Japan wurden bereits die ersten Patienten in klinischen Studien mit hiPS-Zell-basierten Produkten behandelt. So wurde im September 2014 in Kobe die weltweit erste Patientin, die an exsudativer (feuchter) AMD litt, mit retinalen Pigmentepithelzellen (RPE-Zellen) behandelt, die aus autologen hiPS-Zellen abgeleitet wurden.⁶ Die Transplantation erfolgte ohne schwerwiegende Nebenwirkungen.⁷ Trotzdem wurde die Studie im März 2015 ausgesetzt, nachdem Mutationen in den autologen hiPS-Zellen eines weiteren Patienten gefunden wurden.⁸ Mittlerweile wurde auch eine zweite Studie in Kobe zur Transplantation von RPE-Zellen bei Patienten mit feuchter AMD durchgeführt.⁹ Diesmal wurden die RPE-Zellen aus allogenen hiPS-Zellen eines gesunden Spenders abgeleitet. Der erste Patient wurde bereits im März 2017 behandelt.¹⁰ Im Januar 2018 geriet allerdings auch diese Stu-

¹Park et al. 2008; Takahashi et al. 2007; Yu et al. 2007.

²Ebert et al. 2012.

³Netzhauterkrankung; für weitere Informationen s. Neubauer et al. 2020, Abschn. 2.3.3.1.

⁴Für weitere Informationen s. Zimmermann 2020.

⁵Die maskuline Form wird in diesem Beitrag aus Gründen der leichteren Lesbarkeit verwendet.

⁶S. dazu <http://www.umin.ac.jp/ctr>, UMIN000011929 (RIKEN). Zugegriffen: 16.01.2020. Näheres zur Studie s. auch Gerke und Taupitz 2018, S. 227 sowie Neubauer et al. 2020, Abschn. 2.3.3.1.

⁷Mandai et al. 2017. S. ebenfalls RIKEN 2015; RIKEN 2017a.

⁸Garber 2015, S. 890.

⁹S. dazu <http://www.umin.ac.jp/ctr>, UMIN000026003 (Abteilung für Ophthalmologie, Kobe City Medical Center General Hospital). Zugegriffen: 16.01.2020.

¹⁰RIKEN 2017b; AMED 2018.

die in die Kritik, da eine schwerwiegende – wenn auch nicht lebensbedrohliche – unerwünschte Reaktion bei einem Teilnehmer gemeldet wurde.¹¹

Im Juli 2018 wurde zudem beispielsweise in Japan die erste Phase I/II-Studie mit dopaminergen Vorläuferzellen begonnen. Diese wurden aus allogenen hiPS-Zellen mit dem Ziel abgeleitet, Morbus Parkinson zu behandeln.¹² Die erste Transplantation von 2,4 Millionen Vorläuferzellen in das Gehirn eines Patienten fand Cyranoski 2018. Mittlerweile wurde allerdings auch diese Studie ausgesetzt.¹³

Im Dezember 2019 gaben die National Institutes of Health (NIH) die erste klinische Prüfung mit autologen hiPS-Zellen zur Behandlung der fortgeschrittenen „trockenen“ Form der AMD in den USA bekannt.¹⁴ Aus hiPS-Zellen sollen RPE-Zellen abgeleitet und Patienten mit einem Pflaster („Patch“) transplantiert werden.¹⁵ Im Februar 2019 hat zudem Fate Therapeutics eine klinische Prüfung mit ihrem universellen (allogenen) hiPS-Zell-basierten Produkt zur Behandlung von fortgeschrittenen soliden Tumoren in den USA begonnen.¹⁶

Doch nicht nur in Japan und den USA, sondern auch in anderen Ländern, einschließlich Europa, werden klinische Studien mit hiPS-Zell-basierten Produkten durchgeführt bzw. sind klinische Studien geplant. Zum Beispiel hat *Cynata Therapeutics*, ein australisches Unternehmen, bereits eine klinische Phase I-Studie in Australien und dem Vereinigten Königreich abgeschlossen.¹⁷ In dieser Studie wurden mesenchymale Stammzellen aus allogenen hiPS-Zellen abgeleitet. Sie dienen zur Behandlung von steroid-resistenter akuter Graft-versus-Host-Reaktion (ebenfalls Graft-versus-Host-Disease, GvHD), einer Reaktion des Immunsystems, die nach einer allogenen Knochenmark- oder Stammzelltransplantation auftreten kann.¹⁸ Eine Phase II-Studie ist ebenfalls geplant.¹⁹ In Deutschland wird die erste klinische Prüfung mit aus hiPS-Zellen abgeleiteten Herzmuskelzellen zur Behandlung der Herzinsuffizienz ebenfalls erwartet.²⁰ Wie diese Beispiele zeigen, befindet sich die hiPS-Zell-Technologie in der klinischen Translation: die Ergebnisse der (Grundlagen-)Forschung werden in die klinische Praxis übertragen.

Die hiPS-Zell-Technologie birgt ein hohes Potenzial für die klinische Anwendung, doch gleichzeitig auch viele Herausforderungen. Die *International Society for Stem Cell Research (ISSCR)* hat beispielsweise 2016 Leitlinien für die

¹¹ Kyodo 2018.

¹² S. dazu <http://www.umin.ac.jp/ctr>, UMIN000033564 (Kyoto University Hospital). Zugegriffen: 16.01.2020.

¹³ S. <http://www.umin.ac.jp/ctr>, UMIN000033564 (Kyoto University Hospital). Zugegriffen: 16.01.2020.

¹⁴ NIH 2019.

¹⁵ Vgl. Sharma et al. 2019.

¹⁶ S. dazu <https://clinicaltrials.gov>, NCT03841110 (Fate Therapeutics). Zugegriffen: 16.01.2020. S. ebenfalls zurlangfristig angelegten Nachbeobachtungsstudie <https://clinicaltrials.gov>, NCT04106167 (Fate Therapeutics). Zugegriffen: 16.01.2020.

¹⁷ Cynata Therapeutics 2019.

¹⁸ Näheres zur Studie s. <https://clinicaltrials.gov>, NCT02923375 (Cynata Therapeutics Limited). Zugegriffen: 16.01.2020.

¹⁹ Cynata Therapeutics 2019.

²⁰ Näheres dazu s. Wildermuth 2018. S. auch Zimmermann 2020.

Stammzellforschung und klinische Translation sowie 2018 praktische Hinweise für Ärzte und Ethikkommissionen bzw. institutionelle Prüfungsgremien für stammzellbasierte klinische Studien veröffentlicht.²¹ Auch das *German Stem Cell Network* hat 2018 ein White Paper mit Analyse und Empfehlungen zur klinischen Translation von Stammzellforschung in Deutschland veröffentlicht.²² Weiterer – auf hiPS-Zellen zugeschnittener – Bedarf ist gegeben: Um eine erfolgreiche klinische Translation von hiPS-Zellen unter Beachtung höchster Qualitäts-, Sicherheits- und Wirksamkeitsstandards zu sichern, sind die Herausforderungen frühzeitig und umfassend aus einer interdisziplinären Perspektive zu analysieren.

Dieser Aufgabe hat sich das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderte Projekt „ClinhiPS: Eine naturwissenschaftliche, ethische und rechtsvergleichende Analyse der klinischen Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen in Deutschland und Österreich“ gewidmet.²³ In zweijähriger gemeinsamer Arbeit führte ein Forschungsverbund aus deutschen und österreichischen Wissenschaftlern aus Naturwissenschaft, Medizinethik und Recht eine umfassende Analyse zur klinischen Anwendung und Translation der Forschung mit hiPS-Zellen und davon abgeleiteten Produkten in Deutschland und Österreich durch.

Das naturwissenschaftliche Teilprojekt (s. Teil I dieses Sammelbands)²⁴ analysierte die klinische Anwendung von hiPS-Zellen am Menschen mit dem Fokus auf der Schaffung von Qualitätsstandards für eine sichere Anwendung von hiPS-Zellbasierten Therapien. Zu diesem Zweck wurde der Gesamtprozess von der Generierung von hiPS-Zellen über ihre Expansion und Differenzierung bis hin zur Qualitätskontrolle, Charakterisierung, Kryokonservierung und Lagerung eingehend untersucht.

Das ethische Teilprojekt (s. Teil V dieses Sammelbands)²⁵ widmete sich moralischen Problemen, die im Zuge der klinischen Translation von hiPS-Zellen entstehen. Es evaluierte die klinische Implementierung von hiPS-Zellbasierten Therapien. Bestandteil der Analyse waren unter anderem Fragen über die Einwilligung und Aufklärung von Spendern, der Studienplanung und Probandenauswahl sowie einer Risiko-/Belastung-Chancen-Bewertung.

Das juristische Teilprojekt (s. Teil VI dieses Sammelbands)²⁶ war für die rechtsvergleichende Analyse der klinischen Anwendung von hiPS-Zellen in Deutschland und Österreich verantwortlich. Es identifizierte die beiden Rechtslagen, die für einen erfolgreichen Translationsprozess der Ergebnisse der hiPS-Zell-Forschung in die klinische Praxis zu beachten sind. Neben der Identifizierung von rechtlichen Mängeln und Lücken wurden beide Rechtslagen miteinander verglichen und die wesentlichen Unterschiede im Translationsprozess von hiPS-Zellen herausgestellt

²¹ ISSCR 2016; ISSCR 2018

²² GSCN 2018.

²³ Näheres zum Projekt s. www.ClinhiPS.de. Zugegriffen: 16.01.2020.

²⁴ Neubauer et al. 2020.

²⁵ Hansen et al. 2020.

²⁶ Gerke 2020; Kopetzki et al. 2020; Gerke et al. 2020b.

und analysiert. Die Ergebnisse sollen zu mehr Transparenz und Rechtssicherheit beitragen. Der Vergleich soll insbesondere die rechtlichen Divergenzen zwischen Deutschland und Österreich vor dem Hintergrund aufzeigen, dass beide Länder Mitgliedstaaten der Europäischen Union sind. Weiteres Ziel war es, Handlungsempfehlungen an die Gesetzgeber zu geben.

Der vorliegende Sammelband repräsentiert die Ergebnisse des ClinhiPS-Projekts und gibt abschließend naturwissenschaftliche, ethische und rechtliche Empfehlungen des Verbunds zur klinischen Translation der Forschung mit hiPS-Zellen und davon abgeleiteten Produkten (s. Teil VII dieses Sammelbands)²⁷. Er richtet sich an alle Stakeholder, das heißt Individuen und Gruppen, die an der Entwicklung und Anwendung hiPS-Zell-basierter Produkte beteiligt oder von ihr betroffen sind, sowie an die Gesetzgeber. Neben den Ergebnissen der Teilprojekte enthält der Sammelband weitere Beiträge von Stakeholdern aus den Gebieten klinische Forschung, Industrie sowie Patientenvertretung. Diese ergänzenden Beiträge stammen von Referenten und Teilnehmern, die der Tagung: „Die klinische Translation humaner induzierter pluripotenter Stammzellen. Eine Stakeholder-Konferenz zur Evaluation innovativer Risikoforschung“ beiwohnten. Diese Tagung fand am 20. und 21. Oktober 2017 in Göttingen statt. Eine solche Stakeholder-Beteiligung ermöglicht gerade in Bezug auf prospektive Studienvorhaben eine Einbindung unterschiedlicher Perspektiven und Interessen in der Planungsphase klinischer Studien.

Im Folgenden geben wir zunächst eine Arbeitsdefinition des Begriffs „Stakeholder“ und stellen dann das auf der Konferenz in Göttingen angewandte Verfahren und seine Evaluation dar. Den Abschluss bildet ein Überblick über die Beiträge in diesem Sammelband.

2 Einbindung von Stakeholdern im Translationsprozess

2.1 Stakeholder: Eine Arbeitsdefinition

Der Begriff des Stakeholders bezeichnet im Kontext der Medizin Individuen oder Gruppen, die aktiv an gesundheitsbezogenen Entscheidungen beteiligt oder von ihnen betroffen sind. Aufgrund ihrer Betroffenheit haben sie einen Anspruch („stake“) auf Mitbestimmung im Forschungsprozess. Dies beinhaltet zum einen Personen und Institutionen, die bereits finanzielle oder haftungsrechtliche Verantwortung tragen (sog. *primäre Stakeholder*). Sie sind für gewöhnlich von Beginn an in Entscheidungsprozesse eingebunden. Im Kontext der klinischen Forschung sind dies neben den Forschern selbst auch Auftragsunternehmen, Biobanken, Ethikkommissionen und Regulierungsbehörden. Zum anderen sind Stakeholder aber auch solche Personen und Gruppen, die von Forschungsentscheidungen objektiv betroffen sind, ohne

²⁷Gerke et al. 2020a.

selbst Verantwortung für Entscheidungen über den Studienablauf zu tragen (sog. *sekundäre Stakeholder*). Diese objektive Betroffenheit kann direkt oder indirekt sein.²⁸ Direkt Betroffene der hiPS-Zell-Forschung sind sowohl die Spender von somatischen Zellen, die gegebenenfalls über Zusatzbefunde informiert werden und deren Privatsphäre gefährdet sein kann als auch Teilnehmer klinischer Studien. Indirekt Betroffene sind etwa Angehörige, die unter Umständen ebenfalls die Belastungen einer Studienteilnahme (mit-)tragen. Gerade die sekundären Stakeholder sind bislang weder in Entscheidungen über die Studiengestaltung noch den Studienverlauf in systematischer Weise involviert.²⁹

Daneben gibt es vorwiegend subjektiv Betroffene, die mit Anteilnahme oder Befürchtungen auf hochinnovative und risikoreiche Forschung reagieren. Diese Form von subjektiver Betroffenheit geht im Unterschied zu primären und sekundären Stakeholdern oftmals mit einem geringeren normativen Anspruch auf Beteiligung einher. Es besteht hier allerdings durchaus ein Anspruch auf Information, auf deren Grundlage gesundheitliche Entscheidungen gefällt werden können. Normative Relevanz hat die vorwiegend subjektive Betroffenheit jedoch erst, wenn Forschungsvorhaben große Auswirkungen auf das gesellschaftliche Zusammenleben haben. An dieser Stelle setzen das „Patient and Public Involvement“ sowie das „Public Engagement“ an. Beide Konzepte zielen auf einen transparentes Gespräch zwischen Öffentlichkeit und Wissenschaft ab.³⁰ Das „Public Engagement“ soll zur besseren Information über Forschung beitragen und der Öffentlichkeit tatsächliche Möglichkeiten des Dialogs eröffnen. „Patient and Public Involvement“ hingegen bezeichnet konkrete Projekte, die Forschung unter aktiver Beteiligung der Öffentlichkeit durchführen bzw. Forschung für die Öffentlichkeit ermöglichen.³¹

Der Begriff „Stakeholder“ sensibilisiert insbesondere dafür, dem Beteiligungsanspruch verantwortlicher Personen bzw. direkt Betroffener Beachtung zu schenken und zu untersuchen, an welchen Stellen im Translationsprozess es geboten sein kann, sie in Entscheidungen einzubinden.³² Er sensibilisiert weiterhin für verschiedene Rollen, die in der klinischen Translation eingenommen werden, sowie für verschiedene Interessen, die aufeinandertreffen.³³ Zum Beispiel verfolgen Patienten in klinischen Studien häufig das Interesse, ihren Gesundheitszustand zu verbessern. Die meisten Angehörigen von Patienten hoffen ebenfalls auf eine schnelle Genesung ihres kranken Familienmitglieds. Hingegen sorgen sich Forschende in der Regel um das Wohlbefinden der Studienteilnehmer und zusätzlich um ihre Forschungsergebnisse und – im Bereich der Translationsmedizin – regelmäßig auch um die spätere Verbreitung und Vermarktung des Produkts. Regulierungsbehörden

²⁸Näheres dazu s. Hansen et al. 2018.

²⁹Näheres s. auch Hansen et al. 2020.

