

**Gemeinsame 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**

Fassung vom 11. April 2016

Beteiligte Fachgesellschaften und Arbeitsgemeinschaften

DGTI

Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e.V.

DGHO

Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.

GPOH

Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie

DAG-KBT

Deutsche Arbeitsgemeinschaft Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation e.V.

PASZT

Pädiatrische Arbeitsgemeinschaft Stammzelltransplantation und Zelltherapie

Federführung und Koordination

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

Bearbeitung der Fassung vom 11.4.2016

Prof. Dr. Peter Bader, Universität Frankfurt
Schwerpunkt Stammzelltransplantation und Immunologie
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie

Prof. Dr. Wolfgang Bethge, Medizinische Universitätsklinik II, Hämatologie/Onkologie
Universität Tübingen

Prof. Dr. med. Mathias Freund
Emeritus, Universität Rostock

Prof. Dr. Andreas Humpe, Institut für Transfusionsmedizin
Universitätsklinikum Leipzig AöR

Prof. Dr. med. Peter Lang
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Abt. Hämatologie/Onkologie
Universität Tübingen

Univ.Prof. Dr. med. habil. Peter Schlenke
Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin
Medizinische Universität Graz

Prof. Dr. med. Lutz Uharek
Charité Stem Cell Facility
Klinik für Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie
Charité, Campus Rudolf Virchow, Berlin

Verfasser der 1. revidierten Ergänzung vom 01. März 2011

Prof. Dr. Peter Bader, Universität Frankfurt
Schwerpunkt Stammzelltransplantation und Immunologie
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie

Prof. Dr. Wolfgang Bethge, Medizinische Universitätsklinik II, Hämatologie/Onkologie
Universität Tübingen

Prof. Dr. Andreas Humpe, Institut für Transfusionsmedizin
Universitätsklinikum Leipzig AöR

Univ.Prof. Dr.med.habil. Peter Schlenke
Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin
Medizinische Universität Graz

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

Vorsitzender

Univ.Prof. Dr.med. Dr.med.habil. Peter Schlenke

Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und
Transfusionsmedizin, Klinikvorstand/Klinikvorständin, Medizinische
Universität Graz, Vertreter der DGTI

Mitglieder

Prof. Dr. Peter Bader, Universität Frankfurt
Schwerpunkt Stammzelltransplantation und Immunologie
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie

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

Prof. 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

Prof. Dr. Andreas Humpe, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Sektion für Stammzell- und Immuntherapie, 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 Thematik	7
1.1.	Einleitung und historischer Überblick	7
1.2.	Gesetzliche Grundlagen und Definitionen	10
1.3.	Stammzellbiologie	11
2.	Produkt	14
2.1.	Gewinnung	14
2.2.	Prozessierung	17
2.3.	Zusammensetzung des Transplantats	18
2.4.	Prüfverfahren	22
3.	Präklinischer Überblick	23
3.1.	Übersicht zur präklinischen Prüfstrategie	23
3.2.	Pharmakodynamik	23
3.3.	Pharmakokinetik	25
3.4.	Toxikologie	26
3.5.	Zusätzliche Angaben	27
3.6.	Gesamtübersicht und Schlußfolgerungen	27
3.7.	Literatur und Referenzen	27
4.	Klinischer Überblick	28
4.1.	Klinische Entwicklungsstrategie und Programm	28
4.2.	Übersicht zur klinischen Pharmakologie	28
4.3.	Übersicht zur Wirksamkeit/Funktionalität	28
4.4.	Übersicht zur Sicherheit	30
4.5.	Klinischer Überblick zum Stand der autologen Transplantation mit besonderer Berücksichtigung von Aufreinigungsverfahren.	35
4.6.	Klinischer Überblick zum Stand der allogenen Transplantation mit besonderer Berücksichtigung von Aufreinigungsverfahren und haploidenter Transplantation.	37
4.6.1.	Einführung	37
4.6.2.	CD34 Selektion	40
4.6.2.1.	Einführung	40
4.6.2.2.	Haploidente und HLA-mismatch Stammzelltransplantation	41
4.6.2.3.	HLA-idente Stammzelltransplantation	43
4.6.3.	CD3/CD19 Depletion	45
4.6.3.1.	Haploidente und HLA-mismatch Stammzelltransplantation	45
4.6.3.2.	HLA-idente Stammzelltransplantation	47
4.6.4.	CD133 Selektion	47
4.6.5.	Alternative pharmakologische Methoden zur T-Zelldepletion bei mismatch/haploidenter HSZT	48
4.6.6.	Risiko-Nutzen-Analyse immunmagnetischer in-vitro T-Zellentfernung mittels CD34 und CD133 Selektion oder CD3 CD19 Depletion, auch im Vergleich zu	

	alternativen (pharmakologischen) Verfahren	50
4.7	Gesamtübersicht und Schlussfolgerungen	53
4.8.	Zusätzliche Angaben	54
4.9.	Literaturzitate	54

5. Anlagen

5.1. Anlage 1

Zusammenfassung und Bewertung der toxiko-pharmakologischen Daten und Informationen zu Dimethylsulfoxid (DMSO) im Hinblick auf seine Verwendung in Stammzellzubereitungen (36 Seiten)

Dr. Peter Günzel, Berlin und Prof. Dr. Hermann Eichler, Homburg

5.2. Anlage 2

Muster einer Behältnisbeschriftung (deutsch / englisch) (1 Seite)

Dr. Markus Wiesneth, Ulm und Frau Dr. Kristina Hölig, Dresden

5.3. Anlage 3

Muster einer Produktinformation (Modul 1.3) (7 Seiten)

Dr. Markus Wiesneth, Ulm und Frau Dr. Kristina Hölig, Dresden

5.4. Anlage 4

Lebensläufe der Sachverständigen zu der
Gemeinsamen Stellungnahme von 2009

1. Einführung in die Thematik

1.1. Einleitung und historischer Überblick

Die gemeinsam erstellte und beim Paul-Ehrlich-Institut hinterlegte Stellungnahme der Fachgesellschaften DGTI, DGHO und GPOH dient insbesondere als Äquivalent zur Beantwortung der Module 2.4 und 2.5 Präklinischer und Klinischer Überblick („common technical documents“) durch die Antragsteller, kann jedoch auch an anderer Stelle der Genehmigungsanträge zitiert werden. Der Klinische Überblick stellt eine kontinuierliche Weiterentwicklung der „vorläufigen“ DGHO-Stellungnahme (Prof. Ehninger, Dresden) vom Januar 2008 dar. Liegen keine eigenen präklinischen Daten vor, so entfällt für den Antragsteller die Beantwortung des Moduls 2.6. Für das Modul 2.7 wird eine sehr kurze Zusammenfassung der eigenen, retrospektiv erhobenen Qualitätsdaten (Modul 3) empfohlen; ein Querverweis auf diese Stellungnahme ist sicherlich hilfreich. Die Vergleichbarkeit des eigenen Stammzellproduktes mit den in dieser Stellungnahme behandelten Stammzellzubereitungen sollte gegeben sein und an mehreren Stellen des Antrages festgestellt werden. Es sei darauf hingewiesen, dass diese gemeinsame Stellungnahme auch eine Produktinformation und eine Behältnisbeschriftung als Muster enthält.

Im Rahmen der gesetzlich (AMG) vorgeschriebenen Genehmigungsverfahren für Stammzellzubereitungen war 2010 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 von 2010 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 auch nach heutigem Stand von Wissenschaft und Technik noch nicht möglich.

Die Stellungnahme jetzt vorliegende zusammengeführte und bearbeitete Stellungnahme vom 11.4.2016 versucht, den gegenwärtigen Stand von Wissenschaft und Technik widerzuspiegeln. Alle Fachgesellschaften legen Wert auf die Feststellung, dass genehmigungspflichtige Stammzellzubereitungen als Arzneimittel einerseits einem hohen Qualitätsanspruch genügen müssen, jedoch andererseits als „Einzelchargen“ patientenindividuell hergestellt, geprüft und zu Transplantationszwecken freigegeben werden, um lebensbedrohlich erkrankten Patienten als kurative Therapie zu dienen. Somit sind autologe und insbesondere gerichtet hergestellte allogene Stammzellzubereitungen maßgeschneiderte Unikate des oder für den Einzelpatienten. Diese ärztlich-therapeutische Sichtweise fließt in die gegenwärtige Nutzen-Risiko-Bewertung von Stammzellzubereitungen unweigerlich mit ein und war historisch gesehen der Antrieb für Donall Thomas und seine Kollegen, die allogene Stammzelltransplantation als vernunftsbasiertes Therapiekonzept - trotz aller anfänglichen Enttäuschungen - weiterzuentwickeln (Thomas et al., 1957).

Für die 50er und 60er Jahre berichtete Bortin (Bortin, 1970), dass kein Patient von insgesamt 200

Patienten überlebte; diese katastrophalen Ergebnisse wurden erst durch eine der wichtigsten Erkenntnisse dieser Zeit überwunden. Dausset (Dausset, 1958) und van Rood (Van Rood et al., 1958) konnten zeigen, dass genetische Faktoren für das Auftreten der Graft-versus Host-Erkrankung (GvHD) im Humanleukozytenantigen-System (HLA-System) liegen. Hierbei handelt es sich um eine überschießende Immunreaktion immunkompetenter Zellen, insbesondere von T-Lymphozyten im Knochenmark des Spenders, die gegen das Empfängergewebe gerichtet ist (Thomas and Fefer, 1979).

Nach den ersten erfolgreichen Transplantationen bei Kindern mit angeborenen Immundefekten, einem Patienten mit schwerer aplastischer Anämie (Thomas et al., 1972) und der allgemein verbesserten Supportivtherapie folgte dann die rasche Zunahme der Transplantationen in zahlreichen, sich etablierenden Transplantationszentren. 1979 wurde der erste Bericht über Transplantationen bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie in erster Remission vorgelegt (Thomas et al., 1979). Seit den 80er Jahren wurde die Stammzelltransplantation zunehmend ein akzeptiertes Verfahren für die Behandlung vieler maligner und genetischer Erkrankungen. Einen großen Beitrag leisteten hierbei Fortschritte der Immungenetik mit der Entwicklung von molekulargenetischen Analysemethoden zur hochauflösenden Gewebetypisierung, die in den Aufbau eines weltweiten Netzwerks von freiwilligen unverwandten Stammzellspendern mündeten.

Anlässlich des „50. Geburtstages“ der ersten Publikation von Thomas et al. 1957 schrieb der Director der Clinical Research Division des Fred Hutchinson Cancer Research Center (Clinical Research Division) Professor Frederick Appelbaum im *New England Journal of Medicine* (Appelbaum, 2007):

„Yet Thomas's persistence in the face of criticism and clinical failure ultimately paid off in a new form of therapy that was used to treat approximately 50,000 people worldwide in 2006.“

In dieser Publikation fasst Appelbaum die Meilensteine in der Weiterentwicklung der Knochenmark- und Stammzelltransplantation in einer Abbildung sehr anschaulich zusammen:



Thomas' Idee, dass das Knochenmark eines Gesunden das Knochenmark eines Leukämiepatienten ersetzen könne, ging auf Versuche von Jacobson et al. (Jacobson et al., 1950) zurück, bei denen Mäuse unter Aussparung der Milz letal bestrahlt wurden und überlebten. Die gleiche Protektion konnten Lorenz et al. (Lorenz et al., 1951) nachfolgend für lange Röhrenknochen im Maus- und Meerschweinchen-Modell zeigen. Die Historie der Knochenmarktransplantation und ihre Entwicklung zu einer anerkannten Standardtherapie ist auch Gegenstand einer Übersichtartikels in *Nature Reviews 2002* von Marie-Terese Little und Rainer Storb (Little and Storb, 2002).

Die gegenwärtigen Indikationen zur Stammzelltransplantation in Deutschland finden sich auf der Internetseite der DAG-KBT (<http://www.dag-kbt.de/content/public/Indikationsliste-DAG.pdf>) (DAG-KBT e.V., 2014 und 2016) die Behandlungsergebnisse werden in jährliche Berichten (Deutsches Register für Stammzelltransplantationen (DRST)) unter <http://www.drst.de> veröffentlicht.

1.2. Gesetzliche Grundlagen und Definitionen

Zum 1. August 2007 trat das „Gesetz über die Qualität und Sicherheit von menschlichen Geweben“ (Gewebegesetz) in Kraft (Bundesrepublik Deutschland, 2007). Zweck dieses Gesetzes ist die nationale Umsetzung der sogenannten Geweberichtlinie (Directive 2004/23/EG) der Europäischen Kommission (Europäisches Parlament und Rat, 2004). Das Gewebegesetz ist kein eigenständiges Gesetz sondern ein Artikelgesetz, das im Wesentlichen Paragraphen anderer Gesetze ändert, im nämlich Transplantationsgesetz, Arzneimittelgesetz und Transfusionsgesetz.

Der Paragraph 21 des Arzneimittelgesetzes regelt die Zulassungspflicht von Arzneimitteln, insbesondere von sogenannten Fertigarzneimitteln, die im Voraus hergestellt und nachfolgend in den Verkehr gebracht werden. Hierunter fallen die mittels Vollblutspende oder Apherese gewonnenen Blutkomponenten (Erythrozytenkonzentrat, Thrombozytenkonzentrat und gefrorenes Frischplasma), die zur Hämotherapie nach Maß dienen. Die Zulassung ist vom pharmazeutischen Unternehmer zu beantragen und durch die zuständige Bundesoberbehörde - im Falle von Blutkomponenten dem Paul-Ehrlich-Institut in Langen - zu genehmigen bzw. zu versagen. Expressis verbis sind jedoch Gewebesubereitungen (§21 Absatz 2 Satz 1d) mit Verweis auf den neuen §21a von dieser Zulassungspflicht ausgeschlossen.

Paragraph 21a

„Gewebezubereitungen, die nicht mit industriellen Verfahren be- oder verarbeitet werden und deren wesentliche Be- oder Verarbeitungsverfahren in der Europäischen Union hinreichend bekannt und deren Wirkungen und Nebenwirkungen aus dem wissenschaftlichen Erkenntnismaterial ersichtlich sind, dürfen im Geltungsbereich dieses Gesetzes nur in den Verkehr gebracht werden, wenn sie abweichend von der Zulassungspflicht nach §21 Abs. 1 von der zuständigen Bundesoberbehörde genehmigt worden sind...“

Satz 1 gilt entsprechend für Blutstammzellzubereitungen, die zur autologen oder gerichteten, für eine bestimmte Person vorgesehenen Anwendung bestimmt sind.

Die Genehmigung umfasst die Verfahren für die Gewinnung, Verarbeitung und Prüfung, die Spenderauswahl und die Dokumentation für jeden Verfahrensschritt sowie die quantitativen und qualitativen Kriterien für Gewebesubereitungen. Insbesondere sind die kritischen Verarbeitungsverfahren daraufhin zu bewerten, dass die Verfahren die Gewebe nicht klinisch unwirksam oder schädlich für den Patienten machen.“

Quasi im „Nebensatz“ wird die Genehmigungspflicht von Blutstammzellzubereitungen festgelegt. Es stehen grundsätzlich unterschiedliche Quellen für hämatopoetischen Stammzellzubereitungen zur Verfügung: Peripheres Blut (PB) nach Stimulation, Knochenmark (KM) und Nabelschnurblut (NSB).

Hämatopoetische Stammzellen des peripheren Blutes sind kein Gewebe sondern Blutzubereitungen und als „Blutstammzellzubereitungen“ expressis verbis genannt, wohingegen hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks keine Blutzubereitungen sind sondern Gewebe, jedoch auch unter die Genehmigungspflicht fallen.

Für die Transplantation können patienteneigene (autologe) oder von einer fremden Person gewonnene (allogene) hämatopoetische Stammzellen genommen werden. Hierbei verfolgen diese zwei Möglichkeiten der hämatopoetischen Stammzelltransplantation grundsätzlich unterschiedliche

therapeutische Ziele:

Autologe Transplantation => Überbrückung der Knochenmark-Aplasie

**Allogene Transplantation => Primärer Ersatz des kranken Knochenmarks,
Induktion eines immunologischen anti-Tumor-Effekts**

Bei der allogenen Transplantation wird neben der sehr seltenen syngenen Transplantation (eineiige Zwillinge) zwischen Verwandten- bzw. Fremdspende einerseits und HLA-identer bzw. HLA-nichtidentischer Transplantation unterschieden.

Zusammenfassend sind nachfolgend genannte „Stammzellzubereitungen“ genehmigungspflichtig und Gegenstand dieser Stellungnahme:

- 1. und 2.) Hämatopoetische Stammzellen des Peripheren Blutes (PB)
Autolog und Allogen (gerichtet)**
- 3. und 4.) Hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarkes (KM)
Autolog und Allogen (gerichtet)**
- 5.) Hämatopoetische Stammzellen des Nabelschnurblutes (NSB)
Allogen (gerichtet)**

Allogene Stammzellen aus PB und KM werden nicht im Voraus ungerichtet hergestellt. Stammzellen aus NSB werden dagegen in Nabelschnurbanken im Voraus ungerichtet hergestellt und unterliegen somit als Blutzubereitung der Zulassungspflicht nach §21.

1.3. Stammzellbiologie

Die Hämatopoese beschreibt den physiologischen Prozess der Blutzellbildung, insbesondere der nachfolgend genannten ausgereiften, zellulären Elemente: Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten der T- und B-Zellreihe und Natürliche Killerzellen. Die Basis dieser Hämatopoese bilden hämatopoetische Stammzellen, die - dank Ihrer „Pluripotenz“ - in der Lage sind, in liniendeterminierte Vorläuferzellen und hochspezialisierte reife Blutzellen zu proliferieren und differenzieren. Nach der Geburt findet die Blutbildung ausschließlich im Knochenmark statt. Historisch gesehen wurden üblicherweise diese Stammzellen im Knochenmarkblut durch Punktion des Beckenkamms gewonnen und nachfolgend transplantiert. Die hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen aller Reifestadien nisten in durch Knochenmarkstroma ausgekleideten Spongiosabälkchen; hierbei wird eine osteoblastäre von einer vaskulären Nische unterschieden (Kiel and Morrison, 2008; Moore and Lemischka, 2006; Wilson and Trumpp, 2006). Zelluläre Elemente des Knochenmarkstromas sind typischerweise Fibroblasten, Makrophagen, Osteoblasten, Endothelzellen und Adipozyten. Unter normalen physiologischen Bedingungen sind die pluripotenten Stammzellen in der G₀-Phase des Zellzyklus (Arai and Suda, 2007; Gothot et al., 1998; Ladd et al., 1997). Die geringe proliferative Aktivität erlaubt die effiziente Nutzung von DNA-Reparationsmechanismen und trägt wesentlich zum Schutz der genetischen Integrität bei (Cairns, 1975; Jordan and Lemischka, 1990; Liu et al., 2009; Viale et al., 2009). Pluripotente Stammzellen verfügen darüber hinaus über eine Selbsterneuerungskapazität, die die lebenslange Aufrechterhaltung der Hämatopoese im menschlichen Körper gewährleistet. Diese beiden Stammzeleigenschaften - Selbsterneuerungs- und „pluripotente“ Differenzierungskapazität - wurden durch zahlreiche tierexperimentelle als auch

zellbiologische Studien belegt (siehe Kapitel 3 Präklinischer Überblick). Auf diesen Erkenntnissen basiert die Rationale der Transplantationsmedizin, Stammzellen des Knochenmarks eines fremden, gesunden Individuums als Ersatz für erkranktes oder zerstörtes Knochenmark eines Patienten zu verwenden. Die Expression von Adhäsionsmolekülen erleichtert die hämatopoetische Rekonstitution nach myeloablativer Therapie. Das Anwachsen der Stammzellen erfordert neben der richtigen Dosis und Qualität der Stammzellen eine adäquate Mikroumgebung, um das Einnisten („homing“) der transplantierten Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark zu ermöglichen.

Analog zu den im Knochenmark vorhandenen pluripotenten Stammzellen konnten ebensolche Stammzellen im peripheren Blut nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden zahlreiche Wachstumsfaktoren mit koloniestimulierender Wirkung in den achtziger Jahren entdeckt und klinisch erprobt, so zum Beispiel das G-CSF und GM-CSF (Dührsen et al., 1988; Haas et al., 1990; Socinski et al., 1988; Welte et al., 1985). Insbesondere Chemotherapeutika und/oder Wachstumsfaktoren tragen dazu bei, dass vermehrt Stammzellen vom Knochenmarkkompartiment in die Blutzirkulation übertreten (Morrison et al., 1997). Der heutzutage rekombinant hergestellte Wachstumsfaktor G-CSF ist in der Lage, beim Patienten aus dem „steady state“ oder nach Chemotherapie CD34+ Stammzellen effektiv (in der Regel bis Faktor 100) aus dem Knochenmark in das periphere Blut zu mobilisieren (Haas et al., 1990). Zusätzlich wurde G-CSF auch bei gesunden allogenen Familien- oder Fremdspendern erfolgreich eingesetzt und die Indikation zur Gabe von G-CSF diesbezüglich erweitert (Dreger et al., 1994). G-CSF wurde mit den Freinamen Filgrastim und Lenograstim in zwei verschiedenen Formen (nichtglykosyliert/glykosyliert) unter den Handelsnamen Neupogen® und Granocyte® zugelassen. Inzwischen existieren auch verschiedene Biosimilars. Die Standarddosierung beträgt 5-10µg G-CSF s.c./kg Körpergewicht (KG) pro Tag (ggf. verteilt auf 2 Tagesdosen), die über eine variable Zeitspanne nach Chemotherapie im autologen Setting und über 4-6 Tage bei gesunden allogenen Spendern gegeben werden kann (Weaver et al., 1998). Der Mobilisationserfolg ist variabel. Wichtigste Einflussgrößen sind neben der Grunderkrankung (Knochenmarkbefall) die Art der vorangegangenen Therapie (Chemotherapie bzw. Radiatio) und das Lebensalter (Desikan et al., 2001).

Der CXCR4 Antagonist Mozobil (Plerixafor®) kann bei unzureichendem Mobilisierungsergebnis zur effektiveren Mobilisierung CD34 exprimierender Stammzellen eingesetzt werden und besitzt eine Zulassung für die autologe Stammzellmobilisation bei Patienten mit Lymphom oder multiplem Myelom.

Als dritte und alternative Stammzellquelle kommen Stammzellen aus Nabelschnurblut in Betracht (Gluckman et al., 1989; Hofmeister et al., 2007). Diese werden sowohl bei Kindern als auch mit Einschränkung bei Erwachsenen zu Transplantationszwecken eingesetzt. Das Nabelschnurblut ist relativ reich an CD34+ Stammzellen (ca. 0,1% aller kernhaltigen Zellen), die zur vollständigen hämatopoetischen Rekonstitution befähigt und in dieser Eigenschaft den anderen Stammzellquellen gleichwertig sind.

Zur Charakterisierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (unabhängig von den o.g. Quellen) dienen unter anderem spezielle Kultivierungsverfahren. Sehr unreife Vorläuferzellen, die der pluripotenten Stammzelle hierarchisch nachfolgen, können in Langzeitkulturen als *long term culture-initiating cells* (LTCIC) und als *cobble stone area forming cells* (CAFC) bestimmt werden (Ploemacher et al., 1989; Sutherland et al., 1989). Andere Vorläuferzellen differenzieren in Kurzzeitkulturen in semisoliden Medien und unter geeigneter Zytokinstimulation zu unterschiedlichen Kolonien (CFU-GM, CFU-E/BFU-E und CFU-Meg). Alle Kultursysteme sind sehr zeitaufwendig, störanfällig und nur gering standardisiert. Differenzierte Aussagen zur „Pluripotenz“

der eingesetzten Stammzellen lassen sich jedoch nicht ableiten (Jansen et al., 2007). Kurzzeitkulturen mit Koloniebildung werden nicht als obligater Prüfparameter, sondern stichprobenartig in Ergänzung zur „Vitalitätsbestimmung“ von Zellen (Anfärbbarkeit der Zellwand bzw. des Zellkerns) und zu Validierungszwecken sowie als intern verwendeter Qualitätsparameter eingesetzt (Sheikhzadeh et al., 2001).

Zum immunphänotypischen Nachweis von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen steht seit Mitte der 80er Jahre das CD34 Oberflächenantigen zur Verfügung, dessen Funktion bis heute nicht eindeutig geklärt ist und das auch auf Endothelzellen und einigen maligne entarteten Zellen exprimiert wird (Civin et al., 1984). Üblicherweise werden CD34+ Stammzellen heutzutage durchflußzytometrisch unter Hinzugabe der Streulichteigenschaften (FSC_{low-med}, SSC_{bw}) und CD45 Koexpression (CD45_{low}) gemäß ISHAGE Protokoll charakterisiert und quantifiziert (Keeney et al., 1998). Eine kleine Subpopulation an CD34-positiven Stammzellen tragen keine weiteren liniendeterminierenden Merkmale auf ihrer Oberfläche (negativ für CD33, CD38 und HLA-DR) und/oder exprimieren den Rezeptor für den Stammzellfaktor (CD117, c-kit); dieser Subpopulation werden sehr unreife, pluripotente Eigenschaften zugeschrieben (Rusten et al., 1994; Sutherland et al., 1990). Die Fraktion der CD34-positiven Zellen enthält auch Zellen, die zur Koloniebildung befähigt sind. Je nach Differenzierungsgrad und -richtung werden weitgehend linienspezifische Antigene auf ihrer Zelloberfläche koexprimiert, so z.B. CD33 und HLA-DR für die myeloische Zellreihe. Mit voranschreitender Differenzierung geht das CD34 Merkmal verloren. Die Entwicklung monoklonaler Antikörper und Weiterentwicklung moderner Durchflußzytometer erlauben die schnelle und simultane Charakterisierung und Quantifizierung von solchen Stammzellpopulationen in Suspensionslösung.

Die Existenz von hämatopoetischen Stammzellen, die nicht das CD34 Antigen tragen und eventuell hierarchisch sehr unreife, frühe Stammzellen darstellen könnten, ist von mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesen worden (Goodell et al., 1997; Osawa et al., 1996); eine klinische Bedeutung im Rahmen der Transplantationsmedizin haben sie bis heute jedoch nicht erlangt und finden in dieser Stellungnahme keine weitere Berücksichtigung.

2. Produkt

2.1. Gewinnung

Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen können - wie oben bereits erwähnt grundsätzlich aus dem peripheren Blut, Knochenmark und Nabelschnurblut gewonnen werden. Sowohl bei der autologen als auch bei allogenen Transplantation werden heutzutage sehr viel seltener als früher Stammzellen aus dem Knochenmark entnommen.

Die Knochenmarkentnahme erfolgt gewöhnlich im Operationssaal unter Vollnarkose und Bauchlagerung des Patienten bzw. Spenders (Thomas and Storb, 1970). Die hinteren Beckenkämme (seltener die vorderen Beckenkämme oder das Sternum) werden mehrfach (bis zu 150 mal) punktiert (gewöhnlich erfolgen mehrere Hautschnitte mit sternförmigen Punktionen), unter sterilen Bedingungen Knochenmarkaspirate mit Heparinzusatz in 2 bis 10ml Aliquots entnommen und in ein Beutelsystem überführt. Unmittelbar nach der Gewinnung wird das gesammelte Knochenmarkblut über ein Filtersystem gegeben, um Knochensplitter, Fibringerinnsel, Zellaggregate und Fettpartikel zu entfernen. Das Knochenmarkblut wird im Operationssaal in einen Transportbeutel überführt und ggf. zur weiteren Prozessierung ins Labor verbracht. Das Volumen beträgt zu diesem Zeitpunkt in Abhängigkeit vom Körpergewicht des Empfängers 500 bis 1500ml Knochenmarkblut (10-15ml - maximal 20ml - pro kg KG des Spenders), so dass für pädiatrische Patienten auch Volumina unter 500ml entnommen werden. Der Blutverlust des Knochenmarkspenders wird über Elektrolytlösungen, kolloidale Lösungen oder über autologe Erythrozyten, die zuvor entnommen wurden, ausgeglichen. Die postoperative Überwachung erfolgt mit Blutdruck- und Pulskontrolle und einer ausreichenden Analgesie. Üblicherweise können Spender spätestens nach 24 Stunden nach Knochenmarkentnahme entlassen werden.

Häufig sind nach der primären Gewinnung von Knochenmark weitere „Manipulationen“ zur Teilung, Volumeneinengung oder Erythrozytendepletion erforderlich. Eine Plasmaentfernung durch Zentrifugation wird in der Regel bei pädiatrischen Empfängern (mit geringem Körpergewicht) oder bei ABO Minor-Inkompatibilität angewendet (Spenderplasma enthält Antikörper gegen Antigene des Empfängers), um unmittelbare Hämolysen nach Transplantation zu vermeiden. Trotzdem können auch immunkompetente Spenderlymphozyten gegen die Blutgruppenantigene des Empfängers Antikörper primär bilden und nachfolgende Hämolysen verursachen. Volumeneinengungen bzw. Buffycoat-Präparationen erfolgen zur Entfernung des Erythrozytensediments vor anschließender Kryokonservierung und darüber hinaus bei Major-Inkompatibilität im ABO- oder anderen Blutgruppensystemen (Empfängerplasma enthält Antikörper gegen Erythrozytenmerkmale des Spenders). Auch hier besteht die Möglichkeit einer verzögerten Hämolyse durch nicht eliminierte, Antikörperproduzierende Lymphozyten, die Antigene auf Erythrozyten, die aus dem Stammzelltransplantat hervorgegangen sind, erkennen. Stammzellsuspensionen, die aus Knochenmark gewonnen werden, werden - soweit erforderlich - analog zu Blutstammzellen kryokonserviert, so dass hierauf verwiesen wird.

Die Entnahme von Stammzellen aus der Blutzirkulation ist nur unter bestimmten Voraussetzungen möglich, die nachfolgend beschrieben werden. Im peripheren Blut von Patienten und gesunden Individuen zirkulieren nur sehr wenige Stammzellen (~0,01% aller Leukozyten). Für die Gewinnung von autologen Blutstammzellen machte man sich die Beobachtung zunutze, dass nach Abklingen der zytostatischen Therapie sich das Knochenmark „synchronisiert“ zu teilen beginnt und entsprechend eines „Rebound“-Effektes“ vermehrt hämatopoetische Stammzellen in das periphere Blut übertreten. Richman et al. (Richman et al., 1976) konnten bei Patienten mit hochdosierter

Cyclophosphamid-Monotherapie im peripheren Blut nach Durchschreiten des Leukozytennadirs vermehrt koloniebildende Zellen nachweisen. Ende der 70er Jahre führten Körbling et al. (Körbling et al., 1981) die Stammzellapheresen mit einem kontinuierlichen Durchflusszellseparator bei Patienten und freiwilligen Spendern ein und zeigten eine hohe Ausbeute an hämatopoetischen Vorläuferzellen in der mononukleären Zellschicht, die befähigt waren, ebenfalls Kolonien („*colony-forming cells*“) auszubilden. Zu diesem Zeitpunkt war weder das „Stammzell“-Antigen CD34 beschrieben noch die Wirkung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren bekannt.

Mitte der 80er Jahre beschrieben - unabhängig voneinander - mehrere Gruppen, die autologe Transplantation solcher „unprimed“ Blutstammzellen mit vollständiger oder inkompletter hämatopoetischer Rekonstitution des Patienten (Juttner et al., 1985; Kessinger et al., 1986; Körbling et al., 1986). Die allogene Transplantation von nichtmobilisierten Blutstammzellen beschränkt sich auf Fallberichte einzelner Patienten (Kessinger et al., 1989). Insgesamt bleibt heute jedoch festzuhalten, dass die alleinige Chemotherapie-vermittelte Mobilisation von peripheren Blutstammzellen (PBSZ) aufgrund zu geringer Effizienz nicht in den klinischen Alltag einzog.

Die Mobilisation größerer Mengen hämatopoetischer Stammzellen aus peripherem Blut gelang erst Ende der 80er Jahre mit der Erkenntnis, dass bestimmte Wachstumsfaktoren (Zytokine) in der Lage sind, Stamm- und Vorläuferzellen der Hämatopoese aus dem Knochenmark in das periphere Blut auszuschleusen. Hierbei steigt der Gehalt an Stammzellen im peripheren Blut durchschnittlich um Faktor 100 (Bandbreite: 20 - 200). Der bekannteste und bestverträglichste Vertreter dieser Wachstumsfaktoren ist das G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), dessen Einführung die autologe Stammzelltransplantation Mitte der 90er Jahre sprunghaft ansteigen ließ. Subkutan appliziertes G-CSF kam hierbei allein („*steady-state*“ Mobilisation) oder in Kombination mit Chemotherapeutika (z.B. Cyclophosphamid) zum Einsatz.

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 et al., 2006).

Bereits im Jahr 2005 konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass die Mobilisation hämatopoetischer 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 et al., 2008; Flomenberg et al., 2005; Liles et al., 2005). Entscheidende Daten für die Zulassung wurden 2009 publiziert. In einer prospektiv randomisierten, plazebo-kontrollierten, doppelt-geblindeten Phase III Studie (DiPersio et al., 2009) 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 KG 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. Es liegt eine zweite Phase III Studie vor, die die Daten bestätigt (Micallef et al., 2009). Labordaten zeigen, dass Plerixafor-mobilisierte Stammzellen hinsichtlich ihres genetischen Profils vermehrt Gene exprimieren, die ein besseres Engraftment fördern sollten (Fruehauf et al., 2006). 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 „longterm culture“ Untersuchungen bestätigt werden konnte (Fruehauf et al., 2009).

Erst später wurde das stammzellmobilisierende Potential von G-CSF auch im Rahmen der allogenen Stammzellspende von gesunden Freiwilligen ausgenutzt. Die akuten und langfristigen Nebenwirkungen von G-CSF im gesunden Spenderorganismus sind nicht Gegenstand dieser Stellungnahme. Es wird hier auf die Dokumentation der pharmazeutischen Industrie, Stellungnahmen nationaler/internationaler Knochenmark-Spenderegister (ZKRD, WMDA) und internationale Literatur verwiesen (Goldman et al., 2006; Pamphilon et al., 2006). Am 4. oder 5. Tag der G-CSF Gabe wird mit der peripheren Blutstammzellsammlung begonnen. Das Aphereseprodukt kann bis zu 72 Stunden bei $+4 \pm 2$ °C aufbewahrt werden. Wird die angestrebte Zieldosis nicht erreicht und bestehen keine weiteren Kontraindikationen hinsichtlich der Spendertauglichkeit, kann unter Fortführung der G-CSF Applikation eine zweite Apherese durchgeführt werden. Bei einer einrichtungsinternen oder durch Transport bedingten Zwischenlagerungszeit von mehr als 24 Stunden sollte zum besseren Erhalt der Zellvitalität angestrebt werden, eine Konzentration der kernhaltigen Zellen von 300×10^6 / ml nicht zu überschreiten. Dies kann z. B. durch Zugabe von autologem Plasma oder Plasmaersatzlösung (Humanalbumin: 2-10% Endkonzentration) erfolgen (Rowley et al., 1994).

Stammzellapheresen werden unter unmittelbarer ärztlicher Aufsicht und Anleitung durch besonders geschultes und qualifiziertes Personal durchgeführt. Das extrakorporale Volumen wird zur Gewährleistung einer guten Verträglichkeit gering gehalten, liegt in der Regel bei 150-300ml und sollte 15% des individuellen Körperblutvolumens nicht überschreiten. Das prozessierte Vollblut sollte in Anbetracht der derzeit gültigen Richtlinien von 2014 das Vier- bis Fünffache des Körperblutvolumens nicht überschreiten. In begründeten Ausnahmefällen erscheint heute insbesondere in der autologen Situation die Prozessierung des sechsfachen Blutvolumens ärztlich vertretbar zu sein und zum Stand von Wissenschaft und Technik zu werden. Der venöse Zugang erfolgt über periphere Venen; gegebenenfalls ist die Anlage eines zentralvenösen Katheters erforderlich. Die Antikoagulation erfolgt mit gebrauchsfertigen Zitratlösungen (ACD-A) gemäß den Angaben des Medizinprodukteherstellers. Zusätzlich kann Heparin appliziert werden.

Das Aphereseprinzip basiert - vergleichbar zur Gewinnung von Thrombozyten - auf einer kontinuierlichen Zentrifugation mit Hilfe eines Zellseparators. Das technische Prinzip dieser Zellseparatoren ist seit Jahrzehnten bekannt und Bestandteil zahlreicher Herstellungsverfahren von zugelassenen Arzneimitteln insbesondere Thrombozytenkonzentraten in Deutschland. Infolge der variablen Zellgröße und Zelldichte einzelner Blutbestandteile und den daraus resultierenden unterschiedlichen Sedimentationseigenschaften von Zellpopulationen, werden diese aufgetrennt und angereichert. Die gewünschten Zielzellen, also die zirkulierenden Blutstamm- und Vorläuferzellen haben ein ähnliches Sedimentationsverhalten wie mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten), so dass die Stammzellpopulation immer eine kleine Fraktion (Richtwert: 0,1% - 5%) der gesammelten mononukleären Zellen darstellt. Eine ausschließliche Sammlung von Stammzellen mittels physikalischer Zelleigenschaften ist nicht möglich. Darüber hinaus ist regelhaft eine „Verunreinigung“ durch andere kernhaltige Leukozyten (Granulozyten) und kernlose Zellen (Erythrozyten und Thrombozyten) vorhanden. Der Grad der Verunreinigung ist von vielen Faktoren abhängig, unter anderem vom „Ausgangsmaterial“ des Patienten bzw. Spenders (Differentialblutbild), der Stammzellkonzentration im peripheren Blut, dem technischen Aufbau und der Feinjustierung des verwendeten Zellseparators. Die pharmakologisch-toxikologische

Bewertung der sonstigen zellulären Bestandteile und ihrer Abbauprodukte (Erythrozyten, Thrombozyten, Zelldebris) findet sich in Kapitel 4.4.

