

1. Revidierte Ergänzung vom 15. Dezember 2010
(ersetzt die 1. Ergänzung vom 26. Juni 2010)
zur Gemeinsamen Stellungnahme der Fachgesellschaften
DGTI, DGHO und GPOH
zu Genehmigungsverfahren von Stammzellzubereitungen

**„Präklinischer und Klinischer Überblick zum Nachweis
der Funktionalität und Risiken der Stammzellzubereitungen“**

Ergänzung zu den Common Technical Documents
einschließlich Modul 2
zur zentralen Hinterlegung beim Paul-Ehrlich-Institut

Endversion vom 15. Mai 2009

Nur für Mitglieder der o. g. Fachgesellschaften bestimmt

Beteiligte Fachgesellschaften und Arbeitsgemeinschaften

DGTI	Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
DAG-KBT	Deutsche Arbeitsgemeinschaft Knochenmark- / Blutstammzelltransplantation
Päd-AG KBT	Pädiatrische Arbeitsgemeinschaft Knochenmark- / Blutstammzelltransplantation

Federführung und Koordination

**Arbeitsgemeinschaft Genehmigungsverfahren für Stammzellzubereitungen
der DGTI-Sektion „Transplantation und Zelltherapie“**

Verfasser der 1. Revidierte Ergänzung

Prof. Dr. Peter Bader, Universität Frankfurt
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie
PD. Dr. Wolfgang Bethge, Universität Tübingen
Medizinische Universitätsklinik II, Hämatologie/Onkologie
PD Dr. Andreas Humpe, Universität Kiel
II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Sektion für Stammzell- und Immuntherapie
Prof. Dr. Peter Schlenke, Universität Münster
Institut für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie

**Arbeitsgemeinschaft Genehmigungsverfahren für Stammzellzubereitungen
der Sektion „Transplantation und Zelltherapie“
der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie**

Vorsitzender

Prof. Dr. med. Peter Schlenke
Institut für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie
Universität Münster, Vertreter der DGTI

Mitglieder

Prof. Dr. med. Peter Bader
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie
Universität Frankfurt, Vertreter der Päd-AG KBT

Prof. Dr. med. Dietrich Beelen
Klinik für Knochenmarktransplantation
Universität Essen, Vertreter der DAG-KBT

PD Dr. med. Wolfgang Bethge
Medizinische Universitätsklinik II, Hämatologie/Onkologie
Universität Tübingen, Vertreter der DGHO

Frau PD Dr. med. Dilloo
Klinik für Kinderonkologie, -hämatologie und Klinische Immunologie
Universität Düsseldorf, Vertreterin der GPOH

Prof. Dr. med. Hermann Eichler
Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin
Universität des Saarlandes, Vertreter der DGTI

Dr. med. Johannes Fischer
Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
Universität Düsseldorf, Vertreter der DGTI

Frau Dr. med. Kristina Hölig
Medizinische Klinik und Poliklinik I, Transfusionsmedizin
Universität Dresden, Vertreterin der DGHO

PD Dr. med. Andreas Humpe
II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Sektion für Stammzell- und Immuntherapie
Universität Kiel, Vertreter der DGTI

Prof. Dr. med. Rainer Moog
Münchener Blutbank GmbH, Vertreter der DGTI

PD Dr. med. Michael Müller-Steinhardt
DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg Hessen
Universität Heidelberg Fakultät Mannheim, Vertreter der DGTI

PD Dr. med. Torsten Tonn
DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg Hessen
Universität Frankfurt, Vertreter der DGTI

Dr. med. Markus Wiesneth
DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg Hessen
Universität Ulm, Vertreter der DGTI

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung in die Ergänzungen zur Stellungnahme	4
2. Ergänzungen zum Kapitel 1 der Stellungnahme „Einführung in die Thematik“ (Plerixafor)	5
Literatur zu 2.).....	6
Devine SM, Vij R, Rettig M et al. Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using AMD3100, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction. Blood 2008;112:990998.....	6
DiPersio JF, Micallef IN, Stiff PJ et al. Phase III prospective randomized double-blind placebo-controlled trial of plerixafor plus granulocyte colony-stimulating factor compared with placebo plus granulocyte colony-stimulating factor for autologous stem-cell mobilization and transplantation for patients with Non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol 2009;27:4767-4773.....	6
Fruehauf S, Veldwijk MR, Seeger T et al. A combination of granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) and plerixafor mobilizes more primitive peripheral blood progenitor cells than G-CSF alone: results of a European phase II study. Cytotherapy 2009,11:1-10.	6
Martin C, Bridger GJ, Rankin SM. Structural analogues of AMD3100 mobilise haematopoietic progenitor cells from bone marrow in vivo according to their ability to inhibit CXCL12 binding to CXCR4 in vitro. Brit J Hematol 2006;134:326-329.	6
3. Ergänzungen zum Kapitel 2 der Stellungnahme „Produkt“	7
4. Ergänzungen zum Kapitel 4 der Stellungnahme „Klinischer Überblick“ (autolog)	8
Eyrich M., Leiler C., Croner T., Lang P., Schumm M., Mascher B., Schilbach K., Klingebiel T., Handgretinger R. Niethammer D., Schlegel P.G. (2004). Impaired T-cell activation and cytokine productivity after transplantation of positively selected CD34+ allogeneic hematopoietic stem cells.Hematol J 5:329-340.....	31
5. Formale Ergänzungen bzw. Korrekturen	34

1. Einführung in die Ergänzungen zur Stellungnahme

Im Rahmen der gesetzlich (AMG) vorgeschriebenen Genehmigungsverfahren für Stammzellzubereitungen ist eine Aktualisierung der Gemeinsamen Stellungnahme in Form einer Ergänzung erforderlich geworden, um den Inhalt dem aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik anzugleichen und weiteren Auflagen und Nachforderungen des Paul-Ehrlich-Institut, die im Rahmen der Prüfung der Gemeinsamen Stellungnahme oder durch einzelne Antragsteller (pharmazeutischer Unternehmer) benannt wurden, zu genügen.

Diese Ergänzung versucht Antworten insbesondere auf Fragen zur klinischen Wirksamkeit und Unbedenklichkeit von allogenen Stammzellzubereitungen, die im Kontext einer Transplantation mit einem HLA-mismatch bzw. haploidenten Spender durch immunmagnetische Selektions- bzw. Depletionsverfahren manipuliert werden, zu geben (Kapitel 4) und umfasst auch eine vergleichende Gegenüberstellung der in-vitro Verfahren zur T-Zelldepletion und zur pharmakologischen Prophylaxe (in-vivo) einer Graft versus Host Disease (GVHD-Reaktion). Eine abschließende Beurteilung ist nach heutigem Stand von Wissenschaft und Technik nicht möglich und bedarf gegebenenfalls einer erneuten Revision der Gemeinsamen Stellungnahme entsprechend des zukünftigen Erkenntnisgewinnes.

Die 1. revidierte Ergänzung (15. Dezember 2010) zur Gemeinsamen Stellungnahme (Endversion 08.05.09) wird erneut durch die zentrale Hinterlegung beim Paul-Ehrlich-Institut dafür Sorge tragen, dass sich Mitglieder der für die Erstellung verantwortlichen Fachgesellschaften im Rahmen ihrer Genehmigungsverfahren auf diese Dokumentation beziehen können.

2. Ergänzungen zum Kapitel 1 der Stellungnahme „Einführung in die Thematik“ (Plerixafor)

Endversion 08.05.2009: Kapitel 1.3 Stammzellbiologie Seite 10, Absatz 3, 2. Satz

Zitat *„Ihr zukünftiger Stellenwert in der klinischen Routine bleibt abzuwarten.“*

Durch die Ergänzung (Juni 2010) wird dieser Absatz wie folgt ergänzt:

Zitat: *„Dabei hat Plerixafor (Mozobil®) inzwischen eine Zulassung in Kombination mit der Gabe von G-CSF zur Verbesserung der Mobilisation hämatopoietischer Stammzellen ins periphere Blut zur Entnahme und anschließenden autologen Transplantation bei Patienten mit Lymphom oder multiplem Myelom, die nicht ausreichend mobilisieren.“*

Endversion 08.05.2009: Kapitel 2.1 Gewinnung Seite 14, Absatz 3

Durch die Ergänzung (Juni 2010) wird der 3. Absatz wie folgt ergänzt:

Zitat: *„Bei Patienten, die mittels Chemotherapie und/oder Gabe von G-CSF nicht ausreichend Stammzellen ins periphere Blut mobilisieren, steht inzwischen der CXCR4-Rezeptor Antagonist Plerixafor (Mozobil®) zur Verfügung. Plerixafor blockiert die Wechselwirkung zwischen CXCR4 und dem stromal cell-derived factor (SDF1) (Martin C et al, Br J Haematol 2006, 134: 326).*

Bereits im Jahr 2005 konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass die Mobilisation hamatopoetischer Stammzellen mittels Kombination von G-CSF und Plerixafor einer alleinigen Mobilisation mit G-CSF sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Patienten überlegen ist (Devine SM et al, Blood 2008, 112: 990, Liles WC et al. Transfusion 2005, 45 : 295; Flomenberg N, et al. Blood 2005, 106: 1867). Entscheidende Daten für die Zulassung wurden 2009 publiziert. In einer prospektiv randomisierten, plazebo-kontrollierten, doppelt-geblindeten Phase III Studie (Di Persio et al, JCO 2009, 27: 4767) konnte bei Patienten mit NHL gezeigt werden, dass in der Plerixaforgruppe signifikant mehr Patienten die für eine Transplantation benötigte Stammzellmenge(CD34+ Zelldosis) mit weniger Apheresen erreichten. Dabei war die Kombination von G-CSF und Plerixafor gut verträglich. Plerixafor wird subkutan in einer täglichen Dosis von 0,24mg/kg Körpergewicht des Patienten gegeben. In der Studie wurden insgesamt 135 Patienten aus der Plerixafor- und 84 Patienten aus der Plazebo-Gruppe transplantiert. Dabei zeigten alle Patienten ein initiales Engraftment der neutrophilen Granulozyten. Gemessen am langfristigen Engraftment 12 Monate nach Transplantation zeigten 2 Patienten in der Plerixafor- und kein Patient in der Plazebo-Gruppe ein Transplantatversagen, wobei die Ursache dafür offen ist. In einer zweiten Phase III Studie (Micallef IN, et al. Biol Blood Marrow Transpl 2009, 15:1578) Laboraten zeigen, (Fruehauf et al, Exp Hematol. 2006 Aug;34(8):1052-9), dass Plerixaformobilisierte Stammzellen hinsichtlich ihres genetischen Profils vermehrt Gene exprimieren, die ein besseres Engraftment fördern sollten. Diese Daten wurden dadurch ergänzt, dass Plerixafor-

mobilisierte Stammzellen einen „primitiveren“ Phänotyp (CD34+ CD38-; 0,9% (G-CSF) versus 2,6% (G-CSF + Plerixafor) aufweisen), was auch mit entsprechenden Ergebnissen in sogenannten „long-term culture“ Untersuchungen bestätigt werden konnte (Fruehauf et al, 2009, Cytotherapy).

Literatur zu 2.)

Devine SM, Vij R, Rettig M et al. Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using AMD3100, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction. *Blood* 2008;112:990998.

DiPersio JF, Micallef IN, Stiff PJ et al. Phase III prospective randomized double-blind placebo-controlled trial of plerixafor plus granulocyte colony-stimulating factor compared with placebo plus granulocyte colony-stimulating factor for autologous stem-cell mobilization and transplantation for patients with Non-Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol* 2009;27:4767-4773.

Flomenberg N, Devine SM, DiPersio JF et al. The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood* 2005;106:1867-1874.

Fruehauf S, Seeger T, Maier P et al. The CXCR4 antagonist AMD3100 releases a subset of G-CSF-primed peripheral blood progenitor cells with specific gene expression characteristics. *Exp Hematol* 2006;34:1052-1059.

Fruehauf S, Veldwijk MR, Seeger T et al. A combination of granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) and plerixafor mobilizes more primitive peripheral blood progenitor cells than G-CSF alone: results of a European phase II study. *Cytotherapy* 2009,11:1-10.

Liles WC, Rodger E, Broxmeyer HE et al. Augmented mobilization and collection of CD34+ hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Transfusion* 2005;45:295-300.

Martin C, Bridger GJ, Rankin SM. Structural analogues of AMD3100 mobilise haematopoietic progenitor cells from bone marrow in vivo according to their ability to inhibit CXCL12 binding to CXCR4 in vitro. *Brit J Hematol* 2006;134:326-329.

3. Ergänzungen zum Kapitel 2 der Stellungnahme „Produkt“

Endversion 08.05.2009: Kapitel 2.2 Prozessierung Seite 17, Absatz 3, 1. Satz

Zitat: „Aus dem Transplantat mittels CD3 Depletion entfernte Lymphozyten können für Spenderlymphozyten-Transfusionen in Frage kommen und sollten dann kryokonserviert werden.“

Durch diese Ergänzung (Juni 2010) wird dieser Satz ersatzlos gestrichen.

Endversion 08.05.2009: Kapitel 2.3 Seite 19, dritter Absatz, Zeilen 5-8

Zitat: „Das Erythrozytensediment liegt bei Stammzellzubereitungen aus peripherem Blut mittels Zytapherese und bei eingengtem Knochenmarkblut in der Regel unter 10% (Volumenprozent)...“

Durch diese Ergänzung (Juni 2010) wird „unter 10%“ ersetzt durch „bei $5 \pm 3\%$ “.