³⁰Crocker et al. 2018; Lander et al. 2014; Nuffield Council on Bioethics 2012, S. 56–92. Zum Unterschied zwischen Public Involvement und Public Engagement s. auch <https://www.invo.org.uk>. Zugegriffen: 16.01.2020.

³¹Hansen et al. 2018, S. 290.

³²Hansen et al. 2018, S. 298.

³³Concannon et al. 2012.

haben zum Beispiel für gewöhnlich ein Interesse daran, dass klinische Studien nach höchsten Qualitäts- und Sicherheitsstandards durchgeführt werden. Pharmazeutische Unternehmen zielen grundsätzlich darauf ab, ihr Produkt gewinnbringend zu vermarkten. Die Interessen einzelner Stakeholder können sich decken, aber auch so konfliktieren, dass ein Interessensausgleich notwendig wird.

Verfahren zur Beteiligung von Stakeholdern können unterschiedlich ausgestaltet sein und von der einfachen Information von Stakeholdern bis zu ihrer tatsächlichen Partizipation an Entscheidungsprozessen reichen.³⁴ Dabei sollte das jeweils gewählte Verfahren einerseits zum Thema passen, andererseits sollte es so gestaltet sein, dass es einen tatsächlichen Mehrwert für das konkrete Projekt besitzt. Für die Verbesserung eines Verfahrens sollte zudem ihr Einfluss auf die Entscheidungsfindung (z. B. unter Verwendung von qualitativen oder quantitativen Techniken) ausgewertet werden.³⁵

2.2 Das Göttinger Verfahren und seine Evaluation

Ziel der Göttinger Konferenz war es, Stakeholder aus verschiedenen Phasen des Erprobungs- und Zulassungsprozesses miteinander ins Gespräch zu bringen, um sich über die Arbeitsweise anderer Beteiligter und Betroffener der klinischen Translation auszutauschen. Zur gemeinsamen Diskussion stand, wie Transparenz von Entscheidungsprozessen, eine ausgewogene und gerechte Risikobewertung und eine informierte öffentliche Debatte sichergestellt werden können. Die Konferenz gestaltete sich durch sieben Vorträge von unterschiedlichen Stakeholdern der klinischen Translation von hiPS-Zellen sowie drei Workshops, in denen die Teilnehmer zu den Themen *Kommunikation und Bewertung von Risiken*, *Partizipation von Patientenvertretern in der Translation*, sowie *Anforderungen an die Sicherung von Spenderrechten* intensiv diskutierten.

Im Rahmen der Stakeholder-Konferenz wurden Evaluationsbögen an alle Teilnehmenden (n = 60, Rücklauf 63 %) verteilt. Der Fragenkatalog umfasste fünf Frageblöcke: Erstens geschlossene Fragen mit Mehrfachnennungen oder Likert-Skalen (Aussagen auf einer mehrstufigen Antwortskala) zur Selbsteinschätzung, zweitens einen offenen Teil mit drei weiterführenden Fragen. Der Evaluationsbogen sollte dazu dienen, die individuellen Perspektiven auf das gewählte Format und den gemeinsamen Austausch zu erheben.

Die *geschlossenen Fragen* widmeten sich der Positionierung als Stakeholder, dem Vorwissen der Teilnehmenden und der persönlichen Einschätzung vom Konferenzformat. Die *weiterführenden Fragen* erhoben die erfüllten bzw. nicht erfüllten Erwartungen bezüglich der Konferenz, weitere Themen/Aspekte zu hiPS-Zellen bzw. zur klinischen Translation für zukünftige Veranstaltungen sowie die Bewertung des Tagungsformats.

³⁴Luyet et al. 2012.

³⁵Deverka et al. 2012; Esmail et al. 2015; Goodman und Thompson 2017.

2.2.1 Teilnehmerfeld der Stakeholder-Konferenz

Das Teilnehmerfeld setzte sich überwiegend aus Forschern (Grundlagenforschung und klinische Forschung), Ethikern und Juristen zusammen und spiegelte damit die drei Teilprojekte des ClinhiPS-Projekts wider. Die Studierenden aus unterschiedlichen Fächern (v.a. Biologie und Medizin) bildeten einen ebenso großen Anteil wie die Ethiker. Die anderen Teilnehmer waren über verschiedene Gruppen von Stakeholdern verteilt (s. Abb. 1). Im offenen Teil der Evaluation wurde diese Perspektivenvielfalt, und gerade die Einbindung von Stakeholdern wie Industrie und Patientenvertretung, sehr positiv bewertet.

Die Konferenz war vornehmlich mit Experten besetzt und hatte eine relativ geringe Teilnehmerzahl von Patienten. Erklären lässt sich dies mit dem prospektiven Zuschnitt der Konferenz und einem Thema, das bisher weniger in der Öffentlichkeit diskutiert wurde als andere biotechnologische oder medizinethische Themen wie Organtransplantation, Reproduktionsmedizin oder Entscheidungen am Lebensende.

2.2.2 Einschätzung der Workshops

In Bezug auf das Format wurden gerade die diskussionsintensiven Workshops positiv eingeschätzt (s. Abb. 2). Fast 60 % der Teilnehmer stimmten zu, dass die Workshops den Raum für eine ergebnisoffene Diskussion des jeweiligen Themas boten. Für einen kommunikativen Dialog bot sich dieses Format an und stellte eine gute Ergänzung zu den inhaltlichen Vorträgen dar.

Im offenen Teil der Evaluation wurde das Zusammenspiel von Vorträgen und Workshops sowie die konstruktive Diskussionsatmosphäre positiv betont. Zu-

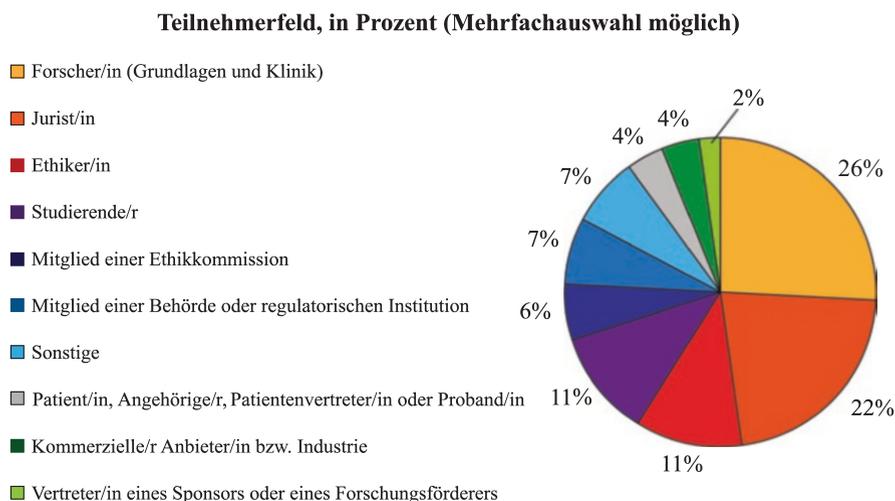


Abb. 1 Teilnehmerfeld der Göttinger Stakeholder-Konferenz im Oktober 2017

Einschätzung der Workshops, in Prozent

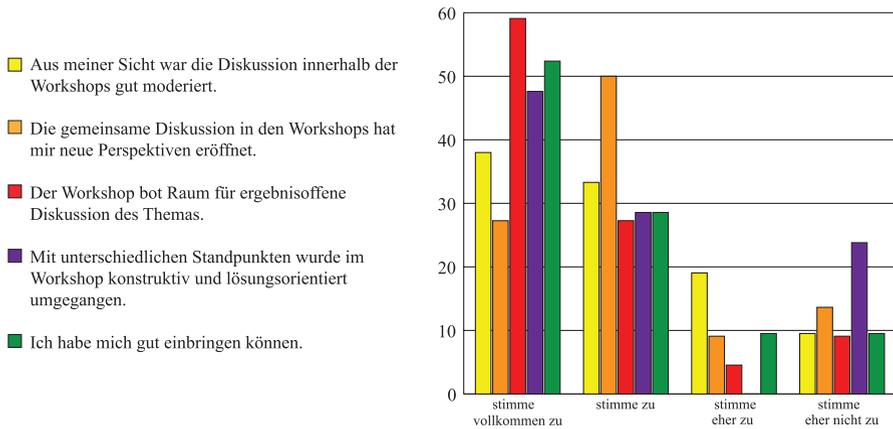


Abb. 2 Einschätzung der Workshops der Göttinger Stakeholder-Konferenz im Oktober 2017

gleich wurde aber auch noch mehr Raum für Diskussionen (insbesondere zum Thema Nutzen und Risiken) sowie eine konkrete Formulierung von Zielen, Aufgaben und Ideen als Folge der Workshops angeregt. Hier zeigt sich, dass eine solche Zusammenführung von Stakeholdern stets einer Weiterentwicklung und Reflexion bedarf. Für zukünftige Vorhaben ist von Interesse, dass die Teilnehmer folgende Aspekte als relevant für einen weiteren öffentlichen Dialog einstufen: Einbindung von Klinikern und Patienten, Gewinnerwartung der Industrie, Umgang mit schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen, die Finanzierung von hiPS-Zell-basierten Produkten im System der gesetzlichen Krankenkassen, Gewinnbeteiligung von Spendern und die Genom-Editierung von hiPS-Zellen. Als weitere einzubindende primäre Stakeholder wurden Biobanken und Krankenkassen genannt. Darüber hinaus regten einzelne Teilnehmende an, auch vorwiegend subjektiv Betroffene einzubeziehen und Gesundheitspolitiker an der öffentlichen Diskussion zu beteiligen. Von einigen Teilnehmern wurde zudem ein stärkerer Fokus auf die praktischen und ethischen Fragen klinischer Studien mit hiPS-Zell-basierten Produkten gewünscht.

2.2.3 Gesamteinschätzung der Konferenz

Vornehmlich wurde die Veranstaltung als eine Möglichkeit zur Diskussion (28 %) und zum Informationsaustausch (23 %) betrachtet. Nur ein Prozent der Befragten hatten den Eindruck, dass auf dieser Konferenz Personen gemeinsam Entscheidungen getroffen haben. Diese Einschätzung sensibilisiert dafür, dass je mehr Perspektiven zum ersten Mal aufeinandertreffen, es desto schwieriger wird, in diesem begrenzten Zeitrahmen konkrete Entscheidungen für die Zukunft zu fällen. In einem so neuen Feld wie der klinischen Translation von hiPS-Zellen kann deshalb

Gesamteinschätzung der Konferenz, in Prozent

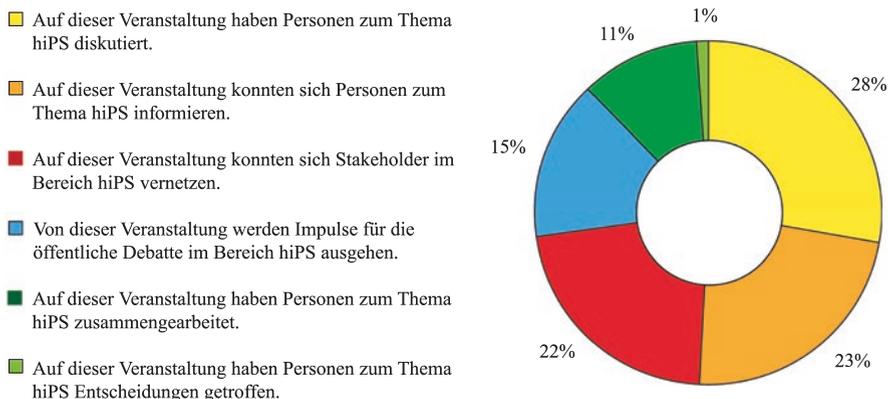


Abb. 3 Gesamteinschätzung der Göttinger Stakeholder-Konferenz im Oktober 2017

auf einer eintägigen Stakeholder-Konferenz nur ein erster Austausch über Perspektiven und einzubindende Interessen erfolgen (Abb. 3).

Ein solcher Austausch über Perspektiven und einzubindende Interessen ist allerdings essenziell, um aktuelle Probleme und Herausforderungen gemeinsam zu identifizieren und zu diskutieren, sich mit verschiedenen Stakeholdern zu vernetzen und ihre Perspektiven kennenzulernen sowie den eigenen Standpunkt zu reflektieren. So hatten 22 Prozent der Befragten den Eindruck, dass die Veranstaltung ein Forum zur Vernetzung bot. Des Weiteren gingen 15 Prozent der Befragten davon aus, dass von der Veranstaltung Impulse für die öffentliche Debatte ausgehen werden.

Die hier vorliegende schriftliche Ausarbeitung geführter Diskussionen bietet nun die Möglichkeit, das Diskutierte der wissenschaftlichen Öffentlichkeit zugänglich zu machen sowie Ergebnisse und Anregungen festzuhalten.

3 Aufbau des vorliegenden Sammelbands

Dieser Sammelband umfasst systematisch die Perspektiven von Stakeholdern auf dem Gebiet der Grundlagenforschung, klinischen Forschung, Industrie, Patientenvertretung, Ethik und des Rechts. Dies ermöglicht eine zielgenaue Suche nach Antworten auf individuelle Fragen im klinischen Translationsprozess von hiPS-Zellen und hiPS-Zell-basierten Produkten. Darüber hinaus enthält dieser Sammelband naturwissenschaftliche, ethische und rechtliche Empfehlungen des deutsch-österreichischen Forschungsverbunds ClinhiPS zur klinischen Translation der Forschung mit hiPS-Zellen und davon abgeleiteten Produkten.

Teil I: Grundlagenforschung

In Teil I werden die naturwissenschaftlichen Grundlagen im Kontext einer klinischen Anwendung von hiPS-Zellen erläutert. *Neubauer et al.* analysieren das zukünftige Potenzial von hiPS-Zellen für die regenerative Medizin. Zwischen der Reprogrammierung von differenzierten Körperzellen und der klinischen Anwendung von hiPS-Zell-basierten Produkten liegen zahlreiche, mitunter zeitintensive Prozessschritte. Neubauer et al. analysieren diese einzelnen Prozessschritte einer hiPS-Zell-basierten Therapie eingehend und systematisch, angefangen von der Generierung von hiPS-Zell-Linien über die Expansion, Differenzierung und anwendungsorientierte Applikation bis hin zur Qualitätskontrolle und Charakterisierung sowie Kryokonservierung und Lagerung.

Teil II: Klinische Forschung

Teil II dieses Sammelbands ist der klinischen Forschung gewidmet. *Zimmermann* gibt einen Einblick in die Herzreparatur mit Herzmuskelpflastern aus pluripotenten Stammzellen und die Translation eines präklinischen Konzeptes in die klinische Prüfung. Aktuelle Therapiemaßnahmen adressieren nur unzureichend die hohe Sterblichkeit und die stark eingeschränkte Lebensqualität von Patienten mit Herzmuskelschwäche. Ein vielversprechendes Verfahren ist die Implantation von Herzmuskelzellen aus hES-Zellen und hiPS-Zellen. Ein Ansatz für eine optimale Herzmuskularisierung stellt die Herzmuskelzellimplantation über im Labor gezüchtete Herzgewebe – sogenannte Herzmuskelpflaster – dar.

Teil III: Industrie

Teil III gibt einen Einblick in die Sichtweise von Unternehmen. *Herget et al.* beleuchten, wie ein Wissenschafts- und Technologieunternehmen in der Stammzellforschung und der Genom-Editierung mit bioethischen Fragen umgeht. *Merck* bietet eine breite Palette von Dienstleistungen und Produkten für die Genom-Editierung, Stammzellforschung und Reproduktionsmedizin an. Diese Geschäftsaktivitäten konfrontieren das Unternehmen mit vielfältigen bioethischen Fragestellungen. *Merck* hat deshalb Prozesse und Strukturen geschaffen, die einen verantwortungsvollen und regelkonformen Einsatz seiner Dienstleistungen und Produkte auf Grundlage höchster ethischer Standards sicherstellen soll. In ihrem Beitrag beschreiben *Herget et al.* diese etablierten Prozesse und Strukturen als Anregungen für andere Unternehmen und stellen dabei das *Merck Bioethics Advisory Panel* und *Stem Cell Research Oversight Committee* vor.