Ende der achtziger Jahre wurde Nabelschnurblut als alternative Stammzellquelle in-vitro evaluiert (Broxmeyer et al., 1989). In einem im Vergleich zu Knochenmark und Blutstammzellen sehr viel geringeren Ausmaß werden auch Stammzellen aus Nabelschnurblut eines gesunden Geschwisterkindes gewonnen, prozessiert und nachfolgend gerichtet transplantiert. Diese Konstellation ist von der zulassungspflichtigen Herstellung von Nabelschnurblut als Fertigarzneimittel zur ungerichteten Anwendung zu unterscheiden. Für die Gebärende und für das Neugeborene darf durch die Nabelschnurblutentnahme kein zusätzliches Risiko entstehen. Die Kriterien zur Spendefähigkeit sind in Richtlinien weitgehend geregelt. Die Entnahme und Weiterverarbeitung wird im Detail unterschiedlich gehandhabt; jedoch basiert sie in der Regel auf der sterilen Gewinnung von 50 - 200ml Nabelschnurblut in einem speziellen Blutbeutelssystem nach Punktion der Nabelschnurgefäße (Eichler et al., 2003). Diese Prozedur erfolgt nach der Abnabelung des Neugeborenen und der Geburt der Plazenta. In der Regel erfolgen eine Volumenreduktion und gegebenenfalls eine standardisierte Kryokonservierung.

Die Konzentration an kernhaltigen Zellen ist sehr heterogen und liegt im Mittel zwischen $5 - 20 \times 10^8$ pro Einheit. Gemäß den Richtlinien von 2014 (Bundesärztekammer (BÄK), 2014) wird eine Mindesttransplantationsdosis von 3×10^7 pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers angestrebt; eine Unterschreitung bis zu 2×10^7 /kg KG erscheint in begründeten Ausnahmefällen, insbesondere in der gerichteten Konstellation gerechtfertigt zu sein und international zum anerkannten Stand von Wissenschaft und Technik zu werden (EBMT, 2008). Im Gegensatz zu Stammzellzubereitungen aus Knochenmark und peripherem Blut ist die Angabe einer CD34 Mindestkonzentration im Sinne einer Transplantationsdosis nicht Standard, obwohl eine durchflusszytometrische Analyse der CD34+ Zellen in der Regel durchgeführt wird und somit der CD34+ Gesamtgehalt angegeben werden kann. Aufgrund kernhaltiger Erythroblasten müssen geeignete Methoden zur Bestimmung der kernhaltigen Zellen bzw. der CD34+ CD45+ Zellen selbstverständlich Berücksichtigung finden. Bezüglich der Infektionsdiagnostik und zum Ausschluss einer potentiellen bakteriellen Kontamination werden dieselben Untersuchungen mit einer 100% Prüffrequenz wie bei allen anderen gerichteten allogenen Stammzellzubereitungen durchgeführt und bewertet.

2.2. Prozessierung

Autologe und allogene Stammzellzubereitungen können weiteren Prozessierungsschritten unterzogen werden. Insbesondere sind hier Positiv- und Negativselektionsverfahren vor Anreicherung von Zielzellen bzw. zur Entfernung unerwünschter Zellen zu nennen. Die Systeme und Reagenzien zu diesen Verfahren unterliegen dem Medizinproduktegesetz. Die Prozessierung von Stammzellzubereitungen mittels solcher Verfahren erfolgt in hierfür geeigneten Räumen, in der Regel in behördlich abgenommenen Reinräumen gemäß dem GMP-Leitfaden (Annex 1). Im autologen Therapieansatz basieren diese Prozessierungsschritte auf der Rationale, potentielle Tumorzellen des Patienten im Transplantat zu entfernen. Da es sehr viele verschiedene Tumorerkrankungen gibt und die Tumorzellen zum größten Teil keine spezifischen Tumormerkmale auf ihrer Oberfläche tragen, wird eine immunmagnetische CD34-Positivselektion der Stammzellen durchgeführt. Hier ist also auszuschließen, dass die Tumorzellen bzw. Leukämieblasten das Merkmal CD34 selbst auf ihrer Oberfläche tragen. Im Rahmen der allogenen Transplantation ist die Rationale eine gänzlich andere. Die großen Mengen an kontaminierenden T-Lymphozyten können im konditionierten Empfängerorganismus anwachsen und neben einer gewollten Antitumorwirkung

auch eine gefürchtete Komplikation, die Spender-gegen-Wirt-Erkrankung (*graft versus host disease, GVHD*) auslösen. Hier steht nicht die Aufreinigung der CD34+ bzw. CD133+ Stammzellen, sondern - zur Vermeidung oder Reduktion dieser überschießenden Immunreaktion und zur Vermeidung einer EBV induzierten lymphoproliferativen Erkrankung nach allogener Stammzelltransplantation - vielmehr die Entfernung der T-Lymphozyten bzw. B-Lymphozyten mittels monoklonaler Antikörper (immunomagnetische CD3-/CD19-Depletion) im Vordergrund.

Aus klinischer Sicht konnte mit diesem Therapieansatz eine Verminderung der GVHD erreicht werden. Das Gesamtüberleben wurde aber bisher bei HLA identischen Transplantationen nicht signifikant beeinflusst, da nach T-Zelldepletionsverfahren eine verlängerte Immuninkompetenz mit Häufung von Infektionen und teilweise auch ein erhöhtes Risiko von Transplantatversagen oder Rezidiven der Grunderkrankung beobachtet wurde. Eine effektive in vivo oder in vitro T-Zelldepletion ist hingegen für die erfolgreiche Transplantation von Zellen mit einem Mismatch in mehreren HLA-Loci bis hin zu einer Identität in nur einem Haplotypen (haploidente Transplantation) zwingend erforderlich. .

Heutzutage finden insbesondere immunomagnetische Verfahren zur selektiven Aufreinigung von Zellsubpopulationen Anwendung, bei denen - durch Eisen markierte Antikörper vermittelt - entweder die Zielzellen (z.B. CD34+ oder CD133+ Stammzellen) zu Transplantationszwecken mittels Magnet gesammelt werden oder die unerwünschte Zellfraktion, ebenfalls durch Markierung mittels solcher Antikörper (z.B. CD3/CD19 Depletion von T- und B-Lymphozyten) entfernt wird. Es sei in diesem Zusammenhang erwähnt, dass auch die oben erwähnte Stammzell-Positivselektion mit einer weitgehenden Entfernung der T- und B-Zellen einhergeht; jedoch werden darüber hinaus auch andere akzessorische Zellen, wie zum Beispiel Natürlichen Killerzellen entfernt, die bei der CD3/CD19 Depletion dem Transplantat erhalten bleiben. Die zuletzt genannten selektiveren Depletionsverfahren mittels anti-CD3 und anti-CD19 erhalten die NK-Zellpopulation und sind eventuell in der Lage, die Komplikationsrate während der langen Immunsuppression in der sogenannten haploidenten Stammzelltransplantation zu reduzieren.

Lymphozyten werden entweder aus einem Teil des Transplantats oder zu einem späteren Zeitpunkt vom allogenen Stammzellspender bei Bedarf (z.B. Rezidiv des Patienten) erneut mittels Zytapherese gewonnen. Diese Spenderlymphozyten-Transfusionen werden bei allogenen Transplantationen als zusätzliche „Immuntherapie“ im Sinne eines gegen den Tumor bzw. die Leukämie gerichteten Effektes (sog. GvL-Effekt) dosisabhängig eingesetzt. Sie unterliegen keiner Genehmigungspflicht und sind im Weiteren nicht Gegenstand dieser Stellungnahme. Allen immunomagnetischen Selektionsverfahren ist gemein, dass sie in einem weitestgehend geschlossenen „Prozessierungssystem“ mit zugelassenen Reagenzien erfolgen und heutzutage unter Reinraumbedingungen durchgeführt werden. Wichtigste Kenngrößen für eine erfolgreiche immunomagnetische Selektion sind die Wiederfindungsrate der Zielzellen (*recovery*) und die Reinheit der Zellen (*purity*). Eine Sterilitätsprüfung erfolgt nach Beendigung der zelltherapeutischen Manipulation am Endprodukt. Die pharmakologisch-toxikologische Bewertung residueller Bestandteile der immunomagnetischen Aufreinigung findet sich in Kapitel 4.4.

2.3 Zusammensetzung des Transplantats

Wie bereits ausgeführt stehen grundsätzlich verschiedene Stammzellquellen zu Transplantationszwecken zur Verfügung (peripheres Blut, Knochenmarkblut und Nabelschnurblut), deren zelluläre Zusammensetzung im Detail quantitativ und qualitativ unterschiedlich ist. Jedoch verfügen alle genannten Quellen über einen Anteil an CD34+ Stammzellen, die - im Prinzip

morphologisch und funktionell vergleichbar - zur hämatopoetischen und immunologischen Rekonstitution im Empfängerorganismus befähigt sind. Diese CD34+ Stammzellen stellen die arzneilich wirksame Substanz dar. Ihre Funktionalität und Wirksamkeit ist - unabhängig von der Quelle - nahezu identisch; lediglich die Konzentration im Ausgangsmaterial und der Grad ihrer Unreife variieren. Dies führt zu einer unterschiedlichen Kinetik der hämatopoetischen und immunologischen Rekonstitution im Empfängerorganismus nach autologer bzw. allogener Transplantation.

Die CD34+ Zellzahl ist heute das wichtigste, international akzeptierte Qualitätskriterium für Stammzellzubereitungen aus peripherem Blut. Nach den nationalen Standards und im Einklang mit der internationalen Literatur werden in der Regel folgende Transplantationsdosen angestrebt:

2-4 x 10⁶ CD34+ Zellen pro kg Körpergewicht (autolog)

4-8 x 10⁶ CD34+ Zellen pro kg Körpergewicht (allogen)

Für die Knochenmarktransplantation sind historisch keine belastbaren Daten publiziert worden, die eine eindeutige Korrelation zwischen dem CD34+ Zellgehalt und der Kinetik der hämatopoetischen und immunologischen Rekonstitution nachweisen konnten. Zu dieser Zeit wurde in Ermangelung des CD34 Markers empirisch auf die Konzentration kernhaltiger Zellen („*nucleated cells*“) referenziert. Es wurde und wird im internationalen Brauchtum zum Teil heute noch die nachfolgend genannte Transplantationsdosis angestrebt:

2-8 x 10⁸ kernhaltige Zellen pro kg Körpergewicht (autolog und allogen)

Später und nach der routinemässigen Etablierung von CD34 Messungen lösten G-CSF mobilisierte Blutstammzellen zumindest die autologe Transplantation von Knochenmark weitestgehend ab und nur ein kleinerer Anteil der allogenen Stammzellzubereitungen erfolgt heute unter Verwendung von Knochenmarkblut. Die Sammlung und Transplantation von mindestens 2 x 10⁶ CD34+ Zellen/kg KG kann bei Knochenmarkblut nicht immer realisiert werden. Dies hängt insbesondere auch von der Gewichts- und Alterskonstellation zwischen Spender und Empfänger ab, so dass unter sorgfältiger Risiko-Nutzen-Abwägung auch niedrigere Transplantationsdosen akzeptiert werden können. Eine Unterschreitung von 1,5 x 10⁶ CD34+ Zellen/kg KG ist zu vermeiden.

Für die angegebenen Dosisbereiche gilt grundsätzlich, dass sich Regenerationszeit für die Myelo-, Erythro- und Megakaryopoese signifikant verkürzen kann, je stammzellreicher das Transplantat ist. Darüber hinaus verkürzt sich zumeist auch die Dauer der Transfusionsabhängigkeit.

Es können vielschichtige Gründe vorliegen, von diesen Regelgrößen abzuweichen. Als Beispiel für Unterschreitungen dieser Regelgrößen ist hier insbesondere die Konstellation einer schlechten Stammzellmobilisation bzw. -gewinnung und einer sehr dringlichen Transplantationsindikation bei einer fortgeschrittenen, lebensbedrohlichen Grunderkrankung bzw. eine bereits erfolgte Konditionierung zu nennen. Der mögliche Nutzen sollte mit dem Risiko einer verzögerten bzw. unvollständigen hämatopoetischen Rekonstitution bzw. einer irreversiblen Schädigung des Knochenmarks abgewogen werden. Das Fehlen von alternativen Therapieoptionen ist hierbei zu berücksichtigen. Auch Überschreitungen der angegebenen Regelgrößen können durchaus begründet sein; insbesondere liegen keine verlässlichen Daten vor, die den Erlass einer definitiven Maximalkonzentration rechtfertigen würden. Als Beispiel für neue Therapieformen mit höherer Stammzellkonzentration seien hier die bereits erwähnten haploidenten Transplantationen erneut aufgeführt.

Die o.g. Stammzellzubereitungen (ohne weiteres Selektionsverfahren) enthalten unabhängig von ihrer Quelle alle löslichen und zellulären Bestandteile des Vollblutes bzw. Knochenmarkblutes als sogenannte „sonstige“ Bestandteile. Die zellulären Bestandteile können aufgrund des Ausgangsmaterials und des Gewinnungsverfahrens in ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung sehr variabel sein. Alle Stammzellprodukte enthalten in unterschiedlichem Ausmaß humanes Restplasma des Stammzellspenders. Die verwendeten Einfrierlösungen enthalten entweder spender- bzw. patienteneigenes Plasma oder alternativ zugelassenes humanes AB-Plasma bzw. als Arzneimittel zugelassene Human-Albuminlösungen (z.B. 5% oder 20%). Bezüglich des Kryoprotektivums Dimethylsulfoxid wird das Gutachten von Prof. Dr. Eichler, Homburg (Universität des Saarlandes) und Dr. Günzel, Berlin verwiesen. (siehe Anlage).

Die Stammzellprodukte enthalten darüber hinaus kontaminierende Erythrozyten, die sich bei der Gewinnung nicht gänzlich vermeiden und sich in Abhängigkeit zu der weiteren Verarbeitung nicht entfernen lassen. Der Erythrozytenausgangswert (Hämatokrit) des Stammzellspenders und das Verfahren zur Gewinnung sind hierbei wichtige Einflussgrößen. Das Erythrozytensediment liegt bei Stammzellzubereitungen aus peripherem Blut mittels Zytapherese und bei eingengtem Knochenmarkblut in der Regel bei $5 \pm 3\%$ (Volumenprozent) mit einer mittleren Erythrozytenkonzentration von $0,1- 5 \times 10^{12}$ pro Produkt, währenddessen Knochenmarkblut nach Gewinnung auch einen Hämatokrit von mehr als 30% aufweisen kann. Stammzellzubereitungen, insbesondere aus Knochenmarkblut werden nur zu einem geringfügigen Anteil kryokonserviert; hierbei bleibt die Erythrozytenintegrität nicht erhalten; es entstehen Zelldebris und freies Hämoglobin.

Die Stammzellprodukte enthalten darüber hinaus kontaminierende Thrombozyten, die sich bei der Gewinnung nicht gänzlich vermeiden und bei der weiteren Verarbeitung nicht vollständig entfernen lassen. Der Thrombozytenausgangswert des Stammzellspenders und das Verfahren zur Gewinnung sind wichtige Einflussgrößen. Die Thrombozytenkonzentration in Stammzellzubereitungen ist hochvariabel und liegt in der Regel bei Produkten aus peripherem Blut bei $0,1- 5 \times 10^{11}$. Eine Konzentration für Knochenmarkblut kann nicht angegeben werden. Stammzellzubereitungen werden zum Teil auch kryokonserviert; hierbei bleibt die Thrombozytenintegrität nicht erhalten. Es entsteht Zelldebris.

Stammzellzubereitungen ohne weitere Selektionsverfahren enthalten darüber hinaus regelhaft mononukleäre Zellen d.h. insbesondere Lymphozyten, Monozyten und deren Vorläuferzellen, denen gemeinsam ist, dass sie im Vergleich zu Stammzellen ähnliche Sedimentationseigenschaften haben. Darüber hinaus enthalten sie auch kontaminierende Granulozyten und deren Vorläuferzellen, die sich bei der Gewinnung nicht gänzlich vermeiden und bei der weiteren Verarbeitung nicht entfernen lassen. Es ist in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, dass die zelluläre Komposition der Stammzellprodukte ein Spiegelbild des jeweiligen Ausgangsmaterials ist. So finden sich in einem Stammzellapheresat grundsätzlich die kernhaltigen Zellen mit unterschiedlichem Ausreifungsgrad wieder, die unter G-CSF Mobilisierung aus dem Knochenmark in das periphere Blut übergetreten sind. Analog gilt diese Feststellung auch für die zelluläre Komposition des Knochenmarks (Vorläuferzellen aller hämatopoetischen Zellreihen) und des Nabelschnurblutes (v.a. kernhaltige Erythroblasten). Aufgrund der heterogenen Zusammensetzung der Zellsuspension aus unterschiedlichen Zellsubpopulationen hatte sich historisch, insbesondere für die Knochenmarktransplantation die Gesamtheit aller kernhaltigen Zellen als Qualitätsparameter eingebürgert. Die absolute Gesamtmenge kernhaltiger Zellen war äußerst heterogen; sie variierte in der Regel zwischen 10×10^9 und 10×10^{10} pro Stammzellprodukt eines Erwachsenen. Die „historische Richtschnur“ von mindestens 2 bis 8×10^8

kernhaltiger Zellen (klassischerweise auf Knochenmarkblut bezogen) pro kg Körpergewicht ist heute in Deutschland weitgehend durch die CD34+ Zellkonzentration als qualitätsbestimmenden Parameter ersetzt oder ergänzt worden. Kernhaltige Zellen werden dagegen häufig nur noch bestimmt und deklariert ohne die Wertigkeit eines Akzeptanzkriteriums zu haben. Dies gilt nicht uneingeschränkt für importierte Stammzellzubereitungen aus dem europäischen Ausland oder den USA.

Stammzellzubereitungen mit weiteren Selektionsverfahren führen generell zu einer relativen Anreicherung der Zielzellen einerseits (bei gleichzeitigem Verlust der Absolutzellzahl) und zu einem Verlust aller sonstigen kontaminierender Zellpopulationen (mononukleäre Zellen einschließlich T- und B-Lymphozyten und NK-Zellen). Im Vordergrund steht bei diesen Verfahren die Positivselektion von CD34+ Zellen mittels Antikörper. 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. Die CD34+ Transplantationsdosis entspricht in der Regel der der nicht aufgereinigten Stammzellzubereitungen. Im Umkehrschluss ist der Anteil an verbleibenden mononukleären Zellen proportional geringer. Durch die gängigen immunmagnetischen Verfahren zur Positivselektion werden Erythrozyten und Thrombozyten weitgehend entfernt.

Analog zum Prinzip der CD34 Positivselektion hat sich ein weiteres Selektionsverfahren unter Verwendung von Antikörpern gegen das CD133 Antigen etabliert. CD133 wird nicht von allen CD34+ Zellen wohl aber insbesondere von der sogenannten CD34 bright Stammzellpopulation koexprimiert (Anteil von ca. 75%). Im Schaf- und Mausmodell konnten sie erfolgreich als Knochenmark repopulierende Zellen, anteilig auch in serieller Transplantationssequenz eingesetzt werden (Gordon et al., 2003; Yin et al., 1997). Die bereits publizierten Daten lassen auch für den Menschen die Gleichwertigkeit in Bezug auf das hämatopoetische Rekonstitutionspotential dieser CD133 exprimierender Stammzellpopulation vermuten (Isidori et al., 2007; Lang et al., 2005).

In Rahmen dieser fachlichen Stellungnahme sei darauf hingewiesen, dass sowohl die Packungsgröße als auch die Produktanzahl stark variieren kann; dies ist insbesondere von der Stammzellquelle und dem Transplantationszeitpunkt (frisch versus kryokonserviert) abhängig. So können bei Zwischenlagerung von Stammzellaphereseprodukten Volumina von 400ml erreicht und bei Gewinnung von Knochenmark auch Volumina von 1000 ml überschritten werden. Für kryokonservierte Stammzellzubereitungen ohne weitere Selektion sind Packungsgrößen zwischen 40-190ml üblich. Je nach Mobilisationserfolg, verwendeter Einfriertechnik und geplanter Transplantationsstrategie fallen im Regelfall 1-6 Produkte pro Transplantation an. Für kryokonservierte Stammzellzubereitungen mit weiteren Selektionsverfahren kommen üblicherweise Packungsgrößen zwischen 40-190ml zur Anwendung, die Produktanzahl liegt regelhaft bei 1-2 Produkten und nur in begründeten Ausnahmefällen darüber. Grundsätzlich sind die jeweiligen Volumina der Stammzellzubereitungen zu bestimmen und zu deklarieren oder sogar auf behördliche Anordnung hin als sogenannte Packungsgrößen vom pharmazeutischen Unternehmen näher zu spezifizieren. Transplantationsdosen sind vom transplantierenden Zentrum unter Berücksichtigung der individuellen Patientencharakteristika (Erkrankungsprogression, Therapieansprechen, Grad der Histokompatibilität, Begleitinfektionen etc.) festzulegen; derzeit übliche Transplantationsdosen sind in diese fachliche Stellungnahme zur vereinfachten Orientierung angegeben. Bezüglich der zu erwartenden DMSO-Toxizität in Abhängigkeit zum Gesamtvolumen und der relativen DMSO-Endkonzentration im Transplantat wird hier auf die weiteren Ausführungen in dieser Stellungnahme verwiesen.

2.4. Prüfverfahren

Stammzellen aus peripheren Blut, Knochenmark und ggf. Nabelschnurblut werden mittels des „Surrogatmarkers“ CD34 durchflußzytometrisch analysiert und quantifiziert. Mithilfe dieser Methode erfolgt die Konzentrationsbestimmung der CD34+ Stammzellen als sogenannter qualitätsbestimmender Prüfparameter im jeweiligen Transplantat. Zur Anwendung kommt hierbei in der Regel ein international festgelegter Analysestandard, das sogenannte ISHAGE-Protokoll (Mc Keeney). Die Analyse ist schnell und einfach durchzuführen. Interne Maßnahmen zur Qualitätssicherung als auch die regelmäßige und erfolgreiche Teilnahme an externen Ringversuchen gewährleisten eine hohe Qualität des Prüfverfahrens und des Produktes. Abweichungen vom ISHAGE Standard sind ausreichend zu begründen.

Üblicherweise finden validierte Prüfverfahren zur Kontrolle der Ausgangsstoffe (Blutgruppenserologie, HLA-Typisierung und Infektionsmarker-Untersuchungen mittels serologischer und NAT Methoden) Anwendung. Hierbei sind sowohl die jeweils aktuellen Richtlinien der Hämotherapie (Bundesärztekammer (BÄK), 2010) und Stammzelltransplantation (Bundesärztekammer (BÄK), 2014), als auch die Standards der jeweiligen Labor-Akkreditierungen (z.B. EFI / JACIE) zu berücksichtigen.

Darüber hinaus finden zahlreiche weitere Prüfverfahren, die die qualitätsbestimmenden Produkteigenschaften vor und unter Umständen nach Kryokonservierung analysieren, Anwendung. Hierunter sind insbesondere die Volumenbestimmung mittels Wägung, die Messung kernhaltiger Zellen (Leukozyten) mittels automatischem Zellzähler oder durch simultane Bestimmung aller CD45+ Zellen mittels Durchflußzytometrie, die Bestimmung der „Vitalität“ mittels Trypanblaufärbung oder 7AAD-Kernfärbung und ggf. die Bestimmung kontaminierender Zellen mit automatischen Zellzählern zu subsumieren. Die eingangs erwähnten semisoliden Kurzzeitkulturen zum Nachweis von CFU-GM bzw. CFU-E/BFU-E bestimmen nicht die Qualität der Einzelcharge von Stammzellzubereitungen, können jedoch zur Prozeßvalidierung und zu Revalidierungszwecken hilfreich sein. Repräsentative Testungen auf mikrobielle Kontaminationen des Endproduktes müssen ebenfalls erfolgen. Üblicherweise werden hier eine aerobe und anerobe Kulturflasche mit geeigneten Volumina gemäß der Europäischen Pharmacopeia (Inokulum in Abhängigkeit zum Produktvolumen) beimpft.

Diese fachliche Stellungnahme erhebt nicht den Anspruch alle in der Bundesrepublik Deutschland eingesetzten Prüfverfahren systematisch zu erfassen und bewerten zu wollen. Die einzelnen Antragsteller sind aufgefordert, die Eignung ihrer Prüfverfahren durch Dokumente des Hersteller, Maßnahmen der internen Qualitätssicherung und (soweit erhältlich) durch Ringversuche zu belegen; dies gilt sicherlich in allererster Linie für die quantitative Messung der arzneilich wirksamen Substanz (CD34+ Stammzellen) als Grundlage für die Berechnung der Transplantationsdosis.

3. Präklinischer Überblick

3.1. Übersicht zur präklinischen Prüfstrategie

Mit den hier zur Genehmigung beantragten Stammzellzubereitungen wurden bis dato keine eigenen präklinischen Untersuchungen durchgeführt und sind auch nicht vorgesehen. Im Folgenden werden publizierte Daten verschiedener präklinischer Untersuchungen dargelegt.

Die Würdigung zum Teil als historisch zu betrachtenden Daten erfolgt aufgrund des besonderen Umstandes, dass der Gesetzgeber in Deutschland eine nachträgliche Genehmigungspflicht für Stammzellzubereitungen, die seit mehr als 20 Jahre klinisch erfolgreich eingesetzt werden, mit dem Erlass des Gewebegesetzes eingeführt hat. Folgerichtig beinhaltet dieser präklinische und der nachfolgende klinische Überblick eine retrospektive Bewertung und Würdigung historischer Daten und nicht die Festlegung und Begründung einer prospektiv ausgerichteten Prüfstrategie wie dieses für ein neuwertiges Arzneimittel oder Zelltherapeutikum angezeigt wäre.

Neben der Prüfung zahlreicher in-vitro Zellkultursysteme, inwieweit diese als Surrogatmarker für die „Pluripotenz“ und Repopulationskapazität der initial eingebrachten Stammzellen dienen könnten, waren historisch insbesondere Tiermodelle (z.B. Maus, Hund, Paviane) im Rahmen der präklinischen Erprobung der Knochenmarktransplantation von besonderer Bedeutung (Georges et al., 1998). Diese Tierversuche wurden durchgeführt, um nicht akzeptable Risiken für Patienten abzuwenden. Auch in der nachfolgenden Zeit wurden Modifikationen der Knochenmarktransplantation (z.B. die Einführung von CD34+ und CD133+ Blutstammzellen), die bezüglich der klinischen Unbedenklichkeit nur schwer abzuwägen waren und die Pathogenese von Transplantationskomplikationen (z.B. GVHD), zunächst im Tiermodell erprobt und validiert. Auch heute sind für grundlegende Fragen der humanen Stammzellbiologie immundefiziente Mausmodelle von großer Bedeutung (Ando et al., 2008).

3.2. Pharmakodynamik

Bereits im Jahr 1966 publizierten Epstein et al. die hämatopoetische Rekonstitution nach allogener Transplantation durch „cross circulation“ in letal bestrahlten Hunden. Anfang der achtziger Jahre publizierten Abrams et al. (Abrams et al., 1981) ihre Ergebnisse bezüglich eines autologen Transplantationsmodells im Hund. Nach Durchschreiten des durch Cyclophosphamidtherapie verursachten Leukozytennadirs wurden mononukleäre Zellen gesammelt und nachfolgend transplantiert. Diese Zellen (MNZ-Dosis: 0.5×10^8 /kg Körpergewicht) waren in der Lage, die Hunde vor den Folgen einer letalen Ganzkörperbestrahlung (9Gy) zu schützen. Zu ähnlichen Ergebnissen sind auch andere Arbeitsgruppen gekommen. Appelbaum et al. (Appelbaum et al., 1986) gewannen ebenfalls MNZ mittels Leukapherese nach chemotherapeutischer Induktion in Hunden mit Lymphomerkrankungen und transfundierten die autolog gewonnenen Zellen erfolgreich. Die hämatopoetische Rekonstitution erfolgte schneller als nach Transplantation von Knochenmark; hierfür wurde ein höherer Anteil an liniendeterminierten Vorläuferzellen verantwortlich gemacht, die im Vergleich zu „pluripotenten“ Stammzellen mit weniger Zellteilungen im Empfängerorganismus ausreifen können.

Das autologe Transplantationsmodell wird immer mit dem Risiko der Rezidiventstehung durch kontaminierende Tumorzellen in Verbindung gebracht. In vergleichenden Studien wurde der Vorteil einer immunmagnetischen Positivselektion von CD34+ Stammzellen, die mit einer Abreicherung an Tumorzellen einhergeht, evaluiert. Für viele Tumorentitäten konnte ein signifikanter

Überlebensvorteil nicht gefunden werden, so dass heute die Indikation zur CD34 Positivselektion bei autologen Transplantationen selten gestellt wird. Im Vordergrund stehen hier pädiatrische Patienten mit Neuroblastomen oder mit Einschränkung Patienten mit Ewing Sarkomen. Die Pharmakodynamik der hämatopoetischen Rekonstitution ist nach autologer Transplantation von aufgereinigten CD34+ Stammzellen vergleichbar mit der von „mononukleären“ Stammzellzubereitungen (Berenson et al., 1991; Gorin et al., 1995; Shpall et al., 1994). Dasselbe gilt wahrscheinlich auch für die kürzlich erst eingeführte Selektion von CD133+ Stammzellen, die in erster Linie eine Teilmenge der CD34+ Stammzellen darstellen und dessen Repopulationskapazität zunächst im Tiermodell erprobt wurde (Gordon et al., 2003; Yin et al., 1997).

Zahlreiche tierexperimentelle Modelle waren für die Entwicklung von Strategien zur effektiven Stammzellmobilisation mittels Wachstumsfaktoren von Nutzen. Neben den Fragen der Mobilisationskinetik und Verträglichkeit des jeweiligen Wachstumsfaktors wurde insbesondere die Verlässlichkeit der hämatopoetischen Rekonstitution der durch Wachstumsfaktor induzierten „mononukleären“ Zellen tierexperimentell untersucht. Ende der achtziger Jahre wurden die ersten Daten (Phase I) zur stammzellmobilisierenden Wirkung im menschlichen Organismus nach Gabe von G-CSF oder GM-CSF publiziert (Dührsen et al., 1988; Socinski et al., 1988; Welte et al., 1985). Auch hier erfolgte zunächst die weitere Erprobung im Tiermodell (Maus) zum Beispiel mittels G-CSF behandelte männlicher Mäuse (250µg/kg/Tag für 4 Tage) (Molineux et al. (1990)). Lediglich $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden in letal bestrahlte weibliche Mäuse (syngenes Modell) transplantiert und führten zur kompletten hämatopoetischen Rekonstitution ohne signifikanten Unterschied zur mitgeführten Kontrollgruppe (Knochenmark). Ein kompletter Spenderchimärismus konnte über 10 Monate nachgewiesen werden. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Neben et al. (Neben et al., 1993), ebenfalls in einem Mausmodell. Cyclophosphamid und G-CSF mobilisierte mononukleäre Zellen zeigten eine ähnliche Frequenz an „*colony-forming units spleen*“ und „*competitive repopulating cells*“ wie normales Knochenmark und führten zu einem vergleichbaren Transplantationserfolg. Zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten beschäftigten sich darüber hinaus mit der stammzellmobilisierenden Wirkung weiterer Wachstumsfaktoren und Botenstoffe (SCF, IL6, IL7, IL8, MIP1a) und der synergistischen Wirkung von Zytokinkombinationen, auf deren näheren Beschreibung an dieser Stelle jedoch verzichtet wird, da sie zumeist keine klinische Relevanz erlangten

Die dauerhafte Rekonstitution der Hämatopoese („*long-term engraftment*“) wird bevorzugt im Grosstiermodell evaluiert; insbesondere Fragen zur Dosisfindung und zur lebenslangen Nachbildung von Blutzellen aus transplantierten Stammzellen lassen sich im Grosstiermodell besser - in Annäherung an das zu erwartende „*outcome*“ beim Menschen beantworten. Darüber hinaus sind auch transplantationsimmunologische Aspekte wie z.B. die Entstehung der GVHD im Grosstiermodell adäquat zu untersuchen, wohingegen MHC (H2) Barrieren in der Maus nicht regelhaft GVHD initiieren und diese Versuche klinische Vorhersagen nicht zulassen.

Wegweisend war der Nachweis, dass autologe CD34 exprimierende Knochenmarkszellen letal bestrahlte Paviane (n=5) rekonstituieren konnten. (Berenson et al., 1988). Ebenfalls am Fred Hutchinson Center in Seattle wurden Hunde erfolgreich mit autologen Blutstammzellen transplantiert, die zuvor mittels G-CSF, SCF oder einer Kombination von beiden Wachstumsfaktoren gewonnen wurden (De Revel et al., 1994). Zielgröße war hierbei nicht eine festgelegte CD34+ Stammzelldosis, sondern die Retransfusion von 1×10^8 MNZ pro kg Körpergewicht nach Ganzkörperbestrahlung (9,2 Gy). Alle Kontrolltiere verstarben, während die transplantierten Hunde mit zwei Ausnahmen hämatopoetisch rekonstituierten (6-monatige Nachbeobachtungszeit). Die neutrophilen Granulozyten (>500/µl) erholten sich durchschnittlich

innerhalb von 14 bis 19 Tagen, die Thrombozyten ($>20.000/\mu\text{l}$) innerhalb von 37 bis 46 Tagen; jedoch verstarben 2 von 10 Hunden an einer ausgeprägten und verlängerten Thrombozytopenie. Das Studiendesign war nicht auf den primären Nachweis einer lebenslangen hämatopoetischen Rekonstitution ausgelegt. Dieser Nachweis ist im autologen Transplantationsmodell nicht mit letzter Sicherheit zu erbringen, da die beobachtete Langzeithämatopoese auch aus bestrahlungsresistenten, ortsständigen Stammzellen hervorgegangen sein könnte. Der synergistische Effekt von G-CSF und SCF wurde auch im Primatenmodell (Paviane) bestätigt. Andrews et al. (Andrews et al., 1995) publizierten ein signifikant schnelleres „*tri-lineage engraftment*“ in Tieren, die das kryokonservierte autologe Leukapheresat nach kombinierter G-CSF/SCF Therapie im Vergleich zu nur G-CSF erhielten. Auch in dieser Studie war die CD34+ Stammzell dosis nicht bekannt und es wurde auf die Anzahl koloniebildender Zellen (CFU-GM) abgehoben. Die Rekonstitutionsgrenzen für neutrophile Granulozyten und Thrombozyten ($500/\mu\text{l}$ und $20.000/\mu\text{l}$) wurden im G-CSF/SCF Arm nach 12 bzw. 8 Tagen erreicht, wohingegen im G-CSF Arm diese Schwellenwerte erst nach 24 bzw. 42 Tagen erreicht wurden. In einem neuen Primatenmodell konnte gezeigt werden, dass die pegG-CSF-Gabe in Kombination mit anderen Zytokinen zu einer signifikant besseren Mobilisation CD34+ Zellen, der koloniebildenden Zellen und der SCID-Mäuse-repopulierenden Zellen führt (Larsen et al., 2008).

Die zusätzliche klinische Anwendung von SCF (Stemgen) ist seit kurzem für schlecht mobilisierende Patienten in Kombination mit G-CSF unter Prämedikation möglich. Darüber hinaus werden monoklonale Antikörper (anti-VLA4, Natalizumab) und SDF1/CXCR4Antagonisten (AMD3100) bezüglich ihrer Mobilisierungseffizienz und Verträglichkeit klinisch erprobt (Broxmeyer et al., 2005; Zohren et al., 2008). Es ist davon auszugehen, dass die unter den neuen Mobilisierungstherapien gewonnenen Stammzellen, die auch das CD34 bzw. CD133 Antigen tragen, ein weitgehend identisches Potential zur hämatopoetischen Rekonstitution aufweisen.

3.3. Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik im engen Sinn der biochemischen Pharmakologie beschreibt alle Prozesse eines Arzneimittels im Körper, insbesondere die Aufnahme (Absorption), ggf. Freisetzung (Liberation), Verteilung (Distribution) und der biochemische Umbau bzw. Abbau (Metabolisierung) und Ausscheidung (Exkretion). Verschiedene der genannten Teilprozesse sind für ein „untypisches“, zelluläres Arzneimittel wie „Stammzellzubereitungen“ nicht zutreffend; dies gilt insbesondere für die Freisetzung, Metabolisierung und Ausscheidung.

Hämatopoetische Stammzellen unterschiedlicher Stammzellquellen werden entweder als Anteil in einer mehr oder weniger „reinen“ mononukleären Zellfraktion oder als aufgereinigte Zellpopulation intravenös appliziert. Diese Transfusion erfolgt entweder im frischen, nicht kryokonservierten Zustand innerhalb von 3 Tagen nach Gewinnung oder mit wieder aufgetauten Zellen unmittelbar nach Verflüssigung. Über die Blutzirkulation erfolgt im menschlichen Organismus eine rasche Verteilung. Zu diesem frühen Zeitpunkt ist es besonders wichtig, dass unter Berücksichtigung der Pharmakokinetik der zuvor applizierten Chemotherapeutika eine signifikante Stammzelltoxizität für das Transplantat ausgeschlossen werden kann. Durch Einhaltung eines ausreichenden Zeitabstandes werden optimale Bedingungen zur Einnistung der Stammzellen und Regeneration des Blut- und Immunsystems geschaffen.