Endversion 08.05.2009: Kapitel 2.3 Seite 20, zweiter Absatz, Zeilen 6-9

Zitat: „Es wird eine möglichst hohe Reinheit an CD34+ Zellen angestrebt (> 90%); aufgrund des sehr unterschiedlichen CD34+ Zellgehaltes des Ausgangsproduktes (z.B. 0,1 bis 5%) variiert der relative Anteil im Sinne der erzielbaren Reinheit im Endprodukt zwischen 50 und nahezu 100%.“

Durch diese Ergänzung (Juni 2010) wird dieser Satz gestrichen und wie folgt ersetzt:

Zitat: „Es wird eine möglichst hohe Reinheit an CD34+ Zellen angestrebt ($85 \pm 15\%$); dies entspricht einem Bereich von 70-100%. In Einzelfällen kann diese Spezifikation herstellungsbedingt oder durch einen sehr niedrigen, relativen CD34+ Zellanteil nicht erreicht werden.“

Endversion 08.05.2009: Kapitel 5.1 Anlage 1 (DMSO), Seite 15 von 36

Zitat: „Die im Rahmen der Kryokonservierung von Blutstammzellen unterschiedlicher Quellen üblicherweise genutzten DMSO-Endkonzentrationen von bis zu 10% sowie die üblichen Expositionszeiten der Zellen mit DMSO vor dem Beginn des Einfriervorganges von 1-2 Stunden sind für die Proliferationsfähigkeit der Blutstammzellen jedoch nachweislich unbedenklich (66; 70).“

Durch diese Ergänzung (Juni 2010) wird dieser Satz gestrichen und wie folgt ersetzt:

Zitat: „Der Einfluss von DMSO auf die Teilungsfähigkeit (Koloniebildung) von hämatopoetischen Stammzellen aus humanem Knochenmark wurde *in vitro* untersucht. Nach Inkubation frisch gewonnener Zellen in 5 oder 10 w/w% DMSO-Lösung bis zu 1 h war die Koloniebildung nicht vermindert. Auch die verzögerte (bis zu 1 h) Entfernung von DMSO nach dem Auftauen kryokonservierter Zellen erwies sich als nicht toxisch (66). Mit 10 w/w% kryokonservierte Knochenmarkzellen konnten nach dem Auftauen in 8 w/w% DMSO-Lösung mindestens 2 h ohne negativen Effekt auf die Koloniebildung aufbewahrt werden. Allerdings ist bekannt, dass die Ergebnisse der *in vitro* Koloniebildung nur schlecht mit der *in vivo* Angehrate der Transplantate korrelieren (70).“

4. Ergänzungen zum Kapitel 4 der Stellungnahme „Klinischer Überblick“ (autolog)

Mit Beschreibung des CD34 Antigens als Stammzellepitop 1984 und der Generierung spezifischer CD34-Antikörper beginnen Arbeiten zur Charakterisierung und Aufreinigung CD34+ hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen (Civin & Small 1995). Die Rationale zur Verwendung autologer CD34 selektionierter Stamm-zellen basiert auf zwei Hauptargumenten:

- Im Rahmen von Therapiekonzepten mittels Hochdosischemotherapie und/oder Radiatio werden gesunde CD34+ Stammzellen angereichert, um einer Verringerung von potentiell kontaminierenden Tumorzellen im Transplantat (sog. „Purging“-Verfahren) ermöglichen.
- Im Rahmen von schweren Autoimmunerkrankungen erhofft man sich eine geringere Rezidivrate durch Neuprägung des Immunsystems aus CD34 positiven Stammzellen und eine möglichst vollständige Elimination autoimmuner Zellen.

Der Antitumoreffekt der allogenen Stammzelltransplantation kommt hierbei nicht zum Tragen.

Primäres Zielkriterium für den Wirksamkeitsnachweis autolog gewonnener, gegebenenfalls selektionierter CD34+ Stammzellen im Rahmen der bundesweit anstehenden Genehmigungsanträge für Stammzellzubereitungen ist das erfolgreiche hämatopoetische Engraftment und sekundär die vollständige und dauerhafte Rekonstitution des Immunsystems.

Die vergleichende und bewertende Beurteilung der langfristigen Therapieerfolge in Abhängigkeit zum autologen Transplantat (unselektioniert oder selektioniert) kann nicht Gegenstand dieser Gemeinsamen Stellungnahme sein und ist sehr differenziert, insbesondere in Kontext zur Grunderkrankung und zum Remissionsstadium vorzunehmen. Seit den 90er Jahre gibt es eine Vielzahl prospektiven Studien und retrospektiven Analysen zum Stellenwert des autologen Stammzelltherapiekonzeptes. In „pubmed“ werden ca. 300 Literaturstellen benannt. Die Gemeinsame Stellungnahme erhebt nicht den Anspruch - einem Lehrbuch entsprechend - hämatologische Krankheitsbilder und deren „state of the art“ Therapiekonzepte systematisch zu kommentieren.

Brenner et al. konnten mittels Genmarkierung bei akuten myeloischen Leukämien den Nachweis erbringen, dass Tumorzellen aus dem Graft zur Rezidiventstehung beitragen (Brenner et al., 1993). Erste Erfahrungen mit „graft“ Manipulationen im Sinne eines „ex vivo purging“ von kontaminierenden Tumorzellen wurden Anfang der 90er Jahre publiziert (Lebkowski et al., 1992; Brugger et al. 1994, Gee 1995, Shpall et al. 1994). Sowohl Shpall et al. als auch Brugger et al. konnten bereits 1994 nachweisen, dass die hämatologische Rekonstitution mit einem CD34 positiv-selektionierten autologen Stammzelltransplantat (Periphere Blut, Knochenmark) nach einer Hochdosischemotherapie identisch ist zur Rekonstitution nach Transplantation mit unmanipuliertem Transplantat.

Im pädiatrischen Bereich ist insbesondere die Publikation von Lang et al. (1999) zu nennen, die über den erfolgreichen Einsatz eines CD34 positiv-selektionierten Transplantats im autologen Setting bei 34 Kindern berichtet. Erst kürzlich berichteten darüber hinaus Kasow et al. (2007) für das St. Jude Hospital in Memphis über deren Erfahrungen wieder bei Kindern mit einem CD34 positiv-selektionierten Präparaten entweder aus Knochenmark (n=131) oder periphere Blutstammzellen (n=237). Alle Patienten hatten ein erfolgreiches Engraftment ohne therapieassoziierte Mortalität.

Initial publizierten Gorin et al. (1995) erfolgreiche hämatopoetische Rekonstitutionen nach CD34 Aufreinigung aus Knochenmark in einem Kollektiv von Non-Hodgkin-Lymphom Patienten. Später berichteten auch Dreger et al. (1999) über 20 Lymphompatienten, die ein CD34 positiv-selektioniertes Transplantat nach einer Hochdosischemotherapie erhielten. Alle Patienten hatten ein erfolgreiches Engraftment. 2005 wurde wiederum bei 48 Lymphompatienten ebenfalls über eine erfolgreiche autologe CD34 positiv-selektionierte Transplantation berichtet (Imai et al. 2005).

Auch in der Behandlung von Patienten mit Multiplen Myelom (Plasmazytom) wurde eine autologe Stammzelltransplantation mit CD34 positiv-selektionierten Stammzelltransplantaten erprobt. Lemoli et al. (2010) berichteten über insgesamt 31 Patienten die mit CD34 positiv-selektionierten Stammzellen autolog transplantiert wurden. Ähnliche Ansätze verfolgten die Studien von Barbui et al.(2002) bei 30

Patienten und Stewart et al. (2001) an 93 Patienten jeweils im randomisierten Vergleich mit unmanipulierten Stammzellpräparaten zur Behandlung des Multiplen Myeloms. Alle Studien zeigten ein rasches Engraftment und eine gute Immunrekonstitution und Transplantatfunktion nach CD34 selektionierter Transplantation ohne signifikante Unterschiede zu unmanipulierten Transplantationen.

Allerdings konnte kein eindeutiger signifikanter klinischer Langzeiteffekt im Sinne eines erfolgreichen Transplantatpurgings, also eine geringere Rezidivrate nach CD34-Selektion festgestellt werden. Diese Ergebnisse wurden 2007 noch einmal in einer EBMT-Studie bestätigt, die an 111 Patienten randomisiert ein CD34-selektioniertes Transplantat mit einem unmanipulierten Transplantat in der autologen Hochdosistherapie bei Multiplen Myelom verglich (Bourhis et al. 2007). Wieder zeigte sich die Gleichwertigkeit beider Verfahren hinsichtlich der hämatologischen Rekonstitution, aber kein „benefit“ hinsichtlich der Rezidivquote. Wie bereits aufgeführt wurde die CD34-Selektion auch häufiger zur autologen Hochdosistherapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom eingesetzt. Yanovich et al. (2000) konnten ein erfolgreiches autologes Engraftment bei insgesamt 48 Patienten zeigen und verglichen die Ergebnisse mit 44 Patienten ohne Stammzellselektion. Wiederum zeigte sich kein Unterschied im Engraftment oder Transplantationsergebnis.

Auch zur Therapie von Autoimmunerkrankung werden CD34 positiv-selektionierte Stammzellen seit Jahren eingesetzt. Moore et al. (2002) publizierten den Einsatz CD34 positiv-selektionierter Stammzellen zur Hochdosistherapie mit Cyclophosphamid und anschließender autologer Transplantation zur Behandlung schwerer therapierefraktärer rheumatoider Arthritis. 33 Patienten wurden in die zweiarmsige Studie eingeschlossen und zwischen unmanipuliert versus CD34 positiv-selektioniert randomisiert. Alle Patienten „engrafteten“ rasch und hatten eine unkomplizierte Rekonstitution ihres Immunsystems. Im Ansprechen auf die Behandlung wurde jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Transplantationsmethoden gefunden. Wenig später folgten auch Berichte über die Erprobung einer autologen HSZT bei Patienten mit multipler Sklerose. Carreras et al. (2003) berichteten über 15 Patienten mit fortgeschrittener Multipler Sklerose, die eine autologe HSZT mit CD34-selektioniertem Transplantat erhielten. Das Engraftment und die hämatologische Erholung waren bei allen Patienten rasch und unkompliziert. Es zeigte sich eine klinische Besserung der Erkrankung bei 3 und eine Stabilisierung bei 9 Patienten. Diese vermeintlichen Therapieerfolge sind hier jedoch nicht weiter Gegenstand der Betrachtung. Ni et al. (2006) berichteten über 21 Patienten mit Multipler Sklerose die ebenfalls autolog mit CD34-selektionierten Stammzellen transplantiert wurden. Wiederum zeigte sich ein rasches und stabiles Engraftment. Das progressionsfreie Überleben lag bei 75%, das Erkrankungsaktivität-freie Überleben bei 33%. Auch bei der Systemischen Sklerose wird die autologe CD34-selektionierte HSZT eingesetzt. Vonk et al. (2008) berichteten z.B. über den Verlauf von 26 Patienten mit Sklerodermie, die nach einer Konditionierung mit Cyclophosphamid ein CD34-selektioniertes autologes Transplantat erhielten. Die hämatologische Rekonstitution war unproblematisch, 81% der Patienten „profitierten“ von der Therapie. Statkute et al. (2007) fassten die Erfahrungen der Northwestern University Chicago mit autologer Stammzelltransplantation bei Autoimmunerkrankungen zusammen und berichteten über 130 CD34 positivselektionierten Transplantationen bei verschiedenen Erkrankungen. Wiederum zeigte sich eine rasche hämatologische und immunologische Rekonstitution.

Zusammenfassung und Nutzen-Risiko Bewertung: Die angeführte Studien sind nur ein repräsentativer Ausschnitt der verfügbaren Erfahrung mit CD34 selektionierten autologen Stammzelltransplantaten. Zusammenfassend zeigt sich bei allen Studien eine rasche und dauerhafte Rekonstitution der Hämatopoese und nachfolgend auch des zellulären Immunsystems. Damit erfüllen auch CD34 positiv-selektionierte Transplantate alle Anforderungen die an die Wirksamkeit eines Stammzelltransplantats als Arzneimittel gestellt werden. In der Nutzen-Risikoabschätzung sind CD34-selektionierte Präparate genauso zur hämatologischen Rekonstitution geeignet wie unmanipulierte Stammzellpräparate. Sie stellen somit hinsichtlich der vollständigen Rekonstitution der Hämatopoese kein zusätzliches Risiko für die zu transplantierenden Patienten dar.

Trotz erheblicher Anstrengungen in den letzten 20 Jahren fehlt der Nachweis reproduzierbarer und signifikanter Überlebensvorteile für Patienten, die ein CD34 positivselektioniertes Transplantat im Sinne einer Tumorzellentfernung (purging“) oder zur Rezidivvermeidung bei Autoimmunerkrankungen erhalten haben. Darüber hinaus fehlen für viele Entitäten, größere prospektive, randomisierte Studien.

Literatur zu 4.)

Barbui AM, Galli M, Dotti G, Belli N, Borleri G, Gritti G, Bellavita P, Viero P, Comotti B, Barbui T, Rambaldi A. Negative selection of peripheral blood stem cells to support a tandem autologous transplantation programme in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2002; **116**:202-210.

Bourhis JH, Bouko Y, Koscielny S, Bakkus M, Greinix H, Derigs G, Salles G, Feremans W, Apperley J, Samson D, Bjorkstrand B, Niederwieser D, Gahrton G, Pico JL, Goldschmidt H. Relapse risk after autologous transplantation in patients with newly diagnosed myeloma is not related with infused tumor cell load and the outcome is not improved by CD34+ cell selection: long term follow-up of an EBMT phase III randomized study. *Haematologica* 2007; **92**:1083-1090.

Brenner MK, Rill DR, Moen REC et al. Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. *Lancet* 1993; **341**: 85-86.

Brugger W, Henschler R, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Positively selected autologous blood CD34+ cells and unseparated peripheral blood progenitor cells mediate identical hematopoietic engraftment after high-dose VP16, ifosfamide, carboplatin, and epirubicin. *Blood* 1994; **84**:1421-1426.

Carreras E, Saiz A, Marin P, Martinez C, Rovira M, Villamor N, Aymerich M, Lozano M, Fernandez-Aviles F, Urbano-Ispizua A, Montserrat E, Graus F. CD34+ selected autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple sclerosis: report of toxicity and treatment results at one year of follow-up in 15 patients. *Haematologica* 2003; **88**:306-314.

Civin CI, Small D. Purification and expansion of human hematopoietic stem/progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci* 1995; **770**:91-98.

Dreger P, Viehmann K, von Neuhoff N, Glaubitz T, Petzoldt O, Glass B, Uharek L, Rautenberg P, Suttorp M, Mills B, Mitsky P, Schmitz N. Autografting of highly purified peripheral blood progenitor cells following myeloablative therapy in patients with lymphoma: a prospective study of the long-term effects on tumor eradication, reconstitution of hematopoiesis and immune recovery. *Bone Marrow Transplant* 1999; **24**:153-161.

Gee A. Purging of peripheral blood stem cell grafts. *Stem Cells* 1995; **13 Suppl 3**:52-62.

Gorin NC, Lopez M, Laporte JP et al. Preparation and successful engraftment of purified CD34+ bone marrow progenitor cells in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1995; **85**: 1647-1654

Imai Y, Chou T, Tobinai K, Tanosaki R, Morishima Y, Ogura M, Shimazaki C, Taniwaki M, Hiraoka A, Tanimoto M, Koike T, Kogawa K, Hirai H, Yoshida T, Tamura K, Kishi K, Hotta T. Isolation and transplantation of highly purified autologous peripheral CD34+ progenitor cells: purging efficacy, hematopoietic reconstitution in non-Hodgkin's lymphoma (NHL): results of Japanese phase II study. *Bone Marrow Transplant* 2005; **35**:479-487.