Harder beschäftigt sich in seinem Beitrag mit den Herausforderungen innovativer Gewebemedizin aus unternehmerischer Sicht. Er untersucht den Bedarf von hiPS-Zellen und Geweben, analysiert die Rahmenbedingungen der Weltgesundheitsorganisation, des Europarates und der Europäischen Union und stellt die Umsetzung in Deutschland dar. *Harder* diskutiert über Qualitäts- und Sicherheitsstandards, die Organisation der Gewebespende, Verteilungsregeln für Gewebespenden, das Handelsverbot von Geweben und den Handel mit Gewebeprodukten, Erstattungsfragen sowie Aspekte der Vigilanz bzw. Nachbeobachtung. In seinem Beitrag spricht sich *Harder* für eine „Kultur der Gewebespende“ aus und unterbreitet

konkrete Vorschläge wie ein staatliches, unternehmerisches und gesellschaftliches Engagement aussehen könnte.

Teil IV: Patientenvertretung

In Teil IV dieses Sammelbands werden hiPS-Zellen aus einer patientenorientierten Perspektive beleuchtet. *Kruip* untersucht in seinem Beitrag die Patientenvertretung in der (hiPS-Zell-)Forschung als Herausforderung für Patientenorganisationen. Am Beispiel der Erbkrankheit Mukoviszidose und der Aktivitäten des *Selbsthilfevereins Mukoviszidose e.V.* zeigt Kruip die Herausforderungen auf, vor denen Patientenorganisationen bei der effektiven Patientenvertretung stehen. Er befürwortet den Abbau von zusätzlichen Hürden, wie zum Beispiel Sprachbarrieren durch Studienunterlagen, die ausschließlich in wissenschaftlicher (d. h. nicht laienverständlicher) englischer Sprache verfügbar sind.

Teil V: Ethik

Teil V des Sammelbands beschäftigt sich mit ethischen Fragestellungen. *Hansen et al.* analysieren die klinische Forschung mit hiPS-Zellen aus ethischer Perspektive. Sie diskutieren insbesondere ethische Fragen zur Aufklärung und Einwilligung der Spender, Studienplanung, Probandenauswahl, Risiko/Belastung-Chancen-Bewertung, Aufklärung und Einwilligung der Studienteilnehmer sowie gesellschaftliche Aspekte der klinischen Translation der Stammzellforschung. Darüber hinaus wird die ethische Analyse durch die Diskussion diskursiver Verfahren des Stakeholder-Involvements ergänzt. Hansen et al. zeigen auf, welche Stakeholder Anspruch auf Beteiligung im Verfahren erheben können und wie eine bessere Berücksichtigung ihrer Interessen bei der Ausgestaltung des Forschungsprozesses aussehen sollte.

Teil VI: Recht

Teil VI dieses Sammelbands ist dem Recht gewidmet. *Gerke* analysiert in ihrem Artikel die klinische Translation von hiPS-Zellen in Deutschland mit dem Ziel, zu mehr Transparenz und Rechtsklarheit beizutragen. Hierfür untersucht sie das Arzneimittelgesetz (AMG), Transplantationsgesetz (TPG), Gentechnikgesetz (GenTG), Stammzellgesetz (StZG) und Embryonenschutzgesetz (ESchG). Gerke stuft zunächst unter anderem somatische Zellen, hiPS-Zellen und/oder hiPS-Zell-basierte Produkte im Lichte des jeweiligen Gesetzes ein und analysiert anschließend die rechtlichen Konsequenzen der Einstufung. Sie vermittelt dem Leser dabei einen systematischen Überblick über die deutsche Rechtslage zur klinischen Translation von hiPS-Zellen. Zusätzlich zur Klärung der deutschen Rechtslage zeigt sie rechtliche Mängel und Lücken auf und gibt konkrete Novellierungsvorschläge.

Kopetzki et al. analysieren die klinische Translation von hiPS-Zellen in Österreich. Sie untersuchen das österreichische Arzneimittelgesetz (öAMG), Gewebesicherheitsgesetz (GSG), Gentechnikgesetz (GTG) und Fortpflanzungsmedizinengesetz (FMedG). Kopetzki et al. legen die erheblichen Auslegungsschwierigkeiten dar, die die Anwendung der einschlägigen rechtlichen Regelungen auf die konkreten Sachverhalte im Zusammenhang von hiPS-Zell-basierten Produkten nach sich zieht. Sie entwickeln in ihrem Landesbericht eine plausible und vertretbare Rechts-

auffassung, zeigen rechtliche Lücken und Mängel im österreichischen Recht auf und stellen Handlungsbedarf für den Gesetzgeber fest.

Im dritten Beitrag zu Teil VI führen *Gerke et al.* eine rechtsvergleichende Analyse der klinischen Translation von hiPS-Zellen in Deutschland und Österreich durch. Sie stellen die wesentlichen Unterschiede zwischen deutschem und österreichischem Recht fest. Dabei werden das Arzneimittelrecht, Transplantations- und Geweberecht, Gentechnikrecht, Stammzellen-, Embryonenschutz- und Fortpflanzungsmedizinrecht in die Untersuchung miteinbezogen. Gerke et al. stellen insbesondere fest, dass Diskrepanzen zwischen deutscher und österreichischer Rechtslage vor allem im Hinblick auf die Regelung ethisch umstrittener Fragestellungen bestehen. So zeigen sie unter anderem auf, dass das deutsche Recht zum Umgang mit hiPS-Zell-basierten Keimzellen derzeit deutlich liberaler ausgestaltet ist als das österreichische Recht.

Teil VII: Empfehlungen des Verbunds ClinhiPS

Teil VII dieses Sammelbands enthält naturwissenschaftliche, ethische und rechtliche Empfehlungen zur klinischen Translation der Forschung mit hiPS-Zellen und davon abgeleiteten Produkten des deutsch-österreichischen Forschungsverbunds *ClinhiPS*. In zweijähriger Arbeit haben Wissenschaftler aus Naturwissenschaft, Medizinethik und Recht die konkreten mit der klinischen Translation von hiPS-Zellen und davon abgeleiteten Produkten verbundenen Probleme identifiziert und untersucht. Darüber hinaus wurden die naturwissenschaftlichen Herausforderungen für Qualität und Sicherheit im Kontext der klinischen Anwendung am Menschen analysiert sowie aktuelle Lücken in der ethischen und rechtlichen Regulierung erfasst. Als Resultat entwickelten *Gerke et al.* die in diesem Teil des Bands enthaltenen Empfehlungen, die sich an alle Stakeholder, die in die klinische Translation der hiPS-Zell-Forschung involviert sind, sowie an die Gesetzgeber richten.

Danksagung Die Autorinnen bedanken sich beim Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Förderung des Verbundprojekts „ClinhiPS: Eine naturwissenschaftliche, ethische und rechtsvergleichende Analyse der klinischen Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen in Deutschland und Österreich“ (FKZ 01GP1602A und 01GP1602C). Des Weiteren bedanken Sie sich bei Tim Holetzke für die Unterstützung bei der Evaluation der Göttinger Stakeholder-Konferenz. Dieser Beitrag gibt dabei ausschließlich die Auffassung der Autorinnen wieder.

Literatur

- AMED = Japan Agency for Medical Research and Development (2018) The World's First Allogeneic iPS-derived Retina Cell Transplant. <https://www.amed.go.jp/en/seika/fy2018-05.html>. Zugegriffen am 16.01.2020
- Concannon TW, Meissner P, Grunbaum JA, McElwee N, Guise J, Santa J, Conway PH, Daudelin D, Morrato EH, Leslie LK (2012) A new taxonomy for stakeholder engagement in patient-centered outcomes research. *J Gen Intern Med* 27:985–991

- Crocker JC, Ricci-Cabello I, Parker A, Hirst JA, Chant A, Petit-Zeman S, Evans D, Rees S (2018) Impact of patient and public involvement on enrolment and retention in clinical trials: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 363:k4738
- Cynata Therapeutics (2019) Graft-versus-host-disease. <https://www.cynata.com/graftversushost-disease>. Zugegriffen am 16.01.2020
- Cyranoski D (2018) ‚Reprogrammed‘ stem cells implanted into patient with Parkinson’s disease. *Nature*. <https://www.nature.com/articles/d41586-018-07407-9>. Zugegriffen am 16.01.2020
- Deverka PA, Lavalley DC, Desai PJ, Esmail LC, Ramsey SD, Veenstra DL, Tunis SR (2012) Stakeholder participation in comparative effectiveness research: defining a framework for effective engagement. *J Comp Eff Res* 1:181–194
- Ebert AD, Liang P, Wu JC (2012) Induced pluripotent stem cells as a disease modeling and drug screening platform. *J Cardiovasc Pharmacol* 60:408–416
- Esmail L, Moore E, Rein A (2015) Evaluating patient and stakeholder engagement in research: moving from theory to practice. *J Comp Eff Res* 4:133–145
- Garber K (2015) RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 33:890–891
- Gerke S (2020) Die klinische Translation von hiPS-Zellen in Deutschland. In: Gerke S, Taupitz J, Wiesemann C, Kopetzki C, Zimmermann H (Hrsg) Die klinische Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen – Ein Stakeholder-Sammelband. Springer, Berlin
- Gerke S, Taupitz J (2018) Rechtliche Aspekte der Stammzellforschung in Deutschland: Grenzen und Möglichkeiten der Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen (hES-Zellen) und mit humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen). In: Zenke M, Marx-Störling L, Schickl H (Hrsg) Stammzellforschung. Aktuelle wissenschaftliche und gesellschaftliche Entwicklungen. Nomos, Baden-Baden, S 209–235
- Gerke S, Hansen SL, Blum VC, Bur S, Heyder C, Kopetzki C, Meiser I, Neubauer JC, Noe D, Steinböck C, Wiesemann C, Zimmermann H, Taupitz J (2020a) Naturwissenschaftliche, ethische und rechtliche Empfehlungen zur klinischen Translation der Forschung mit humanen induzierten pluripotenten Stammzellen und davon abgeleiteten Produkten. In: Gerke S, Taupitz J, Wiesemann C, Kopetzki C, Zimmermann H (Hrsg) Die klinische Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen – Ein Stakeholder-Sammelband. Springer, Berlin
- Gerke S, Kopetzki C, Blum VC, Noe D, Steinböck C (2020b) Eine rechtsvergleichende Analyse der klinischen Translation von hiPS-Zellen in Deutschland und Österreich. In: Gerke S, Taupitz J, Wiesemann C, Kopetzki C, Zimmermann H (Hrsg) Die klinische Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen – Ein Stakeholder-Sammelband. Springer, Berlin
- Goodman MS, Thompson VLS (2017) The science of stakeholder engagement in research: classification, implementation, and evaluation. *Transl Behav Med* 7:486–491
- GSCN = German Stem Cell Network (2018) White paper. Translation – von der Stammzelle zur innovativen Therapie. http://gscn.org/Portals/0/Dokumente/White%20Paper/GSCN_White_Paper_Translation.pdf?ver=2018-11-19-142632-347. Zugegriffen am 16.01.2020
- Hansen SL, Holetzke T, Heyder C, Wiesemann C (2018) Stakeholder-Beteiligung in der klinischen Forschung: eine ethische Analyse. *Eth Med* 30:289–305
- Hansen SL, Heyder C, Wiesemann C (2020) Ethische Analyse der klinischen Forschung mit humanen induzierten pluripotenten Stammzellen. In: Gerke S, Taupitz J, Wiesemann C, Kopetzki C, Zimmermann H (Hrsg) Die klinische Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen – Ein Stakeholder-Sammelband. Springer, Berlin
- ISSCR = International Society for Stem Cell Research (2016) Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation. <https://www.isscr.org/docs/default-source/all-isscr-guidelines/guidelines-2016/isscr-guidelines-for-stem-cell-research-and-clinical-translationd67119731dff6ddb37cff0000940c19.pdf?sfvrsn=4>. Zugegriffen am 16.01.2020
- ISSCR = International Society for Stem Cell Research (2018) Stammzellbasierte klinische Studien: Praktische Hinweise für Ärzte und Ethikkommissionen/institutionelle Prüfungsgremien. <https://www.isscr.org/docs/default-source/clinical-resources/isscr-brochure-german-2018-final.pdf?sfvrsn=2>. Zugegriffen am 16.01.2020

- Kopetzki C, Blum VC, Noe D, Steinböck C (2020) Die klinische Translation von hiPS-Zellen in Österreich. In: Gerke S, Taupitz J, Wiesemann C, Kopetzki C, Zimmermann H (Hrsg) Die klinische Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen – Ein Stakeholder-Sammelband. Springer, Berlin
- Kyodo (2018) First serious adverse reaction to iPSC-derived retinal cell transplant reported. https://www.japantimes.co.jp/news/2018/01/17/national/science-health/first-serious-reaction-ips-derived-retinal-cell-transplant-reported-kobe/#.XES_jlxKjIV. Zugegriffen am 16.01.2020
- Lander J, Hainz T, Hirschberg I, Strech D (2014) Current practice of public involvement activities in biomedical research and innovation: a systematic qualitative review. *PLoS One* 9:e113274
- Luyet V, Schlaepfer R, Parlange MB, Buttler A (2012) A framework to implement Stakeholder participation in environmental projects. *J Environ Manage* 111:213–219
- Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hiramitsu Y, Morinaga C, Daimon T, Fujihara M, Akimaru H, Sakai N, Shibata Y, Terada M, Nomiya Y, Tanishima S, Nakamura M, Kamao H, Sugita S, Onishi A, Ito T, Fujita K, Kawamata S, Go MJ, Shinohara C, Hata K, Sawada M, Yamamoto M, Ohta S, Ohara Y, Yoshida K, Kuwahara J, Kitano Y, Amano N, Umekage M, Kitaoka F, Tanaka A, Okada C, Takasu N, Ogawa S, Yamanaka S, Takahashi M (2017) Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N Engl J Med* 376:1038–1046
- Neubauer JC*, Bur S*, Meiser I*, Kurtz A, Zimmermann H (2020) Naturwissenschaftliche Grundlagen im Kontext einer klinischen Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen. In: Gerke S, Taupitz J, Wiesemann C, Kopetzki C, Zimmermann H (Hrsg) Die klinische Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen – Ein Stakeholder-Sammelband. Springer, Berlin* geteilte Erstautorenschaft
- NIH = National Institutes of Health (2019) NIH launches first U.S. clinical trial of patient-derived stem cell therapy to replace dying cells in retina. <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-launches-first-us-clinical-trial-patient-derived-stem-cell-therapy-replace-dying-cells-retina>. Zugegriffen am 16.01.2020
- Nuffield Council on Bioethics (2012) Emerging biotechnologies: technology, choice, and the public good. http://nuffieldbioethics.org/wp-content/uploads/2014/07/Emerging_biotechnologies_full_report_web_0.pdf. Zugegriffen am 16.01.2020
- Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ (2008) Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451:141–146
- RIKEN (2015) Update on first transplant recipient in the „Clinical study of autologous induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium (RPE) cell sheets for exudative age-related macular degeneration (AMD)“. <http://www.riken-ibri.jp/AMD/img/20151009en.pdf>. Zugegriffen am 16.01.2020
- RIKEN (2017a) Clinical safety study using autologous iPSC-derived retinal cell sheet for AMD. http://www.cdb.riken.jp/en/wp-content/uploads/sites/2/2017/04/pdfnews_170404_1.pdf. Zugegriffen am 16.01.2020
- RIKEN (2017b) Donor iPSC-derived RPE cells transplanted into first AMD patient in new clinical study. http://www.cdb.riken.jp/en/wp-content/uploads/sites/2/2017/07/pdfnews_170404_2rev.pdf. Zugegriffen am 16.01.2020
- Sharma R, Khristov V, Rising A, Jha BS, Dejene R, Hotaling N, Li Y, Stoddard J, Stankewicz C, Wan Q, Zhang C, Campos MM, Miyagishima KJ, McGaughey D, Villasmil R, Mattapallil M, Stanzel B, Qian H, Wong W, Chase L, Charles S, McGill T, Miller S, Maminishkis A, Amaral J, Bharti K (2019) Clinical-grade stem cell-derived retinal pigment epithelium patch rescues retinal degeneration in rodents and pigs. *Sci Transl Med* 11:eaat5580
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872
- Wildermuth V (2018) Bewegung in der Stammzellen-Therapie. https://www.deutschlandfunk.de/vom-labor-zum-patienten-bewegung-in-der-stammzellen-therapie.676.de.html?dram:article_id=422553. Zugegriffen am 16.01.2020

- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917–1920
- Zimmermann WH (2020) Herzreparatur mit Herzmuskelpflaster aus Stammzellen – Umsetzung eines präklinischen Konzeptes in die klinische Prüfung. In: Gerke S, Taupitz J, Wiesemann C, Kopetzki C, Zimmermann H (Hrsg) *Die klinische Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen – Ein Stakeholder-Sammelband*. Springer, Berlin

Sara Gerke Dipl.-Jur. Univ., M. A. Medical Ethics and Law, ist Research Fellow, Medicine, Artificial Intelligence, and Law, am Petrie-Flom Center for Health Law Policy, Biotechnology, and Bioethics at Harvard Law School in Cambridge, USA. Bis 31. März 2018 war Frau Gerke Geschäftsführerin des Instituts für Deutsches, Europäisches und Internationales Medizinrecht, Gesundheitsrecht und Bioethik der Universitäten Heidelberg und Mannheim sowie Gesamtkoordinatorin des Projekts ClinhiPS.