Transfundierte humane Stammzellen werden im Gesamtblutvolumen eines Patienten rasch verdünnt und sind 24 - 48 Stunden nach Transplantation in der Blutzirkulation kaum noch nachweisbar. Die Verteilung von hämatopoetischen Stammzellen erfolgt durch transendotheliale

Migration in viele verschiedene Organe, vorwiegend jedoch in Lunge, Leber, Milz und Knochenmark. Dieser Prozeß wird als „homing“, „seeding“ und „early engraftment“ bezeichnet. Verschiedene molekulare Mechanismen, insbesondere die Expression von Adhäsionsmolekülen im Sinne von Rezeptor-Liganden-Paaren auf transplantierten Stammzellen und ortsständigen Stromazellen, sind bereits in den letzten 20 Jahren identifiziert worden und Gegenstand zahlreicher Übersichtsartikel (Papayannopoulou, 2000; Williams and Nilsson, 2009), zumal die Stammzeleinnistung die Kehrseite der eingehend untersuchten Stammzellmobilisierung darstellt. In diesem Zusammenhang verweisen wir hier auch auf das Kapitel 1.3 Stammzellbiologie.

Die Standarduntersuchung zur Beurteilung eines „short term or long-term engraftment“ durch hämatopoetische Stammzellen erfolgt in der Regel in experimentellen Tiermodellen, in denen Spenderzellen in Empfängerorganen bzw. im Knochenmark nachgewiesen werden. Dieses Vorgehen macht die Tötung des Versuchstieres erforderlich und erlaubt nur die Beurteilung der Stammzelldistribution zum Zeitpunkt der Untersuchung. So konnten Hendriks et al. (Hendriks et al., 1996) bereits zeigen, dass 1×10^4 PKH-26 positive Zellen (CFUSpleen Zellen) nach intravenöser Applikation besser in die Milz als in das Knochenmark von tödlich bestrahlten Mäusen einnisteten. Zur Zeit werden neue Technologien erprobt, die eine mehr dynamische Verfolgung („tracking“) hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen mittels „in-vivo imaging“, also in einem lebenden, xenogenen Organismus erlauben. Hier sind zum Beispiel durch lentivirale Transfektion Luciferase-exprimierende Stammzellen (CD34+) und deren Subpopulationen (CD34+ CD38-) zu nennen, die im Knochenmark von NOD/SCID Mäusen einnisteten und anwachsen (Wang et al., 2003). Diese vergleichenden Untersuchungen zeigten, dass die Sensitivität solcher Biolumineszenz-Verfahren bei ca. 1% Spenderzellanteil im Knochenmark liegt. Auch Eisenoxid als FDA zugelassenes Kontrastmittel kann mittels Lipofektion in hämatopoetische Stammzellen aufgenommen und die Organanreicherung mittels Magnetresonanztomographie nachgewiesen werden. Im Mausmodell waren 24 Stunden nach Injektion in die Schwanzvene die stärksten Signale in Leber, Milz und Knochenmark nachweisbar (Daldrup-Link et al., 2005).

Askenasy und Farkas beschrieben ein fluoreszenzoptisches Verfahren zum „invivo tracking“ und „in-situ assessment“ von murinen Knochenmarkzellen, die mit dem Membranfarbstoff PKH gekennzeichnet waren (Askenasy and Farkas, 2002). Die Autoren konnten zunächst zeigen, dass die PKH Farbstoffe ($1-4\mu\text{M}$) weder die Vitalität noch die hämatopoetische Rekonstitution im Empfängertier beeinträchtigten. Darüber hinaus konnten „homing efficiencies“ von 1,8% bzw. 0,2% in Femuren 16 Stunden post transplantationem (syngen versus allogene) nachgewiesen werden. Erst kürzlich publizierten die Arbeitsgruppe von Quesenberry (Colvin et al., 2007) Daten zu einem allogenen Mausmodell (C57BL/6J Lin-Sca+ CFSE-markiert in nichtmyeloablativ behandelte BALB/c Mäuse). Mittels Durchflußzytometrie wurde bereits 1 Stunde nach Injektion ein schnelles „homing“ in das Knochenmark nachgewiesen, das über die nachfolgenden Stunden (6h) nicht mehr gesteigert wurde.

3.4. Toxikologie

Es liegen aus den vergangenen Jahrzehnten keine belastbaren bzw. evidenzbasierten Daten vor, die eine toxikologische Bedenklichkeit der arzneilich wirksamen Substanz, hier der hämatopoetischen Stammzelle aus Knochenmark, peripherem Blut bzw. Nabelschnurblut belegen würden. Somit wurde für therapeutische Anwendung sowohl bei der autologen als auch bei der allogenen Transplantation national und international keine aus toxikologischen Gründen vertretbare Dosisobergrenze für CD34+Zellen festgelegt.

Ein Risiko für eine krebserregende oder das Krebswachstum fördernde Wirkung ist für adulte Stammzellen humanen Ursprungs, die zu Transplantationszwecken eingesetzt werden, nicht bekannt (Donner, 2007). Von der „gesunden“ hämatopoetischen Stammzelle ist hierbei eine durch maligne Transformation (Aktivierung von Protoonkogenen, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen) entstandene „leukämische“ Stammzelle zu unterscheiden; dies gelingt in erster Linie durch molekulargenetische Analysen, währenddessen das phänotypische Erscheinungsbild (z.B. CD34+ CD38-) oder mit Einschränkung auch die Funktionalität (Selbsterneuerung, Differenzierung, Koloniebildung) eine schnelle Unterscheidung nicht erlaubt (Liu *et al.*, 2009; Viale *et al.*, 2009).

3.5 Zusätzliche Angaben

— keine —

3.6 Gesamtübersicht und Schlußfolgerungen

Es wurden die wichtigsten pharmakodynamischen, pharmakokinetischen und toxikologischen Aspekte von humanen Stammzellen unterschiedlicher Quelle (Knochenmark, peripheres Blut und Nabelschnurblut) genannt, mit Literaturstellen belegt und soweit erforderlich diskutiert. Die wissenschaftliche Bewertung der präklinisch erhobenen Daten erfolgt kontinuierlich bereits seit mehr als 50 Jahren und wird stetig dem neuesten Kenntnisstand angepasst.

3.7 Literatur und Referenzen

Es wurde ein alphabetisches Gesamtverzeichnis unter Kapitel 4.9 erstellt.

4. Klinischer Überblick

4.1. Klinische Entwicklungsstrategie und Programm

Im Folgenden wird der aktuelle Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse anhand von Veröffentlichungen dargelegt; hierbei finden auch Veröffentlichungen Berücksichtigung, in denen Antragssteller für die Genehmigung von Stammzellzubereitungen die Ergebnisse ihrer eigenen klinischen Studien darstellten oder diese im Rahmen grosser multizentrischer Studien ausgewertet wurden.

4.2. Übersicht zur klinischen Pharmakologie

Die allgemeine Pharmakologie untersucht die allgemeingültigen Gesetzmäßigkeiten der Wechselwirkung zwischen Arzneimittel und Organismus unabhängig vom Arzneimittel, während die klinische Pharmakologie sich mit der speziellen Wirkung des Arzneimittels bei Anwendung am Menschen beschäftigt (Pharmakotherapie). Neben den bereits im präklinischen Teil abgehandelten Bereichen der Pharmakodynamik und Pharmakokinetik wird hier insbesondere die klinische Wirksamkeit und Sicherheit von humanen Stammzellzubereitungen im Einzelnen dargestellt und eine kurze Risiko-Nutzen Bewertung vorgenommen.

4.3. Übersicht zur Wirksamkeit/Funktionalität

Die hämatopoetische Rekonstitution nach autologer bzw. allogener Transplantation ist Gegenstand zahlreicher Übersichtsarbeiten (Dreger-P. and Schmitz, 1998; Pettengell, 1998; Spitzer and Adkins, 1998). Historisch gesehen wurden in den 70-er Jahren eine unvollständige oder deutlich verzögerte hämatopoetische Rekonstitution und die damit verbundenen Komplikationen beschrieben (Appelbaum et al., 1978). Zu dieser Zeit wurden im autologen Transplantationsansatz vor allem Stammzellen aus dem Knochenmark transplantiert. Die Grunderkrankung einschließlich einer potentiellen Knochenmarkinfiltration und die Stammzelltoxizität der vorangegangenen Therapie waren die wichtigsten negativen Einflussgrößen auf die hämatopoetische Rekonstitution. Ebenso wurde zu jener Zeit keine minimale Stammzelltransplantationsdosis anhand des CD34+ Zellgehaltes festgelegt. Die mäßige, durch Chemotherapie induzierte Mobilisation peripherer Blutstammzellen erbrachte keinen nennenswerten klinischen Durchbruch (Kessinger *et al.*, 1986; Körbling *et al.*, 1986). Jedoch wurde im Tiermodell die grundsätzliche Machbarkeit gezeigt.

Erst durch die dauerhafte Einführung von Wachstumsfaktoren mit einem stark stammzellmobilisierenden Effekt bei nachgewiesener guter Patientenverträglichkeit wurden Stammzellen aus dem peripheren Blut zu einer ernsthaft zu erwägenden Alternative. Periphere Blutstammzellen tragen zur Verkürzung der Dauer der hämatopoetischen Rekonstitution im Vergleich zu Knochenmarkstammzellen signifikant bei. Dies wird im Allgemeinen darauf zurückgeführt, dass ein Anteil peripherer Blutstammzellen bzw. der mononukleären Zellfraktion nach G-CSF Stimulation die Eigenschaft von liniendeterminierten Vorläuferzellen innehat und diese im Vergleich zu unreiferen Stammzellen früher zur Blutzellbildung beitragen („short-term engraftment“). Die gerade erwähnten unreiferen Stammzellen siedeln sich ebenfalls in Knochenmarknischen an und tragen nach mehreren Zellteilungen zur permanenten Hämatopoese („long-term engraftment“) bei.

Anfängliche Bedenken bezüglich des Potentials von Blutstammzellprodukten im Empfängerorganismus eine persistierende und komplette Hämatopoese zu gewährleisten, wurden nicht bestätigt. Die offensichtlichen Vorteile der Blutstammzellen hinsichtlich der einfachen

Gewinnung und schnellen hämatopoetischen Rekonstitution haben zusammen mit diversen anderen Verbesserungen in den supportiven Maßnahmen (Antibiotika, Antimykotika, Reinraumzimmer) die Toxizität und Letalität der autologen PBSZT im Vergleich zur klassischen autologen KMT deutlich gesenkt. Sowohl deskriptive Untersuchungen (Oberflächenantigene, Koloniebildung) als auch funktionelle Untersuchungen im Tiermodell zeigten kein offensichtliches Defizit der mobilisierten CD34+ Stammzellen bezüglich ihrer Befähigung zur Selbsterneuerung und „pluripotenten“ Differenzierung. Nach nahezu 20-jähriger klinischer Erfahrung mit der Transplantation peripherer Blutstammzellen anstelle von Knochenmark steht heute bezüglich der hämatopoetischen Rekonstitution im Empfängerorganismus die prinzipielle Gleichwertigkeit im Regelfall außer Frage (Bensinger et al., 2001; Blaise et al., 2000; Schmitz et al., 2006). Hieraus folgt konsequenterweise, dass heutzutage bei der autologen Transplantation die PBSZT die KMT weitestgehend verdrängt hat.

Auch wenn die molekularen Mechanismen der Stammzellmobilisation und „homing“ im Einzelnen nicht vollständig verstanden sind, wird im Allgemeinen jedoch davon ausgegangen, dass insbesondere Zell-Zell-Kontakte zwischen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen einerseits und zellulären Elementen der Mikroumgebung namentlich Knochenmarkstromazellen andererseits von zentraler Bedeutung sind. Die Retention und Mobilisation von Stammzellen entsprechen wie „zwei Seiten einer Medaille“ unterschiedlichen Funktionszuständen in der Pharmakodynamik von hämatopoetischen Stammzellen. Diese zellulären Interaktionen werden mit einigen Adhäsionsmoleküle in enger Verbindung gebracht (Übersichtsartikel: (Pelus and Fukuda, 2008)).

Die molekularen Mechanismen der G-CSF induzierten Stammzellmobilisation sind nicht vollständig geklärt. Aufgrund des späten Wirkungseintritts wird ein indirekter Mechanismus unter Beteiligung von proteolytischen Enzymen (Elastase, Cathepsin G, Metalloproteinasen) favorisiert. Unter den bekannten Adhäsionsmolekülen befinden sich Chemokine und Chemokin-Rezeptoren wie zum Beispiel die nachfolgend genannten Achsen: MIP1a/CCR1, SDF1/CXCR4, IL8/CXCR2 bzw. GRO-Proteine/CXCR2. Grundsätzlich werden entweder Analoga der Liganden (z.B. von SDF1-Agonist) oder Rezeptorantagonisten (CXCR4-Antagonist) experimentell erprobt (Broxmeyer et al., 2005). Ihnen ist eine im Tierexperiment nachgewiesene sehr schnelle Rekrutierung (<1h) von Stammzellen in die Blutzirkulation gemeinsam. Darüber hinaus konnte unter anderem gezeigt werden, dass auch blockierende Antikörper, wie zum Beispiel anti-VLA-4 Antikörper einen stammzellmobilisierenden Effekt haben und die G-CSF Wirkung über einen unabhängigen Mechanismus verstärken (Papayannopoulou, 2000). Das „very late antigen 4“ gehört zur Familie der β 1-Integrine und ist im Vergleich zu Knochenmarkstammzellen geringer und funktionell eingeschränkt auf zirkulierenden Blutstammzellen exprimiert (Lichterfeld et al., 2000). VLA-4 bindet an das Adhäsionsmolekül VCAM 1 (vascular cell adhesion molecule).

Ende der achtziger Jahre berichtete das Hopital Saint-Louis in Paris von der ersten Nabelschnurblut-Transplantation bei einem Patienten mit Fanconi Anämie (Gluckman et al., 1989). Neben den bereits ausführlich besprochenen Stammzellquellen Knochenmark und peripheres Blut gewinnt seitdem auch die Transplantation von Nabelschnurblut an Bedeutung, auch wenn im Vergleich zu den USA in Deutschland die Zahl der Transplantationen noch gering ist (Gluckman et al., 2005; Kögler et al., 1999). Aufgrund ihrer größeren Unreife ist die Kinetik der hämatopoetischen Rekonstitution nach Transplantation von Nabelschnurblut jedoch verlangsamt (Hong and Deeg, 1994; Kurtzberg et al., 1996; Urbano-Ispizua, 2007). Die verzögerte Erholung der Granulozyten, Thrombozyten und der immunkompetenten Zellen führt vermehrt zu Infektionskomplikationen und bedingt eine höhere transplantationsassoziierte Mortalität (Kurtzberg et al., 1996; Laughlin et al.,

2004; Rocha et al., 2004).

Allogene Transplantationen von Nabelschnurblut werden nur eingesetzt, wenn kein HLA Klasse I und Klasse II (10 auf 10 bzw. 8 auf 8) kompatibler, unverwandter adulter Spender zur Verfügung steht (Gluckman *et al.*, 2005). Jedoch besteht die Einschränkung, dass nur wenige Nabelschnurtransplantate für normalgewichtige Erwachsene aufgrund des geringen Volumens und der daraus resultierenden geringen absoluten CD34+ Stammzellendosis geeignet sind (Gluckman et al., 2004; Migliaccio et al., 2000). Richtlinienkonform wird im Regelfall eine Mindestdosis von 3×10^7 kernhaltiger Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers gefordert, nicht jedoch eine Mindestdosis von CD34+ Stammzellen. Nach den Angaben der EBMT (EBMT, 2008) werden 3×10^7 kernhaltige Zellen / kg KG im Median erreicht (dieser Wert wird jedoch nicht als definierte Untergrenze angesehen), währenddessen die Konzentration an CD34+ Zellen mit $0,2 \times 10^6$ /kg KG im Median sehr limitiert war. Hofmeister et al. (Hofmeister *et al.*, 2007) haben kürzlich diese offensichtlichen Limitationen der Transplantierbarkeit zum Anlass genommen, über die ex-vivo Expansion von Nabelschnurstammzellen durch die Manipulation von Signaltransduktionswegen als möglichen Ausweg zu berichten.

4.4. Übersicht zur Sicherheit

Die Bewertung der Sicherheit von Stammzellzubereitungen beinhaltet Faktoren bzw. Risiken, die aus der zellulären Zusammensetzung einschließlich der arzneilich wirksamen „Substanz“ (hier: Stammzellen), der sonstigen zellulären und nicht zellulären Bestandteilen und dem Zusatz eines Einfriermediums resultieren.

Bezüglich der Stammzellen selbst müssen hier laut Empfehlung der Bundesoberbehörde tumorigene und immunologische Aspekte erörtert werden. Die Möglichkeit bzw. das Risiko einer krebserregenden oder krebswachstumsfördernden Wirkung wird für adulte Stammzellen nur dann angenommen, wenn sie z.B. zu lange kultiviert werden. Bei den hier beantragten Stammzellzubereitungen und in den meisten klinischen Studien werden die adulten Stammzellen unmittelbar, kurz nach der Entnahme oder nach Kryokonservierung dem Spender selbst (autolog) oder einem anderen Empfänger (allogen) verabreicht, ohne dass die Stammzellen in einem Nährmedium vermehrt würden und darin proliferieren und altern könnten. Unter diesen Voraussetzungen wurden bis dato keine Hinweise für ein krebserzeugendes Potenzial der adulten Stammzellen gefunden (Donner, 2007).

Auch bei der Bewertung des generellen Nutzens dieser Therapie (Konditionierung und Transplantation) seitens des unabhängigen Institutes für Qualität und Wirtschaftlichkeit wurden keine Hinweise für eine Krebsbildung infolge der Stammzelltransplantation beschrieben (Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG), 2007). Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass von humanen hämatopoetischen Stammzellen in dieser Hinsicht keine Sicherheitsbedenken ausgehen und der Primärnutzen in ihrer Funktionalität zur hämatopoetischen Rekonstitution zu sehen ist. Der gesundheitsökonomische Gesamtnutzen der autologen bzw. allogenen Stammzelltransplantation ist nicht Gegenstand dieser Stellungnahme.

Für die autologe Stammzelltransplantation wird vom Patienten selbst das „Ausgangsmaterial“ gewonnen, das die zu transplantierenden Stammzellen enthält. Hierfür wird der Patient einer Spendetauglichkeitsuntersuchung unterzogen, die auch eine infektionsserologische Standarduntersuchung beinhaltet. Weder die Spendetauglichkeitsuntersuchung noch die Infektionsserologie sind im Detail Gegenstand dieser fachlichen Stellungnahme. Die

pharmazeutischen Unternehmer und Antragsteller von Genehmigungen für Stammzellzubereitungen haben ihre Festlegungen im Genehmigungsantrag benannt. Diese sollten in der Regel gesetzes- und richtlinienkonform sein. Abweichungen hiervon sind im „Gutachten“ nicht weiter zu begründen.

Für die allogene Stammzelltransplantation wird auf einen gesunden freiwilligen Spender zurückgegriffen. Dieser kann verwandt oder unverwandt sein. Die enorme Vielfalt der menschlichen Gewebemerkmale (HLA-Polymorphismen) macht die Suche nach einem nicht verwandten Spender extrem schwierig. Der nationale, gegebenenfalls internationale Suchprozess wird in der Regel durch nationale Register so zum Beispiel dem Zentralen Knochenmarkspender-Register Deutschland (ZKRD) organisiert. Die Spenderauswahl sollte der Richtlinie 2006/17/EG der Kommission zur Durchführung der Richtlinie 2004/23/EG des Europäischen Parlaments und des Rates (Europäische Kommission, 2006; Europäisches Parlament und Rat, 2004) hinsichtlich technischer Vorschriften für die Spende, Beschaffung und Testung von menschlichen Geweben und Zellen (2006) und den Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) (Bundesärztekammer (BÄK), 2010) entsprechen. Näheres wird im Rahmen dieses „Gutachten“ zu der Spenderauswahl allogener Transplantation nicht festgestellt.

In den letzten 15 Jahren wurden national und international sehr große Anstrengungen unternommen, gesunde Mitbürger und -innen davon zu überzeugen, sich als Stammzellspender zur Verfügung zu stellen. Heute existiert ein international vernetztes System an sogenannten Spenderdateien. In Deutschland stehen mehr als 6 Millionen Menschen und weltweit mehr als 25 Millionen Menschen als potentielle Stammzellspender zur Verfügung. Von diesen Spendern ist eine Reihe an transplantationsrelevanten Gewebemerkmale bekannt, die eine prinzipielle Verträglichkeit (Kompatibilität) zwischen Patient und Spender anzeigen können. Das System an Gewebemerkmale (HLA) ist ein sehr komplexes und hoch polymorphes System. Gegenwärtig werden vier bis fünf Genorte (HLA-A, -B, -C, -DR und mit Einschränkung DQ) berücksichtigt; bei einer vollen Übereinstimmung aller Allele (2 Allele pro Genort) spricht man von einem „10/10-match“ bzw. „8/8-match“ (Mattsson, 2008; Ottinger et al., 2001; Petersdorf, 2007).

Der zweite deutsche Konsensus zur immungenetischen Spenderauswahl bei allogener Stammzelltransplantation wurde 2001 publiziert (Ottinger *et al.*, 2001); der dritte Konsensus dagegen nicht. Der zusätzliche Gewinn einer DP- und DQ-Typisierung wird als marginal gesehen, bei mehreren vorhandenen Spendern sollte diese Untersuchung aber zusätzlich durchgeführt und die Merkmalsausprägung berücksichtigt werden. Der Grad der erforderlichen Verträglichkeit wird durch das Transplantationszentrum unter Berücksichtigung der klinischen Dringlichkeit festgelegt. Bei malignen Erkrankungen oder fortgeschrittenen Erkrankungsstadien ist der Grad der HLA-Übereinstimmung weniger bedeutsam, da durch Verstärkung des Graft-versus-Leukämie-Effektes die zusätzlichen Risiken einer stärkeren GVH-Reaktion ausbalanciert werden können.

Seit längerem wird auch - bei fehlenden unverwandten Spendern mit hoher HLA-Übereinstimmung - auf die Eltern des Patienten zurückgegriffen und eine haploidente Stammzelltransplantation durchgeführt (siehe Übersichtsartikel: (Aversa, 2008; Dey and Spitzer, 2006)). Um der nach HLA-differenter Transplantation massiv erhöhten Rate schwerer GVH Reaktionen zu begegnen, werden solche Transplantate in der Regel nur zusammen mit zusätzlichen Maßnahmen zur Elimination oder Suppression von T-Zellen eingesetzt. Verbesserungen der Konditionierungstherapie und der Immunsuppression post-transplantationem einerseits und die Transplantation von Megadosen an CD34+ Stammzellen ($>10 \times 10^6$ /kg KG) mit nahezu vollständiger T-Zell-Depletion (2×10^4 /kg KG)

andererseits haben das klinische Outcome signifikant verbessert (Aversa et al., 2005; Chen et al., 2006). Die Bedeutung von nicht HLA-Antigenen für die Spenderauswahl wird aktuell in wissenschaftlichen Studien untersucht (Horowitz and Confer, 2005). Eine Untersuchung dieser Gen-Loci wird aber noch nicht routinemäßig in der klinischen Spenderauswahl eingesetzt.

Diese und weitere zelltherapeutischen Manipulationen (sog. graft engineering) wie zum Beispiel durch regulatorische T-Zellen, immunmodulierende mesenchymale Stammzellen oder die kombinierte T- und B-Lymphozytendepletion unter Beibehaltung weiterer akzessorischer Zellen im Transplantat (u.a. NK-Zellen mit KIR-Status) werden zu neuen Formen der allogenen Stammzelltransplantation führen (Giebel et al., 2003; Mattsson, 2008; Rezvani and Storb, 2008). Hierbei steht die Trennung eines gewünschten GVL-Effektes von einem unerwünschten GVHD-Effekt im Vordergrund. Diese heute noch experimentellen zelltherapeutischen Ansätze und die ebenfalls komplexen Abwägungsprozesse zur Frage der „Noch-Akzeptanz“ von bestimmten HLA-Mismatch-Konstellationen in Abhängigkeit von diversen weiteren klinischen Einflussgrößen (wie z.B. Grunderkrankung, Alter, Therapieversagen, Konditionierungstherapie, fehlende Therapiealternative) sind im weiteren nicht Gegenstand dieser Stellungnahme. Die jeweiligen Risiko-Nutzen-Analysen unterliegen gemäß dem neuesten Kenntnisstand durch die Ergebnisse zahlreicher klinischer Studien und dem kontinuierlichen wissenschaftlichen Diskurs mit international anerkannten Experten einem ständigen Anpassungsprozess. Gleiches gilt auch für die Bedeutung des HLA-Systems bei Nabelschnurbluttransplantation (Gluckman *et al.*, 2005).

Für aufgereinigte autologe bzw. allogene Stammzellzubereitungen sind die Sicherheitsrisiken ausführlicher abzuwägen. Im Rahmen dieser immunomagnetischen Prozessierungsverfahren kommen murine Primärantikörper, paramagnetische Eisenpartikel und Pufferlösungen zum Einsatz, die nur zum Teil vor der Kryokonservierung bzw. vor intravenöser Transfusion entfernt werden. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle der gutachterlichen Stellungnahme auf die nach Stand von Wissenschaft und Technik vermutete Unbedenklichkeit immunomagnetischer Isolationsverfahren eingegangen und die Verwendung dieser Medizinprodukte bei der Herstellung von autologen und allogenen Stammzellzubereitungen nach Nutzen-Risiko-Abwägung als sinnvoll erachtet.

Im Regelfall werden zur Herstellung der CD34, CD133, CD3 und CD19 Antikörper Maus-Hybridomzellen in proteinfreien Medien in-vitro kultiviert und die sezernierten Primärantikörper anschließend aufgereinigt. Mittels Nanofiltration werden potentiell kontaminierende Viren abgetrennt und mittels einer Solvent-Detergent-Behandlung lipidumhüllte Viren effektiv inaktiviert. Auf Mycoplasmenfreiheit der Hybridomzellen wird durch Anwendung sensitiver Testverfahren (PCR, Direktkultivierung auf speziellem Agar) durch den Medizinproduktehersteller getestet. Eine bakterielle Verunreinigung des durch immunomagnetische Zellisolierung hergestellten Stammzellproduktes kann durch Verwendung steriler Einmalmaterialien, einer dem GMP-Standard entsprechenden aseptischen Prozessierung (Reinraum) und durch mikrobiologische Testung der Einzelcharge vor Transplantation weitestgehend ausgeschlossen werden.

Zum besseren Verständnis des Nachfolgenden sei darauf hingewiesen, dass die Definition von Medizinprodukten und deren Qualitätsanforderungen in der europäischen Richtlinie 93/42/EWG (Europäischer Rat, 2007) und im nationalen Medizinproduktegesetz (MPG) (Bundesrepublik Deutschland, 2009) zu finden sind. Medizinprodukte unterscheiden sich von Arzneimitteln dadurch, dass ihre bestimmungsgemäße Hauptwirkung überwiegend auf physikalischem Weg erreicht wird. Hierbei erfolgt eine Einteilung der Medizinprodukte in vier Risikoklassen (I, IIa, IIb und III), die auf den jeweilig erforderlichen Zulassungsprozess (Konformitätsbewertungsverfahren von Produkten des freien Warenverkehrs durch neutrale, unabhängige und kompetente Einrichtungen (sog.

Benannte Stellen)) für das erstmalige Inverkehrbringen erheblichen Einfluß haben. Nach erfolgreicher Durchführung wird das Medizinprodukt mit einer CE-Kennzeichnung versehen.

Medizinprodukte mit einem hohen Gefahrenpotential (zum Beispiel durch Inhaltsstoffe tierischen Ursprungs) werden der Klasse III zugeordnet, so auch die o.g. Antikörperreagenzien murinen Ursprungs. Neben dem weitestgehenden Ausschluß infektiöser Übertragungsrisiken sind bei der therapeutischen Anwendung immunmagnetisch vorbehandelter Stammzellzubereitungen auch Immunisierungsreaktionen (Humane-Anti-Maus-Antikörper-Antwort, Humane-Anti-Schaf-Antikörper-Antwort) und die pharmakologisch-toxikologische Bewertung der paramagnetischen Mikropartikel zu berücksichtigen. In diesem Zusammenhang wird auf die umfangreichen Untersuchungen der jeweiligen Medizinproduktehersteller verwiesen.

Zusammenfassend liegen den Autoren dieser Stellungnahme jedoch keine Hinweise auf eine klinisch relevante und persistierende Immunantwort gegen Maus-Antikörper bzw. Schaf-Antikörper vor, die bei der weitgehenden Entfernung der in-vitro eingesetzten Antikörper (insbesondere bei den Depletionsverfahren) und der zumeist einmaligen Anwendung auch nicht zu erwarten ist. Ein Vergleich zu therapeutisch (in-vivo) eingesetzten Antikörpertherapien mit der Gefahr der Neutralisation der Maus-Antikörper bei zunehmender Therapiedauer ist hier sicherlich nicht zulässig.

Für die klinisch in Deutschland angewandten immunomagnetischen Positiv- oder Negativselektionsverfahren finden unterschiedliche paramagnetische Mikropartikel (magnetische Teilchen mit einem „polymeren Überzug“) Anwendung. Hier sind zum Beispiel die relativ grossen (~4,5µm Durchmesser), spheroiden Polystyren-„Beads“ (M-450) der Firma Dynal im Isolex300i System der Firma Baxter zu nennen, die mit einem Sekundärantikörper (Schaf-Anti-Maus-IgG) kovalent verbunden sind, der die anti-CD34 (Maus-Anti-Human) markierten Stammzellen erkennt. Nach CD34-Isolierung erfolgt die weitgehende Abtrennung des Antikörper-Beads-Komplexes von der Zelloberfläche mittels eines nicht näher definierten Oktapeptids. Die so aufgereinigten und behandelten Stammzellen scheinen sich regelhaft in die Markräume des Knochenmarks einzunisten, so dass die hämatopoetische Rekonstitution prinzipiell vergleichbar ist mit der nach Transplantation von nicht-selektierten Stammzellen. Eine leicht verzögerte Erholung der Thrombopoese (Tag14 versus Tag11) ist beschrieben worden; die geringe Fallzahl und niedrige CD34+ Transplantationsdosis erlauben jedoch hierzu keine evidenzbasierte Aussage, zumal in eine Risiko-Nutzen-Betrachtung die Möglichkeit einer risikoarmen prophylaktischen Thrombozytensubstitution einfließen würde.

Die Firma Miltenyi-Biotec verwendet dagegen sehr kleine paramagnetische Nanopartikel (~60nm) mit einer Eisen-Dextran-Matrix unter Verwendung eines magnetischen Hochintensitätsfeldes. Diese patentierte Technologie findet als geschlossenes, GMP-konforme CliniMACS System der Firma Miltenyi Biotec ihre klinische Anwendung. Die insbesondere bei der CD34+ bzw. CD133+ Positivselektion nicht entfernten, jedoch gebundenen Komplexe aus Antikörper und Eisen-Dextran-Partikel scheinen nach heutigem Kenntnisstand die Stammzellfunktion nicht zu beeinträchtigen und eine mit nichtselektierten Stammzellzubereitungen vergleichbare, dauerhafte hämatopoetische Rekonstitution zu ermöglichen, soweit sie in derselben Konzentration transplantiert werden. Diese Komplexe werden im retikulohistiozytärem System (einem Teil des mononukleär-phagozytärem Systems, insbesondere durch Markophagen der Milz und Leber phagozytiert und lysosomal abgebaut. Das Eisen steht nachfolgend dem Körper zur Verfügung. Eine Freisetzung von toxikologisch bedenklichen freien Eisenionen in die Blutzirkulation konnte nicht nachgewiesen werden. Es sei darauf hingewiesen, dass zum Beispiel Eisen-III-hydroxid-Dextran zur intravenösen

Gabe zugelassen ist und Eisen-Dextrane in der Magnetresonanztomographie als Kontrastmittel eingesetzt werden. In sehr seltenen Fällen könnte der Dextrananteil dieser Mikropartikel bei Patienten mit präformierten Antikörpern gegen Dextran zu anaphylaktischen Reaktionen führen. Im Vergleich zur intravenösen Applikation zu therapeutischen Zwecken ist der Eisendextrangehalt von solchen Stammzellzubereitungen sehr gering. Bis heute wurde ein anaphylaktischer Schock bei stammzelltransplantierten Patienten nicht beschrieben. Zusammenfassend liegen den Autoren dieser Stellungnahme keine präklinischen oder klinischen Daten zu Stammzellzubereitungen, die mittels immunomagnetischer Trennungsvorgänge hergestellt wurden, vor, die den Nachweis einer toxikologischen Bedenklichkeit bezüglich der eingesetzten paramagnetischen Partikel erbracht hätten.

Im Gegensatz zu den Antikörperreagenzien werden Pufferlösungen der Klasse IIa und die Schlauchsysteme bzw. die verbundenen Instrumente der Klasse IIb zugeordnet. In den oben genannten Systemen finden phosphatgepufferte, isotone Salzlösungen Anwendung, die nicht-toxisch sind und steril und pyrogenfrei produziert werden. Diese Puffer können Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat enthalten, so zum Beispiel PBS/1mM Edta pH7.2 oder dem PBS wird - soweit notwendig Edta in Apothekenqualität (European Pharmacopeia). Edta ist als Tetraanion ein Chelatbildner und komplexiert zum Beispiel zweiwertige Kationen wie Calcium und Magnesium. Dies verhindert die Aktivierung von Monozyten zu Makrophagen, die die zugegebenen Komplexe aus Antikörper und paramagnetischen Mikropartikeln ansonsten rasch phagozytieren würden. Darüber hinaus wird in der Regel als Arzneimittel zugelassenes humanes Serumalbumin (zum Beispiel 1%) zugegeben. Nach erfolgreicher Positiv- bzw. Negativisolierung erfolgt in der Regel die Kryokonservierung in hierzu geeigneten, DMSO-haltigen Einfrierlösungen (autologes Plasma, Plasmaersatzlösung auf HSA-Basis) mit und ohne Waschschrift bzw. Volumeneinengung.

Die jeweiligen Medizinproduktehersteller der oben genannten immunomagnetischen Selektionsverfahren verfügen über umfangreiches, im Rahmen der Konformitätsbewertung geprüftes Informationsmaterial. Diese Dokumentation enthält auch Daten bezüglich der pharmakologisch-toxikologischen Bewertung ihrer CE-zertifizierten immunomagnetischen Reagenzien und Separationssysteme und kann gegebenenfalls unter Bezugnahme auf diese gutachterliche Stellungnahme oder als sogenannter „Masterfile“ beim Paul-Ehrlich-Institut eingereicht bzw. hinterlegt werden.

Für kryokonservierte Stammzellzubereitungen sind auch zusätzliche Sicherheitsrisiken zu bedenken. Im Vordergrund der Begutachtung möglicher Risiken der nichtzellulären Bestandteile steht die Anwendung von Substanzen zur Kryokonservierung, wie z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO) und Hydrxyethylstärke (HAES). Letzteres ist als Arzneimittel zugelassen und wird als Infusionslösung zum kolloidalen Volumenersatz gegeben. DMSO findet bei allen Stammzellquellen (Peripheres Blut, Knochenmark, Nabelschnurblut) prinzipiell Anwendung; dies gilt in erster Linie für patienteneigene Stammzellzubereitungen, die deutlich vor der Hochdosischemotherapie oder Ganzkörperbestrahlung gesammelt und zur späteren Transplantation tiefgefroren eingelagert werden. Währenddessen wird in der allogenen Situation vorrangig der Zeitpunkt der freiwilligen Stammzellspende mit dem der Transplantation synchronisiert.

Der Volumenanteil des Kryoprotektivums kann differieren, gewöhnlich liegt dieser bei 5-10% Endkonzentration. Eine genaue Analyse der Auswirkungen von DMSO im Transplantat wird in einem gesonderten DMSO-Gutachten durchgeführt (siehe Anlage, Zusammenfassung und Bewertung der toxiko-pharmakologischen Daten und Informationen zu Dimethylsulfoxid (DMSO) im

Hinblick auf seine Verwendung in den oben genannten Arzneimitteln von Dr. Peter Günzel (Berlin) und Prof. Dr. Hermann Eichler (Homburg/Saar)).

4.5 Klinischer Überblick zum Stand der autologen Transplantation mit besonderer Berücksichtigung von Aufreinigungsverfahren.

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 and Small, 1995). Die Rationale zur Verwendung autologer CD34 selektionierter Stammzellen 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) zu 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 (Brugger et al., 1994; Gee, 1995; Lebkowski et al., 1992; 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 (Peripheres 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. (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. (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. (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. (Dreger et al., 1999) über 20 Lymphompatienten, die ein CD34 positiv-selektioniertes Transplantat nach einer Hochdosistherapie 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. (Lemoli et al., 2000) berichteten über insgesamt 31 Patienten die mit CD34 positiv-selektionierten Stammzellen autolog transplantiert wurden. Ähnliche Ansätze verfolgten die Studien von Barbui et al. (Barbui et al., 2002) bei 30 Patienten und Stewart et al. (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 Immunrestitution 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. (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 Autoimmunerkrankungen werden CD34 positiv-selektionierte Stammzellen seit Jahren eingesetzt. Moore et al. (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 zweiarmige 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. (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. (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. (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. (Statkute et al., 2007) fassten die Erfahrungen der Northwestern University Chicago mit autologer Stammzelltransplantation bei Autoimmunerkrankungen zusammen und berichteten über 130 CD34-positiv-selektionierten 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.

