

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie,
Campus Virchow-Klinikum, Charité – Universitätsmedizin Berlin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Bernd Dörken

HABILITATIONSSCHRIFT

STELLENWERT DER NICHTMYELOABLATIVEN STAMMZELLTRANSPLANTATION UND ADOPTIVEN IMMUNTHERAPIE BEI AKUTEN LEUKÄMIEN UND REFRAKTÄREN NIERENZELLKARZINOMEN: ENTWICKLUNG EINES IMMUNOLOGISCHEN THERAPIEKONZEPTES

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach

Innere Medizin

der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

vorgelegt von

Dr. med. Gero Massenkeil
geboren am 6. Mai 1961 in Köln

Berlin, Februar 2004

Datum des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrags: 18. 10. 2004

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. Arnold Ganser, Medizinische Hochschule Hannover

2. Prof. Dr. Dieter Hoelzer, Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt/Main

für Elisabeth und Carla

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1. Entwicklung der hämatopoetischen Stammzelltransplantation	1
1.2. Konzept der Myeloablation	3
1.3. Chimärismus nach allogener Stammzelltransplantation	5
1.4. Spenderlymphozyteninfusionen nach allogener Stammzelltransplantation	6
1.5. Grundlagen der nichtmyeloablativen Stammzelltransplantation	8
1.6. Klinische Studien zur nichtmyeloablativen Stammzelltransplantation	9
1.7. Nichtmyeloablativ Stammzelltransplantation bei akuten Leukämien und metastasierten Nierenzellkarzinomen	11
2. Fragestellungen und Untersuchungsziele der vorliegenden Arbeit	14
3. Patienten und Methoden	
3.1. Patientencharakteristika	16
3.2. Chimärismusanalyse	17
3.3. Spenderlymphozyteninfusionen	19
3.4. Nichtmyeloablativ Stammzelltransplantation bei akuten Leukämien	20
3.4.1. Patientencharakteristika und Indikation zur NST	20
3.4.2. Transplantation	23
3.4.3. Prophylaxe und Therapie der GvHD	23
3.4.4. Prophylaxe und Therapie von Infektionen	24
3.4.5. Anwachsen des Transplantates und Remissionskontrolle	25
3.5. Retrospektive Fall-Kontrollstudie	26
3.5.1. Patientenselektion und Matching-Kriterien	26
3.5.2. Transplantation	26
3.5.3. Prophylaxe und Therapie der GvHD	28
3.5.4. Prophylaxe und Therapie von Infektionen	28
3.4.5. Anwachsen des Transplantates und Remissionskontrolle	28
3.6. Nichtmyeloablativ Stammzelltransplantation bei metastasierten Nierenzellkarzinomen	29
3.6.1. Patientenselektion und Charakteristika stammzelltransplantierter Patienten	29
3.6.2. Transplantation	31
3.6.3. Prophylaxe und Therapie der GvHD	31
3.6.4. Prophylaxe und Therapie von Infektionen	31
3.6.5. Anwachsen des Transplantates, Spenderlymphozyten und Tumornachsorge	32
3.7. Statistische Auswertung	33

4. Ergebnisse

4.1.	Chimärismusanalyse	34
4.2.	Spenderlymphozyteninfusionen	35
4.2.1.	Chimärismus und Rezidive nach Spenderlymphozyteninfusionen	37
4.2.2.	Toxizität der Spenderlymphozyteninfusionen	38
4.3.	Nichtmyeloablative Stammzelltransplantation bei akuten Leukämien	40
4.3.1.	Hämatopoetische Rekonstitution	40
4.3.2.	Transplantationsassoziierte Komplikationen	40
4.3.3.	Chimärismusanalyse und Spenderlymphozyteninfusionen	42
4.3.4.	Therapieergebnisse nach nichtmyeloablativer Stammzelltransplantation	44
4.4.	Retrospektive Fall-Kontrollstudie	46
4.4.1.	Hämatopoetische Rekonstitution	46
4.4.2.	Transplantationsassoziierte Komplikationen	47
4.4.3.	Chimärismusanalyse und Spenderlymphozyteninfusionen	48
4.4.4.	Transplantationsassoziierte Mortalität	49
4.4.5.	Erkrankungsfreies Überleben	50
4.4.6.	Überleben	53
4.5.	Nichtmyeloablative Stammzelltransplantation bei metastasierten Nierenzellkarzinomen	55
4.5.1.	Hämatopoetische Rekonstitution	55
4.5.2.	Transplantationsassoziierte Komplikationen	55
4.5.3.	Chimärismusanalyse und Spenderlymphozyteninfusionen	56
4.4.4.	Tumoransprechen und Überleben	57
4.6.	Zusammenfassung der Ergebnisse unter Berücksichtigung der Fragestellungen und Untersuchungsziele	60

5. Diskussion

5.1.	Indikationsstellung zur nichtmyeloablativen Stammzelltransplantation in der Literatur	63
5.2.	Nichtmyeloablative Stammzelltransplantation bei akuten Leukämien	64
5.3.	Wahl des optimalen dosisreduzierten Konditionierungsregimes	65
5.4.	Komplikationen nach nichtmyeloablativer Stammzelltransplantation	66
5.5.	Prädiktiver Wert des gemischten Chimärismus und prophylaktischer Einsatz von Spenderlymphozyten	68
5.6.	Therapeutischer Einsatz von Spenderlymphozyten im Rezidiv	71
5.7.	Überleben nach nichtmyeloablativer Stammzelltransplantation bei akuten Leukämien	71
5.8.	Nichtmyeloablative Stammzelltransplantation bei metastasierten Nierenzellkarzinomen	72

6. Zusammenfassung und Perspektiven 75

Literatur 77

1. Einleitung

1.1. Entwicklung der hämatopoetischen Stammzelltransplantation

Die Grundlagen für die hämatopoetische Stammzelltransplantation wurden Anfang der fünfziger Jahre des 20. Jahrhunderts gelegt. Experimentelle Untersuchungen zeigten, dass letal bestrahlte Mäuse nach Transfusion autologer [Jacobson 1951] oder allogener [Lorenz 1951] Knochenmarkzellen überlebten. Die Gabe von Knochenmarkzellen eines Spender-Mäusestammes sicherte das Überleben eines Hauttransplantates vom gleichen Spenderstamm beim Empfängertier [Trentin 1956]. Damit wurde bewiesen, dass hämatopoetische Zellen zur Repopulierung des Knochenmarks führen können, und dass durch sie eine Toleranz gegenüber Xenotransplantaten erzeugt werden konnte. Anfang des 21. Jahrhunderts ist die allogene Stammzelltransplantation ein wichtiger Bestandteil der Behandlung maligner und benigner hämatologischer Erkrankungen mit kurativem Therapieansatz.

Die häufigsten Indikationen zur allogenen Stammzelltransplantation (SZT) sind akute myeloische Leukämien (AML) mit ca. 2000 an das internationale Knochenmarkregister (IBMTR) gemeldeten Fällen im Jahre 2002, akute lymphatische Leukämien (ALL) mit ca. 1300 Fällen, chronische myeloische Leukämien (CML), ca. 700 Fälle, myelodysplastische Syndrome (MDS), ca. 700 Fälle, Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), ca. 900 Fälle und chronische lymphatische Leukämien (CLL), ca. 300 Fälle, außerdem nichtmaligne Erkrankungen wie aplastische Anämien, Immundefekte und angeborene Stoffwechselerkrankungen (ca. 600 Fälle). Ca. 75% werden von HLA-kompatiblen verwandten Spendern und 25% von HLA-kompatiblen unverwandten Spendern transplantiert [IBMTR-Database 2003].

Die hohe transplantationsassoziierte Morbidität und Mortalität (TRM) führte zu einer Indikationsbeschränkung auf jüngere Patienten ohne gestörte Organfunktionen. Dabei werden im Allgemeinen Patienten bis zu einer Altersgrenze von 50 - 55 Jahren für eine HLA-identische Stammzelltransplantation akzeptiert. ALL, AML, MDS, CML, CLL, NHL und multiple Myelome (MM) sind aber mit Ausnahme der kindlichen ALL Erkrankungen, die in der großen Mehrzahl der Fälle jenseits des 50. Lebensjahres auftreten. Ältere Patienten haben häufig weitere internistische Erkrankungen und eingeschränkte Organfunktionen, die eine Konditionierung mit Chemo- und Strahlentherapie ausschließen. Die Mehrzahl der Patienten kommt damit schon aus Altersgründen nicht für eine Transplantation in Frage, so dass allogene stammzelltransplantierte Patienten im Median bis zu 2 Dekaden jünger sind als der Altersmedian dieser Erkrankungen in der Bevölkerung.

Auch jüngere Patienten, die eine intensive Induktions- und Konsolidationschemotherapie erhalten haben, können durch schwere Infektionen, vor allem Pilzpneumonien (häufig bei akuten Leukämien) und medikamentös toxische Organschäden, die vor allem Nieren und Herz betreffen, Kontraindikationen gegen eine Standardkonditionierung aufweisen [Arnold 2002].

Ebenso können Patienten mit Rezidiven nach allogener SZT wegen der bereits verabreichten hochdosierten Radio-Chemotherapie nicht erneut einer konventionellen Konditionierung zur Retransplantation zugeführt werden.

Drei aktuelle Entwicklungen haben die allogene Stammzelltransplantation entscheidend verändert:

1. In den letzten 5 - 8 Jahren ist es zu einer deutlichen Zunahme der peripheren Blutstammzelltransplantationen (PBSZT) und Rückgang der Knochenmarktransplantationen (KMT) gekommen [DRST 2001]. Die Apherese aus dem peripheren Blut nach Stammzellmobilisation mit einem hämatopoetischen Wachstumsfaktor umgeht die in Vollnarkose durchzuführende Knochenmarkentnahme. Die PBSZT ist mit einer rascheren hämatopoetischen Rekonstitution von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten verbunden [Schmitz 1998, Blaise 2000], scheint aber mit einer etwas höheren Rate chronischer Transplantat-gegen-Wirt Erkrankungen einherzugehen [Bensinger 2001]. Nach PBSCT wird in einigen Studien ein besseres krankheitsfreies und Gesamt-Überleben beobachtet, möglicherweise durch Reduktion der transplantationsassoziierten Mortalität (TRM) und einen stärkeren Transplantat-gegen-Leukämie (graft-versus-leukemia, GvL)-Effekt [Elmaagacli 1999, Bensinger 2001].

2. Die Verbesserung der DNA (Desoxyribonukleinsäure)-basierten HLA (Haupthistokompatibilitätskomplex)-Typisierung der Klassen I und II hat zusammen mit der ständig wachsenden Zahl freiwilliger Spender (Ende 2001 waren 2,7 Millionen Spender im amerikanischen Knochenmarkspenderregister (NMDP) erfasst und größtenteils Klasse I und II typisiert) zu einer Zunahme unverwandter Transplantationen bei jüngeren und älteren Patienten geführt, die in Deutschland im Jahre 2001 erstmalig häufiger als verwandte Transplantationen durchgeführt wurden [DRST 2001].

3. Die Altersgrenze hat sich durch die Verbesserung der supportiven Therapie nach oben verschoben, der Anteil über 50-jähriger Patienten an der Gesamtheit allogenen transplantierten Patienten ist inzwischen auf 15 - 20 % gestiegen und hat sich damit innerhalb der letzten 10 Jahre fast verdreifacht [IBMTR 2003].

1.2. Konzept der Myeloablation

Erfolgreiche hämatopoetische Stammzelltransplantationen müssen im Unterschied zur allogenen Transplantation solider Organe eine doppelte Immunbarriere überwinden, die Wirt-gegen-Transplantat- bzw. Abstoßungsreaktion (host-versus-graft reaction, HvG) und die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (graft-versus-host disease, GvHD). Die Entwicklung verschiedener hochdosierter Strahlen- und Chemotherapieprotokolle mit maximal tolerablen Dosierungen führte zur effektiven Unterdrückung der Abstoßungsreaktion [Buckner 1974]. Die Zerstörung der Empfängerhämatopoese (Myeloablation) durch die hochdosierte Konditionierungstherapie wurde als der entscheidende Faktor für die Eradikation des malignen Zellklons und die Stammzellgabe als Überbrückung der Knochenmarkaplasie angesehen [Buckner 1974].

Die drei Ziele der myeloablativen Konditionierung ließen sich damit wie folgt beschreiben:

1. Immunsuppression des Empfängers zur Überwindung der HvG-Reaktion
2. Zerstörung maligner hämatopoetischer Zellen und Eradikation des malignen Zellklons
3. Herstellen einer Knochenmarkaplasie, um Platz für das neue Transplantat zu schaffen [Storb 1998].

Dosislimitierender Faktor der Konditionierung ist die nichthämatologische Organtoxizität. Die hämatologische Toxizität ist bei ausreichender Zahl transplantierte hämatopoetischer Stammzellen mit Überwindung der Knochenmarkaplasie nicht dosisbegrenzend [Blaise 2000, Bensing 2001].

Während das Risiko eines Transplantatversagens (HvG-Reaktion) bei HLA-identischem Spender bei unter 2 % liegt [Anasetti 1989], führt die Gabe allogener Zellen in Abhängigkeit bekannter Risikofaktoren wie HLA-Kompatibilität, Krankheitsstadium, Alter des Patienten und Geschlecht des Spenders trotz medikamentöser Prophylaxe in 20 – 80 % zu einer GvHD [Beatty 1985].

Die Intensität der Konditionierung ist ein Risikofaktor für eine akute GvHD, weil es durch die Gewebsschädigung zu Mukosaschäden mit Translokation von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF-alpha ins Blut kommt (*Abbildung 1*). Die dadurch ausgelöste weitere Zytokinfreisetzung („cytokine storm“) wird als wichtigster Faktor für die weitere Gewebsschädigung angesehen. Proinflammatorische Zytokine sowie die veränderte Oberflächenantigenpräsentation führen zu einer unspezifischen Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen und Makrophagen des Empfängers und zur Amplifikation der Alloreaktivität der Spender-T-Lymphozyten [Ferrara 1991, Holler 2002].

Die Fraktionierung der Ganzkörperbestrahlung sowie supportive Maßnahmen zur Senkung der Toxizität der hochdosierten Chemotherapie hatten eine Reduktion der therapieinduzierten Nebenwirkungen zur Folge [Deeg 1984, Shank 1990, Thomas 1990]. Die allogene SZT ist aber immer noch mit

einer hohen TRM assoziiert. Die häufigsten transplantationsassoziierten Todesursachen sind Infektionen, unkontrollierte akute oder chronische GvHD und Organversagen [IBMTR 2003].

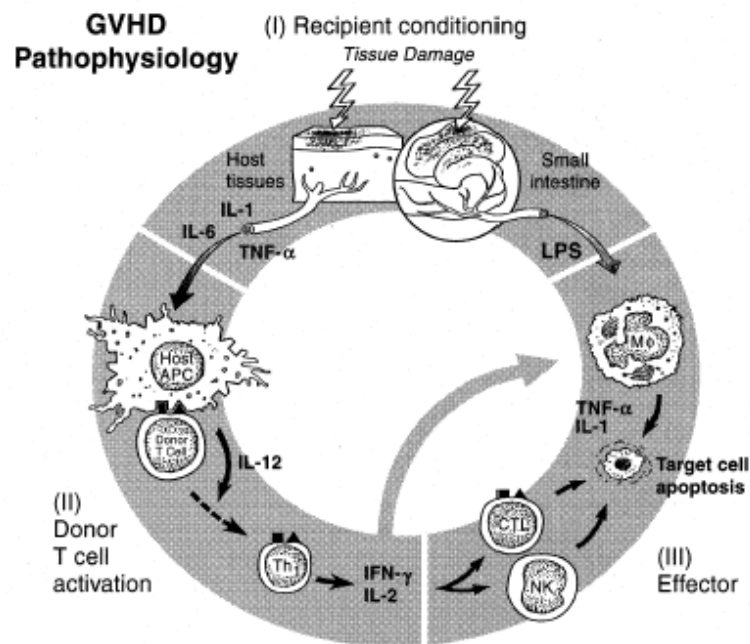


Abbildung 1. Pathophysiologie der akuten GvHD.

[Ferrara 1998]

Der günstige Einfluss des Immuneffektes der Spenderzellen auf das rezidivfreie Überleben nach allogener SZT wurde schon früh erkannt (Barnes 1957). Der antileukämische Effekt der allogenen SZT wurde in großen retrospektiven Untersuchungen und Registerdaten nachgewiesen:

1. Syngene Transplantationen wiesen zusammen mit T-Zell-depletierten Transplantaten die höchsten Rezidivraten auf [Horowitz 1990].
2. Nach allogener SZT konnte auch ohne GvHD noch eine deutliche Senkung des Rezidivrisikos gegenüber der syngenen Transplantation oder der T-Zell-Depletion beobachtet werden, erklärbar durch eine subklinische GvHD, die einen GvL-Effekt auslöst [Horowitz 1990].
3. Eine Rezidivsenkung war sowohl durch eine akute wie auch eine chronische GvHD möglich, der stärkste Effekt wurde durch eine Kombination von akuter und chronischer GvHD ausgelöst [Weiden 1979, Horowitz 1990, Ringdén 1996].
4. Mit dem Konzept einer GvL vereinbar sind randomisierte Studien, die durch eine weniger intensive GvHD-Prophylaxe das Rezidivrisiko senken konnten [Storb 1989a].

5. Die Wirksamkeit des GvL-Effektes wurde am beeindruckendsten durch die Fähigkeit von Spender T-Lymphozyteninfusionen (donor lymphocyte infusions, DLI) demonstriert, die bei rezidierten Leukämien nach allogener SZT eine erneute Remission induzieren können [Kolb 1995, Porter 2000].

Durch die Transplantation wird eine antileukämische Reaktion der Spenderzellen gegen Empfängerewebe ausgelöst, die zu einer Rezidivsenkung führt und sich klinisch meist als GvHD manifestiert [Weiden 1979, Horowitz 1990].

1.3. Chimärismus nach allogener Stammzelltransplantation

Als Chimärismus wird der Nachweis lymphohämatopoetischer Zellen bezeichnet, die nicht vom Wirtsorganismus stammen. Als gemischter Chimärismus wird der gleichzeitige Nachweis von Spender- und Empfängerzellen bezeichnet.

In älteren Chimärismusstudien wurden Blutgruppenbestimmungen, zytogenetische Krankheitsmarker, Immunglobulinisotypennachweise oder Y-Chromosomnachweise mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Analyse eingesetzt. Diese Ansätze hatten den Nachteil eines geringen Polymorphismusgrades, niedriger Sensitivität, der Notwendigkeit eines molekularen Markers oder einer Spender-Empfänger-Geschlechtsdifferenz [Antin 2001].

DNA-basierte Techniken haben zu einer deutlichen Erhöhung der Sensitivität der Chimärismusuntersuchungen geführt. Vor allem die quantitative Analyse kurzkettiger repetitiver DNA-Sequenzen wie Minisatelliten oder die „variablen Anzahlen von Tandemwiederholungen“ (variable number of tandem repeats, VNTR) sowie kurze repetitive Mikrosatelliten (short tandem repeats, STR) in einzelnen Leukozytensubpopulationen ermöglicht den Nachweis eines gemischten Chimärismus bei geringen Zellzahlen und bei Fehlen molekularer Erkrankungsmarker. Die Verwendung einer Multiplex-Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Primern gegen neun über das Genom verstreute STR und die Verwendung einer geschlechtschromosomspezifischen Sonde erlaubt eine eindeutige Zuordnung einer DNA-Probe zu einem Individuum und hat sich in den letzten Jahren als wichtige Methode zur Untersuchung des Chimärismus etabliert [Thiede 1999, Nagy 2000, Massenkeil 2003]. Vorteile sind der hohe Polymorphismusgrad der verwendeten Marker, die spezifische Untersuchung einzelner Leukozytensubpopulationen, die geringe Zahl benötigter Zellen und die Unabhängigkeit von molekularen Krankheitsmarkern.

Im Gegensatz zu einer hochdosierten Strahlen- und Chemotherapie kann in Tierexperimenten durch eine dosisreduzierte Konditionierung gezielt ein gemischter Chimärismus (mixed chimerism, MC) herbeigeführt werden [Sykes 1999, Spitzer 2000]. Ein stabiler gemischter Chimärismus nach

Stammzelltransplantation, also die Koexistenz von Spender- und Empfängerzellen beim Transplantatempfänger, kann in klinischen Untersuchungen bei nichtmalignen hämatologischen Erkrankungen wie den Hämoglobinopathien jenseits der frühen Anwachsphase („engraftment“) des Transplantates mit einer Normalisierung pathologischer Krankheitsparameter einhergehen [Andreani 1996, Slavin 1998]. Die Induktion eines gemischten Chimärismus scheint HvG- und GvH-Reaktion nach Transplantation gegenseitig zu neutralisieren [Childs 1999, Spitzer 2000].

1.4. Spenderlymphozyteninfusionen nach allogener Stammzelltransplantation

Die anti-leukämische Potenz von DLI wurde anfänglich für Patienten mit rezidivierter CML nach allogener SZT bewiesen, Chimärismusuntersuchungen wurden nicht durchgeführt [Kolb 1995]. Anhaltende Remissionen werden vor allem bei molekularen und zytogenetischen Rezidiven der CML beobachtet [Dazzi 2000], späte Rezidive können jedoch noch nach mehreren Jahren auftreten [Porter 1999].

Patienten mit großer Tumorzellmasse und rascher Wachstumskinetik der Grunderkrankung, d.h. Blastenkrisen der CML sowie ALL oder AML hatten eine geringere Ansprechrate auf DLI und ein deutlich geringeres progressionsfreies Überleben nach 1 - 2 Jahren [Kolb 1995, Collins 1997, Porter 2000]. Prophylaktische DLI (präemptive Gabe) schienen dagegen bei einer kleineren Gruppe von pädiatrischen Hochrisikoleukämien ein Rezidiv verhindern zu können [Bader 1999]. Üblicherweise werden DLI in eskalierenden Zelldosen über mehrere Monate verabreicht, da diese Vorgehensweise gegenüber der einmaligen hochdosierten Gabe zu einer signifikant geringeren GvHD-Häufigkeit führt [Dazzi 2000]. Die Ansprechraten zeigen eine Abhängigkeit von der transfundierten Zahl CD3-positiver Zellen. Eine GvHD tritt häufig erst bei höheren Zelldosen auf. Auch ohne Entwicklung einer GvHD konnte ein GvL-Effekt mit niedrigen T-Zelldosen bei rezidivierter CML erzielt werden [Mackinnon 1995].

Die schwerste Komplikation nach DLI ist das Auftreten einer GvHD bei 40 – 70 % der Patienten [Kolb 1995, Mackinnon 1995, Dazzi 2000]. Frühe Gabe von DLI nach Transplantation sowie hohe kumulative Zelldosis erhöhen das Risiko [Mackinnon 1995, Guglielmi 2002].

Eine Knochenmarkaplasie tritt bei 18 – 36 % der Patienten nach DLI auf. Risikofaktoren für eine Myelosuppression sind zugrunde liegende Erkrankung, Stadium der Erkrankung vor DLI und verabreichte Zelldosis [Kolb 1995, Guglielmi 2002]. Ursächlich für die Knochenmarkaplasie wird eine Transplantat-gegen-Empfängerhämatoopoese-Reaktion bei Vorhandensein einer ausreichenden Zahl von persistierenden Empfängerzellen angesehen. GvHD und Knochenmarkaplasie können zu erheblicher Gefährdung der Patienten führen [Porter 1999].

Der nach dosisreduzierter Konditionierung oft beobachtete und experimentell induzierbare gemischte Chimärismus [Spitzer 2000] kann als Basis für eine spätere adoptive Immuntherapie mit DLI dienen. Durch DLI kann eine Konversion in einen kompletten Spenderchimärismus (CC) erzielt werden (*Abbildung 2*). Für die Induktion eines GvL-Effektes durch DLI war in tierexperimentellen Untersuchungen ein gemischter Chimärismus im Vergleich zu einem vollen Spenderchimärismus vorteilhaft [Mapara 2002].