Dr. phil. Solveig Lena Hansen ist wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Ethik und Geschichte der Medizin in Göttingen. 2017 erhielt sie den Nachwuchspreis der Akademie für Ethik in der Medizin. Promoviert wurde sie 2016 als erste Doktorandin im Fach „Bioethik“ an der Philosophischen Fakultät der Universität Göttingen mit einer Arbeit zum reproduktiven Klonen. Andere Forschungsschwerpunkte sind ethische Aspekte von Gesundheitskommunikation, Narrative Ethik, Organtransplantation und Methodenfragen der Bioethik.

Teil I
Grundlagenforschung

Naturwissenschaftliche Grundlagen im Kontext einer klinischen Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen



Julia C. Neubauer*, Stephanie Bur*, Ina Meiser*, Andreas Kurtz und Heiko Zimmermann

Zusammenfassung Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPS-Zellen) können patienten- und krankheitsspezifisch aus nahezu jeder Zelle des Körpers erzeugt werden und besitzen Eigenschaften, die eigentlich nur Zellen aus einem Embryo besitzen. Ihre einfache Herstellung und ihre hohe Verfügbarkeit ermöglichen eine Vielzahl an neuartigen zellbasierten Therapiemethoden und therapeutischen Einsatzmöglichkeiten. Der gesamte Arbeitsablauf, der für eine klinische Anwendung von hiPS-Zellen nötig ist, lässt sich in die Gewinnung (Generierung), die Vervielfältigung (Expansion), die Spezialisierung (Differenzierung), die funktionsverlustfreie Lagerung (Kryokonserierung), die Charakterisierung (Qualitätskontrolle)

* Julia C. Neubauer, Stephanie Bur und Ina Meiser teilen sich die Erstautorenschaft.

J. C. Neubauer

Fraunhofer-Projektzentrum für Stammzellprozesstechnik, Würzburg, Deutschland
E-Mail: julia.neubauer@ibmt.fraunhofer.de

S. Bur · I. Meiser

Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT, Sulzbach, Deutschland
E-Mail: stephanie.bur@gmx.de; ina.meiser@ibmt.fraunhofer.de

A. Kurtz

Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland
E-Mail: andreas.kurtz@charite.de

H. Zimmermann (✉)

Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik, Sulzbach, Deutschland
E-Mail: Heiko.Zimmermann@ibmt.fraunhofer.de

© Springer-Verlag GmbH Deutschland, ein Teil von Springer Nature 2020
S. Gerke et al. (Hrsg.), *Die klinische Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen*, Veröffentlichungen des Instituts für Deutsches, Europäisches und Internationales Medizinrecht, Gesundheitsrecht und Bioethik der Universitäten Heidelberg und Mannheim 48,
https://doi.org/10.1007/978-3-662-59052-2_2

sowie die finale Applikation (Zelltherapie) der hiPS-Zellen bzw. der hiPS-Zell-basierten Produkte unterteilen. Jeder dieser Schritte besitzt einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität und Funktionalität des resultierenden hiPS-Zell-basierten Therapieproduktes. Daher werden in diesem Beitrag die naturwissenschaftlichen Grundlagen und die Umsetzung der genannten Prozessschritte mit ihren Chancen und Risiken nach aktuellem Stand der Technik erläutert sowie Ausblicke auf zukünftige praktische Fragestellungen gegeben.

1 Einleitung: Was sind humane induzierte pluripotente Stammzellen und welches Potenzial besitzen sie für die regenerative Medizin der Zukunft?

In den letzten Jahrzehnten wurde verstärkt der Begriff der personalisierten Medizin geprägt. Dies beschreibt die Möglichkeit, maßgeschneiderte Therapien für jeden Menschen nach seinem genetischen Code und seiner Veranlagung zu entwickeln. Ein Meilenstein hierfür stellt die Entdeckung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) durch Yamanaka im Jahr 2007 dar. Diese Zellen können durch das Einbringen spezifischer genetischer Faktoren aus fast jeder Zelle des Menschen erzeugt werden und erlangen dadurch wieder Fähigkeiten, die normalerweise ausschließlich Zellen aus einem Embryo besitzen: hiPS-Zellen sind unbegrenzt teilungsfähig und können sich in fast alle Zellen des menschlichen Körpers entwickeln (auch „differenzieren“ genannt). Damit bilden hiPS-Zellen einen der vielversprechendsten Kandidaten für zukünftige Zelltherapien, um nach zellzerstörenden Unfällen (z. B. Verbrennungen) oder Krankheiten (z. B. Herzinfarkt) einen angemessenen Ersatz zu erzeugen.

Heute – 11 Jahre nach der Erzeugung der ersten hiPS-Zellen – ist eine klinische Anwendung im Rahmen der Stammzelltherapie in greifbare Nähe gerückt. Der naturwissenschaftliche Hintergrund und die noch vorhandenen technischen Probleme einer solchen Anwendung werden nachfolgend für die notwendigen Prozessschritte erläutert.

1.1 Was sind Stammzellen und wie werden sie unterschieden

Alle Stammzellen sind durch zwei Eigenschaften charakterisiert. Erstens besitzen sie die Fähigkeit sich unbegrenzt selbst zu *erneuern*. Das bedeutet, dass sie sich immer wieder teilen und dabei Kopien von sich erzeugen können, die auch wieder Stammzeleigenschaften besitzen. Zweitens *differenzieren* die in ihrer Funktion noch nicht festgelegten (undifferenzierten) Stammzellen unter bestimmten Voraussetzungen in spezialisierte (differenzierte) Zelltypen.

Anhand ihres Differenzierungspotenzials werden Stammzellen kategorisiert. Totipotente Zellen besitzen das größte Differenzierungspotenzial; dieses nimmt während der Embryonalentwicklung von pluripotent über multipotent bis zu unipotent stetig ab (Abb. 1). *Totipotente* (*totus* = ganz und *potentia* = Vermögen, Kraft)

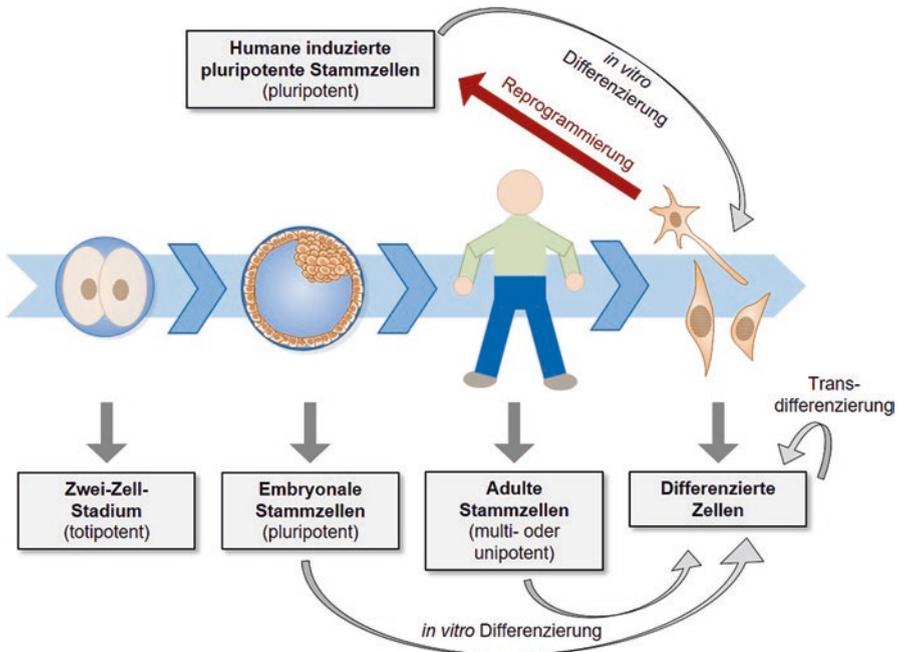


Abb. 1 Unter natürlichen Umständen nimmt das Differenzierungspotenzial von humanen Zellen mit zunehmender Spezialisierung während der Entwicklung ab: die befruchtete Eizelle und Zellen bis zum Acht-Zell-Stadium sind totipotent, die innere Zellmasse der Blastozyste ist pluripotent, während der darauffolgenden Embryonalentwicklung und im adulten Organismus sind multi- und unipotente Stammzellen vorhanden, welche in die spezialisierten Zelltypen des menschlichen Körpers differenzieren. Pluripotente, multipotente und unipotente Stammzellen können *in vitro* differenziert werden. Die direkte Umwandlung von einem differenzierten Zelltyp in einen anderen (Transdifferenzierung) ist für einzelne Zelltypen *in vitro* ebenfalls möglich (Abschn. 1.2). Differenzierte Zellen können außerdem durch Reprogrammierung in einen pluripotenten Zustand versetzt werden (hiPS-Zellen)

Stammzellen sind in der Lage, unter geeigneten Bedingungen einen vollständigen Organismus zu bilden. Beim Menschen sind lediglich die befruchtete Eizelle und die embryonalen Zellen bis zum Acht-Zell-Stadium totipotent. Sie können in der Gebärmutter einen menschlichen Organismus inklusive der dazu notwendigen extraembryonalen Gewebe, wie Plazenta und Eihäute, bilden.¹ Ab dem 16-Zell-Stadium differenzieren die Zellen in eine innere und äußere Schicht, was mit dem Verlust ihrer Totipotenz einhergeht. Die fortschreitende Differenzierung resultiert in einer Hohlkugel, der Blastozyste, an deren Innenseite eine Ansammlung pluripotenter Zellen (Embryoblast) liegt, aus der sich der Embryo entwickelt. *Pluripotente* (*plus* = mehr) Stammzellen sind dadurch charakterisiert, dass sie alle Zellen des menschlichen Körpers bilden können. In der weiteren Entwicklung kommt es zur Ausbildung der drei Keimblätter (Ektoderm, Entoderm, Mesoderm), wobei es sich um Zellschichten handelt, aus denen alle Organe des menschlichen Körpers hervor-

¹Strachan und Read 2005, S. 84 ff.

gehen. Mit der Spezialisierung in Ekto-, Endo- oder Mesoderm verlieren die Zellen ihr Pluripotenz. Sie sind jedoch noch in der Lage verschiedene Zelltypen eines Keimblattes zu bilden, sie sind *multipotent* (*multus* = viel). Beim Entoderm handelt es sich um das innere (bildet z. B. die Epithelien des Verdauungstraktes, der Atemwege, der Leber) beim Mesoderm um das mittlere (bildet z. B. Skelettmuskulatur, Knochen, Niere, Herz, Blutgefäße) und beim Ektoderm um das äußere Keimblatt (bildet z. B. Haut, Nervensystem, Zähne) des Embryoblasten. Multipotente Stammzellen sind nicht nur während der Embryogenese vorhanden, sondern lassen sich auch aus dem erwachsenen Körper isolieren. Sind Stammzellen nur noch in der Lage einen Zelltyp zu bilden, bezeichnet man sie als *unipotent* (*uni* = eins). Ein Beispiel hierfür stellen die spermatogonialen Stammzellen in den Hoden dar, aus denen nur Spermien entstehen. Derzeit sind über 200 verschiedene Zelltypen im menschlichen Körper bekannt. Im Gegensatz zu Stammzellen haben spezialisierte Zellen nicht die Fähigkeit sich unbegrenzt oft zu teilen. Da die Lebenszeit der meisten Zellen zudem begrenzt ist, müssen kontinuierlich neue Körperzellen von den im Organismus vorhandenen multipotenten und unipotenten Stammzellen gebildet werden um das Gleichgewicht des Körpers (Homöostase) aufrecht zu erhalten. Dabei steuern Impulse des umgebenden Zellmilieus wie Zell-Zell-Kontakte, extrazelluläre Matrix oder Wachstumsfaktoren die Differenzierung in gewebe- oder organspezifische Zellen. Stammzellen finden sich beispielsweise in der Haut, der Leber, im Darm oder im Knochenmark. In der Regel sind nur sehr wenige Stammzellen im Gewebe vorhanden, was es schwierig macht größere Mengen zu isolieren. Eine Ausnahme stellt beispielsweise das Knochenmark dar.

Stammzellen werden nicht nur anhand ihres Differenzierungspotenzials unterschieden, sondern auch aufgrund ihrer Herkunft (Abb. 1). *Humane embryonale Stammzellen* (*human embryonic stem cell*, hES-Zellen) werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste isoliert, welche bei der normalen Embryonalentwicklung den Embryo bilden würde.² Dabei wird die Blastozyste zerstört. Embryonale Stammzellen können *in vitro* unter Beibehaltung ihres pluripotenten Status kultiviert werden. Das erfordert aber eine Anpassung der Zellen, sodass sie nicht mehr identisch mit den im Embryo vorhandenen Zellen sind.³ Werden aus älteren Embryonen Stammzellen isoliert, bezeichnet man diese als *fetale Stammzellen*. Sie sind in der Regel multipotent, also nicht mehr in der Lage alle Zellen des Organismus zu bilden. *Adulte Stammzellen oder auch Gewebestammzellen* können nach der Geburt aus verschiedenen Organen und Geweben isoliert werden. Sie sind multi- oder unipotent und dienen der stetigen Erneuerung der Körperzellen und der Regeneration nach Verletzungen. Neben den hämatopoetischen Stammzellen (Blutstammzellen) im Knochenmark, welche den Ausgangspunkt für die Zellneubildung des Blutes und des Abwehrsystems darstellen, fanden beispielsweise die mesenchymalen Stammzellen in mehreren klinischen Studien Anwendung.⁴ Eine Sonderform stellen

² Thomson et al. 1998, S. 1145 ff.

³ Varela et al. 2011, S. 15207 ff.; Yamanaka 2012, S. 678 ff.