4.6 Klinischer Überblick zum Stand der allogenen Transplantation mit besonderer Berücksichtigung von Aufreinigungsverfahren und haploidenter Transplantation.

4.6.1 Einführung

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 trotz intensiver Suche kein geeigneter 10/10 HLA-identer Spender rechtzeitig 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
- 5-8/10 match Familienspender (haploidente Transplantation)
(in der Regel ist ein Elternteil oder Kind 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 immunogenetischen 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. Dementsprechend werden Empfänger-Spender-Konstellationen mit nur 1 Allel- oder Antigenmismatch (9/10 match) heute in der Regel den HLA-identen (10/10 match) Stammzelltransplantationen gleichgestellt.

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.

Neben der Induktion eines anti-Tumor Effekts dient die Transplantation von allogenen Stammzellen 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.

Das insbesondere in der haploidentischen Situation in wenigen Fällen zu beobachtende sog. primäre Transplantatversagen („graft failure“) ist in der Regel nicht auf die die zelluläre Zusammensetzung des Transplantates, sondern auf eine Abstoßungsreaktion zurückzuführen, die durch von der Konditionierungstherapie nicht eliminierte zytotoxische T-Lymphozyten des Empfängers verursacht wird. 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) (Aversa, 2008; Bachar-Lustig et al., 1995; Dvorak et al., 2008; Handgretinger et al., 2001; Reisner et al., 1999; Reisner et al., 2005). Heute sind bereits Therapiekonzepte im Einsatz (siehe unten), die eine solche CD34+-Megadosis nicht mehr erforderlich machen.

Die Transplantation von allogenen Stammzellen dient 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 immunomagnetischen Selektionsverfahren, kotransplantiert wird.

Im Rahmen der allogenen haploidentischen Stammzelltransplantation kommen unterschiedliche immunomagnetische 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

Immunmagnetische Verfahren sind in der Lage, T-Lymphozyten effizient zu entfernen. Im Kontext der haploidenten Transplantation wird in der Regel darauf geachtet, dass die Zahl übertragener T-Zellen unter einem für die jeweilige klinische Situation definierten Wert liegt. In der Regel liegt dieser Wert zwischen $0,25$ bis $1,0 \times 10^5$ /kg KG, da sonst mit einem sehr hohen Risiko von schweren GvH-Reaktionen gerechnet werden muss. Welche Zahl an T-Zellen in der jeweiligen Situation akzeptabel bzw. wünschenswert ist, hängt von zahlreichen Parametern wie der immunsuppressiven Therapie, dem Rezidivrisiko und dem Vorliegen weiterer GvH-Risikofaktoren ab.

Die drei immunmagnetischen Verfahren sind in der Lage, B-Lymphozyten effizient 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 $1,0 \times 10^5$ /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-Tumor (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, es sich durchweg um fortgeschrittene und ausgedehnt vorbehandelte Patienten handelt, denen keine alternative lebenserhaltende Therapieoption angeboten werden kann, so dass die Durchführung kontrollierter und randomisierter Studie nicht möglich ist. 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.

4.6.2 CD34 Selektion

4.6.2.1 Einführung

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 (Brugger *et al.*, 1994; Gee, 1995; Lebkowski *et al.*, 1992). Nachfolgend wurde die CD34-Selektion zur T-Zelldepletion im Rahmen von allogenen Stammzelltransplantationen eingesetzt (Dreger *et al.*, 1995; Lane *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 durchgesetzt (Lang *et al.*, 1999; Ringhoffer *et al.*, 2004; Schumm *et al.*, 1999).

4.6.2.2 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 $>10 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg KG) 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, 2008; Aversa *et al.*, 2008; Aversa *et al.*, 1994; Aversa *et al.*, 1998; Aversa, Tabilio *et al.*, 2001; Aversa *et al.*, 2002; Aversa *et al.*, 2005; Aversa, Velardi *et al.*, 2001).

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 akuten 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 26 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 $11,9 \times 10^6$ 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 >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 $20,7 \times 10^6$ /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 >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-selektioniertes 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, Klingebiel et al., 2004). Ein erfolgreiches primäres Engraftment erfolgte bei 84% der Patienten nach im Median 11 Tagen. Die Inzidenz von akuter GVHD >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. beobachteten 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 die indirekte T-Zell und B-Zelldepletion (i.d.R. jeweils $< 1 \times 10^5$ CD3+ bzw. CD19+ Zellen/kgKG) durch CD34-Selektion und die Gabe einer Megadosis (i.d.R. definiert als $>10 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kgKG) auch im HLA-mismatch ($<8/10$ match) 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 aktueller Therapiekonzepte (Bader et al., 2010; Federmann et al., 2009) und besonderen klinischen Umständen (u.a. Körpergewicht) das klassische „Megadosiskonzept“ verlassen werden kann und auch niedrigere Stammzell Dosen ($4\text{--}8 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg KG) akzeptabel sind, die der HLA-identen (10/10) oder single-mismatch (9/10) allogenen Stammzelltransplantation entsprechen.

4.6.2.3 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 Cephate SC System CD34-selektionierten 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-selektionierten 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-selektionierten 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-selektioniertem Knochenmark (KM), während 56 Patienten mit CD34-selektionierten 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 $2,0 \times 10^5$ /kg, $p < 0,0001$) und CD34-Zellen (Median: $3,6$ versus $0,9 \times 10^6$ /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 Thrombozytenengraftment. 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-Mismatche. Primäres Engraftment erfolgte bei 83% der Patienten mit im Median 11 Tagen bis >500 Neutrophile/ μL . Die Inzidenz akuter GVHD $>II$ 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.

Gemäß der oben zitierten Literatur und entsprechend der Erklärung im Gutachten von Mai 2009 wird eine CD34+ Zellzahl von $4-8 \times 10^6$ CD34+ Zellen pro kg Körpergewicht in der HLA-identen, allogenen Stammzelltransplantation auch nach CD34 Positivselektion angestrebt.

Die Inzidenz der GVHD ist eng abhängig von verwendeter Immunsuppression und T-Zelldosis im Transplantat. Der Grenzwert übertragener T-Zellen ist von zahlreichen klinischen Faktoren abhängig und muss für die jeweilige Transplantationsform und Ausgangssituation individuell festgelegt werden. Eine Zahl von 1×10^5 CD3+ T-Zellen/kg Körpergewicht kann in den meisten Situationen als möglichst nicht zu überschreitende Obergrenze angesehen werden. Bei ausreichender T-Zelldepletion kann die Inzidenz der GVHD deutlich gesenkt werden und sogar auf eine Immunsuppression nach Transplantation verzichtet werden. Die B-Lymphozyten werden

indirekt im ähnlichen Umfang entfernt (Zielwert: $< 1 \times 10^5$ CD19+ Zellen pro kg KG).

4.6.3 CD3/CD19 Depletion

4.6.3.1 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 Immunrestitution nach sehr effizienter T-Zelldepletion mittels CD34-Selektion mit entsprechend schwerwiegenden Infektkomplikationen 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/kg KG verwendet, steigt die Rate an Transplantatabstoßungen und das Angehen des Transplantats und die Immunrestitution ist stark verzögert (Lang, Bader *et al.*, 2004). Hiervon kann nach heutigem Stand von Wissenschaft und Technik nur im Einzelfall begründet abgewichen werden, so z.B. mit 8×10^6 CD34+ Zellen/kg KG 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 Immunrestitution 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.*, 2008; Bethge *et al.*, 2006; Lang and Handgretinger, 2008). Die Patienten erhielten eine dosisreduzierte Konditionierung mit Fludarabin ($150-200 \text{ mg/m}^2$), Thiotepa (10 mg/kg), Melphalan (120 mg/m^2) 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

$6,8 \times 10^6$ (Range, $3,5-22 \times 10^6$) 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 $3,5 \times 10^6$ 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 (jeweils $< 1 \times 10^5/\text{kg KG}$) 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. Neben dem klassischen Megadosiskonzept von $>10 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg KG, ermöglicht eine effiziente CD3/CD19 Depletion nun eine dosisreduzierte Konditionierung sowie ein rasches Engraftment mit weniger CD34-positiven Zellen (allogene Standarddosis von $4-8 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg KG). 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.

4.6.3.2 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. Es werden die gleichen Spezifikationen bezüglich der CD34 Stammzelldosis und T-Zell- bzw. B-Zellentfernung angestrebt wie bei der CD34 Positivselektion mit einem allogenen, HLA-identen Spender.

4.6.4 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, wobei eine kleine Fraktion an mobilisierten CD133+ Stammzellen kein CD34-Antigen koexprimieren (im Mittel < 10%). 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, Bader et al., 2004). Bitan et al. publizierten 2005 die ersten 5 Patienten, die erfolgreich haploident mit einem CD133-selektionierten Stammzellpräparat transplantiert wurden. Das Engraftment war rasch mit im Median 10 Tagen zum Neutrophilen-Engraftment (>500/ μ L) und 12 Tagen zum Thrombozyten-Engraftment (>20.000/ μ L) (Bitan et al., 2005). Schließlich verglichen Lang et al. 2005 in jeweils kleinen Patientenkohorten alle drei bisher dargestellten Aufreinigungsmethoden. Eine haploidente HSZT wurde bei 39 Patienten nach CD34Selektion, 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 x 10⁶ 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. Auf Basis der oben zitierten und noch nicht sehr umfangreichen Literatur werden die gleichen Spezifikationen bezüglich der CD133 Stammzelldosis und T-Zell- bzw. B-Zellentfernung angestrebt wie bei der Positivselektion von CD34+ Stammzellen unabhängig von der Frage einer HLA-identen oder HLA-nichtidenten allogenen Transplantation.

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.

4.6.5 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 soeben 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 „non inherited 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 therapieassoziiertes 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, $2,5 \text{ mg/kg}$ von Tag -5 to -2 (Huang et al., 2006; Huang et al., 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 therapieassoziiertes 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 AntiCD25 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%.

4.6.6. 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 <i>et al.</i> , 2008	Burroughs <i>et al.</i> , 2008	Huang <i>et al.</i> , 2009	Aversa <i>et al.</i> , 2008	Federmann <i>et al.</i> , 2009	Klingebiel <i>et al.</i> , 2010	Bader <i>et al.</i> , 2010
Patientenzahl	68	28	250	255	60	27 children	59 children
GvHD Prophylaxe	Cy, TAC, MMF	Cy, TAC, MMF	ATG, CSA, MMF, MTX	CD34Selektion	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.
Erkrankungsfreies Überleben	26%	51%	25-70%	25-50%	24%	37%	n.d.
TRM	nd	nd	19-51%	41%	44%	26%	10,70%

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 therapieassoziiierter 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 (Koehl *et al.*, 2005; Ruggeri *et al.*, 2002). In den grundlegenden Versuchen im in-vivo Mausmodell durch Ruggeri *et al.* konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass alloreaktive NK-Zellen zum Anwachsen hämatopoetischer Stammzellen eine wesentliche Rolle spielen (Ruggeri *et al.*, 2002). In ihren Versuchen konnte diese Arbeitsgruppe demonstrieren, dass Mäuse, die mit einer subletalen Knochenmarkdosis 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 CD3/CD19 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 Engraftmentraten von ca. 90% oder mehr zu erzielen sind. (Bader *et al.*, 2007; Lang and Handgretinger, 2008). In einer Zwischenanalyse aus einer laufenden Studie konnten Bader *et al.* zeigen, dass mit ein CD3/CD19 Depletion im Anschluß an eine reduzierte Konditionierung bei 59 Patienten eine Engraftmentrate von 100% erreicht werden konnte (Bader *et al.*, 2010). Mit allen immunomagnetischen 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 post Transplantationem 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 (Bader *et al.*, 2007; Volpi *et al.*, 2001). 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; Bethge *et al.*, 2006; Lang and Handgretinger, 2008).

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 immunomagnetischen 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 immunomagnetischen 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.

4.7 Gesamtübersicht und Schlussfolgerungen

Die Therapie mit adulten Blutstammzellen und adulten Stammzellen des Knochenmarks ist für bestimmte Blutkrankheiten wie Leukämien und Lymphome, aber auch bei Anämien und Immundefekten seit vier Jahrzehnten etabliert (Appelbaum, 2007). Gemäß der Erfassung durch das Deutsche Register für Stammzelltransplantationen erhielten im Jahr 2007 2118 Patienten in Deutschland adulte Stammzellen von einem Fremdspender (allogene Ersttransplantationen) bzw. 2457 Patienten eine autologe Ersttransplantation (DRST, 2007). Wie bereits in der Einleitung hingewiesen, sind die gegenwärtigen Indikationen zur autologen bzw. allogenen

Stammzelltransplantation in Deutschland auf der Internetseite der DAG-KBT zu finden. (<http://www.dag-kbt.de/content/public/Indikationsliste-DAG.pdf>); die Behandlungsergebnisse werden in jährliche Berichten des Deutschen Registers für Stammzelltransplantationen (DRST) unter <http://www.drst.de> veröffentlicht. Die durch die Berichterstattung des Instituts für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen initiierte und kontrovers geführte Diskussion über den therapeutischen Nutzen im Sinne einer evidenzbasierten Medizin ist nicht Gegenstand dieser Stellungnahme. Vonseiten der Sachverständigen und beteiligten Fachgesellschaften wird jedoch das Nutzen-Risiko Verhältnis positiv im Hinblick darauf bewertet, dass die autologe bzw. allogene Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen aus Knochenmark, peripherem Blut oder Nabelschnurblut bei einem Teil der Patienten eine dauerhafte Heilung oder zumindest ein längeres krankheitsfreies Überleben ermöglicht.

4.8. Zusätzliche Angaben

Entfällt

4.9. Literaturzitate

Abrams, R.A., McCormack, K., Bowles, C., Deisseroth, A.B., 1981. Cyclophosphamide treatment expands the circulating hematopoietic stem cell pool in dogs. *J. Clin. Invest.* 67, 1392-1399.

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.

Ando, K., Muguruma, Y., Yahata, T., 2008. Humanizing bone marrow in immune-deficient mice. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 324, 77-86.

Andrews, R.G., Bridgell, R.A., Knitter, G.H., Rowley, S.D., Appelbaum, F.R., McNiece, I.K., 1995. Rapid engraftment by peripheral blood progenitor cells mobilized by recombinant human stem cell factor and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in nonhuman primates. *Blood.* 85, 15-20.

Appelbaum, F.R., 2007. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N. Engl. J. Med.* 357, 1472-1475.

Appelbaum, F.R., Deeg, H.J., Storb, R., Graham, T.C., Charrier, K., Bensinger, W., 1986. Cure of malignant lymphoma in dogs with peripheral blood stem cell transplantation. *Transplantation.* 42, 19-22.

Appelbaum, F.R., Herzig, G.P., Ziegler, J.L., Graw, R.G., Levine, A.S., Deisseroth, A.B., 1978. Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood.* 52, 85-95.

Arai, F., Suda, T., 2007. Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1106, 41-53.

Askenasy, N., Farkas, D.L., 2002. Optical imaging of PKH-labeled hematopoietic cells in recipient bone marrow in vivo. *Stem Cells.* 20, 501-513.

Aversa, F., 2008. Haploidentical haematopoietic stem cell transplantation for acute leukaemia in

adults: experience in Europe and the United States. *Bone Marrow Transplant.* 41, 3447-3454.

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., 2001. 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 1:165-8., 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., 2001. 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., Jarisch, A., Soerensen, J., Esser, R., Bönig, H., Klingebiel, T., 2010. Transplantation CD3/CD19-depletierter Stammzellen. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 158, 216-222.

Bader, P., Willasch, A., Niethammer, D., Klingebiel, T., 2007. Haploidentical stem cell transplantation in childhood. *Curr. Cancer Ther.* 3, 37-40.

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

Bensinger, W.I., Martin, P.J., Storer, B., Clift, R., Forman, S.J., Negrin, R., Kashyap, A., Flowers, M.E., Lilleby, K., Chauncey, T.R., Storb, R., Appelbaum, F.R., 2001. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N. Engl. J. Med.* 344, 175-181.

Berenson, R.J., Andrews, R.G., Bensinger, W.I., Kalamasz, D., Knitter, G., Buckner, C.D.,

Bernstein, I.D., 1988. Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J. Clin. Invest.* 81, 951-955.

Berenson, R.J., Bensinger, W.I., Hill, R.S., Andrews, R.G., Garcia-Lopez, J., Kalamasz, D.F., Still, B.J., Spitzer, G., Buckner, C.D., Bernstein, I.D., , 1991. Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood.* 1717-1722.

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.

Blaise, D., Kuentz, M., Fortanier, C., Bourhis, J.H., Milpied, N., Sutton, L., Jouet, J.P., Attal, M., Bordignon, P., Cahn, J.Y., Boiron, J.M., Schuller, M.P., Moatti, J.P., Michallet, M., 2000. Randomized trial of bone marrow versus lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle. *J. Clin. Oncol.* 18, 537-546.

Bornhäuser, M., Eger, L., Oelschlaegel, U., Auffermann-Gretzinger, S., Kiani, A., Schetelig, J., Illmer, T., Schaich, M., Corbeil, D., Thiede, C., Ehninger, G., 2005. Rapid reconstitution of dendritic cells after allogeneic transplantation of CD133+ selected hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 19, 161-165.

Bortin, M.M., 1970. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation.* 9, 571-587.

Bourhis, J.H., 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, J.L., Goldschmidt, H., 2007. 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.* 92, 1083-1090.

Brenner, M.K., Rill, D.R., Moen, R.C., Krance, R.A., Mirro, J., Jr., Anderson, W.F., Ihle, J.N., 1993. Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. *Lancet.* 341, 85-86.

Brodsky, R.A., Luznik, L., Bolanos-Meade, J., Leffell, M.S., Jones, R.J., Fuchs, E.J., 2008. Reduced intensity HLA-haploidentical BMT with post transplantation cyclophosphamide in nonmalignant hematologic diseases. *Bone Marrow Transplant.* 42, 523-527.

Broxmeyer, H.E., Douglas, G.W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Arny, M., Thomas,

L., Boyse, E.A., 1989. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 3828-3832.

Broxmeyer, H.E., Orschell, C.M., Clapp, D.W., Hangoc, G., Cooper, S., Plett, P.A., Liles, W.C., Li, X., Graham-Evans, B., Campbell, T.B., Calandra, G., Bridger, G., Dale, D.C., Srour, E.F., 2005. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J. Exp. Med.* 201, 1307-1318.

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.

Bundesärztekammer (BÄK), 2010. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). Zweite Richtlinienanpassung 2010.

Bundesärztekammer (BÄK), 2014. Richtlinie zur Herstellung und Anwendung von Hämatopoetischen Stammzellen. *Dt. Ärztebl.* 111, 1-25.

Bundesrepublik Deutschland, 2007. Gesetz über Qualität und Sicherheit von menschlichen Geweben und Zellen (Gewebegesetz) vom 20. Juli 2007 (BGBl. I S. 1574).

Bundesrepublik Deutschland, 2009. Gesetz über Medizinprodukte (Medizinproduktegesetz - MPG).

Burroughs, L.M., O'Donnell, P.V., Sandmaier, B.M., Storer, B.E., Luznik, L., Symons, H.J., Jones, R.J., Ambinder, R.F., Maris, M.B., Blume, K.G., Niederwieser, D.W., Bruno, B., Maziarz, R.T., Pulsipher, M.A., Petersen, F.B., Storb, R., Fuchs, E.J., Maloney, D.G., 2008. Comparison of outcomes of HLA-matched related, unrelated, or HLA-haploidentical related hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14, 1279-1287.

Cairns, J., 1975. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature.* 255, 197-200.

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., 2003. 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.* 88, 306-314.

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, D.F., Fischer, A., 1998. Prevention of EBV-induced B-lymphoproliferative disorder by ex vivo marrow B-cell depletion in HLA-phenoidentical or non-identical T-depleted bone marrow transplantation. *Br. J. Haematol.* 103, 543-551.

Chakrabarti, S., Macdonald, D., Hale, G., Holder, K., Turner, V., Czarnecka, H., Thompson, J., Fegan, C., Waldmann, H., Milligan, D.W., 2003. 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. *Br. J. Haematol.* 121, 109-118.

Chen, X., Hale, G.A., Barfield, R., Benaim, E., Leung, W.H., Knowles, J., Horwitz, E.M., Woodard, P., Kasow, K., Yusuf, U., Behm, F.G., Hayden, R.T., Shurtleff, S.A., Turner, V., Srivastava, D.K.,

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, B.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.* 770:91-8., 91-98.

Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F., Shaper, J.H., 1984. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.* 133, 157-165.

Colvin, G.A., Lambert, J.F., Dooner, M.S., Cerny, J., Quesenberry, P.J., 2007. Murine allogeneic in vivo stem cell homing(.). *J. Cell Physiol.* 211, 386-391.

Cornelissen, J.J., van der Holt, 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.

DAG-KBT e.V., 2014. Indikationsliste DAG-KBT e.V.

Daldrup-Link, H.E., Rudelius, M., Piontek, G., Metz, S., Brauer, R., Debus, G., Corot, C., Schlegel, J., Link, T.M., Peschel, C., Rummeny, E.J., Oostendorp, R.A., 2005. Migration of iron oxide-labeled human hematopoietic progenitor cells in a mouse model: in vivo monitoring with 1.5-T MR imaging equipment. *Radiology.* 234, 197-205.

Dausset, J., 1958. Iso-leuko-antibodies. *Acta Haematol.* 20, 156-166.

De Revel, T., Appelbaum, F.R., Storb, R., schuening, F., Nash, R., Deeg, J., McNiece, I., Andrews, R., Graham, T., 1994. Effects of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor, alone and in combination, on the mobilization of peripheral blood cells that engraft lethally irradiated dogs. *Blood.* 83, 3795-3799.

Desikan, K.R., Tricot, G., Munshi, N.C., Anaissie, E., Spoon, D., Fassas, A., Toor, A., Zangari, M., Badros, A., Morris, C., Vesole, D.H., Siegel, D., Jagannath, S., Barlogie, B., 2001. Preceding chemotherapy, tumour load and age influence engraftment in multiple myeloma patients mobilized with granulocyte colony-stimulating factor alone. *Br. J. Haematol.* 112, 242-247.

Devine, S.M., Vij, R., Rettig, M., Todt, L., McGlauchlen, K., Fisher, N., Devine, H., Link, D.C., Calandra, G., Bridger, G., Westervelt, P., DiPersio, J.F., 2008. Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using AMD3100, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction. *Blood.* 112, 990-998.

Dey, B.R., Spitzer, T.R., 2006. Current status of haploidentical stem cell transplantation. *Br. J.*

Haematol. 135, 423-437.

DiPersio, J.F., Micallef, I.N., Stiff, P.J., Bolwell, B.J., Maziarz, R.T., Jacobsen, E., Nademanee, A., McCarty, J., Bridger, G., Calandra, G., 2009. 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.* 27, 4767-4773.

Donner, S., 2007. Zusammenhang zwischen Krebsentstehung und adulten bzw. embryonalen Stammzellen. Wissenschaftliche Dienste des Deutschen Bundestages. Ausarbeitung WD 8 - 36/07. Dt. Bundestag, Wiss. Dienste, WD 8.

Dreger, P., Haferlach, T., Eckstein, V., Jacobs, S., Suttrop, M., Loffler, H., Muller-Ruchholtz, W., Schmitz, N., 1994. G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: safety, kinetics of mobilization, and composition of the graft. *Br. J. Haematol.* 87, 609-613.

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.

Dreger, P., Viehmann, K., von, N.N., Glaubitz, T., Petzoldt, O., Glass, B., Uharek, L., Rautenberg, P., Suttrop, M., Mills, B., Mitsky, P., Schmitz, N., 1999. 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.* 24, 153-161.

Dreger-P., Schmitz, N., 1998. Allogeneic blood stem cell transplantation. In: Reiffers, J., Goldman, J., Armitage, J. (Eds.), *Blood stem cell transplantation* Martin Dunitz Ltd, London, pp. 217-230.

DRST, 2007. Jahresbericht 2007. Öffentlicher Teil. Deutsches Register für Stammzelltransplantationen.

Dührsen, U., Villeval, J.L., Boyd, J., Kannourakis, G., Morstyn, G., Metcalf, D., 1988. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood.* 72, 2074-2081.

Dvorak, C.C., Hung, G.Y., Horn, B., Dunn, E., Oon, C.Y., Cowan, M.J., 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. Blood Marrow Transplant.* 14, 1125-1133.

EBMT, 2008. *The EBMT-ESH Handbook – Haematopoietic Stem Cell Transplantation.* Forum Service Editore, Genoa, Italy.

Eichler, H., Kern, S., Beck, C., Zieger, W., Kluter, H., 2003. Engraftment capacity of umbilical cord blood cells processed by either whole blood preparation or filtration. *Stem Cells.* 21, 208-216.

Eissens, D.N., Schaap, N.P., Preijers, F.W., Dolstra, H., van, C.B., Schattenberg, A.V., Joosten, I., van der Meer, 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.

Europäische Kommission, 2006. Richtlinie 2006/17/EG der Kommission vom 8. Februar 2006 zur Durchführung der Richtlinie 2004/23/EG des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich technischer Vorschriften für die Spende, Beschaffung und Testung von menschlichen Geweben und Zellen.

Europäischer Rat, 2007. Richtlinie 93/42/EWG des Rates vom 14. Juni 1993.

Europäisches Parlament und Rat, 2004. Richtlinie 2004/23/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 31. März 2004 zur Festlegung von Qualitäts- und Sicherheitsstandards für die Spende, Beschaffung, Testung, Verarbeitung, Konservierung, Lagerung und Verteilung von menschlichen Geweben und Zellen.

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., Bornhäuser, M., Kordelas, L., Beelen, D.W., Stuhler, G., Schwerdtfeger, R., Stelljes, M., Behre, G., Christopeit, M., Faul, C., Vogel, W., Handgretinger, R., Kanz, L., Bethge, W.A., 2009. 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, 494-495.

Flomenberg, N., Devine, S.M., DiPersio, J.F., Liesveld, J.L., McCarty, J.M., Rowley, S.D., Vesole, D.H., Badel, K., Calandra, G., 2005. The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood*. 106, 1867-1874.

Fruehauf, S., Seeger, T., Maier, P., Li, L., Weinhardt, S., Laufs, S., Wagner, W., Eckstein, V., Bridger, G., Calandra, G., Wenz, F., Zeller, W.J., Goldschmidt, H., Ho, A.D., 2006. The CXCR4 antagonist AMD3100 releases a subset of G-CSF-primed peripheral blood progenitor cells with specific gene expression characteristics. *Exp. Hematol.* 34, 1052-1059.

Fruehauf, S., Veldwijk, M.R., Seeger, T., Schubert, M., Laufs, S., Topaly, J., Wuchter, P., Dillmann, F., Eckstein, V., Wenz, F., Goldschmidt, H., Ho, A.D., Calandra, G., 2009. 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* 11, 992-1001.

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

Georges, G.E., Sandmaier, B.M., Storb, R., 1998. Animal models. In: Reiffers, J., Goldman, J., Armitage, J. (Eds.), *Blood stem cell transplantation* Martin Dunitz Ltd, London, pp. 1-18.

Giebel, S., Locatelli, F., Lamparelli, T., Velardi, A., Davies, S., Frumento, G., Maccario, R., Bonetti, F., Wojnar, J., Martinetti, M., Frassoni, F., Giorgiani, G., Bacigalupo, A., Holowiecki, J., 2003. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood*. 102, 814-819.

Gluckman, E., Broxmeyer, H.A., Auerbach, A.D., Friedman, H.S., Douglas, G.W., Devergie, A.,

Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., ., 1989. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J. Med.* 321, 1174-1178.

Gluckman, E., Koegler, G., Rocha, V., 2005. Human leukocyte antigen matching in cord blood transplantation. *Semin. Hematol.* 42, 85-90.

Gluckman, E., Rocha, V., Arcese, W., Michel, G., Sanz, G., Chan, K.W., Takahashi, T.A., Ortega, J., Filipovich, A., Locatelli, F., Asano, S., Fagioli, F., Vowels, M., Sirvent, A., Laporte, J.P., Tiedemann, K., Amadori, S., Abecassis, M., Bordigoni, P., Diez, B., Shaw, P.J., Vora, A., Caniglia, M., Garnier, F., Ionescu, I., Garcia, J., Koegler, G., Rebutta, P., Chevret, S., 2004. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp. Hematol.* 32, 397-407.

Goldman, J.M., Madrigal, J.A., Pamphilon, D., 2006. Possible harmful effects of short course granulocyte colony-stimulating factor in normal donors. *Br. J. Haematol.* 135, 651-652.

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.

Goodell, M.A., Rosenzweig, M., Kim, H., Marks, D.F., DeMaria, M., Paradis, G., Grupp, S.A., Sieff, C.A., Mulligan, R.C., Johnson, R.P., 1997. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat. Med.* 3, 1337-1345.

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.

Gorin, N.C., Lopez, M., Laporte, J.P., Quittet, P., Lesage, S., Lemoine, F., Berenson, R.J., Isnard, F., Grande, M., Stachowiak, J., ., 1995. Preparation and successful engraftment of purified CD34+ bone marrow progenitor cells in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 85, 1647-1654.

Gothot, A., van der Loo, J.C., Clapp, D.W., Srour, E.F., 1998. Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34(+) cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. *Blood.* 92, 2641-2649.

Guo, M., Sun, Z., Sun, Q.Y., Han, Q., Yu, C.L., Wang, D.H., Qiao, J.H., Chen, B., Sun, W.J., Hu, K.X., Liu, G.X., Liu, B., Zhao, R.C., Ai, H., 2009. A modified haploidentical nonmyeloablative transplantation without T cell depletion for high-risk acute leukemia: successful engraftment and mild GVHD. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 15, 930-937.

Haas, R., Ho, A.D., Bredthauer, U., Cayeux, S., Egerer, G., Knauf, W., Hunstein, W., 1990. Successful autologous transplantation of blood stem cells mobilized with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Exp. Hematol.* 18, 94-98.

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.

Hendriks, P.J., Martens, C.M., Hagenbeek, A., Keij, J.F., Visser, J.W., 1996. Homing of fluorescently labeled murine hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 24, 129-140.

Hofmeister, C.C., Zhang, J., Knight, K.L., Le, P., Stiff, P.J., 2007. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. *Bone Marrow Transplant.* 39, 11-23.

Hong, D.S., Deeg, H.J., 1994. Hemopoietic stem cells: sources and applications. *Med. Oncol.* 11, 63-68.

Horowitz, M.M., Confer, D.L., 2005. Evaluation of hematopoietic stem cell donors. *Hematology. Am Soc. Hematol. Educ. Program.* 469-475.

Huang, X.J., Liu, D.H., Liu, K.Y., Xu, L.P., Chen, H., Han, W., Chen, Y.H., Wang, J.Z., Gao, Z.Y., Zhang, Y.C., Jiang, Q., Shi, H.X., Lu, D.P., 2006. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion for the treatment of hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 38, 291-297.

Huang, X.J., Liu, D.H., Liu, K.Y., Xu, L.P., Chen, H., Han, W., Chen, Y.H., Zhang, X.H., Lu, D.P., 2009. Treatment of acute leukemia with unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 15, 257-265.

Ichinohe, T., Uchiyama, T., Shimazaki, C., Matsuo, K., Tamaki, S., Hino, M., Watanabe, A., Hamaguchi, M., Adachi, S., Gondo, H., Uoshima, N., Yoshihara, T., Hatanaka, K., Fujii, H., Kawa, K., Kawanishi, K., Oka, K., Kimura, H., Itoh, M., Inukai, T., Maruya, E., Saji, H., Kodera, Y., 2004. Feasibility of HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation between noninherited maternal antigen (NIMA)-mismatched family members linked with long-term fetomaternal microchimerism. *Blood.* 104, 3821-3828.

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., 2005. 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.* 35, 479-487.

Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG), 2007. Stammzelltransplantation bei den Indikationen Akute lymphatische Leukämie (ALL) und Akute myeloische Leukämie (AML) bei Erwachsenen - Abschlußbericht N05-3A. Köln.

Isidori, A., Motta, M.R., Tani, M., Terragna, C., Zinzani, P., Curti, A., Rizzi, S., Taioli, S., Giudice, V., D'Addio, A., Gugliotta, G., Conte, R., Baccarani, M., Lemoli, R.M., 2007. Positive selection and transplantation of autologous highly purified CD133(+/-) stem cells in resistant/relapsed chronic lymphocytic leukemia patients results in rapid hematopoietic reconstitution without an adequate leukemic cell purging. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 10, 1224-1232.

Jacobson, L.O., Simmons, E.L., Marks, E.K., Robson, M.J., Bethard, W.F., Gaston, E.O., 1950. The role of the spleen in radiation injury and recovery. *J. Lab Clin. Med.* 35, 746-770.

Jakubowski, A.A., Small, T.N., Young, J.W., Kernan, N.A., Castro-Malaspina, H., Hsu, K.C., Perales, M.A., Collins, N., Cisek, C., Chiu, M., van den Brink, M.R., O'Reilly, R.J., Papadopoulos, E.B., 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.

Jansen, E.M., Hanks, S.G., Terry, C., Akard, L.P., Thompson, J.M., Dugan, M.J., Jansen, J., 2007. Prediction of engraftment after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: CD34, colony-forming unit-granulocyte-macrophage, or both? *Transfusion*. 47, 817-823.

Jordan, C.T., Lemischka, I.R., 1990. Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev*. 4, 220-232.

Juttner, C.A., To, L.B., Haylock, D.N., Branford, A., Kimber, R.J., 1985. Circulating autologous stem cells collected in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia produce prompt but incomplete haemopoietic reconstitution after high dose melphalan or supralethal chemoradiotherapy. *Br. J. Haematol*. 61, 739-745.

Kasow, K.A., Sims-Poston, L., Eldridge, P., Hale, G.A., 2007. CD34(+) hematopoietic progenitor cell selection of bone marrow grafts for autologous transplantation in pediatric patients. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 13, 608-614.

Keeney, M., Chin-Yee, I., Weir, K., Popma, J., Nayar, R., Sutherland, D.R., 1998. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Cytometry*. 34, 61-70.

Kessinger, A., Armitage, J.O., Landmark, J.D., Weisenburger, D.D., 1986. Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. *Exp. Hematol*. 14, 192-196.

Kessinger, A., Smith, D.M., Strandjord, S.E., Landmark, J.D., Dooley, D.C., Law, P., Coccia, P.F., Warkentin, P.I., Weisenburger, D.D., Armitage, J.O., 1989. Allogeneic transplantation of blood-derived, T cell-depleted hemopoietic stem cells after myeloablative treatment in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 4, 643-646.

Kiel, M.J., Morrison, S.J., 2008. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Immunol*. 8, 290-301.

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.

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.

Koehl, U., Esser, R., Zimmermann, S., Tonn, T., Kotchetkov, R., Bartling, T., Sorensen, J., Gruttner, 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.

Kögler, G., Somville, T., Gobel, U., Hakenberg, P., Knipper, A., Fischer, J., Adams, O., Krempe, C.,

McKenzie, C., Ruttgers, H., Meier, W., Bellmann, O., Streng, H., Ring, A., Rosseck, U., Rocha, V., Wernet, P., 1999. Haematopoietic transplant potential of unrelated and related cord blood: the first six years of the EUROCORD/NETCORD Bank Germany. *Klin. Padiatr.* 211, 224-232.

Körbling, M., Burke, P., Braine, H., Eifenbein, G., Santos, G., Kaizer, H., 1981. Successful engraftment of blood derived normal hemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Exp. Hematol.* 9, 684-690.

Körbling, M., Dorken, B., Ho, A.D., Pezzutto, A., Hunstein, W., Fliedner, T.M., 1986. Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood.* 67, 529-532.

Kuci, S., Wessels, J.T., Buhning, H.J., Schilbach, K., Schumm, M., Seitz, G., Loffler, J., Bader, P., Schlegel, P.G., Niethammer, D., Handgretinger, R., 2003. Identification of a novel class of human adherent CD34⁺ stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood.* 101, 869-876.

Kurtzberg, J., Laughlin, M., Graham, M.L., Smith, C., Olson, J.F., Halperin, E.C., Ciocchi, G., Carrier, C., Stevens, C.E., Rubinstein, P., 1996. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N. Engl. J. Med.* 335, 157-166.

Ladd, A.C., Pyatt, R., Gothot, A., Rice, S., McMahel, J., Traycoff, C.M., Srour, E.F., 1997. Orderly process of sequential cytokine stimulation is required for activation and maximal proliferation of primitive human bone marrow CD34⁺ hematopoietic progenitor cells residing in G0. *Blood.* 90, 658-668.

Lane, 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., 2004. 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:S54-9. doi: 10.1038/bmt.2008.285., 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-Weihrich, S., Niethammer, D., Handgretinger, R., 2004. 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., Greil, J., Bader, P., Klingebiel, T., Muller, I., Feuchtinger, T., Pfeiffer, M., Schlegel, P.G., 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., 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., Teltschik, H.M., Mueller, I., Feuchtinger, T., Pfeiffer, M., Ebinger, M., Schumm, M., Handgretinger, R., 2010. Haploidentical stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in refractory diseases: current results. *Bone Marrow Transplant.* 45 (S2), S295.