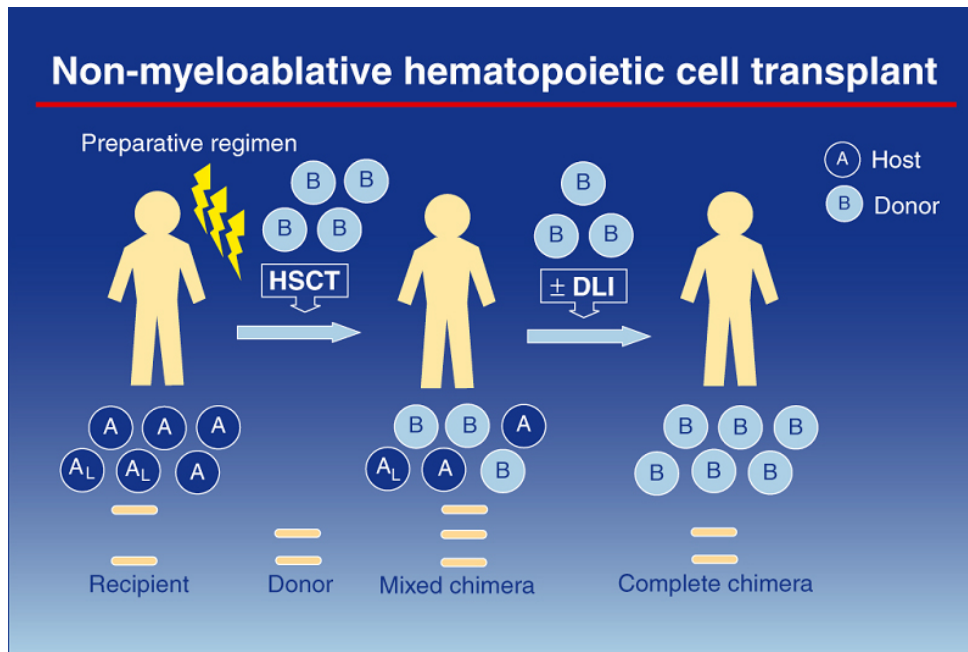


Abbildung 2. Gemischter Chimärismus nach allogener Stammzelltransplantation.

Nachweis von Spender- und Empfängerprofil (mixed chimera) nach Konditionierung (preparative regimen) und Transplantation (HSCT). Konversion in einen kompletten Spenderchimärismus (complete chimera) nach Gabe von Spenderlymphozyten (DLI) (R. Champlin, University of Texas, USA).

Die prognostische Bedeutung des gemischten Chimärismus konnte bisher in klinischen Studien nur teilweise geklärt werden. Ein gemischter Chimärismus nach dosisreduzierter Konditionierung war in einigen klinischen Untersuchungen mit einer erhöhten Abstoßungs- oder Rezidivrate assoziiert [Bornhäuser 2001, Mc Sweeney 2001, Massenkeil 2003]. Nach myeloablativer Konditionierung ging ein anhaltender gemischter Chimärismus mit einem erhöhten Rezidivrisiko einher [Huss 1996, Bader 1998].

1.5. Grundlagen der nichtmyeloablativen Stammzelltransplantation

Zahlreiche Beobachtungen und Untersuchungen in Patienten- und Tiermodellen der letzten 2 Jahrzehnte führten zu einer Änderung des Transplantationskonzeptes:

1. Da T-Lymphozyten des Empfängers bzw. des Spenders Effektorzellen sowohl der HvG- wie auch der GvH-Reaktionen bei allogener SZT sind [Ferrara 1991, Barrett 2003], lagen Überlegungen nahe, durch T-Zellsuppression die Immunreaktion in Spender- wie auch in Empfängerrichtung zu unterdrücken.

In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Gabe von immunsuppressiv wirkenden Medikamenten nach letaler Bestrahlung und Stammzelltransfusion nicht nur eine anhaltende Unterdrückung der Abstoßungsreaktion, sondern auch eine verminderte GvHD-Rate zur Folge hatte [Yu 1995]. Auch nach subletaler Bestrahlung mit 200 cGy konnte im gleichen Modell gezeigt werden, dass eine Post-Transplantationsimmunsuppression mit Cyclosporin A (CSA) und Mycophenolat mofetil (MMF) zu einem Transplantatanwachsen mit stabilem gemischtem Chimärismus führt [Yu 1998]. Eine letale Bestrahlung der Tiere mit 450 cGy ohne immunsuppressive Komedikation führte nicht zum Transplantatanwachsen [Storb 1989b], womit bewiesen wurde, dass eine Myeloablation alleine das Anwachsen des Transplantates nicht sichert, und eine HvG-Reaktion durch die gleichen Medikamente wie die GvH-Reaktion kontrolliert werden kann. Ein anderer tierexperimenteller Ansatz beinhaltete die in-vivo und ex-vivo T-Zell-Depletion durch Gabe von Anti-T-Zell-Antikörper und Thymusbestrahlung kombiniert mit einer niedrig dosierten Chemotherapie. Auch hier konnte ein Anwachsen des Transplantates und Entwicklung eines gemischten Chimärismus erzielt werden [Sharabi 1989].

2. Trotz maximal tolerabler Strahlen- und Chemotherapiedosis erleiden viele Patienten ein Rezidiv der Grunderkrankung nach Transplantation [Appelbaum 1997, Greinix 2002]. Diese treten meist in den ersten 2 Jahren nach Stammzelltransplantation in Abhängigkeit von der zugrunde liegenden malignen Erkrankung, dem Krankheitsstadium und dem Auftreten bzw. Fehlen einer GvHD auf [Horowitz 1997]. Damit musste die Vorstellung verlassen werden, dass eine vollständige Eradikation des malignen Zellklons durch Konditionierung alleine erzielt werden kann.

3. Durch niedrig dosierte Lymphknotenbestrahlung ohne Einbeziehung des Knochenmarkes, anschließender Stammzellgabe und Post-Transplantationsimmunsuppression gelang ein Anwachsen des Transplantates. Die Transplantate schienen also in der Lage zu sein, sich ihren

eigenen Platz im Knochenmark zu schaffen, wahrscheinlich durch eine subklinische GvH-Reaktion [Storb 1999]. Eine Knochenmarkaplasie ist also keine notwendige Voraussetzung für die Überwindung der HvG-Reaktion.

Diese und andere Studien bewiesen, dass eine suffiziente Immunablation des Empfängers ohne Myeloablation (nichtmyeloablative Stammzelltransplantation, NST) Voraussetzung für ein Transplantatanwachsen ist [Sykes 1997, Stewart 1998, Storb 1999].

Von den postulierten Wirkungsmechanismen der Konditionierung scheint die Toleranzinduktion des Empfängers und damit die Überwindung der HvG-Reaktion durch Immunsuppression entscheidend für das Anwachsen des Transplantates zu sein, das seinerseits ein Prädiktor des Patientenüberlebens und Voraussetzung für die Entwicklung eines GvL-Effektes ist [Davies 2000]. Die sich aus den differenzierenden CD34-positiven Stammzellen entwickelnden T-Lymphozyten und NK (natural killer) -Zellen unterstützen das Anwachsen über eine allogene Immunreaktion gegen residuelle Empfängerimmunzellen [Reisner 1995].

Die aufgeführten Studien führten zu zahlreichen Modifikationen der etablierten Konditionierungsregime mit dem Ziel, die Toxizität der Strahlen- und Chemotherapie zu vermindern, ohne eine Abstoßungsreaktion auszulösen und das Rezidivrisiko zu erhöhen. Gleichzeitig wurden nach Entwicklung sensitiver Methoden regelmäßige Chimärismusanalysen in die Überwachung dieser Patienten nach Transplantation eingeführt. Chimärismusanalysen werden aktuell genutzt, um die Posttransplantationsimmunsuppression besser steuern zu können und eine adoptive Immuntherapie mit DLI zur Verhütung oder Behandlung von Rezidiven rechtzeitig einzuleiten [Riddell 1998].

1.6. Klinische Studien zur nichtmyeloablative Stammzelltransplantation

In den letzten Jahren wurde eine Reihe klinischer Untersuchungen mit dosisreduzierten Konditionierungsprotokollen durchgeführt. Es handelte sich um unkontrollierte, häufig monozentrische Phase I/II Studien mit unterschiedlicher Konditionierungsintensität, die die Durchführbarkeit und Wirksamkeit der NST testeten.

Giralt et al. transplantierten 15 Patienten mit fortgeschrittener AML oder MDS zwischen 27 und 71 Jahren. 13/15 Patienten hatten ein Transplantatanwachsen. 8 Patienten erzielten eine komplette Remission (CR), bei 6/8 waren über 90 % Spenderzellen im Knochenmark nachweisbar. Nach einer maximalen Nachbeobachtungszeit von nur 242 Tagen waren 6/15 Patienten an der Leukämie verstorben und 3/15 an transplantationsassoziierten Komplikationen. Nur noch 2 Patienten befanden sich zu diesem Zeitpunkt in CR [Giralt 1997].

Slavin et al. transplantierten 26 Patienten nach Konditionierung mit Fludarabin, Busulfan und Antithymozytenglobulin (ATG), die Kandidaten für eine konventionelle Stammzelltransplantation gewesen wären. Die zugrunde liegenden Erkrankungen waren heterogen und umfassten auch 4 nichtmaligne Erkrankungen. Die hämatopoetische Rekonstitution erfolgte rasch. Nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 8 Monaten lebten 22/26 Patienten, 21 Patienten waren erkrankungsfrei und 4 Patienten waren an akuter GvHD verstorben [Slavin 1998].

Die Bedeutung der Chimärismuskonversion der verschiedenen Leukozytensubpopulationen wurde von Childs et al. an 15 Patienten untersucht. 8 Patienten litten an hämatologischen Erkrankungen und 7 an fortgeschrittenen soliden Tumoren. Die hämatologische Rekonstitutionszeit war kurz. Nach Transplantation kam es rasch zu einer T-Zellkonversion vom Empfänger zum Spender, gefolgt von der Konversion myeloischer Zellen. Die beobachteten Tumorrückbildungen traten erst nach Konversion zu einem überwiegenden Spenderchimärismus auf [Childs 1999].

Die Durchführbarkeit einer NST bei älteren Patienten wurde von Mc Sweeney et al. geprüft. 54 Patienten mit einem medianen Alter von 56 Jahren erhielten eine minimale Konditionierung mit 200 cGy Ganzkörperbestrahlung und Immunsuppression mit CSA und MMF. 9/44 Patienten (20%) entwickelten ein Transplantatversagen nach NST, daher wurde die Konditionierung während der Studie um Fludarabin erweitert. Insgesamt konnte eine CR bei 19/29 Patienten (66 %) mit aktiver Erkrankung vor Transplantation erzielt werden. 4 Patienten erreichten eine CR nach Gabe von DLI. Nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 417 Tagen waren nur 3 Patienten (7 %) an Komplikationen der Transplantation verstorben [Mc Sweeney 2001].

Eine hohe Abstoßungsrate von 23 % bei 44 CML-Patienten beobachteten auch Bornhäuser et al. nach Konditionierung mit Busulfan, Fludarabin und ATG; 10/44 Patienten hatten aber ein Transplantat von HLA-differenten verwandten oder unverwandten Spendern erhalten [Bornhäuser 2001].

Obwohl die Konditionierungsschemata in den aufgeführten Studien unterschiedlich waren, wurden vor allem Zytostatika mit ausgeprägt immunsuppressiver Wirkung wie Fludarabin und Cyclophosphamid und / oder eine niedrig dosierte Ganzkörperbestrahlung von 2 Gy (gegenüber 12 Gy bei konventioneller Konditionierung) eingesetzt. Teilweise erhielten die Patienten auch einen T-Lymphozyten-depletierenden polyklonalen Antikörper wie ATG.

Konditionierungsregime sowie Art und Dauer der immunsuppressiven Therapie nach Transplantation sind bisher nicht vergleichend evaluiert worden. Ebenso sind bisher keine prospektiven Studien zum Vergleich nichtmyeloablativer und myeloablativer Konditionierungsregime durchgeführt worden.

Aus den Studienergebnissen kann zur Zeit geschlossen werden, dass dosisreduzierte Konditionierungsregime in den meisten Fällen zu einem stabilen Anwachsen des Transplantates führen. Die Zeitdauer bis zur hämatopoetischen Rekonstitution ist in der Regel kürzer als nach myeloablativer Konditionierung [Slavin 1998, Mc Sweeney 2001]. Komplette Remissionen werden auch bei refraktären Erkrankungen erzielt. Die TRM war in mehreren unkontrollierten Studien im Vergleich zur konventionellen Transplantation deutlich reduziert [Giralt 1997, Mc Sweeney 2001]. Langzeitdaten zur Spättoxizität und zum Überleben nach NST liegen bisher nicht vor. In den bisherigen Studien war die Rate akuter und chronischer GvHD jedoch meist hoch [Bornhäuser 2001, Corradini 2002, Mc Sweeney 2001, Massenkeil 2002, Mielcarek 2003, Or 2003]. Publikationen kleinerer Patientengruppen zeigten übereinstimmend, dass nach NST bakterielle, mykotische und virale Infektionen häufig auftreten [Mohty 2000, Chakrabarti 2002, Junghanss 2002, Massenkeil 2002].

1.7. Nichtmyeloablative Stammzelltransplantation bei akuten Leukämien und metastasierten Nierenzellkarzinomen

Dosisreduzierte Konditionierungsregime haben trotz fehlender prospektiver Studien und kurzer Nachbeobachtungszeiten zu einer raschen Etablierung der NST geführt, die bereits im Jahr 2001 27,4 % aller allogenen SZT in Europa ausmachten [Gratwohl 2002]. Meistens wurden Patienten mit Kontraindikationen gegen eine hochdosierte Strahlen- und Chemotherapie behandelt. Dies betraf ältere Patienten, Patienten in reduziertem Allgemeinzustand, mit eingeschränkten Organfunktionen, schweren Infektionen sowie intensiven Vortherapien inklusive vorangegangener Stammzelltransplantationen mit Hochdosischemotherapie und Ganzkörperbestrahlung [Slavin 1998, Bornhäuser 2001, Mc Sweeney 2001, Massenkeil 2002].

Darüber hinaus haben dosisreduzierte Konditionierungsprotokolle zu einer Ausweitung der Indikationen zur allogenen SZT auf hämatologische Erkrankungen mit bisher sehr hoher TRM wie z.B. dem multiplen Myelom und der CLL geführt [Kröger 2002, Dreger 2003a] und wurden bei therapierefraktären soliden Tumoren erprobt [Childs, 2000].

NST bei akuten Leukämien

Von Patienten mit ALL oder AML liegen im Unterschied zu Patienten mit CML, NHL oder MM bisher wenige Daten zur NST, adoptiven Immuntherapie mit DLI und zur prognostischen Bedeutung des gemischten Chimärismus nach NST vor, da dosisreduzierte Konditionierungsregime bei diesen Erkrankungen bisher wegen der raschen Erkrankungskinetik und des hohen Rezidivrisikos nur selten durchgeführt wurden.

Bei Kontraindikationen gegen eine konventionelle Konditionierung scheint aber auch bei Hochrisikoleukämien ein nichtmyeloablativer Therapieansatz möglich. In eigenen Untersuchungen bei 23 Patienten mit akuten Leukämien konnten wir zeigen, dass durch eine nichtmyeloablative Konditionierung und präemptive Gabe von Spenderlymphozyten bei gemischtem Chimärismus eine anhaltende CR nach Chimärismuskonversion erzielt werden konnte. Bei Persistenz von Empfängerzellen rezidierten alle Patienten. Eine prophylaktische Gabe von DLI scheint daher bei Hochrisikoleukämien in Abhängigkeit vom Chimärismusstatus Rezidive zu verhindern [Maszenkeil 2003]; weitere detaillierte Untersuchungen liegen bei akuten Leukämien bisher nicht vor.

NST bei chemo- und immuntherapieresistenten Tumoren

Der Einsatz der allogenen SZT nach dosisreduzierter Konditionierung bei chemotherapieresistenten metastasierten Tumoren beruhte auf folgenden Überlegungen:

1. der bei Nierenzellkarzinomen und malignen Melanomen beobachteten Tumorreduktion unter einer immunologischen Therapie [Rosenberg 1987],
2. der Transplantation eines intakten, nicht zytostatisch vorbehandelten und nicht toleranten Immunsystems des Spenders,
3. der Gabe eines kompletten T-Zellrepertoires des Spenders, das sich nicht nur gegen Empfänger-Tumorantigene, sondern auch gegen weitere, durch die Tumorzellen exprimierte Alloantigene (z.B. Minor-Histokompatibilitätsantigene, mHa) richtet [Goulmy 1997],
4. der Möglichkeit der Gabe von DLI zur Verstärkung eines Graft-versus-Tumor (GvT) -Effektes in Analogie zu den Untersuchungen bei hämatologischen Neoplasien [Kolb 1995, Porter 2000],
5. der verminderten Toxizität der dosisreduzierten Konditionierungsregime bei den überwiegend älteren Patienten mit hoher Komorbidität.

Metastasierte Nierenzellkarzinome haben eine ausgeprägte Chemotherapieresistenz und eine sehr schlechte Prognose [Motzer 1996, Amato 2000]. Durch den Einsatz von Interferon-haltigen Immuntherapien konnte eine Tumorregression bei 10 – 30 % der Patienten erzielt werden [Rosenberg 1987, Roigas 2003]. Dabei handelte es sich aber meistens um partielle Remissionen (PR) und die Überlebensraten nach 3 - 5 Jahren lagen unter 25 % [Atzpodien 2001, Roigas 2003]. Das Ansprechen von metastasierten Nierenzellkarzinomen auf eine Zytokin-basierte Therapie [Atzpodien 2001] und vereinzelt beobachtete spontane Rückbildungen von Tumormetastasen [Fairlamb 1981] machten das Nierenzellkarzinom zum Ziel zahlreicher immunologischer Therapieansätze.

Dazu zählen die Infusion von tumorinfiltrierenden Lymphozyten [Figlin 1999] oder die autologe Tumorzellvakzinierung [Chang 2003].

Mögliche Ursachen der geringen Ansprechraten immunologischer Therapien bei Nierenzellkarzinomen liegen in der intensiven Vorbehandlung der Patienten, der Überexpression des antiapoptotisch wirkenden Protoonkogens bcl-2, der Antigenrestriktion der meisten Vakzinierungsstudien, der Heterogenität der Tumorzellen, der Möglichkeit des Antigen-„escapes“ von Tumorzellen sowie der häufig großen Tumormassen bei weit fortgeschrittenen Tumoren [Rivoltini 1995, Oudard 2002].

Die Erfahrungen mit der allogenen SZT bei therapierefraktären soliden Tumoren waren bis vor kurzem wegen der erheblichen TRM der Transplantation und des meist fortgeschrittenen Alters der Tumorpatienten kasuistisch [Eibl 1996]. Die Entwicklung dosisreduzierter Konditionierungsregime führte in jüngster Zeit auch zum Einsatz der NST bei chemotherapierefraktären Tumoren. 19 Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen, die nach vorangegangener Immuntherapie progredient waren, erhielten eine NST vom verwandten Spender nach Konditionierung mit Cyclophosphamid und Fludarabin. Eine Tumorrückbildung konnte bei 10/19 Patienten dokumentiert werden, davon erreichten 3 eine CR. Die Remission ging mit der Konversion eines gemischten T-Zell-Chimärismus in einen kompletten Spenderchimärismus einher und war eng mit dem Auftreten einer GvHD verbunden. Tumorrückbildungen konnten immer erst nach mehreren Monaten beobachtet werden und gingen mit einer deutlich verlängerten Überlebenszeit einher [Childs 2000]. Diese Befunde sind sowohl vereinbar mit der bekannten Chemotherapieresistenz von Nierenzellkarzinomen [Amato 2000], die ein Tumoransprechen früh nach Transplantation nicht erwarten ließ, als auch einem GvT-Effekt nach Überwiegen allogener Effektorzellen und Entwicklung einer GvHD. Die in den letzten Jahren publizierte Literatur zur NST bei metastasierten Nierenzellkarzinomen ergibt allerdings ein heterogenes Bild [Bregni 2002, Hentschke 2003].

2. Fragestellungen und Untersuchungsziele der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird der Stellenwert der nichtmyeloablativen Stammzelltransplantation (NST) bei Patienten mit akuten lymphatischen (ALL) oder akuten myeloischen Leukämien (AML) sowie bei Patienten mit chemo- und immuntherapierefraktären metastasierten Nierenzellkarzinomen untersucht.

Dabei wurde das Konzept der NST bei diesen Patienten evaluiert, die Kinetik des Anwachsens der Spenderhämatopoese in sequenziellen Chimärismusanalysen analysiert und die Bedeutung einer adoptiven Immuntherapie mit Spenderlymphozyten (DLI) nach allogener Stammzelltransplantation geprüft.

Damit sollen die folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

1. Welchen prädiktiven Wert hat der Nachweis eines gemischten Chimärismus in der sequenziellen, hochauflösenden Chimärismusuntersuchung von Leukozytensubpopulationen in Blut oder Knochenmark nach allogener Stammzelltransplantation?

Gibt es Unterschiede in der Häufigkeit des gemischten Chimärismus, der Chimärismuskinetik und Chimärismuskonversion nach NST im Vergleich zur konventionellen Stammzelltransplantation nach hochdosierter Strahlen- und Chemotherapie (Standardtransplantation)?

Haben diese Unterschiede eine prognostische Bedeutung?

2. Welchen Stellenwert hat die Gabe von DLI nach allogener Stammzelltransplantation für die Konversion eines gemischten Chimärismus, die Prophylaxe eines drohenden Rezidivs und die Therapie eines klinischen Rezidivs?

3. Stellt die NST eine durchführbare Option bei Patienten mit ALL oder AML dar, die Kandidaten für eine allogene Stammzelltransplantation sind, jedoch Kontraindikationen gegen eine hochdosierte Strahlen- und Chemotherapie vor Transplantation aufweisen?

4. Wie hoch ist das Risiko für Leukämiepatienten nach NST, schwere Infektionen und eine GvHD zu erleiden, die die wichtigsten Faktoren der transplantationsassoziierten Mortalität sind?

5. Zeigen sich im Vergleich von NST und Standardtransplantation bei Patienten mit akuten Leukämien signifikante Unterschiede bezüglich der transplantationsassoziierten Mortalität (TRM), der Rezidivrate und des Überlebens? Ist durch die NST eine Senkung der TRM möglich?
6. Ist die NST eine therapeutische Option für Patienten mit refraktären metastasierten Nierenzellkarzinomen, die ein ungenügendes Ansprechen auf eine vorherige Immuntherapie hatten?

3. Patienten und Methoden

3.1. Patientencharakteristika

Zwischen März 1998 und August 2003 erhielten 280 Patienten eine allogene SZT. Davon hatten 85 Patienten eine ALL, 86 Patienten eine AML, 19 Patienten ein MDS und 72 Patienten eine CML. Die übrigen Patienten hatten NHL, MM, aplastische Anämien oder Nierenzellkarzinome. Die Patienten waren von März 1998 bis März 2001 in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie, Charité, Campus Mitte und ab April 2001 nach der Fusion der Knochenmarktransplantationen und Umzug an den Campus Virchow-Klinikum der Charité, in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, Campus Virchow-Klinikum transplantiert worden.

Von 155 der 280 Patienten, die zwischen März 1998 und August 2003 wegen einer ALL, AML, MDS oder einer CML allogene stammzelltransplantiert wurden, lagen ausreichende Nachbeobachtungszeiten und Chimärismusdaten vor.

(Die Darstellung der Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen erfolgt in Kapitel 3.6.).

Das mediane Alter der 155 Patienten betrug 37 Jahre (16 - 67 Jahre). Die allogene SZT erfolgte bei 73/155 Patienten (47 %) in kontrollierten Krankheitsstadien (1. CR bei ALL oder AML, 1. chronischer Phase (cP) bei CML oder bei unbehandeltem MDS) und bei 82/155 Patienten (53 %) in fortgeschritteneren Krankheitsstadien. 121/155 Patienten (78 %) erhielten eine allogene SZT nach konventioneller hochdosierter Strahlen- und Chemotherapie (Standardtransplantation); 34/155 Patienten (22 %) hatten eine dosisreduzierte Konditionierung zur nichtmyeloablativen Stammzelltransplantation (NST) erhalten.

88 Patienten (57 %) waren von einem HLA-identischen verwandten Spender transplantiert worden und 67 Patienten (43%) von einem HLA-identischen Fremdspender. Die große Mehrzahl der Patienten (88 %) wurde mit mobilisierten peripheren Stammzellen transplantiert, 12 % wurden knochenmarktransplantiert (*Tabelle 1*).

Die GvHD-Prophylaxe variierte in Abhängigkeit von Grunderkrankung, Spendertyp und Konditionierung und umfasste in allen Fällen CSA; MTX und/oder Prednisolon wurden zusätzlich bei Standardtransplantation gegeben; MMF wurde bei einigen Patienten nach NST zusätzlich zu CSA gegeben (siehe Kapitel 3.4.3.).