⁴ Squillaro et al. 2016, S. 829–48.

hiPS-Zellen dar, da sie nicht natürlich vorkommen, sondern durch die künstliche Reprogrammierung von differenzierten Zellen erzeugt werden.⁵

1.2 Die Geschichte der hiPS-Zellen

Für eine lange Zeit war man davon überzeugt, dass die Differenzierung von Zellen nicht reversibel ist.⁶ Man stellte sich das wie einen Ball vor, der von einer Bergspitze ins Tal rollt (Waddingtons mountain), wobei verschiedene Täler der Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen entsprachen.⁷ Eine Reihe bahnbrechender Experimente, die über Jahrzehnte stattfanden, war notwendig um das Gegenteil zu beweisen. In Folge dieser Entdeckungen entstand die iPS-Zell-Technologie.⁸

1962 führte Sir John Gurdon den ersten erfolgreichen *somatischen Zellkerntransfer* mit Fröschen durch (*somatic cell nuclear transfer*, SCNT).⁹ Darunter versteht man die Übertragung des Zellkerns einer differenzierten Körperzelle (somatische Zelle) in eine entkernte Eizelle, was in der Umprogrammierung des Zellkerns resultiert. Wie man heute weiß, wird die Umprogrammierung durch Faktoren im Cytoplasma der entkernten Eizelle ausgelöst. Nach dem somatischen Zellkerntransfer entsteht aus der Eizelle ein Embryo, der genetisch identisch mit der verwendeten differenzierten Körperzelle ist. Dieser Vorgang wird auch als Klonen bezeichnet. Erst 1997, also über 30 Jahr später, konnte der SCNT mit einem Säugetier – nämlich dem Schaf Dolly – erfolgreich durchgeführt werden.¹⁰ Kurz darauf wurde 1998 die erste Maus geklont.¹¹ Mittlerweile konnten verschiedene Arten wie zum Beispiel Schweine, Rinder, Katzen, Kaninchen, Wildkatzen und Kamele geklont werden, die Effizienz ist jedoch bis heute niedrig (1–3 %).¹² Diese Erfolge im Klonen bewiesen, dass differenzierte Zellen noch alle genetischen Informationen für die Entwicklung eines Organismus enthalten, dass die Differenzierung reversibel ist und, dass Eizellen unbekannte Faktoren enthalten, welche diese Reprogrammierung auslösen.

Die Entdeckung, dass bestimmte Faktoren existieren, welche als sogenannte „Master-Regulatoren“ wirken und so die Zelldifferenzierung und -identität steuern können, legte nahe, dass diese auch für die Reprogrammierung in der Eizelle verantwortlich waren. 1987 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch die Expression des Transkriptionsfaktors Antennapedia in *Drosophila melanogaster* Beine statt Antennen ausgebildet werden.¹³ Dieser Prozess der direkten Umwandlung

⁵Takahashi und Yamanaka 2006, S. 663 ff; Park et al. 2008; Takahashi et al. 2007; Yu et al. 2007.

⁶Weismann et al. 1893, S. 37 ff.; Waddington 1957.

⁷Waddington 1957.

⁸Takahashi und Yamanaka 2006, S. 183 ff.

⁹Gurdon 1962, S. 622 ff.

¹⁰Wilmot et al. 1997, S. 810 ff.

¹¹Wakayama et al. 1998, S. 369 ff.

¹²Thuan et al. 2010, S. 20 ff.

¹³Schneuwly et al. 1987, S. 816 ff.

einer differenzierten Körperzelle in einen anderen Zelltyp ohne pluripotente oder multipotente Zwischenstufe wird als *Transdifferenzierung* bezeichnet (Abb. 1).

Die Etablierung von Kultivierungsbedingungen für pluripotente Zellen ermöglichte schließlich die Suche nach den für die Umkehrung der Differenzierung verantwortlichen Faktoren. Dazu analysierte die Arbeitsgruppe von Yamanaka systematisch, welche Gene bei der unbegrenzten Selbsterneuerung und der Pluripotenz von embryonalen Mausstammzellen eine Rolle spielen. Andere Gruppen identifizierten parallel ebenfalls Gene, die in embryonalen Stammzellen aktiv sind, nicht aber in differenzierten Zellen. Schließlich entstand eine Liste mit 24 möglichen Reprogrammierungs-Faktoren. Diese wurden einzeln oder kombinatorisch mit Hilfe eines retroviralen Transduktions-Systems (Abschn. 2.1) in embryonale Maus-Fibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*, MEF) eingebracht, anschließend wurde die mögliche Induktion der Pluripotenz untersucht. Pluripotente Zellen unterscheiden sich zum Beispiel in ihrer Morphologie (Gestalt) von Fibroblasten, da sie in dichtgepackten, homogenen Kolonien wachsen und nicht mehr als Einzelzellen.¹⁴ Bei Verwendung aller 24 Faktoren entstanden pluripotente Kolonien, aber nicht bei der Einbringung einzelner Faktoren. In weiteren Versuchen wurde die Anzahl der Kandidaten systematisch reduziert, was schließlich zur Identifizierung einer minimal notwendigen Anzahl von vier Faktoren führte (OCT3/4, SOX2, KLF4 und MYC). Die Reprogrammierung von differenzierten Maus-Zellen mit diesen vier Faktoren wurde 2006 publiziert und die so generierten Zellen wurden als induziert pluripotent bezeichnet.¹⁵ Schon ein Jahr später konnten Yamanaka und Kollegen mit denselben Reprogrammierungsfaktoren humane Zellen reprogrammieren.¹⁶ Bis heute wird die Reprogrammierung stetig weiterentwickelt (unter anderem Methoden zum Einbringen der Gene, verwendete Gene, Moleküle zum Erhöhen der Effektivität). Darauf wird im Abschn. 2.1 „Generierung von hiPS-Zell-Linien“ näher eingegangen.

1.3 Vor- und Nachteile von hiPS-Zellen im Vergleich zu anderen Zellsystemen

Wie bedeutend die Reprogrammierung von differenzierten Körperzellen in pluripotente Stammzellen ist, wird daran deutlich, dass Shinya Yamanaka und John Gurdon 2012 für ihre Entdeckung den Nobelpreis in Medizin erhielten. Die Vor- und Nachteile der hiPS-Zellen im Vergleich zu anderen Zellsystemen wie hES-Zellen, adulten Stammzellen, sowie Zellen gewonnen aus somatischem Zellkerntransfer oder einer Transdifferenzierung, werden in diesem Abschnitt erläutert.

¹⁴Takahashi und Yamanaka 2006, S. 183 ff.

¹⁵Takahashi und Yamanaka 2006, S. 663 ff.

¹⁶Takahashi et al. 2007, S. 861 ff.

Humane embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen, somit müssen für ihre Gewinnung Embryonen zerstört werden. Dies ist ethisch stark umstritten und unterliegt in Europa keiner einheitlichen Gesetzgebung. In Deutschland verbietet das Stammzellgesetz (StZG) die Herstellung, Einfuhr und Verwendung von humanen embryonalen Stammzellen, gestattet aber nach behördlicher Genehmigung und Überprüfung durch die Ethik-Kommission deren Einfuhr für bestimmte Forschungszwecke. In anderen Ländern finden trotz der Kontroverse bereits klinische Studien mit hES-Zellen statt [<https://www.clinicaltrials.gov>, zugegriffen: 16. Januar 2019].¹⁷ HiPS-Zellen scheinen auf den ersten Blick das ethische Problem zu lösen und aufgrund ihrer funktionalen Äquivalenz ähnlich geeignet für therapeutische Anwendungen zu sein wie embryonale Stammzellen. Im Gegensatz zu hES-Zellen kann das Ausgangsmaterial für die Reprogrammierung in hiPS-Zellen leicht gewonnen werden, da sie theoretisch aus allen Zellen des menschlichen Körpers generiert werden können. Am weitesten verbreitet ist die Verwendung von Fibroblasten aus Hautbiopsien oder von PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) aus dem Blut. Ein weiterer großer Vorteil liegt darin, dass sich mit der hiPS-Zell-Technologie patienten- und damit auch krankheitsspezifische Stammzellen und entsprechende differenzierte Zellen herstellen lassen. Diese können in Zukunft sowohl als unerschöpfliche Zellquelle für Stammzelltherapien eingesetzt werden, wobei die benötigten Zellen vom Patienten selbst gewonnen werden können (autologe Therapien), als auch in der Grundlagenforschung und Medikamentenentwicklung, da hiPS-Zellen viele Krankheitsbilder im Labormaßstab abbilden können.¹⁸ Im Gegensatz dazu sind mit hES-Zellen nur sogenannte allogene Therapien möglich, bei welchen Spender und Empfänger verschiedene Personen sind und entsprechend ein Leben lang Abstoßungsreaktionen durch Immunsuppression verhindert werden müssen. Jedoch hat die Forschung an hES-Zellen im Vergleich zu den hiPS-Zellen 10 Jahre Vorsprung, weswegen deren therapeutische Anwendung trotz ethischer Bedenken, rechtlicher Einschränkungen und medizinischer Hürden näher an der praktischen Umsetzung ist. HES-Zellen und hiPS-Zellen sind sich morphologisch, funktionell und genetisch sehr ähnlich, inwieweit sie identisch sind, konnte jedoch noch nicht vollständig geklärt werden und ist weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Es gab seit der Entdeckung der hiPS-Zellen sowohl Berichte, die keinen Unterschied zu hES-Zellen hinsichtlich Genexpression oder Desoxyribonukleinsäure-Methylierung (*deoxyribonucleic acid*, DNA) (Abschn. 2.1.1) feststellen konnten, als auch Publikationen, die das Gegenteil zeigte.¹⁹ Erklären lässt sich dieser Umstand teilweise damit, dass in der Anfangszeit die Reprogrammierung häufig unvollständig erfolgte, obwohl die hiPS-Zellen morphologisch nicht von hES-Zellen unterschieden werden konnten. Die unvollständige Reprogrammierung äußerte sich beispielsweise darin, dass das Methylierungsmuster der Ausgangszelle erhalten blieb, was wiederum die Differen-

¹⁷ Schwartz et al. 2015, S. 509 ff.

¹⁸ Singh et al. 2015, S. 2; Verheyen et al. 2018, S. 363 ff.

¹⁹ Yamanaka 2012, S. 678 ff.

zierung beeinflusste.²⁰ Das führte zur damaligen Annahme, dass sich hiPS-Zellen von hES-Zellen unterscheiden. Die Methode der Reprogrammierung wurde seit 2006 weiterentwickelt und verbessert, dennoch sind für einen direkten Vergleich beider Zellsysteme hES- und hiPS-Zellen mit dem gleichen genetischen Hintergrund, also von einem identischen Spender notwendig. Aus diesem Grund wurden in Studien hES-Zell-Linien zunächst differenziert und die differenzierten Zellen anschließend wieder in hiPS-Zellen reprogrammiert. Bei solchen isogenen Linien konnten keine Unterschiede in der Genexpression, dem Methylierungsmuster oder der Funktionalität festgestellt werden.²¹ Unabhängig davon, stellen hiPS-Zellen wegen ihres vergleichbaren Potenzials, den geringeren ethischen Bedenken und aufgrund der Möglichkeit sie patientenspezifisch einzusetzen, einen vielversprechenden Kandidaten für eine therapeutische Anwendung dar.

Eine weitere Möglichkeit der Gewinnung pluripotenter Zellen aus der Blastozyste ist der *somatische Zellkerntransfer* (*somatic cell nuclear transfer*, SCNT) (Abschn. 1.2). Der mittels SCNT generierte Embryo trägt die gleiche Erbinformation wie der Spender des verwendeten Zellkerns (klonen). Aufgrund der niedrigen Effizienz und dem damit einhergehenden hohen Verbrauch an Eizellen und aufgrund der Zerstörung von Embryonen ist der somatische Zellkerntransfer ebenso ethisch fragwürdig wie die Verwendung embryonaler Stammzellen. Ein Ansatz, der diese Probleme abschwächen soll, ist der modifizierte Zellkerntransfer (*altered nuclear transfer*, ANT). Bei dieser Technik werden der somatische Zellkern und/oder die Eizelle so verändert, dass das volle embryonale Entwicklungspotenzial nach dem Kerntransfer nicht mehr vorhanden ist, der sogenannte Pseudoembryo aber immer noch pluripotente Zellen bilden kann.²² Neben den ethischen bestehen aber auch methodische Bedenken, da klonierte Mäuse häufig genetische Defekte aufweisen. Zu diesen gehören bei Mäusen unter anderem eine fehlerhafte Genexpression in Embryonen, ein erhöhtes Risiko für Adipositas, eine Beeinträchtigung des Immunsystems, eine höhere Krebsanfälligkeit und vorzeitiger Tod, sodass eventuelle Auswirkungen beim Menschen noch weiter untersucht werden müssten.²³ Da die mitochondriale DNA (mtDNA) im Cytoplasma der Eizelle vorliegt und nicht vom Zellkern des Spenders stammt, könnte SCNT oder ANT allerdings bei Erkrankungen, die durch Mutationen in der mtDNA hervorgerufen werden, eine Möglichkeit zur Erzeugung eines gesunden Embryos darstellen. Eine weitere Besonderheit ist, dass der somatische Zellkerntransfer zurzeit die einzige Methode ist, mit der eine differenzierte Zelle *in vitro* in einen totipotenten Zustand versetzt werden kann.²⁴ Auf Grund der ethischen Problematik ist diese Methode allerdings in vielen Ländern, darunter auch Deutschland (nach dem Embryonenschutzgesetz, ESchG) verboten.

²⁰ Kim et al. 2010, S. 285 ff.

²¹ Mallon et al. 2014, S. 376 ff.; Choi et al. 2015, S. 1173 ff.

²² Hurlbut 2007, S. 79 ff.

²³ Thuan et al. 2010, S. 20 ff.

²⁴ Cieślak-Pobuda et al. 2017, S. 1359 ff.

Bei der *Transdifferenzierung* wird eine differenzierte Zelle direkt in eine andere differenzierte Zelle umgewandelt (Abschn. 1.2). Dieser Prozess ist auf den ersten Blick schneller und einfacher als die Reprogrammierung in hiPS-Zellen mit anschließender Differenzierung in den gewünschten Zelltyp.²⁴ Die kürzere Zeit der *in vitro* Kultivierung macht die transdifferenzierten Zellen außerdem weniger anfällig für eine Akkumulation genetischer Mutationen, welche bei hiPS-Zellen möglich ist.²⁵ HiPS-Zellen bergen die Gefahr, dass sie nach der Differenzierung spontan dedifferenzieren oder dass im differenzierten Zellprodukt noch undifferenzierte, pluripotente Stammzellen vorhanden sind, die aufgrund ihres unbegrenzten Vermehrungspotenzials Tumore bilden können. Dieses Risiko ist bei der Transdifferenzierung zwar nicht vorhanden, eine karzinogene Wirkung bei transdifferenzierten Zellen kann durch mögliche epigenetische Veränderungen der Zellen (Abschn. 2.1.1) und die notwendige Einbringung und Expression neuer Gene (ähnlich der Reprogrammierung, Abschn. 2.1) allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden.²⁶ Ein großer Nachteil der Transdifferenzierung ist, dass differenzierte Zellen im Gegensatz zu Stammzellen ein begrenztes Teilungspotenzial besitzen und nur für kurze Zeit expandiert werden können, sodass keine großen Zellmengen hergestellt werden können. Entsprechend kann die *in vitro* Transdifferenzierung für therapeutische Anwendungen, bei denen eine große Zellzahl benötigt wird (Abschn. 2.2), nicht verwendet werden. Zurzeit ist die Transdifferenzierung zudem nur in wenige Zelltypen möglich, was den Anwendungsbereich im Vergleich zu hiPS-Zellen stark einschränkt. Beispielsweise konnten Fibroblasten in Myozyten, Neurone, Hepatozyten oder Kardiomyozyten transdifferenziert werden. Zusammengefasst könnte die Transdifferenzierung eine schnellere und kostengünstigere Alternative für einzelne Zelltypen, die in kleinen Mengen benötigt werden, darstellen. Mit hiPS-Zellen kann jedoch ein breiteres Spektrum an Zelltypen und eine größere Zellzahl generiert werden.²⁷

Adulte Stammzellen sind uni- oder multipotent und können nach der Geburt aus verschiedenen Organen und Geweben, zum Beispiel Fettgewebe oder Knochenmark, isoliert werden. Einzelne Therapien mit adulten Stammzellen werden bereits seit Jahrzehnten eingesetzt und gelten im Gegensatz zu pluripotenten Stammzelltherapien als sicher und ethisch unbedenklich. Alles begann 1969 mit der ersten von Thomas durchgeführten Knochenmarkstransplantation; seitdem wurde diese Stammzelltherapie bei ungefähr einer Million Menschen zur Behandlung von Leukämie angewandt.²⁸ Die hämatopoetischen Stammzellen (Blutstammzellen) im Knochenmark stellen dabei den Ausgangspunkt für die Zellneubildung des Blutes und des Abwehrsystems dar. Ebenfalls äußerst erfolgreich werden Hautstammzellen seit über 30 Jahren unter anderem zur Behandlung von Verbrennungen ange-

²⁵ Gore et al. 2011, S. 1173 ff.; Cieślak-Pobuda et al. 2017, S. 1359 ff.