Larsen, S.R., Chng, K., Battah, F., Martiniello-Wilks, R., Rasko, J.E., 2008. Improved granulocyte colony-stimulating factor mobilization of hemopoietic progenitors using cytokine combinations in primates. *Stem Cells.* 11, 2974-2980.

Laughlin, M.J., Eapen, M., Rubinstein, P., Wagner, J.E., Zhang, M.J., Champlin, R.E., Stevens, C., Barker, J.N., Gale, R.P., Lazarus, H.M., Marks, D.I., Van Rood, J.J., Scaradavou, A., Horowitz, M.M., 2004. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N. Engl. J. Med.* 351, 2265-2275.

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.

Lemoli, R.M., Martinelli, G., Zamagni, E., Motta, M.R., Rizzi, S., Terragna, C., Rondelli, R., Ronconi, S., Curti, A., Bonifazi, F., Tura, S., Cavo, M., 2000. Engraftment, clinical, and molecular follow-up of patients with multiple myeloma who were reinfused with highly purified CD34+ cells to support single or tandem high-dose chemotherapy. *Blood.* 95, 2234-2239.

Lichterfeld, M., Martin, S., Burkly, L., Haas, R., Kronenwett, R., 2000. Mobilization of CD34+ haematopoietic stem cells is associated with a functional inactivation of the integrin very late antigen 4. *Br. J. Haematol.* 110, 71-81.

Liles, W.C., Rodger, E., Broxmeyer, H.E., Dehner, C., Badel, K., Calandra, G., Christensen, J., Wood, B., Price, T.H., Dale, D.C., 2005. 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.* 45, 295-300.

Little, M.T., Storb, R., 2002. History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat. Rev. Cancer.* 2, 231-238.

Liu, Y., Elf, S.E., Miyata, Y., Sashida, G., Liu, Y., Huang, G., Di, G.S., Lee, J.M., Deblasio, A., Menendez, S., Antipin, J., Reva, B., Koff, A., Nimer, S.D., 2009. p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell.* 4, 37-48.

Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T.R., Shelton, E., 1951. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J. Natl. Cancer Inst.* 12, 197-201.

Luznik, L., O'Donnell, P.V., Symons, H.J., Chen, A.R., Leffell, M.S., Zahurak, M., Gooley, T.A., Piantadosi, S., Kaup, M., Ambinder, R.F., Huff, C.A., Matsui, W., Bolanos-Meade, J., Borrello, I., Powell, J.D., Harrington, E., Warnock, S., Flowers, M., Brodsky, R.A., Sandmaier, B.M., Storb, R.F., Jones, R.J., Fuchs, E.J., 2008. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14, 641-650.

Martin, C., Bridger, G.J., Rankin, S.M., 2006. 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. *Br. J. Haematol.* 134, 326-329.

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.

Mattsson, J., 2008. Recent progress in allogeneic stem cell transplantation. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 10, 343-349.

Micallef, I.N., Stiff, P.J., DiPersio, J.F., Maziarz, R.T., McCarty, J.M., Bridger, G., Calandra, G., 2009. Successful stem cell remobilization using plerixafor (mozobil) plus granulocyte colony-stimulating factor in patients with non-hodgkin lymphoma: results from the plerixafor NHL phase 3 study rescue protocol. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 15, 1578-1586.

Migliaccio, A.R., Adamson, J.W., Stevens, C.E., Dobrila, N.L., Carrier, C.M., Rubinstein, P., 2000. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood.* 96, 2717-2722.

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., Passeullo, F., Snowden, J., 2002. A pilot randomized trial comparing CD34-selected versus unmanipulated hemopoietic stem cell transplantation for severe, refractory rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46, 2301-2309.

Moore, K.A., Lemischka, I.R., 2006. Stem cells and their niches. *Science.* 311, 1880-1885.

Morrison, S.J., Wright, D.E., Weissman, I.L., 1997. Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1908-1913.

Neben, S., Marcus, K., Mauch, P., 1993. Mobilization of hematopoietic stem and progenitor cell subpopulations from the marrow to the blood of mice following cyclophosphamide and/or granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 81, 1960-1967.

Ni, X.S., Ouyang, J., Zhu, W.H., Wang, C., Chen, B., 2006. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: report of efficacy and safety at three yr of follow up in 21 patients. *Clin. Transplant.* 20, 485-489.

Ogawa, H., Ikegame, K., Kaida, K., Yoshihara, S., Fujioka, T., Taniguchi, Y., Tamaki, H., Inoue, T., Hasei, H., Iiboshi, Y., Tazuke, Y., Kawakami, M., Kim, E.H., Soma, T., Inoue, T., Kawase, I., 2008. Unmanipulated HLA 2-3 antigen-mismatched (haploidentical) bone marrow transplantation using only pharmacological GVHD prophylaxis. *Exp. Hematol.* 36, 1-8.

Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., Nakauchi, H., 1996. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science.* 273, 242-245.

Ottinger, H.D., Muller, C.R., Goldmann, S.F., Albert, E., Arnold, R., Beelen, D.W., Blasczyk, R., Bunjes, D., Casper, J., Ebell, W., Ehninger, G., Eiermann, T., Einsele, H., Fauser, A., Ferencik, S.,

Finke, J., Hertenstein, B., Heyll, A., Klingebiel, T., Knipper, A., Kremens, B., Kolb, H.J., Kolbe, K., Lenartz, E., Lindemann, M., Muller, C.A., Mytilineos, J., Niederwieser, D., Runde, V., Sayer, H., Schaefer, U.W., Schmitz, N., Schroder, S., Schulze-Rath, R., Schwerdtfeger, R., Siegert, W., Thiele, B., Zander, A.R., Grosse-Wilde, H., 2001. Second German consensus on immunogenetic donor search for allotransplantation of hematopoietic stem cells. *Ann. Hematol.* 80, 706-714.

Pamphilon, D., Mackinnon, S., Nacheva, E., Russell, N., Wilson, K., Clay, M., Miller, J., Green, A., Navarrete, C., Contreras, M., 2006. The use of granulocyte colony-stimulating factor in volunteer blood and marrow registry donors. *Bone Marrow Transplant.* 38, 699-700.

Papayannopoulou, T., 2000. Mechanisms of stem-/progenitor-cell mobilization: the anti-VLA-4 paradigm. *Semin. Hematol.* 37 Suppl 2, 11-18.

Pelus, L.M., Fukuda, S., 2008. Chemokine-mobilized adult stem cells+ADs- defining a better hematopoietic graft. *Leukemia.* 22, 466-473.

Petersdorf, E.W., 2007. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: histocompatibility. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 20, 155-170.

Pettengell, R., 1998. Haematopoietic recovery following transplantation. In: Reiffers, J., Goldman, J., Armitage, J. (Eds.), *Blood stem cell transplantation* Martin Dunitz Ltd, London, pp. 157-170.

Ploemacher, R.E., van der Sluijs, J.P., Voerman, J.S., Brons, N.H., 1989. An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood.* 74, 2755-2763.

Reisner, Y., Bachar-Lustig, E., Li, H.W., Aversa, F., Velardi, A., Martelli, M.F., 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. N. Y. Acad. Sci.* 872:336-48; discussion 348-50., 336-348.

Reisner, Y., Gur, H., Reich-Zeliger, S., Martelli, M.F., Bachar-Lustig, E., 2005. Hematopoietic stem cell transplantation across major genetic barriers: tolerance induction by megadose CD34 cells and other veto cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1044:70-83., 70-83.

Rezvani, A.R., Storb, R.F., 2008. Separation of graft-vs.-tumor effects from graft-vs.-host disease in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J. Autoimmun.* 30, 172-179.

Richman, C.M., Weiner, R.S., Yankee, R.A., 1976. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood.* 47, 1031-1039.

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.

Rocha, V., Labopin, M., Sanz, G., Arcese, W., Schwerdtfeger, R., Bosi, A., Jacobsen, N., Ruutu, T., de, L.M., Finke, J., Frassoni, F., Gluckman, E., 2004. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N. Engl. J. Med.* 351, 2276-2285.

Rowley, S.D., Bensinger, W.I., Gooley, T.A., Buckner, C.D., 1994. Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. *Blood.* 83, 2731-2736.

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

Rusten, L.S., Jacobsen, S.E., Kaalhus, O., Veiby, O.P., Funderud, S., Smeland, E.B., 1994. Functional differences between CD38- and DR- subfractions of CD34+ bone marrow cells. *Blood*. 84, 1473-1481.

Schmitz, N., Eapen, M., Horowitz, M.M., Zhang, M.J., Klein, J.P., Rizzo, J.D., Loberiza, F.R., Gratwohl, A., Champlin, R.E., 2006. Long-term outcome of patients given transplants of mobilized blood or bone marrow: A report from the International Bone Marrow Transplant Registry and the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 108, 4288-4290.

Schumm, M., Lang, P., Taylor, G., Kuci, S., Klingebiel, T., Bühring, 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.

Sheikhzadeh, S., Hammers, H.J., Hartwig, D., Kirchner, H., Schlenke, P., 2001. Improvement of the precision in CFU-GM and BFU-E counting by flow cytometry-based standardization of short-term culture assays. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 10, 881-885.

Shpall, E.J., Jones, R.B., Bearman, S.I., Franklin, W.A., Archer, P.G., Curiel, T., Bitter, M., Claman, H.N., Stemmer, S.M., Purdy, M., ., 1994. 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.* 12, 28-36.

Socinski, M.A., Cannistra, S.A., Elias, A., Antman, K.H., Schnipper, L., Griffin, J.D., 1988. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet*. 1, 1194-1198.

Spitzer, G., Adkins, D., 1998. The impact of growth factors on hematopoietic recovery after highdose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. In: Reiffers, J., Goldman, J., Armitage, J. (Eds.), *Blood stem cell transplantation* Martin Dunitz Ltd, London, pp. 171-186.

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, R.K., 2007. Mobilization, harvesting and selection of peripheral blood stem cells in patients with autoimmune diseases undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 39, 317-329.

Stewart, A.K., 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, K.C., Berenson, J., 2001. 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.* 19, 3771-3779.

Sutherland, H.J., Eaves, C.J., Eaves, A.C., Dragowska, W., Lansdorp, P.M., 1989. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood*. 74, 1563-1570.

Sutherland, H.J., Lansdorp, P.M., Henkelman, D.H., Eaves, A.C., Eaves, C.J., 1990. Functional

characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 3584-3588.

Thomas, E.D., Buckner, C.D., Clift, R.A., Fefer, A., Johnson, F.L., Neiman, P.E., Sale, G.E., Sanders, J.E., Singer, J.W., Shulman, H., Storb, R., Weiden, P.L., 1979. Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission. *N. Engl. J. Med.* 301, 597-599.

Thomas, E.D., Fefer, A., 1979. Graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* 301, 556.

Thomas, E.D., Lochte, H.L., Jr., Lu, W.C., Ferrebee, J.W., 1957. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 257, 491-496.

Thomas, E.D., Storb, R., 1970. Technique for human marrow grafting. *Blood.* 36, 507-515.

Thomas, E.D., Storb, R., Fefer, A., Slichter, S.J., Bryant, J.I., Buckner, C.D., Neiman, P.E., Clift, R.A., Funk, D.D., Lerner, K.E., 1972. Aplastic anaemia treated by marrow transplantation. *Lancet.* 1, 284-289.

Urbano-Ispizua, A., 2007. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: stem cell source. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 20, 265-280.

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, J.J., Eernisse, J.G., Van, L.A., 1958. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature.* 181, 1735-1736.

Van Rood, J.J., Loberiza, F.R., Jr., Zhang, M.J., Oudshoorn, M., Claas, F., Cairo, M.S., Champlin, R.E., Gale, R.P., Ringden, O., Hows, J.M., Horowitz, M.H., 2002. 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. *Blood.* 99, 1572-1577.

Viale, A., De, F.F., Orleth, A., Cambiaghi, V., Giuliani, V., Bossi, D., Ronchini, C., Ronzoni, S., Muradore, I., Monestiroli, S., Gobbi, A., Alcalay, M., Minucci, S., Pelicci, P.G., 2009. Cell-cycle restriction limits DNA damage and maintains self-renewal of leukaemia stem cells. *Nature.* 457, 51-56.

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

Vonk, M.C., Marjanovic, Z., van den Hoogen, F.H., Zohar, S., Schattenberg, A.V., Fibbe, W.E., Larghero, J., Gluckman, E., Preijers, F.W., van Dijk, A.P., Bax, J.J., Roblot, P., van Riel, P.L., van Laar, J.M., Farge, D., 2008. Long-term follow-up results after autologous haematopoietic stem cell transplantation for severe systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 98-104.

Wang, X., Rosol, M., Ge, S., Peterson, D., McNamara, G., Pollack, H., Kohn, D.B., Nelson, M.D., Crooks, G.M., 2003. Dynamic tracking of human hematopoietic stem cell engraftment using in vivo

bioluminescence imaging. *Blood*. 102, 3478-3482.

Wang, Y., Chen, F., Han, Y., Fu, Z.Z., Tang, X.W., Miao, M., Qiu, H.Y., Jin, Z.M., Sun, A.N., Wu, D.P., 2009. Partially matched related hematopoietic stem cell transplantation without ex vivo T cell depletion compared with matched unrelated transplantation in adult patients with hematologic malignancies. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 15, 1258-1264.

Weaver, C.H., Birch, R., Greco, F.A., Schwartzberg, L., McAneny, B., Moore, M., Oviatt, D., Redmond, J., George, C., Alberico, T., Johnson, P., Buckner, C.D., 1998. Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells: randomized evaluations of different doses of filgrastim. *Br. J. Haematol.* 100, 338-347.

Welte, K., Platzer, E., Lu, L., Gabrilove, J.L., Levi, E., Mertelsmann, R., Moore, M.A., 1985. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 1526-1530.

Williams, B., Nilsson, S.K., 2009. Investigating the interactions between haemopoietic stem cells and their niche: methods for the analysis of stem cell homing and distribution within the marrow following transplantation. *Methods Mol. Biol.* 482:93-107. doi: 10.1007/978-1-59745-060-7_6., 93-107.

Wilson, A., Trumpp, A., 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 93-106.

Yanovich, S., Mitsky, P., Cornetta, K., Maziarz, R.T., Rosenfeld, C., Krause, D.S., Lotz, J.P., Bitran, J.D., Williams, S., Preti, R., Somlo, G., Burtness, B., Mills, B., 2000. 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.* 25, 1165-1174.

Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J., Buck, D.W., 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 90, 5002-5012.

Zohren, F., Toutzaris, D., Klarner, V., Hartung, H.P., Kieseier, B., Haas, R., 2008. The monoclonal anti-VLA-4 antibody natalizumab mobilizes CD34+ hematopoietic progenitor cells in humans. *Blood*. 111, 3895.

5. Anlagen

5.1. Anlage 1

Zusammenfassung und Bewertung der toxiko-pharmakologischen Daten und Informationen zu Dimethylsulfoxid (DMSO) im Hinblick auf seine Verwendung in Stammzellzubereitungen (36 Seiten)

Dr. Peter Günzel, Berlin und Prof. Dr. Hermann Eichler, Homburg

**Zusammenfassung und Bewertung der toxiko-pharmakologischen
Daten und Informationen zu Dimethylsulfoxid (DMSO) im Hinblick auf
seine Verwendung in Stammzellzubereitungen**

von

Dr. Peter Günzel und Prof. Dr. Hermann Eichler

als gutachterliche Ergänzung

**der Gemeinsamen Stellungnahme der Fachgesellschaften DGTI, DGHO und GPOH
zu Genehmigungsverfahren von Stammzellzubereitungen**

Inhaltsverzeichnis

Präambel	Seite 3
1. Eingesetztes Produkt	3
2. Chemisch-physikalische und allgemeine biologische Eigenschaften	3
3. Natürliches Vorkommen	4
4. Verwendung in der Medizin	4
5. Pharmakodynamik und Wirkungsmechanismus	4
6. Pharmakokinetik	6
7. Toxikologie	7
7.1. Akute Toxizität	7
7.2. Subchronische und chronische Toxizität	8
7.3. Reproduktionstoxizität	10
7.4. Genetische Toxizität	11
7.5. Tumorigenität	11
7.6. Lokale Verträglichkeit	11
7.7. Immuntoxizität	12
7.8. Umweltrisiken	13
8. Kryokonservierung	13
8.1. Kryobiologische Vorgänge und ihre Beeinflussung durch Kryoprotektiva	13
8.2. DMSO in der Kryokonservierung	14
9. Verträglichkeit beim Menschen	16
10. Zusammenfassung und Schlussfolgerung	17
11. Generalzusammenfassung, Risikobeurteilung und Unterschriften der Sachverständigen	19
12. Referenzen	22
13. Informationen über die Sachverständigen	30
Anhang: Arzneimittelspezifische Angaben des Herstellers	35

Präambel

Die Informationen und Daten zu DMSO sind ausnahmslos der Literatur entnommen. Wegen der Vielzahl bereits vorhandener Übersichtsarbeiten und der ohnehin erforderlichen starken Informationsverdichtung werden vorwiegend diese berücksichtigt und nur in bestimmten Fällen die Originalarbeiten herangezogen. Da in der Regel aus den Übersichtsarbeiten mehrere Informationen zu unterschiedlichen Aspekten eines Abschnitts zitiert werden, sind die Referenzen jeweils direkt nach der Überschrift angeführt. Sie werden in einem Abschnitt nur dann wiederholt, wenn es sich um eine besondere, seltene Detailinformation handelt.

Die bisher am Menschen erhobenen Befunde werden weitgehend in die einzelnen Untersuchungsgebiete der experimentellen Toxikologie eingeordnet, da sie letztlich für die Beurteilung der Verträglichkeit und Risikoabschätzung für den Menschen von entscheidender Bedeutung sind. Dennoch wird die Verträglichkeit am Menschen in einem gesonderten Kapitel zusammengefasst (siehe 9.).

1. Eingesetztes Produkt

Für die Kryokonservierung von Knochenmark- und peripheren Blutstammzellen wird DMSO in Apothekenqualität eingesetzt. Das Produkt ist eine klare, farb- und geruchlose Flüssigkeit, auf Sterilität, Pyrogen- und Endotoxinfreiheit gemäß European und US Pharmacopeia und auf Mycoplasmenfreiheit gemäß DAB 10, V.2.1.3.6. geprüft.

Jede Lieferung ist mit einem gesonderten Analysenzertifikat versehen.

Die Endkonzentration im Präparat beträgt je nach Hersteller in der Regel ca. 5,5 – 10 %.

2. Chemisch-physikalische und biologische Eigenschaften (15; 53;58;61)

DMSO, das bereits 1867 durch Oxydation von Dimethylsulfid synthetisiert wurde (15), ist eine farb- und geruchlose Flüssigkeit mit schwach bitterem Geschmack und leicht süßem Nachgeschmack mit folgenden Kenndaten: Schmelzpunkt 18,45°C; Siedepunkt 189°C; Flammpunkt 95°C; relative Dichte d^{20} 1,1; Viskosität bei 20°C 1,1 mPa • s; MW 78,14.

DMSO ist stark hygroskopisch, komplett mit Wasser, Alkohol, Chloroform und Methylenchlorid mischbar und kann den Gefrierpunkt von Wasser deutlich herabsetzen (40%ige wässrige Lösung - 40°C) (33).

DMSO gibt selbst keine Protonen bei chemischen Reaktionen ab, ist aber ein Protonenakzeptor bei der Wasserstoffbindung und bewirkt dadurch die Spaltung von Wasserstoffbindungen. DMSO bildet bei exothermer Reaktion einen Komplex mit Wasser im Verhältnis 2:1. Das DMSO-Hydrat enthält etwa 67 v/v % Wasser.

Seine einzigartige Fähigkeit, lebende Gewebe (Membranen) ohne Schädigung zu durchdringen, ist vermutlich auf seine Polarität und die o.g. Fähigkeit zur Wasserstoffbindung zurückzuführen. Dabei scheint DMSO eisähnliche Wassercluster (Assoziante) zu stabilisieren (60). In unterschiedlichen biologischen Systemen in vitro und/oder in vivo wirkt DMSO zell-differenzierend, als Hydroxylradikalfänger und intrazellulärer Elektronenentkoppler, mobilisiert intrazellulär LDL-Cholesterin, wirkt als Kryoprotektivum (siehe Kapitel 8), wird als Lösungsvermittler in der Elektronenmikroskopie und, allein oder in Kombination mit anderen Arzneimittelwirkstoffen, in der Arzneimitteltherapie in einer Vielzahl von Indikationen eingesetzt (siehe Kapitel 4) (53).

3. **Natürliches Vorkommen** (33; 34; 61)

DMSO kommt physiologisch im menschlichen Plasma in einer Konzentration von 20-40 ng/ml und in Spuren in einer Vielzahl von Nahrungsmitteln in Konzentrationen bis zu 16 µg/g vor.

4. **Verwendung in der Medizin** (33; 34; 58; 61)

DMSO wird aufgrund seiner physikalisch-chemischen (siehe Kapitel 2), pharmakologischen (siehe Kapitel 5) und pharmakokinetischen Eigenschaften (siehe Kapitel 6) vorwiegend bei dermalen Verabreichung in der Therapie bei muskulo-skelettalen Störungen (Zerrungen, Stauchungen, Bursitiden sowie bei Sklerodermie, postthrombotischem Syndrom und M. Raynaud) eingesetzt.

Neben seiner antiphlogistischen, hyperämisierenden und analgetischen Wirkung zeichnet es sich durch Penetrationsförderung topisch applizierter Wirkstoffe aus (penetration enhancer). Die durchschnittliche Dosis bei dermalen Verabreichung liegt bei 0,1-0,2 g/kgKG/Tag (27).

Zur Behandlung der interstitiellen Zystitis wird es als 25-50%ige Lösung in die Harnblase instilliert (33; 34; 56). Daneben sind Anwendungen bei Hirnödem, Amyloidose und Schizophrenie beschrieben (53). Darüber hinaus dient es bei biologischen Versuchen mit Zellsystemen in vitro als häufig eingesetzter Lösungsvermittler (61) und ist als Hilfsmittel bei der Kryokonservierung von Zellen und Geweben (53;58) unentbehrlich (siehe Kapitel 8).

Zu Verträglichkeit und unerwünschten Wirkungen beim Menschen siehe Kapitel 9.

5. **Pharmakodynamik und Wirkungsmechanismus** (11; 15; 26; 27; 28; 58; 61; 64)

DMSO hat einen (milden) **analgetischen Effekt**, der vermutlich auf eine Hemmung der Reizleitung in den sensiblen Nerven und auf die dortige lokale Konzentration zurückzuführen ist (61). Ein systemischer analgetischer Effekt war nicht eindeutig nachweisbar.

In verschiedenen tierexperimentellen Modellen (z.B. Dinitrochlorbenzol-induzierte Kontaktdermatitis, Drucknekrose der Haut, Granuloma-Pouch-Test u.a.) war DMSO in der Mehrzahl der Untersuchungen, aber keineswegs immer, **entzündungshemmend** wirksam (61; 64), vor allem bei topischer Applikation. Vermutlich ist die Wirkung auf das Abfangen reaktiver Sauerstoffmetaboliten, die von aktivierten phagozytierenden Zellen freigesetzt werden, durch den oxidativen Abbau von DMSO zurückzuführen (11). Zusätzlich konnte die (lokale) Prostaglandinsynthese gehemmt werden (61). Allerdings ergaben Untersuchungen von Enzymen der Prostaglandinsynthese (PGS) in vitro, dass die PGS durch DMSO nicht über die normale physiologische Konzentration hinaus verändert wird (11). Ferner wirkt DMSO der Bildung und Freisetzung weiterer Mediatoren entgegen (33).

Die **gefäßerweiternde** Wirkung von DMSO bei Auftragung auf die Haut wird auf eine **histaminfreisetzende** Wirkung zurückgeführt (15; 27). Allerdings liegen zur histaminfreisetzenden Wirkung unterschiedliche Ergebnisse aus in vitro Untersuchungen an Peritonealzellen von Ratten vor. Während DMSO einerseits in niedrigen Konzentrationen (0.62-10%) die durch andere Substanzen induzierte Histaminfreisetzung hemmt, stimuliert es seinerseits die Histaminfreisetzung in höheren Konzentrationen (10-40%) selbst (12).

Möglicherweise wird auch der **Kollagenabbau** beschleunigt (27; 64). Die Untersuchungsergebnisse sind allerdings nicht immer eindeutig.

Ein vermutlich osmotisch bedingter **diuretischer Effekt** ist bei Hunden, Rhesusaffen und Menschen nachgewiesen (61). Bei Ratten war zusätzlich zum angestiegenen Harnvolumen auch die Natrium- und Kaliumausscheidung erhöht (64).

Bestimmte in vitro Untersuchungen weisen auf eine mögliche **Cholinesterase-hemmende** Wirkung hin (15; 27; 64). In Anbetracht des Fehlens entsprechender systemischer Wirkungen nach sehr hohen Dosierungen scheint dieser Effekt jedoch in vivo ohne wesentliche) Bedeutung zu sein.

Die **Penetrationsförderung** durch Zellmembranen ist vermutlich auf eine reversible Konfigurationsänderung der Membranproteine durch Entzug oder Ersatz von Wasser zurückzuführen, durch die potentielle Poren (tubuläres System) geöffnet werden (52). Die natürliche Struktur der Proteine bleibt durch Wasserstoffbrücken, hydrophobe Interaktionen und andere stabilisierende Faktoren erhalten (61). Die Penetrationsförderung war nicht von irreversiblen Schäden der Hornschicht der Haut abhängig (27). Ausnahmen von der schnellen Penetrierbarkeit bilden Finger-, Zehennägel und Zahnschmelz (64). Zur Bedeutung der Penetrationsförderung für die Kryokonservierung siehe Kapitel 8.

In 20-25%iger Konzentration wirkt DMSO bakteriostatisch auf Staph. aureus, E. coli und Pseudomonas. Das Wachstum von B. tuberculosis wurde schon bei 1%iger Konzentration gehemmt (61). Den bereits beschriebenen Membraneffekten entsprechend (s.o.) scheint DMSO die Empfindlichkeit von Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) gegenüber antimikrobiellen Substanzen zu steigern (15; 27; 61; 64).

Hinweise auf **Interaktionen (Wechselwirkungen)** von DMSO mit anderen Wirkstoffen resultieren vorwiegend aus Untersuchungen im letalen Dosisbereich (15) und sind deshalb ohne Bedeutung für die Risikoabschätzung im vorliegenden Fall.

Ob die Förderung der tumorhemmenden Wirkung von Cyclophosphamid (58) ein direkt potenzierender Effekt oder nur eine Folge der Penetrationsförderung (Membraneffekt; siehe oben) ist, bleibt zu klären. Gleiches trifft auf die Verstärkung der neurotoxischen Wirkung der Substanz Sulindac zu (58) (dieser nichtsteroidale Entzündungshemmer befindet sich nicht mehr im Handel). DMSO ist in der Lage, die Wirkung von Stoffen zu verstärken (15). Die Wirkungsverstärkung scheint eher auf die Lösungsvermittlung durch DMSO sowie dessen Membraneffekte zurückzuführen zu sein und nicht auf einer Interaktion auf Rezeptorebene zu beruhen.

Im Hinblick auf den Einsatz in der Kryokonservierung von Blut und Blutzellen (siehe Kapitel 8) ist der **hämolytische Effekt** von DMSO von Interesse. Eine 5 v/v %ige DMSO-Lösung ist in vitro etwa so stark hämolysierend, wie eine 0.9 w/v %ige NaCl-Lösung. Eine nennenswerte Hämolyse (2%) tritt erst bei einer 25 v/v %igen DMSO-Konzentration auf. Die osmotische Resistenz von Erythrozyten ist ab 7 v/v % DMSO deutlich erniedrigt (21). Intravaskuläre Hämolyse und daraus resultierende Hämoglobinurie können durch Erniedrigung der Konzentration ($\leq 20\%$) und Verlängerung der Infusionszeit vermieden werden (58).

Die in vitro durch endogene Mediatoren (ADP, Adrenalin, Arachidonsäure, Kollagen) auslösbare **Thrombozytenaggregation** wird durch DMSO (0.25-5 %) konzentrationsabhängig **gehemmt** (36).

Untersuchungen über spezifische pharmakodynamische Effekte der Metaboliten Dimethylsulfon (DMSO_2) und Dimethylsulfid (DMS) sind spärlich. In experimentellen Modellen an Ratten und Mäusen (Taurinexkretion, Letalität von Benzol und Chlorbenzol, Cholinesterasehemmung von Paraoxon und Octamethylphosphoramid, Messung von Körpertemperatur und Motilität) war $\text{DMSO} > \text{DMSO}_2 > \text{DMS}$ wirksam. Daraus ist zu schließen, dass die Metaboliten an den nach DMSO beobachteten pharmakodynamischen Wirkungen beteiligt sein könnten (31).

6. Pharmakokinetik (11; 27; 28; 32; 61)

Resorption und Plasmakonzentration

Nach **dermaler** Verabreichung wurden maximale Plasmakonzentrationen (T_{max}) bei Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen und Hunden nach 10 Minuten (niedrigste Angabe für Ratten) bis 2 Stunden erreicht. Nach dermaler Verabreichung an Menschen waren bereits nach 5 Minuten Plasmakonzentrationen nachweisbar, T_{max} wurde aber erst nach 4-8 Stunden erreicht.

Nach **p.o.** Gabe wurde T_{max} beim Menschen nach 4 Stunden, bei der Ratte nach 0,5 - 4 Stunden erreicht (34; 61).

Nach **i.v. Transfusion** von 180-585 ml Stammzelltransplantaten, die 10 v/v% DMSO entsprechend 254-824 mmol DMSO (= 18-58,5 ml oder 19,85-64,4 g) enthielten, über 20-120 Minuten, wurden C_{max} von $19,1 \pm 6,3$ mmol/L (= $1,5 \pm 0,5$ g/L oder $1,5 \pm 0,5$ mg/ml) im Plasma gemessen. Die Plasma-DMSO₂-Konzentrationen stiegen innerhalb von 24 h auf ein Plateau von $4,4 \pm 1,2$ mmol/L an, das 48 h (letzte Probenahme) erhalten blieb.

DMSH₂ Konzentrationen im Plasma erreichten ein steady-state 5 Minuten nach Ende der Transfusion und blieben bei 3-5 mmol/L für 48 h (letzte Probenahme) (18).

Verteilung

Nach dermaler Applikation war die DMSO Konzentration (Radioaktivität; siehe Biotransformation) in der Haut und der darunter liegenden Muskulatur deutlich erhöht (32).

Nach p.o. und i.p. Verabreichung an Kaninchen, Ratten und Meerschweinchen waren deutliche DMSO Konzentrationen in verschiedenen Organen nach 30 Minuten messbar und nach 24 Stunden auf minimale Konzentrationen abgesunken (15). Die Konzentration in Knochen war deutlich niedriger als in den Weichteilen (61).

Verteilungsstudien bei wiederholter Verabreichung gaben keine Hinweise auf eine Akkumulation (von Radioaktivität) (27).

Biotransformation

DMSO wird schnell zu Dimethylsulfon (DMSO₂) und Dimethylsulfid (DMS oder DMSH₂) metabolisiert. Schon 24 Stunden nach Verabreichung ist kein DMSO mehr nachweisbar (21).

Der durch Oxidation entstehende Hauptmetabolit Dimethylsulfon (DMSO₂) erreicht nach dermaler Verabreichung bei Mensch und Versuchstieren T_{max} im Serum nach 36-72 Stunden und ist bis zu ca. 13 Tagen nachweisbar (15; 34). Der durch Reduktion entstehende Nebenmetabolit Dimethylsulfid (DMS) wird vorwiegend in Leber, Niere und Lunge gebildet und schnell durch mischfunktionelle Oxidasen zu DMSO reoxidiert (57). Der ausgeschiedene Anteil ist für den knoblauchartigen Geruch verantwortlich (34; 61).

Beide Metaboliten sind noch 2 Wochen nach Einmalgabe im Plasma nachweisbar (33) und identisch mit natürlich vorkommenden Metaboliten (15).

Insgesamt wurden bei pharmakokinetischen Untersuchungen nur etwa 80% der applizierten Dosis wieder gefunden. Es wird deshalb vermutet, dass sowohl der oxidative (zu Dimethylsulfon) als auch der

reduktive (zu Dimethylsulfid) Stoffwechsel letztlich bis zum Sulfat als Endprodukt führen (15), obwohl andererseits der Abbau bis zum Sulfat in vivo ernsthaft in Zweifel gezogen wird (21).

Ausscheidung

Die Ausscheidung erfolgt überwiegend über die Niere.

Die Eliminationshalbwertszeiten ($T_{1/2}$) sind von Spezies und Verabreichungsart abhängig (siehe Tab. 1).

Tab. 1 Eliminationshalbwertszeiten von ^{35}S (32), verabreicht als DMSO

Applikationsart	Spezies	$T_{1/2}$
i.v.	Ratte	6 h
	Hund	1.5-2 d
	Mensch	8 d
dermal	Ratte	8 h
	Hund	14 d
	Mensch	14 d
p.o.	Hund	1.5-2 d
	Mensch	< 5 d (61)

Da DMSO jedoch schnell (innerhalb von 24 Stunden) zu Dimethylsulfon (DMSO_2) metabolisiert wird (21), sind die in Tab. 1 angegebenen Zeiten sicher für Radioaktivität, vermutlich aber nicht für unverändertes DMSO zutreffend, für das eine $T_{1/2}$ von 11-14 h beim Menschen angegeben wird (58).

Die unveränderte Substanz, Dimethylsulfon und Dimethylsulfid werden renal und über die Faeces, letzteres auch über Haut und Lunge eliminiert (33). Das über die Lunge ausgeschiedene DMS beträgt etwa 3% der dermal verabreichten DMSO-Dosis (61).

DMSO_2 erscheint nach dermalen Gabe von 18%, nach p.o. Verabreichung zu 22% der gegebenen DMSO-Dosis im Harn. Es hat eine $T_{1/2}$ von 60-70 h (57), wird jedoch bis zu 20 Tagen nach dermalen Verabreichung ausgeschieden (15).

Das nach i.v. Stammzelltransfusion verabreichte DMSO (19,8-64,4 g/Patient; bei 50 kg KG = 0,4-1,3 g/kg) wurde bei Messung über 24 Stunden zu $44 \pm 4\%$ als DMSO und $4 \pm 1\%$ als DMSO_2 über die Niere eliminiert (18).

Die Substanz geht in die Muttermilch über (13).

7. Toxikologie (15; 27; 51)

7.1. Akute Toxizität

Ergebnisse aus systemischen Verträglichkeitsprüfungen bei einmaliger Verabreichung (akute Toxizität) sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2 Akute Toxizität von DMSO (15; 23; 38; 51;72)

Spezies	LD ₅₀ in g/kg nach den Verabreichungsarten				
	p.o.	i.v.	i.p.	s.c.	dermal
Maus	16,5-28,6	3,8-9,2	14,7-17,7	13,9-20,5	> 50
Ratte	17,4-28,3	5,2-8,1	> 5-13	12,0-20,5	> 40
Meerschweinchen	11	4	5,5	--	--
Kaninchen	14,0	--	--	--	--
Katze	--	4	> 4	--	--
Hund	> 10	2,4-2,5	--	--	> 11
Affe	> 4	4-> 11	--	--	> 11

Mit DL₅₀-Werten im g/kg-Bereich, selbst nach i.v. Verabreichung, ist DMSO als relativ ungiftig bei Einmalapplikation einzustufen.

7.2. Subchronische und chronische Toxizität (15; 23; 51; 62)

Subchronische und chronische Toxizitätsstudien wurden an Nacktmäusen, Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen, Hunden und Affen bei dermalen, p.o., i.v. und intraperitonealer Verabreichung mit Dauern von einigen Tagen bis zu 18 Monaten ausgeführt. Dabei wurden ≥ 50 -80%ige DMSO Lösungen verabreicht.

Mit Ausnahme von Veränderungen am Applikationsort (siehe Kapitel 7.6) und an den Augenlinsen (siehe unten) wurde DMSO systemisch außerordentlich gut vertragen.

Bei Ratten traten ab 5 g/kg p.o. Leberschäden, bei Hunden ab 0.4 g/kg i.v. zentrolobuläre Leberverfettungen auf. Todesfälle wurden bei Ratten ab 11 g/kg/Tag p.o., d.h. in einem Bereich nahe der bei einmaliger Verabreichung letalen Dosis, beobachtet.

Nach derart hohen Dosierungen traten Verminderung der Gewichtszunahme, Schädigungen des weißen Blutbildes (Abnahme der Leukozyten-, insbesondere der Lymphozytenzahl), Follikelatrophie in der Milz, Erosionen der Magenschleimhaut und Entzündungen im Dünndarm auf (23).

Bei Affen traten nach ≤ 9 ml/kg/Tag DMSO als 90 v/v %ige Lösung dermal oder ≤ 3 ml/kg/Tag p.o. über 18 Monate keine pathologischen Veränderungen auf. 9 ml/kg/Tag p.o. wirkten nach 15-53 Wochen tödlich (62).

Die Inhalation von DMSO in den Konzentrationen 2,9 g/m³ für 24 Stunden, 2,0 g/m³ für 40 Stunden und 0,2 g/m³ für 7 Stunden/Tag über 20 Tage verursachte bei Ratten keine wesentlichen Unverträglichkeitserscheinungen.