Lang P, Schumm M, Taylor G, Klingebiel T, Neu S, Geiselhart A, Kuci S, Niethammer D, Handgretinger R. Clinical scale isolation of highly purified peripheral CD34+progenitors for autologous and allogeneic transplantation in children. *Bone Marrow Transplant* 1999; **24**:583-589.

Lebkowski JS, Schain LR, Okrongly D, Levinsky R, Harvey MJ, Okarma TB. Rapid isolation of human CD34 hematopoietic stem cells--purging of human tumor cells. *Transplantation* 1992; **53**:1011-1019.

Moore J, Brooks P, Milliken S, Biggs J, Ma D, Handel M, Cannell P, Will R, Rule S, Joske D, Langlands B, Taylor K, O'Callaghan J, Szer J, Wicks I, McColl G, Passetullo F, Snowden J. A pilot randomized trial comparing CD34-selected versus unmanipulated hemopoietic stem cell transplantation for severe, refractory rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; **46**:2301-2309.

Ni Xs, Ouyang J, Zhu WH et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: report of efficacy and safety three year of follow up in 21 patients. *Clin Transplant* 2006; **20**:484-489.

Shapll EJ, Jones RB, Bearman SI et al. Transplantation of enriched CD34-positive autologous marrow into breast cancer patients following high-dose chemotherapy: influence of CD34-positive peripheral blood progenitors and growth factors on engraftment. *J Clin Oncol* 1994; 12:28-36.

Statkute L, Verda L, Oyama Y, Traynor A, Villa M, Shook T, Clifton R, Jovanovic B, Satkus J, Loh Y, Quigley K, Yaung K, Gonda E, Krosnjar N, Spahovic D, Burt RK. Mobilization, harvesting and selection of peripheral blood stem cells in patients with autoimmune diseases undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; **39**:317-329.

Stewart AK, Vescio R, Schiller G, Ballester O, Noga S, Rugo H, Freytes C, Stadtmauer E, Tarantolo S, Sahebi F, Stiff P, Meharchard J, Schlossman R, Brown R, Tully H, Benyunes M, Jacobs C, Berenson R, White M, DiPersio J, Anderson KC, Berenson J. Purging of autologous peripheral-blood stem cells using CD34 selection does not improve overall or progression-free survival after high-dose chemotherapy for multiple myeloma: results of a multicenter randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2001; **19**:3771-3779.

Vonk MC, Marjanovic Z, van den Hoogen FH et al. Long-term follow up results after autologous haematopoietic stem cell transplantation for severe systemic sclerosis. *Ann Rheum dis* 2008;67:98-104.

Yanovich S, Mitsky P, Cornetta K, Maziarz RT, Rosenfeld C, Krause DS, Lotz JP, Bitran JD, Williams S, Preti R, Somlo G, Burtness B, Mills B. Transplantation of CD34+ peripheral blood cells selected using a fully automated immunomagnetic system in patients with high-risk breast cancer: results of a prospective randomized multicenter clinical trial. *Bone Marrow Transplant* 2000; **25**:1165-1174.

4. Ergänzungen zum Kapitel 4 der Stellungnahme „Klinischer Überblick“ (allogen)

Das Konzept der allogenen Stammzelltransplantation (HSZT) ist eine wissenschaftlich anerkannte und in mehr als 500 Einrichtungen Europas etablierte Therapieoption (siehe EBMT-Report), insbesondere bei hämatologischen Erkrankungen, soliden Tumoren und angeborenen genetischen Defekten der Hämatopoese und des Immunsystems. Als Quellen stehen hämatopoetische Stammzellen aus peripherem Blut, Knochenmark und mit Einschränkung (primär wegen der begrenzten Zelldosis) aus Nabelschnurblut zur Verfügung.

Für die Mehrzahl der erkrankten Patienten stehen heutzutage immungenetisch kompatible Spender zur Verfügung; hierunter werden prinzipiell in den wichtigsten HLA-Systemen (HLA-A, -B, -C, -DR und DQ) idente Spender verstanden:

- 10/10 match Familienspender (ca. 25%)
- 10/10 match unverwandter Spender (ca. 50%)

Für ca. 25% der Patienten steht heutzutage kein geeigneter 10/10 HLA-identer Spender zur Verfügung. Dies gilt umso mehr für ethnische Minderheiten oder wenn eine zeitraubende Spendersuche aufgrund einer Rezidiv- oder Hochrisikosituation aufgrund der Erkrankung des Patienten nicht abgewartet werden kann. Auch für diese Patientenkollektive soll die allogene Stammzelltransplantation ermöglicht werden. Weil bei diesen Patienten sonst keine Transplantation durchgeführt werden würde, ist der schlichte Vergleich mit einem akzeptierten „Standard“ (hier 10/10 „perfect-match“ Situation) weder ethisch statthaft noch therapeutisch zielführend. Diese Ergänzung versucht im weiteren Verlauf auf die Besonderheiten der HLA-mismatch bzw. haploidenten Stammzelltransplantation umfassend und nachvollziehbar einzugehen.

Die Erweiterung der Stammzellspenderdateien einerseits und die Ermöglichung von Stammzelltransplantationen trotz HLA-Disparitäten andererseits sind seit zirka 10 Jahren die vorrangigen Ziele, um auch diesen Patienten eine Heilungschance zu ermöglichen. Gegenwärtig werden folgende potentielle Spender zur allogenen Stammzelltransplantation erwogen, soweit kein 10/10 Spender zur Verfügung steht:

- (8-)9/10 match unverwandter Spender
- 6-9/10 match Familienspender (haploidente Transplantation)
(in der Regel ist ein Elternteil verfügbar; evtl. mit weiteren zufälligen HLA Übereinstimmungen)
- Alternativ: Nabelschnurblut (unverwandt, bis zu 2 HLA-Abweichungen akzeptiert)

Auf weitere Besonderheiten der Immungenetik und der Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut wird im Rahmen dieser Stellungnahme nicht eingegangen. Es sei darauf hingewiesen, dass die zu diskutierenden immunmagnetischen Selektionsverfahren vorrangig in

Verbindung mit der haploidentischen Stammzelltransplantation zur Anwendung kommen, aber auch in der Situation einer Empfänger-Spender-HLA-Konstellation von weniger als 9/10 Übereinstimmungen.

Die Transplantation von allogenen Stammzellen ist das „zelluläre Element“ einer sehr komplexen Behandlungsstrategie, die insbesondere auch die initiale Therapie der Grunderkrankung (Radio-/Chemotherapie) und die Konditionierungstherapie einschließlich der Option eines reduzierten Konditionierungsregime sowie - bei fehlender T-Zelldepletion des Transplantats - auch eine starke Immunsuppression nach Transplantation umfasst.

Die jeweilige therapeutische „Feinjustierung“ ist hierbei komplex und wird patientenindividuell vorgenommen; unter anderem finden neben der Entität der zugrundeliegenden Erkrankung der Remissionsstatus des Patienten, das Alter, die toxikologische und infektiöse Komplikationen und Dringlichkeit zur Transplantation Berücksichtigung.

Die Transplantation von allogenen Stammzellen dient primär der Rekonstitution einer gesunden und dauerhaften Hämatopoese, die die ausreichende Bildung von reifen Blutzellen aller Blutzelllinien gewährleistet. Die kurzfristige, hämatopoetische Rekonstitution wird mit dem Terminus eines primären „Engraftment“ (Anwachsen) nach Transplantation gleichgesetzt und durch das dauerhafte Überschreiten einer Neutrophilenzahl von $> 500/\mu\text{l}$ und einer Thrombozytenzahl von $> 20.000/\mu\text{l}$ im peripheren Blut ausgedrückt. Darüber hinaus wurde in der allogenen Stammzelltransplantation, insbesondere in der haploidentischen Situation ein sog. primäres Transplantatversagen („graft failure“) beobachtet. Dieser Begriff ist zumindest dahingehend irreführend, da häufig nicht die zelluläre Zusammensetzung des Transplantates sondern vielmehr durch die Konditionierungstherapie nicht eliminierte zytotoxische T-Lymphozyten des Empfängers für diese Abstoßungsreaktion verantwortlich gemacht werden können. Viele der Patienten mit fehlendem primärem Engraftment können durch eine Zweittransplantation oder Stammzellboost doch noch erfolgreich hämatologisch rekonstituieren (sekundäres Engraftment).

Stammzellen aus peripherem Blut, die nach Mobilisierung mittels Wachstumsfaktoren in einer bis zu 10-fach höheren Konzentration gesammelt werden können als Knochenmarkstammzellen spielen bei der Überwindung der HLA-Barriere eine wesentliche Rolle (sog. „Megadosis“-Konzept) (Bachar-Lustig et al., 1995, Reisner et al., 1999, Handgretinger et al., 2001; Reisner et al., 2005; Aversa et al., 2008; Dvorak et al. 2008) .

Die Transplantation von allogenen Stammzellen dient sekundär auch der Rekonstitution des Immunsystems des Empfängers, die die ausreichende Bildung von immunkompetenten Zellen (NK-Zellen und T- und B-Lymphozyten) zur dauerhaften Abwehr von Bakterien, Viren, Pilzen und anderen Pathogenen gewährleistet. Die immunologische Rekonstitution benötigt wesentlich mehr Zeit als die primäre hämatopoetische Rekonstitution und wird zumeist mit dem Durchschreiten des unteren Normwertbereiches gleichgesetzt. Die Generierung von immunkompetenten T-Lymphozyten aus hämatopoetischen Stammzellen (Thymusreifung in Abhängigkeit zur Intensität der Konditionierungstherapie) nach Transplantation darf nicht verwechselt werden mit dem zellulären Kompartiment

akzessorischer Zellen, das mit dem allogenen Stammzelltransplantat und in Abhängigkeit mit dem jeweils gewählten immunmagnetischen Selektionsverfahren, kotransplantiert wird.

Im Rahmen der haploidentischen Stammzelltransplantation kommen unterschiedliche immunmagnetische Selektionsverfahren (MACS-Technologie der Firma Miltenyi Biotec) zur Anwendung, die prinzipiell dem gleichen Ziel dienen, nämlich der effizienten Entfernung von T-Lymphozyten, um hämatopoetische Stammzellen in einer Reinheit herzustellen, die deren primäres Anwachsen und eine dauerhafte hämatopoetische Rekonstitution im Empfängerorganismus gewährleistet.

- CD34 Positivselektion hämatopoetischer Stammzellen zur indirekten Entfernung von T- und B-Lymphozyten
- CD133 Positivselektion hämatopoetischer Stammzellen zur indirekten Entfernung von T- und B-Lymphozyten
- CD3 CD19 Depletion zur direkten Entfernung von T- und B-Lymphozyten

Alle drei immunmagnetischen Verfahren sind in der Lage T-Lymphozyten effizient zu entfernen. Eine Reduktion um mindestens 3log-Stufen wird angestrebt, um im Regelfall die Einhaltung bzw. Unterschreitung einer kritischen Grenze von zirka $1 \times 10^5/\text{kg KG}$ zu erreichen. In Abhängigkeit zur initialen T-Lymphozytenlast im Stammzelltransplantat und der Qualität des immunmagnetischen Verfahrens ist mit Einschränkung eine Grenze von $1 \times 10^5/\text{kg KG}$ realistisch, wenn auch nicht immer erreichbar. Die Qualität dieser in-vitro Manipulation ist nur ein Bestandteil zur Sicherung der Qualität der zugrunde liegenden allogenen Stammzelltherapie; hingewiesen sei hier auf die Möglichkeit der Durchführung und Steuerung einer zusätzlichen immunsuppressiven Therapie und auf die Beimengung von Stammzellen nach CD34 Positivselektion mit sehr niedriger T-Zelllast. Der optimale T-Zellkonzentrationsbereich im Kontext zum jeweiligen Therapiekonzept ist nach dem heutigen Stand von Wissenschaft und Technik noch nicht abschließend definiert.

Die drei immunmagnetischen Verfahren sind in der Lage effizient B-Lymphozyten zu entfernen. Dies verhindert das Auftreten einer bei T-Zelldepletion gehäuft vorkommenden EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankung (Cavazzana-Calvo *et al.*, 1998). Eine Reduktion um 3log-Stufen wird angestrebt, um im Regelfall keine signifikante B-Lymphozytenpopulation ($<0.1\%$) nachweisen zu können; dies entspricht in der Regel der Unterschreitung einer Grenze von $1 \times 10^5/\text{kg KG}$.

Die drei immunmagnetischen Verfahren unterscheiden sich in der zusätzlichen Entfernung akzessorischer Zellen aus allogenen Stammzellzubereitungen. So führt die CD34 und CD133 Positivselektion zu einer Abreicherung aller anderen Zellpopulationen (Monozyten, Natürliche Killerzellen, Dendritische Zellen). Diese Zellpopulationen bleiben bei der CD3/CD19 Depletion im Stammzelltransplantat als akzessorische Zellen erhalten und könnten für das primäre hämatopoetische Engraftment, die Immunrekonstitution und den graft-versus-tumour (GvT)-Effekt eine Bedeutung haben. Diese zusätzliche therapeutische Funktionalität ist augenblicklich Gegenstand klinischer Studien und beeinflusst weder das primäre Therapieziel noch würde die primäre Wirksamkeit hämatopoetischer Stammzellen (hämatopoetische Rekonstitution) in allogenen

Stammzellzubereitungen, die zur Zeit in der Bundesrepublik Deutschland zur Genehmigung durch die Bundesoberbehörde anstehen und Gegenstand der gutachterlichen Stellungnahme sind, hierdurch in Frage gestellt.