²⁶ Cieślak-Pobuda et al. 2017, S. 1359 ff.

²⁷ Cieślak-Pobuda et al. 2017, S. 1359 ff.; Davis et al. 1987, S. 987 ff.; Vierbuchen et al. 2010, S. 1035 ff.; Ambasudhan et al. 2011, S. 113 ff.; Sekiya und Suzuki 2011, S. 390 ff.; Ieda et al. 2010, S. 375 ff.

²⁸ Storb 2012, S. 334.

wandt, da sie sich vergleichsweise einfach und schnell kultivieren lassen. Aus einer 3 cm² großen Hautbiopsie vom Patienten entsteht nach 3–4 Wochen ein vielschichtiges, epitheliales autologes Transplantat, das groß genug ist den ganzen Körper zu bedecken.²⁹ Mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem cell*, MSC) können aus verschiedenen Geweben wie Knochenmark, Fettgewebe oder Nabelschnur isoliert werden und fanden bereits in zahlreichen klinischen Studien zur Behandlung verschiedener Erkrankungen, wie zum Beispiel Diabetes, Autoimmunerkrankungen oder Erkrankungen der Leber und Niere, Anwendung.³⁰ MSCs haben ihren Ursprung im Mesoderm und können beispielsweise in Osteoblasten (knochenbildende Zellen), Chondrozyten (knorpelbildende Zellen) oder Adipozyten (Fettgewebszellen) differenzieren. Es existiert allerdings auch die zuletzt dominante Hypothese, dass die Wirkung von transplantierten MSCs auf von ihnen sezernierten Stoffen beruht. Allerdings haben sie den Vorteil, dass sie immunomodulatorische, das heißt das Immunsystem beeinflussende, Eigenschaften besitzen, wodurch eine allogene Verwendung vereinfacht wird.³¹ Alle bislang etablierten Therapien mit adulten Stammzellen haben gemeinsam, dass sie Zellen aus verhältnismäßig leicht zugänglichen Quellen wie Knochenmark, Blut oder Haut verwenden, die sich zudem vergleichsweise einfach kultivieren lassen. Viele adulte Stammzellen lassen sich aber nicht ohne irreparable Schädigung des Spenders in ausreichender Menge gewinnen, da nur sehr wenige Stammzellen tief verteilt im Gewebe vorhanden sind. Ein Beispiel hierfür sind Stammzellen aus dem Gehirn zur Behandlung neurologischer Erkrankungen. Folglich ist in vielen Bereichen zurzeit keine Therapie mit adulten Stammzellen möglich. Dass mit zunehmendem Alter des Patienten die Funktionalität der adulten Stammzellen abnimmt und das Krebsrisiko steigt, stellt ein weiteres Problem bei der autologen Verwendung von adulten Stammzellen dar.³²

Im Vergleich zu den hier dargestellten Zellsystemen, gelten hiPS-Zellen mit ihrer Verfügbarkeit, sowie ihrem Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotenzial als vielversprechendste Zellquelle für die klinische Translation Zell-basierter Therapien.

2 Prozessschritte einer hiPS-Zell-basierten Therapie

Zwischen der Reprogrammierung von Körperzellen und der klinischen Applikation des hiPS-Zellen abgeleiteten Produkts liegen zahlreiche, mitunter zeitintensive Arbeitsschritte. Der Herstellungsprozess kann unabhängig von der finalen Anwendung in einzelne Prozessschritte abstrahiert werden (Abb. 2). Zunächst müssen hiPS-Zell-Linien *generiert* werden (Abschn. 2.1; Abb. 2 Punkt 1). Dazu werden die zu reprogrammierenden Zellen aus dem gespendeten Gewebe aufgereinigt und in Kul-

²⁹Ojeh et al. 2015, S. 25476 ff.

³⁰Squillaro et al. 2016, S. 829 ff.; Stoltz et al. 2015, S. 19.

³¹Stoltz et al. 2015, S. 19.

³²Brunet und Rando 2007, S. 288.

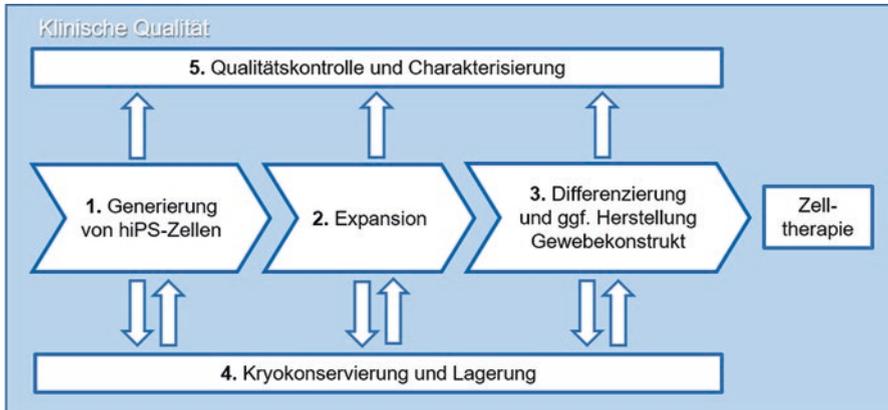


Abb. 2 Schematische Übersicht des Herstellungsprozesses von hiPS-Zellen abgeleiteten Therapieprodukten. Dieser beginnt mit der Generierung der hiPS-Zellen und endet mit dem differenzierten Zellprodukt für die klinische Anwendung

tur genommen. Nach der Reprogrammierung mit den entsprechenden Transkriptionsfaktoren bilden die erzeugten hiPS-Zellen kolonieartige Strukturen, wodurch hiPS-Zellen von den nicht reprogrammierten Zellen morphologisch unterschieden werden können. Diese Kolonien werden zunächst separiert und getrennt kultiviert, bevor eine erste Qualitätskontrolle entscheidet, welche Kolonien als hiPS-Zell-Linie weiterverwendet werden. Da für die meisten Zelltherapien eine große Zellzahl benötigt wird, muss die erzeugte hiPS-Zell-Linie im nächsten Schritt weiter *expandiert* werden (Abschn. 2.2; Abb. 2 Punkt 2). Um das bei einem Herzinfarkt verlorene Gewebe zu ersetzen, sind beispielsweise mindestens $1-2 \times 10^9$ künstlich hergestellte Kardiomyozyten notwendig.³³ Nach der Expansion ist es unerlässlich erneut die *Qualität* der hiPS-Zellen zu kontrollieren (Abschn. 2.4; Abb. 2 Punkt 5). Es wird geschätzt, dass von der Gewinnung des Ausgangsmaterials bis zur expandierten hiPS-Zell-Linie aktuell Kosten von 10.000 bis 20.000 USD entstehen bei einer Prozessdauer von vier bis sechs Monaten.³⁴ Die nächsten Schritte hin zur Therapie sind die *Differenzierung* der hiPS-Zellen in den benötigten Zelltyp, sowie die Herstellung des finalen Zellproduktes (Abschn. 2.3; Abb. 2 Punkt 3). Beim finalen Zellprodukt kann es es sich je nach Anwendung sowohl um Einzelzellen als auch um ein Gewebekonstrukt handeln. Zur Qualitätssicherung sowie für eine erleichterte und schnellere Bereitstellung können die Produkte während der verschiedenen Prozessschritte *eingefroren* (kryokonserviert) und bei tiefkalten Temperaturen über Jahre gelagert werden (Abschn. 2.5; Abb. 2 Punkt 4). Dies ermöglicht es zu einem späteren Zeitpunkt auf bereits generierte hiPS-Zell-Linien eines Patienten zurück zu greifen oder auch ganze Zellbanken für allogene Therapien anzulegen. Diese Zellbanken könnten in Zukunft kompatible hiPS-Zell-Linien für therapeutische Anwen-

³³ Storb 2012, S. 334.

³⁴ McKernan und Watt 2013, S. 875 ff.

dungen für einen Großteil der Bevölkerung vorrätig halten (Abschn. 2.1.3.1). Zu jedem Prozessschritt sind entsprechende *Qualitätskontrollen* unerlässlich, die im Abschn. 2.4 näher beschrieben werden (Abb. 2 Punkt 5).

Eines der größten Probleme auf dem Weg zu einer breiten klinischen Anwendung von hiPS-Zellen liegt neben der relativ langen Produktionsdauer und den hohen Kosten in fehlenden standardisierten Methoden zum Nachweis der Qualität und Sicherheit dieser Zellen. Die Prozessschritte zur Herstellung von hiPS-Zellen abgeleiteten Therapieprodukten werden im Folgenden einzeln betrachtet. Dabei werden sowohl der biologische Hintergrund als auch die technische Umsetzung erläutert. Zusätzlich werden vielversprechende Entwicklungen im Ausblick dargestellt.

2.1 Generierung von hiPS-Zell-Linien

Differenzierte Körperzellen können durch Reprogrammierung, also durch die Expression ausgewählter und in die Zellen eingebrachter Transkriptionsfaktoren, in induzierte pluripotente Stammzellen umgewandelt werden. Seit der ersten erfolgreichen Reprogrammierung 2006, wurde die Methode in den letzten 12 Jahren weiterentwickelt, um die Effizienz und die Sicherheit zu erhöhen. Im Folgenden werden sowohl der biologische Hintergrund (Abschn. 2.1.1) als auch die technische Umsetzung mit verschiedenen Vektorsystemen (Abschn. 2.1.2) erläutert. Anschließend werden im Ausblick (Abschn. 2.1.3) die verschiedenen Kategorien von Therapiemöglichkeiten erläutert und die zukunftsweisende Methode der Genom-Editierung vorgestellt, wodurch das therapeutische Potenzial der hiPS-Zellen deutlich vergrößert werden könnte.

2.1.1 Biologischer Hintergrund

Für eine erfolgreiche Reprogrammierung sind die Einschleusung von bestimmten Reprogrammierungsfaktoren und deren erfolgreiche Expression über einen bestimmten Zeitraum, der abhängig vom Zelltyp und der verwendeten Methode variiert, notwendig.³⁵ Erfolgreich ist die Reprogrammierung dann, wenn durch diese exogenen, also von außen eingebrachten, Faktoren das endogene, zelleigene Pluripotenz-Netzwerk (zentral bedeutsam sind z. B. OCT3/4, SOX2 und NANOG) vollständig reaktiviert wird, welches wiederum embryonale Gentranskriptionskaskaden dauerhaft stabilisiert und aufrechterhält. Diese Transkriptionskaskaden sind sowohl verantwortlich für die unbegrenzte Selbsterneuerungsfähigkeit wie auch für die Pluripotenz der reprogrammierten Zellen. Die vollständige, dauerhafte Reaktivierung dieses endogenen Netzwerks findet nur statt, wenn die Stilllegung der exogenen Faktoren erfolgt.³⁶

³⁵ Gonzalez et al. 2011, S. 231 ff.

³⁶ Gonzalez et al. 2011, S. 231 ff.

2.1.1.1 Reprogrammierungsfaktoren

Durch eine systematische Untersuchung konnte die Liste potenzieller Reprogrammierungsfaktoren auf vier reduziert und die erste erfolgreiche Reprogrammierung von murinen Zellen mit OCT3/4 (*octamer-binding transcription factor 3/4*), SOX2 (*SRY-box-containing gene 2*), KLF4 (*Kruppel-like factor 4*) und MYC (*myelocytomatosis oncogene*, auch bekannt als C-MYC), kurz OSKM, durchgeführt werden.³⁷ Ein Jahr später wurden humane Zellen zeitgleich mit Hilfe dieses und eines anderen Faktorgemischs, bei dem OCT3/4 und SOX2 in Kombination mit NANOG und LIN28 (kurz OSNL) eingesetzt wurden, reprogrammiert.³⁸ Bis heute wurde die Methode der Reprogrammierung weiter optimiert. Im Folgenden wird eine kurze Übersicht gegeben, eine detaillierte Zusammenfassung kann den Review-Artikeln von Gonzalez et al. und von Takahashi und Yamanaka entnommen werden.³⁹ Generell spielen drei Kategorien von Faktoren bei der Reprogrammierung eine Rolle: Pluripotenz-assoziierte, Zellzyklus-regulierende und die Epigenetik-beeinflussende Faktoren, die nachfolgend erläutert werden.

Ziel der Reprogrammierung ist die Aktivierung des endogenen Pluripotenz-Netzwerks, das heißt von Genen, die früh in der Embryonalentwicklung exprimiert werden und das pluripotente Potenzial erhalten. Dafür notwendig sind Pluripotenz-assoziierte Transkriptionsfaktoren. Zu diesen zählen OCT3/4, SOX2 und NANOG. Alternativ können andere Transkriptionsfaktoren verwendet werden sofern sie die gleichen Zielgene beeinflussen. Beispielsweise kann NANOG durch KLF4, welches kein Pluripotenz-Transkriptionsfaktor ist, ersetzt werden.⁴⁰ Werden zusätzlich zu OSKM weitere Pluripotenz-Transkriptionsfaktoren wie NANOG oder UTF1 (*undifferentiated embryonic cell transcription factor 1*) verwendet, verbessert dies die Effizienz der Reprogrammierung.⁴¹ Die Effizienz gibt den prozentualen Anteil der reprogrammierten Zellen an.

Zellzyklus-Regulatoren wie die Transkriptionsfaktoren MYC oder KLF4 beeinflussen direkt oder indirekt die Regulation des Zellzyklus und damit die Zellteilung (Proliferation). Sie tragen somit dazu bei, dass die Zellen eine unbegrenzte Selbsterneuerungsfähigkeit erlangen. Humane Fibroblasten können zwar ganz ohne MYC mit OSK reprogrammiert werden, jedoch wird die Effizienz der Reprogrammierung dadurch deutlich reduziert. Dennoch ist für therapeutische Anwendungen ein Verzicht auf MYC aufgrund seiner potenziell tumorigenen (tumorerzeugenden) Wirkung (Onkogen) möglicherweise sinnvoll: Eine Studie zeigte, dass sich bei keiner von 26 Mäusen, die aus mit OSK reprogrammierten Zellen erzeugt wurden, Tumore entwickelten. Wurde zusätzlich MYC verwendet, starben sechs von 37 Mäusen aufgrund einer Tumorbildung.⁴² Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass es sich hierbei

³⁷Takahashi und Yamanaka 2006, S. 663 ff.

³⁸Yu et al. 2007, S. 1917 ff.

³⁹Takahashi und Yamanaka 2016, S. 183 ff.; Gonzalez et al. 2011, S. 231 ff.

⁴⁰Takahashi und Yamanaka 2016, S. 183 ff.

⁴¹Takahashi und Yamanaka 2016, S. 183 ff.; Gonzalez et al. 2011, S. 231 ff.