Nach wiederholter i.v. Verabreichung an Hunde (0,2 g/kg/Tag über 24 Tage) und Affen (3 g/kg/Tag über 9 Tage) traten vorübergehend (für einige Stunden) hämolytische Anämien mit Hämoglobinurie auf (27; 61).

Insgesamt waren auch keine kumulativen toxischen Effekte zu beobachten, wenn die täglich verabreichte Dosis nicht die maximal tolerierte Einzeldosis überschritt und die Konzentration der verabreichten Formulierung unter 50% blieb (15).

Spezielle Effekte am Auge

Von besonderem Interesse sind Veränderungen an der Augenlinse, die bisher nur bei Versuchstieren beschrieben wurden und dort dosisabhängig auftraten (27; 61). Behandlungsregimes und Grenzdosierungen, nach denen die Veränderungen (nicht) auftraten, sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Bei den Veränderungen handelt es sich um eine starke bilaterale Zunahme der Myopie (-20 Dioptrien) des Linsenkerns, während die periphere (corticale) Linsenzonzone unverändert ist (15) oder hyperop erscheint (27).

Während beim Schwein 2 Monate nach Absetzen der Behandlung (2,7-4,5 g/kg/Tag dermal für 27 Wochen) eine Rückbildung der Veränderung beobachtet wurde, war beim Hund auch 8 Monate nach Behandlungsende (5 g/kg/Tag p.o.) die Veränderung präsent (27).

In Linsen mit veränderter Brechkraft war die Konzentration von Harnstoff, Glutathion, Harnsäure und Aminosäuren erniedrigt und diejenige von Albuminoid angestiegen. Die Linsenveränderung scheint nicht eine einfache Folge der Veränderung des Wassergehalts zu sein (27; 51).

Ein Vergleich der Grenzdosierungen, die zu Effekten an der Linse führten (siehe Tab. 3), zeigt, dass die einzelnen Spezies möglicher Weise unterschiedlich empfindlich reagieren (Pferd, Kaninchen > Schwein > Hund > Ratte > Affe). Insgesamt scheint die wirksame Grenzdosis, unabhängig von der Verabreichungsart, etwa in der Größenordnung von 1g/kg/Tag zu liegen.

Beim Menschen wurden derartige Veränderungen auch nach 2 1/2jähriger Therapie bisher nicht beobachtet (15; 27; 48; 61).

Tab. 3 Behandlungsregimes und Grenzdosierungen, nach denen Linsenveränderungen aufgetreten/nicht aufgetreten sind (5; 15; 27; 51)

Applikationsart	-dauer (Wochen)	Spezies	Grenzdosis (g/kg/Tag), mit dem Befund	
			positiv	negativ
Dermal	12	Kaninchen	1,0	0,1-0,5
	4 (30 Tage)	Kaninchen	--	0,5
	78	Affe	--	9,0
	26	Affe	--	11,0
	9	Hund	2,5	--
	16	Schwein	1,5	--
	26	Schwein	--	1,5
	27	Schwein	< 2,7-4,5	--
	2	Pferd	--	0,4
	8	Pferd	0,6	--
	12 (90 Tage)	Mensch	--	1,0
	132 (2,5 Jahre)	Mensch	--	(≈ 0,1-0,2)

p.o.	52	Hund	--	1,0
	5	Hund	3,8	--
(p.o. ?)	104	Ratte	9,0	--
	26	Affe	3,3	--
	78	Affe	--	9,0
	52	Ratte	--	1,0

7.3. Reproduktionstoxizität

Fertilität

Fertilitätsstudien mit DMSO in dem heute üblichen Versuchsmodell an Ratten liegen nicht vor. Hoden, Prostata, Ovar und Uterus wurden jedoch nach langfristiger systemischer Verabreichung von DMSO [Ratten ≤ 11 g/kg/Tag, Hunde $\leq 8,25$ g/kg/Tag p.o. über 16 Wochen (23); Affen $\leq 9,9$ g/kg/Tag p.o. oder dermal über 18 Monate (61)] makroskopisch und mikroskopisch untersucht. Die Befunde ergaben keinerlei Hinweise auf eine Schädigung von Struktur und Funktion der Fortpflanzungsorgane. Aus dieser Befundlage können keine Hinweise auf eine mögliche Beeinträchtigung der männlichen und weiblichen Fertilität abgeleitet werden.

Embryonale Entwicklung

Die wiederholt berichteten Befunde am bebrüteten Hühnerei wurden wegen der zu vernachlässigenden Bedeutung des Modells für die Risikoabschätzung für den Menschen nicht berücksichtigt.

Nach i.p. Verabreichung von 5-12 g DMSO/kg an Mäuse und Ratten in 50%iger Lösung vom 6.-12. Tag der Gravidität traten vereinzelt Missbildungen auf. Bei Hamstern wurden nach ip. Gabe von 2,5-15 g/kg DMSO (100%) nach der höchsten Dosis gehäuft Missbildungen gesehen (54).

Wegen der Höhe der Dosierungen (nahe bei dem oder im letalen Dosisbereich bei Einmalgabe), der Höhe der Konzentration ($\geq 50\%$) und der Verabreichungsart (i.p.) sind diese Untersuchungen für die Risikoabschätzung unbrauchbar, da physikalisch-chemische nicht von toxikodynamischen Effekten unterschieden werden können.

Auch nach täglicher p.o. Verabreichung des Hauptmetaboliten von DMSO, Dimethylsulfon (DMSO₂), an Ratten vom 6.-20. Tag der Gravidität in Dosierungen bis 1.0 g/kg wurden keine unerwünschten Effekte auf Lebensfähigkeit der Feten, Wurfgröße, fetales Körpergewicht, Anomalie- und Mißbildungsrate gefunden (73).

In Kaninchenversuchen (5 g/kg p.o., 4 g/kg s.c. vom 6.-14. Tag der Gravidität) wurde eine Missbildung bei 83 Feten gefunden (15). Unabhängig davon, dass die Inzidenz im Bereich der Spontanmissbildungsrate [1,4 % (45)] liegt, ist auch hier die Dosishöhe zu kritisieren. Die gleiche Kritik trifft für die Gabe von 10 g/kg/Tag an Kaninchen zu, auch wenn keine Störungen der Fertilität und embryonalen Entwicklung beobachtet wurden.

Peri- und postnatale Entwicklung

Peri- und Postnatalstudien mit DMSO in dem heute üblichen Rattenmodell liegen nicht vor. Deshalb können aus tierexperimentellen Versuchsergebnissen keine Aussagen zur postnatalen Entwicklung der Neugeborenen während der Laktationsphase der Mutter gemacht werden.

In einer Studie an Ratten wurde jedoch DMSO in Dosierungen ≤ 11 g/kg/Tag p.o. über 16 Wochen an Tiere verabreicht, die sich mit einem Körpergewicht von etwa 100-150 g bei Behandlungsbeginn noch in juvenilem Alter in der frühen Wachstumsphase befanden (23). Mit Ausnahme einer Verminderung der Gewichtszunahme bei männlichen Tieren nach Dosierungen $> 2,75$ g/kg/Tag waren keinerlei schädigende Wirkungen bis zu dieser Dosis zu diagnostizieren. Dementsprechend sind aus den tierexperimentellen Befunden bis zu diesem Dosisbereich auch keine Bedenken für den kindlichen und juvenilen Organismus abzuleiten.

Insgesamt lassen die Ergebnisse der tierexperimentellen in vivo Studien nicht vermuten, dass bei den in der Therapie und Kryokonservierung eingesetzten Dosierungen, Konzentrationen und Behandlungsdauern (in der Regel Einmalgaben oder wiederholte Einzelapplikationen in Abständen von mehreren Tagen oder Wochen) reproduktionstoxikologische Effekte auftreten könnten.

7.4. Genetische Toxizität

Hinweise auf eine genotoxische Wirkung an Systemen, die routinemäßig zur Prüfung von Chemikalien eingesetzt werden, liegen nicht vor (13).

Die wiederholte (1x täglich an 5 aufeinander folgenden Tagen) i.p. Verabreichung an Ratten verursachte ab 550 mg/kg/Tag einen Anstieg von Chromatidbrüchen in Knochenmarkzellen, die 24 Stunden nach der letzten Applikation untersucht wurden. Das Phänomen wird als Schädigung der Integrität der Chromosomenstruktur in vivo interpretiert (29), scheint jedoch für die therapeutische Anwendung und Sicherheit von DMSO ohne Bedeutung zu sein.

In vitro war die Thymidinaufnahme, Phythämagglutinin-stimulierter leukämischer Lymphozyten unter DMSO-Einfluss (0,1-1,0% DMSO Zugabe) etwa doppelt so hoch wie bei normalen Lymphozyten. Generell wird der fördernde Einfluss von DMSO in diesen Konzentrationen ($< 2\%$) auf den Thymidineinbau auf eine Modulation der Membranfunktion der Zellen (siehe Kapitel 5) zurückgeführt (17).

7.5. Tumorigenität

In experimentellen Studien verzögerte DMSO den tumorigenen (karzinogenen) Effekt von 8,10-Dimethyl-1,2-benzanthrazen (64).

Hinweise auf eine tumorigene Wirkung von DMSO liegen nicht vor (13).

Die signifikante Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate von Menschen bei Magen- und Kolonkarzinomen wird auf die Inaktivierung von Hydroxylradikalen (siehe Kapitel 5) zurückgeführt (33; 34).

7.6. Lokale Verträglichkeit

Haut

Nach (einmaliger) Verabreichung von relativ hohen Konzentrationen (70-100%) auf die Haut des Menschen verursacht DMSO umgehend Stechen und Brennen, gefolgt von mildem Erythem und Juckreiz. Die Symptome sind vermutlich auf Histaminfreisetzung (siehe Kapitel 5) und die exotherme Reaktion (siehe Kapitel 2) zurückzuführen (15) und klingen in der Regel nach 1-2 Stunden ab (15; 31). Die meisten Patienten scheinen 70-80%ige Lösungen auf der Haut zu tolerieren. Nur bei wenigen, besonders empfindlichen Individuen treten unerwünschte lokale Effekte schon nach 15%iger Lösung auf (58).

Die langfristige dermale Behandlung kann zu Austrocknung der Haut und Schorfbildung führen und eine entsprechende kosmetische Behandlung erforderlich machen (58).

Ödembildung und entzündliche Reaktionen wurden auch tierexperimentell nachgewiesen (11).

Konjunktiva

Die (einmalige) Verabreichung auf die Konjunktiva führt zu gering- bis mittelgradiger Konjunktivitis und Lidödem für etwa 24 Stunden. Die Irritationen klingen ab, ohne bleibende Schäden zu hinterlassen (51). Konzentrationen von $\leq 50\%$ wurden ohne Reizerscheinungen vertragen (11).

Bei in vitro Versuchen kam es in der Cornea zu einem Austausch von Wasser gegen DMSO, anscheinend in einer Mengen von Mol pro Mol (51).

Harnblase

Auf der Blasenschleimhaut des Hundes wurde die einmalige Instillation von 25 ml 25%iger oder 50%iger DMSO-Lösung für 30 Minuten symptomlos vertragen. Nach 100%iger Lösung traten bei gleichem Applikationsmodus Ödem und oberflächliche Hämorrhagien auf. Die chronische Behandlung mit 2 x wöchentlich 25 ml 25 oder 50%iger DMSO Lösung für jeweils 30 Minuten über bis zu 6 Monaten ergab keinen pathologischen Befund.

Beim Menschen wurden zur Behandlung von chronischer interstitieller Cystitis intravesikal 50 ml 50%iger DMSO Lösung für 15 Minuten alle 14 Tage, mit fortschreitendem Therapieerfolg in Abständen von etwa 1 bis 3 Monaten, bis zu ≥ 2 Jahre lang instilliert. Weder lokal noch systemisch (einschließlich Auge; siehe Kapitel 7.2) wurden unerwünschte Effekte beobachtet (56).

Blutgefäße

Bei der iv. Verabreichung wurden 10 und 25%ige DMSO Lösungen (von Hunden) auch bei wiederholter Gabe vertragen, während ab 50%iger Konzentration Gefäßverschlüsse (intravasale Thromben), bei höheren Konzentrationen bei Ratten auch Nekrosen auftraten (15).

Bei in vitro Versuchen wurde eine Endothelschädigung der Aorta der Ratte ab 30% DMSO beobachtet (27).

7.7. Immuntoxizität

Die Senkung von Schilddrüsenantikörpern bei experimenteller Autoimmun-Thyreoiditis der Ratte weist auf einen spezifischen immunosuppressiven Effekt von DMSO hin; dabei stieg das Verhältnis von IgM- zu IgG- plaque-bildenden Zellen an. DMSO könnte die Reifung von B-Zellen (IgM- zu IgG- produzierenden Zellen) verzögert haben (61).

In das gleiche Bild passt die schnelle und lang anhaltende Senkung von humoralen Antikörpern gegen Acetylcholinrezeptoren durch DMSO-Behandlung bei experimentell erzeugter Myasthenia gravis an Ratten (48).

Auch bei Mäusen führten sehr hohe Dosierungen (4,4 g/kg/Tag ip. für 7 Tage) zu einer Senkung von IgG und IgA, aber nicht von IgM.

Bei Tieren, die gegen Schafserthrozyten sensibilisiert waren, war nach p.o. Gabe von DMSO mit dem

Trinkwasser (27-52 g DMSO/kg/Tag) eine Senkung von Plaque-bildenden Zellen, Hämagglutinationstiter und IgG₁-Konzentration im Serum zu beobachten (41).

In einem in vitro System für den Nachweis einer verzögerten Immunantwort konnte gezeigt werden, dass DMSO in der Lage war, die Bildung von macrophage imigration inhibiting factor (MIIF) von Ovalbumin-sensitiven Lymphozyten zu steigern. Der Effekt ist vermutlich, wie viele andere (siehe Kapitel 5., 7.4., 8), auf eine Modulation der Funktion der Zellmembran zurückzuführen. Dimethylsulfon war in diesem Modell unwirksam (6).

Obwohl die o.g. Effekte (Senkung der humoralen Immunantwort) im Hinblick auf den Einsatz von DMSO zur Kryokonservierung von allogenen Blutstammzellen eher positiv bewertet werden könnten, ist ihre Bedeutung unter Berücksichtigung der in den Modellen wirksamen Dosierungen/Konzentrationen wohl eher zu vernachlässigen.

Bei der Kryokonservierung von Thrombozyten mit 5% DMSO wurde eine deutliche Komplement-aktivierung nach dem Auftauen auf die Substanz zurückgeführt (7).

7.8. Umweltrisiken

An Lachs und Forelle wurde die DL₅₀ nach ip. Injektion mit 12-17 g/kg ermittelt. Im Wasser tolerierten beide Fischarten eine Konzentration von 2% DMSO über 100 Tage. Bei Exposition gegenüber einer 4%igen Konzentration kam es zu Erosionen an den Kiemen. 4.6% führten innerhalb von 86 Stunden zum Tode (15).

An Zebra-Fisch Embryos hatten Konzentrationen bis zu 2.0 v/v% (höchste geprüfte Konzentration) keinen negativen Effekt auf die Überlebensrate. 0.1 v/v% waren ohne Einfluss auf die embryonale Entwicklung. Höhere Konzentrationen (≥ 1.0 v/v%) führten zu deutlichen Entwicklungsstörungen ((schwache Pigmentierung, Ödeme, Körperkrümmung, Augen- und Schwanzdefekte, reduzierte Herzfrequenz, abnorme Streifung), die jedoch nach DMSO geringer ausgeprägt waren als nach gleichen Konzentrationen von Äthanol. DMSO erwies sich als stärkster Induktor von Hitzeschock-(Stress-) Proteinen. Konzentrationen von ≤ 1 v/v% sind als unbedenklich für diese Spezies anzusehen und werden als Lösemittel für Testsubstanzen, die in diesem Testsystem geprüft werden sollen, empfohlen (77). Froschembryonen und -larven reagierten empfindlicher. In diesem Testsystem sollten DMSO-Konzentrationen von 0.01 v/v% nicht überschritten werden (78).

DMSO ist als schwach wassergefährdender Stoff in die Wassergefährdungskategorie 1 eingestuft. Es wird im Wasser nicht hydrolytisch gespalten und ist daher [in reiner Form (Günzel)] umweltgefährlich, d.h. es darf in reiner Form nicht in die Kanalisation oder Oberflächengewässer gelangen, sondern muss als Sonderabfall entsorgt werden. Allerdings ist [wegen seiner guten Mischbarkeit mit Wasser und seiner biologischen Abbaubarkeit (Günzel)] eine Bioakkumulation nicht zu erwarten (13).

8. Kryokonservierung

8.1. Kryobiologische Vorgänge und ihre Beeinflussung durch Kryoprotektiva (25; 65)

Bei dem **unbeeinflussten Gefriervorgang** entzieht die Eisbildung dem extrazellulären Raum Wasser und führt zu einer Erhöhung der Konzentration gelöster Stoffe in der nicht gefrorenen Extrazellulärlüssigkeit.

Die Zellen reagieren auf die erhöhte extrazelluläre Konzentration mit der Abgabe von Wasser in den Extrazellularraum, um das Equilibrium zwischen dem Intra- und Extrazellularraum wieder herzustellen. Bei sehr schneller Abkühlung kann der Konzentrationsprozess im Extrazellularraum schneller ablaufen, als Wasser aus den Zellen hinaus diffundiert. Folge dieser Imbalance der Konzentration ist die intrazelluläre Eiskristallbildung, die für die Zellen tödlich ist. Als weiterer schädigender Faktor wird die Änderung der Zusammensetzung (Konzentrationsänderung) der Zellflüssigkeit selbst diskutiert (74).

Durch den Einsatz von **Kryoprotektiva**, die in die Zelle eindringen und die Membranpermeabilität erhöhen, wie z.B. DMSO, kann der intrazellulären Eisbildung und damit der Zellzerstörung vorgebeugt werden. Dabei wird durch den Einstrom von DMSO und dessen Wasserbindung ein Verdünnungseffekt für das Cytoplasma erzielt. Dagegen führen Kryoprotektiva, die nur im extrazellulären Raum bleiben, wie z.B. Dextran, auch nur zu einem kolligativen Effekt im Extrazellularraum.

Bei der Kryokonservierung spielen natürliche Permeabilitätsunterschiede der Membranen verschiedener Zelltypen für die zu beobachtenden Effekte eine große Rolle. Die Durchlässigkeit der Zellmembranen für Wasser von Blutzellen ist bei

Erythrozyten >> Granulozyten > Lymphozyten > Monozyten > Stammzellen.

Daraus resultiert, dass bei gleichen Kryokonservierungsbedingungen die einzelnen Zelltypen unterschiedliche Überlebenschancen und -raten haben. Dementsprechend werden bei Bedingungen, die für Stammzellen eine hohe Überlebensrate sichern, die anderen Zellen, insbesondere Erythrozyten (siehe o.g. Permeabilitätsrangfolge), lysiert. Darüber hinaus scheint die Zelldichte (höherer Prozentsatz hämolysierter Zellen bei höherer Zelldichte) für den Hämolysegrad von Bedeutung zu sein.

Zusätzlich zu den Einflüssen auf Membranpermeabilität und Wassergehalt der Zellen werden Effekte von Kryoprotektiva auf die Stabilisierung von Membranen bei tiefen Temperaturen, das Kristallisationsverhalten und weitere Mechanismen diskutiert.

8.2. DMSO in der Kryokonservierung

Der erste Bericht über die kryoprotektiven Eigenschaften von DMSO wurde 1959 publiziert und befasste sich mit dem Schutz von **Erythrozyten** und **Spermien** gegen Schädigung beim Einfrieren (37). DMSO allein hat bei Konzentrationen von 5-10% einen ausgezeichneten Schutzeffekt auf eine Reihe unterschiedlicher Zellsysteme vor der schädigenden Wirkung des Einfrier- und Auftauprozesses.

Das graduierte Hinzufügen von DMSO bis zu einer Konzentration von 5% beim Einfrieren (-1°C/min.) einer **Thrombozytensuspension** in Plasma zur Kryokonservierung (Lagerung bei -79°C) ist seit 1972 beschrieben. Nach schnellem Auftauen und Verdünnung des DMSO-haltigen Mediums, seiner Entfernung durch Zentrifugation und Resuspendierung der (auf diese Weise „gewaschenen“) Thrombozyten stand ein Transfusionspräparat mit optimaler hämostatischer Funktion zur Verfügung. Das auf diese Weise aus 500 ml Blut hergestellte Präparat enthält zum Zeitpunkt der Transfusion noch 30-60 mg DMSO (pro Dosis) (4).

Besondere Beachtung ist bei der Kryokonservierung den Unterschieden von Membranen zu schenken: Erythrozytenmembranen sind in vielerlei Hinsicht atypisch und unterscheiden sich von den Membranen von anderen Geweben, Spermien und Bakterien in chemischer Zusammensetzung und biologischer Ultrastruktur (3).

Die beste kryoprotektive Wirkung auf Säugerzellen (mit Ausnahme von Erythrozyten) wird mit DMSO in Konzentrationen von 5-10% während des Gefrier- und Auftauprozesses erreicht, wobei gewöhnlich die Abkühlungsgeschwindigkeit bei -1 bis -20°C/min und die Auftaurate bei 100°C/min liegen. Auf diese Weise behandelte Zellen haben eine Überlebensrate von 50-95% (3).

Dennoch wird bei hohen Konzentrationen von DMSO (>10%) und langen (> 2 Stunden) Zeiten für die Präparation von (Knochenmark-) Transplantaten (pre-freeze plus post-freeze thaw) ein zytotoxischer Effekt (Verlust an vitalen Zellen) beobachtet. Als mögliche biochemische Mechanismen für diesen zytotoxischen Effekt werden u.a. Veränderungen im Zellskelett, epigenetische Ereignisse und Cross-linking von nukleären Proteinen diskutiert (25).

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).

Die Kombination von 0.25% DMSO und 9.75% Dextran 70 führte zu nahezu gleichen Überlebensraten wie 10% DMSO allein. Mit einer Kombination von 1% DMSO und 9% Dextran 70 wurde eine Überlebensrate von nahezu 100% erreicht (3).

Bei der Kryokonservierung menschlicher hämatopoetischer Stammzellen waren bei einer Lagerung bis zu 6 Monaten 5% und 10% DMSO vergleichbar wirksam (20). Inzwischen liegen positive Erfahrungen über 12 Jahre vor. Dabei erwies sich für die Erfolgsrate weniger die DMSO-Konzentration (5 oder 10%) als vielmehr die Zahl der CD34+-Zellen als bedeutsam (75).

Bei einem umfangreichen Vergleich der Erfolgsraten nach Transfusion mittels DMSO kryokonservierter (105 Fälle) oder ohne DMSO frisch präparierter (106 Fälle) Transplantate von verwandten allogenen Spendern wurden mit Ausnahme einer erhöhten Kryosensitivität Megakaryozyten-bildender Kolonien keine signifikanten Unterschiede bei Neutrophilen, Lymphozyten, Thrombozyten und Gesamtüberlebensraten gefunden (76).

Obwohl umfangreiche Erfahrungen mit der Kryokonservierung hämatopoetischer Stammzellen aus Plazentarestblut bei 10%iger DMSO-Konzentration vorliegen (22; 39; 55), wird der Einsatz der 5% igen DMSO Konzentration für optimal (80) oder ausreichend gehalten (40) oder es werden 7,5% DMSO empfohlen (9).

Auch die Kombination von 5% DMSO mit 6% Hydroxyethylstärke hat sich bewährt (9; 55). Bei einer Konzentration von 10 v/v% DMSO im Kryokonservat von Plazentarestblut ergab die Untersuchung nach dem Auftauen bei einer Lagerung über 2-8 Wochen für die kernhaltigen mononukleären Zellen eine Wiederfindungsrate von 90% bei >90% Viabilität. Die Lagerung über 15 Jahre resultierte in einer Wiederfindung von 80% bei >95% Viabilität (30).

Wegen des gelegentlichen Auftretens von unerwünschten Arzneimittelwirkungen bei der Transfusion aufgetauter Stammzellpräparate (z.B. Hautrötung, Atemnot, Übelkeit, abdominale Krämpfe, Erbrechen, Diarrhoe, lokale Vasospasmen, Hypo- und Hypertension, kardiale oder anaphylaktoide Reaktionen), die überwiegend auf die histaminfreisetzende Wirkung von DMSO zurückgeführt werden (55) (siehe Kapitel 5), sollte die Menge des mit dem Transplantat verabreichten DMSO soweit wie möglich reduziert werden bzw. die Applikation langsam unter ärztlicher Beobachtung fraktioniert erfolgen (67; 68; 69). Unter Beachtung dieser Vorsichtsmaßnahmen treten klinisch schwerwiegende Nebenwirkungen, wie etwa ausgeprägte Hypotensionen oder kardiale Arrhythmien, kaum auf bzw. sind aufgrund der intensiv-

medizinischen Überwachung der Patienten im Rahmen der Transplantation sofort behandelbar. Unter Berücksichtigung klinischer Erfahrungen werden sogar Applikationsdosen von 1g DMSO/kg Körpergewicht als für den Patienten akzeptabel eingestuft (72). Hinsichtlich des Transplantationserfolges hat der DMSO-Gehalt im Transplantat offensichtlich keinen Einfluss. Die Rate an erfolgreichem Engraftment war bei gewaschenen und ungewaschenen aufgetauten Präparaten gleich groß, ist jedoch abhängig von der Dosis koloniebildender (CFC's) und CD34⁺-Zellen (40).

9. Verträglichkeit beim Menschen (15; 27; 61)

Aufgrund seiner pharmakodynamischen Eigenschaften (siehe Kapitel 5), insbesondere seiner entzündungshemmenden und analgetischen Wirkung wurde und wird DMSO vor allem bei topischer dermaler Verabreichung zur Behandlung akuter muskuloskeletaler Verletzungen und Entzündungen (z.B. Bursitis, Tendinitis, Zerrungen, Osteoarthritis, progressive systemische Sklerose, Verstauchungen, post-traumatische Weichteilverletzungen) in Konzentrationen von 50-95% erfolgreich eingesetzt (61).

Auch bei systemischer Amyloidose gibt es eine Reihe positiver Behandlungsergebnisse nach täglicher p.o. Gabe von 4-15 g DMSO/Patient über 7-20 Monate, wobei der Wirkungsmechanismus ungeklärt ist (61).

Als unerwünschte Effekte stehen, neben dem knoblauchartigen Geruch der Atemluft nach allen Verabreichungsarten, nach dermaler Applikation Brennen und Rötungen auf der Haut im Vordergrund. Vereinzelt kam es zu Blasenbildung auf der Haut und Urticaria (8; 33; 34; 61) (siehe auch 7.6.).

Als unerwünschte systemische Effekte werden, geringgradig ausgeprägt und vorübergehend, nach massiven Dosierungen (1 g DMSO/kg/Tag dermal als 80%iges Gel) auftretend, Sedierung, Kopfschmerzen und Übelkeit berichtet. Ernsthafte Nebenwirkungen traten nicht auf (8; 33; 61).

Nach Transfusion einer Blut-Stammzell-Präparation, die 38 g DMSO (0,7 g/kg) und 45,5 g Hydroxyethylstärke (HES) (0,84 g/kg) enthielt, kam es nach 1,5 Stunden zu pulmonalem Ödem und Atemstillstand, die eine intensivmedizinische Intervention erforderlich machten. Für die Symptomatik werden die für die Kryokonservierung eingesetzten Hilfsstoffe DMSO und HES verantwortlich gemacht (42). Sofern diese Vermutung zutrifft, ist im Hinblick auf die Risikoabschätzung zu beachten, dass es sich bei dem hier geschilderten Fall um die gleichzeitige Verabreichung von DMSO **und** Hydroxyethylstärke in relativ hoher Dosierung gehandelt hat (vergleiche Kapitel 11).

Bei Erwachsenen und Kindern war im Vergleich zur Transplantation von nicht kryokonservierten Knochenmarkpräparaten ein gesicherter Anstieg unerwünschter Reaktionen wie Übelkeit, Schüttelfrost, Dyspnoe, erniedrigte Herzfrequenz, Hypo- und Hypertonie, abdominale Krämpfe, Diarrhoe, Kopfschmerzen, Fieber, Haemolyse vorübergehend zu beobachten, wenn bei der Transplantation die gesamte, zur Kryoprotektion eingesetzte DMSO-Menge mit dem Transplantat infundiert wurde (57; 59). Allerdings konnte nur für die Häufigkeit von Erbrechen nach > 200 mg DMSO/kg eine positive Korrelation zur DMSO-Dosis gefunden werden (57). Bei 30 pädiatrischen Patienten (2-18 Jahre alt), die Knochenmark- oder periphere Blutzellpräparationen erhalten hatten, wurden nach Transfusion von 0,2-0,8 ml DMSO/kg KG (entspricht 0,22-0,88 g DMSO /kg KG) mit den genannten Produkten keine schweren Nebenwirkungen und keine lebensbedrohlichen Zustände beobachtet. Die meisten Nebenwirkungen (Häufigkeit insgesamt 47%) traten nach Knochenmarkstransplantaten auf, während periphere Blutprodukte nur zu minimalen Beschwerden führten (47). Auch nach 0,17-2,38 g/kg DMSO (als 10 %iger Zusatz zu peripheren Blutstammzell-Suspensionen) wurde bei Kindern Erbrechen als einzige DMSO-verursachte unerwünschte Reaktion beschrieben. Die bei 8 von 31 Patienten (36 Transfusionen) beobachteten, mit

und ohne Behandlung vorübergehenden Schock-Symptome, die sowohl mit als auch ohne unterstützende Therapie schnell abklagen, werden offensichtlich nicht auf DMSO zurückgeführt. (43; 44). Zumindest einige der beobachteten o.g. Symptome sind vermutlich auf die DMSO-induzierte Histaminfreisetzung zurückzuführen (siehe Kapitel 5). Generell wird es für möglich gehalten, die Nebenwirkungsrate, die sich lt. einer neueren Umfrage in der Größenordnung von einer bei 70 Transplantationen bewegt und vorwiegend das Herz-Kreislauf-System und die Atmung betraf (63), durch Senkung der transfundierten DMSO-Menge zu reduzieren (1; 10; 14; 53; 57; 59; 63).

Die o.g. unerwünschten Arzneimittelwirkungen scheinen jedoch nicht nur auf DMSO zurückzuführen zu sein (s.o.), das mit großer Wahrscheinlichkeit vor allem für das Auftreten von Sedierung, Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen verantwortlich zu machen ist. An der weiteren Symptomatik dürften Zytolyseprodukte zumindest mitbeteiligt sein. An der positiven Korrelation zwischen Bradycardie und Erythrozyten(produkten) scheint kein Zweifel zu bestehen (1).

Die prospektive Auswertung transfusionsbedingter Unverträglichkeitserscheinungen nach Gabe von kryokonservierten autologen peripheren Blutstammzellen an 215 Patienten mit bösartigen hämatologischen Erkrankungen oder soliden Tumoren ergab, dass das weibliche Geschlecht, die Diagnose multipler Myelome und die Zahl der pro kg Körpergewicht transfundierten Granulozyten von deutlicher Vorhersagekraft für das Auftreten von Unverträglichkeitserscheinungen bei insgesamt ca. 57% der Fälle waren. Diese Verhältnisse zeigen, dass neben der transfundierten DMSO-Dosis die Zusammensetzung des Transplantats und die Grunderkrankung der Patienten wichtige Einflussfaktoren für das Auftreten transfusionsbedingter unerwünschter Effekte sind (79).

Die Bedeutung anderer Faktoren als DMSO für das Auftreten unerwünschter Effekte wird durch Befunde unterstrichen, die zeigen, dass auch nach seiner Entfernung solche (am häufigsten allergische Reaktionen, gefolgt von gastrointestinalen und respiratorischen Symptomen) auftreten. Als Risikofaktoren wurden die Zahl der Granulozyten und (Zell- ?) Verklumpungen identifiziert (81).

Eine **Reduktion von Zytolyseprodukten** durch einen vor der Kryokonservierung stattfindenden Aufreinigungsschritt des Transplantats sowie von **DMSO** im Transplantat durch einen **Waschprozess** erscheint deshalb unter toxikologischem Gesichtspunkt **wünschenswert** (16). Allerdings sind mit Waschprozessen nach dem Auftauen stets auch Verluste an Stammzellen verbunden, die den therapeutischen Effekt der Präparate erheblich reduzieren können. Daher wird im klinischen Betrieb in aller Regel auf das Waschen von aufgetauten Blutstammzell-Präparaten zur Reduzierung der DMSO-Belastung verzichtet. Ggf. auftretende leichtere Nebenwirkungen werden in Kauf genommen.

Die in Tierexperimenten beobachteten Veränderungen an der Augenlinse (siehe Kapitel 7.2) konnten beim Menschen nach täglicher dermaler Verabreichung von 1 g DMSO (80%ig)/kg/Tag über 90 Tage nicht nachgewiesen werden (8). Auch die Langzeitüberwachung dauertherapierter Patienten (\leq 21 Monate) erbrachte keine Hinweise auf derartige Veränderungen (27)

10. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

DMSO ist eine stark hygroskopische, komplett mit Wasser mischbare und deutlich Gefrierpunkt-herabsetzende Flüssigkeit, die in biologischen Systemen die einzigartige Fähigkeit hat, bei Einhaltung bestimmter Konzentrationen Membranen ohne Schädigung zu durchdringen.

Es kommt zu \leq 40 ng/ml physiologisch im menschlichen Plasma vor und wird in Spuren auch über Nahrungsmittel aufgenommen.

Aus pharmakodynamischen Untersuchungen sind im wesentlichen entzündungshemmende, gefäßerweiternde (Histamin-freisetzende), diuretische, Thrombozytenaggregation-hemmende und hämolytische Effekte bekannt. Daneben werden Förderung des Kollagenabbaus, Cholinesterase-hemmende und antimikrobielle Wirkungen beschrieben.

Die Penetrationsförderung durch Zellmembranen spielt bei den o.g. Effekten z.T. eine bedeutsame Rolle und wird pharmazeutisch für die dermale Verabreichung von anderen Wirkstoffen genutzt.

Interaktionen mit anderen Wirkstoffen auf Rezeptorebene sind nicht bekannt.

Die Metaboliten Dimethylsulfon (DMSO_2) und Dimethylsulfid (DMS; DMSH) sind pharmakodynamisch wenig untersucht und, wenn überhaupt, weniger wirksam als DMSO.

DMSO wird bei Versuchstieren und Menschen schnell resorbiert und offensichtlich vorzugsweise im Körperwasser verteilt. Es wird schnell zu Dimethylsulfon (DMSO_2) oxidiert. In geringer Menge entsteht durch Reduktion Dimethylsulfid (DMS; DMSH_2), das für den knoblauchartigen Geruch verantwortlich ist.

Die Ausscheidung der unveränderten Substanz und der Metabolite erfolgt vorwiegend über die Nieren, daneben über die Faeces und, in Form von Dimethylsulfid, auch über Haut und Lunge.

Die für die Risikoabschätzung für kryokonservierte Präparate aus autologen oder allogenen humanen Blutstammzellen wichtigsten Informationen zur Pharmakokinetik wurden durch Stammzelltransfusionen beim Menschen mit DMSO-Dosierungen von ca. 0,4-1,3 g/kg Körpergewicht gewonnen:

$C_{\max} \approx 1,5 \pm 0,5 \text{ mg/ml}$; Elimination bis 24 h zu 44% als DMSO und zu 4% als DMSO_2 über die Nieren.

Akute Toxizitätsprüfungen wurden an Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Katze, Hund und Affe durchgeführt. Mit DL_{50} -Werten im g/kg-Bereich, selbst nach iv. Verabreichung, ist DMSO als relativ ungiftig bei Einmalapplikation einzustufen.

Subchronische und chronische Toxizitätsstudien an Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Hund und Affe bei unterschiedlichen Verabreichungsarten und -dauern bis zu 18 Monaten erbrachten keine Hinweise auf spezifische systemische toxische Effekte. Dabei wurden ≤ 50 -80%ige DMSO-Lösungen verabreicht. Systemische Unverträglichkeitserscheinungen traten erst bei Dosierungen auf, die nahe bei oder im letalen Dosisbereich bei Einmalapplikation lagen.

Bestimmte Veränderungen am Auge (Myopie des Linsenkerns) traten bei verschiedenen Versuchstierspezies nach wiederholter längerfristiger Applikation (≥ 5 Wochen) von Dosierungen $\geq \approx 1,0 \text{ g/kg}$ auf. Beim Menschen wurden solche Veränderungen nach $\geq 0,1 \text{ g/kg}$ über 2,5 Jahre oder $1,0 \text{ g/kg}$ über 12 Wochen nicht beobachtet.

Reproduktionstoxikologische Untersuchungen wurden nur in begrenztem Umfang ausgeführt. Hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung der Fertilität ergaben morphologische Untersuchungen von Gonaden, Prostata und Uterus keine Hinweise auf schädigende Wirkungen.

Untersuchungen des möglichen Einflusses auf die Embryonalentwicklung sind aufgrund methodischer Mängel für die Risikoabschätzung weitgehend unbrauchbar, da die Dosierungen vorwiegend in der Nähe des letalen Dosisbereichs lagen. Soweit niedrigere Dosierungen verabreicht wurden, lassen diese nicht vermuten, dass bei den in der Therapie eingesetzten DMSO-Dosierungen und -Konzentrationen reproduktionstoxische Effekte zu erwarten sind.