Generell liegen eine Vielzahl von Phase II Studien und Fallsammlungen zu den verschiedenen in vitro Aufbereitungsverfahren vor, aber keine kontrollierten, randomisierten Studien. Dies ist vor allem darin begründet, dass das Hauptanwendungsgebiet die HLA-mismatch und haploidente Stammzelltransplantation darstellt. Mismatch und haploidente Stammzelltransplantation werden deshalb nur bei wenigen Patienten an ausgewählten Transplantationszentren durchgeführt. Meist handelt es sich zudem um fortgeschrittene und ausgedehnt vorbehandelte Patienten ohne alternative Therapieoption. Dies macht die Durchführung großer kontrollierter und randomisierter Studie schwer bis unmöglich. Patienten, die mit den hier besprochenen Verfahren behandelt werden haben keinen anderen verfügbaren Spender. Zusätzlich ist eine Randomisierung zu einer Transplantation ohne in vitro Aufbereitung bzw. medikamentösen Verfahren zur T-Zelldepletion aufgrund der zu erwartenden schweren GVHD als unethisch zu betrachten (Anasetti *et al.*, 1990). Im Weiteren sollen nun die bisherigen klinische Erfahrungen und Studienergebnisse zu den verschiedenen in vitro Aufbereitungsverfahren zusammengefasst werden und eine Bewertung der in vitro Methoden im Vergleich zu alternativen medikamentösen Verfahren zur T-Zelldepletion erfolgen:

CD34 Selektion

Mit Beschreibung des CD34 Antigens als Stammzellepitop und der Generierung spezifischer Antikörper gegen CD34 beginnen Arbeiten zur spezifischen Anreicherung und Aufreinigung CD34 positiver Stammzellen (Civin and Small, 1995). Erste Erfahrungen wurden insbesondere mit einer CD34 Aufreinigung zum ex vivo purging von das Transplantat kontaminierenden Tumorzellen bei autologen HSZT gesammelt (Lebkowski *et al.*, 1992; Brugger *et al.*, 1994; Gee, 1995). Nachfolgend wurde die CD34-Selektion durch die T-Zelldepletion im Rahmen von allogenen Stammzelltransplantationen ersetzt (Lane *et al.*, 1995; Dreger *et al.*, 1995). Von Beginn an wurden hierbei zwei verschiedene Anwendungen verfolgt: T-Zelldepletion zur Ermöglichung einer Transplantation über HLA-Barrieren hinweg im mismatch/haploidenten Setting und T-Zelldepletion zur Minderung des GVHD-Risikos bei HLA-identen Familien- oder Fremdspendertransplantationen. Primär wurden unterschiedliche Methoden wie E-Rosetting, Antikörperbeladung (z.B. CD52), Immunadsorption (CellPro) und später die immunmagnetische Selektion per ISOLEX 300i und CliniMACS eingesetzt (Chakrabarti *et al.*, 2003). Letztere Methode ermöglicht die effizienteste T-Zelldepletion und hat sich als in vitro Aufreinigungsmethode weitgehend durchgesetzt (Lang *et al.*, 1999; Schumm *et al.*, 1999; Ringhoffer *et al.*, 2004).

Haploidente und HLA-mismatch Stammzelltransplantation

Die ersten Versuche zur Durchführung einer mismatch/haploidenten HSZT waren bedingt durch den ausgeprägten HLA-Unterschied (bis zu 50%) komplikationsreich mit einer hohen Inzidenz an GVHD, Transplantatabstoßung und infektiösen Komplikationen, die zu einer inakzeptabel hohen Rate an therapieassoziierten Morbidität und Mortalität führte (Anasetti *et al.*, 1990).

Sowohl Transplantatabstoßung als auch GVHD werden primär von Empfänger- und Spender-T-Zellen vermittelt. Strategien diese HLA-Barrieren zu überwinden haben sich deshalb auf effektive Verfahren zur Empfänger- und Spender-T-Zell-Depletion konzentriert. Eine Strategie zur erfolgreichen Durchführung einer haploidenten HSZT wurde von Bachar-Lustig et al. in enger Kollaboration mit der Gruppe von Aversa in Perugia entwickelt. Sie konnten zunächst in Mäusen (Bachar-Lustig *et al.*, 1995) und später im Menschen zeigen, dass die Abstoßung von T-zelldepletiertem Knochenmark im haploidenten Bereich durch eine massive Erhöhung der Stammzelldosis auf eine „Megadosis“ von CD34-positiven Zellen (d.h. in der Regel $\geq 10 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kgKG) verhindert werden kann. Durch eine in vitro CD34 Selektion zunächst durch E-Rosetting, später mittels immunmagnetischer Selektion wurde gleichzeitig zur CD34-Anreicherung eine ausgeprägte T-Zelldepletion um mehrere Log-Stufen möglich. Hierdurch wird eine mismatch/haploidente HSZT erst ohne schwere GVHD möglich. Erste klinische Studien mit diesem Verfahren begannen 1993, nachdem durch die Einführung von hämatopoietischen Wachstumsfaktoren (G-CSF) die Sammlung einer Megadosis von CD34 positiven Stammzellen möglich wurde (Aversa *et al.*, 1994). Die Arbeitsgruppe in Perugia veröffentlichte hierzu eine Vielzahl von Publikationen, die die Machbarkeit, Sicherheit und Ergebnisse dieses Ansatzes eindrücklich zeigen (Aversa *et al.*, 1994; Aversa *et al.*, 1998; Aversa *et al.*, 2001a; Aversa *et al.*, 2001b; Aversa *et al.*, 2002; Aversa *et al.*, 2005; Aversa, 2008; Aversa *et al.*, 2008).

Zusammenfassend sollen hier die Daten eines aktuellen Update aus dem Jahr 2008 von insgesamt 255 Patienten dargelegt werden (Aversa *et al.*, 2008). Dieses Verfahren setzt eine intensive Konditionierung mit einer Ganzkörperbestrahlung, kombiniert mit einer Chemotherapie mit Cyclophosphamid, Thiothepa und Fludarabin sowie die Gabe von Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) zur in-vivo T-Zelldepletion ein. Anschließend erfolgt die Gabe einer Megadosis ($> 10 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg) von hochangereicherten CD34 positiven Stammzellen vom haploidenten Spender. Aufgrund der T-Zelldepletion ($< 2 \times 10^4$ CD3+ Zellen/kg) ist eine haploidente HSZT auch ohne Posttransplantations-Immunsuppression durchführbar. Mit diesem Verfahren wird primär bei 95% ein erfolgreiches Angehen des Transplantats erreicht. Engraftment mit > 500 Neutrophile/ μ L (im peripheren Blut) erfolgte innerhalb im Median 9 (mit G-CSF) bzw. 12 Tage (ohne G-CSF). Das Verfahren erlaubt eine erfolgreiche haploidente HSZT mit einer niedrigen akute GVHD-Rate von 5-17% und einem erfolgsversprechendem 3-Jahresüberleben von 25-50%, sofern die Patienten in kompletter Remission ihrer akuten Leukämie transplantiert werden.

Ähnlich gute Ergebnisse wurden auch von anderen Arbeitsgruppen insbesondere auch aus der Pädiatrie berichtet. Ciceri et al. publizierten 2008 die Ergebnisse eines EBMT-Surveys zu den Ergebnissen einer haploidenten HSZT mit CD34-Selektion (Ciceri *et al.*, 2008). Evaluiert wurden 266 Patienten nach haploidenter HSZT. Die mediane CD34-Dosis/kg KG im Transplantat (G-CSF mobilisierte periphere Blutstammzellen) lag bei 10×10^6 für AML und 11.9×10^6 für ALL-Patienten. Die mediane T-Zelldosis im Transplantat lag jeweils bei nur 1×10^4 CD3+/kg KG. Ein primäres Engraftment wurde bei 91% der Patienten im Median für die Neutrophilen nach 12 Tagen beobachtet. Eine akute GVHD \geq II wurde bei nur 5% der Patienten beobachtet. Dagegen war das Patienten-Outcome eher enttäuschend. Das leukämiefreie 2-Jahres-Überleben war stark abhängig vom Erkrankungsstadium

und erreichte bei Patienten mit AML in CR1 48% und ALL in CR1 19%. Die therapieassoziierte Mortalität dieser Patientengruppe lag bei zirka 40%.

Handgretinger et al. evaluierten eine haploidente HSZT bei Kindern ohne HLA-identen Spender (Handgretinger et al., 2001). 39 Patienten wurden von einem Familienspender mit HLA-Mismatch nach immunmagnetischer CD34-Selektion und einer Megadosis CD34-positiver Zellen (Mittelwert $20.7 \times 10^6 / \text{kg KG}$) zur Behandlung verschiedener hämatologischer Erkrankungen transplantiert. Primäres Engraftment wurde bei 92% der Patienten mit im Median 11 Tage bis zu Neutrophilen $>500 / \mu\text{L}$ beobachtet. Akute GVHD $\geq \text{II}$ wurde bei lediglich einem Patienten beobachtet. Nach 2 Jahren waren 38% der Patienten ohne Erkrankung und am Leben. Die gleiche Arbeitsgruppe publizierte ähnliche Erfahrungen auch für die Durchführung einer allogenen HSZT zur Behandlung nicht-maligner Erkrankungen. Lang et al. berichtete 2004 über 25 Patienten, die ein CD34-selektiertes Transplantat entweder vom passenden Familienspender ($n=4$), vom Fremdspender mit teilweise vorhandenem HLA-Mismatch ($n=14$) und Familienspender mit HLA-Mismatch ($n=8$) erhielten (Lang et al., 2004b). Ein erfolgreiches primäres Engraftment erfolgte bei 84% der Patienten nach im Median 11 Tagen. Die Inzidenz von akuter GVHD $\geq \text{II}$ war 8% und das Gesamtüberleben nach im Median 3.7 Jahren betrug 88%.

In einer kürzlich publizierten Register-Studie der EBMT wurden die Ergebnisse von 127 haploidenten HSZT überwiegend mit einer CD34-Selektion (97/102 Patienten) bei Kindern mit einer akuten lymphoblastischen Leukämie zusammengefasst (Klingebiel et al., 2010). Ein erfolgreiches Engraftment wurde bei 91% der Patienten mit einem neutrophilen Engraftment (>500 Neutrophile/ μL) im Median an Tag 15 gesehen. Für die in kompletter Remission transplantierten Patienten war das Leukämiefreie Überleben nach 5 Jahren 27% und die nicht-Rezidiv-bedingte Mortalität 37%.

Eine Studie vergleicht prospektiv die Immunrekonstitution nach CD34-Selektion und mismatch/haploidenter HSZT mit derer von HLA-identen, mit unmanipuliertem Knochenmark transplantierten Patienten. Eyrich et al. beobachten dabei nach CD34-Selektion eine um etwa 100 Tage verspätete T-Zellrekonstitution mit einem auch dann noch deutlich dezimierten T-Zell-Rezeptor-Repertoire (Eyrich et al., 2004). Die Rekonstitution naiver T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen war vergleichbar.

Zusammenfassend erlaubt eine T-Zelldepletion (i.d. R. $\leq 1 \times 10^5$ CD3+ Zellen/kgKG) durch CD34-Selektion und die Gabe einer Megadosis (i.d.R. definiert als $\geq 10 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kgKG) auch im mismatch und haploidenten Setting eine erfolgreiche allogene HSZT bei Patienten, die ansonsten keine andere potentiell kurative Therapieoption hätten. Das Engraftment liegt unter Beachtung dieser Kriterien in der Regel $>90\%$ und erfolgt rasch und ausdauernd. Die T-Zellrekonstitution erfolgt jedoch verspätet. Die Inzidenz und der Schweregrad auftretender GVHD sind niedrig. Die beobachteten Gesamtergebnisse in diesen Hochrisikokollektiven entsprechen etwa denen, die mit einem HLA-„gematchten“ unverwandten Spender erreichbar wären. Es ist davon auszugehen, dass unter der Maßgabe neuester Therapiekonzepte und besonderen klinischen Umständen (u.a. Körpergewicht)

das klassische „Megadosiskonzept“ verlassen werden kann und auch niedrigere Stammzell Dosen (z.B. 8×10^6 CD34+ Zellen/kgKG) akzeptabel sein können.

HLA-idente Stammzelltransplantation

Aufgrund des überwiegenden Einsatzes einer CD34-Selektion bei Hochrisikopatienten für eine GVHD oder in einer Mismatch-Situation gibt es wie oben erwähnt keine randomisierte Studien zum Einsatz einer CD34-Selektion im Vergleich zu unmanipulierten Stammzellen. Urbano-Ispizua et al. berichteten 1997 über eine Phase I/II Studie in 20 Patienten die bei unterschiedlichen hämatologischen Neoplasien eine allogene HSZT nach einer myeloablativen Konditionierung mit einem per CellPro Ceparate SC System CD34-selektiertes Transplantat von einem HLA-kompatiblen Familienspender erhielten (Urbano-Ispizua *et al.*, 1997). Die Studie zeigte ein rasches und stabiles Engraftment. Zur Immunsuppression erhielten die Patienten Ciclosporin A und Methylprednisolon. Es wurden keine Fälle einer Grad II-IV akuten oder chronischen GVHD beobachtet. Mit 7.5 Monaten Follow-up lebten 16 von 20 Patienten mit einer Remission ihrer Erkrankung. Wenig später berichtete die gleiche Arbeitsgruppe über die Immunrekonstitution nach einer solchen Transplantation im Vergleich zu einem unmanipulierten Transplantat (Martinez *et al.*, 1999). Initial wurden in der CD34-selektierten Gruppe eine niedrigere CD4+/CD3+ und TCR-gamma/delta+ Frequenz beobachtet. Nach 8 Monaten verhielten sich beide Gruppen gleich. Die Rekonstitution von B-, CD8+ T- und NK-Zellen zeigte keine weiteren Unterschiede.

Cornelissen et al. publizierten 2003 einen prospektiven, randomisierten Vergleich zwischen einer Transplantation von jeweils CD34-selektierten peripheren Stammzellen und Knochenmark im HLA-identen Bereich (Cornelissen *et al.*, 2003). In diese Studie wurden 120 Patienten eingeschlossen und randomisiert. 10 Patienten fielen vor Transplantation aus verschiedenen Gründen (vorzeitiger Tod=2, Rezidiv=6, Patientenwunsch=1, misslungene Stammzellmobilisierung=1) aus der Studie. 54 Patienten erhielten eine Transplantation mit CD34-selektiertem Knochenmark (KM), während 56 Patienten mit CD34-selektierten peripheren Stammzellen (PB) transplantiert wurden. Allerdings kamen in dieser Studie zwei unterschiedliche in-vitro Aufbereitungsverfahren zum Einsatz: bei 87 Patienten erfolgte die CD34 Selektion über Immunadsorption mit dem CellPro-System, bei 22 Patienten immunmagnetisch mit dem CliniMACS-System. Mit dem CliniMACS System ist eine deutlich reinere CD34-Selektion im Vergleich zum nicht mehr auf dem Markt befindlichen CellPro-System zu erreichen. Alle Patienten erhielten eine intensive Konditionierung mit TBI/Cy oder Bu/Cy. Alle Patienten erhielten Ciclosporin A zur Immunsuppression. Die mit peripheren Stammzellen transplantierte Kohorte erhielt signifikant mehr T-Zellen (Median: 3.0 versus 2.0×10^5 /kg, $p < 0.0001$) und CD34-Zellen (Median: 3.6 versus 0.9×10^6 /kg, $p < 0.0001$) mit dem Transplantat. Das Engraftment war in beiden Gruppen erfolgreich mit einer wie erwartet etwas längeren Zeit bis zum Engraftment nach einer Transplantation mit Knochenmark (Mediane Tage bis zu $>500/\mu\text{L}$ Neutrophilen 15 mit peripheren Stammzellen versus 20 Tage mit Knochenmark, $p=0.001$). Das Engraftment der Thrombozyten war im Median 25 (PB) versus 38 (KM) Tage nicht signifikant unterschiedlich. Engraftment-Versagen wurde primär bei einem Patienten nach PBSZT und sekundär bei einem Patienten mit KMT berichtet. Die Zahl der transplantierten CD34+ Stammzellen korrelierte positiv mit

Neutrophilen- und Thrombozyten-engraftment. Die Inzidenz akuter GVHD II-IV war in der PBSZT-Kohorte mit 52% höher als bei der KM-Kohorte mit 37% und direkt verknüpft mit der höheren Zahl der transplantierten T-Zellen im Transplantat. Mit einem medianen Follow-up von 3 Jahren war das geschätzte Gesamtüberleben nach 4 Jahren in der KM-Kohorte mit 60% signifikant besser als 34% in der PBSZT-Kohorte ($p=0.04$). Der Unterschied war hauptsächlich durch die erhöhte Therapie bedingte Mortalität und GVHD-Inzidenz in der PBSZT-Kohorte mit Patienten bedingt, die mehr als 2×10^5 CD3+ T-Zellen im Transplantat erhielten. Dies wiederum war insbesondere bei Patienten ($n=38$) die ein mittels Immunadsorption (CellPro) aufgereinigtes Transplantat und PBSZT ($n=42$) erhielten der Fall.