Tabelle 1. Patientencharakteristika.

n	155
Alter Median (Spannweite)	37 (16-67) Jahre
Geschlecht	
männlich	91 (59%)
weiblich	64 (41%)
Diagnosen	
Stadium der Erkrankung	
ALL	54 (35%)
1. CR	21
> 1. CR	33
AML	56 (36%)
1. CR	22
> 1. CR	34
MDS	9 (6%)
unbehandelt	7
behandelt	2
CML	36 (23%)
1. cP	23
> 1. cP	13
Konditionierung	
hochdosiert	121 (78%)
dosisreduziert	34 (22%)
Spendertyp	
verwandt	88 (57%)
unverwandt	67 (43%)
Spendergeschlecht	
männlich	90 (58%)
weiblich	65 (42%)
Stammzellquelle	
Knochenmark	19 (12%)
peripheres Blut	136 (88%)

ALL = akute lymphatische Leukämie, AML = akute myeloische Leukämie, CML = chronische myeloische Leukämie, MDS = myelodysplastisches Syndrom, CR = komplette Remission. CP = chronische Phase.

3.2. Chimärismusanalyse

Vor Beginn der Konditionierung wurden vom Patienten 3-5 ml mit EDTA durchmisches Knochenmark und 10 ml EDTA-Blut für die Chimärismusanalyse asserviert. Vom Spender wurden ebenfalls Blutproben vor Stammzellmobilisation bzw. von unverwandten Spendern Blutproben, die mit dem Transplantat mitgeliefert wurden, asserviert.

Die Chimärismusanalysen aus peripherem Blut wurden 2 und 4 Wochen nach Transplantation, danach in zuerst 2 - 4- wöchigen Abständen, dann alle 3 Monate für mindestens ein Jahr durchgeführt. Knochenmark wurde anlässlich von routinemäßig durchgeführten Punktionen 1, 3, 6 und 12 Monate nach Standardtransplantation und nach NST untersucht, nach NST erfolgte eine weitere Knochenmarkuntersuchung am Tag + 14.

Ein gemischter Chimärismus (MC) wurde definiert als $\geq 5\%$ Empfängerzellen in mindestens 1 untersuchten Zellsubpopulation in 2 unabhängigen Untersuchungen [Nagy 2000, Massenkeil 2003]. Die Chimärismusanalysen erfolgten im DNA-Labor (Leiterin: Frau Dr. M. Nagy) des Institutes für Rechtsmedizin der Charité und wurden im Rahmen eines drittmittelfinanzierten Kooperationsprojektes (Dieter-Schlag Stiftung, 10/1999) durchgeführt.

Die Chimärismusanalyse von Leukozytensubpopulationen aus dem Blut und Knochenmark wurde mit Hilfe eines Multiplex-STR Assays durchgeführt [Thiede 1999, Nagy 2000, Massenkeil 2003]. EDTA-Blut oder –Knochenmark wurde mit Antikörper-beschichteten Magnetperlen (Dynabeads) sortiert (Deutsche Dynal GmbH, Hamburg). Die verwendeten Antikörper waren spezifisch für CD4-, CD8-, CD3-, CD19-, CD14-, CD15- und CD2-positive kernhaltige Zellen. Das Knochenmark wurde mit Antikörpern gegen CD34 untersucht. Residuelle Blut- und Knochenmarkzellen wurden ebenfalls untersucht. Die Reinheit der spezifischen Zellpopulationen wurde mittels flußzytometrischer Analyse nach Ablösung der Magnetperlen (Becton Dickinson, Heidelberg) kontrolliert und war $> 93\%$.

Genomische DNA wurde aus dem gesorteten Blut mit Hilfe der voll automatischen GenoMTM-48 Robotic Workstation (GENOVISION, Wien, Österreich) gewonnen [Blin 1976]. Die Extraktion bestand aus Zelllyse mit chaotropen Reagenzien, DNA-Bindung an Silikat-beschichtete Magnetpartikel, gefolgt von Elution der reinen Nukleinsäureproben. STR-Polymorphismen wurden auf dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Darmstadt) nach Koamplifikation von neun STR's und dem Amelogenin Gen mit dem AmpFISTR Profilerplus Kit (PE Applied Biosystems, Darmstadt) untersucht [Nagy 2000]. Wir bestimmten die Spender:Empfänger-Relation der untersuchten DNA durch Messung der Relation der Flächen der Spender- und Empfängersignale [Thiede 1999]. Die geschätzte Sensitivität des AmpFISTR Profilerplus multiplex Systems für den Nachweis eines geringen Empfänger- bzw. Spenderzellanteils in einer gemischten Probe liegt bei 5 %. Eine Mindestzellzahl von 1000 Zellen ist ausreichend für eine aussagekräftige Analyse [Nagy 2000]. Proben, in denen kein eindeutiges Spender- oder Empfängerprofil nachgewiesen werden konnte, wurden von der Analyse und anschließenden Auswertung ausgeschlossen.

3.3. Spenderlymphozyteninfusionen

Von den verwandten Spendern wurden für eine spätere adoptive Immuntherapie vor Stammzellmobilisation Lymphozyten durch Leukapherese gewonnen und auf CD3-Expression untersucht. Die Zellen wurden in Portionen zu 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 und, soweit vorhanden, 1×10^8 CD3-positiven Zellen/kg KG des Empfängers geteilt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Von unverwandten Spendern wurden zum Zeitpunkt der Stammzelltransplantation Lymphozyten aus dem G-CSF mobilisierten Blutstammzelltransplantat in Portionen zu 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 und, soweit vorhanden, 5×10^7 CD3-positiven Zellen/kg KG des Empfängers geteilt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

61 Patienten erhielten eine oder mehrere DLI in eskalierender Dosierung nach Transplantation. Bei 6 Patienten lagen keine ausreichenden Nachbeobachtungsdaten und Chimärismusuntersuchungen vor, so dass in die folgende Analyse 55 Patienten eingingen.

Indikationen zur Spenderlymphozyteninfusion waren:

1. prophylaktisch bei Hochrisikopatienten mit ALL oder AML nach NST und bei Patienten nach Standardtransplantation mit Ph+ ALL oder ALL > 1. CR bei Transplantation.
2. therapeutisch bei rezidivierter ALL, AML oder CML.

Die vor Transplantation gewonnenen Spenderlymphozyten wurden als prophylaktische DLI ab Tag + 60 verabreicht, wenn sich keine GvHD nach Absetzen der medikamentösen GvHD-Prophylaxe entwickelt hatte und diese Patienten entweder einen MC aufwiesen oder ein sehr hohes Rezidivrisiko durch unkontrollierte Erkrankung vor Transplantation hatten. DLI wurden auch in therapeutischer Indikation bei bestätigtem Frührezidiv verabreicht. Sie wurden meist in vierwöchigen Abständen nach anti-allergischer Prämedikation verabreicht. Die erste Dosis enthielt 1×10^7 CD3-positiv Zellen/kg KG bei verwandten Spendern und 5×10^6 bei Fremdspendern, die weiteren Gaben erfolgten eskalierend in halblogarithmisch gesteigerten Dosierungsstufen bis maximal 1×10^8 CD3-positiv Zellen/kg KG des Patienten. Während des Beobachtungszeitraums wurde wegen der häufig nach DLI zu beobachtenden GvHD eine Reduktion um eine halbe logarithmische Stufe vorgenommen, so dass dann die 1. DLI nach unverwandter Transplantation 1×10^6 und nach verwandter Transplantation 5×10^6 CD3-positiv Zellen/kg KG enthielt.

3.4. Nichtmyeloablative Stammzelltransplantation bei akuten Leukämien

Nichtmyeloablative Stammzelltransplantationen (NST) werden seit August 1998 in unserer Klinik durchgeführt. Das Protokoll zur NST wurde durch die Ethikkommission der Charité genehmigt. Nach Aufklärung gaben alle Patienten ihre schriftliche Einverständniserklärung.

3.4.1. Patientencharakteristika und Indikation zur NST

Vierunddreißig konsekutive Patienten wurden wegen einer ALL oder einer AML zwischen August 1998 und August 2003 nichtmyeloablative stammzelltransplantiert. Dreißig von 34 Patienten hatten eine ausreichende Nachbeobachtungszeit und gingen in die weitere Untersuchung ein, um die Durchführbarkeit und Nebenwirkungsrate der NST bei Patienten mit akuten Leukämien zu analysieren. Die vier ausgeschlossenen Patienten hatten eine Nachbeobachtungszeit von weniger als drei Monaten zum Zeitpunkt der Auswertung und waren in CR. Die Patienten waren zwischen 19 und 67 Jahren alt. 6/9 ALL-Patienten hatten eine Ph+ ALL und 9/21 AML-Patienten eine sekundäre AML. 17/30 Patienten hatten einen mit einer ungünstigen Prognose assoziierten Karyotyp in der Knochenmarkdiagnostik.

Zum Zeitpunkt der NST waren 9 Patienten in 1. CR, 21 Patienten hatten eine fortgeschrittene Erkrankung, 3/21 waren in 2. CR und 18 Patienten hatten eine aktive Erkrankung (*Tabelle 2*).

Alle Patienten erfüllten Kriterien der Hochrisiko-ALL bzw. -AML aufgrund ihres fortgeschrittenen Alters, hoher Zellzahl bei Erstdiagnose, ungünstiger zytogenetischer Aberrationen oder unkontrollierter Erkrankung [Gökbuget 2000, Visani 2001].

Tabelle 2. Charakteristika von 30 Patienten
mit akuten Leukämien vor NST.

n	30
Alter Median (Spannweite)	45 (19-67) Jahre
Geschlecht	
männlich	18
weiblich	12
Diagnose	
ALL	9
AML	21
Stadium der Erkrankung	
1. CR	9
> 1. CR	21
Spender	
verwandt	20
unverwandt	10
Spendergeschlecht	
männlich	19
weiblich	11
Stammzellquelle	
Knochenmark	3
peripheres Blut	27
GvHD-Prophylaxe	
CSA	23
CSA+MMF	7

ALL = akute lymphatische Leukämie, AML = akute myeloische Leukämie, CR = komplette Remission, GvHD = graft-versus-host disease, CSA = Cyclosporin A, MTX = Methotrexat.

Alle Patienten waren aufgrund ihrer Grunderkrankung Kandidaten für eine allogene SZT, hatten aber Kontraindikationen gegen eine myeloablative Konditionierung. Die häufigsten Kontraindikationen waren Alter über 50 Jahre, ein Rezidiv nach allogener Standardtransplantation und eine aktive oder residuelle schwere Infektion. 14/30 Patienten hatten mehr als 1 Kontraindikation gegen eine Standardkonditionierung. Insgesamt 17/30 Patienten hatten zum Zeitpunkt der NST eine aktive oder gerade überwundene schwere Infektion (*Tabelle 3*).

Tabelle 3. Indikation zur NST bei 30 Patienten mit ALL oder AML.

Alter/Geschlecht	Diagnose und Stadium	Indikation zur dosisreduzierten Konditionierung
29 / M	ALL, Ph+, 1. CR	Pneumonie (Infiltrate)
50 / M	ALL, Ph+, 3. CR	Rezidiv nach KMT
19 / M	ALL, Ph+, 1. Rezidiv	Candidapneumonie (Infiltrate)
25 / M	ALL, Ph+, 1. Rezidiv	Rezidiv nach KMT
26 / M	ALL, Ph+, 2. Rezidiv	Rezidiv nach KMT
49 / F	ALL, Ph+, 2. Rezidiv	Rezidiv nach KMT
23 / M	ALL, c-ALL, 1. CR	Konsolidationstherapie nach Hochdosistherapie mit autologer SZT
21 / M	ALL, prä-T-ALL, 1. Rezidiv	Rezidiv nach KMT
30 / M	ALL, T-ALL, refraktär	hepatolienale Candidiasis (Infiltrate), mediastinale Bestrahlung 40 Gy
38 / F	AML, FAB M1, 1. CR	rezidivierende Thrombosen bei Faktor V Leiden
61 / M	AML, FAB M1, 1. CR	Alter > 50 Jahre, Z.n. Candida-glabrata-Pneumonie
44 / F	AML, FAB M2, 1. CR	Aspergillus-Pneumonie (Infiltrate)
21 / M	AML, FAB M5a, 1. CR	Pilzpneumonie (Infiltrate), Thrombosen, toxischer Leberschaden
48 / M	AML, FAB M7, 1. CR	Aspergilluspneumonie (Infiltrate)
57 / F	AML, FAB M2, 2. CR	Alter > 50 Jahre, Z.n. Pneumocystis carinii-Pneumonie
58 / F	AML, FAB M5, 2. CR	Alter > 50 Jahre
29 / F	AML, FAB M4, 1. Rezidiv	hepatolienale Candidiasis (Infiltrate)
39 / F	AML, FAB M4, 1. Rezidiv	Rezidiv nach KMT
22 / M	AML, 2. Rezidiv	Rezidiv nach KMT, Aspergillomverdacht (Infiltrat)
34 / F	AML, FAB M2, refraktär	Candida-krusei-Sepsis mit hepatolienaler Candidiasis und Pneumonie
59 / M	AML, FAB M2, refraktär	Alter > 50 Jahre
54 / F	sAML, FAB M5, 1. CR	Alter > 50 Jahre, KI < 80 %
50 / M	sAML, FAB M6, 1. CR	Z.n. Pilzpneumonie, KI < 80 %
45 / F	sAML, 2. CR	Rezidiv nach KMT, aktive Pneumonie (Infiltrate)
67 / M	sAML, FAB M2, 1. Rezidiv	Alter > 50 Jahre, Z.n. Pilzpneumonie, Z.n. Staph. haemolyticus Sepsis
58 / M	sAML, FAB M6, 2. Rezidiv	Alter > 50 Jahre, Z.n. Pilzpneumonie (Infiltrate)
47 / F	sAML, refraktär	Candida-Pneumonie (Infiltrate), persistierende Neutropenie, KI < 80 %
59 / F	sAML, FAB M1, refraktär	Alter > 50 Jahre, KI < 80 %, Lungenfibrose
48 / M	sAML, FAB M4, refraktär	rezidivierende chronische subdurale Hämatoome, KI < 80 %
43 / M	sAML, FAB M6, refraktär	Z.n. Pneumonie, KI < 80 %

M = Mann, F = Frau, ALL = akute lymphatische Leukämie, Ph+ = Philadelphia-Chromosom-positive ALL, c-ALL = common-ALL, T-ALL = T-lymphoblastische ALL, AML = akute myeloische Leukämie, sAML = sekundäre AML, Z.n. = Zustand nach, KI = Karnofsky-Index.

Die Zeitdauer von der Erstdiagnose bis zur NST betrug im Median 9,9 Monate (3,3 - 68,3 Monate); bei den 8 retransplantierten Patienten lagen im Median 16 Monate zwischen Erst- und Zweittransplantation (Spannweite 7 - 61 Monate).

3.4.2. Transplantation

Alle Patienten wurden von HLA-identischen Spendern transplantiert. 20 Patienten hatten einen verwandten (66 %), 10 Patienten einen unverwandten Spender (33 %). Eine Spender-Empfänger Geschlechtsdifferenz lag bei 12/30 Patienten vor.

Die Konditionierung bestand aus Fludarabin 30 mg/m² i.v. an den Tagen – 10 bis – 5 (Gesamtdosis 180 mg/m²), Busulfan 4 mg/kg p. os an den Tagen – 6 und – 5 (Gesamtdosis 8 mg/kg) sowie ATG (Fresenius) 10 mg/kg i.v. Tag – 4 bis – 1 (Gesamtdosis 40 mg/kg) [Slavin 1998] (Abbildung 3).

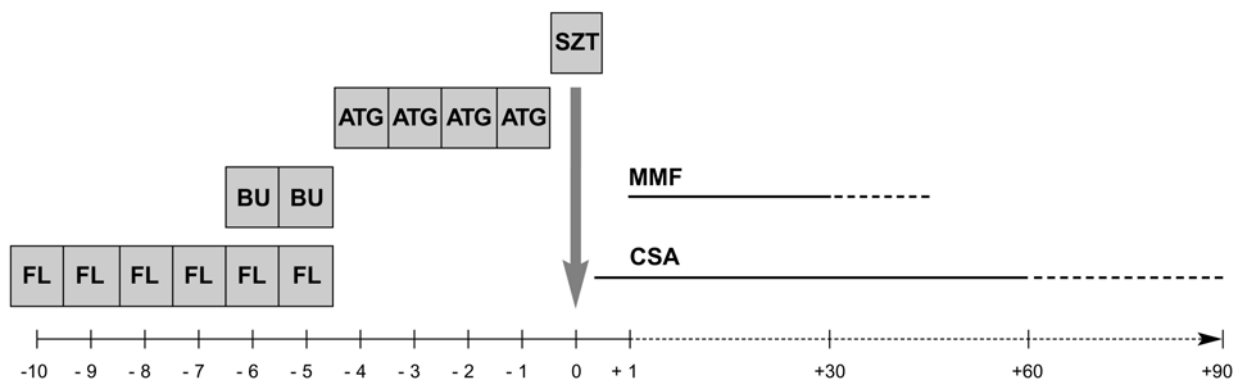


Abbildung 3. Dosisreduzierte Konditionierung.

SZT = Stammzelltransplantat, ATG = Antithymozytenglobulin, BU = Busulfan, FL = Fludarabin, CSA = Cyclosporin A, MMF = Mycophenolat mofetil.

Die Stammzellmobilisation erfolgte bei 27 Spendern mit G-CSF 2 x 5 µg/kg/Tag s.c. über 4 - 5 Tage. Die Stammzellapherese wurde über 1 - 2 Tage durchgeführt. Angestrebt wurde die Gewinnung von mindestens 4 x 10⁶ CD34-positiven Zellen/kg KG des Patienten. Von 3 Spendern wurde wegen Ablehnung der G-CSF-Gabe Knochenmark in Vollnarkose durch Beckenkammaspiration gewonnen. Die Apherese von CD3-positiven Lymphozyten bei verwandten Spendern und die Gewinnung von CD3-positiven Lymphozyten aus dem G-CSF mobilisierten Transplantat bei unverwandten Spendern sowie deren Portionierung wurde in Kapitel 3.3. beschrieben.

3.4.3. Prophylaxe und Therapie der GvHD

Als GvHD-Prophylaxe wurde anfänglich nur CSA mit initial 2 x 2,5 mg/kg/Tag i.v. ab Tag – 1 verwendet. CSA wurde bei Ausbleiben einer akuten GvHD ab Tag + 60 stufenweise abgesetzt. Wegen der im Verlauf der Studie häufig auftretenden GvHD, wurde die GvHD-Prophylaxe ab Patient Nr. 24 um MMF 3 x 1 g/Tag i.v. ab Tag 0 erweitert, das zwischen Tag + 30 und + 45 abgesetzt wurde, wenn keine GvHD aufgetreten war. CSA wurde bei diesen Patienten bis mindestens Tag + 90 gegeben.

Akute and chronische GvHD wurden histologisch gesichert und nach etablierten Kriterien evaluiert und klassifiziert [Glucksberg 1974, Shulman 1980, Przepiorka 1995]. Die akute GvHD wurde mit Hochdosis-Prednisolon von 2 mg/kg bis 1 g Methylprednisolon/Tag behandelt, eine steroidrefraktäre akute GvHD wurde mit 2 x 20 mg des monoklonalen Interleukin-2 Rezeptorantikörpers Basiliximab und/oder ATG 3 x 30 mg/kg behandelt [Massenkeil 2002]. Die chronische GvHD wurde mit CSA und Prednisolon behandelt; refraktäre Patienten erhielten MMF, Cyclophosphamid und extrakorporale Photopherese.

3.4.4. Prophylaxe und Therapie von Infektionen

Die selektive Darmdekontamination erfolgte mit Ciprofloxacin 2 x 500 mg/Tag und Amphotericin B 4 x 1 ml/Tag ab Konditionierung bis zur Rekonstitution der neutrophilen Granulozyten und Abheilung einer Stomatitis. Die Prophylaxe der *Pneumocystis carinii* Pneumonie (PCP) wurde mit Trimethoprim/ Sulfamethoxazol 3 x 960 mg/Woche p. os bis 6 Monate nach NST durchgeführt. Patienten mit chronischer GvHD erhielten eine PCP-Prophylaxe, solange sie immunsuppressiv behandelt wurden. Bei Kontraindikationen gegen Trimethoprim/ Sulfamethoxazol erhielten die Patienten Pentamidin per inhalationem, 3 x 300 mg zum Beginn der Konditionierung und dann alle 4 Wochen.

Die Herpes simplex Virus Prophylaxe erfolgte mit Aciclovir 3 x 5 mg/kg/Tag i.v. von Tag – 1 bis Tag + 30. Immunglobuline 10 g wurden an Tag 0 und dann alle 2 Wochen bis 3 Monate nach NST verabreicht, danach nur bei IgG-Werten < 5 g/l.

Bei Cytomegalovirus (CMV)-negativer Empfänger-Spenderkonstellation erhielten die Patienten CMV-negative Blutprodukte. Alle Patienten wurden mit gefilterten und bestrahlten Blutprodukten versorgt.

Eine Computertomographie (CT) wurde bei allen 17 Patienten mit einer Pneumonie oder systemischen Pilzinfektion vor NST angefertigt. Die CT-Untersuchung zeigte Lungeninfiltrate bei 9/17 und hepatolienale Infiltrate bei 2/17 Patienten (*Tabelle 3*). Diese 11 Patienten erhielten eine antimykotische Therapie mit verschiedenen Präparaten, die vom Beginn der Konditionierung bis zur Entlassung, zum Teil auch bis 6 Monate nach Entlassung in Abhängigkeit von den Befunden der radiologischen Verlaufsuntersuchungen verabreicht wurden.

Fieber wurde definiert als orale Temperatur > 38.3 °C oder zweimal > 38.0 °C innerhalb von 12 Stunden. Sepsis, Fieber unklarer Genese (fever of unknown origin, FUO) und Katheterassoziierte Infektionen wurden akzeptierten Leitlinien folgend beurteilt [ACCP / SCCM 1992, Mermel 2001, Hughes 2002].

Patienten, die nicht innerhalb von 72 Stunden entfieberten, bei denen klinisch oder im konventionellen Röntgen-Thorax ein Pneumonieverdacht vorlag oder die eine Pneumonie in der Anamnese hatten, erhielten ein Spiral-CT der Lunge. Die antibiotische Erstlinientherapie bestand aus Breitspektrum-beta-Lactamantibiotika, im Ausnahmefall kombiniert mit Aminoglykosiden; Patienten mit Haut- oder Katheterinfektionen oder Nachweis von Staphylokokken erhielten zusätzlich ein Glykopeptid. Die Zweitlinientherapie bestand aus einem Carbapenem und eventuell einem Glykopeptid. Antimykotika wurden bei persistierendem Fieber oder Lungeninfiltraten zusätzlich verabreicht.

Der CMV-Serostatus von Empfänger und Spender wurde vor NST festgestellt. Wöchentliche Testungen auf CMV-DNA und -Antigen pp65 wurden bis zur Entlassung sowie an Tag + 90, + 180 und + 360 durchgeführt, zusätzliche Untersuchungen erfolgten bei stattgehabter CMV-Infektion unter antiviraler Therapie und bei klinischem Verdacht auf eine CMV-Infektion. Eine präemptive Therapie [Ljungman 2002] mit Ganciclovir wurde bei zwei aufeinander folgenden CMV-DNA-Nachweisen oder einmaligem CMV-Antigennachweis eingeleitet und bis zu zwei negativen Testresultaten fortgeführt.

3.4.5. Anwachsen des Transplantates und Remissionskontrolle

Nach NST erhielten alle Patienten ab Tag 5 G-CSF 5 µg/kg/Tag zur Verkürzung der Neutropeniezeit bis die Leukozytenzahlen stabil > 2,0/nl waren. Das Anwachsen des Transplantates wurde definiert als der Zeitpunkt, an dem die neutrophilen Granulozyten > 0,5/nl und Thrombozyten > 20/nl ohne Thrombozytenkonzentratgabe über 3 Tage lagen. Knochenmarkpunktionen zur Krankheitsbeurteilung wurden vor NST, nach 2 Wochen, 1, 3, 6 und 12 Monaten durchgeführt. Die Chimärismusanalysen aus peripherem Blut und Knochenmark erfolgten wie in Kapitel 3.2. beschrieben.

3.5. Retrospektive Fall-Kontrollstudie

Zur Evaluation des Stellenwertes der NST bei Patienten mit Hochrisikoleukämien im Vergleich zur Standardtransplantation führten wir eine kontrollierte Fall-Kontrollstudie durch. Dabei wurde auch die Chimärismuskinetik der Leukozytensubpopulationen soweit vorliegend analysiert.

3.5.1. Patientenselektion und Matching-Kriterien

Fünfundzwanzig konsekutive Patienten mit Hochrisiko-ALL oder AML [Gökbuget 2000, Visani 2001], die zwischen August 1998 und Juni 2002 eine NST erhalten hatten (siehe Kapitel 3.4.) und eine ausreichende Nachbeobachtungszeit hatten, wurden in die retrospektive Analyse als Fallpatienten eingeschlossen. Kontraindikationen gegen eine Standardtransplantation waren: schwere aktive oder residuelle pilzverdächtige Infektionen bei 10/25 Patienten, Alter über 50 Jahre bei 7/25 Patienten, Rezidive nach allogener Standardtransplantation bei 6/25 Patienten, intensive zytostatische Vorbehandlung bei 1/25 Patienten und wiederholte subdurale Hämatome bei 1/25 Patienten. 11/25 Patienten hatten mehr als 1 Kontraindikation gegen eine Standardtransplantation.