Die Untersuchung des möglichen Einflusses auf die postnatale Entwicklung erfolgte erst nach Ende der Säugeperiode an juvenilen Tieren. Unerwünschte Wirkungen (u.a. Wachstumshemmung) traten erst bei langfristiger Verabreichung von Dosierungen > 2,75 g/kg/Tag auf.

Hinweise auf eine genotoxische Wirkung an Systemen, die routinemäßig zur Prüfung von Chemikalien eingesetzt werden, liegen nicht vor.

Beobachtungen über tumorigene Wirkungen wurden bisher nicht mitgeteilt. Eine Hemmung der Tumorgenese durch Sauerstoff- oder Hydroxylradikalfang von DMSO wird diskutiert.

Bei Konzentrationen von > 50% DMSO sind Unverträglichkeitserscheinungen auf der Haut (Stechen, Brennen, Erythem, Juckreiz, seltene Ödembildung und stärkere Entzündungen) und Schleimhaut (Konjunktiva: Irritationen, Ödeme, Harnblase: Ödeme, Hämorrhagien) zu erwarten. Nach i.v. Verabreichung können von dieser Konzentration an intravasale Thromben auftreten.

Zu nennenswerten Hämolysen bei intravasaler Gabe scheint es ab 25 v/v% zu kommen.

Effekte auf das Immunsystem waren nur nach extrem hohen Dosierungen und Konzentrationen in vivo und in vitro nachweisbar. Sie sind deshalb für die Risikoabschätzung zu vernachlässigen.

Reines DMSO ist als schwach wassergefährdender Stoff in die Wassergefährdungsklasse 1 eingestuft und muss als Sonderabfall entsorgt werden.

Beim Menschen werden, abgesehen von dem durch Dimethylsulfid verursachten knoblauchartigen Geruch, bei **dermalen** Applikation Tagesdosen von 0,1-0,2 g/kg auch über lange Zeiträume ohne unerwünschte systemische Effekte vertragen. Solche (Sedierung, Kopfschmerzen, Übelkeit) traten, wenig ausgeprägt vorübergehend, erst nach 1 g/kg/Tag auf.

Die i.v. Verabreichung von ≥ 100 bis > 200 mg DMSO/kg als Bestandteil von Blutstammzelltransplantaten führte zu relativ hohen Raten unerwünschter Reaktionen, wie vorübergehender Sedierung, Kopfschmerzen, Übelkeit, Schüttelfrost, Dyspnoe, Bradykardie und Hypertonie, bei > 200 mg/kg auch zu einem deutlichen Anstieg von Erbrechen.

Die o.g. unerwünschten Wirkungen sind vermutlich sowohl auf DMSO als auch auf den Granulozytengehalt und Zytolyse-Produkte zurückzuführen. Die Reduktion beider Komponenten durch einen Waschprozess ist deshalb wünschenswert, obwohl dieser Schritt für etwa die Hälfte des Verlustes kernhaltiger Zellen nach dem Auftauen und Waschen verantwortlich ist (35). Zum Erhalt der Wirksamkeit von Blutstammzell-Präparaten wird daher eine generelle Waschung im klinischen Betrieb kaum durchgeführt.

11. Generalzusammenfassung, Bewertung der Daten und Informationen und Unterschriften der Sachverständigen

DMSO wird in der Regel in einer Endkonzentration von maximal 5-10% zur Kryokonservierung von Blutstammzell-Präparaten aus den Quellen Knochenmark, peripheres Blut und Nabelschnurblut / Plazentarestblut eingesetzt.

Die Praxis (Transplantation autologer Stammzellen, kryokonserviert mit 10 v/v % DMSO) (18) zeigt, dass bei iv. Verabreichung von

0,4-1,3 g DMSO/kg Körpergewicht im Plasma ein C_{max} von $1,5 \pm 0,5$ mg/ml

erreicht wird. Diese Dosierung und die daraus resultierende Plasmakonzentration sind als repräsentativ für die gegenwärtig praktizierte Therapie bei Erwachsenen anzusehen, die akzeptiert und toleriert wird.

Die im Transplantat maximal mögliche Endkonzentration von 10 v/v% DMSO ist hinsichtlich der lokalen Verträglichkeit in Blutgefäßen noch als unbedenklich einzustufen.

Unter Berücksichtigung der für DMSO vorliegenden Daten zur Verträglichkeit im Tierexperiment und am Menschen können für die Verabreichung von Dosierungen und Konzentrationen in dem o.g. Bereich unter Berücksichtigung der Indikation keine absolut unvermeidbaren Risiken für den Empfänger abgeleitet werden.

Allerdings muss bei beabsichtigter Verabreichung von DMSO-haltigen Präparaten an Säuglinge und Kleinkinder auf einige Probleme besonders hingewiesen werden.

Auf Grund des Fehlens entsprechender pharmakokinetischer Untersuchungsergebnisse an Kleinkindern ist für die o.g. Aussagen die Extrapolation vom Erwachsenen auf den Säugling erforderlich. Die mit dieser Extrapolation verbundenen Unsicherheiten, relativ hohe Dosierungen und die dadurch möglicherweise verursachten Unverträglichkeitserscheinungen (z.B. vorübergehende Sedierung, Kopfschmerzen, Übelkeit, Schüttelfrost, Dyspnoe, Bradycardie, Hypo- oder Hypertonie, anaphylaktoide Reaktionen, bei Belastungen > 200 mg/kg auch ein deutlicher Anstieg von Erbrechen) lassen eine Absenkung der DMSO-Konzentration im Transplantat aus toxikologischer Sicht als wünschenswert erscheinen. Das kann unter anderem durch einen zusätzlichen Waschprozess geschehen, zumal dadurch zusätzlich Zytolyseprodukte reduziert werden, die neben der Granulozytenzahl (79) zumindest für einen Teil der beobachteten Symptomatik verantwortlich sein dürften (1; 10). Durch einen solchen Waschprozess kann bei sorgfältiger Ausführung unter aseptischen Bedingungen der therapeutische Effekt in der Regel, aber nicht in jedem Fall, erhalten bleiben (40). Es ist jedoch mit einer Abnahme zumindest der Intensität der unerwünschten Effekte, insbesondere der Herzfrequenz- und Blutdruckveränderungen (16), zu rechnen, wenn auch eine komplette Beseitigung der transfusionsbedingten unerwünschten Effekte nicht gelingt (50).

Allerdings können bei nicht absolut sachgerechter Durchführung dieses Waschprozesses das Ausmaß osmotisch bedingter Zellschäden und das Infektionsrisiko erheblich ansteigen. Außerdem entsteht ein zusätzlicher Zeitaufwand von 15 min (46) bis zu ca. 3-4 Stunden (59). Schließlich ist auch die Qualität des zur Verfügung stehenden Transplantats von erheblicher Bedeutung für die Vorschaltung eines Waschprozesses. Bei nahe den unteren Grenzwerten für kernhaltige und CD34⁺-Zellen liegenden Zellzahlen sollte auf einen Waschvorgang eher verzichtet werden, um einen manipulationsbedingten weiteren Zellverlust zu vermeiden (2; 24).

Deshalb sind der Mehraufwand und die Risiken im einzelnen Anwendungsfall durch den behandelnden Arzt vor Ort gegen die Risiken einer höheren DMSO- und Zytolyseprodukt-Belastung des Patienten abzuwägen. Dabei sind besonders die örtlichen Gegebenheiten (z.B. Verfügbarkeit von Reinraumtechnik, Clean Benches, geschlossenen Systemen für die Durchführung des Waschprozesses) zu berücksichtigen. Alternativ kann durch eine fraktionierte Gabe von DMSO-haltigen Präparaten die Nebenwirkungsrate deutlich gesenkt werden (68).

Zum anderen ist hervorzuheben, dass die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen bei Kleinkindern und Erwachsenen auf Grund einer vitalen Indikation erfolgt. Bei dieser Art der Indikation sind die o.g., z.T. nur theoretisch ableitbaren Bedenken zweifellos aus medizinisch-ethischer Sicht zurückzustellen. Sie werden vom therapeutischen Nutzen der Medikation eindeutig dominiert, insbesondere wenn man berücksichtigt, dass für Patienten, für die bisher auf Grund seltener Gewebe-

merkmale kein geeigneter Familien- oder Fremdspender gefunden werden konnte (ca. 20%), durch die gezielte Sammlung besonders gesuchter Gewebetypen nunmehr eine Heilungschance besteht.

Berlin – Homburg/Saar, 03. Dezember 2008

Dr. Peter Günzel

Prof. Dr. Hermann Eichler

Sachverständige

12. Referenzen

1. Alessandrino EP, Bernasconi P, Caldera D et al.
Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases.
Bone Marrow Transplant (1999) 23: 533-537
2. Antoneas V, Shaw PI, Bradstock KF
Inclusion of unwashed umbilical cord blood stem cells after thawing for allogenic transplantation.
Bone Marrow Transplantation (2004) 34:379
3. Ashwood-Smith MJ
Current concepts concerning radioprotective and cryoprotective properties of dimethyl sulfoxide in cellular systems. In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.
Ann NY Acad Sci (1975): 246-256
4. Baldini MG
Discussion paper: dimethyl sulfoxide as a cryoprotective agent for platelet preservation by freezing.
In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.
Ann NY Acad Sci (1975): 306-307
5. Barnett KC, Noel PRB
Dimethyl sulphoxide and lens changes in primates
Nature (1967) 214: 1115-1116
6. Bartfeld H, Goldstein A
Cell-mediated immunity: Its modulation by dimethyl sulfoxide. In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.
Ann NY Acad Sci (1975): 81-90
7. Bock M, Schleuning M, Heim MU, Mempel W
Cryopreservation of human platelets with dimethyl sulfoxide: changes in biochemistry and cell function.
Transfusion (1995) 35: 921
8. Brobyn RD
The human toxicology of dimethyl sulfoxide. In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.
Ann NY Acad Sci (1975): 497-506
9. Bruno A, Ballatare B, Adorno G, Caravita T et al.
Red blood cell depletion and cryopreservation of umbilical cord blood (UCB).
Bone Marrow Transplantation (1997) 20: 89-93
10. Calmels B, Houzé P, Hengesse J-C, T et al.
Preclinical evaluation of an automated closed fluid management device :Cytomate, for washing out DMSO from hematopoietic stem cell grafts after thawing.
Bone Marrow Transplant (2003) 31: 823-828

11. Calesnick B, Dinan A
Pharmakologie und Toxikologie von Dimethylsulfoxid (DMSO). In: Jacob SW, Herschler RJ, Schmellenkamp H. DMSO – Die Anwendung in der Medizin.
Springer; Berlin et al (1985): 26-3
12. Candussio L, Klugmann FB, Decorti G, Bevilacqua S, Baldini L
Dimethyl sulfoxide inhibits histamine release induced by various chemicals.
Agents and Actions (1987) 20: 17-21
13. Chemikalien-Lexikon 1999
Dimethylsulfoxid
<http://www.omikron-online.de/cyberchem/cheminfo/0177-lex.htm>
14. Curcoy AI, Alcorta I, Estella J et al.
Cryopreservation of HPCs with high cell concentration in 5-percent DMSO for transplantation in children.
Transfusion (2002) 42: 962
15. David NA
The pharmacology of dimethyl sulfoxide.
Annu Rev Pharmacol (1972) 12: 353-374
Davis JM, Rowley SD, Braine HG, Piantadosi S, Santos GW,
Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion.
Blood (1990) 75: 781-786
16. Davis JM, Rowley SD, Braine HG, Piantadosi S, Santos GW
Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion
Blood (1990) 75: 781-786
17. Dennis AJ
Altered mitogenic responsiveness of chronic leukemic lymphocytes and normal human lymphocytes treated with dimethyl sulfoxide. In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.
Ann NY Acad Sci (1975): 73-80
18. Egorin MJ, Rosen DM, Sridhara R, Sensenbrenner L, Cottler-Fox M
Plasma concentrations and pharmacokinetics of dimethyl sulfoxide and its metabolites in patients undergoing peripheral-blood stem-cell transplants.
J Clin Onc (1998) 16 (2): 610-615
19. Fiedler HP
Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete.
Editio Cantor, Aulendorf, 4. Aufl. (1996) pp 478-482
20. Galmés A, Besalduch J, Bargay J, Novo A, Morrey M, Guerra JM, Duran MA
Long-term storage at -80°C of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant.
Transfusion (1999) 39: 70-73
21. Gerhards E, Gibian H
The metabolism of dimethyl sulfoxide and its metabolic effects in man and animals.

- Ann NY Acad Sci (1967) 141: 65-76
22. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R et al.
Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors.
New Engl J Med (1997) 337 (6): 373-381
 23. Günzel P, Richter KD
Verträglichkeit von DOLICUR (Dimethylsulfoxyd) bei langdauernder Anwendung im Tierversuch.
In Laudahn/Schloßhauer: Dimethyl-Sulfoxyd DMSO, Symposium 2.7.1965
Berlin (1965) pp: 23-27; Literatur pp 115-119
 24. Hahn T, Bunrowasate U, George MC, Bir AS et al.
Use of nonvolume-reduced (unmanipulated after thawing) umbilical cord blood stem cells for
allogenic transplantation results in safe engraftment.
Bone Marrow Transplantation (2003) 32: 145-150
 25. Hubel A
Parameters of cell freezing: Implications for the cryopreservation of stem cells.
Transfusion Medicine Reviews (1997) 11 (3): 224-233
 26. Jacob SW, Herschler R
Pharmacology of DMSO.
Cryobiology (1986) 23: 14-27
 27. Jacob SW, Wood DC
Dimethyl Sulfoxide (DMSO). Toxicology, pharmacology, and clinical experience.
Am J Surg (1967) 114: 414-26
 28. Jacob SW, Wood DC, Brown JH
Therapeutic potential of dimethyl sulfoxide (DMSO) in aerospace medicine.
Aerospace Med (1969) 40 (1): 75-84
 29. Kapp RW, Eventoff BE
Mutagenicity of dimethylsulfoxide (DMSO): In vivo cytogenetics study in the rat.
Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis (1980) 1: 141-145
 30. Kobyłka P, Ivanyi P, Breuer-Briesendorf BS
Preservation of immunological and colony-forming capacities of long-term (15 years) cryopreserved
cord blood cells.
Transplantation (1998) 65: 1275-1278
 31. Kocsis JJ, Harkaway S, Snyder R
Biological effects of the metabolites of dimethyl sulfoxide. In: Jacob W, Herschler R. Biological
actions of dimethyl sulfoxide.
Ann NY Acad Sci (1975): 104-109
 32. Kolb KH, Jänicke G, Kramer M, Schulze PE, Raspé
Das Verhalten von ³⁵S markiertem Dimethylsulfoxid im menschlichen und tierischen Organismus.
Arzneim Forsch (Drug Res) (1965) 15: 1292-1295

33. Kommentar zum DAB 10
Dimethylsulfoxid – Dimethylis sulfoxidum.
Grundlfg. 1991, 4. Lfg. (1994): 1-3
34. Kommentar zur PH EUR. 1997
Dimethylsulfoxid – Dimethylis sulfoxidum.
9. Lfg. (1998): 1-3
35. Laroche V, McKenna DH, Moroff G et al.
Cell loss and recovery in umbilical cord blood processing: a comparison of postthaw and postwash samples.
Transfusion (1999) 45: 1909-1916
36. Lehuu B, Curtis-Prior PB
Effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on aggregation of human blood platelets.
J Pharm Pharmacol (1987) 39: 62-63
37. Lovelock JE, Bishop MW
Prevention of freezing damage to living cells by DMSO.
Nature (1959) 183: 1394-1395
38. Montaguti P, Melloni E, Cavalletti E
Acute intravenous toxicity of dimethyl sulfoxide, polyethylene glycol 400, dimethylformamide, absolute ethanol, and benzyl alcohol in inbred mouse strains.
Arzneimittelf (1994) 44 (4): 566-570
39. Mugishima H, Harada K, Chin M, Suzuki T, Takagi K, Hayakawa S et al.
Effects of long-term cryopreservation on hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood.
Bone Marrow Transplantation (1999) 23: 395-396
40. Nagamura-Inoue T, Shioya M, Sugo M, Cui Y et al.
Wash-out of DMSO does not improve the speed of engraftment of cord blood transplantation: follow-up of 46 adult patients treated with units shipped from a single cord blood bank.
Transfusion (2003) 43: 1285-1294
41. Nash DR, Steingrube VA, Warrington RJ
Primary immune responsiveness and other observations in mice given oral dimethyl sulfoxide.
Immunopharmacol (1983) 6: 191-201
42. Nishihara G, Sakemi T, Ikeda Y, Baba N, Shimamoto Y
Multiple organ failure associated with dimethyl sulfoxide and hydroxyethyl starch in autologous blood stem cell transplantation.
Nephron (1996) 72: 356-357
43. Okamoto Y, Takaue Y, Yasutomo K, Saito S et al.
Clinical toxicity at the infusion of cryopreserved and thawed peripheral blood stem cell grafts in children.
Rinsho Ketsueki (1992) 33(3): 317-321

44. Okamoto Y, Takaue Y, Saito S et al.
Toxicities associated with cryopreserved and thawed peripheral blood stem cell autografts in children with active cancer.
Transfusion (1993) 33: 578
45. Palmer AK
Reproductive toxicity risk assessment – some questions. In: Neubert D, Kavelock RJ, Merker HJ, Klein J. Risk Assessment of prenatally-induced adverse health effects.
Springer, Heidelberg (1992) pp 45-61
46. Perotti CG, Del Fante C, Viarengo G, Papa P et al.
A new automated cell washer device for thawed cord blood units.
Transfusion (2004) 44: 900-906
47. Perseghin P, Balduzzi A, Bonamoni S, Dassi M et al.
Infusion-related side-effects in children undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia.
Bone marrow transplantation (2000) 26(1): 116-118
48. Pestronk A, Drachman DB
Dimethyl sulphoxide reduces anti-receptor antibody titres in experimental myasthenia gravis.
Nature (1980) 228: 733-734
49. Richter E, Eichler H, Raske D, Leveringhaus A, Zieger W, Kerowgan M et al.
5% Me₂SO is sufficient to preserve stem cells derived from cord blood.
Bone Marrow Transplantation (1998) 22 (1): 16
50. Rowley SD, Feng Z, Yadock D, Holmberg L et al.
Post-thaw removal of DMSO does not completely abrogate infusional toxicity or the need for pre-infusion histamine blockade.
in
Taylor & Francis (Edit.), Cytotherapy (1999)pp 439-446
51. Rubin LF
Toxicity of dimethyl sulfoxide, alone and in combination. . In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.
Ann NY Acad Sci (1975): 88-103
52. Sandborn EB, Stephens H, Bendayan M
The influence of dimethyl sulfoxide on cellular ultrastructure and cytochemistry. In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.
Ann NY Acad Sci (1975): 122-137
53. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J et al.
Multidisciplinary utilisation of dimethyl sulfoxide : pharmacological, cellular, and molecular aspects.
Biochem Pharmacol (2003) 65: 1035-1041
54. Shephard TH
Catalogue of teratogenic agents.

The John Hopkins University Press 9. Ed (1998) pp 928-929

55. Sputtek A, Gutensohn K, Hummel K, Löliger C, Kühnl P
Zur Kryokonservierung von Blutstammzellen.
J Lab Med (1996) 20 (2): 70-77
56. Stewart BH, Brannson AC, Hewitt CB, Kiser WS, Straffon RA
The treatment of patients with interstitial cystitis, with special reference to intravesical DMSO
J Urol (1972) 107: 377-380
57. Stroncek DF, Fautsch SK, Lasky LC, Hurd DD, Ramsay NKC, Mc. Cullough J
Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow.
Transfusion (1991) 31: 521-526
58. Swanson BN
Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO).
Rev Clin Basic Pharmacol (1985) 5: 1-33
59. Syme R, Bewick M, Stewart D, Porter K et al.
The role of depletion of dimethyl sulfoxide before autografting: On hematologic recovery, side effects, and toxicity.
Biology of Blood and Marrow Transplantation (2004) 10: 135-141
60. Szmant HH
Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems. . In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.
Ann NY Acad Sci (1975): 20-23
61. Trice JM, Pinals RS
Dimethyl sulfoxide: A review of its use in the rheumatic disorders.
Sem Arthr Rheum (1985) 15 (1): 45-60
62. Vogin EE, Carson S, Cannon G, Linegar CR, Rubin LF
Chronic toxicity of DMSO in primates.
Toxicol Appl Pharmacol (1970) 16: 606-612
63. Windrum P, Morris TCM, Drake MB et al.
Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres.
Bone Marrow Transplantation (2005) 36: 601-603
64. Wood DC, Wood J
Pharmacologic and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide. In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.
Ann NY Acad Sci (1975): 7-19
65. Rowley SD
Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques. J Hematother (1992) 1: 233-250

66. Rowley SD, Anderson GL
Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* (1993) 11: 389-393
67. Keung YK, Lau S, Elkayam U, Chen SC, Douer D
Cardiac arrhythmia after infusion of cryopreserved stem cells. *Bone Marrow Transplant* (1994) 14: 363-367
68. López-Jiménez J, Cerveró C, Muñoz A, Hernández-Madrid A, Fernández Pineda J, García Laraña J, Moro C, Maldonado M, Pérez Oteyza J, Otheo E, et al.
Cardiovascular toxicities related to the infusion of cryopreserved grafts: results of a controlled study. *Bone Marrow Transplant* (1994) 13: 789-793
69. Martino M, Morabito F, Messina G, Irrera G, Pucci G, Iacopino P
Fractionated infusions of cryopreserved stem cells may prevent DMSO-induced major cardiac complications in graft recipients. *Haematologica* (1996) 81: 59-61
70. Branch DR, Calderwood S, Cecutti MA, Herst R, Solh H
Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulfoxide toxicity. *Transfusion* (1994) 34: 887-890
71. Willhite CC, Katz PI.
Toxicology updates. Dimethyl sulfoxide. *J Appl Toxicol* 1984;4:155-60.
72. Rowley SD, Bensinger WI, Gooley TA, Buckner CD.
Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. *Blood* 1994;83:2731-2736
73. Magnuson BA, Appleton J, Ryan B, Matulka RA
Oral developmental toxicity study of methylsulfonylmethane in rats. *Food Chem Toxicol* (2007) 45(6):977-984
74. Pegg DE
Principles of cryoconservation. *Methods Mol Biol* (2007) 368: 39-57
75. Galmes A Gutierrez A, Sampol A, et al.
Long-term hematological reconstitution and clinical evaluation of autologous peripheral blood stem cell transplantation after cryopreservation of cells with 5% and 10% dimethylsulfoxide at -80 degrees C in a mechanical freezer. *Haematologica* (2007) 92(7): 986-989
76. Kim DH, Jamal N, Saragosa R, et al.
Similar outcomes of cryopreserved allogeneic peripheral stem cell transplants (PBSCT) compared to fresh allografts. *Biol Blood Marrow Transplant* (2007) 13(10): 1233-1243

77. Hallare A, Nagel K, Köhler HR, Triebkorn R
Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos.
Ecotoxicol Environ Saf (2006) 63(3): 378-388
78. Marquis O, Millery A, Guittonneaud S, Miaud C
Solvent toxicity to amphibian embryos and larvae.
Chemosphere (2006) 63(5): 889-892
79. Bojanic I, Cepulic BG, Mazic S, et al.
Toxicity related to autologous peripheral blood haematopoietic progenitor cell infusion is associated with number of granulocytes in graft, gender and diagnosis of multiple myelomas.
Vox Sang (April 16, 2008) (elektronische Publikation vor Druck)
80. Bakken AM
Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells.
Curr Stem Cell Res Ther (2006) 1(1): 47-54
81. Cordoba R, Arrieta R, Kerquelen A, Hernandez-Navarro F
The occurrence of adverse events during the infusion of autologous peripheral blood stem cells is related to the number of granulocytes in the leukapheresis product.
Bone Marrow Transplant (2007) 40(11): 1063-1067

13. Informationen über die Sachverständigen

Curriculum

Name Dr. med. vet. Peter K.H. **Günzel**

Anschrift Hubertusstr. 19; 135 89 Berlin-Spandau
Tel. 0049-30-375 94 979 Fax 0049-30-375 94 980
E-mail p.guenzel@t-online.de

Geburt in Breslau/Schlesien, Deutschland (jetzt Polen)
am 22.04.1937

Studium und universitäre Ausbildung

1955-1957 Studium der Veterinärmedizin; Humboldt-Universität, Berlin

1957-1961 Studium der Veterinärmedizin; Freie Universität Berlin

1961 Assistent; Klinik für Klauentierkrankheiten, Freie Universität, Berlin

1962 Promotion zum Dr. med. vet. an der Freien Universität, Berlin. Titel der Dissertation: „Untersuchungen über Veränderungen von Nieren, Mund- und Magenschleimhaut bei der Urämie des Hundes“; Pathologie und Histopathologie

Berufliche Weiterbildung und Tätigkeit

1961-1964 Schering AG, Abt. für Pharmakologie; Weiterbildung in Versuchstierzucht und -haltung, lokaler und systemischer Verträglichkeitsprüfung, Hämatologie, Klinischer Chemie, Sektion und Histopathologie von Labortieren, Reproduktionstoxikologie. Tumorigenitätsprüfung

1964 Schering AG, Werk Bergkamen; Gründung der Abt. für Experimentelle Toxikologie

1964-1974 Schering AG, Werk Bergkamen; Leiter des Instituts für Experimentelle Toxikologie

1974-1997 Schering AG; Werk Berlin; Leiter des Instituts für Experimentelle Toxikologie

1997 Pensionierung; Tätigkeit als freier Berater (Consultant)

Qualifikationen

- 1971** Fachtierarzt für Pharmakologie und Toxikologie;
Tierärztekammer Nordrhein-Westfalen, Deutschland
- 1998** Eurotox Registered Toxicologist;
EUROTOX Generalsekretariat, Basel, Schweiz

Mitgliedschaft in wissenschaftlichen Gesellschaften

- seit 1964** European Society of Toxicology (EUROTOX)
(1975-1981 Vorstandsmitglied)
- 1964-1998** Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS)
- seit 1966** Deutsche Pharmakologische Gesellschaft, jetzt
Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und
Klinische Pharmakologie und Toxikologie
- 1990-1997** Drug Information Association (DIA)

Weitere Aktivitäten

- 1994-1997** International Safety Evaluation Advisory Board
Center for Medicines Research, Carshalton, Surrey,
UK
- 1983-1997** Mitglied des wissenschaftlichen Beirats der
Zeitschrift ALTEX- Alternatives to Animal Experiments

Publikationen

Artikel in wissenschaftlichen Zeitschriften	61
Artikel in Symposiums-Berichten	28
Lehrbuchbeiträge	15

Erklärung zu möglichen Interessenkonflikten

Ich arbeite als Berater für pharmazeutische Unternehmen und wissenschaftliche Einrichtungen auf Honorarbasis.

Ich bin prinzipiell nicht an Patentgebühren und Verkaufserlösen von Produkten beteiligt, an deren Entwicklung ich mitarbeite.

Berlin, 03. Dezember 2008

Dr. Peter Günzel

Curriculum

Univ.-Prof. Dr. med. Hermann Eichler
Direktor des Instituts für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes
66421 Homburg/Saar

Telefon: 06841-16-22530, Fax.: 06841-16-22555
email: hermann.eichler@uks.eu

Persönliche Daten

geboren am 29. März 1962 in Hof / Saale, deutsche Staatsangehörigkeit

Ausbildung

- 05 / 1982 – 06 / 1989 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 06 / 1989 Ärztliche Prüfung (Gesamtnote ‚sehr gut‘)
- 01 / 1988 – 06 / 1990 Promotionsarbeit an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Abteilung für Transfusionsmedizin der Chirurgischen Universitätsklinik unter der Leitung von Prof. Dr. D. Wiebecke. „Untersuchung eines neuartigen Plasmapherese-Systems unter besonderer Berücksichtigung der Thrombozytenfunktion“ („magna cum laude“)
- 04 / 1991 Ärztliche Approbation

Beruflicher und wissenschaftlicher Werdegang

- 10 / 1989 – 11 / 1990 Arzt im Praktikum in der Kinderklinik am Mönchberg, Würzburg
- 12 / 1990 – 08 / 1991 Assistenzarzt im Institut Würzburg, Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes (Leiter: Dr. R. Leimbach)
- 10 / 1991 – 12 / 1992 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Transfusionsmedizin und Gerinnungsphysiologie, Universitätsklinikum der Philipps-Universität Marburg (Leiter: Prof. Dr. V. Kretschmer)
- 01 / 1993 – 06 / 1994 Assistenzarzt im Institut Mannheim, DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg gGmbH (Leiter: Prof. Dr. S.F. Goldmann)
- 07 / 1994 – 12 / 1995 Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesie und Schmerztherapie, Nordwest-Krankenhaus, Frankfurt am Main (Leiter: Prof. Dr. R. Dennhardt)
- 01 / 1996 – 06 / 2005 Tätigkeit am Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie Mannheim, DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH
Leiter bis 06 / 1999: Prof. Dr. S.F. Goldmann
Leiter ab 07 / 1999: Prof. Dr. H. Klüter
- 04 / 1996 Anerkennung zum Facharzt für Transfusionsmedizin

- 02 / 1997 Fachkundenachweis Rettungsdienst
- 07 / 1999 Ernennung zum Oberarzt am Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Fakultät für Klinische Medizin Mannheim, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Abteilungsleiter des Spende- und Produktionsbereichs im Institut Mannheim des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen
- 01 / 2001 Ernennung zum leitenden Oberarzt
- 10 / 2002 Habilitation für Transfusionsmedizin und Immunologie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg mit dem Thema „Plazentarestblut als Quelle hämatopoetischer Stammzellen und autologer Erythrozyten“
- 07 / 2005 – 09 / 2006 Ärztlicher Institutsdirektor am Institut für Transfusionsmedizin Ratingen-Breitscheid, DRK-Blutspendedienst West gGmbH
- ab 10 / 2006 Universitätsprofessor für Transfusionsmedizin und Klinische Hämostaseologie, Medizinische Fakultät des Saarlandes; Direktor am Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
- 10 / 2007 Zusatz-Weiterbildung Hämostaseologie

Mitgliedschaft in wissenschaftlichen Fachgesellschaften

- Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI)
- International Society of Blood Transfusion (ISBT)
- International Society of Thrombosis and Hemostasis (ISTH)
- Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative
- International Society of Cellular Therapy (ISCT)
- European Bone Marrow Transplantation Group (EBMT)
- Deutsche Gesellschaft für Immunogenetik (DGI)
- Arbeitsgemeinschaft der Knochenmarkspende-Dateien Deutscher Blutspendedienste

Weitere wissenschaftliche Aktivitäten und Ämter

- seit 01 / 2002 Ressort-Herausgeber für das Ressort ‚Blutprodukte‘ der Zeitschrift ‚Transfusion Medicine and Hemotherapy‘, Offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
- seit 06 / 2007 Section Editor für das Ressort ‚Cellular Therapy‘ der Zeitschrift ‚Vox Sanguinis‘, Offizielles Organ der International Society of Blood Transfusion
- 06 / 2003 – 10 / 2007 Chair der Gruppe ‚Cellular Therapy‘, Biomedical Excellence for Safer Transfusion Collaborative

07 / 2003 – 12 / 2005

Obmann der Sektion „Transplantation und Zelltherapie“ der DGTI

11 / 2007

Berufung in den Arbeitskreis Blut des Bundesministeriums für Gesundheit

Homburg, 03. Dezember 2008

Univ.-Prof. Dr. med. Hermann Eichler

Anhang Arzneimittelspezifische Angaben des Herstellers

1 Art des Antrages

Das Arzneimittel XY ist eine Präparation menschlicher hämatopoetischer Stammzellen für Transplantationszwecke. Als Stammquelle dient XY. Es enthält unreife blutbildende Zellen. Jedes Transplantat wird aus einer Einzelspende hergestellt und entspricht einer Transplantationsdosis, die individuell deklariert wird, aber mindestens

- ≥ XY ml XY und
- ≥ XY x 10^x Zellen/Transplantat

enthält. Neben den hämatopoetischen Stammzellen ist ein geringer Anteil an Erythrozyten und Thrombozyten vorhanden.

2. Beschreibung der Konservierung

Um das Transplantat haltbar zu machen, wird es in folgenden Schritten und Mengen kryokonserviert:

XY vom Spender inklusive Vorlage von CPD-Stabilisator nach Abzug der Untersuchungsproben	XY	ml		
+ Kryokonservierungsmedium (Beispiel) ¹⁾	X	–	Y	ml
¹⁾ DMSO	XY			v/v %
Humanalbuminlösung (20 w/v%)	XY			v/v %
NaCl (0.9 w/v %)	XY			v/v %
Endvolumen ohne Abzug von Kryo-Rückstellproben	X	–	Y	ml

Dieses Präparat wird in sterilen Kunststoffbeuteln bei -135°C in der Gasphase von Flüssigstickstoff aufbewahrt und ist so mindestens XY Monate haltbar. Auf Grund der Herstellung hat das Präparat immer spenderindividuelle Merkmale.

Infektionsdiagnostische Untersuchungen: HIV 1/2-AK; HB_s-AG; HCV-AK; HCV-RNA (PCR); HTLV I/II-AK; HB_c-AK; CMV-AK; Treponema pallidum-AK; und irreguläre erythrozytäre Antikörper, Zellzahlbestimmung, HLA-A-, B- und DRB1-(Gewebe-) Typisierung sowie Blutgruppenbestimmung.

Für die Transplantation wird das Präparat in folgender Weise vorbereitet:

3. Chemische und pharmakokinetische Eigenschaften

Wirksamer Bestandteil im Sinne der Arzneimitteldefinition sind die hämatopoetischen Stammzellen. Sie siedeln sich nach i.v.-Infusion primär im Knochenmark an und bilden den Ausgangspunkt für eine Rekonstitution der Hämatopoese.

4. Indikationen, Dosierung, pharmakologisch-therapeutische Klassifikation und Wirkmechanismus

Indikation

Das Arzneimittel XY wird zur Rekonstitution des Knochenmarks als blutbildendes Organ bei Knochenmarkinsuffizienz durch

- lebensbedrohliche maligne und nichtmaligne Erkrankungen des blutbildenden Systems, insbesondere nach Hochdosis-Chemo- und Radiotherapie
- Stoffwechselerkrankungen
- angeborene oder erworbene Immundefekte

eingesetzt. Für die Transplantation wird das jeweilige Präparat bezüglich Blutgruppe und Histokompatibilität empfangerspezifisch ausgesucht.

Dosierung

Jeder Empfänger erhält ein auf Basis von Blutgruppe und Histokompatibilität individuell ausgewähltes Transplantat. Die für eine erfolgreiche Transplantation empfohlene Mindestdosis beträgt $XY \times 10^x$ Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers.

Pharmakologisch-therapeutische Klassifikation

Die wirksamen Bestandteile des Transplantats sind morphologisch und funktionell intakte Stammzellen zur Rekonstruktion der Hämatopoese. Dabei wird der Fraktion der Stammzellen, die das CD-34-Oberflächenantigen als Surrogatmarker exprimiert, die größte hämatopoetische Potenz zugeschrieben. Da der Kryokonservierungsprozess für eine maximale Vitalität der weißen Zellen optimiert wurde, werden Erythrozyten und Thrombozyten weitgehend lysiert und verlieren ihre Funktionsfähigkeit.

Wirkungsmechanismus

Nach Infusion der aufgetauten Zellen finden die blutbildenden Stammzellen in das Knochenmark des Empfängers. Durch den zellschonenden Kryokonservierungs- und Auftauprozess des Transplantates ist eine hohe Bioverfügbarkeit der infundierten Zellen zu erwarten. Innerhalb von 4 Wochen differenzieren sich aus den pluripotenten Stammzellen Leukozyten, die in das periphere Blut einströmen.

5. Vorsichtsmaßnahmen

Bei der Anwendung von XY muss HLA- und sollte AB0-Blutgruppenverträglichkeit vorliegen. Absolute Kontraindikationen sind nicht bekannt.

Bei Anwendung während der Gravidität, Stillzeit und bei bekannter Überempfindlichkeit gegen die Inhaltsstoffe sind die Risiken gegenüber der Strenge der Indikation zu bewerten.

Wegen der Gefahr der hypotonen Lyse dürfen keine hypotonen Lösungen ,wegen der Gefahr der Gerinnselbildung keine kalziumhaltigen Lösungen gleichzeitig in dasselbe Schlauchsystem gegeben werden.

Die Beimischung von Medikamenten zum Arzneimittel XY ist nicht zulässig.