Jakubowski et al. berichtete 2007 über eine Studie mit 52 erwachsenen Patienten mit verschiedenen malignen hämatologischen Erkrankungen, die ein Transplantat von einem HLA-identen Familienspender erhielten, das mittels des ISOLEX-System CD34-angereichert und somit T-Zelldepletiert wurde (Jakubowski et al., 2007). Es wurde keine weitere GVHD-Prophylaxe im Sinne einer Posttransplantationsimmunsuppression angewandt. Alle Patienten zeigten ein erfolgreiches Engraftment und es trat nur bei 8% der Patienten eine GVHD mit maximalem Grad II und bei 9% der Patienten eine chronische GVHD auf. Das erkrankungsfreie Überleben nach 3 Jahren lag bei 61%.

Auch im pädiatrischen Bereich wurde eine CD34-Selektion zur Prophylaxe einer GVHD bei einer PBSZT vom unverwandten Spender evaluiert. Lang et al. berichtet über 31 Patienten mit Leukämien, die mit CD34-immunmagnetisch selektionierten Stammzellen und ohne zusätzliche Immunsuppression transplantiert wurden (Lang et al., 2003). 15 Patienten hatten einen komplett HLA-„gematchten“ Spender, 16 Patienten 1 oder 2 Antigen-Mismatches. Primäres Engraftment erfolgte bei 83% der Patienten mit im Median 11 Tagen bis >500 Neutrophile/ μL . Die Inzidenz akuter GVHD \geq II lag bei 10%, für chronische GVHD 7%. Das 2-Jahresgesamtüberleben lag bei 38%. Im Vergleich zu einer historischen Kontrollgruppe ohne CD34-Selektion zeigten sich vergleichbare Ergebnisse bei geringerer GVHD-Inzidenz.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass nach CD34-Selektion im HLA-identen Setting das hämatopoetische Engraftment nicht eingeschränkt ist und sich vergleichbar zu unmanipulierten Stammzellzubereitungen verhält. Ebenso erfolgt auch regelhaft eine komplette Immunrekonstitution. Die Inzidenz der GVHD ist eng abhängig von verwendeter Immunsuppression und T-Zelldosis im Transplantat. Als Grenze für die T-Zelldosis erscheint ein Schwellenwert von 1×10^5 CD3+ T-Zellen/kg Körpergewicht als noch akzeptabel. Bei ausreichender T-Zelldepletion kann die Inzidenz der GVHD deutlich gesenkt werden und sogar auf eine Immunsuppression nach Transplantation verzichtet werden.

CD3/CD19 Depletion

Haploidente und HLA-mismatch Stammzelltransplantation

Die oben für eine haploidenten HSZT beschriebene intensive Konditionierungstherapie schließt ältere, komorbide und stark vorbehandelte Patienten von dieser Therapie aus. Die Nicht-Rückfall-assoziierte

Mortalität (NRM) ist auch bei jüngeren Patienten (medianes Alter 29 Jahre) mit 41% sehr hoch (Aversa *et al.*, 2008). Diese hohe Mortalität ist insbesondere durch die langsame Immunrekonstitution nach sehr effizienter T-Zelldepletion mittels CD34-Selektion mit entsprechend schwerwiegenden Infekt komplikationen und den therapieassoziierten Toxizitäten bedingt. Weiterhin ist eine Megadosis CD34+ Stammzellen bei Kindern durch ihr geringes Körpergewicht leicht zu erreichen, stellt jedoch bei Jugendlichen und Erwachsenen ein erhebliches Problem dar. Werden Stammzell Dosen unter 10×10^6 CD34+ Zellen/kgKG verwendet, steigt die Rate an Transplantatabstoßungen und das Angehen des Transplantats und die Immunrekonstitution ist stark verzögert (Lang *et al.*, 2004a). Hiervon kann nach heutigem Stand von Wissenschaft und Technik nur im Einzelfall begründet abgewichen werden, so z.B. mit 8×10^6 CD34+ Zellen/kgKG bei sehr ungünstiger Körpergewichtskonstellation und fehlender therapeutischer Alternative.

Für eine erfolgreiche Transplantation bei stark vorbehandelten, komorbiden oder älteren Patienten sowie ohne erfolgreiche Gewinnung einer Megadosis von CD34 positiven Stammzellen wurden in den letzten Jahren unterschiedliche Strategien verfolgt. Wie bei der HSZT bei HLA-identen Spendern wird hier insbesondere der Einsatz einer dosisreduzierten Konditionierung erprobt. Durch Arbeitsgruppen in Tübingen und Frankfurt wurde bei Kindern und Erwachsenen hierzu eine neue Form der Transplantataufarbeitung, die immunmagnetische Depletion von CD3/CD19 positiven Zellen durchgeführt. Ein solches selektiv T- und B-Zell depletiertes Transplantat, enthält in großer Zahl NK-Zellen, Granulozyten, Monozyten, antigenpräsentierende Zellen und vermutlich auch im geringeren Umfang CD34 negative Stammzellen. Diese Zellpopulationen sollen als sogenannte "facilitating cells" hämatopoetisches Engraftment und Immunrekonstitution verbessern. Die T- und B-Zelldepletion ist, wie oben beschrieben, zur Verhinderung einer schweren GVHD und von EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen geeignet. Durch das verbesserte Engraftment eines solchen CD3/CD19 depletierten Transplantats wird der Einsatz einer dosisreduzierten Konditionierung auch ohne Megadosis von CD34-positiven Stammzellen möglich. In Phase II Studien bei Patienten mit sehr fortgeschrittenen hämatologischen Erkrankungen wurde diese Strategie zur haploidenten HSZT bei Kindern wie auch Erwachsenen eingesetzt (Bethge *et al.*, 2006; Bethge *et al.*, 2008; Lang & Handgretinger, 2008). Die Patienten erhielten eine dosisreduzierte Konditionierung mit Fludarabin (150-200 mg/m²), Thiotepa (10 mg/kg), Melphalan (120 mg/m²) und OKT-3 (5 mg/Tag, Tag -5 bis +14). Anschließend erfolgte die Transplantation eines CD3/CD19 depletierten Transplantats.

Federmann *et al.* berichtete kürzlich über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie bei 60 erwachsenen Patienten (Federmann *et al.*, 2009). Alle Patienten hatten eine Hochrisikoerkrankung oft mit Rückfall nach vorangegangener autologer oder allogener HSZT. Nur die Hälfte der Patienten hatte zum Zeitpunkt der HSZT eine komplette Remission der Erkrankung. Das mediane Alter der Patienten lag bei 45 Jahren (Bereich: 19 - 65 Jahre) und somit fast eine Dekade älter als in den oben erwähnten Studien zur haploidenten HSZT nach CD34 Selektion. Alle Patienten erhielten ein CD3/CD19 depletiertes haploidenten Transplantat mit einer hohen Anzahl von NK-Zellen aber eine ausreichende T- und B-Zelldepletion. Die median applizierte CD34-Dosis im Transplantat lag bei $6,8 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg, die mediane CD3-Dosis bei $4,0 \times 10^4$ CD3+ Zellen/kg. Das Anwachsen des Transplantats

war rasch mit einer medianen Zeit bis >500 Granulozyten/ μL von 12 Tagen und >20.000 Thrombozyten/ μL von 11 Tagen. Diese Strategie ermöglichte ein erfolgreiches Engraftment selbst bei Patienten mit einer Stammzelldosis von nur 3.5×10^6 CD34+Zellen/kg und somit ohne Megadosiskonzept. Bei Erwachsenen betrug die nicht-Rückfall-assoziierte Mortalität in den ersten 100 Tagen 25%. Die Inzidenz einer akuten GVHD Grad II-IV lag bei 47% und für die chronischer GVHD bei 15%. Die GVHD Inzidenz ist aufgrund höheren T-Zelldosis in einem CD3/CD19 depletierten Transplantat höher als bei den oben beschriebenen Daten zur haploidenten HSZT nach CD34-Selektion aber nicht höher als bei Standard-HSZT im HLA-identen Setting. Das Gesamtüberleben der äusserst fortgeschrittenen und stark vorbehandelten Patienten dieser Studie lag bei 30% mit einem medianen Follow-up von knapp unter 2 Jahren.

Bei Kindern berichtete Lang et al. über ähnliche Ergebnisse bei 36 Patienten mit einem medianen Alter von 11 Jahren (Lang *et al.*, 2010). Ein primäres Engraftment wurde bei 89% der Patienten beobachtet mit im Median 10 Tagen bis zum Neutrophilen-Engraftment ($>500/\mu\text{L}$). Eine akute GVHD I-II trat bei 54% der Patienten und GVHD III bei 8% der Patienten auf. Therapie-assoziierte Mortalität war 0% bis zu Tag 100 und 8% nach einem Jahr. Für Patienten, die in CR erstmalig transplantiert wurden, lag das 2 Jahres Ereignisfreie Überleben bei 66%, bei Zweittransplantation bei 30%. Gonzalez-Vicent et al. veröffentlichten kürzlich einen Vergleich von 21 Patienten mit einer mismatch/haploidenten HSZT; in 9 Fällen wurde eine CD34-Selektion des Transplantats und bei 12 Patienten eine CD3/CD19 Depletion durchgeführt (Gonzalez-Vicent *et al.*, 2010). Diese Kohorte wurde mit Patienten mit einem HLA-identen Spender und einem CD34-selektionierten Transplantat verglichen. In der Patientenkohorte der CD3/CD19 depletierten Transplantate wurde ein rascheres Erreichen eines kompletten Chimerismus und Thrombozyten-Engraftments (Tage bis >20.000 Thrombozyten/ μL 11 versus 14 Tage) im Vergleich zu der CD34-selektionierten Gruppe beobachtet. Außerdem zeigte die CD3/CD19 depletierte „Kohorte“ eine raschere Rekonstitution der NK-Zellen aber auch etwas mehr akute GVHD. Im klinischen Ergebnis waren beide Gruppen vergleichbar.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine CD3/CD19 Depletion eine ausreichende T- und B-Zelldepletion ermöglicht, um erfolgreich eine mismatch/haploidente HSZT durchzuführen. Im Vergleich zur CD34-Selektion sind die Daten zum hämatopoetischen Engraftment und zur Immunrekonstitution mindestens gleichwertig, wenn nicht besser. Eine CD3/CD19 Depletion erscheint ein rascheres Engraftment mit weniger CD34-positiven Zellen auch nach einer dosisreduzierten Konditionierung zu ermöglichen. Prospektive vergleichende Studien (CD3/CD19-depletierte zu CD34-selektionierten Transplantaten) liegen bisher nicht vor. Die Entscheidung welches dieser beiden Verfahren zur Transplantataufbereitung zum Einsatz kommt hängt insbesondere von Erfahrung und Präferenz des jeweiligen Transplantationszentrums und dem angewandten Therapie- bzw. Studienprotokolls ab. Die derzeitig zur Verfügung stehenden Daten lassen keine nähere Empfehlung zur Auswahl des Selektions- bzw. Depletionsverfahrens zu und überlassen die Entscheidung der therapeutischen Freiheit des behandelnden Transplantationsmediziners.

HLA-idente Stammzelltransplantation

Eine CD3/CD19 Depletion wird derzeit nur sehr selten im HLA-identen Setting eingesetzt. Eissens et al. berichteten kürzlich über einen Vergleich der Immunrekonstitution bei Patienten, die an einer prospektiven, randomisierten Studie zum Vergleich CD3/CD19 Depletion versus CD34 Selektion in der allogenen HSZT von einem HLA-identen Spender teilnahmen (Eissens *et al.*, 2010). Klinische Ergebnisse dieser Studie liegen noch nicht vor. Im Vergleich der Immunrekonstitution zeigte sich eine raschere und bessere Rekonstitution insbesondere der NK-Zellen in der CD3/CD19 depletierten Kohorte aber kein Unterschied in der sonstigen Engraftmentkinetik.