Durch 1:2 Zuordnung wurden den 25 Fallpatienten 50 Kontrollpatienten zugeordnet, die ebenfalls eine Hochrisiko-ALL oder –AML hatten und eine myeloablative Stammzelltransplantation erhalten hatten. Matching-Kriterien für die Zuordnung von Fällen und Kontrollen waren: Diagnose (ALL oder AML), Stadium der Erkrankung (1. CR oder keine 1. CR), Spendertyp (HLA-identischer verwandter oder unverwandter Spender) und Alter bei Transplantation. Da fortgeschrittenes Alter eine Indikation für die NST darstellte, waren diese Patienten im Median 6 Jahre älter als die Kontrollpatienten (n.s.).

3.5.2. Transplantation

50 Patienten hatten einen HLA-identischen verwandten und 25 Patienten einen HLA-identischen unverwandten Spender. Eine Spender-Empfänger-Geschlechtsdifferenz lag bei 9/25 NST-Patienten (36 %) und 21/50 Standardtransplantations-Patienten (43 %) vor (n.s.) (*Tabelle 4*).

Tabelle 4. Charakteristika von 75 Patienten der retrospektiven Fall-Kontrollstudie.

	NST	Standard SZT	p-Wert
n	25	50	
Diagnose			n.s.
ALL	9 (36 %)	18 (36 %)	
AML	16 (64 %)	32 (64 %)	
Geschlecht			n.s.
männlich	16 (64 %)	26 (52 %)	
weiblich	9 (36 %)	24 (48 %)	
Alter Median (Spannweite)	44 (19-67) Jahre	38 (17-57) Jahre	n.s.
< 35 Jahre	9 (36 %)	21 (42 %)	
35- 49 Jahre	7 (28 %)	22 (44 %)	
≥ 50 Jahre	9 (36 %)	7 (14 %)	
Krankheitsstadium			n.s.
1. CR	7 (28 %)	18 (36 %)	
> 1. CR	18 (72 %)	32 (64 %)	
Karyotyp (n=68)			n.s.
Standardrisiko	10 (43 %)	19 (42 %)	
Hochrisiko	13 (57 %)	26 (58 %)	
Spender			n.s.
verwandt	17 (68 %)	33 (66 %)	
unverwandt	8 (32 %)	17 (34 %)	
Alter Median (Spannweite)	37 (17-67) Jahre	38 (18-76) Jahre	n.s.
Stammzellquelle			n.s.
Knochenmark	3 (12 %)	17 (34 %)	
peripheres Blut	22 (88 %)	33 (66 %)	

ALL = akute lymphatische Leukämie, AML = akute myeloische Leukämie, CR = komplette Remission.

Die nichtmyeloablative Konditionierung für die 25 Fallpatienten erfolgte mit Fludarabin, Busulfan und ATG wie in Kapitel 3.4. beschrieben. Kontrollpatienten erhielten eine fraktionierte totale Ganzkörperbestrahlung mit 2 x 2 Gy von Tag – 6 bis Tag – 4 (Gesamtdosis 12 Gy) und Cyclophosphamid 60 mg/kg, Tag – 3 und – 2 (Gesamtdosis 120 mg/kg) (n = 36) oder Etoposid 50 mg/kg, Tag – 3 (n = 2) bzw. Etoposid 50 mg/kg Tag - 3 und Cyclophosphamid 100 mg/kg an Tag – 4 (n = 12).

Leukapherese, Stammzellmobilisation und Stammzellapherese erfolgten wie in Kapitel 3.3. und 3.4. beschrieben. Knochenmark wurde bei 20 Patienten als Stammzellquelle verwendet und mobilisierte periphere Stammzellen bei 55 Patienten. Mobilisierte periphere Blutstammzellen wurden häufiger bei der NST als Stammzellquelle verwendet als bei der Standardtransplantation (p = 0,054), da mehrere standardtransplantierte Patienten ihre Transplantation schon 1997 oder in der

ersten Hälfte des Jahres 1998 erhalten hatten, und zu dieser Zeit Knochenmarkentnahmen noch häufiger durchgeführt wurden. Die Patienten wurden ausgewählt, um ein gutes Matching der aufgeführten Kriterien zu erzielen.

3.5.3. Prophylaxe und Therapie der GvHD

Die GvHD-Prophylaxe nach NST erfolgte mit CSA oder CSA und MMF wie in Kapitel 3.4.3. beschrieben. Kontrollpatienten mit verwandtem Spender erhielten nach Standardtransplantation CSA bis Tag + 150 - 180 sowie MTX i.v., Tag + 1, + 3, + 6 und + 11. Nach unverwandter Transplantation erhielten die Patienten CSA, MTX und Prednisolon, letzteres wurde ab Tag + 28 stufenweise abgesetzt. Wenn Etoposid Bestandteil der Konditionierung war, wurde Prednisolon statt MTX gegeben. Die Klassifikation der akuten wie der chronischen GvHD erfolgte nach etablierten Kriterien [Glucksberg 1974, Shulman 1980, Przepiorka 1995]. Die Therapie der akuten und chronischen GvHD war in beiden Gruppen gleich und wurde in Kapitel 3.4.3. beschrieben.

3.5.4. Prophylaxe und Therapie von Infektionen

Die Prinzipien der Infektionsprophylaxe, Infektionsüberwachung, Diagnostik und antiinfektiösen Therapie waren in beiden Gruppen gleich und wurden in Kapitel 3.4.4. ausführlich beschrieben. Aus statistischen Gründen einer ausreichenden Fallzahl wurden Sepsis, invasive Pilzinfektionen und andere Pneumonien in der Fall-Kontrollstudie gemeinsam als schwere Infektionen vor oder nach SZT analysiert.

3.5.5. Anwachsen des Transplantates und Remissionskontrolle

Ab Tag + 5 nach Transplantation erhielten alle nichtmyeloablativ stammzelltransplantierten Patienten und nach Standardtransplantation alle von einem unverwandten Spender transplantierten Patienten G-CSF in einer Dosis von 5 µg/kg/Tag bis zu stabilen Leukozytenwerten > 2,0/nl. Die Beurteilung des Transplantatanwachsens und der Remission wurde in Kapitel 3.4.5. beschrieben. Die Chimärismusanalysen aus peripherem Blut und Knochenmark erfolgten wie in Kapitel 3.2. beschrieben.

3.6. Nichtmyeloablative Stammzelltransplantation bei metastasierten Nierenzellkarzinomen

NST bei metastasierten Nierenzellkarzinomen werden in einer gemeinsamen Studie mit der Klinik für Urologie der Charité seit Dezember 2000 nach Erteilung der Votums der Ethikkommission der Charité durchgeführt. Nach Aufklärung erteilten alle Patienten ihre schriftliche Einwilligung.

3.6.1. Patientenselektion und Charakteristika stammzelltransplanteder Patienten

Zwischen Dezember 2000 und Juni 2003 wurden insgesamt 29 Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen als Kandidaten für eine NST interdisziplinär evaluiert. Folgende Ein- und Ausschlusskriterien galten für die Studie:

Einschlusskriterien

- Metastasiertes Nierenzellkarzinom nach Tumornephrektomie
- messbare Metastasen
- kein Ansprechen auf eine Interferon-haltige Immuntherapie
- Lebenserwartung > 6 Monate
- Alter 18 - 65 Jahre (biologisches Alter)
- HLA-identischer Geschwister- (oder Fremd-)spender
- Aufklärung über den experimentellen Charakter der Therapie
- schriftliche Einwilligung in die Studie

Ausschlusskriterien

- ausschließlich ossäre Metastasen
- ZNS-Metastasen
- Zustand nach Organtransplantation
- schwere und chronische virale Infektionen
- schwere internistische Begleiterkrankungen
- manifestes Zweitmalignom
- Schwangerschaft oder Stillzeit
- letzte Therapie des Nierenzellkarzinoms vor weniger als 8 Wochen

Der Primärtumor war bei allen 29 Patienten operativ entfernt worden, unabhängig davon, ob zum Operationszeitpunkt ein lokal begrenztes oder ein metastasiertes Tumorstadium vorlag. Die mediane Zeit von der Primärdiagnose bis zum Auftreten von Fernmetastasen betrug 2 Jahre. Alle Patienten hatten einen oder mehrere Zyklen Chemoimmuntherapie erhalten, die aus hochdosiertem Interleukin-2 s.c. und Interferon alpha s.c. bestand, kombiniert mit 5-Fluorouracil i.v. und/oder 13-cis-Retinolsäure [Roigas 2003]. Die niedrig auflösende HLA-Klasse I- und hochauflösende Klasse II-Typisierung identifizierte einen HLA-kompatiblen Spender bei 13/29 unter-

suchten Patienten; ein unverwandter Spender wurde bei einem 25-jährigen Patienten gefunden (Tabelle 5). 15/29 Patienten hatten keinen HLA-kompatiblen Spender.

Tabelle 5. Charakteristika von 29 evaluierten Patienten mit refraktären Nierenzellkarzinomen bei Studieneinschluss.

	Spender vorhanden	Kein Spender vorhanden
n	14	15
Alter Median (Spannweite)	53 (25-66) Jahre	58 (53-68) Jahre
Geschlecht		
männlich	12	12
weiblich	2	3
Ansprechen auf die Immuntherapie		
CR	0	1
PR	1	1
SD	7	7
PD	6	6

CR = komplette Remission, PR = partielle Remission, SD = stabile Erkrankung, PD = progrediente Erkrankung.

Sieben der 14 Patienten mit einem HLA-kompatiblen Spender wurden nicht allogenen stammzell-transplantiert wegen sehr rascher Tumorprogression (n = 5), medizinischer Kontraindikation des Spenders (n = 1) und sekundärer Therapieablehnung (n = 1).

Eine NST wurde zwischen Juni 2001 und März 2003 bei 7/29 als transplantabel beurteilten Patienten (24 %) durchgeführt. Das mediane Alter der Patienten betrug 58 Jahre (25-64 Jahre). Drei von 7 Patienten hatten ein primär metastasiertes Nierenzellkarzinom, bei den anderen 4 Patienten lagen zwischen Primärdiagnose und Auftreten von Metastasen 1 - 5 Jahre. 5 Patienten hatten ein klarzelliges und 2 ein papilläres bzw. tubulo-papilläres Nierenzellkarzinom. Zusätzlich zur Tumornephrektomie hatten die Patienten Operationen resezierbarer Metastasen, Immuntherapien, Chemotherapien und Lasertherapien bei symptomatischer metastasierter Tumorerkrankung erhalten (Tabelle 6). Zwischen Auftreten der Metastasen und der NST lagen 9 bis 155 Monate (im Median 19 Monate). Alle Patienten hatten ihre schriftliche Einwilligung nach Aufklärung über den experimentellen Charakter der Therapie erteilt.

Tabelle 6. Charakteristika von 7 Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen vor NST.

Pat	Alter/Geschlecht	Metastasenlokalisierung	Vortherapien	Spender
1	63 / M	Lunge, Leber, Lymphknoten	4 x Op, IMT, CHT, LITT	Schwester
2	63 / M	Niere, Lunge, Lymphknoten, Knochen	2 x Op, IMT, RT	Schwester
3	50 / M	Niere, Lunge	1 x Op, IMT	Bruder
4	58 / M	Lunge, Pleura, Lymphknoten	1 x Op, IMT	Schwester
5	50 / F	Lunge	IMT, CHT	Schwester
6	64 / F	Lunge	IMT, CHT	Bruder
7	25 / M	Lymphknoten, Knochen	IMT, RT, CHT	Fremdspender

M = Mann, F = Frau, Op = Operation, IMT = Immuntherapie, LITT = Laser induzierte Thermotherapie, RT = Bestrahlung.

3.6.2. Transplantation

Alle Patienten wurden von HLA-identischen verwandten (n = 6) oder unverwandten (n = 1) Spendern transplantiert. Die Konditionierung bestand aus Cyclophosphamid 60 mg/kg KG i.v., Tag – 7 und – 6 (Gesamtdosis 120 mg/kg), Fludarabin 25 mg/m² i.v., Tag – 5 bis – 1 (Gesamtdosis 125 mg/m²) und ATG (Fresenius) 10 mg/kg i.v., Tag – 3 bis - 1 (Gesamtdosis 30 mg/kg KG) [Childs 2000]. Vor Beginn der Stammzellmobilisation wurden von den Spendern Lymphozyten für eine spätere adoptive Immuntherapie gewonnen und portioniert wie beschrieben (siehe Kapitel 3.3.). Als Stammzellquelle wurden ausschließlich mobilisierte periphere Blutstammzellen eingesetzt. Die Stammzellmobilisation und –apherese erfolgte wie in Kapitel 3.3. und 3.4.2. beschrieben.

3.6.3. Prophylaxe und Therapie der GvHD

Die GvHD-Prophylaxe bestand aus CSA und wurde stufenweise nach 6 - 8 Wochen reduziert, falls keine GvHD aufgetreten war. Nach Fremdspendertransplantation wurde zusätzlich MMF bis Tag + 28 verabreicht. Die Klassifikation und Therapie der GvHD erfolgte wie beschrieben (Kapitel 3.4.3).

3.6.4. Prophylaxe und Therapie von Infektionen

Infektionsprophylaxe, Überwachung, Diagnostik und antimikrobielle Therapie entsprachen den klinikinternen Standards für die allogene SZT bei hämatologischen Systemerkrankungen und wurden ausführlich in Kapitel 3.4.4. dargestellt.

3.6.5. Anwachsen des Transplantates, Spenderlymphozyten und Tumornachsorge

Die Verabreichung von DLI erfolgte wie in 3.3. beschrieben ab Tag + 60, wenn sich keine GvHD nach Absetzen von CSA und MMF entwickelt hatte und ein gemischter Chimärismus vorlag. Die erste Dosis enthielt 5×10^6 CD3-positive Zellen/kg KG. Chimärismusuntersuchungen aus dem peripheren Blut zur Kontrolle des Anwachsens des Transplantates wurden nach 2 Wochen, monatlich bis 6 Monate, zwei- bis dreimonatlich bis 1 Jahr und dann alle 3 Monate nach NST durchgeführt wie in Kapitel 3.2. beschrieben. Die Tumorevaluation erfolgte vor Transplantation klinisch und durch CT von Thorax und/oder Abdomen und wurde in dreimonatlichen Abständen nach NST wiederholt.

3.7. Statistische Auswertung

Die berechneten Resultate der deskriptiven Statistik werden mit Median und Spannweite (range) angegeben. Wegen der begrenzten Patientenzahl und nicht normal verteilten Variablen (skew distributions) bei den jeweiligen Fragestellungen wurden statistische Vergleiche stets mit nicht-parametrischen Tests analysiert (Mann-Whitney-U Test für zwei unabhängige Gruppen). Überlebensdaten bezüglich transplantationsassoziiierter Mortalität (TRM), erkrankungsfreiem Überleben (EFS) und Gesamt-Überleben wurden nach Kaplan-Meier [Kaplan 1958] analysiert und univariat mit dem Log-Rang Test [Kalbfleisch 1980] auf Unterschiedlichkeit in Bezug auf wichtige Einflussgrößen geprüft. Mit Hilfe dieser Analysen wurden zusätzlich mediane Überlebenszeiten mit 95%-Konfidenzintervall (C.I.) ermittelt. Voraussetzung für den statistischen Vergleich zweier Überlebenskurven ist eine in beiden Vergleichsarmen gleichverlaufende Zensierung. Das wurde mit Hilfe der Follow-up-Maturity [Parmar 1996] als Maß für statistisch vergleichbare Nachbeobachtungszeiten in zwei unabhängigen Gruppen [Schemper 1996] geprüft. Die statistische Relation zwischen Konditionierungsregimen sowie hämatopoetischer Rekonstitution, Chimärismusanalyse, akuter und chronischer GvHD und Infektionen nach Stammzelltransplantation wurden mit dem exakten Fisher-Test und dem Chi-Quadrat-Test (χ^2) berechnet. Eine multivariate Cox' Regressionsanalyse für proportionale Hazards [Cox 1972] wurde durchgeführt, um den prognostischen Einfluss der Konditionierung, der Diagnose, des Krankheitsstadiums, des Patientenalters, der Spenderherkunft, der zytogenetischen Risikogruppe, der akuten und chronischen GvHD, des Chimärismusstatus und schwerer Infektionen auf die TRM, das EFS und das Gesamt-Überleben multivariat zu bestimmen. Die statistische Analyse wurde mit SPSS 11.0 (Statistical Package for the Social Science) durchgeführt. Alle Signifikanzen wurden zweiseitig bezüglich $p < 0,05$ festgelegt. Die statistische Beratung erfolgte durch Professor Dr. Klaus-Dieter Wernecke, Institut für Medizinische Biometrie der Charité.

4. Ergebnisse

4.1. Chimärismusanalyse

Die STR-Analyse ermittelte bei allen 155 untersuchten Patienten ein informatives Empfänger- und Spenderprofil vor Transplantation. Bei 3,5 % der Untersuchungen nach Transplantation konnte in der STR-Analyse der Leukozytensubpopulationen kein eindeutiges Empfänger- oder Spenderprofil festgestellt werden, dies betraf Untersuchungen an Tag + 14 mit sehr geringer Zahl untersuchter Zellen. Zu späteren Zeitpunkten ergab die Chimärismusanalyse bei diesen Patienten ein informatives Profil mit Zuordnung von Empfänger- und Spendermerkmalen.

Die Chimärismusanalyse der CD34-positiven Zellen aus dem Knochenmark zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der Spenderzellen, beginnend mit im Median 82 % Spenderzellanteil an Tag + 14; 100 % Spenderzellen im Median wurden erst nach 3 Jahren erreicht. Die Analyse der Leukozyten-Subpopulationen aus dem peripheren Blut ergab dagegen meist an Tag + 14, spätestens an Tag + 28 einen Median von 100 % Spenderzellen mit einer Spannweite von 0-100 %. Aussagekräftiger erwies sich die Untersuchung der Quartilen und Auswertung in Abhängigkeit von der Konditionierung (siehe Kapitel 4.4.3.).

Ab Tag + 28 konnten durch die CD34-Analyse im Knochenmark anhand der statistischen Ausreißer unterhalb der untersten Quartile 18/20 Patienten mit bereits diagnostiziertem oder bis zu einem Jahr später eintretendem Rezidiv diagnostiziert werden (*Abbildung 4*). Die Ausreißer bei der CD3-Untersuchung ließen sich ab Tag + 60 ausnahmslos bereits eingetretenen oder später diagnostizierten Rezidiven zuordnen.

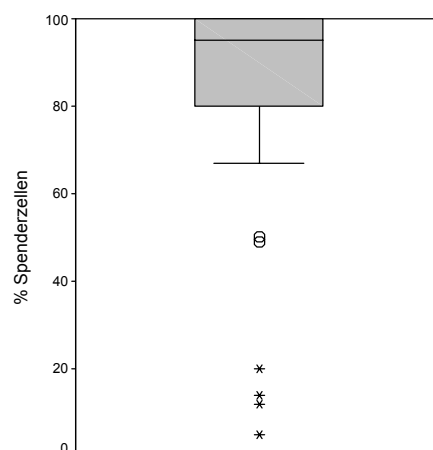


Abbildung 4 Chimärismusanalyse CD34-positiver Zellen im Knochenmark an Tag + 60.

Box-Plot mit Median, Quartilen und Ausreißern (unterhalb der untersten Quartile).

Die Analyse des Chimärismus in Leukozytensubpopulationen des Blutes und im Knochenmark war wesentlich sensitiver als die Chimärismusanalyse des unseparierten Blutes oder Knochenmarks, diese wurde daraufhin nach einer Probephase nicht mehr durchgeführt. Ein MC wurde häufiger in lymphatischen (CD3, CD4, CD8) als in myeloischen Zellen (CD14) nachgewiesen, unabhängig davon, ob es sich um eine lymphatische oder myeloische Erkrankung handelte. Die weitere Analyse der Chimärismusdaten findet sich im folgenden Kapitel Spenderlymphozyteninfusionen und der Auswertung der NST (Kapitel 4.3.3.) sowie der Fall-Kontrollstudie (Kapitel 4.4.3.).

4.2. Spenderlymphozyteninfusionen

55 auswertbare Patienten der Gesamtpopulation von 155 Patienten (35 %) erhielten insgesamt 118 DLI nach allogener Stammzelltransplantation.

DLI wurden bei 38/121 Patienten (31 %) nach Standardtransplantation und bei 17/34 Patienten (50 %) nach NST appliziert. 22 dieser 55 Patienten (40 %) hatten eine kontrollierte Erkrankung vor Transplantation und 33/55 (60 %) hatten ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium bei Transplantation (*Tabelle 7*). Im Median wurden 2 DLI pro Patient gegeben (1 - 7/Patient); bis auf 1 Patienten, der 7 DLI erhielt, wurden maximal 4 DLI verabreicht. Die kumulative Zellzahl betrug $5,25 \times 10^7$ CD3-positive Zellen/kg KG (0,5 - 39,6). Die erste DLI wurde im Median an Tag + 93 verabreicht. Die große Spannweite wurde durch 2 Patienten mit AML bedingt, die wegen eines Spätrezidivs ihre 1. DLI an Tag + 660 bzw. Tag + 735 erhielten.

Tabelle 7. Zeitpunkt und Zellzahl der verabreichten DLI.

DLI	Patienten	Zeitpunkt der DLI (Tage)	CD3-positive Zellen
	n	Median (Spannweite)	(10^7 / kg KG)
1. DLI	55	93 (29 - 735)	1,0 (0,05 - 16,5)
2. DLI	34	129 (87 - 749)	4,8 (1,0 - 13,0)
3. DLI	22	185 (127 - 770)	6,4 (1,0 - 10,0)
4. DLI	5	246 (198 - 543)	5,6 (0,5 - 10,0)

n = Zahl der Patienten, Zeitpunkt der DLI in Tagen nach NST

Die Gabe von Spenderlymphozyteninfusionen erfolgte

1. prophylaktisch bei 38 Patienten: 14 Patienten mit Hochrisiko-ALL (n = 1) oder AML (n = 13) nach NST, und 24 Patienten nach Standardtransplantation mit Ph+ ALL oder ALL jenseits einer 1. CR (n = 21) bei Transplantation (Höchstrisiko bzw. Hochrisiko-ALL nach dem

multizentrischen deutschen GM-ALL-Protokoll [Gökbuget 2000]), 2 Patienten mit AML und 1 Patient mit CML mit neu diagnostiziertem MC nach Transplantation.

2. therapeutisch bei 16 Patienten im frühen Rezidiv mit ALL (n = 4), AML (n = 7) und CML (n = 5).

1 Patient mit einer CML wurde wegen eines Posttransplantationslymphoms (PTLD) 3 Monate nach Standardtransplantation mit DLI behandelt (*Tabelle 8*).

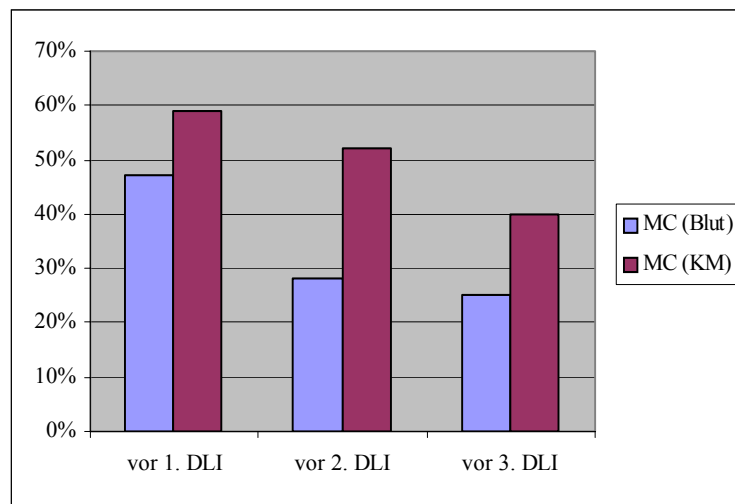
Tabelle 8. Zugrundeliegende Erkrankung, Konditionierung und Indikation zur DLI bei 55 Patienten.