6. Inverkehrbringen und Zeitraum danach

5.2. Anlage 2

Muster einer Behältnisbeschriftung (deutsch / englisch) (1 Seite)

Dr. Markus Wiesneth, Ulm und Frau Dr. Kristina Hölig, Dresden

Anlage 5.2

Präparate ID-Nummer 702 08 543 678	Spender ID-Nummer DE-ULM-12345678
Entnommen am / Uhr 29 JAN 2008 / 13:15 CET	Verwendbar bis / Uhr 01 FEB 2008 / 13:15 CET
Blutgruppe 0 Rh D positiv	Nur zur Anwendung bei genanntem Empfänger.
Art.-Nr. P400208 Gen.-Nr. PEI.G03859.01.1 HUMANE PERIPHERE BLUTSTAMMZELLEN APHERESE ALLOGEN DRK-BLUTSPENDEDIENST Beutel Nr. 1 of 1	Menschliche Zellen für die Transplantation. Nicht bestrahlen. Unverzüglich weitergeben. Achtung: Der Empfänger ist über potentiell übertragbare Erkrankungen aufzuklären.
Volumen ml 229,1 inklusive ACD ml 13,9 Erythrozyten ml 4,0 NC x 10E8 408,5 CD34 x 10E6 603,6	Suspension zur i.v. Infusion mittels geeignetem Transfusionssystem. Begleitschreiben beachten.
Lagerung bei +2 bis +6 °C Transport bei +1 bis +10 °C	Empfänger Hans Mustermann ID: 87659321 Geburtsdatum 31 JAN 1981
Nicht verwendete Präparate melden an den Hersteller IKT Ulm Helmholtzstraße 10 D-89081 Ulm / Germany Tel. (0049)731-1500	Transplantationszentrum Klinik für Innere Medizin III Universitätsklinikum Ulm Robert-Koch-Straße 8 D-89081 Ulm / Germany Tel. (0049)731-50045656

Product ID-Number 702 08 543 678	Donor ID-Number DE-ULM-12345678
Collection Date / Time 29 JAN 2008 / 13:15 CET	Expiration Date / Time 01 FEB 2008 / 13:15 CET
Blood Group 0 Rh D positive	For Use by Intended Recipient Only
Product Code No. P400208 Gen. No. PEI.G03859.01.1 HPC-A Hematopoietic Progenitor Cells APHERESIS DIRECTED DRK-BLUTSPENDEDIENST Bag No. 1 of 1	Properly Identify Intended Recipient and Product. Do Not Use Leukoreduction Filter. Do Not Irradiate. Warning: This Product may Transmit Infectious Agents. Advise Patient of Communi- cable Disease Risks.
Volume ml 229,1 including ACD ml 13,9 Erythrocytes ml 4,0 NC x 10E8 408,5 CD34 x 10E6 603,6	Suspension for i.v. Infusion. For Additional Information and Laboratory Testing See Accompanying Letter.
Store at +2 to +6 °C Transport at +1 to +10 °C	Recipient Hans Mustermann ID: 87659321 Date of Birth 31 JAN 1981
Unused Products Have to be Reported to the Collection Center IKT Ulm Helmholtzstraße 10 D-89081 Ulm / Germany Phone (0049)731-1500	Transplant Center Clinic for Internal Medicine III University Hospital Ulm Robert-Koch-Straße 8 D-89081 Ulm / Germany Phone (0049)731-50045656

5.3. Anlage 3

Muster einer Produktinformation (Modul 1.3) (7 Seiten)

Dr. Markus Wiesneth, Ulm und Frau Dr. Kristina Hölig, Dresden

Modul 1.3 PRODUKTINFORMATION

1.3.1 ZUSAMMENFASSUNG DER WESENTLICHEN MERKMALE DES ARZNEIMITTELS

1.3.1.1 Bezeichnung der Stammzellzubereitung

Humane Blutstammzellen / allogene / gerichtet /

aus Knochenmark, peripherem Blut oder Placenta-Restblut

1.3.1.2 Darreichungsform

Suspension zur intravenösen Infusion oder Weiterverarbeitung nur für eine bestimmte Person

1.3.1.3 Klinische Angaben

1.3.1.3.1 Art der Anwendung

Zur intravenösen Infusion

1.3.1.3.2 Anwendungsgebiete

Humane Blutstammzellen sind indiziert zur hämatologischen und immunologischen Rekonstitution eines bestimmten Patienten im Rahmen der Transplantation zur Therapie verschiedener maligner und nicht-maligner Erkrankungen.

1.3.1.3.3 Gegenanzeigen

Außer Schwangerschaft und Stillzeit gibt es keine absolute Kontraindikation für gerichtete, für eine bestimmte Person zur Anwendung vorgesehene Blutstammzellen, die nach immunogenetischen Kriterien ausgewählt und ordnungsgemäß hergestellt wurden. Relative Kontraindikationen stellen Abweichungen bei den Auswahlkriterien des Spenders oder Mängel der Produktqualität dar.

1.3.1.3.4 Besondere Vorsichtsmaßnahmen für die Anwendung

- Die Gabe von allogenen Blutstammzellen darf nur nach adäquater Vorbehandlung des Empfängers zur Vermeidung einer Abstoßung oder einer allergischen Reaktionen erfolgen.
- Die korrekte Zuordnung der für eine bestimmte Person hergestellten Stammzellzubereitung muss gewährleistet sein.
- Blutstammzellzubereitungen dürfen keinesfalls bestrahlt werden !
- Unmittelbar vor Anwendung hat eine visuelle Kontrolle auf Unversehrtheit und Aggregate zu erfolgen.
- Zur Infusion ist ein Transfusionsgerät mit Standardfilter der Porengröße 170-230 µm ohne Leukozytenfilter zu verwenden.
- Die Infusion sollte so rasch als möglich erfolgen, wobei auf akute Reaktionen zu achten ist und die Infusionsgeschwindigkeit dem klinischen Zustand angepasst werden muss.
- Eine angemessene Überwachung des Patienten und der Vitalparameter ist während und nach der Stammzellgabe zu gewährleisten.
- Insbesondere bei ABO-inkompatibler Stammzellzubereitung ist auf eine hämolytische Reaktion zu achten.

- Stammzellzubereitungen sind vor und während der Infusion gut zu durchmischen.
- Nach der Gabe von CMV-seropositiven Stammzellzubereitungen sind Empfänger regelmäßig auf eine CMV-Virämie zu untersuchen.

1.3.1.3.5 Wechselwirkung mit anderen Arzneimitteln und andere Inkompatibilitäten

- Die Anwendung potentiell stammzell-toxischer Medikamente und Maßnahmen muss ausreichend lange zurück liegen, um eine Beeinträchtigung der transfundierten Stammzellzubereitung auszuschließen.
- Mit Ausnahme von physiologischer Kochsalzlösung sollten keine anderen Lösungen oder Medikamente in demselben Schlauchsystem mit der Stammzellzubereitung verabreicht werden. Dies gilt insbesondere für Calcium-haltige Lösungen wegen der Gefahr von Gerinnselbildung.
- Die Beimischung von Medikamenten zu dem Blutstammzellpräparat ist zu vermeiden.
- Blutprodukte, Antibiotika und liposomale Antimykotika dürfen nur in ausreichendem zeitlichem Abstand zur Blutstammzellgabe infundiert werden.

1.3.1.3.6 Verwendung für besondere Personengruppen (z.B. Frauen in der Schwangerschaft und Stillzeit, Säuglinge, Kleinkinder)

- Frauen im gebärfähigen Alter
Vor Behandlungsbeginn zur Transplantation ist eine Schwangerschaft auszuschließen und falls erforderlich eine Empfängnisverhütung durchzuführen.
- Schwangerschaft und Stillzeit
Während der Schwangerschaft und der Stillzeit ist eine Transplantation mit allogenen Blutstammzellen kontraindiziert.
- Säuglinge und Kleinkinder
Bei Säuglingen und Kleinkindern ist der besonderen klinischen Situation Rechnung zu tragen, insbesondere auf eine Volumenüberladung oder Citratintoxikation zu achten und gegebenenfalls eine Weiterverarbeitung der Stammzellzubereitung durchzuführen.

1.3.1.3.7 Besondere Hinweise zur Anwendung (Dosierung, Überdosierung, Behandlungsdauer, Häufigkeit der Verabreichung, Notfallmaßnahmen)

1.3.1.3.7.1 Dosierung

Die Dosierung der Blutstammzellen ist abhängig vom Spender, von der Grunderkrankung des Empfängers und der Weiterverarbeitung. Die übliche Standarddosis für die initiale Behandlung liegt bei $4 - 8 \times 10^6$ CD34-positive Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers. Ein deutliches Übergewicht des Empfängers ist bei der Dosisberechnung zu berücksichtigen.

1.3.1.3.7.2 Überdosierung und Unterdosierung

Bei einer Dosierung von über 8×10^6 CD34-positive Zellen pro kgKG besteht ein höheres Risiko für eine akute und chronische Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion.

Bei einem deutlichen Unterschreiten der Standarddosis besteht ein erhöhtes Risiko eines verzögerten oder fehlenden Anwachsens der Stammzellen mit ausbleibender, verzögerter oder nur partieller Regeneration der Hämatopoese bzw. ein erhöhtes Risiko einer Transplantatabstoßung.

1.3.1.3.7.3 Häufigkeit der Verabreichung

In der Regel erfolgt die Gabe von Stammzellzubereitungen als einmalige intravenöse Infusion. In besonderen klinischen Situationen wie z. B. bei Patienten mit Osteopetrose oder nach nicht-myeloablativer Vorbehandlung kann eine mehrfache Gabe zur Verbesserung des Behandlungserfolges indiziert sein.

1.3.1.3.7.4 Notfallmaßnahmen

Bei akuten, schweren Unverträglichkeitsreaktionen ist die Gabe der Stammzellzubereitung zu unterbrechen, der Venenzugang offen zu halten und eine der Schwere der Symptome angemessene notfallmedizinische Behandlung und Überwachung durchzuführen.

1.3.1.3.8 Unerwünschte Reaktionen

1.3.1.3.8.1 Infektiöse Komplikationen

Bei der Anwendung von aus menschlichem Blut oder Knochenmark hergestellten Arzneimitteln ist die Übertragung von Infektionserregern, auch bislang unbekannter Natur, nicht völlig auszuschließen. Dies gilt z. B. für Hepatitiden, seltener für das erworbene Immundefekt-Syndrom (AIDS). Das Risiko einer bakteriellen Kontamination bzw. einer Toxinbildung lässt sich ebenfalls nicht mit letzter Sicherheit ausschließen.

Im Europäischen Ausland wurden Einzelfälle berichtet, in denen bei Empfängern von Blutprodukten, deren Spender später an der varianten Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJK) erkrankten, ebenfalls der „Erreger“ (sogenannte Prionen) nachgewiesen wurde. Das Risiko einer Übertragung dieser Erkrankung durch Blutprodukte wird derzeit als extrem gering eingestuft. Eine Testung auf den Erreger übertragbarer spongiformer Enzephalopathien (TSE) und verschiedener anderer Erreger ist derzeit nicht möglich.

Durch Auswahl CMV-seronegativer Stammzellpräparate kann das Risiko einer CMV-Übertragung reduziert werden.

1.3.1.3.8.2 Immunologische Komplikationen

Die **akute und chronische Spender-gegen-Wirt-Reaktion** oder Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) bei Empfängern von Stammzellpräparaten wird durch viable T-Lymphozyten des Spenders verursacht. Inzidenz und Schweregrad der Erkrankung hängen insbesondere von der HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger sowie dem T-Zellgehalt des Präparates ab, werden jedoch von zahlreichen weiteren Faktoren des Spenders und Empfängers beeinflusst.

Eine **akute Empfänger-gegen-Spender-Reaktion** (Abstoßung) oder ein verzögertes bzw. nur partielles Anwachsen der Blutstammzellen ist eine sehr seltene Komplikation und kann infolge Qualitätsmängel des Stammzellpräparats oder durch Spender-Empfänger-Unverträglichkeiten entstehen.

Eine **Transfusionsbedingte Akute Lungeninsuffizienz** (TRALI) ist in vielen Fällen assoziiert mit anti-leukozytären Antikörpern der Spender plasmahaltiger Blutkomponenten oder der Empfänger leukozytenhaltiger Blutpräparate. Auf Grund der HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger allogener Blutstammzellpräparate ist das Auftreten von TRALI sehr unwahrscheinlich, aber nicht völlig auszuschließen.

Akute und verzögerte hämolytische Transfusionsreaktionen können grundsätzlich bei der Anwendung von ABO-major- und / oder ABO-minor inkompatiblen Blutstammzellpräparaten vorkommen. Hämolytische Reaktionen können sowohl durch anti-erythrozytäre Antikörper des Empfängers gegen Antigene des Spenders als auch in den meist schwereren Fällen durch anti-erythrozytäre Antikörper des Spenders gegen Antigene des Empfängers mit deutlicher Verzögerung noch 1 bis 3 Wochen nach Stammzellgabe auftreten. Diese verzögerte Immunreaktion, auch "Passenger-Lymphocyte-Syndrom" genannt, kann plötzlich, schwerwiegend und lebensbedrohlich sein, weshalb bei Risikoempfängern immunhämatologische Kontrollen angezeigt sind.

Weitere mögliche immunologische Reaktionen:

- Febrile, nicht-hämolytische Transfusionsreaktionen durch z. B. anti-leukozytäre Antikörper oder Zytokine
- Allergische und anaphylaktoide Unverträglichkeitsreaktionen gegen Bestandteile, Antikoagulanzen oder Hilfsstoffe der Stammzellzubereitung (z. B. urtikarielle Hautreaktionen, Lid- oder Glottisödem) oder anaphylaktische Reaktionen bei Empfängern mit angeborenem IgA-Mangel
- Posttransfusionelle Purpura
- Alloimmunisierung gegen erythrozytäre, thrombozytäre, leukozytäre Antigene oder Plasmaproteine des Spenders

Sonstige mögliche Komplikationen:

- Reaktionen auf Antikoagulanzen (Citrat, Heparin) sowie Additiva wie DMSO oder HAES insbesondere bei Neugeborenen und Kleinkindern
- Blutungskomplikationen insbesondere bei großvolumigen Stammzellzubereitungen mit hohen Heparindosen
- Mikrozirkulationsstörungen durch Thrombozyten, Zellaggregate oder Fett
- Volumenüberlastung infolge großvolumigen Stammzellzubereitungen oder zu rascher Applikation, besonders in engem zeitlichem Zusammenhang mit anderen zirkulatorisch wirksamen Infusionen und Transfusionen
- Hypothermie bei großvolumigen oder zu rascher Applikation der gekühlten Stammzellzubereitungen. (Die Anwendung von Blutwärmegeräten für Stammzellzubereitungen ist nicht indiziert.)
- Hämolytische Stammzellzubereitungen infolge unsachgemäßer Lagerung, osmotischer oder mechanischer Schädigung der Erythrozyten oder anderer Ursachen

1.3.1.3.9 Meldepflicht

Unerwünschte Ereignisse und jeder Verdacht auf eine schwerwiegende Reaktion infolge der Anwendung von Stammzellzubereitungen sind gemäß den gesetzlichen Vorgaben und Verordnungen im Rahmen des Qualitätssicherungssystem den zuständigen Stellen anzuzeigen, wenn sie in möglichem ursächlichem Zusammenhang stehen, die Qualität und Sicherheit beeinflussen oder auf sie zurückgeführt werden können..

1.3.1.4 Wirkungsweise, pharmakologische und toxikologische Eigenschaften

1.3.1.4.1 Wirkungsweise

Wirksame Bestandteile der Stammzellzubereitungen sind morphologisch und funktionell intakte hämatopoetische Vorläuferzellen, die bei dem Empfänger eine komplette hämatopoetische und immunologische Rekonstitution gewährleisten. Durch die Fähigkeit zur Selbstreplikation und Ausdifferenzierung der Stammzellen kommt es zu einem dauerhaften Anwachsen der Spenderzellen im Empfängerorganismus.

1.3.1.4.2 Pharmakologische Eigenschaften

Nach intravenöser Infusion der Blutstammzellen kommt es zu einer raschen Ansiedlung im Knochenmark, Leber, Milz und Lymphknoten. Innerhalb von Wochen finden sich beim Empfänger ausgereifte und differenzierte Spenderzellen wie Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten im peripheren Blut. Bis zur Etablierung des Spender-Immunsystems können mehrere Wochen bis Monate vergehen.

1.3.1.4.3 Toxikologische Eigenschaften

T-Lymphozyten der Stammzellzubereitung können zu einer schweren immunologischen Reaktion gegen den Empfänger führen. Diese Spender-gegen-Wirt-Erkrankung hat eine akute oder chronische Schädigung von Empfängerorganen und Geweben zur Folge und betrifft insbesondere Haut, Schleimhäute, Darm, Leber und Lunge. Allogene Stammzellzubereitungen induzieren aber auf Grund dieser immunologischen Reaktion auch einen "Spender-gegen-Tumor-Effekt", der ein wichtiges Therapieprinzip bei der Behandlung maligner Erkrankungen darstellt.

1.3.1.5 Pharmazeutische Angaben

1.3.1.5.1 Qualitative und quantitative Zusammensetzung

Arzneilich wirksamer Bestandteil der Stammzellzubereitungen sind hämatopoetische Vorläuferzellen, die zur Selbstreplikation und Ausdifferenzierung fähig sind. Stammzellzubereitungen können aus peripherem Blut nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren, aus Knochenmark durch multiple Aspiration oder aus Plazenta-Restblut gewonnen werden.

Weitere wirksame Bestandteile der Stammzellzubereitungen sind neben den Vorläuferzellen reife Zellen wie Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten und Plasma vom selben Spender sowie Stabilisatorlösung (ACD-A) und Antikoagulantien (Heparin) im geeigneten Mischungsverhältnis. Zur Kryokonservierung von

Stammzellen werden Additiva wie DMSO und HAES in angemessener Dosierung zugesetzt.

Die quantitative Zusammensetzung der Stammzellzubereitungen unterliegt auf Grund der individuellen Herstellung von einem bestimmten Spender zur Anwendung bei einem bestimmten Patienten und zur Therapie einer bestimmten Erkrankung naturgemäß großen Schwankungen. Die Produktspezifikationen werden gemäß der individuellen Anforderung vom Anwender festgelegt und mit geeigneten Qualitätskontrollen vom Hersteller nachgewiesen. Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Stammzellzubereitung ist der Präparatebeschriftung und dem Begleitschreiben zu entnehmen.

1.3.1.5.2 Angaben zur Haltbarkeit

Stammzellzubereitungen sind im nicht-kryokonservierten Zustand bis zu 72 Stunden nach Herstellung bei $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ohne Agitation haltbar. Die Haltbarkeit kann in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren bzw. der Weiterverarbeitung mit Selektion und Depletion und dem verwendeten Primärbehälter reduziert sein. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten. Nach Ablauf des Verfalldatums darf das Stammzellpräparat nur bei vitaler Indikation verwendet werden, um das Leben des vorgesehenen Empfängers nicht zu gefährden.

1.3.1.5.3 Lager- und Transportbedingungen

1.3.1.5.3.1 Lagerbedingungen

Stammzellzubereitungen können bei geeigneter Antikoagulation und Zellkonzentration ohne weitere Zusätze bei $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ bis maximal 72 Stunden nach Herstellung gelagert werden. Für eine längere Lagerung ist die Kryokonservierung in gasförmigem Stickstoff bei -140°C nach Zugabe einer geeigneten Gefrierschutzlösung möglich. Die Temperaturkontrolle und Überwachung der Lagerung ist regelmäßig zu dokumentieren. Die Lagerungszeit von nicht-kryokonservierten Präparaten sollte möglichst kurz sein.

1.3.1.5.3.2 Transportbedingungen

Der Transport der Stammzellzubereitungen erfolgt in einem geeigneten, entsprechend beschrifteten Behälter durch einen über das Transplantat und die Transportbedingungen instruierten Kurier, der von der Transplantationseinrichtung zu beauftragen und einzuweisen ist. Die Transport-Temperatur sollte $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ betragen, jedoch zumindest zwischen $+1^{\circ}\text{C}$ und $+10^{\circ}\text{C}$ liegen. Der Transport hat unter kontrollierten Bedingungen zu erfolgen und ist durch eine schriftliche Anweisung zu regeln. Während des Transports ist dafür Sorge zu tragen, dass die Qualität der Stammzellzubereitung nicht beeinträchtigt, das Präparat keinesfalls bestrahlt wird und kein Unbefugter Zugriff hat.

Der Kurier ist zu verpflichten, einen sicheren und überwachten Transport ohne vermeidbare Verzögerungen zu gewährleisten, um transportbedingte Mängel der Stammzellpräparate auszuschließen.

1.3.1.5.4 Primärbehältnis

1.3.1.5.4.1 Beschriftung und Handhabung

Stammzellzubereitungen werden in sterilen, pyrogen-freien und geschlossenen bzw. verschlossenen Behältnissen hergestellt. Die Anwendung von Blutstammzellzubereitungen darf nur auf ärztliche Anordnung erfolgen. Geöffnete oder angestochene Stammzellpräparate sind unverzüglich zu infundieren. Die Entnahme von Proben aus den verschlossenen Behältnissen zu Untersuchungszwecken ist zu vermeiden.

Die Behältnisbeschriftung erfolgt gemäß den gesetzlichen Vorgaben und weist die Spender- und Empfängeridentifikation auf, die zwingend einzuhalten ist. Stammzellzubereitungen dürfen nur für den auf der Behältnisbeschriftung genannten Empfänger angewendet werden. Die i. v. Infusion erfolgt möglichst rasch mittels geeignetem Transfusionssystem ohne Leukozytenfilter nach allgemein anerkannten Standards der Fachgesellschaften. Während und nach der Stammzellgabe ist eine geeignete Überwachung des Patienten zu gewährleisten. Bei nachgewiesener Infektiosität oder fehlendem Testergebnis der Stammzellzubereitung sind die Präparate entsprechend gekennzeichnet.

1.3.1.5.4.2. Entsorgung

Nach Anwendung sind die leeren Primärbehältnisse der Stammzellzubereitungen steril zu verschließen und bei $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ für 24 Stunden für eventuell erforderliche Nachuntersuchungen aufzubewahren. Nicht verwendete Präparate müssen dem Hersteller gemeldet werden und sind ordnungsgemäß zu entsorgen. Sie dürfen nicht für andere als den bei Herstellung bestimmten Empfänger verwendet werden. Eine Nutzung für wissenschaftliche Zwecke mit Einverständnis des Spenders ist möglich. Die Anwendung und der Verbleib aller Blutstammzellzubereitungen sind im Rahmen eines Qualitätssicherungssystems zu dokumentieren.

1.3.1.6 Inhaber der Genehmigung

Angabe des pharmazeutischen Unternehmers und Herstellers

1.3.1.7 Genehmigungsnummer

Datum der Genehmigung

Datum der Verlängerung

Datum Stand der Produktinformation

5.4. Anlage 4

Lebensläufe der Sachverständigen zu der
Gemeinsamen Stellungnahme von 2009

Name: PD Dr. med. Peter Schlenke

Einrichtung: Institut für Transfusionsmedizin
und Transplantationsimmunologie
Universitätsklinikum Münster

Abitur: 1984 Gymnasium Grossburgwedel

Hochschulstudium: Humanmedizin Georg August Universität Göttingen

Abschluss des Hochschulstudiums: 1992

Promotion: 1993 „magna cum laude“, Universität Göttingen

Facharztwerb: 1998 Transfusionsmedizin

Habilitation: 2002 Immunologie und Transfusionsmedizin

Jetzige Position: Leitender Oberarzt

Wichtige Mitgliedschaften: DGTI, DGHO, DGI, DGfI, ISBT, ISEH, EBMT

Besondere Interessensgebiete: Stammzelltransplantation, Qualität und Sicherheit

**Geschätzte Anzahl an Publikationen
(Originalarbeiten)** zirka 70

Münster 05.05.2009

Ort, Datum



Unterschrift

Curriculum vitae

Name: Prof. Dr. med. Peter Bader

Einrichtung: Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik III
Schwerpunkt Stammzelltransplantation
Universitätsklinikum Frankfurt

Abitur: 1985 Gymnasium Rottweil

Hochschulstudium: Humanmedizin Eberhard-Karls Universität Tübingen

Abschluss des Hochschulstudiums: 1993

Promotion: 1993 „magna cum laude“, Universität Tübingen

Facharztwerb: 2000 Facharzt für Kinderheilkunde

Habilitation: 2001 für das Fach Kinderheilkunde

Jetzige Position: Leiter des Schwerpunktes Stammzelltransplantation

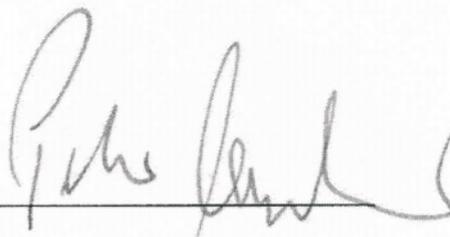
Wichtige Mitgliedschaften: Päd-AG-KBT, GPOH, DGKJ, EBMT

Besondere Interessensgebiete: Stammzelltransplantation, Immuntherapie

**Geschätzte Anzahl an Publikationen
(Originalarbeiten)** zirka 117

Frankfurt, 6. März 2008

Ort, Datum



Unterschrift

Curriculum vitae

Name: Prof. Dr. med. Dietrich W. Beelen

Einrichtung: Klinik für Knochenmarktransplantation
Zentrum für Konservative Onkologie
Westdeutsches Tumorzentrum

Universitätsklinikum Essen
der Universität Duisburg-Essen

Abitur: 1974 Städt. Gymnasium Steinmetzstrasse Essen

Hochschulstudium: Humanmedizin Julius-Maximilians Universität Würzburg

Abschluss des Hochschulstudiums: 1981

Promotion: 1981 „magna cum laude“, Universität Würzburg

Facharztwerb: 1990 Innere Medizin
2000 Hämatologie und Internistische Onkologie

Habilitation: 1997 Innere Medizin

Professur: 2004 Innere Medizin

Jetzige Position: Direktor der Klinik für Knochenmarktransplantation

Wichtige Mitgliedschaften: DGHO, DGI, DAG-KBT (stellv. Vorsitzender),
DRST (stellv. Vorsitzender), EBMT, ASH

Besondere Interessensgebiete: Allogene und autologe Stammzelltransplantation

**Geschätzte Anzahl an Publikationen
(peer- review Originalarbeiten)** zirka 165

Essen, 06.05.2009



Ort, Datum

Unterschrift

Curriculum vitae

Name: PD Dr. med. Dagmar Dilloo

Einrichtung:

Klinik für Kinder- Onkologie, -Hämatologie und -Immunologie
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
Universitätsklinikum Düsseldorf

Abitur: 1979
Internationale Hochschulreife (International Baccalaureat, Genf)

Hochschulstudium: Humanmedizin
Philipps-Universität, Marburg & Middlesex Hospital & University College, London, GB

Abschluss des Hochschulstudiums: 1988

Promotion: 1989
„magna cum laude“, Philipps-Universität, Marburg

Facharztwerb: 1997 Kinderheilkunde
Schwerpunktbezeichnung: 2007 Pädiatrische Hämatologie/Onkologie

Habilitation: 1998

Jetzige Position: Stellvertreterin des Direktors

Wichtige Mitgliedschaften: GPOH, DGHJ; PÄDAG-KBT; ASH

Besondere Interessensgebiete: Stammzelltransplantation, Immuntherapie

Geschätzte Anzahl an Publikationen zirka 70 (Originalarbeiten)

Ort, Datum

Unterschrift

Curriculum vitae

Name:

Prof. Dr. med. Hermann Eichler

Einrichtung:

**Institut für Klinische Hämostaseologie
und Transfusionsmedizin**

Universität des Saarlandes, Homburg

(siehe Lebenslauf im DMSO-Gutachten (Anlage 1))

Dr. med. Johannes C Fischer

03.07.1964 in Freiburg i. Brsg.

Ausbildung und wissenschaftlicher Werdegang

seit	2007	Kommissarischer Direktor des Institutes für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) des Universitätsklinikums Düsseldorf; Medizinischer Direktor NMDP (National Marrow Donor Program USA), Donor Center 114, Apheresis Center 9925, Collection Center 2331
seit	2006	Sachkundige Person nach AMG und Leiter der Herstellung am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums Düsseldorf (ITZ)
seit	2003	NETCORD-FACT Cord Blood Bank Inspektor
seit	2002	Herstellungsleiter nach AMG für Zelltherapeutika am ITZ
2000		Promotion über die "Zelluläre Charakterisierung von Nabelschnurtransplantaten"
1995 -	2002	Kontrolleiter nach AMG für Zelltherapeutika am ITZ
seit	1999	Stellvertretender Direktor des ITZ
seit	1995	Leiter der Aphereseabteilung am ITZ
1994		Mitgründer d. Arbeitskreises für den deutschen Standard zur Stammzell (CD34)- Bestimmung
1993		Aufbau der Stammzellapherese- und Verarbeitungseinheit am Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Bonn (IHT)
1993-	1995	Assistenzarzt am IHT
1991 -	1993	AIP mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie/ Intensivmedizin an der Medizinischen Klinik der Universität Bonn
1984 -	1991	Studium der Human-Medizin an den Universitäten Freiburg, Tübingen und Bonn

Richtlinien / Arbeitsgemeinschaften

seit	1996	NETCORD FACT Advisory Board
	1996	BEST Working Party: Arbeitsgruppe zur internationalen Standardisierung der CD34 Messung
Seit	1997	Mitglied der DAKBT
1995-	1996	Teilnahme an der Arbeitsgemeinschaft der BÄK zur Entwicklung der Richtlinien für Blutstammzelltransplantation sowie der Richtlinien zur Nabelschnurbluttransplantation.
sowie seit		
2008	1994	ILGD (DGHO/DGTI) Arbeitsgemeinschaft zur Erstellung eines deutschen Standards zur CD34 Zellzahlbestimmung

Mitgliedschaften/ Gremien/ Reviewertätigkeit:

- IGLD, DAG-KBT, DGTI.
- Reviewertätigkeit für British Journal of Hematology; Stemcells and Development, Bone Marrow Transplantation
- Physician Advisory Board NMDP (National Marrow Donor Program, USA)

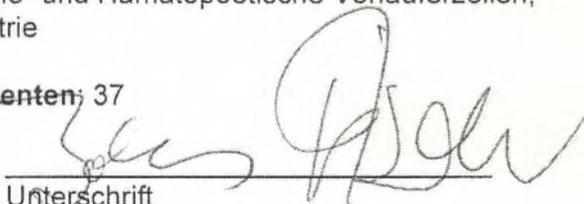
Derzeitige Forschungsschwerpunkte

Transplantationsimmunologie, Endotheliale- und Hämatopoetische Vorläuferzellen, Stammzellmobilisierung, Durchflusssyctometrie

Anzahl an Originalpublikationen inkl. Patenten: 37

Düsseldorf, den 5.5.2009

Unterschrift

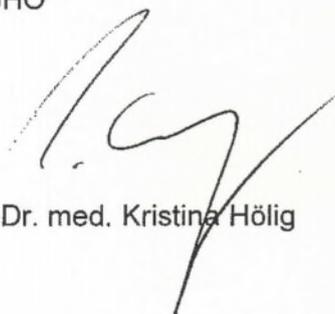


Curriculum Vitae

- Name:** Dr. med. Kristina Hölig
- Einrichtung:** Medizinische Klinik und Poliklinik I,
Bereich Transfusionsmedizin
Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der Technischen
Universität Dresden
- Geburtsdatum und -ort:** 12.05.62 in Plauen, Deutschland
- Familienstand:** verheiratet mit Dr. med. Olaf Hölig, eine Tochter
- Ausbildung:**
- Abitur Erweiterte Oberschule „Erich Weinert“ Plauen 1980
 - Medizinstudium 1981-1987 (Humboldt-Universität Berlin,
Medizinische Akademie „Carl Gustav Carus“ Dresden)
 - 1989 Promotion zum Dr. med.
 - Facharztweiterbildung zum Facharzt für
Transfusionsmedizin Universitätsklinikum Dresden 1988-
1994
- Berufstätigkeit:**
- Wissenschaftliche Mitarbeiterin Abteilung
Transfusionsmedizin Universitätsklinikum Dresden 1988-
1994
 - Leiterin der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums
Dresden seit 1.9.1994
 - Seit 2004 Bereichsleiterin Transfusionsmedizin in der
Medizinischen Klinik und Poliklinik I
 - Verantwortliche Funktionen nach AMG (Herstellungsleiter,
Stufenplanbeauftragter, Informationsbeauftragter) seit 1991
 - Herstellungsleiterin für Blutstammzellpräparate und
Nabelschnurblut, verantwortliche Tätigkeit im Bereich
Stammzellmobilisierung/-apherese seit 1.01.1996
 - Durchführung von Klinischen Studien seit 1998
 - Lehrtätigkeit (fakultative Lehrveranstaltungen und –praktika
Transfusionsmedizin seit 1995)
- Wissenschaftliche Schwerpunkte:**
Therapeutische Hämapherese, insbesondere extracorporale
Photoimmuntherapie
Mobilisierung und Gewinnung von peripheren Blutstammzellen
Spendersicherheit
Gewinnung und Therapie mit Granulozytenkonzentraten

Mitglied in wiss. Fachgesellschaften: DGTI, ESFH, DGHO

Dresden, den 15.05.2009


Dr. med. Kristina Hölig

Curriculum vitae

Name: Prof. Dr. med. Rainer Moog

Einrichtung: Münchener Blutbank GmbH

Abitur: 1978 Gymnasium Ratingen

Hochschulstudium: Humanmedizin Universität-Gesamthochschule Essen

Abschluss des Hochschulstudiums: 1986

Promotion: 1987 „magna cum laude“, Universität Essen

Facharztwerb: 1995 Transfusionsmedizin

Zusatzbezeichnung: 2007 Hämostaseologie

Habilitation: 2000 Transfusionsmedizin

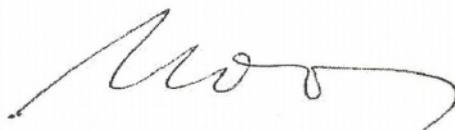
Jetzige Position: Ärztlicher Leiter

Wichtige Mitgliedschaften: DGTI, StKB, ISBT, ESFH, BBTS, ASFA

Besondere Interessensgebiete: Hämapherese (einschließlich Blutstammzellen)

Publikationen (Originalarbeiten): 38

München, den 05.05.09



Curriculum vitae

Name: PD Dr. med. Michael Müller-Steinhardt

Einrichtung: Institut für Transfusionsmedizin
und Immunologie Mannheim
Medizinische Fakultät Mannheim, Universität
Heidelberg, DRK-Blutspendedienst Baden-
Württemberg – Hessen gGmbH

Abitur: 1985 Amos-Comenius-Gymnasium, Bad Godesberg

Hochschulstudium: Humanmedizin Universitäten Bonn und Lübeck

Abschluss des Hochschulstudiums: 1994

Promotion: 1994 „magna cum laude“, Universität Lübeck

Facharztwerb: 2000 Transfusionsmedizin

Habilitation: 2004 Immunologie und Transfusionsmedizin

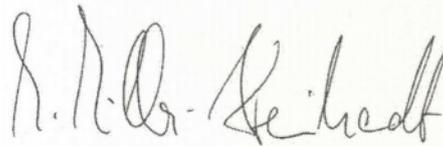
Jetzige Position: Leitender Oberarzt

Wichtige Mitgliedschaften: DGTI, DGI, DGfI, EFI

Besondere Interessensgebiete: Nabelschnurblut, Immungenetik

**Geschätzte Anzahl an Publikationen
(Originalarbeiten)** zirka 40

Mannheim, den 12. Mai 2009



Unterschrift

Curriculum vitae

Name: PD Dr. med. Torsten Tonn

Einrichtung: Institut für Transfusionsmedizin
und Immunhämatologie, DRK Blutspendedienst
Baden-Württemberg-Hessen, JWG Universität
Frankfurt am Main

Abitur: 1982 Gymnasium Hochdahl

Hochschulstudium: Humanmedizin Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Abschluss des Hochschulstudiums: 1991

Promotion: 1996 - „sehr gut“, Universität Düsseldorf

Facharztwerb: 2006 Transfusionsmedizin

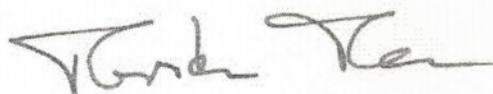
Habilitation: 2006 JWG Universitätsklinikum Frankfurt am Main

Jetzige Position: Abteilungsleiter und Oberarzt, Stationäre Blutspende,
Apherese u. somatische Zelltherapie, Institut
Frankfurt/Main

Wichtige Mitgliedschaften: DGTI, DGI, ISCT-Europe*, IGLD* (*Board Member),
Arbeitsausschuss medizinische Biotechnologie der
DECHEMA, European Blood Alliance – Working Group
Tissues & cells

Besondere Interessensgebiete: Gewinnung und Herstellung von (Stamm-) Zellpräparaten

**geschätzte Anzahl an Publikationen
(Originalarbeiten)** zirka 46



Frankfurt am Main, den 13.05.2009

Unterschrift

Curriculum vitae

Name	WIESNETH Markus Maria Michael, Dr. med.	
Nationalität	Deutsch	
Einrichtung	Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik Ulm Universitätsklinikum Ulm	
Abitur	1971 Descartes Gymnasium, Neuburg/Donau	
Hochschulstudium	1972 – 1978 Humanmedizin, Universität Ulm, Deutschland	
Approbation	1978	Arzt
Promotion	1980	Universität Ulm, Deutschland
Facharztanerkennung	1988	Innere Medizin
	1989	Hämatologie und Internistische Onkologie
	1991	Transfusionsmedizin
Jetzige Position	Leiter der Blutspender- und Aphereseabteilung Leiter des Labors für Knochenmark- und Blutstammzell-Präparation Leiter der Produktionsabteilung des Instituts Ulm des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen, des IKT Ulm und der Abteilung Transfusionsmedizin der Universität Ulm Stellvertretender Ärztlicher Direktor und Herstellungsleiter des Instituts für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik Ulm, Universitätsklinikum Ulm	
AMG-Funktion	Herstellungsleiter gemäß § 15 AMG Sachkundige Person gemäß § 14 AMG	
Mitgliedschaften	DGTI, DGHO, DGI, ISBT, ISEH, EBMT	
Besondere Interessensgebiete	Stammzelltransplantation Qualität und Sicherheit von Blutprodukten	

Ulm im April 2009

M. Wiesneth