CD133 Selektion

Seit Anfang der 90-er Jahre des letzten Jahrhunderts wird CD133 als alternativer Stammzellmarker zu CD34 beschrieben (Kobari *et al.*, 2001). Zunächst wurde *in vitro* und im Tierversuch gezeigt, dass CD133 wie CD34 positive Stammzellen die Eigenschaft des „self-renewal“ und der geforderten Repopulationsfähigkeit von multipotenten hämatopoietischen Stammzellen zeigen. Bald darauf wurde CD133 als Antigen zur Positivselektion von hämatopoietischen Stammzellen klinisch eingesetzt. Eine Vielzahl kleinerer Studien belegt eine Einsetzbarkeit und Äquivalenz von CD133- zur CD34-Selektion. 2003 berichtete Gordon et al. über die erste im klinischen Maßstab durchgeführten CD133-Selektionen mit ausreichendem Engraftment im Tierversuch (Gordon et al., 2003). Lang et al. berichtete dann 2004 über die ersten 10 Patienten, die mit einer Kombination aus CD34 und CD133 selektionierten Stammzellen transplantiert wurden. Der Anteil der CD133-selektionierten Stammzellen wurde dabei langsam von 10-100% gesteigert, ohne einen nachteiligen Effekt auf das hämatopoetische Engraftment zu beobachten (Lang et al., 2004a). Bitan et al. publizierten 2005 die ersten 5 Patienten, die erfolgreich haploid mit einem CD133-selektionierten Stammzellpräparat transplantiert wurden. Das Engraftment war rasch mit im Median 10 Tagen zum Neutrophilen-Engraftment ($>500/\mu\text{L}$) und 12 Tagen zum Thrombozyten-Engraftment ($>20.000/\mu\text{L}$) (Bitan et al., 2005). Schliesslich verglich Lang et al. 2005 in jeweils kleinen Patientenkohorten alle drei bisher dargestellten Aufreinigungsmethoden. Eine haploidente HSZT wurde bei 39 Patienten nach CD34-Selektion, bei 14 Patienten nach CD133-Selektion und bei 11 Patienten nach CD3/CD19 Depletion durchgeführt (Lang et al., 2005). Das primäre Engraftment war mit 85% nach CD34-Selektion, 72% nach CD133-Selektion und 92% nach CD3/CD19-Depletion vergleichbar. In der CD3/CD19-Gruppe wurde eine etwas höhere Inzidenz an GVHD aber auch eine raschere T-Zellrekonstitution beobachtet. Darüber hinaus berichteten Bornhäuser et al. über eine Patientenkohorte von 10 Patienten, die zu 100% ein primäres Engraftment nach Transplantation von $2,6$ bis $12,2 \times 10^6$ CD133 zeigten (Bornhäuser et al., 2005).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine CD133-Selektion äquivalente Ergebnisse im hämatopoetischen Engraftment und Immunrekonstitution im Vergleich zu einer CD34-Selektion ermöglicht. Eine Aussage über die Wertigkeit und Anwendungsgebiete der beiden Selektionsmethoden untereinander kann durch die bisher vorliegenden Studien nicht getroffen werden, wenn auch die Erfahrungen mit einer CD34-Selektion wesentlich umfangreicher sind. Die Entscheidung ob eine CD34-Selektion oder eine CD133 Selektion durchgeführt wird ist hauptsächlich abhängig von der

Präferenz und Erfahrung des jeweiligen Transplantationszentrums oder des durchgeführten Behandlungs- bzw. Studienprotokolls.

Alternative pharmakologische Methoden zur T-Zelldepletion bei mismatch/haploidenter HSZT

Lange Jahre war die Notwendigkeit der oben beschriebenen Methoden zur in-vitro T-Zelldepletion im Rahmen einer erfolgreichen haploidenten HSZT ein Paradigma. In den letzten Jahren wurde jedoch auch zunehmend über Protokolle berichtet, die eine erfolgreiche haploidente HSZT auch mit pharmakologischen Methoden zur T-Zelldepletion und insbesondere dem Einsatz von unmanipulierten Knochenmark allein oder in Kombination mit peripheren Stammzellen ermöglichen.

Luznik et al. berichtete 2008 über die erfolgreiche Durchführung haploidenter HSZT durch den Einsatz von unmanipuliertem Knochenmark als Transplantat kombiniert mit einer intensiven Immunsuppression mit Cyclophosphamidgaben in einer Dosis von 50 mg/kg an Tag 3 und/oder 4 nach Stammzellgabe und Tacrolimus und Mycophenolat Mofetil (Luznik et al., 2008). Cyclophosphamid dient dabei zur Depletion nach Transplantation expandierender alloreaktiver T-Zellen. Zur Konditionierung wurde 14,5 mg/kg/Tag Cyclophosphamid an Tag -6 und -5, Fludarabine 30 mg/m²/Tag an den Tagen -6 bis -2, und 200 cGy Ganzkörperbestrahlung an Tag -1 angewandt. Luznik et al. berichtet über 68 Patienten mit Hochrisikoerkrankungen, die mit diesem Protokoll behandelt wurden. Die Autoren berichten über eine Inzidenz von 13% Transplantatversagen und einer Inzidenz akuter GVHD II-IV von 40%. Die Inzidenz einer extensiven chronischen GVHD lag nach einer nur einmaligen Cyclophosphamidgabe nach Transplantation bei 25%. Die nicht rezidivbedingte Mortalität nach 1 Jahr lag bei 15% und die Rezidivquote bei 51%. Das 2-Jahres gesamt- und ereignisfreies Überleben lag bei 36% und 26%. (Brodsky et al. aus der gleichen Arbeitsgruppe berichtet ebenfalls 2008 über 3 Patienten mit nicht-malignen hämatologischen Erkrankungen, die mit diesem Protokoll behandelt wurden. 2 der 3 Patienten überstanden die Transplantation erfolgreich und hatten ein stabiles Engraftment ohne schwere GVHD (Brodsky et al., 2008).

Burroughs et al. berichtet über einen retrospektiven Vergleich an 90 Patienten einer allogenen HSZT von haploidenten Spendern mittels des oben dargestellten Verfahrens mit einer Transplantation vom passenden Familien- und Fremdspender bei Patienten mit einem therapierefraktären Hodgkin-Lymphom. Das Ergebnis nach einer haploidenten HSZT war dem der beiden herkömmlichen Verfahren zumindest gleichwertig (Burroughs et al., 2008).

Van Rood berichtete 2002 über den positiven Einfluss eines „noninherited maternal antigen“ (NIMA haplotype) Mismatch auf den Ausgang haploidenter Transplantationen ohne in-vitro T-Zelldepletion (Van Rood et al. 2002). Bestätigt wurde diese Beobachtung in einer Registerstudie aus Japan von Ichinohe et al. der 2004 über 35 Patienten berichtete, die eine haploidente HSZT von einem NIMA-mismatch Spender erhielten (Ichinohe et al., 2004). Die angewandte Konditionierung und Immunsuppression war heterogen. Alle Patienten rekonstituierten hämatopoetisch erfolgreich. Die Inzidenz für akute GVHD Grad II-IV lag bei 56% und die einer chronischen GVHD bei 57%.

Ebenfalls in Japan wurde von Ogawa et al. gezeigt, dass eine haploidente HSZT auch mit alleiniger konventioneller pharmakologischer GVHD Prophylaxe möglich ist. In dieser Studie erhielten 30 Patienten eine sehr intensive Immunsuppression mit Tacrolimus, Methotrexat, Mycophenolate Mofetil und hochdosierten Steroiden (Ogawa et al., 2008). Elf Patienten (36.7%) entwickelten Grad II–III akute GVHD, sieben Patienten (23.3%) starben an therapieassoziiierter Mortalität und 39% erlebten ein Rezidiv ihrer Erkrankung. Das Gesamtüberleben nach 3 Jahren lag bei 50%. Generell ist die HLA-Varianz bei der japanischen Bevölkerung reduziert, womit die Fremdspenderverträglichkeit steigt; dies erschwert die Anwendbarkeit von Ergebnissen aus Japan auf die kaukasische Bevölkerung in Europa.

In China wurde ein weiteres Verfahren zur mismatch und haploidenten HSZT ohne in vitro Transplantataufreinigung etabliert. Huang und Mitarbeiter berichten in mehreren Publikationen über ein Protokoll bestehend aus einer intensiven Konditionierungstherapie mit Cytarabin (4 g/m^2) Tag –10 und –9, Busulfan (12 mg/kg) an den Tagen –8, –7, und –6, Cyclophosphamid ($1,8 \text{ g/m}^2$) an Tag –5 und –4, Semustin (250 mg/m^2) an Tag –3 kombiniert mit einer in vivo T-Zelldepletion mit Thymoglobulin (rabbit ATG, Sangstat-Genzyme, 2.5 mg/kg von Tag –5 to –2 (Huang et al. 2006 & 2009). Als Transplantat wird eine Kombination aus unmanipuliertem Knochenmark und G-CSF mobilisierten peripheren Stammzellen des entweder „gemismatchten“ oder komplett haploidenten Spenders eingesetzt. Nach der Transplantation erfolgt eine Immunsuppression mit Ciclosporin, Mycophenolat Mofetil und Methotrexat.

2006 berichtete Huang et al. über 171 Patienten mit verschiedenen hämatologischen Neoplasien, die eine haploidente HSZT nach diesem Protokoll erhielten (Huang et al., 2006). Alle Patienten hatten ein erfolgreiches Engraftment. Die Inzidenz für akute GVHD Grad II-IV lag bei 55% und für chronische GVHD bei 74%. Das erkrankungsfreie Überleben lag bei 68% für Standardrisiko-Patienten und 42% für Hochrisiko-Patienten. 2009 berichtete die gleiche Gruppe dann über 250 Patienten mit einer akuten Leukämie, die mit dieser Methode eine Transplantation von einem Spender mit 1-3 HLA-Mismatches erhielten (Huang et al., 2009). 249/250 hatten ein erfolgreiches Engraftment. Die Inzidenz einer akuten GVHD Grad II-IV lag bei 46%, und einer chronischen GVHD bei 54%. Das leukämiefreie Überleben lag für die Standard- und Hochrisikogruppe bei AML bei 71% und 56% und bei ALL bei 60% und 25%. Die 3-Jahres therapieassoziierte Mortalität lag bei 19% und 29% in der AML- und 21% and 51% in der ALL-Kohorte, jeweils stratifiziert nach Standard- und Hochrisikogruppe.

In einem retrospektiven Vergleich dieses Verfahrens zur Transplantation von einem passenden Fremdspender oder mismatch/haploidenten Familienspender berichtete Wang et al. nach der Analyse von insgesamt 88 Patienten (mismatch/haploident=36 und Fremdspender=52) über keine signifikanten Unterschiede im Transplantationsergebnis mit beiden Spenderarten (Wang et al., 2009).

Ebenfalls aus China stammt ein Protokoll zur nichtmyeloablativen haploidenten HSZT mit pharmakologischer Immunsuppression kombiniert mit dem Einsatz von ATG und mesenchymalen Stromazellen. Guo et al. berichtet über 33 Patienten, die eine Konditionierung mit Fludarabin, niedrig

dosierter Ganzkörperbestrahlung, Cytarabin und Cyclophosphamid erhielten (Guo et al., 2009). Zur GVHD Prophylaxe wurde eine Kombination aus Ciclosporin A, Mycophenolat Mofetil und einem Anti-CD25 Antikörper eingesetzt. Zusätzlich erhielten die Patienten eine intraossäre Injektion von mesenchymalen Stromazellen. Bei allen Patienten wurde ein erfolgreiches Engraftment beobachtet. Die Inzidenz einer akuten GVHD I-IV lag bei 46%, die einer chronischen GVHD bei 31%. Das geschätzte 3-Jahresüberleben lag bei 57%.

Risiko-Nutzen-Analyse immunmagnetischer in-vitro T-Zellentfernung mittels CD34 und CD133 Selektion oder CD3 CD19 Depletion, auch im Vergleich zu alternativen (pharmakologischen) Verfahren

Allgemein: Eine allogene Stammzelltransplantation stellt für Patienten mit einer malignen hämatologischen Erkrankung oft die einzige kurative Therapieoption dar. Bislang musste leider vielen Patienten aufgrund Alter, Begleiterkrankungen und insbesondere fehlendem HLA-identen Spender eine solche potentiell heilende Stammzelltransplantation vorenthalten werden. Durch die oben dargestellten Entwicklungen und Methoden ist eine Stammzelltransplantation mit dosisreduzierter Konditionierung und Stammzellen von einem nicht HLA-identischen oder sogar haploidenten Spender inzwischen an großen Transplantationszentren klinische Routine geworden. Ohne eine mismatch/haploidente HSZT würden diese Patienten keine kurative Therapieoption besitzen und an ihrer Erkrankung letztendlich versterben. Es gibt deshalb zu der Frage haploidente HSZT versus keine Transplantation und nur palliative Therapie auch keine Literaturdaten oder klinische Studien.

Soweit Phase I-II Studien und retrospektive Analysen überhaupt einen Vergleich erlauben, erscheinen die Erfolgchancen dieser neuen Transplantationsform nicht wesentlich schlechter als nach einer Standardtransplantation (10/10 match) zu sein, vor allem wenn man das bisher behandelte Hochrisikokollektiv der Patienten berücksichtigt. Alle mit einer mismatch oder haploidenten HSZT behandelten Patienten hatten keinen besser passenden, verfügbaren freiwilligen Stammzellspender und somit keine andere Therapieoption außer der Palliation.

Eine randomisierter Vergleich einer mismatch/haploidenten HSZT ohne weitere in-vitro oder pharmakologische T-Zelldepletion erscheint bislang aufgrund der zu erwartenden schweren GVHD (Anasetti *et al.*, 1990) als unethisch.

GVHD-Inzidenz und Mortalität: Der oben dargestellte Überblick über derzeit verfügbare alternativen Verfahren zur haploidenten HSZT ohne in vitro aber mit in-vivo T-Zelldepletion zeigt einerseits, dass eine in vitro Manipulation für eine erfolgreiche haploidente HSZT keine „conditio sine qua non“ darstellt, andererseits ist die Inzidenz akuter und chronischer GVHD mit pharmakologischen Verfahren meist deutlich höher als nach Transplantatmanipulationen mittels immunmagnetischer in vitro-Verfahren zur T-Zelldepletion. Insgesamt erscheinen – wie in der nachfolgenden Tabelle dargestellt – die klinischen Ergebnisse aller dargelegten Verfahren ähnlich:

Tabelle: Vergleich der pharmakologischen GVHD Prophylaxe und der in-vitro T-Zellentfernung im Rahmen der haploidentischen Stammzelltransplantation

	Luznik 2008	Burroughs 2008	Huang 2009	Aversa 2008b	Federmann 2009	Klingebiel 2004	Bader 2010
Patientenzahl	68	28	250	255	60	27 children	59 children
	Cy, TAC, MMF	Cy, TAC, MMF	ATG, CSA, MMF, MTX	CD34- Selektion	CD3/CD19 Depletion	CD34 Selektion	CD3/CD19 Depletion
aGvHD II-IV	34%	43%	46%	5-17%	47%	13%	n.d.
aGvHD III-IV	6%	11%	13%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
cGvHD	15%	nd	54%	n.d.	15%	n.d.	n.d.
extensive GvHD	Nd	35%	23%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Erkrankungs- freies Überleben	26%	51%	25-70%	25-50%	24%	37%	n.d.
TRM	nd	nd	19-51%	41%	44%	26%	10,7%

Nach derzeitigem Stand von Wissenschaft und Technik erscheinen beide Ansätze (in vitro und in-vivo bzw. pharmakologische T-Zelldepletion) gleichberechtigte Verfahren zu sein, die ein primäres hämatopoetisches Engraftment und eine ausreichende Patientensicherheit gewährleisten. Die Überlegenheit des einen oder anderen Verfahrens kann nur aufwendige und ausreichend grosse randomisierte Studien geklärt werden, die bisher angesichts der eingeschränkten Patientenzahlen und Vielzahl unterschiedlicher Therapieansätze kaum durchführbar erscheinen. Die beobachteten Inzidenzen von GVHD und therapieassoziierte Mortalität liegen unter oder ähnlich wie bei Standard-transplantationen mit unmanipulierten Stammzellzubereitungen HLA-identer Spender.