Diagnose	Patienten	Konditionierung		Indikation zur DLI	
		<i>Standard</i>	<i>NST</i>	<i>prophylaktisch</i>	<i>therapeutisch</i>
ALL	26	23	3	22: 21 Standard, 1 NST	4: 2 Standard, 2 NST
AML	22	8	14	15: 2 Standard, 13 NST	7: 6 Standard, 1 NST
CML	7*	7		1 Standard	5 Standard

ALL = akute lymphatische Leukämie, AML = akute myeloische Leukämie, CML = chronische myeloische Leukämie, * 1 Patient erhielt DLI wegen eines PTLD (siehe Text), NST = nichtmyeloablative Stammzelltransplantation, Standard = Standardtransplantation

4.2.1. Chimärismus und Rezidive nach Spenderlymphozyteninfusionen

Vierundzwanzig von 55 Patienten hatten einen MC vor 1. DLI in Blut oder Knochenmark. Die Chimärismusanalyse vor und nach den ersten 3 DLI (nur 5 Patienten hatten ≥ 4 DLI) zeigte eine statistisch signifikante Abnahme der Patienten mit MC sowohl in den Untersuchungen aus dem peripheren Blut als auch in denjenigen aus dem Knochenmark (*Abbildung 5*).



	1. DLI versus 2. DLI	2. DLI versus 3. DLI
Blut	p < 0,001	p = 0,005
Knochenmark	p = 0,018	p = 0,015

Abbildung 5. Chimärismusstatus vor Spenderlymphozyteninfusionen.

Anteil von Patienten mit gemischtem Chimärismus vor 1. - 3. DLI in %, DLI = Spenderlymphozyteninfusionen, MC = gemischter Chimärismus.

Da der Nachweis eines MC in Leukozytensubpopulationen noch keine Aussage über das Vorliegen eines Rezidivs erlaubt, erfolgte eine Analyse des weiteren Krankheitsverlaufes der Patienten mit MC zu den Messzeitpunkten vor 1. DLI. Ein MC ohne Rezidiv lag bei 17/24 Patienten (71 %) im Blut und bei 14/24 Patienten (58 %) im Knochenmark vor 1. DLI vor (*Tabelle 9*).

Tabelle 9. Chimärismusstatus im Vergleich zum Krankheitsstatus vor 1. DLI.

	CC (Blut)	MC (Blut)	Gesamt	CC (KM)	MC (KM)	Gesamt
Kein Rezidiv	23	17	40	16	14	30
Rezidiv	4	7	11	1	10	11
Gesamt	27	24	51	17	24	41

CC = kompletter Chimärismus, MC = gemischter Chimärismus, KM = Knochenmark

16/24 Patienten (66 %) konvertierten nach DLI in einen CC, 13/16 unter dem klinischen Bild einer GvHD. 14 dieser 16 Patienten sind in anhaltender CR, 2/16 Patienten entwickelten trotz chronischer GvHD ein Rezidiv 20 bzw. 22 Monate nach Transplantation. Eine Chimärismuskonversion durch DLI gelang damit bei zwei Drittel der Patienten mit gemischtem Chimärismus ohne Rezidiv. 5/24 hatten auch bei Folgeuntersuchungen nach DLI noch einen MC und rezidierten bis zu 1 Jahr später; 1 weiterer Patient entwickelte ein Transplantatversagen und 2 verstarben an schwerer GvHD und Infektionen.

4/27 Patienten (15 %) hatten vor der 1. DLI ein im Knochenmark diagnostiziertes Rezidiv, im peripheren Blut jedoch noch einen kompletten Spenderchimärismus; keiner dieser Patienten hatte zum Messzeitpunkt eine leukämische Ausschwemmung, ein MC im Blut trat erst bei Krankheitsprogression auf. Lediglich 1 Patient mit nachgewiesenem Rezidiv hatte auch in der Chimärismusanalyse des Knochenmarks einen CC, es handelte sich um eine Patientin mit molekularbiologischem Rezidiv einer CML in der nested-PCR. Wegen der höheren Sensitivität der PCR wurde dieses Rezidiv nicht in der Chimärismusanalyse entdeckt. Nach DLI entwickelte sich bei dieser Patientin wieder eine stabile CR.

Das Überleben nach DLI hing entscheidend vom aktuellen Stadium der hämatologischen Grunderkrankung und damit der Indikation für die Spenderlymphozytengabe ab: Bei prophylaktischer Gabe in CR überlebten 24/38 Patienten (63 %) rezidivfrei. Das erkrankungsfreie Überleben nach 2 Jahren in dieser Gruppe betrug 74 %. Von 16 Patienten, die DLI erst nach Diagnose eines Rezidivs erhielten, verstarben 13 Patienten (81 %) an der malignen Grunderkrankung. Die 3 Überlebenden hatten eine CML. 1 Patient verstarb 7 Tage nach DLI an progredienter PTLD. Das erkrankungsfreie 2-Jahres-Überleben nach therapeutische DLI-Gabe lag bei 13 % ($p < 0,001$).

4.2.2. Toxizität der Spenderlymphozyteninfusionen

DLI wurden bei 54 Patienten komplikationslos infundiert, 1 Patientin erlitt trotz Prämedikation unmittelbar nach DLI einen Krampfanfall infolge kurzer Asystolie, der folgenlos blieb.

Zum Zeitpunkt der 1. DLI hatte kein Patient eine klinisch oder laborchemisch manifeste GvHD. Nach DLI trat innerhalb von 7 - 28 Tagen eine GvHD bei 37/55 Patienten (67 %) auf, 24/37 Patienten entwickelten die GvHD schon nach der 1. DLI. Da die 1. DLI im Median an Tag + 93 gegeben wurde, trat die GvHD in 18/37 Fällen erst nach Tag + 100 auf. Die Manifestation der späten GvHD nach DLI zeigte klinisch sowohl die typischen Symptome einer chronischen GvHD mit Xerophthalmie und Xerostomie als auch Zeichen einer akuten Darm-GvHD mit blutigen Diarrhoen.

Patienten, die nach DLI eine GvHD entwickelten, hatten ihre 1. Gabe 22 Tage früher als diejenigen Patienten erhalten, die keine GvHD entwickelten, der Unterschied war aber nicht statistisch signifikant ($p = 0,178$). Nach NST entwickelten 15/17 Patienten (88 %) im Anschluss an die DLI-Gabe eine GvHD verglichen mit 22/38 Patienten (58 %) nach Standardtransplantation ($p = 0,027$). Nichtmyeloablativ konditionierte Patienten hatten die 1. DLI im Median an Tag + 86 (34 - 189 Tage) erhalten, myeloablativ konditionierte dagegen erst an Tag + 109 (29 - 735 Tage) ($p = 0,063$). Der Chimärismusstatus vor 1. DLI hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Auftreten einer GvHD nach DLI ($p = 0,095$).

Zugrundeliegende Erkrankung, Krankheitsstadium und Spender hatten keinen Einfluss auf das Auftreten einer GvHD nach DLI. Die Stammzellquelle als Einflussfaktor konnte wegen geringer Fallzahl von knochenmarktransplantierten Patienten, die DLI erhielten, nicht ausgewertet werden. Nur 1 Patient entwickelte eine protrahierte Leuko- und Thrombopenie nach prophylaktischer DLI-Gabe bei MC in Blut und Knochenmark.

4.3. Nichtmyeloablative Stammzelltransplantation bei akuten Leukämien

Der Stichtag der Auswertung und Endpunkt der Nachbeobachtungszeit war der 30.09.2003.

4.3.1. Hämatopoetische Rekonstitution

Die Patienten wurden mit $4,1 \times 10^6$ CD34-positiven Zellen/kg KG im Median transplantiert (2,1 - 19,8 CD34-positive Zellen). 27/30 Patienten (90 %) hatten ein Anwachsen des Transplantates nach NST. Ein Patient hatte ein Transplantatversagen und wurde erfolgreich retransplantiert von einem anderen Spender. Zwei Patienten hatten eine refraktäre Leukämie nach NST, bei beiden war die NST im Rezidiv nach Standardtransplantation durchgeführt worden. Die mediane Zeit bis zu stabilen neutrophilen Granulozyten $> 0,5/\text{nl}$ betrug im Median 11 Tage (9 - 31 Tage) und bis zur Erholung der Thrombozyten $> 20/\text{nl}$ 15 Tage (0 - 42 Tage) (Abbildung 6). Im Median erhielten die Patienten 10 Erythrozytenkonzentrate (4 - 22) und 9 Einzelspender-Thrombozytenkonzentrate (0 - 23). Von 18 Patienten mit unkontrollierter Erkrankung erreichten 15 Patienten (83 %) eine CR nach NST.

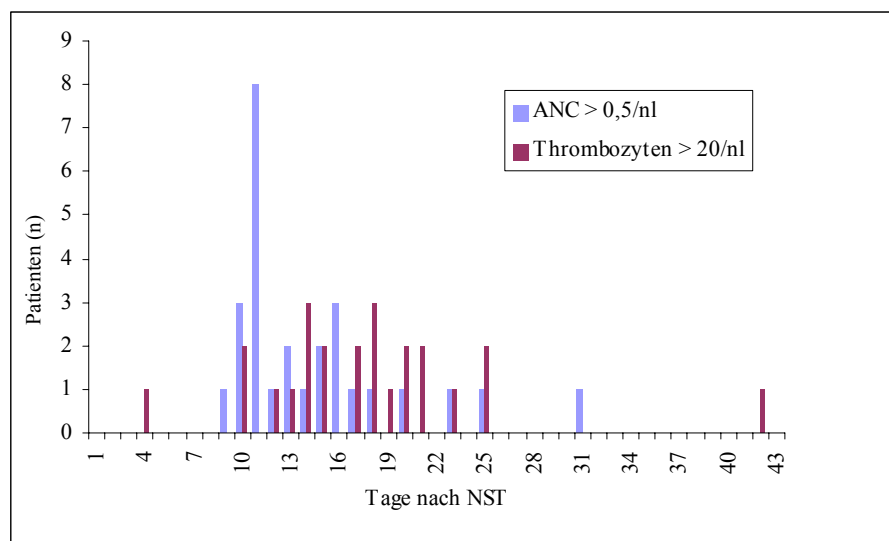


Abbildung 6. Hämatopoetische Rekonstitution nach NST.

ANC = absolute Zahl neutrophiler Granulozyten.

4.3.2. Transplantationsassoziierte Komplikationen

Konditionierungstoxizität

Eine Mukositis $> \text{II}^\circ$ (Bearman-Score) wurde nur bei 7/30 Patienten (23 %) beobachtet, 5 Patienten brauchten zeitweise eine volle parenterale Ernährung. 2 Patienten erlitten nach Busulfan einen zerebralen Krampfanfall trotz antikonvulsiver Prophylaxe. Eine Serumerkrankung und eine

systemische Entzündungsreaktion (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) wurde trotz antiallergischer Prämedikation bei 1 bzw. 2 Patienten unter ATG diagnostiziert. Keiner der 30 Patienten entwickelte eine Venenverschlusskrankheit der Leber (veno-occlusive disease, VOD).

Akute und chronische GvHD

Eine akute GvHD trat bei 15/30 Patienten (50 %) auf, 9 dieser Patienten (30 %) hatten eine schwere akute GvHD (Grad III-IV). Zehn von 15 Patienten mit akuter GvHD hatten diese nach DLI entwickelt. Alle 12 Patienten mit akuter GvHD > I.° wurden mit CSA und Prednisolon behandelt. Nach Erweitern der GvHD-Prophylaxe um MMF entwickelte nur 1/7 Patienten eine akute GvHD.

Die akute GvHD setzte mit einer erheblichen Latenz nach hämatopoetischer Rekonstitution ein und wurde im Median 80 Tage nach Transplantation diagnostiziert (9 - 97 Tage). Von 4 Patienten, bei denen die GvHD vor Tag + 30 begann, war bei 3 die GvHD-Prophylaxe wegen des Verdachts auf ein frühes Rezidiv vorzeitig abgesetzt worden (*Abbildung 7*). Vierzehn von 22 auswertbaren Patienten entwickelten eine chronische GvHD (63 %), 9 dieser Patienten hatten ein ausgedehntes Stadium („extensive disease“).

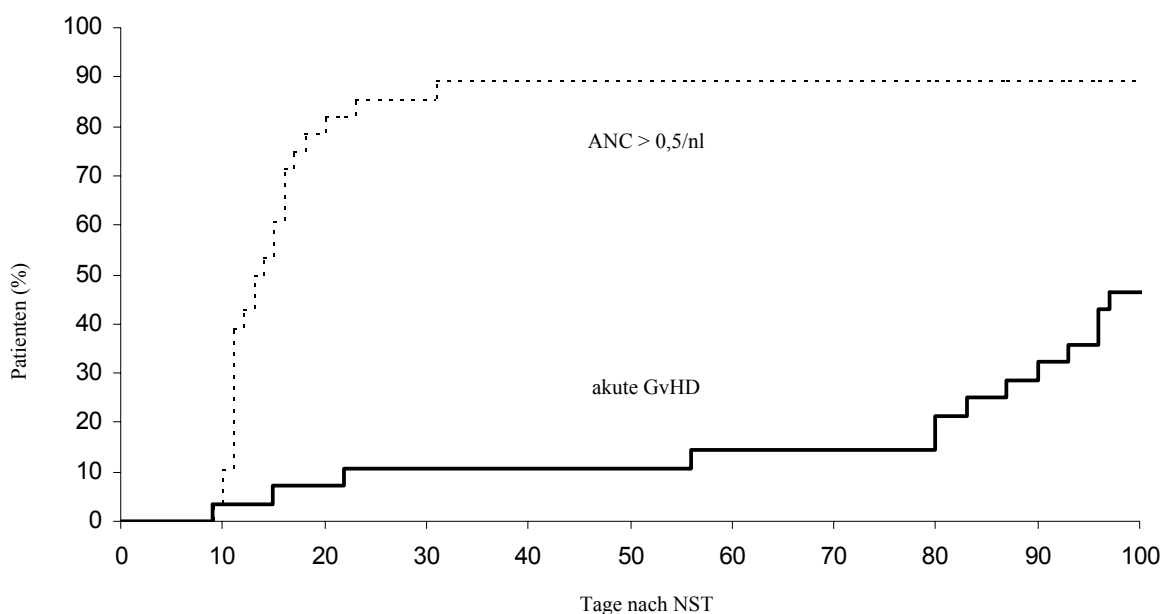


Abbildung 7 Neutrophilenrekonstitution und Beginn der akuten GvHD nach NST

ANC = absolute Zahl neutrophiler Granulozyten.

Infektionen

Fieber unklarer Genese (FUO) trat bei 5 Patienten in der Neutropenie (im Median Tag + 7) auf, die Patienten entfieberten innerhalb von 2 - 3 Tagen unter Erstlinienantibiotikatherapie ohne Antimykotika. Elf von 30 Patienten erlitten eine Sepsis nach NST, 9/11 während der Knochenmarkaplasie (im Median Tag + 7). Aus Blutkulturen wurde *Staphylococcus epidermidis* (n = 5), *Enterococcus faecium* (n = 1), *Enterococcus faecalis* (n = 1) und *Escherichia coli* (n = 2) bei 9/11 Patienten isoliert. Vier Patienten hatten eine ZVK-Infektion und 1 Patient eine rezidivierende Aspergilluspneumonie mit Sepsis 11 Monate nach Transplantation. 10/11 Patienten sprachen auf eine antibiotische Therapie an und entfieberten im Median nach 4 Tagen (2- 23 Tage). Eine Patientin entwickelte einen septischen Schock 3 Monate nach NST bei akuter GvHD Grad III des Darmes und starb am Multiorganversagen. Ein Erreger konnte auch in der Obduktion nicht nachgewiesen werden.

Fünf Patienten mit pulmonaler Aspergillose (n = 4) und hepato lienaler Candidiasis (n = 1) vor NST hatten trotz antimykotischer Therapie eine progrediente Pilzinfektion nach NST. Die Infiltrate zeigten unter Dosisintensivierung von Amphotericin B eine langsame Rückbildung über mehrere Wochen. De novo Pneumonien ohne Hinweis auf eine Pilzinfektion traten bei 2 Patienten mit einer ausgedehnten chronischen GvHD auf. Eine der beiden Patienten verstarb 14 Monate nach Transplantation an der Pneumonie. Kein Patient entwickelte eine de novo Pilzinfektion nach NST. Alle Patienten, die nach hämatopoetischer Rekonstitution eine schwere Infektion (Sepsis oder Pneumonie) entwickelten, litten unter einer therapiebedürftigen akuten oder chronischen GvHD.

Eine CMV-Reaktivierung wurde durch die wöchentlichen Überwachungsuntersuchungen bei 9/30 Patienten (30 %) 0 - 42 Tage nach NST (im Median nach 21 Tagen) mittels PCR nachgewiesen und eine CMV-Antigenämie bei 4 von ihnen. Nur 1/8 Patienten hatte Fieber, das mit der CMV-Infektion in Verbindung gebracht wurde, alle anderen hatten keine Zeichen einer CMV-Erkrankung.

4.3.3. Chimärismusanalyse und Spenderlymphozyteninfusionen

Vier Wochen nach NST hatten 14/27 untersuchten Patienten (52 %) einen MC, nach 8 Wochen 13/23 (56 %) und nach 12 Wochen 6/19 (32 %) der untersuchten Patienten. Der Anteil der Empfängerzellen bei diesen Patienten lag immer über 10 %. 69 % der Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung und 56 % der Patienten in 1. CR vor NST hatten einen MC (n.s.), der in CD3+, CD4+, CD8+ und CD19+ Zellen unabhängig von der lymphatischen oder myeloischen Genese der Erkrankung entdeckt wurde, seltener auch bei CD14+ Zellen.

Empfängerzellen wurden bei allen 16 Patienten entdeckt, die nach NST ein Rezidiv entwickelten. Ein drohendes Rezidiv wurde durch persistierenden oder wieder auftretenden MC bei 7/16 Patienten (44 %) 4 - 52 Wochen vor klinischer Rezidivdiagnose festgestellt (im Median 8 Wochen vor Rezidiv). 4 von 7 Patienten hatten keinen molekularen Marker der Leukämie und das Wiederauftreten von Empfängerzellen war der früheste Erkrankungsmarker bei den anderen 3 Patienten. Der MC wurde nur in der Leukozytensubpopulationsanalyse, nicht jedoch bei der Untersuchung des unseparierten Blutes festgestellt. Bei den übrigen 9/16 Patienten wurden Rezidiv und MC zeitgleich diagnostiziert.

Neunzehn von 30 Patienten (63 %) erhielten 1 - 3 DLI (im Median 2 DLI); die infundierte CD3-Zahl pro Patient betrug kumulativ 6×10^7 /kg KG (1 - 16×10^6 /kg KG). 14/19 Patienten hatten einen MC vor 1. DLI und waren in kompletter Remission. Bei den übrigen 5 Patienten, die DLI erhalten hatten, lag keine Analyse bei 1 Patienten vor, 3 hatten einen CC vor DLI und 1 erhielt therapeutische DLI im Rezidiv.

Die Gabe von DLI führte zu einer Chimärismuskonversion in einen CC bei 8/14 Patienten (57 %); 1/8 Patienten entwickelte 22 Monate später ein Rezidiv. Der MC persistierte trotz DLI bei 6/14 Patienten, alle 6 rezidierten bis zu einem Jahr nach Auftreten des MC. 2 Patienten starben an den Folgen einer GvHD mit schwerer Infektion, die nach DLI aufgetreten war (*Tabelle 10*). 15/19 Patienten (79 %) entwickelten eine GvHD nach DLI.

Bei 11/30 Patienten wurden keine DLI verabreicht: 1/11 Patienten hatte ein Transplantatversagen, bei 2/11 Patienten waren keine DLI verfügbar, 3/11 Patienten hatten vorher eine akute GvHD entwickelt und mussten über längere Zeit immunsuppressiv behandelt werden und 5/11 Patienten hatten ein frühes Rezidiv.

Tabelle 10. Effekt der DLI bei 14 Patienten mit MC nach NST.

Diagnose	Chimärismus vor DLI	CD3+ Zellen	Chimärismus nach DLI	Follow-up (Monate)	Status
Ph+ ALL, 1. CR	MC	6,0	CC	18	lebt in CR
Ph+ ALL, 1. Rezidiv	MC	10,0	MC	4	tot (Rezidiv)
c-ALL, 1. CR	MC	16,0	CC	22	lebt in CR
prä-T-ALL, 1. Rezidiv	MC	1,5	MC	5	tot (Rezidiv)
T-ALL, refraktär	MC	1,0	MC	13	tot (Rezidiv)
AML, 1. CR	MC	1,0	CC	22	tot (Rezidiv)
AML, 1. CR	MC	1,0	CC	14	tot (Pneumonie)
AML, 1. CR	MC	6,5	CC	14	lebt in CR
AML, 2. CR	MC	6,0	CC	3	tot (Sepsis)
AML, 1. Rezidiv	MC	16,0	CC	24	lebt in CR
AML, 2. Rezidiv	MC	4,0	MC	10	lebt im Rezidiv
AML, refraktär	MC	14,0	MC	8	tot (Rezidiv)
sAML, 1. CR	MC	1,0	MC	23	tot (Rezidiv)
sAML, refraktär	MC	1,0	CC	28	lebt in CR

DLI = Spenderlymphozyteninfusionen, MC = gemischter Chimärismus, M = Mann, F = Frau, Ph+ ALL = Philadelphia-Chromosom-positive ALL, c-ALL = common-ALL, T-ALL = T-lymphatische ALL, sAML = sekundäre AML, CD3+ Zellen = CD3-positive Zellen $\times 10^7/\text{kg KG}$. CR = komplette Remission, Follow-up = Nachbeobachtungszeit.

4.3.4. Therapieergebnisse nach nichtmyeloablativer Stammzelltransplantation

Nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 10 Monaten (2 - 55 Monate) betrug das Überleben 40 %; 60 % der Patienten verstarben. 16/30 Patienten (53 %) rezidierten 1 bis 37 Monate nach NST (im Median 4 Monate) und verstarben an Leukämie 2 bis 45 Monate nach Transplantation (im Median 7 Monate). Die Wahrscheinlichkeit des erkrankungsfreien Überlebens nach 3 Jahren betrug 45 %, das mediane erkrankungsfreie Überleben 22 Monate (95% C.I., 1 - 43 Monate).

2/30 Patienten verstarben an transplantationsassoziierten Komplikationen (Sepsis, Pneumonie). Die kumulative transplantationsassoziierte Todesrate betrug 7 % nach 3 Jahren.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit nach 3 Jahren betrug 37 %, das mediane Überleben lag bei 14 Monaten (95% C.I., 1 - 30 Monate) (*Abbildung 8*).

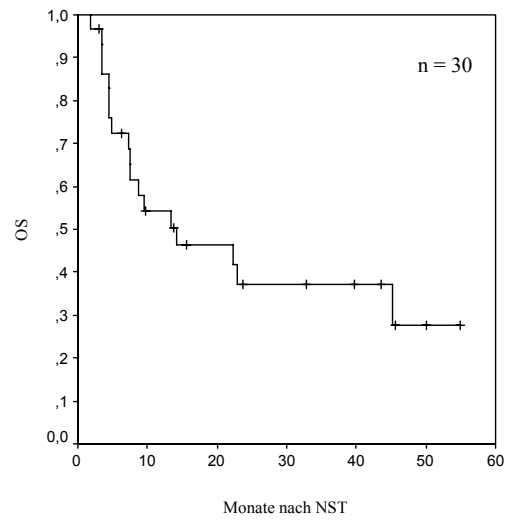


Abbildung 8. Gesamt-Überleben (OS) nach nichtmyeloablativer Stammzelltransplantation (NST).

4.4. Retrospektive Fall-Kontrollstudie

Der Stichtag der Auswertung und Endpunkt der Nachbeobachtungszeit war der 30.06.2003.

4.4.1. Hämatopoetische Rekonstitution

Die Zahl transplantierte CD34-positiver Zellen war vergleichbar in beiden Gruppen. 22/25 Patienten nach NST (88 %) und 47/50 Patienten nach Standardtransplantation (Standard SZT) (94 %) rekonstituierten mit Spenderhämatopoese. Die Zeit bis zur Rekonstitution neutrophiler Granulozyten war signifikant kürzer nach NST ($p = 0,001$), die thrombozytäre Rekonstitution war dagegen in beiden Gruppen vergleichbar (*Tabelle 11*). Ein Patient in jeder Gruppe hatte ein primäres Transplantatversagen; zwei Patienten in jeder Gruppe waren refraktär und rekonstituierten mit leukämischen Blasten.

Tabelle 11. Posttransplantationsverlauf in der Fall-Kontrollstudie.