⁴²Nakagawa et al. 2008, S. 101 ff.

um einen durch unvollständige Reprogrammierung hervorgerufenen Effekt handelte. Da alle Vertreter der MYC-Familie gegeneinander ausgetauscht werden können, könnten alternativ weniger tumorigene Varianten wie L-MYC verwendet werden.⁴³ Der Zellzyklus kann nicht nur durch Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden, auch andere Proteine (z. B. Kinase-Inhibitoren), chemische Substanzen oder microRNAs (*micro ribonucleic acid*, micro Ribonukleinsäure) können positive Effekte auf die Proliferation und die Reprogrammierung haben, sowie die Inhibierung von Reprogrammierungs-Barrieren ermöglichen (Abschn. 2.2.1).⁴⁴

Ebenso können die Epigenetik-beeinflussende Faktoren die Reprogrammierung beschleunigen und die Effizienz erhöhen, da die mit der Reprogrammierung einhergehenden epigenetischen Veränderungen einen limitierenden Faktor darstellen.⁴⁵ Unter Epigenetik werden alle auf die Tochterzellen vererbaren Modifikationen der Genexpression zusammengefasst, die nicht auf einer Veränderung der DNA-Sequenz basieren.⁴⁶ Zu den bedeutendsten epigenetischen Mechanismen zählt die DNA-Methylierungen bei der Methylgruppen an Bausteine der DNA gebunden werden, was zu einer Inaktivierung der Transkription führt. Jeder Zelltyp besitzt ein spezifisches DNA-Methylierungsmuster, welches die Zelltyp-spezifische Genexpression definiert. Folglich hat der Status der DNA-Methylierung in den Ausgangszellen einen Effekt auf die Reprogrammierung.

Neben der Kombination von Reprogrammierungsfaktoren aus verschiedenen Kategorien ist der Erfolg der Reprogrammierung auch von der Stöchiometrie der verwendeten Faktoren abhängig.⁴⁷ Beispielsweise resultierten eine hohe OCT3/4 und gleichzeitig niedrige SOX2 Konzentration in der höchsten Effizienz. Häufig wird für OSKM ein Verhältnis von 3:1:1:1 verwendet.

2.1.1.2 Kultivierungsbedingungen

Neben der Kombination und Stöchiometrie der ausgewählten Reprogrammierungsfaktoren sind auch die Kultivierungsbedingungen ein ausschlaggebender Faktor für die effiziente Reprogrammierung und Qualität der generierten hiPS-Zellen. Ein chemisch definiertes Minimalmedium komplett frei von tierischen Komponenten (E8) erwies sich in Kombination mit einer Vitronektin-Beschichtung (Abschn. 2.2.1) beispielsweise als effizienter bei der lentiviralen und episomalen Reprogrammierung (Abschn. 2.1.2) als das meistverwendete, kommerzielle Medium mTeSR.⁴⁸ Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Enzymen ins Medium (z. B. 2i Medium zur Inhibierung der Kinasen MEK und Glycogensynthase-Kinase 3) sowohl die Induktion als auch den Erhalt der Pluripotenz positiv beeinflusst.⁴⁹

⁴³Nakagawa et al. 2008, S. 101 ff.

⁴⁴Gonzalez et al. 2011, S. 231 ff.

⁴⁵Takahashi und Yamanaka 2016, S. 183 ff.; Gonzalez et al. 2011, S. 231 ff.

⁴⁶Strachan und Read 2005, S. 341 ff.

⁴⁷Takahashi und Yamanaka 2016, S. 183 ff.

⁴⁸Chen et al. 2011, S. 424 ff.

⁴⁹Takahashi und Yamanaka 2016, S. 183 ff.

Neben der Zusammensetzung des Zellkulturmediums hat der Sauerstoff-Partialdruck einen Einfluss auf die Reprogrammierung. HiPS- und hES-Zellen werden standardmäßig mit normaler Luft, also 21 % Sauerstoff kultiviert. Da der Sauerstoff-Partialdruck im Embryo hypoxisch (2–6 % Sauerstoff) ist, entspricht dies nicht der physiologischen Umgebung. Passt man die Kultivierungsbedingungen der natürlichen Zellnische an und reprogrammiert unter hypoxischen Bedingungen, erhöht dies die Effizienz deutlich.⁵⁰

2.1.1.3 Ausgangsmaterial für Reprogrammierung

Nicht zuletzt beeinflusst auch das verwendete Ausgangsmaterial für die Reprogrammierung die Effizienz und Dauer des Prozesses. HiPS-Zellen können theoretisch aus allen Zellen des menschlichen Körpers generiert werden, am weitesten verbreitet ist zurzeit aufgrund der guten Verfügbarkeit die Verwendung von Fibroblasten aus Hautbiopsien oder PBMCs aus dem Blut (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*). Von den 1556 bei der größten Zellbank CIRM (California Institute for Regenerative Medicine) registrierten hiPS-Zell-Linien wurden 263 aus Fibroblasten und 1148 aus PBMCs gewonnen (Stand 21.01.19). Bei der europäischen Bank für induzierte pluripotente Stammzellen (EBiSC) wurden bei 78 % der Linien Fibroblasten als Ausgangsmaterial verwendet und bei den restlichen 22 % PBMCs.⁵¹ Die Gewinnung der somatischen Ausgangszellen sollte für den Spender möglichst schonend und somit wenig invasiv erfolgen. Zum Beispiel ist die Entnahme einer geringen Menge Blutes einer Hautbiopsie vorzuziehen, sofern beide Verfahren im Hinblick auf Gewinnung und Verwendung medizinisch und naturwissenschaftlich gleichwertig sind. Wenig invasiv ist auch die Entnahme eines Haares; die daraus gewonnen primären Keratinozyten (Hautzellen) konnten im Vergleich zu humanen Fibroblasten hundertfach effizienter und zweifach schneller zu hiPS-Zellen reprogrammiert werden.⁵² Bei der Auswahl des Ausgangszelltyps gilt generell: Je geringer der Differenzierungsstatus der Zellen ist, umso leichter und effizienter lassen sie sich reprogrammieren, da das genetische Muster dann noch vergleichbarer zu pluripotenten Zellen ist. Beispielsweise weist das DNA-Methylierungsmuster vollständig differenzierter Zellen mehr Veränderungen auf als das wenig differenzierter Zellen. Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen konnten entsprechend mit einer Effizienz von 28 % reprogrammiert werden, damit war die gleiche Methode dreihundertfach effizienter als bei final differenzierten B- oder T-Zellen.⁵³

Die Auswahl der Reprogrammierungsfaktoren ist auch abhängig vom verwendeten Ausgangszelltyp. Wenn differenzierte Zellen bereits einen Reprogrammierungsfaktor endogen exprimieren, so muss dieser nicht mehr von außen hinzugegeben werden. Neurale Vorläuferzellen exprimieren beispielsweise *sox2*, sodass hier sowohl eine Kombination aus OCT3/4 und KLF4 oder MYC als auch OCT3/4 allein

⁵⁰Yoshida et al. 2009, S. 237 ff.

⁵¹De Sousa et al. 2017, S. 105 ff.

⁵²Aasen et al. 2008, S. 1276 ff.

⁵³Eminli et al. 2009, S. 968 ff.

eine erfolgreiche Reprogrammierung ermöglichte. Allerdings war die Reprogrammierungseffizienz mit nur einem Faktor zehnfach niedriger (0,014 %) als mit zwei Faktoren und Reprogrammierungsdauer fast doppelt so lang (4–5 Wochen).⁵⁴

2.1.1.4 Mechanismus der Reprogrammierung

Wie genau die Expression von eingeschleusten Transkriptionsfaktoren wie OSKM den Übergang zum pluripotenten Status einleitet ist zurzeit noch nicht vollständig bekannt. Details zu den molekularen Mechanismen wurden von Smith et al. zusammengefasst, wohingegen Takahashi und Yamanaka eine generellere Übersicht geben.⁵⁵ Die erfolgreiche Reprogrammierung hängt vom Zusammenspiel vieler Ereignisse ab und kann in eine frühe und eine späte Phase unterteilt werden. In den Ausgangszellen sind somatische Gene aktiv, wohingegen Pluripotenz-assoziierte Gene (PAG) nicht exprimiert werden. In der frühen Phase ist unter anderem die Unterdrückung der Expression somatischer Zellgene wichtig. Gleichzeitig blockieren zum Beispiel DNA-Schäden oder der programmierte Zelltod (Apoptose) den Fortschritt der Reprogrammierung. Erst in der späten Phase werden spezifische PAGs für die Reprogrammierungs-Transkriptionsfaktoren zugänglich und deren Expression initiiert, während gewebespezifische Gene und Entwicklungsgene weiterhin unterdrückt werden. Schließlich werden in hiPS-Zellen die exogenen Reprogrammierungsfaktoren und die somatischen Gene im Gegensatz zu den PAGs nicht mehr exprimiert. Nach der Aktivierung bestimmter Schlüssel-Gene wird die Pluripotenz in der späten Phase der Reprogrammierung stabilisiert und damit unabhängig von der Expression der eingeschleusten Faktoren. Die Expression der Schlüssel-Gene scheint ein vollständiges, sich selbst erhaltendes regulatorisches Netzwerk wiederherzustellen. Viele Zellen der heterogenen Ausgangs-Zellpopulation initiieren die Reprogrammierung, da der Prozess komplex ist und viele Ereignisse umfasst, schließen aber nur sehr wenige Zellen ihn erfolgreich ab. Insgesamt verläuft die Reprogrammierung nicht deterministisch, also nicht vorherbestimmt, sondern zufällig (stochastisch). Folglich erscheinen reprogrammierte Zellen nicht synchronisiert, sondern zu unterschiedlichen, zufälligen Zeiten. Um die Funktionalität und Sicherheit der hiPS-Zellen zu gewährleisten, muss darauf geachtet werden, dass es sich um vollständig reprogrammierte Zellen handelt. Unvollständig reprogrammierte Zellen weisen viele Eigenschaften von vollständig reprogrammierten Zellen auf (z. B. Selbsterneuerungsfähigkeit, Expression von Pluripotenz-Genen, Morphologie, Bildung von Teratoma) (Abschn. 2.4.1), exprimieren aber weiterhin die exogenen Reprogrammierungsfaktoren und somatische DNA-Methylierungsmuster wurden nicht vollständig gelöscht. Solch ein „epigenetisches Gedächtnis“ kann dazu führen, dass einerseits die Differenzierung in die Ausgangszellen oder nahe verwandte Zelltypen begünstigt und andererseits in andere Zelltypen erschwert

⁵⁴ Kim et al. 2008, S. 646 ff.

⁵⁵ Takahashi und Yamanaka 2016, S. 183 ff; Smith et al. 2016, S. 139 ff.

wird.⁵⁶ Ein weiteres Merkmal vollständig reprogrammierter Zellen ist die Aktivierung des stillgelegten X-Chromosoms in weiblichen Zellen.

2.1.1.5 Zusammenfassung

Für die Durchführung einer erfolgreichen Reprogrammierung muss genau evaluiert werden welcher Zelltyp, welche Reprogrammierungsfaktoren und welche Kultivierungsbedingungen verwendet werden sollen. Generell können Vorläuferzellen oder adulte Stammzellen effizienter und oftmals mit weniger Faktoren reprogrammiert werden als vollständig differenzierte Zellen. Die Effizienz kann jedoch durch Beeinflussung des Zellzyklus und/oder epigenetischen Status ebenso verbessert werden wie durch die Beseitigung von Reprogrammierungs-Barrieren. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind Gegenstand weiterer Untersuchungen und können dabei helfen weitere Faktoren und Wege zu identifizieren, um die Reprogrammierung zu optimieren.

2.1.2 Technische Umsetzung

Durch Verwendung verschiedener Ausgangszelltypen, Kombinationen von Transkriptions- bzw. Reprogrammierungsfaktoren und Kultivierungsbedingungen ergeben sich, wie in Abschn. 2.1.1 beschrieben, zahlreiche Optionen für eine Reprogrammierung. Allen gemeinsam ist allerdings die Grundvoraussetzung, dass zunächst Pluripotenz-assoziierte Transkriptionsfaktoren in die Ausgangszellen eingebracht werden müssen. Um dies zu erreichen, können verschiedene Techniken angewandt werden, welche sich in drei Kategorien einteilen lassen: integrative DNA-Methoden (z. B. Retroviren, Transposons), nicht-integrative DNA-Methoden (z. B. Adenoviren, episomale Plasmide) und DNA-freie Methoden (z. B. Proteine, mRNA). Die unterschiedlichen Kategorien unterscheiden sich in ihrem Risiko für Erbgutveränderungen und folglich in ihrer Sicherheit für klinische Anwendungen (Abb. 3). Bei den meisten dieser Methoden werden sogenannte Vektoren verwendet. Vektoren sind Transportvehikel, mit denen Nukleinsäuren, also die Bausteine der DNA und RNA, in Zellen eingebracht und exprimiert werden. Handelt es sich um einen viralen Vektor wird der Prozess als Transduktion bezeichnet, wohingegen man unter Transfektion die Aufnahme von Nukleinsäuren (z. B. Plasmide, mRNA) in eukaryotische Zellen versteht. Bei letzterem muss die Aufnahme künstlich herbeigeführt werden. Ob alle Reprogrammierungsfaktoren zusammen in einem Vektor oder jeder Faktor in einem separaten Vektor übertragen wird, ist vektor- und protokollabhängig. Im Folgenden werden stellvertretend die wichtigsten Beispiele aus den verschiedenen Kategorien beschrieben. Eine detailliertere Übersicht kann den Artikeln von Bernal et al. und Gonzalez et al. entnommen werden.⁵⁷

⁵⁶ Kim et al. 2010, S. 285 ff.

⁵⁷ Gonzalez et al. 2011, S. 231 ff.; Bernal 2013, S. 956 ff.

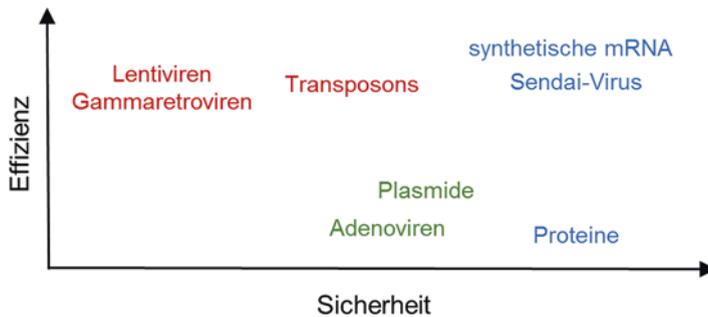


Abb. 3 Vergleich verschiedener Reprogrammierungs-Methoden hinsichtlich ihrer Effizienz und Sicherheit für eine therapeutische Anwendung. Integrative DNA-Methoden sind in rot, nicht-integrative DNA-Methoden in grün und DNA-freie Methoden in blau dargestellt. Abbildung in Anlehnung an Gonzalez et al. 2011 (Takahashi et al. 2007, S. 861 ff.)