Engraftment: Mobilisierte periphere hämatopoetische Stammzellenpräparate setzen sich aus einer Vielzahl von Zellen zusammen. Dazu zählen Granulozyten, Monozyten, dendritische Zellen, NK-Zellen, regulatorische T-Zellen, T-Zellprogenitoren und andere. Jüngere Daten weisen zudem daraufhin, dass auch CD34 negative Stammzellen im peripheren Blut nach einer Stimulation mit Zytokinen vorkommen können (Kuci et al., 2003). Diese verschiedenen Zellsubpopulationen spielen eine entscheidende Rolle für das hämatopoetische Engraftment, die Geschwindigkeit der Immunregeneration und somit auch für das Auftreten letaler infektiöse Komplikationen. Nach dem Einsatz von Positivselektionsverfahren zur Anreicherung von hämatopoetischen Stammzellen entweder mittels der CD34- oder der CD133-Antigen gehen die oben beschriebenen „facilitating cells“ verloren. Bei der Negativdepletion von CD3 und CD 19 Zellen bleiben jedoch diese Zellsubpopulationen größten Teils erhalten und können ihre biologische Wirkung so im Empfängerorganismus entfalten. Dabei kommt vor allem der Anwesenheit alloreaktiver NK-Zellen eine wichtige Rolle zu. (Ruggeri et al., 2002 und Koehl et al., 2005). In den grundlegenden Versuchen im in-vivo Mausmodell durch Ruggeri et al., 2002 konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass alloreaktive NK-Zellen zum Anwachsen hämatopoetischer Stammzellen eine wesentliche Rolle spielen. In ihren Versuchen konnte diese Arbeitsgruppe demonstrieren, dass Mäuse, die mit einer subletalen Knochenmarksdosis bestrahlt wurden (7Gy) periphere Stammzellpräparate abstoßen; erhalten solchermaßen konditionierte Tiere allerdings eine Ko-Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen mit alloreaktiven NK-Zellen, so nehmen alle Tiere das übertragene Stammzellpräparat an und zeigen ein rasches Engraftment. Durch die

Selektion hämatopoetischer Stammzellen mittels CD3CD19 Depletion ist es nun möglich, NK-Zellen in hohem Maß mit zu transplantieren. Bereits 2005 berichtete Lang in einer Pilotstudie vom Vergleich zwischen Patienten nach CD34, CD133 Anreicherung oder CD3 CD19 Depletion. Die Tübinger Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass mit der CD3 CD19 Depletion eine primäre Engraftmentrate von 91% gegenüber 85% und 72% bei Patienten mit CD34 und CD133 Anreicherung erreicht werden konnte. Nach Rekonditionierung und erneuter Stammzellgabe war es dann möglich in allen Patienten ein stabiles Engraftment zu erreichen (Lang et al., 2005).

In mehreren weiteren Studien konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass mit allen drei Methoden Engraftmentrate von ca. 90% oder mehr zu erzielen sind. (Bader et al. 2007 Lang & Handgretinger. 2008). In einer Zwischenanalyse aus einer laufenden Studie konnten Bader et al. zeigen, dass mit ein CD3CD19 Depletion im Anschluß an eine reduzierte Konditionierung bei 59 Patienten eine Engraftmentrate von 100% erreicht werden konnte. (Bader et al., 2010). Mit allen immunmagnetischen Verfahren konnte ein ausreichend sicheres primäres Engraftment bei >90% der Patienten erreicht werden. In Fällen eines fehlenden primären Engraftment kann durch eine erneute Transplantation oder „Nachgraft“ (stem cell boost“) bei weiteren 5-10% ein sekundäres Engraftment erreicht werden.

Immunologische Rekonstitution / Infektiöse Komplikationen: Die Immunregeneration stellte nach Transplantation von T-Zell-depletierten Stammzellpräparaten lange Zeit den kritischen Faktor für einen erfolgreichen Verlauf einer Transplantation dar. Eine verzögerte Immunregeneration war für die hohe Anzahl an komplizierten Transplantationsverläufen und für behandlungsabhängige Sterblichkeitsraten zwischen 30-40% verantwortlich.

Dies hat sich geändert. Die wichtige Beobachtung, dass der Einsatz von G-CSF posttransplantationem die Erholung der Granulozyten zwar beschleunigt, die IL12 Produktion von antigenpräsentierenden Zellen aber abschwächt, führte dazu, dass G-CSF in diesem Transplantationssetting nicht mehr eingesetzt wird. Die Maßnahme hat wesentlich dazu beigetragen, dass die Regeneration IL-12 produzierender T-Zellen bereits zwischen Monat 1-3 geschieht (Volpi et al., 2001, Bader et al., 2007). Neben diesen Faktoren sind zahlreiche weitere für die Geschwindigkeit und Diversität der Immunregeneration verantwortlich; die Gabe einer Megadosis von peripheren Stammzellen zählt dazu.

Eine ganz wichtige Rolle kommt dabei der Thymusfunktion zu. Chen et al. verglichen Patienten die ein reduziertes Konditionierungsregime ohne Bestrahlung erhielten mit Patienten nach einer Standard-Ganzkörperbestrahlung bevor sie mit T-Zell depletierten peripheren Stammzellen behandelt wurden. Die Chemotherapiegruppe zeigte eine signifikant raschere, thymusabhängige Immunregeneration (Chen et al. 2006). In dieser Studie ist keiner der 22 Patienten an einer Virusinfektion verstorben. Dies lag vermutlich an der rascheren Erholung der thymusabhängigen T-Zell Regeneration und einer kompetenten NK-Zell vermittelten Abwehr wie diese im Rahmen der haploidenten, T-Zell depletierten Stammzelltransplantation regelmäßig zu finden ist.

Zwar treten Virusreaktivierungen von CMV, Adenoviren und EBV gleichhäufig wie bei Patienten nach einer klassischen Knochenmarktransplantation auf, die rasche Erholung und Etablierung eines neuen Immunsystems im Rahmen der CD3 CD19 depletierten Stammzelltransplantationen hat aber dazu

geführt, dass die infektionsbedingte „TRM-Rate“, im Erwachsenenbereich, aber vor allem in der Pädiatrie stark zurückgegangen sind. Gegenwärtig liegen die tödlich verlaufenden Komplikationen bei etwa 10-15% und somit in der Größenordnung von Geschwister- und HLAidentischen Fremdspendertransplantation. (Bader et al., 2010; Lang & Handgretinger, 2008; Bethge et al., 2006)

Zusammenfassung: Die verfügbaren Daten belegen ausreichend die klinische Wirksamkeit von Stammzellzubereitungen nach Anwendung einer der beschriebenen drei in-vitro Manipulationsmethoden und keine offensichtliche Bedenklichkeit des Transplantates bezüglich der Frequenz oder des Schweregrades der GVHD, der Rate an Rezidiven und infektiösen Komplikationen und der behandlungsabhängigen Gesamtmortalität in Abwägung zu den jeweiligen lebensbedrohlichen Erkrankungen und den vorhandenen bzw. fehlenden Therapiealternativen.

Der Einsatz verschiedener in vitro-Manipulationsmethoden zur Positivselektion von Stammzellen und zur Depletion von T und B Lymphozyten, die von Seiten des pharmazeutischen Herstellers bereits heute technisch und GMP konform sicher beherrscht werden, sollten jedoch bezüglich ihrer klinischen Wirksamkeit und Unbedenklichkeit weiterhin Inhalt prospektiver Studien sein oder zumindest in Patientenkohorten retrospektiv analysiert werden. Neben der hämatopoetischen und immunologischen Rekonstitution ist eine sorgfältige und kontinuierliche Risiko-Nutzen-Analyse auch gegenüber Alternativverfahren wie der oben genannten pharmakologischen GVHD Prophylaxe erforderlich.

Für die beim Paul-Ehrlich-Institut anhängigen Genehmigungsverfahren für Stammzellzubereitungen mittels immunmagnetischen in-vitro Manipulationsmethoden, entspricht aus Sicht der beteiligten Fachgesellschaften das primäre hämatopoetische Engraftment dem gewünschten klinischen Wirksamkeitsnachweis, währenddessen die immunologische Rekonstitution bzw. ihre Kehrseite, die infektiöse Komplikationsrate von vielen weiteren therapeutischen Einflussgrößen abhängig ist. Für alle drei immunmagnetischen Methoden lässt sich eine ausreichende primäre Wirksamkeit und Sicherheit belegen. Aufgrund der therapeutischen Alternativlosigkeit der so behandelten Patienten fällt somit nach heutigem Stand von Wissenschaft und Technik die Nutzen-Risiko-Abwägung eindeutig zu Gunsten der Durchführung einer allogenen HSZT mit T-Zellentfernung aus. Eine abschließende Beurteilung für oder gegen das eine oder andere Verfahren ist heute nicht möglich und bedarf gegebenenfalls einer Anpassung der Gemeinsamen Stellungnahme.

Die Auswahl eines heute als geeignet erscheinendem Transplantationsverfahrens - sei es mit in-vitro oder pharmakologischer T-Zelldepletion - obliegt dem behandelnden Transplantationszentrum. Aufgrund von derzeitigen Literaturdaten ist keines der Verfahren dem anderen eindeutig überlegen, so dass zur Auswahl des Verfahren sekundäre Kriterien wie klinische Erfahrung, etablierte Studien- und Therapieprotokolle und Zentrumspräferenzen herangezogen werden dürfen und die Entscheidung der therapeutischen Freiheit des behandelnden Zentrums zu überlassen ist.

Literatur zu 5.)

- Anasetti,C., Beatty,P.G., Storb,R., Martin,P.J., Mori,M., Sanders,J.E., Thomas,E.D., Hansen,J.A. (1990). Effect of HLA incompatibility on graft-versus-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma. *Hum.Immunol.* 29, 79-91.
- Aversa,F. (2008). Haploidentical haematopoietic stem cell transplantation for acute leukaemia in adults: experience in Europe and the United States. *Bone Marrow Transplant* 41:473-481.
- Aversa,F., Reisner,Y., Martelli,M.F. (2008). The haploidentical option for high-risk haematological malignancies. *Blood Cells Mol.Dis.* 40, 8-12.
- Aversa,F., Tabilio,A., Terenzi,A., Velardi,A., Falzetti,F., Giannoni,C., Iacucci,R., Zei,T., Martelli,M.P., Gambelunghe,C., . (1994). Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood* 84, 3948-3955.
- Aversa,F., Tabilio,A., Velardi,A., Cunningham,I., Terenzi,A., Falzetti,F., Ruggeri,L., Barbabietola,G., Aristei,C., Latini,P., Reisner,Y., Martelli,M.F. (1998). Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N.Engl.J.Med.* 339, 1186-1193.
- Aversa,F., Tabilio,A., Velardi,A., Martelli,M.F. (2001a). Allogeneic transplantation across the HLA barriers. *Rev.Clin.Exp.Hematol.* 5, 147-161.
- Aversa,F., Terenzi,A., Felicini,R., Carotti,A., Falcinelli,F., Tabilio,A., Velardi,A., Martelli,M.F. (2002). Haploidentical stem cell transplantation for acute leukemia. *Int.J.Hematol.* 76 *Suppl* 1, 165-168.
- Aversa,F., Terenzi,A., Tabilio,A., Falzetti,F., Carotti,A., Ballanti,S., Felicini,R., Falcinelli,F., Velardi,A., Ruggeri,L., Aloisi,T., Saab,J.P., Santucci,A., Perruccio,K., Martelli,M.P., Mecucci,C., Reisner,Y., Martelli,M.F. (2005). Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J.Clin.Oncol.* 23, 3447-3454.
- Aversa,F., Velardi,A., Tabilio,A., Reisner,Y., Martelli,M.F. (2001b). Haploidentical stem cell transplantation in leukemia. *Blood Rev.* 15, 111-119.
- Bachar-Lustig,E., Rachamim,N., Li,H.W., Lan,F., Reisner,Y. (1995). Megadose of T cell-depleted bone marrow overcomes MHC barriers in sublethally irradiated mice. *Nat.Med.* 1, 1268-1273.
- Bader P., Willasch A, Niethammer D, Klingebiel T. (2007) Haploidentical stem cell transplantation in childhood. *Curr .Cancer Ther. Rev.* 3:37-44.
- Bader,P., Willasch,A., Jarisch,A., Soerensen,J., Esser,R., Böning,H., Klingebiel,T. (2010) Transplantation CD3/CD19-depletierter Stammzellen. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 158, 216-222.
- Bethge,W.A., Faul,C., Bornhauser,M., Stuhler,G., Beelen,D.W., Lang,P., Stelljes,M., Vogel,W., Hagele,M., Handgretinger,R., Kanz,L. (2008). Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: an update. *Blood Cells Mol.Dis.* 40, 13-19.
- Bethge,W.A., Hagele,M., Faul,C., Lang,P., Schumm,M., Bornhauser,M., Handgretinger,R., Kanz,L. (2006). Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults with reduced-intensity conditioning and CD3/CD19 depletion: fast engraftment and low toxicity. *Exp.Hematol.* 34, 1746-1752.
- Bitan,M., Shapira,M.Y., Resnick,I.B., Zilberman,I., Miron,S., Samuel,S., Ackerstein,A., Elad,S., Israel,S., Amar,A., Fibach,E., Or,R., Slavin,S. (2005). Successful transplantation of haploidentically mismatched peripheral blood stem cells using CD133+-purified stem cells. *Exp.Hematol.* 33, 713-718.

Bornhäuser M, Eger L, Oelschlaegel U et al. Rapid reconstitution of dendritic cells after allogeneic transplantation of CD133+ selected hematopoietic stem cells. (Letter). *Leukemia* 2005;19:161-165.

Brugger,W., Henschler,R., Heimfeld,S., Berenson,R.J., Mertelsmann,R., Kanz,L. (1994). Positively selected autologous blood CD34+ cells and unseparated peripheral blood progenitor cells mediate identical hematopoietic engraftment after high-dose VP16, ifosfamide, carboplatin, and epirubicin. *Blood* 84, 1421-1426.

Brodsky RA, Luznik L, Bolanos-Meade J, et al. Reduced intensity HLA-haploidentical BMT with post transplantation cyclophosphamide in nonmalignant hematologic diseases (2008). *Bone Marrow Transplant*; 42: 523-527.