	NST (n = 25)	Standard SZT (n = 50)	p-Wert
CD34-positive Zellen x 10 ⁶ /kg KG			
<i>Median (Spannweite)</i>	4,1 (2,1 - 19,8)	4,1 (1,0 - 17,7)	n.s.
Tage bis ANC > 0.5/nl			
<i>Median (Spannweite)</i>	12 (9 - 31)	17 (9 - 35)	0,001
Tage bis Thrombozyten > 20/nl			
<i>Median (Spannweite)</i>	18 (0 - 42)	19 (10 - 39)	n.s.
Zahl der Erythrozytenkonzentrate			
<i>Median (Spannweite)</i>	10 (4 - 22)	10 (0 - 50)	n.s.
Zahl der Thrombozytenkonzentrate			
<i>Median (Spannweite)</i>	9 (0 - 23)	10 (1 - 110)	n.s.
GvHD			
akute GvHD I-IV°	13 (52 %)	32 (64 %)	n.s.
akute GvHD III-IV.°	9 (36 %)	7 (14 %)	0,007
chronische GvHD	12 (63 %)	21 (52 %)	n.s.
Infektionen			
CMV-Reaktivierung	7 (28 %)	21 (42 %)	n.s.
Fieber unklarer Genese	5 (20 %)	22 (44 %)	n.s.
Sepsis	10 (40 %)	12 (24 %)	n.s.
Pneumonie ohne Pilzverdacht	2 (8 %)	12 (24 %)	n.s.
reaktivierte invasive Pilzinfektion	4 (16 %)	9 (18 %)	n.s.
Entlassung (Tage nach Transplantation)	30 (22 - 45)	39 (20 - 79)	0,005

NST = nichtmyeloablative Stammzelltransplantation, Standard SZT = Standardtransplantation, ANC = absolute Zahl neutrophiler Granulozyten, GvHD = Graft-versus-host disease, CMV = Cytomegalievirus.

4.4.2. Transplantationsassoziierte Komplikationen

Akute und chronische GvHD

Eine akute GvHD entwickelte sich bei 13/25 Patienten nach NST (52 %) und bei 32/50 Patienten (64 %) nach Standardtransplantation (n.s.). Eine schwere akute GvHD war häufiger nach NST als nach Standardtransplantation ($p = 0,007$). Die akute GvHD trat nach NST erst an Tag + 83 (9 - 97 Tage) auf verglichen mit Tag + 26 nach Standardtransplantation (8 - 80 Tage) ($p = 0,001$) (*Abbildung 9*).

Eine chronische GvHD wurde bei 12/19 auswertbaren Patienten (63 %) nach NST und 22/42 Patienten nach Standardtransplantation (52 %) diagnostiziert, Inzidenz und Verteilung von begrenzten und ausgedehnten Stadien waren in beiden Gruppen gleich.

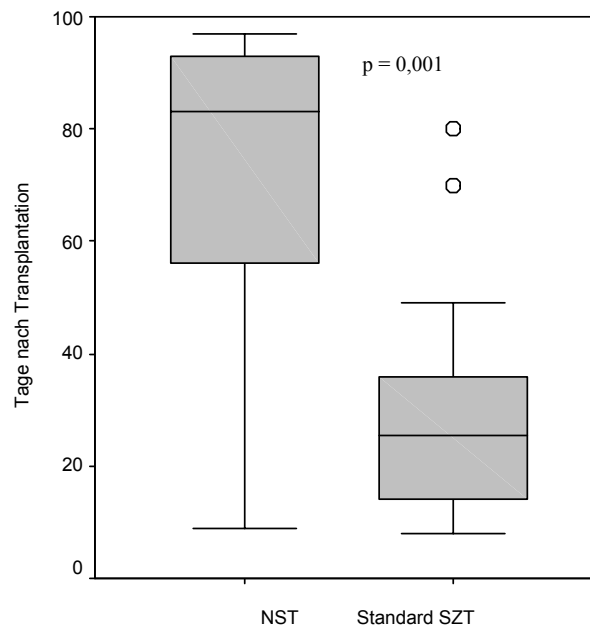


Abbildung 9. Zeitpunkt des Auftretens der akuten GvHD nach Transplantation.

NST = nichtmyeloablative Stammzelltransplantation, Standard SZT = Standardtransplantation.

Infektionen

Die Zahl schwerer Infektionen vor Transplantation war in beiden Gruppen vergleichbar.

Eine CMV-Reaktivierung wurde bei 7 Patienten (28 %) nach NST und 21 Patienten (42 %) nach Standardtransplantation diagnostiziert (n.s.). Außer 1 Neuinfektion nach Standardtransplantation waren alle Patienten CMV-IgG positiv vor Transplantation. Die CMV-Reaktivierung trat im Median 20 Tage (7 - 42 Tage) nach NST und 28 Tage (0 - 172 Tage) nach Standardtransplantati-

on auf (n.s.). Nach Standardtransplantation hatten 2 Patienten eine klinische CMV-Erkrankung mit histologisch gesicherter CMV-Gastritis bzw. –Kolitis.

Invasive Pilzinfektionen wurden bei 4 Patienten nach NST (Pneumonie = 3, hepatolienale Candidiasis = 1) und 9 Patienten (Pneumonie = 8, ösophageale Candidiasis = 1) nach Standardtransplantation diagnostiziert (n.s.). Alle 4 Fall- und 9 Kontrollpatienten hatten eine wahrscheinliche oder gesicherte invasive Pilzinfektion vor der Transplantation erlitten und wurden als reaktivierte oder progrediente Pilzinfektion beurteilt. 10/25 Patienten nach NST und 22/50 Patienten nach Standardtransplantation wurden mit Antimykotika behandelt. Die Unterschiede in der Inzidenz dieser Infektionen nach NST und nach Standardtransplantation waren nicht signifikant (*Tabelle 11*).

4.4.3. Chimärismusanalyse und Spenderlymphozyteninfusionen

In der STR-Untersuchung an Tag + 30 wiesen 13/22 analysierten Patienten (59 %) nach NST einen MC auf verglichen mit 6/34 Patienten (18 %) nach Standardtransplantation ($p = 0,002$). Nach 90 Tagen hatten 3/15 Patienten (20 %) noch einen MC und 3/19 (16 %) nach Standardtransplantation (n.s.) (*Abbildung 10*).

16/25 Patienten (64 %) nach NST und 15/50 Patienten (30 %) nach Standardtransplantation erhielten DLI ($p = 0,007$). Eine GvHD trat bei 13/16 Patienten nach NST und 8/15 nach Standardtransplantation auf (n.s.).

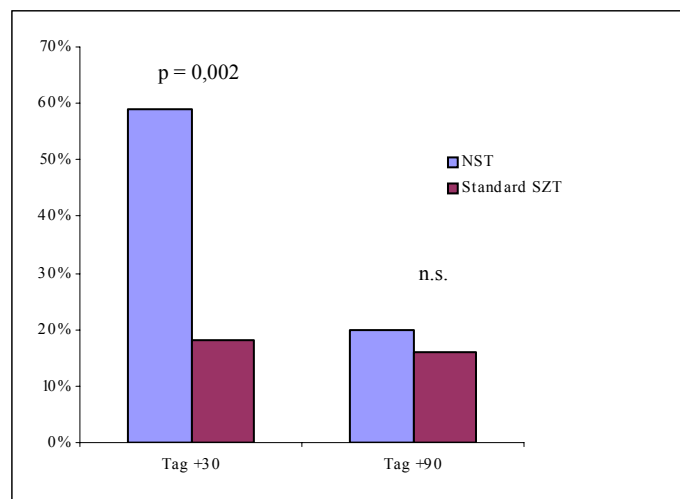


Abbildung 10. Häufigkeit des gemischten Chimärismus 30 und 90 Tage nach NST und nach Standard SZT.

Prozentualer Anteil der Patienten mit MC = gemischtem Chimärismus an der untersuchten Gesamtgruppe.

4.4.4. Transplantationsassoziierte Mortalität

Eine von 25 Patienten (4 %) starb 3 Monate nach NST an akuter Darm-GvHD Grad III und Sepsis mit folgendem Multiorganversagen. Zwölf von 50 Kontrollpatienten (24 %) verstarben 0,4 bis 12,7 Monate nach Standardtransplantation, 10/12 Patienten verstarben an Infektionen, 5/10 entwickelten ein Multiorganversagen; 6/10 Patienten hatten gleichzeitig eine schwere akute oder chronische GvHD. 2/12 Patienten verstarben an einer schweren GvHD ohne Begleitinfektion. Der Unterschied zwischen Fall- und Kontrollpatienten war signifikant ($p = 0,031$). Ein weiterer Patient verstarb 118 Tage nach Standardtransplantation an Lungenembolie, die als nicht transplantationsbedingt angesehen wurde.

In der univariaten Kaplan-Meier Analyse betrug die kumulative TRM nach 3 Jahren 4% nach NST und 24% nach Standardtransplantation ($p = 0,055$). (Abbildung 11). Schwere Infektionen (Definition siehe Kapitel 3.5.4.) nach Transplantation waren nur nach Standardtransplantation mit einer höheren Sterblichkeit assoziiert ($p = 0,022$). Zugrundeliegende Erkrankung, Alter der Patienten, Spenderstatus, Spender-Empfänger Geschlechtsdifferenz, Infektionen vor Transplantation, Stammzellquelle sowie akute und chronische GvHD hatten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die TRM. Eine multivariate Analyse konnte wegen der geringen Patientenzahlen nicht durchgeführt werden.

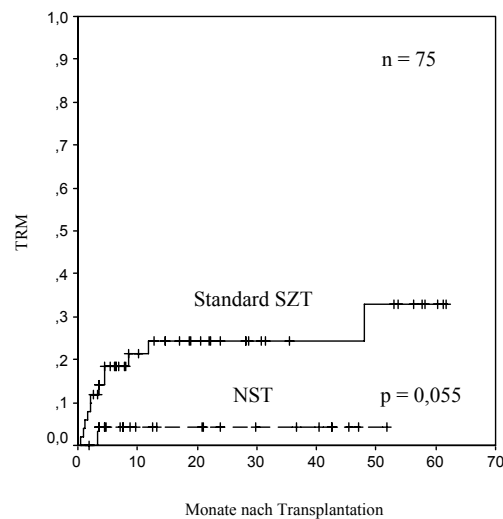


Abbildung 11. Transplantationsassoziierte Mortalität (TRM) nach NST und Standard SZT.

NST = nichtmyeloablative Stammzelltransplantation, Standard SZT = Standardtransplantation.

4.4.5. Erkrankungsfreies Überleben

Das Follow-up in den beiden Gruppen (Follow-up-Maturity) war nicht signifikant unterschiedlich (*Abbildung 12*).

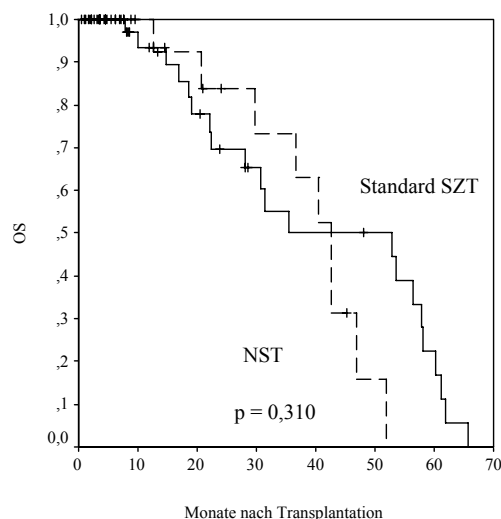


Abbildung 12. Follow-up-Maturity.

Ausschließliche Berücksichtigung zensierter Patienten zur Überprüfung vergleichbarer Zensierungen in den untersuchten Gruppen. NST = nichtmyeloablative Stammzelltransplantation, Standard SZT = Standardtransplantation.

Nach NST hatten 15 von 25 Patienten (60 %) ein Rezidiv 3 Monate im Median (1 - 37 Monate) nach Transplantation und verstarben. 20 von 50 Kontrollpatienten (40 %) rezidierten im Median 6 Monate nach Standardtransplantation (1 - 32 Monate) (n.s.), 16/20 sind verstorben, 4/20 Patienten leben im Rezidiv.

Das erkrankungsfreie 3-Jahresüberleben (EFS) betrug 42 % nach NST und 45 % nach Standardtransplantation; das mediane Überleben lag bei 12 Monaten nach NST (95% C.I., 1 - 33 Monate) und bei 24 Monaten nach Standardtransplantation (95% C.I., 8 - 41 Monate) ($p = 0,240$). Die Art der Konditionierung hatte keinen signifikanten Einfluss auf das EFS (*Abbildung 13*). In der univariaten Kaplan-Meier Analyse waren das Stadium der Erkrankung bei Transplantation ($p = 0,003$) (*Abbildung 14*), der Karyotyp ($p = 0,002$) (*Abbildung 15*), der Schweregrad der akuten GvHD ($p = 0,043$) (*Abbildung 16*), das Auftreten einer chronischen GvHD ($p = 0,031$) (*Abbildung 17*) und der Chimärismusstatus 90 Tage nach Transplantation ($p < 0,001$) (*Abbildung 18*) Variablen mit signifikantem Einfluss auf das EFS.

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse waren 1. CR (gegenüber > 1 . CR) ($p = 0,034$, relatives Risiko (hazard ratio) 0,366 (95% C.I., 0,144 - 0,927) und das Auftreten einer chronischen

GvHD (gegenüber keiner chronischen GvHD) ($p = 0,036$, relatives Risiko (hazard ratio) 0,285 (95% C.I., 0,088 - 0,922) signifikante (günstige) Risikofaktoren für das EFS.

Zugrundeliegende Erkrankung, Alter der Patienten, Spenderstatus, Stammzellquelle und Spenderlymphozyteninfusionen hatten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das EFS (*Tabelle 12*).

Tabelle 12. Univariate Analyse des erkrankungsfreien Überlebens und des Gesamt-Überlebens 3 Jahre nach Transplantation.

Variable	Vergleichsgruppen	EFS	p-Wert	OS	p-Wert
Konditionierung	Standard SZT	45 %	n.s.	39 %	n.s.
	NST	42 %		38 %	
Diagnose	ALL	50 %	n.s.	44 %	n.s.
	AML	42 %		35 %	
Krankheitsstadium	1. CR	67 %	0,003	63 %	0,005
	> 1. CR	32 %		27 %	
Zytogenetik	Standardrisiko	68 %	0,002	58 %	0,001
	Hochrisiko	24 %		22 %	
Alter	< 35 Jahre	50 %	n.s.	51 %	n.s.
	35 - 49 Jahre	39 %		32 %	
	≥ 50 Jahre	42 %		28 %	
Spendertyp	verwandter Spender	43 %	n.s.	42 %	n.s.
	Fremdspender	47 %		32 %	
akute GvHD (Grad)	0	43 %	0,043	41 %	0,017
	I - II	62 %		48 %	
	III - IV	18 %		21 %	
chronische GvHD	nein	28 %	0,031	31 %	0,003
	ja	62 %		61 %	
schwere Infektionen*	nein	n.a.		57 %	0,045
	ja	n.a.		32 %	
schwere Infektionen vor Tag 28*	nein	n.a.		53 %	0,035
	ja	n.a.		31 %	
Chimärismus Tag 30	MC	39 %	n.s.	36 %	n.s.
	CC	48 %		45 %	
Chimärismus Tag 90	MC	17 %	< 0,001	n.e.	0,046
	CC	62 %		56 %	

EFS = erkrankungsfreies Überleben, OS = Gesamt-Überleben, Standard SZT = Standardtransplantation, NST = nichtmyeloablative Stammzelltransplantation, ALL = akute lymphatische Leukämie, AML = akute myeloische Leukämie, CR = komplette Remission, GvHD = graft-versus-host disease, schwere Infektionen* = Sepsis / Pneumonien / invasive Pilzinfektionen, MC = gemischter Chimärismus, CC = kompletter Chimärismus n.a. = nicht analysiert, n.s. = nicht signifikant, n.e. = nicht erreicht.

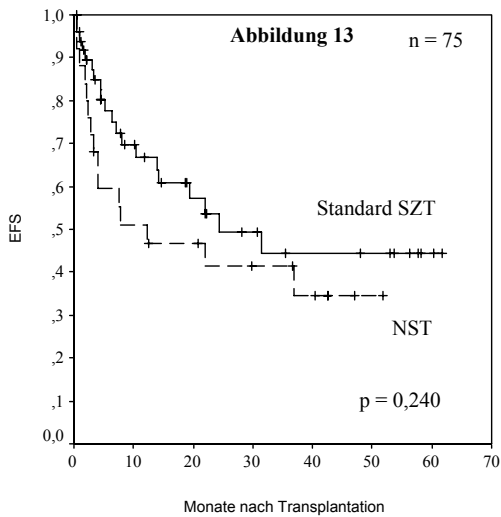


Abbildung 13. Erkrankungsfreies Überleben (EFS) nach NST und nach Standard SZT.

NST = nichtmyeloablative Stammzelltransplantation, Standard SZT = Standardtransplantation.

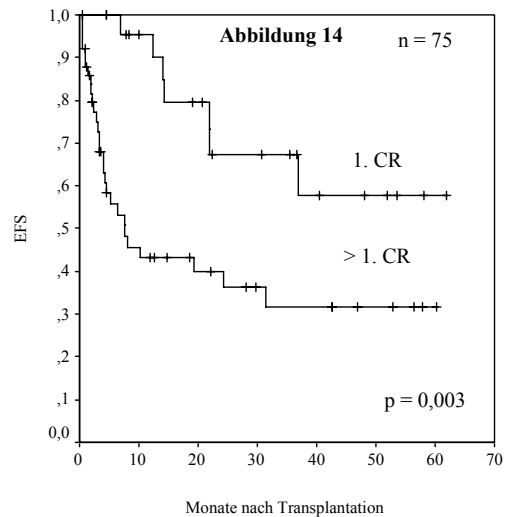


Abbildung 14. Erkrankungsfreies Überleben (EFS) in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium.

CR = komplette Remission.

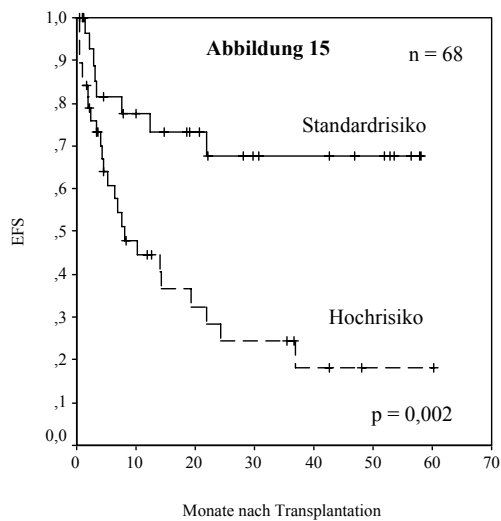


Abbildung 15. Erkrankungsfreies Überleben (EFS) und zytogenetische Risikogruppe.

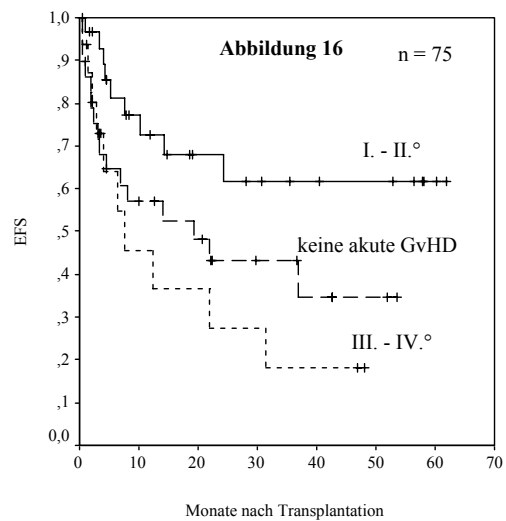


Abbildung 16. Erkrankungsfreies Überleben (EFS) und akute GvHD.

keine GvHD versus GvHD I.-II.° versus III.-IV.° : p = 0,043. GvHD I.-II.° versus III.-IV.° : p = 0,009

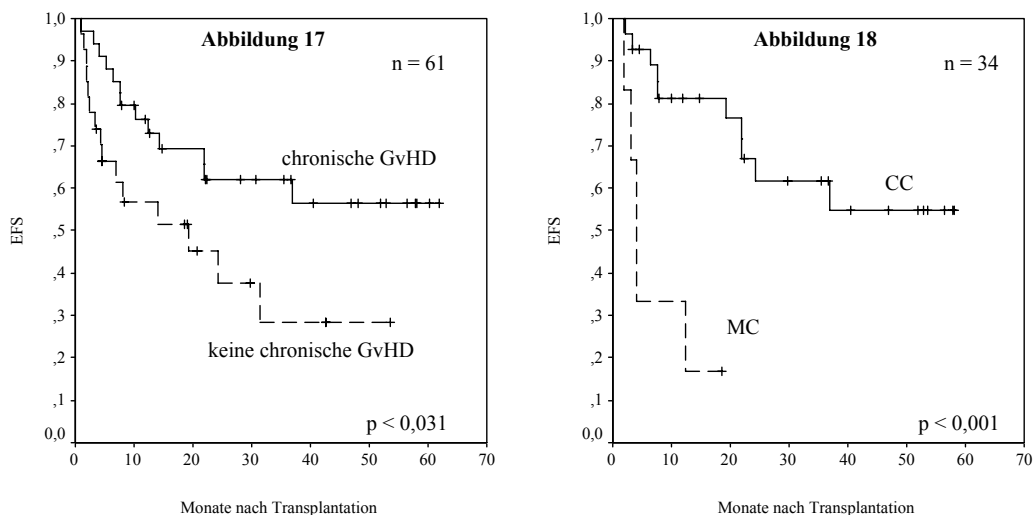


Abbildung 17. Erkrankungsfreies Überleben (EFS) und chronische GvHD.

Abbildung 18. Erkrankungsfreies Überleben (EFS) und Chimärismus an Tag 90.

CC = kompletter Chimärismus, MC = gemischter Chimärismus.

4.4.6. Überleben

Nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 41 Monaten (95% C.I., 29 - 52 Monate) lebten noch 30 von 75 in die Fall-Kontrollstudie eingeschlossene Patienten (40 %). Nach NST lebten noch 9/25 Patienten (36 %) in CR. 5/9 überlebende Patienten hatten eine fortgeschrittene Erkrankung vor Transplantation. Nach Standardtransplantation lebten noch 21 von 50 (42 %), 17/21 in CR. 7/17 Patienten hatten eine fortgeschrittene Erkrankung vor Transplantation.

Die 3-Jahresüberlebenschance betrug 38 % nach NST und 39 % nach Standardtransplantation; das mediane Gesamt-Überleben lag bei 13 Monaten nach NST (95% C.I., 1 - 32 Monate) und 21 Monaten nach Standardtransplantation (95% C.I., 3 - 38 Monaten), der Unterschied zwischen den Konditionierungsregimen war nicht signifikant ($p = 0,815$) (*Abbildung 19*). Krankheitsstadium ($p = 0,005$), zytogenetische Risikogruppe ($p = 0,001$), Grad der akuten GvHD ($p = 0,017$), chronische GvHD ($p = 0,003$), schwere Infektionen nach Transplantation ($p = 0,045$) (nur nach Standardtransplantation) und schwere Infektionen vor Tag + 28 (nur nach Standardtransplantation) ($p = 0,035$) sowie Chimärismusstatus an Tag + 90 nach Transplantation ($p = 0,046$) waren Variablen mit signifikantem Einfluss auf das Überleben in der univariaten Kaplan-Meier Analyse. Zugrundeliegende Erkrankung, Alter, Spendertyp und Infektionen vor Transplantation hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben (*Tabelle 12*).

Nur eine chronische GvHD (gegenüber keiner chronischen GvHD) hatte einen signifikanten günstigen Einfluss auf das Überleben in der multivariaten Analyse ($p < 0,001$, relatives Risiko (hazard ratio) 0,136 (95% C.I., 0,063 - 0,295)).

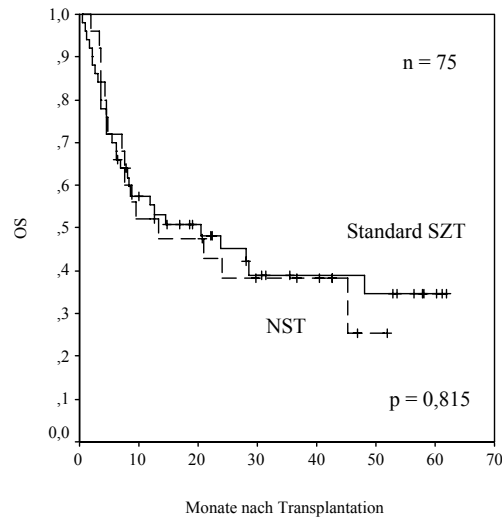


Abbildung 19. Überleben (OS) nach NST und nach Standard SZT.

NST = nichtmyeloablative Stammzelltransplantation, Standard SZT = Standardtransplantation.