2.1.2.1 Integrative DNA-Methoden

Bei den *integrativen DNA-Methoden* integriert der Vektor inklusive der eingeschleusten Gene in die DNA-Sequenz der Empfängerzelle. Um dies zu ermöglichen, können verschiedene Arten von Viren, zum Beispiel Retroviren verwendet werden. Retroviren sind behüllte Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom. Unter dem Genom versteht man die Gesamtheit der vererbaren Informationen, welche in der Nukleinsäure-Sequenz gespeichert und in Abschnitten (Genen) organisiert ist. Nach der Infektion der Empfängerzelle wird die virale RNA mit Hilfe des viralen Enzyms „Reverse Transkriptase“ in doppelsträngige DNA umgeschrieben (transkribiert), welche als *complementary DNA* (cDNA) bezeichnet wird. Ein zweites virales Enzym vermittelt die Integration der cDNA in das Genom der Empfängerzelle. Nachdem das virale Genom ins Wirtsgenom integriert wurde, wird es gemeinsam mit den zelleigenen Genen exprimiert, was schließlich im Zusammenbau neuer Viruspartikel resultiert. Werden Viren als Vektor verwendet, muss die Nukleinsäuresequenz, die in den Empfängerzellen exprimiert werden soll, in das Genom der Viren eingefügt werden. Dabei werden in der Regel Teile des viralen Genoms, zum Beispiel Gene für Membranproteine, ersetzt, um vermehrungsunfähige Viruspartikel zu erzeugen. Die so generierten, nur einmalig infektiösen, vermehrungsunfähigen Viren können die Empfängerzellen infizieren, woraufhin die integrierte Nukleinsäuresequenz zusammen mit dem verbliebenen viralen Genom übertragen werden. Neben Gammaretroviren wurden auch Lentiviren aus der Familie der Retroviren verwendet. Diese haben den Vorteil, dass sie Zellen unabhängig vom Zellzyklus infizieren können, weswegen sie im Gegensatz zu Gammaretroviren auch für sich nicht teilende Zellen geeignet sind. Trotz der hohen Transduktionseffizienz lag die Effizienz der Reprogrammierung mit einem gammaretroviralen Vektor, welcher OSKM enthielt, beispielsweise bei 0,020 % (10 hiPS-Zellkolonien entwickelten sich aus 50.000 Ausgangszellen) und mit einem lentiviralen Vektor, welcher OSNL

enthielt, bei 0,022 % (198 Kolonien aus 900.000 Zellen).⁵⁸ Diese Effizienzen stellen aber lediglich einen groben Anhaltspunkt dar und lassen sich nicht direkt miteinander vergleichen. Alle retroviralen Vektoren integrieren ins Genom der Wirtszelle, was ein Sicherheitsrisiko für therapeutische Anwendungen darstellt, da die Genexpression umliegender Gene der Wirtszelle beeinflusst werden kann. Zum Beispiel kann eine Integration innerhalb eines Tumorsuppressorgens dessen Expression verhindern und in der Nähe eines Onkogens dessen Expression erhöhen, was beides zu unkontrolliertem, unbegrenztem Wachstum, also zur Tumorbildung, führen kann. Yamanaka und Kollegen verwendeten beispielsweise für die Transduktion mit OSKM vier separate Vektoren und erhielten reprogrammierte Zellen, bei denen sich an 20 verschiedenen Stellen der Vektor integriert hatte.⁵⁹ Des Weiteren besteht die Gefahr, dass die retroviralen Vektoren, deren Expression in den pluripotenten Zellen unterdrückt ist, während oder nach der Differenzierung reaktiviert werden. Um diese Probleme zum Teil zu beheben, wurden induzierbare und nach der Reprogrammierung aus dem Genom entfernbare Systeme entwickelt (z. B. mit dem Cre/loxP-System). Eine weitere integrative DNA-Methode stellen Transposons dar. Transposons sind genetische Elemente, die im Genom springen können. Im Gegensatz zu retroviralen Vektoren wird beispielsweise das sogenannte *PiggyBac* Transposon nach der Integration vollständig herausgeschnitten, sodass theoretisch keine genomische Veränderung am Integrationsort vorhanden ist. Dennoch wurden in der Praxis Veränderungen an den Integrationsstellen beobachtet, weswegen die Überprüfung der präzisen Entfernung mittels Sequenzierung unbedingt notwendig ist.⁶⁰ Zudem ist diese Methode im Vergleich zu nicht-integrativen und DNA-freien Methoden sehr komplex und zeitaufwendig.

2.1.2.2 Nicht-integrative DNA-Methoden

Zu den *nicht-integrativen DNA-Methoden* zählt unter anderem die Verwendung von Adenoviren und Plasmiden. Diese Methoden haben im Hinblick auf eine Verwendung der Zellen zur Humantherapie den Vorteil, dass die Reprogrammierung theoretisch ohne permanente Modifikation des Genoms der Ausgangszellen erfolgt, dennoch besteht die Möglichkeit, dass die DNA-Vektoren ins Genom integrieren, weswegen entsprechende Kontrollen notwendig sind (Abschn. 2.4). Generell ist die Effizienz der Reprogrammierung mit nicht-integrativen DNA-Methoden deutlich niedriger als mit integrativen. Adenoviren sind unbehüllte, doppelsträngige DNA-Viren. Für die Reprogrammierung wurden vermehrungsunfähige, adenovirale Vektoren verwendet, welche zum Beispiel eine Effizienz von 0,0006 % (3 Kolonien entwickelten sich aus 500.000 Zellen) aufwiesen.⁶¹ Dabei wurden Hepatozyten als Ausgangszellen verwendet, da sie besonders leicht mit Adenoviren infizierbar sind, sodass circa 50–60 % der

⁵⁸Takahashi et al. 2007, S. 861 ff.; Yu et al. 2007, S. 1917 ff.

⁵⁹Takahashi et al. 2007, S. 861 ff.

⁶⁰Gonzalez et al. 2011, S. 231 ff.

⁶¹Stadtfeld et al. 2008, S. 945 ff.

Hepatozyten mit allen vier verwendeten Reprogrammierungsfaktoren (OSKM) gleichzeitig infiziert wurden. Da die verwendeten Vektoren nicht ins Wirtsgenom integrieren und vermehrungsunfähig sind, wird ihr Erbgut bei der Zellteilung nicht vermehrt, sondern zufällig auf die Tochterzellen verteilt. Dadurch werden die Vektoren mit jeder Zellteilung verdünnt und gehen schließlich verloren. Das gleiche Prinzip gilt für Plasmide, die auch als episomale DNA bezeichnet werden. Plasmide sind ringförmige DNA-Moleküle, die außerhalb des chromosomalen Erbgutes, also dem „Haupt“-Erbgut, in Bakterien vorkommen und mehrere Gene enthalten. Für die Reprogrammierung wurden zunächst vermehrungsunfähige Plasmide als Vektor (andere Bezeichnung: episomaler Vektor) verwendet, welche die Gene der Reprogrammierungsfaktoren enthalten und bei den Zellteilungen verloren gehen. Da die konstante Expression der Faktoren über mehrere Tage die Voraussetzung für eine erfolgreiche Reprogrammierung ist, müssen diese Plasmide immer wieder in die Zellen eingebracht werden.⁶² Um diese arbeitsintensive serielle Transfektion zu umgehen und eine stabilere Expression zu erreichen, wurden vom Epstein-Barr Virus abgeleitete Plasmid-Vektoren entwickelt, wodurch eine zum Wirtsgenom synchrone Vervielfältigung stattfindet. Der Vektor wird aber zufällig und gegebenenfalls ungleichmäßig oder fehlerhaft auf die Tochterzellen verteilt, sodass circa 5 % der Plasmide pro Zellteilung verloren gehen. Dies führt dazu, dass nach ungefähr 10 bis 15 Zellteilungen in einem Großteil der Zellen, aber nicht in allen Zellen, keine Plasmide mehr vorhanden sind. Folglich müssen sowohl bei episomalen als auch bei Adenovirus-Vektoren die Beibehaltung der ursprünglichen DNA-Sequenz der Ausgangszelle und die Vektorfreiheit in den entstandenen hiPS-Zellkolonien überprüft werden, um die Sicherheit für eine therapeutische Anwendung zu gewährleisten (Abschn. 2.4.1). Dennoch wurden episomale Vektoren in der ersten klinischen Studie von aus hiPS-Zellen abgeleiteten Zellen verwendet.

2.1.2.3 DNA-freie Methoden

Zu den *DNA-freien Methoden* zählen unter anderem die Verwendung von Vektoren, die auf dem Sendai-Virus basieren und von vollständig Vektor-freien Technologien (synthetische mRNA, Proteine). Eine Integration ins Wirtsgenom ist bei den DNA-freien Methoden ausgeschlossen, da im gesamten Prozess keine DNA verwendet wird. Sie gelten daher momentan als die sicherste Art der Reprogrammierung, wobei die Effizienz der DNA-freien Methoden sehr unterschiedlich ist: Sie reicht von niedrigen (Proteine) bis zu hohen Effizienzen (mRNA, Sendai-Virus). Die einzige Methode, bei der keine Nukleinsäuren in die Ausgangszellen eingebracht werden, stellt die Reprogrammierung mit Proteinen dar. Hierbei wird direkt das benötigte Produkt, also die Transkriptionsfaktoren selbst, in die Zellen eingeschleust statt wie in allen anderen Methoden die kodierenden DNA- oder RNA-Sequenzen. Die Proteine werden dazu mit kurzen Aminosäureketten fusioniert, die ihr Eindringen in eukaryotische Zellen vermitteln. Allerdings ist es technisch schwierig, große Men-

⁶²Gonzalez et al. 2011, S. 231 ff.

gen bioaktiver Proteine, die die Zellmembran durchdringen können, zu synthetisieren. Außerdem ist die Effizienz der Protein-vermittelten Reprogrammierung sehr niedrig.⁶³ Im Gegensatz dazu ist die Effizienz bei der Verwendung synthetischer mRNAs sehr hoch.⁶⁴ Als mRNA wird das einzelsträngige Transkript eines zu einem Gen gehörigen Teilabschnitts der DNA bezeichnet und dient als Vorlage für die Proteinbiosynthese. Verschiedene technische Hürden mussten überwunden werden, um synthetische mRNAs für die Reprogrammierung herzustellen. Unter anderem wurde die *in vitro* Synthese optimiert, die RNA stabilisiert und die Immunogenität, also das Risiko, dass eine Abwehrreaktion des Immunsystems ausgelöst wird, reduziert.⁶⁵ Nach dem Einbringen in die Ausgangszellen ist die synthetischen mRNAs nur für ungefähr 24 h stabil, weswegen die mRNAs täglich neu in die zu reprogrammierenden Zellen eingeschleust werden müssen, um die benötigte stabile Expression über mehrere Tage zu gewährleisten. Da das angeborene Immunsystem von den synthetischen mRNAs aktiviert wird, kommt es zu einer zytotoxischen Wirkung.⁶⁵ Eine Methode um diese immunvermittelte Toxizität zu reduzieren, stellt die vollständige Substitution der natürlichen mRNA-Bausteine mit ähnlichen Bausteinen dar. In Kombination mit der Zugabe eines neutralisierenden Proteins, welches die verbliebene Immunantwort unterdrückt, konnte die Reprogrammierungseffizienz mit synthetischen mRNAs für OSKML auf 4 % erhöht werden.⁶⁶ Der direkte Vergleich des retroviralen Vektors mit synthetischer mRNA bei der Reprogrammierung mit OSKM zeigte, dass mRNA nicht nur effizienter (1,4 % gegen 0,04 %) sondern auch schneller funktionierte (Kolonien nach 13 Tagen statt 24 Tagen).⁶⁷ Aufgrund der Einfachheit, der hohen Effizienz und der nicht vorhandenen Gefahr einer Integration ins Genom, stellt die Reprogrammierung mit synthetischer mRNA eine vielversprechende Technik für therapeutische Anwendungen dar. Da mRNAs ebenso wie Proteine keine Vektorsysteme sind und nach einer kurzen Zeit in den Zellen abgebaut werden, besteht zudem keine Notwendigkeit die generierten hiPS-Zellen auf Vektorfreiheit zu überprüfen. Jedoch muss die synthetische mRNA aufgrund der kurzen Stabilität, ebenso wie Proteine, über mehrere Tage täglich neu in die Zellen eingeschleust werden, was arbeitsintensiv ist. Zudem werden durch die direkte Einbringung der mRNA hohe Konzentrationen an Transkriptionsfaktoren erreicht, die bei der Verwendung von MYC ein onkogenes Risiko darstellen und die Genomstabilität beeinflussen.⁶⁸ Eine weitere DNA-freie Alternative stellt die Verwendung von auf dem Sendai-Virus (SeV) basierenden Vektoren dar. Sendai-Viren sind behüllte Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom aus der Familie der Paramyxoviridae. Seit der ersten Verwendung 1995 wurden auf SeV basierende Vektoren stetig weiterentwickelt. In aktuellen Varianten wurde beispielsweise das Gen des viralen Fusionsproteins deletiert, wodurch die Fähigkeit des Virus mit der

⁶³Takahashi und Yamanaka 2016, S. 183 ff.; Gonzalez et al. 2011, S. 231 ff.

⁶⁴Warren et al. 2010, S. 618 ff.

⁶⁵Bernal et al. 2013, S. 956 ff.

⁶⁶Mandal und Rossi 2013, S. 568 ff.

⁶⁷Warren et al. 2010, S. 618 ff.

⁶⁸Gonzalez et al. 2011, S. 231 ff.

Zellmembran der Wirtszelle zu verschmelzen, verloren geht. Folglich können keine neuen Zellen infiziert werden. Um dennoch eine einmalige Infektion der Ausgangszellen zu ermöglichen, werden die SeV-Vektoren in Zell-Linien produziert, die so verändert wurden, dass sie das fehlende Fusionsprotein produzieren, was zur Bildung einmalig infektiöser SeV-Vektoren führt.⁶⁹ Nach erfolgreicher Reprogrammierung mit SeV-Vektoren muss die virale RNA durch mehrere Passagen aus den Zellen eliminiert werden. Dies kann aufgrund der noch vorhandenen Vermehrungsfähigkeit der RNA schwierig und langwierig sein. Um die Effizienz zu verbessern und den Prozess zu beschleunigen, wurden Mutationen eingefügt, die zu einer Temperatursensitivität führen. Eine Temperaturerhöhung in Form einer mehrtägigen Kultivierung bei 39 °C statt 37 °C führt dann zur Inaktivierung der Genexpression.⁷⁰ Solch verbesserte SeV-Vektoren wurden bereits für die Reprogrammierung verschiedener Ausgangszellen verwendet. Je nach Bedingungen und verwendeten Reprogrammierungsfaktoren kann die Effizienz besser sein als mit retroviralen Vektoren, es wurden beispielsweise Effizienzen von bis zu 1 % mit Fibroblasten erreicht.⁷¹ SeV-Vektoren wurden darüber hinaus zur Gentherapie verschiedener Krankheiten wie zystischer Fibrose klinisch angewandt, da sie eine effiziente Methode zur Einbringung von Genen in verschiedene Zelltypen darstellen.⁷² Der Vorteil bei der Reprogrammierung ist, dass die SeV-Technologie eine hohe Effizienz aufweist, die Ausgangszellen nur einmal transfiziert werden müssen und keine Gefahr der Integration ins Genom besteht. Im Vergleich zur Reprogrammierung mit synthetischer mRNA haben SeV-Vektoren den Nachteil, dass die generierten hiPS-Zellen länger kultiviert werden müssen, um den SeV-Vektor zu eliminieren, was zur Anhäufung genetischer Mutation beitragen kann.⁷³ Zudem müssen die entstandenen hiPS-Kolonien auf Vektorfreiheit überprüft werden (Abschn. 2.4.1).

2.1.2.4 Einschleusen der Reprogrammierungsfaktoren

Während virale Vektorsysteme in der Regel infektiös sind und folglich die Empfängerzellen ohne zusätzliche Hilfsmittel infizieren (Transduktion), müssen sowohl andere Vektorsysteme als auch mRNA (Transfektion) künstlich in die Empfängerzellen eingebracht werden. Dazu stehen unter anderem chemische Verfahren wie Lipofektion, die Verwendung kationischer Polymere und anorganischer Nanopartikel oder physikalische Methoden wie Elektroporation zur Verfügung. Bei der Elektroporation werden kurze Hochspannungsimpulse verwendet, die vorübergehend einen Bruch in der Zellmembran erzeugen, durch den die Nukleinsäure-Moleküle passieren können. Die Elektroporation ist im Allgemeinen effizient und für viele Zelltypen anwendbar, jedoch ist die hohe Mortalitätsrate der Zellen ein limitieren-

⁶⁹ Bernal et al. 2013, S. 956 ff.

⁷⁰ Ban et al. 2011, S. 14234 ff.

⁷¹ Fusaki et al. 2009, S. 348 ff.

⁷² Bernal et al. 2013, S. 956 ff.

⁷³ Gore et al. 2011, S. 63.