Burroughs LM, O'Donnell PV, Sandmaier BM et al. Comparison of outcomes of HLA-matched related, unrelated, or HLA-haploidentical related hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma (2008). *Biol BBMT* 2008;14:1279-1287.

Cavazzana-Calvo,M., Bensoussan,D., Jabado,N., Haddad,E., Yvon,E., Moskwa,M., Tchet des,C.A., Buisson,M., Morand,P., Virion,J.M., Le Deist,F., Fischer,A. (1998). Prevention of EBV-induced B-lymphoproliferative disorder by ex vivo marrow B-cell depletion in HLA-phenotypical or non-identical T-depleted bone marrow transplantation. *Br.J.Haematol.* 103, 543-551.

Chakrabarti S, MacDonald D, Hale G et al. T-cell depletion with Campath-1H "in the bag" for matched related allogeneic peripheral blood stem cell transplantation is associated with reduced graft-versus-host disease, rapid immune constitution and improved survival. *Brit J Hematol* 2003;121:109-118.

Chen,X., Hale,GA., Barfield,R., Benaim,E., Leung,WH., Knowles,J., Horwitz,EM., Woodard,P., Kasow,K., Yusuf,U., Behm,FG., Hayden,T., Shurtleff,SA., Turner,V., Srivastava,DK., Handgretinger,R. (2006). Rapid immune reconstitution after a reduced-intensity conditioning regimen and a CD3-depleted haploidentical stem cell graft for paediatric refractory haematological malignancies. *Br J Haematol* 135, 524-532.

Ciceri,F., Labopin,M., Aversa,F., Rowe,J.M., Bunjes,D., Lewalle,P., Nagler,A., Di Bartolomeo,P., Lacerda,J.F., Lupo Stanghellini,M.T., Polge,E., Frassoni,F., Martelli,M.F., Rocha,V. (2008). A survey of fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in adults with high-risk acute leukemia: a risk factor analysis of outcomes for patients in remission at transplantation. *Blood* 112, 3574-3581.

Civin,C.I., Small,D. (1995). Purification and expansion of human hematopoietic stem/progenitor cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 770, 91-98.

Cornelissen,J.J., van der,H.B., Petersen,E.J., Vindelov,L., Russel,C.A., Hoglund,M., Maertens,J., Schouten,H.C., Braakman,E., Steijaert,M.M., Zijlmans,M.J., Slaper-Cortenbach,I., Boogaerts,M.A., Lowenberg,B., Verdonck,L.F. (2003). A randomized multicenter comparison of CD34(+)-selected progenitor cells from blood vs from bone marrow in recipients of HLA-identical allogeneic transplants for hematological malignancies. *Exp.Hematol.* 31, 855-864.

Dvorak CC, Hung GY, Horn B et al. (2008). Megadose CD34(+) cell grafts improve recovery of T cell engraftment but not B cell immunity in patients with severe combined immunodeficiency disease undergoing haplocompatible nonmyeloablative transplantation. *Biol BMT* 14:1125-1133.

Dreger,P., Viehmann,K., Steinmann,J., Eckstein,V., Muller-Ruchholtz,W., Loffler,H., Schmitz,N. (1995). G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: comparison of T cell depletion strategies using different CD34+ selection systems or CAMPATH-1. *Exp.Hematol.* 23, 147-154.

Eissens,D.N., Schaap,N.P., Preijers,F.W., Dolstra,H., van Cranenbroek,B., Schattenberg,A.V., Joosten,I., van der,M.A. (2010). CD3+/CD19+-depleted grafts in HLA-matched allogeneic peripheral blood stem cell transplantation lead to early NK cell cytolytic responses and reduced inhibitory activity of NKG2A. *Leukemia* 24, 583-591.

Eyrich M., Leiler C., Croner T., Lang P., Schumm M., Mascher B., Schilbach K., Klingebiel T., Handgretinger R., Niethammer D., Schlegel P.G. (2004). Impaired T-cell activation and cytokine productivity after transplantation of positively selected CD34+ allogeneic hematopoietic stem cells. *Hematol J* 5:329-340.

Federmann, B., Bornhauser, M., Kordelas, L., Beelen, D. W., Stuhler, G., Schwerdtfeger, R., Stelljes, M., Behre, G., Christopeit, M., Faul, C., Vogel, W., Handgretinger, R., Kanz, L., and Bethge, W. A. Results of a Phase II Study of Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation (HHCT) in Adults Using Reduced Intensity Conditioning and CD3/CD19-Depleted Grafts: Clinical Outcome and Immune Reconstitution. *Blood* 114[22], 494-495. 2009 (abstract).

Gee, A. (1995). Purging of peripheral blood stem cell grafts. *Stem Cells* 13 Suppl 3, 52-62.

Gonzalez-Vicent, M., Perez, A., Abad, L., Sevilla, J., Ramirez, M., Diaz, M.A. (2010). Graft manipulation and reduced-intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from mismatched unrelated and mismatched/haploidentical related donors in pediatric leukemia patients. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 32, e85-e90.

Gordon, P.R., Leimig, T., Babarin-Dorner, A., Houston, J., Holladay, M., Mueller, I., Geiger, T., Handgretinger, R. (2003). Large-scale isolation of CD133+ progenitor cells from G-CSF mobilized peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 31, 17-22

Guo M, Sun Z, Sun QY, et al. A modified haploidentical nonmyeloablative transplantation without T cell depletion for high-risk acute leukemia: successful engraftment and mild GVHD (2009). *Biol Blood Marrow Transplant*, 15: 930-937

Handgretinger, R., Klingebiel, T., Lang, P., Schumm, M., Neu, S., Geiselhart, A., Bader, P., Schlegel, P.G., Greil, J., Stachel, D., Herzog, R.J., Niethammer, D. (2001). Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant.* 27, 777-783.

Huang XJ, Liu DH, Liu KY, et al. (2009). Treatment of acute leukemia with unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15(2):257-265

Huang XJ, Liu DH, Liu KY, et al. (2006). Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion for the treatment of haematological malignancies. *Bone Marrow Transplantation*, 38:291-297.

Jakubowski AA, Small TN, Young JW et al. (2007). T cell depleted stem-cell transplantation for adults with hematologic malignancies: sustained engraftment of HLA-matched related donor grafts without the use of antithymocyte globulin. *Blood* 110:4552-4559.

Klingebiel, T., Cornish, J., Labopin, M., Locatelli, F., Darbyshire, P., Handgretinger, R., Balduzzi, A., Owoc-Lempach, J., Fagioli, F., Or, R., Peters, C., Aversa, F., Polge, E., Dini, G., Rocha, V. (2010). Results and factors influencing outcome after fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in children with very high-risk acute lymphoblastic leukemia: impact of center size: an analysis on behalf of the Acute Leukemia and Pediatric Disease Working Parties of the European Blood and Marrow Transplant group. *Blood* 115, 3437-3446.

Koehl, U., Esser, R., Zimmermann, S., Tonn, T., Kotchetkov, R., Bartling, T., Sørensen, J., Grüttner, H.P., Bader, P., Seifried, E., Martin, H., Lang, P., Passweg, J.R., Klingebiel, T., Schwabe, D. (2005). Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children. *Klin Padiatr* 217, 345-350.

Kuci, S., Wessels, J., Bühring, H.J., Schilbach, K., Schumm, M., Seitz, G., Löffler, J., Bader, P., Schlegel, P.G., Niethammer, D., Handgretinger, R. (2003). Identification of a novel class of human adherent CD 34 neg. stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood* 1, 869-876.

Kobari,L., Giarratana,M.C., Pflumio,F., Izac,B., Coulombel,L., Douay,L. (2001). CD133+ cell selection is an alternative to CD34+ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *J.Hematother.Stem Cell Res.* 10, 273-281.

Ichinohe T, Uchiyama T, Shimazaki C, et al. Feasibility of HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation between noninherited maternal antigen (NIMA)-mismatched family members linked with long-term fetomaternal microchimerism (2004). *Blood*; 104: 3821-3828.

Jane,T.A., Law,P., Maruyama,M., Young,D., Burgess,J., Mullen,M., Mealiffe,M., Terstappen,L.W., Hardwick,A., Moubayed,M., . (1995). Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. *Blood* 85, 275-282.

Lang,P., Bader,P., Schumm,M., Feuchtinger,T., Einsele,H., Fuhrer,M., Weinstock,C., Handgretinger,R., Kuci,S., Martin,D., Niethammer,D., Greil,J. (2004a). Transplantation of a combination of CD133+ and CD34+ selected progenitor cells from alternative donors. *Br.J.Haematol.* 124, 72-79.

Lang,P., Handgretinger,R. (2008). Haploidentical SCT in children: an update and future perspectives. *Bone Marrow Transplant.* 42 *Suppl* 2, S54-S59.

Lang,P., Handgretinger,R., Niethammer,D., Schlegel,P.G., Schumm,M., Greil,J., Bader,P., Engel,C., Scheel-Walter,H., Eyrich,M., Klingebiel,T. (2003). Transplantation of highly purified CD34+ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia. *Blood* 101, 1630-1636.

Lang,P., Klingebiel,T., Bader,P., Greil,J., Schumm,M., Schlegel,P.G., Eyrich,M., Mueller-Wehrich,S., Niethammer,D., Handgretinger,R. (2004b). Transplantation of highly purified peripheral-blood CD34+ progenitor cells from related and unrelated donors in children with nonmalignant diseases. *Bone Marrow Transplant.* 33, 25-32.

Lang,P., Schumm,M., Taylor,G., Klingebiel,T., Neu,S., Geiselhart,A., Kuci,S., Niethammer,D., Handgretinger,R. (1999). Clinical scale isolation of highly purified peripheral CD34+progenitors for autologous and allogeneic transplantation in children. *Bone Marrow Transplant.* 24, 583-589.

Lang,P., Schumm,M., Greil,J., Bader,P., Klingebiel,T., Müller,I., Feuchtinger,T., Pfeiffer,M., Schlegel,PG., Niethammer,D., Handgretinger,R. (2005). A comparison between three graft manipulation methods for haploidentical stem cell transplantation in pediatric patients: preliminary results of a pilot study. *Klin Padiatr* 217, 334-338.

Lang, P., Teltschik, H. M., Mueller, I., Feuchtinger, T., Pfeiffer, M., Ebinger, M., Schumm, M., and Handgretinger, R. Haploidentical stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in refractory diseases: current results. *Bone Marrow Transplant.* 45[S2], S295. 2010 (abstract).

Lebkowski,J.S., Schain,L.R., Okrongly,D., Levinsky,R., Harvey,M.J., Okarma,T.B. (1992). Rapid isolation of human CD34 hematopoietic stem cells--purging of human tumor cells. *Transplantation* 53, 1011-1019.

Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide (2008). *Biol Blood Marrow Transplant* 14: 641-650.

Martinez,C., Urbano-Ispizua,A., Rozman,C., Marin,P., Rovira,M., Sierra,J., Montfort,N., Carreras,E., Montserrat,E. (1999). Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation: comparison of recipients of positive CD34+ selected grafts with recipients of unmanipulated grafts. *Exp.Hematol.* 27, 561-568.

Ogawa H, Ikegame K, Kaida K, et al. Unmanipulated HLA 2-3 antigen- mismatched (haploidentical) bone marrow transplantation using only pharmacological GVHD prophylaxis (2008). *Exp Hematol.* 36: 1-8.

Reisner Y, Bachar-Lustig E, Li HW et al. (1999). The role of megadose CD34+ progenitor cells in the treatment of leukemia patients without a matched donor and in tolerance induction for organ transplantation. *Ann NY Acad Sci* 872:336-348

Reisner Y, Gur H, REich-Zeliger S et al. (2005). Hematopoietic stem cell transplantation across major genetic barriers: tolerance induction by megadose CD34 cells and other veto cells. *Ann NY Acad Sci* 1044:70-83.

Ringhoffer,M., Wiesneth,M., Harsdorf,S., Schlenk,R.F., Schmitt,A., Reinhardt,P.P., Moessner,M., Grimminger,W., Mertens,T., Reske,S.N., Dohner,H., Bunjes,D. (2004). CD34 cell selection of peripheral blood progenitor cells using the CliniMACS device for allogeneic transplantation: clinical results in 102 patients. *Br.J.Haematol.* 126, 527-535.

Ruggeri,L., Capanni,M., Urbani,E., Perruccio,K., Shlomchik,WD., Tosti,A., Posati,S., Rogaia,D., Frassoni,F., Aversa,F., Martelli,MF., Velardi,A. (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, 295, 2097-2100.

Schumm,M., Lang,P., Taylor,G., Kuci,S., Klingebiel,T., Buhring,H.J., Geiselhart,A., Niethammer,D., Handgretinger,R. (1999). Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device. *J.Hematother.* 8, 209-218.

Urbano-Ispizua,A., Rozman,C., Martinez,C., Marin,P., Briones,J., Rovira,M., Feliz,P., Viguria,M.C., Merino,A., Sierra,J., Mazzara,R., Carreras,E., Montserrat,E. (1997). Rapid engraftment without significant graft-versus-host disease after allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood. *Blood* 89, 3967-3973.

Van Rood JJ, Loberiza FR Jr, Zhang MJ, et al. Effect of tolerance to noninherited maternal antigens on the occurrence of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation from a parent or an HLA-haploidentical sibling (2002). *Blood*; 99: 1572-1577.

Volpi,I., Perruccio,K., Tosti,A., Capanni,M., Ruggeri,L., Posati,S., Aversa,F., Tabilio,A. Romani,L., Martelli,MF., Velardi,A. (2001). Postgrafting administration of granulocyte colony-stimulating factor impairs functional immune recovery in recipients of human leucocyte antigen haplotype-mismatched hematopoietic transplants. *Blood* 97, 2514-2521.

Wang Y, Chen F, Han Y, et al. Partially matched related hematopoietic stem cell transplantation without ex vivo T cell depletion compared with matched unrelated transplantation in adult patients with hematologic malignancies (2009) *Biol Blood Marrow Transplant*; 15: 1258-1264.

5. Formale Ergänzungen bzw. Korrekturen

Die formalen, nicht-inhaltlichen Korrekturen erfolgen erst mit der Gesamtnovellierung.

Die Gemeinsame Stellungnahme (Endversion 08.05.2009) enthält im Unterkapitel 5.4 (Anlage 4) eine Mustervorlage vom Paul-Ehrlich-Institut. Im Rahmen dieser Ergänzung wird auf die Verfügbarkeit aktueller Versionen dieser Mustervorlagen auf der „homepage“ des PEI (www.pei.de) hingewiesen.