4.5. Nichtmyeloablative Stammzelltransplantation bei metastasierten Nierenzellkarzinomen

Der Stichtag der Auswertung und Endpunkt der Nachbeobachtungszeit war der 30.06.2003.

4.5.1. Hämatopoetische Rekonstitution

Die Transplantation erfolgte mit $5,9 \times 10^6$ CD34-positiven Zellen/kg KG im Median (3,5 - 10,7 CD34-positive Zellen). Das Transplantat wuchs bei allen Patienten an. Die mediane Zeit bis zu neutrophilen Granulozytenzahlen $> 0,5/\text{nl}$ betrug 11 Tage (8 - 14 Tage) und bis zu stabilen Thrombozytenzahlen $> 20/\text{nl}$ 6 Tage (0 - 14 Tage), 3/7 Patienten hatten zu keinem Zeitpunkt ≤ 20 Thrombozyten/nl. Im Median wurden 6 Erythrozytenkonzentrate (4 - 14) transfundiert. Zwei von 7 Patienten erhielten 3 bzw. 9 Thrombozytenkonzentrate. Der höchste Transfusionsbedarf bestand nach Fremdspondertransplantation.

4.5.2. Transplantationsassoziierte Komplikationen

Toxizität

Eine relevante Stomatitis $> \text{I.}^\circ$ trat nicht auf; eine parenterale Ernährung musste in keinem Fall eingeleitet werden. Ein Patient erlitt einen Gichtanfall, ein weiterer ein tachykardes Vorhofflimmern. Zwei Patienten erlitten einen zerebralen Krampfanfall an Tag + 14 bzw. Tag + 184. Die 2. Patientin entwickelte rasch eine komplette Tetraparese. CT und Magnetresonanztomographien des Kopfes zeigten große bilaterale hyperintense, vor allem posterior gelegene Areale, vereinbar mit ischämischen Insulten. Eine neuroradiologische Untersuchung wegen unklarer Verwirrungs Zustände einer weiteren Patientin erbrachte den dringenden Verdacht auf eine Leukenzephalopathie. Nach Absetzen von CSA bildete sich die Verwirrtheit zurück und die Tetraparese zeigte eine allmähliche Rückbildung, so dass in beiden Fällen die Diagnose eines posterioren reversiblen Enzephalopathiesyndroms (PRES) als am wahrscheinlichsten galt [Hinchey 1996].

Akute und chronische GvHD

Eine akute oder chronische GvHD trat bei 5/7 Patienten auf (*Tabelle 13*). 3/5 hatten eine akute GvHD Grad I-II entweder früh nach Anwachsen des Transplantates ($n = 2$) oder nach der 1. DLI ($n = 1$), die sich bei 2/3 Patienten zur chronischen ausgedehnten GvHD weiterentwickelte. Eine de novo chronische GvHD entstand bei zwei weiteren Patienten nach DLI, einer von ihnen entwickelte eine schwere GvHD von Haut, Leber und Darm sowie ein Evans-Syndrom mit transfusionspflichtiger autoimmunhämolytischer Anämie (AIHA) und idiopathischer thrombozytopenischer Purpura (ITP). Alle Symptome bildeten sich unter einer intensivierten immunsuppress-

siven Therapie mit CSA und hochdosierten Glucocorticoiden zurück. Der zweite Patient wurde aufgenommen mit Fieber und Panzytopenie nach DLI, im peripheren Blut wurden ausschließlich Spenderlymphozyten nachgewiesen, die Knochenmarkpunktion zeigte ein aplastisches Knochenmark. Trotz zahlreicher Gaben von G-CSF erholte sich die Hämatopoese nicht und der Patient verstarb an einer Sepsis.

Infektionen

Eine CMV-Reaktivierung wurde durch die wöchentlichen Überwachungsuntersuchungen bei 3/7 Patienten festgestellt. Die Patienten wurden mit Ganciclovir bis zur PCR-Negativität behandelt. Einer der Patienten entwickelte zeitgleich mit dem CMV-Nachweis eine Panzytopenie, die sich unter der antiviralen Therapie verbesserte. Die beiden anderen Patienten boten keine Hinweise auf eine Viruserkrankung.

Tabelle 13. Verlauf nach NST bei 7 Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen.

Pat	GvHD		DLI	Zeitpunkt der DLI	> 50% Spender	Status	Nachbeobachtung
	akute	chronische					
1	keine	begrenzt	6 x 10 ⁷	Tag + 122 Tag + 150	Tag + 153	lebt, PD	Tag 732+
2	keine	keine	5 x 10 ⁶	Tag + 114	Tag + 130	tot, Sepsis	Tag 194
3	Grad II	ausgedehnt	1 x 10 ⁷	Tag + 51	Tag + 100	lebt, PR	Tag 644+
4	keine	keine			Tag + 105	tot, PD	Tag 141
5	keine	ausgedehnt	6 x 10 ⁶	Tag + 114	Tag + 101	lebt, PD	Tag 329+
6	Grad I	ausgedehnt			Tag + 42	lebt, PD	Tag 286+
7	Grad II	keine			Tag + 147	lebt, SD - PD	Tag 108+

DLI pro kg KG, Zeitpunkt der DLI in Tagen nach Transplantation.

4.5.3. Chimärismusanalyse und Spenderlymphozyteninfusionen

Das Anwachsen der Spenderzellen war verzögert gegenüber Patienten mit akuten Leukämien nach Standardtransplantation. Ein Anteil von über 50 % CD3-positiven Spenderlymphozyten wurde zwischen Tag + 42 und Tag + 153 (im Median Tag + 103) nach NST festgestellt (*Abbildung 20*); an Tag + 90 hatte lediglich 1/7 Patienten einen kompletten Spenderchimärismus.

Nach Absetzen von CSA erhielten 4/7 Patienten DLI, beginnend zwischen Tag + 51 und + 150 nach Transplantation. 2/4 Patienten erhielten 1 DLI und 2/4 erhielten 2 DLI. Alle 4 Patienten hatten einen MC vor 1. DLI. 3/7 Patienten erhielten keine DLI wegen früher akuter GvHD bei 2/7 und rascher Krankheitsprogression mit Allgemeinzustandsverschlechterung bei 1 Patienten.

6/7 Patienten erreichten einen stabilen CC; 4/6 konvertierten rasch nach DLI in allen lymphatischen und myeloischen Leukozytensubpopulationen aus einem MC in einen CC, 2/6 erreichten ohne DLI nach Auftreten einer GvHD einen CC. 1/7 Patienten hatte einen MC bis Tag + 100, danach kam es zu einem raschen Überwiegen von Empfängerzellen mit zeitgleicher rascher Tumorprogression und Allgemeinzustandsverschlechterung.

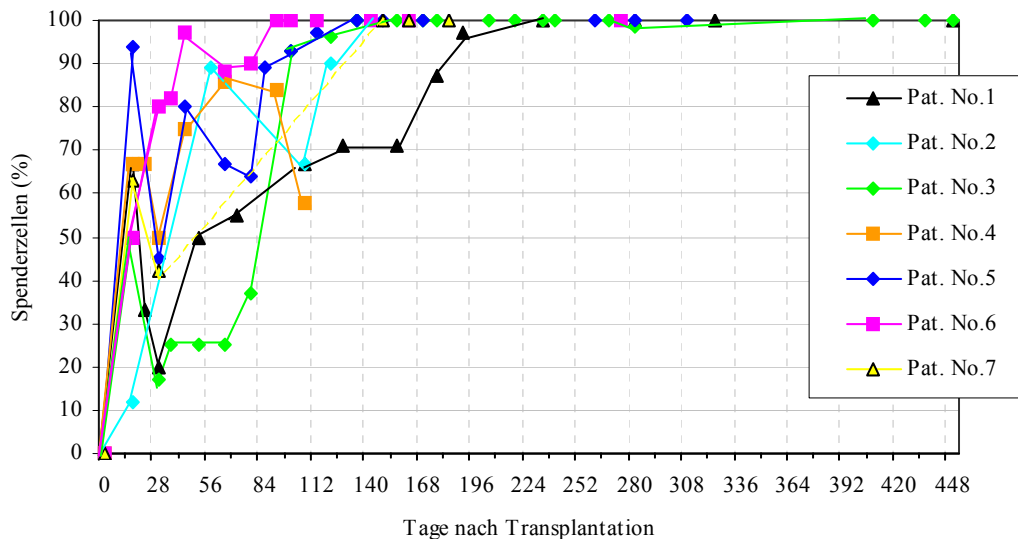


Abbildung 20. Anteil CD3-positiver Spenderzellen im peripheren Blut in der Chimärismusanalyse.

4.5.4. Tumoransprechen und Überleben

Innerhalb der ersten drei Monate nach NST sprach keines der Nierenzellkarzinome an. Eine sehr gute partielle Remission (PR) wurde bei 1/7 Patienten nach vier Monaten erreicht, der Patient ist inzwischen über 20 Monate nach NST in stabiler sehr guter PR bei gutem Allgemeinbefinden. Im CT des Thoraxes finden sich lediglich Residuen der Tumormanifestation, eine histologische Bestätigung liegt nicht vor (*Abbildung 21*). Bei einem weiteren Patienten wurde eine PR nach 6 Monaten festgestellt; der Patient verstarb kurz darauf an einer Sepsis in der prothrombinopenen Panzytopenie. 1/7 Patienten erreichte eine progressionsfreie stabile Erkrankung (SD) 6 Monate nach NST. Die übrigen 4 Patienten zeigten zu keinem Zeitpunkt ein Ansprechen auf die Therapie und waren weiter progredient.

Nach einer medianen Verlaufsbeurteilung von 10 Monaten (4 - 24 Monate) ist 1/7 Patienten (14%) an transplantationsassoziierten Komplikationen verstorben. Die Ansprechrate in dieser kleinen Serie lag bei 29 % (2/7 Patienten). Fünf von 7 Patienten (71 %) leben, 1 in stabiler sehr guter PR, 4 mit progredientem Tumor (*Tabelle 13*).

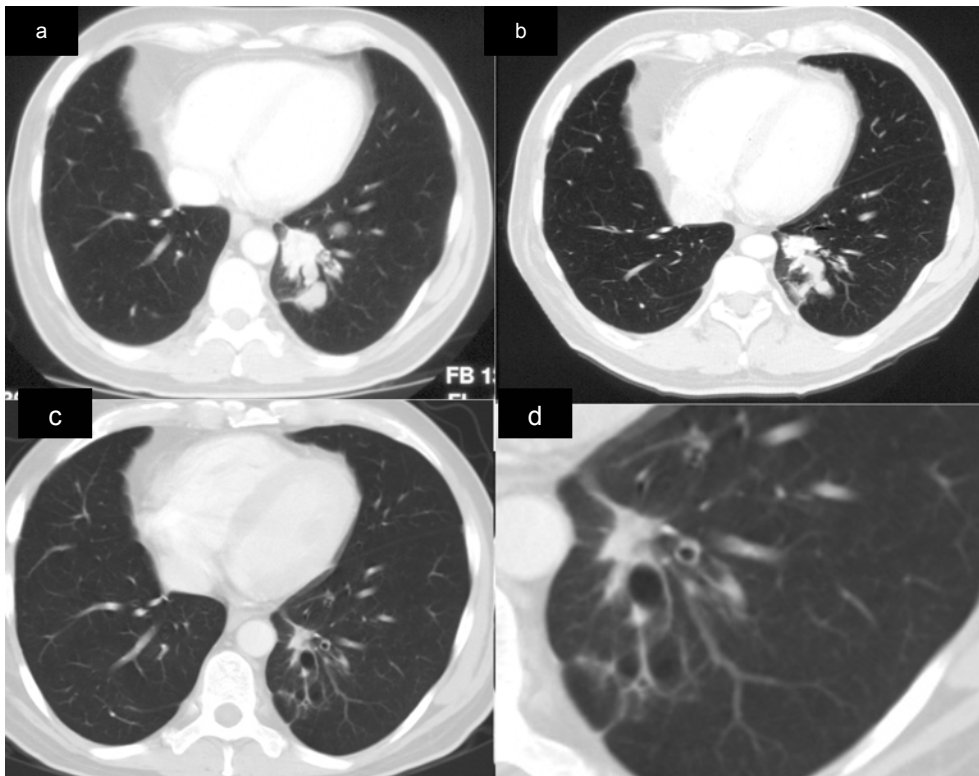


Abbildung 21. Sehr gute partielle Remission pulmonaler Metastasen nach NST.

CT der Lunge bei Patient Nr. 3.:

- a) CT vor NST zeigt multifokale Metastasen im linken Lungenunterlappen;
- b) CT 6 Wochen nach NST zeigt einen unveränderten Befund;
- c) CT 4 Monate nach NST zeigt eine fast vollständige Rückbildung der pulmonalen Metastasen in Originalgröße und
- d) gleiche Aufnahme wie c) in 3,3-facher Vergrößerung. Serielle CT-Untersuchungen bis mehr als 20 Monate nach NST zeigen eine Konstanz dieses Befundes.

Die 22 ebenfalls für eine NST in Betracht gezogenen Patienten erhielten nach Ausschluss von der Transplantation eine Chemo- oder Immuntherapie (n = 11), Bestrahlung (n = 5), Operation (n=3), Misteltherapie (n = 7), Tumorstabilisierung (n = 1), oder keine weitere Therapie (n = 5). Nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 14 Monaten (1 – 31 Monaten) sind 11/22 am Tumorleiden verstorben und 11/22 leben. Von diesen 11 Patienten sind 5/11 progredient, 5/11 haben eine stabile Erkrankung und 1/11 entzog sich der weiteren Nachbetreuung. Eine komplette oder partielle Remission trat bei keinem Patienten nach Ausschluss von der Transplantation auf. In der univariaten Analyse betrug das 1-Jahresüberleben 67 % für die transplantierte Gruppe (n = 7) und 59 % für die nicht transplantierte Gruppe (n = 29) (p = 0,256) (Abbildung 22).

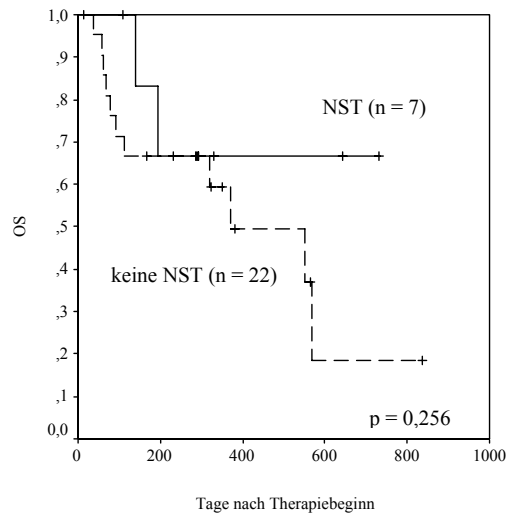


Abbildung 22. Überleben von 29 NST-Kandidaten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen.

NST = nichtmyeloablative Stammzelltransplantation, OS = Gesamt-Überleben. Nachbeobachtungszeit ab NST oder Einleitung einer anderen Therapie. Falls keine Therapie durchgeführt wurde, Berechnung ab HLA-Typisierung.

4.6. Zusammenfassung der Ergebnisse unter Berücksichtigung der Fragestellungen und Untersuchungsziele

1. Welche Bedeutung hat die serielle Chimärismusuntersuchung von Leukozytensubpopulationen in Blut und Knochenmark nach allogener Stammzelltransplantation? Gibt es Unterschiede in der Chimärismuskinetik und Chimärismuskonversion nach NST im Vergleich zur Standardtransplantation? Haben diese Unterschiede eine prognostische Bedeutung?

Die Untersuchungen an 155 Patienten ergaben, dass die Chimärismusuntersuchungen mit Multiplex-STR ein geeignetes Instrument sind, um das stabile Anwachsen der Spenderhämatopoese nach allogener Stammzelltransplantation zu untersuchen. Sie bildeten ein Werkzeug zur Bestimmung des Zeitpunktes der Einleitung und der Steuerung einer adoptiven Immuntherapie nach Transplantation. Die Chimärismusanalyse CD34-positiver Zellen im Knochenmark erlaubte ab Tag + 28 die Vorhersage eines späteren Rezidivs, gleiches gelang mit der CD3-Analyse im peripheren Blut ab Tag + 60.

Nach NST fand sich in den ersten 4 Wochen ein statistisch signifikanter höherer Anteil von T-Lymphozyten des Empfängers in Blut und Knochenmark gegenüber der Standardtransplantation; der Unterschied war aber nicht mit einem höheren Risiko für ein Rezidiv verbunden.

Ein anhaltender gemischter Chimärismus 3 Monate nach Transplantation und länger war nicht stabil, sondern ein negativer prognostischer Faktor für ein Rezidiv und das Überleben sowohl nach NST als auch nach Standardtransplantation. Retrospektiv gelang durch die Chimärismusanalyse bei einem Teil der Patienten die Vorhersage eines drohenden Rezidivs bis zu 1 Jahr vor klinischer Diagnose.

2. Welchen Stellenwert hat die Gabe von Spenderlymphozyteninfusionen (DLI) nach allogener Stammzelltransplantation für die Konversion eines gemischten Chimärismus, die Prophylaxe eines Rezidivs (präemptive Gabe) oder die Therapie eines klinischen Rezidivs?

Ein GvL-Effekt bei ALL oder AML kann aus der signifikanten Abnahme eines gemischten Chimärismus nach NST und Standardtransplantation nach prophylaktischer Gabe von DLI wegen eines anhaltenden gemischten Chimärismus postuliert werden; 63 % dieser Patienten überlebten rezidivfrei. Eine Chimärismuskonversion gelang bei 66 % der Patienten mit akuten Leukämien. Alle Patienten, die nach DLI nicht in einen kompletten Spenderchimärismus konvertierten, rezidierten. Untersuchungen zum Vergleich von Chimärismusanalysen, die keine Aussage über die Benignität der untersuchten Zellen erlauben, und minimal residueller Erkrankung (minimal resi-

dual disease) waren nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit, können aber in der Zukunft den Stellenwert der Chimärismusuntersuchungen weiter klären.

Die therapeutische Gabe von DLI bei diagnostiziertem Rezidiv führte nur bei Patienten mit CML zu einer erneuten anhaltenden kompletten Remission; Patienten mit rezidierten akuten Leukämien profitierten nicht von den DLI.

3. Stellt die nichtmyeloablative Stammzelltransplantation (NST) eine durchführbare Option bei Patienten mit ALL oder AML dar, die Kandidaten für eine allogene Stammzelltransplantation sind, jedoch Kontraindikationen gegen eine hochdosierte Strahlen- und Chemotherapie vor allogener Stammzelltransplantation (Standardtransplantation) aufweisen?

Eine NST konnte bei 30 Patienten mit akuten Leukämien über 50 Jahren, nach schweren pulmonalen Infektionen und bei Rezidiven nach Standardtransplantation durchgeführt werden, obwohl die Hälfte der Patienten zwei oder mehr Kontraindikationen gegen eine Standardtransplantation aufwies.

Das verwendete Konditionierungsprotokoll führte zu einem sicheren Anwachsen des Transplantates bei 90 % der Patienten mit signifikant kürzerer Neutropeniedauer als nach Standardtransplantation. Eine Remissionsinduktion gelang bei über 80 % der Patienten mit unkontrollierter Erkrankung vor NST. Die Überlebenswahrscheinlichkeit nach 3 Jahren betrug 37 %.

4. Wie hoch ist das Risiko für Patienten nach NST, schwere Infektionen und eine GvHD zu erleiden, die wichtigsten Faktoren der transplantationsassoziierten Morbidität und Mortalität?

Schwere Infektionen sowie akute und chronische GvHD traten nach NST in vergleichbarer Häufigkeit wie nach Standardtransplantation auf; die GvHD trat aber nach NST signifikant später auf (83 gegenüber 26 Tagen im Median). Die kumulative TRM betrug lediglich 7 % nach 3 Jahren.

5. Zeigen sich im Vergleich zwischen NST und Standardtransplantation bei Patienten mit akuten Leukämien signifikante Unterschiede bezüglich der transplantationsassoziierten Mortalität (TRM), der Rezidivrate und des Überlebens? Ist durch die NST eine Senkung der TRM möglich?

Trotz hoher Morbidität in beiden Gruppen war die kumulative TRM nach NST deutlich geringer als nach Standardtransplantation (4 % gegenüber 24 %, n.s.). Insbesondere die Sterblichkeit an Infektionen, die früh nach Transplantation auftraten, war nur in der Gruppe myeloablativ konditionierter Patienten hoch. Die Rezidivrate war jedoch bei Patienten nach NST höher als nach Standardtransplantation (60 % gegenüber 40 %, n.s.). Nach einer medianen Nachbeobachtungs-

zeit von über 40 Monaten waren in der retrospektiven Fall-Kontrollstudie mit 75 Patienten die Wahrscheinlichkeit des erkrankungsfreien Überlebens (NST: 42 %; Standardtransplantation: 45 %) und des Gesamt-Überlebens (NST: 38 %; Standardtransplantation: 39 %) in den beiden Gruppen nach 3 Jahren vergleichbar. Das Konditionierungsregime hatte keinen signifikanten Einfluss auf das erkrankungsfreie Überleben und das Gesamt-Überleben, erkrankungsfreies und Gesamt-Überleben wurden beeinflusst durch bekannte Risikofaktoren nach allogener SZT von akuten Leukämien wie Krankheitsstadium, zytogenetische Risikogruppe, akute GvHD, chronische GvHD, außerdem schwere Infektionen früh nach Standardtransplantation. Ein gemischter Chimärismus 90 Tage nach Transplantation war auch in der Fall-Kontrollstudie mit einem hohen Rezidivrisiko verbunden.

6. Ist die NST eine therapeutische Option für Patienten mit refraktären metastasierten Nierenzellkarzinomen, die kein Ansprechen auf eine vorherige Immuntherapie hatten?

Nach NST kam es zu einem verzögerten Anwachsen der Spenderhämatopoese. Die Patienten konvertierten zu einem kompletten Spenderchimärismus nach Gabe von DLI oder Auftreten einer GvHD. Die Toxizität der Transplantation war bei den überwiegend älteren Patienten hoch. Die verzögerte Tumorrückbildung nach Chimärismuskonversion ist vereinbar mit einem Transplantat-gegen-Tumor Effekt (GvT-Effekt). Im Gegensatz zu anderen Therapieverfahren waren nach NST bei diesen weit fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen noch Tumorregressionen möglich. Die kleine Fallzahl ermöglicht keine Analyse prädiktiver Faktoren für ein Ansprechen nach NST. Die NST ist weiterhin als eine experimentelle Therapieoption für selektierte Patienten mit metastasierten immuntherapierefraktären Nierenzellkarzinomen zu betrachten.

5. Diskussion

5.1. Indikationsstellung zur nichtmyeloablativen Stammzelltransplantation in der Literatur

Dosisreduzierte Konditionierungsregime haben zusammen mit der Verbesserung der supportiven Therapiemaßnahmen in den letzten Jahren zu einer Indikationserweiterung der allogenen Stammzelltransplantation geführt. So nahm das Durchschnittsalter allogenen stammzelltransplantierten Patienten in den letzten Jahren kontinuierlich um mehrere Jahre zu [Mc Sweeney 2001, IBMTR 2003]. Dieser Trend spiegelt sich auch in der Zunahme des medianen Alters allogenen stammzelltransplantierten Patienten an der Charité von 38 auf 43 Jahre zwischen 1998 und 2003 wider. Außerdem wurden Patienten mit Rezidiven nach vorhergehender konventioneller Stammzelltransplantation oder intensiven Radio- und Chemotherapieregimen, Patienten mit infektiösen Lungeninfiltraten, anderen Organschäden und Patienten in reduziertem Allgemeinzustand einer NST zugeführt [Mc Sweeney 2001]. Schließlich werden NST bei nichtmalignen hämatologischen Erkrankungen und bei soliden Tumoren, die einer Immuntherapie zugänglich erscheinen, in klinischen Studien geprüft [Slavin 1998, Childs 2000].

Trotz breiter Anwendung liegen bisher keine prospektiven Studiendaten zum Vergleich mit myeloablativen Konditionierungsprotokollen vor. Die Komplikationsrate nach NST war nur in einzelnen retrospektiven Untersuchungen geringer als nach Standardtransplantation [Chakraverty 2002, Fukuda 2003, Mielcarek 2003], in der Mehrzahl der allerdings unkontrollierten Untersuchungen war die Infektions- und GvHD-Rate nach NST hoch [Bornhäuser 2001, Mc Sweeney 2001, Corradini 2002, Kröger 2002, Or 2003].

Mehrere Studien wiesen trotzdem eine niedrige transplantationsassoziierte Mortalität auf [Mc Sweeney 2001, Dreger 2003a]. In einer ungematchten Fall-Kontrollstudie bei 52 Patienten mit MDS war das Rezidivrisiko nach 2 Jahren in der Gruppe der 23 NST-Patienten etwas höher, die TRM jedoch geringer. Erkrankungsfreies Überleben und das Gesamt-Überleben waren nach 2 Jahren in beiden Gruppen gleich, obwohl die NST-Patienten im Median über 10 Jahre älter waren, eine höhere Komorbidität und einen höheren Anteil unverwandter Transplantationen aufwiesen [Parker 2002]. In einer bisher nur als Kongressbeitrag vorliegenden Analyse von 453 Patienten mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen, die eine niedrig dosierte Ganzkörperbestrahlung mit oder ohne Fludarabin vor NST erhalten hatten, lag die kumulative TRM nach einer bis zu 5-jährigen Nachbeobachtungszeit bei 22% trotz eines medianen Patientenalters von 55 Jahren und eines Fremdspenderanteils von 33% [Sandmaier 2003].

Nichtmyeloablative Stammzelltransplantationen wurden bisher überwiegend bei Erkrankungen mit langsamer Wachstumskinetik durchgeführt; CML in chronischer Phase, CLL, NHL und multiple Myelome stellten die Mehrzahl der Patienten in diesen Studien. Wegen ihrer hohen Rezidivrate und der raschen Erkrankungsprogression wurden Patienten mit AML und ALL bisher selten in dosisreduzierten Protokollen behandelt [Giralt 1997, Khouri 1998, Slavin 1998, Bornhäuser 2001, Mc Sweeney 2001].

Ziel dieser Arbeit waren daher Untersuchungen zum Stellenwert der nichtmyeloablative Stammzelltransplantation und adoptiven Immuntherapie mit Spenderlymphozyteninfusionen bei akuten Leukämien.

5.2. Nichtmyeloablative Stammzelltransplantation bei akuten Leukämien

Die bisher größte Beobachtungsstudie zur ALL nach NST umfasste 22 Patienten in 13 Transplantationszentren im Rahmen der deutschen Studiengruppe zur Behandlung der ALL (GM-ALL) und wurde von unserer Arbeitsgruppe an der Charité ausgewertet. 16/22 Patienten hatten eine fortgeschrittene ALL. Bei 11 Patienten wurde die NST als Salvagetransplantation nach Versagen einer Standardtransplantation durchgeführt. Nur 1/22 Patienten hatte ein Transplantatversagen. Eine Kontrolle der HvG-Reaktion war damit auch bei rasch proliferierenden Neoplasien durch niedrig dosierte Konditionierung und Post-Transplantationsimmunsuppression möglich. Nach Transplantation erreichten 13/16 Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung eine komplette Remission. Damit konnte bei der Mehrzahl der Patienten mit rezidivierter oder refraktärer ALL zumindest vorübergehend eine komplette Remission erzielt werden. Die Komplikationsrate war sehr hoch und am Ende des Nachbeobachtungszeitraums lebten lediglich noch 4/22 Patienten; alle überlebenden Patienten hatten sich in kompletter Remission vor NST befunden. Chimärismusdaten lagen bei dieser heterogenen Gruppe nicht in ausreichendem Maße vor [Arnold 2002]. Diese multizentrische Untersuchung zeigte, dass Patienten mit ALL von einer dosisreduzierten Konditionierung profitieren können, wenn diese bei kontrollierter Erkrankung durchgeführt wird.

Mit der vorliegenden unizentrischen Fall-Kontrollstudie liegt die erste gematchte Vergleichsuntersuchung vor, die GvHD, Infektionen, Rezidive, erkrankungsfreies Überleben und Gesamtüberleben bei Patienten mit akuten Leukämien nach NST gegenüber einer Standardtransplantation untersucht.

Unsere Untersuchungen belegen, dass nichtmyeloablative Stammzelltransplantationen auch bei Patienten mit fortgeschrittener ALL oder AML trotz erheblicher Komorbidität und Kontraindikationen gegen eine myeloablative Konditionierung durchgeführt werden können und sind damit

im Einklang mit den Ergebnissen der NST bei langsamer proliferierenden Neoplasien wie CML, NHL und MM [Giralt 1997, Khouri 1998, Mc Sweeney 2001].

Nahezu die Hälfte unserer Patienten (14/30) hatte mehr als 1 Kontraindikation gegen eine Standardtransplantation. Obwohl ein Viertel der Patienten über 50 Jahre alt war (8/30 Patienten), war das mediane Alter mit 45 Jahren 11 Jahre unter demjenigen der von Mc Sweeney publizierten Patienten [Mc Sweeney 2001]. Unsere Patienten wiesen jedoch andere Risikofaktoren auf, da ein Viertel der Patienten (8/30 Patienten) bereits eine vorhergehende Standardtransplantation erhalten hatte und ein Drittel der Patienten (11/30 Patienten) zum Zeitpunkt der NST pulmonale oder hepatolienale infektiöse Infiltrate hatte. Diese beiden Untergruppen waren deutlich jünger, das Risikoprofil der beiden Studiengruppen ist damit nicht vergleichbar.

5.3. Wahl des optimalen dosisreduzierten Konditionierungsregimes

Die Frage nach dem optimalen dosisreduzierten Konditionierungsregime kann derzeit nicht beantwortet werden. Verschiedene Therapieansätze, auch als Mini- oder Mikrotransplantationen oder anfänglich „Transplant-lite“ bezeichnet, wurden angewandt [Khouri 1998, Slavin 1998]. Gemeinsam ist allen Vorgehensweisen die ausgeprägte immunsuppressive Wirkung der Konditionierung und medikamentöse Immunsuppression nach Transplantation zur Überwindung der doppelten Immunbarriere [Yu 1998]. Der Begriff „nichtmyeloablativ“ bezieht sich weniger auf das Konditionierungsregime allein, sondern vielmehr auf das gesamte Therapiekonzept von der Konditionierungsmodifikation mit dem Ziel der Senkung der Akuttoxizität über die Kinetik des Anwachsens der Spenderzellen und vorübergehenden Persistenz der Empfängerhämatopoese und Gabe von Spenderlymphozyten als adoptiver Immuntherapie bei gemischtem Chimärismus nach Transplantation.

In unseren eigenen Untersuchungen traten Abstoßungsreaktionen nur sehr selten auf, obwohl zwei Drittel der Patienten vor NST eine unkontrollierte Erkrankung hatten, ein Drittel einen unverwandten Spender und die meisten Patienten eine Monoprophylaxe der GvHD mit CSA erhalten hatten. Andere Gruppen hatten bis zu 20% Transplantatversagen nach NST [Bornhäuser 2001, Mc Sweeney 2001]. Daraufhin wurde die Konditionierungstherapie um Fludarabin erweitert mit anschließendem stabilen Anwachsen [Mc Sweeney 2001].

Bei Lymphomen war nach dosisreduzierter Konditionierung die Zeit bis zur maximalen Lymphomregression erheblich verzögert [Khouri 1998], so dass wir ein Protokoll intermediärer Intensität für Patienten mit akuten Leukämien wegen des hohen Rezidivrisikos früh nach Transplantation gewählt hatten [Slavin 1998]. Die Konditionierung wurde meist gut vertragen und die Zeit bis zur hämatopoetischen Rekonstitution war kurz. Die Patienten wurden nach NST im Me-

dian 9 Tage früher aus der stationären Behandlung entlassen als nach Standardtransplantation. Ob eine niedrigere ATG-Dosis bei diesen Patienten ebenfalls eine ausreichende Empfänger- und Spenderimmunsuppression mit stabilem Anwachsen ermöglicht, wurde bisher nicht untersucht. Der nichtmyeloablative Charakter des verwendeten Protokolls zeigte sich an der signifikant höheren Rate von Patienten mit gemischtem Chimärismus in der frühen Posttransplantationsphase und der Tatsache, dass mehrere Patienten keine Thrombopenie $< 25/\text{nl}$ nach NST entwickelten. Die eigenen Untersuchungen konnten damit das Konzept der dosisreduzierten Konditionierung auch für akute Leukämien bestätigen. Die Frühtoxizität war bei den stationären Patienten gering.

5.4. Komplikationen nach nichtmyeloablativer Stammzelltransplantation

Die Erwartung an dosisreduzierte Konditionierungsregime war eine Senkung der transplantationsassoziierten Morbidität und Mortalität. Die bisherigen Studien haben die Hoffnungen bezüglich der Morbiditätssenkung nicht erfüllt. Die Inzidenz der behandlungspflichtigen akuten GvHD Grad II-IV betrug in den meisten Studien 40 bis $> 50\%$ [Corradini 2002, Or 2003], nur vereinzelt war sie deutlich geringer [Chakraverty 2002]. Auffallend war das oft verspätete Auftreten der akuten GvHD [Mc Sweeney 2001, Mielcarek 2003, Or 2003]. Eine ausgedehnte chronische GvHD trat bei 15 - 40% auf [Bornhäuser 2001, Corradini 2002, Mielcarek 2003, Or 2003]. Die ebenfalls häufigen Infektionen traten gegenüber myeloablativer Konditionierung häufig verspätet nach hämatopoetischer Rekonstitution auf [Mohty 2000, Chakrabarti 2002, Junghanss 2002, Massenkeil 2002]. Auch in den eigenen Untersuchungen war die Rate akuter und chronischer GvHD nach NST so hoch wie nach Standardtransplantation. Außerdem entwickelten viele Patienten Infektionen nach NST.

GvHD

Für das häufige Auftreten einer akuten und chronischen GvHD in unseren Untersuchungen und anderen Studien können mehrere Ursachen angeführt werden:

Erstens stellt das höhere Durchschnittsalter nichtmyeloablative stammzelltransplantierte Patienten einen Risikofaktor für die Entwicklung der GvHD dar [Sullivan 1991].

Zweitens wurde die GvHD-Prophylaxe nach NST in allen Studien nur als Mono- oder Doppeltherapie durchgeführt im Gegensatz zur myeloablativen Stammzelltransplantation, nach der die GvHD-Prophylaxe mit einer Zweier- oder Dreier-Kombinationstherapie durchgeführt wird [Slavin 1998, Arnold 2002].

Drittens wurde von uns wegen der geringeren Konditionierungsintensität und der erhöhten Rate von Patienten mit gemischtem Chimärismus nach Transplantation eine frühe Reduktion der Im-

munsuppression angestrebt, um bei den Hochrisikoleukämien eine rasche Chimärismuskonversion zu erreichen.

Viertens wurde der gemischte Chimärismus als Basis für eine adoptive Immuntherapie mit DLI betrachtet, die häufig eine GvHD auslösten [Kolb 1995, Massenkeil 2002].

Die GvHD entwickelte sich nach NST spät im Vergleich zur Standardtransplantation. Das verzögerte Auftreten der akuten GvHD ist durch den nichtmyeloablativen Charakter der Konditionierung erklärbar. Da das Empfängerimmunsystem durch die reduzierte Konditionierungsintensität nicht vollständig eradiziert wird, kommt es zu einer höheren Rate an gemischtem Chimärismus. Dieser vermindert das Risiko für eine frühe GvHD [Childs 1999]; die frühe GvHD geht mit einer erhöhten transplantationsassoziierten Mortalität einher [Martin 1990]. Nach Reduktion der Immunsuppression und Gabe von DLI kommt es verspätet zu einer Chimärismuskonversion und spätem Auftreten einer GvHD. Nach Erweiterung der immunsuppressiven Therapie um MMF sank die GvHD-Rate bei unseren Patienten deutlich.

Im Gegensatz dazu führt die myeloablative Hochdosistherapie zu einer raschen Chimärismuskonversion mit früher GvHD [Glucksberg 1974]. Zusätzlich stellt die toxische Organ- und Schleimhautschädigung durch die hochdosierte Konditionierung einen Risikofaktor für eine akute GvHD dar [Clift 1990, Hill 1997].

Infektionen

Die niedrige Sterblichkeit an Infektionen in unserer Untersuchung lässt sich durch mehrere Faktoren erklären:

Erstens senkt die kürzere Neutropeniezeit, wie wir sie nach dosisreduzierter Konditionierung erwartungsgemäß beobachteten, das Risiko für schwere bakterielle und mykotische Infektionen, da diese erst gehäuft nach über 10-tägiger Neutropeniedauer auftreten [Bow 1998].

Zweitens beeinflusste die Art der aufgetretenen Infektionen die Mortalitätsrate. Fieber unklarer Genese gilt nicht als schwere Infektion bei Patienten mit kurzer Neutropeniedauer und hat eine geringe Mortalität [Krüger 1999]. Keiner unserer Patienten verstarb an grampositiver oder gramnegativer Sepsis. Patienten mit Nachweis koagulase-negativer Staphylokokken hatten zwar eine klinische Infektion und einige entwickelten eine Sepsis, sie erholten sich aber rasch nach Entfernen des zentralen Venenkatheters und resistenzgerechter antibiotischer Therapie. Patienten mit der Anamnese einer Pilzinfektion und residuellen Infiltraten erhielten eine sekundäre antimykotische Prophylaxe, da reaktivierte Pilzinfektionen nach Stammzelltransplantation eine sehr hohe Letalität haben [Offner 1998]. Trotzdem kam es zu Reaktivierungen der Infektionen, die auch

nach hämatopoetischer Rekonstitution auftraten, und durch die anhaltende Immunsuppression erklärbar sind [Wald 1997]. Keiner dieser Patienten verstarb jedoch an der Pilzinfektion.

Eine Senkung der TRM nach NST ist nach unseren Ergebnissen trotz hoher GvHD- und Infektionsrate bei akuten Leukämien möglich. Gemischter Chimärismus und geringere Intensität der Konditionierung verhindern eine frühe GvHD. Nach Reduktion der Immunsuppression und Chimärismuskonversion kommt es zu einer verzögerten akuten GvHD [Mielcarek 2003]. Zu diesem Zeitpunkt ist die akute Organ- und Schleimhauttoxizität der Konditionierung weitgehend abgeklungen, die Schleimhäute sind abgeheilt und die Patienten haben frühe Infektionen bereits ohne gleichzeitige GvHD überwunden.

In der von uns durchgeführten Fall-Kontrollstudie bestätigte sich die signifikant niedrigere transplantationsassoziierte Mortalität gegenüber einer konventionellen, hochdosierten Konditionierung. Die transplantationsassoziierte Mortalität variierte erheblich in den bisher publizierten Studien [Bornhäuser 2001, Mc Sweeney 2001, Chakrabarti 2002, Sandmaier 2003]. Insgesamt sind die Studien aber zu klein und aufgrund unterschiedlicher Patientenselektion, Krankheitsstatus, Konditionierungsregime, Spender und HLA-Kompatibilität zu heterogen, um sie miteinander vergleichen zu können. In einer retrospektiven Vergleichsuntersuchung bei 448 Patienten mit CLL wurde auch eine signifikant geringere transplantationsassoziierten Mortalität nach NST beobachtet [Dreger 2003b].

5.5. Prädiktiver Wert des gemischten Chimärismus und prophylaktischer Einsatz von Spenderlymphozyten

Die frühe Entdeckung eines Leukämie rezidivs nach allogener Stammzelltransplantation ist wegen fehlender Erkrankungsmarker mit ausreichender Vorlaufzeit vor dem Auftreten des klinischen Rezidivs und der raschen Rezidivkinetik nur bedingt möglich. Durch sequenzielle Chimärismusuntersuchungen konnte bei unseren Patienten über die Persistenz oder Zunahme von Empfängerzellen ein beginnendes Rezidiv frühzeitig festgestellt werden. Die Wertigkeit der hochauflösenden Chimärismusanalyse war vor allem bei Patienten ohne zytogenetische oder molekulare Leukämiemarker offensichtlich. Obwohl durch die Chimärismusanalyse nicht zwischen residuellen gesunden Empfängerzellen und einem beginnenden Rezidiv unterschieden werden kann, zeigen unsere eigenen Daten wie auch diejenigen anderer Autoren, dass persistierende oder zunehmende Empfängerzellen ein drohendes Rezidiv anzeigen [Bader 1998, Lion 2001]. Nur die Analyse von Leukozytensubpopulationen erwies sich erwartungsgemäß als sensitiv genug, um frühzeitig einen Wiederanstieg der Empfängerzellen detektieren zu können [Fredriksson 2004].

Die methodische Beschränkung der Chimärismusanalyse erklärt nicht vollständig die Assoziation zwischen gemischtem Chimärismus und Rezidiv, da auch persistierende lymphatische Zellen prädiktiv für ein späteres Rezidiv einer akuten oder chronischen myeloischen Leukämie waren. Einen stabilen gemischten Chimärismus ohne Rezidiv konnten wir damit bei unseren Patienten nicht beobachten.

Der gemischte Chimärismus kann als Basis für eine anschließende Immuntherapie mit Spenderlymphozyten genutzt werden. Tierexperimentelle Daten haben gezeigt, dass die Interaktion von Spender-T-Lymphozyten mit antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers entscheidend für die Entwicklung einer akuten GvHD ist [Shlomchik 1999]. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein gemischter Chimärismus eine Voraussetzung für einen DLI-vermittelten GvT-Effekt ist [Mapara 2002].

Bei den behandelten Patienten mit Hochrisikoleukämien und/oder gemischtem Chimärismus gelang durch eskalierende DLI-Gabe eine signifikante Abnahme der Patienten, die einen gemischtem Chimärismus hatten. Nur diejenigen Patienten mit akuten Leukämien, die durch Spenderlymphozytengabe in einen kompletten Spenderchimärismus konvertierten, erreichten eine anhaltende komplette Remission. Bei pädiatrischen Patienten mit akuten Leukämien schien ebenfalls durch frühzeitige Gabe von Spenderlymphozyten ein Rezidiv verhinderbar [Bader 1999]. Der prognostische Wert des Chimärismusstatus zeigte sich darin, dass alle Patienten mit persistierendem gemischtem Chimärismus trotz Spenderlymphozytengabe rezidierten [Masenkeil 2003]. Dies betraf Patienten nach nichtmyeloablativer wie auch nach myeloablativer Stammzelltransplantation. Damit konnten wir den aus Tierversuchen postulierten günstigen Einfluss eines anhaltenden gemischten Chimärismus bei unseren Patienten nicht bestätigen [Storb 1999]. Zum einen müssen immunologische Unterschiede zwischen dem Hundemodell und klinischen Untersuchungen angenommen werden, zum anderen ist wahrscheinlich die Biologie rasch proliferierender Neoplasien wie der akuten Leukämien für dieses Ergebnis verantwortlich. Akute Leukämien scheinen nach Transplantation einen stabilen gemischten Chimärismus zur Entwicklung einer Toleranz ohne Rezidiv nicht zuzulassen. Die Instabilität des gemischten Chimärismus wurde inzwischen von anderen Autoren auch bei langsamer wachsenden Neoplasien festgestellt [Mc Sweeney 2001]. Obwohl prophylaktische DLI zu einer effektiven Konversion des Chimärismus führten, der eine Voraussetzung für eine anhaltende komplette Remission bei unseren Patienten war, ist der Stellenwert einer prophylaktischen DLI-Gabe für das erkrankungsfreie Überleben in den von uns und anderen Autoren vorgelegten Studien nicht endgültig zu belegen. Dies kann nur durch kontrollierte und randomisierte Studien geschehen.

Die Grenzen der Sensitivität der Chimärismusanalyse zeigten sich bei sehr geringen persistierenden Leukämiezellzahlen, wie bei einem molekularbiologischen Rezidiv einer CML. Bei zytogenetischen Rezidiven der CML ging aber der gemischte Chimärismus immer der Diagnose des Rezidivs voraus. In Zukunft kann die vor einer breiteren Einführung stehende Automatisierung der Chimärismusanalyse und Untersuchung von Einzelnukleotidpolymorphismen (single-nucleotide polymorphisms, SNR) zu einer Vereinfachung der Analytik und einer Sensitivitätserhöhung führen [Fredriksson 2004].

Die Gabe von DLI war mit einer hohen Morbidität assoziiert, vor allem durch das Auftreten einer teilweise sehr schweren GvHD bei zwei Drittel der Patienten. Dabei traten bei vielen Patienten schwere Diarrhoen wie bei akuter GvHD auf. Ebenso wie bei der verzögert auftretenden akuten GvHD ohne vorherige DLI-Gabe entsprach das klinische Erscheinungsbild dieser spät einsetzenden GvHD nach DLI jenseits von Tag + 100 einer frühen akuten GvHD („late onset acute GvHD“) [Mielcarek 2003]. Die klassische Einteilung einer GvHD in akute oder chronische Form anhand des Zeitpunktes des Auftretens der GvHD wird der veränderten Klinik der GvHD nach dosisreduzierten Konditionierungsverfahren und Gabe von DLI nur noch unzureichend gerecht.

Wegen der hohen GvHD-Rate reduzierten wir die erste Zelldosis um eine halbe logarithmische Stufe, da die GvHD-Rate bei Zellzahlen über 1×10^7 CD3-positiven Zellen/kg KG deutlich zunimmt [Mackinnon 1995, Guglielmi 2002]. Ebenso vervierfacht sich bei hohen Einstiegsdosen die DLI-induzierte Mortalität [Guglielmi 2002].

Das Risiko für eine Myelosuppression nach DLI wurde in ersten Studien mit 25 - 36% bei akuten Leukämien angegeben [Kolb 1995], scheint aber nach neueren Veröffentlichungen geringer zu sein [Porter 2000]. Wir beobachteten lediglich bei einem Patienten mit AML und einem mit metastasiertem Nierenzellkarzinom eine lang anhaltende Knochenmarkaplasie nach DLI, an deren Folgen einer der beiden Patienten später verstarb. Bei beiden Patienten war es kurz vor der 1. DLI-Gabe zu einem Absinken des Anteils der Spenderzellen gekommen, so dass eine starke allogene Reaktion der Spenderlymphozyten gegen die wieder dominierende Empfängerhämatoopoese postuliert werden muss. Insgesamt ist die Morbidität und Mortalität der adoptiven Immuntherapie aber vor allem durch GvHD und assoziierte Infektionen hoch [Porter 2000]. Beide Patienten, die nach NST in unserer Klinik verstarben, hatten vorher Spenderlymphozyten erhalten und im Anschluss daran eine schwere GvHD mit anschließender Sepsis bzw. Pneumonie entwickelt. Wir verschoben die 1. DLI-Gabe über Tag + 100 nach Transplantation hinaus, da nach einer ersten Auswertung unserer Patienten die spätere Gabe von DLI mit einer geringeren GvHD-Rate

verbunden war, obwohl der Unterschied nicht statistisch signifikant war. Die Verschiebung ermöglicht wahrscheinlich ein weiteres Abklingen der Konditionierungstoxizität und einen größeren Zeitabstand zwischen Reduktion oder Absetzen der Immunsuppression und DLI-Gabe.

5.6. Therapeutischer Einsatz von Spenderlymphozyten im Rezidiv

Eine engmaschige sequenzielle Chimärismusanalyse kann bei einigen Patienten früh Rezidive detektieren. Eine therapeutische Gabe von DLI kam überwiegend bei Patienten nach myeloablativer Stammzelltransplantation zum Einsatz, da die prophylaktische Gabe von DLI bei gemischtem Chimärismus nicht Teil des Posttransplantationskonzeptes bei diesen Patienten war. Allerdings hatte die nach Rezidivdiagnose eingeleitete adoptive Immuntherapie keinen relevanten Einfluss auf den weiteren Krankheitsverlauf. Bei einzelnen Patienten kam es nach DLI vorübergehend zu einer Reduktion der Blastenzahl und Abnahme des Empfängerzellanteils, dieser Effekt wurde aber mit einer schweren GvHD erkaufte; der anti-leukämische Effekt hielt maximal 2 Monate an. Bei einem Patienten mit Rezidiv einer AML 5 Monate nach Standardtransplantation wurde ein 18 Monate lang anhaltender GvL-Effekt nach Absetzen der Immunsuppression ohne DLI beobachtet.

Nur bei Patienten mit CML war ein remissionsinduzierender Effekt der DLI festzustellen, der zu anhaltenden kompletten Remissionen führte. Dieses Ergebnis entspricht den veröffentlichten Daten zum therapeutischen Effekt der DLI bei rezidierten akuten Leukämien [Kolb 1995, Collins 1997, Porter 2000]. Wir halten daher weiterhin das Konzept einer frühzeitigen „präemptiven“ Gabe von Spenderlymphozyteninfusionen bei Patienten mit akuten Leukämien für prüfungswert, da nur ein prophylaktischer Einsatz im Gegensatz zum therapeutischen Einsatz einer adoptiven Immuntherapie bei rasch proliferierenden Neoplasien erfolgsversprechend ist.

5.7. Überleben nach nichtmyeloablativer Stammzelltransplantation bei akuten Leukämien

Die von uns beobachtete höhere Rezidivrate nach nichtmyeloablativer Stammzelltransplantation gegenüber der Standardtransplantation ist ein gewichtiges Argument für eine strenge Indikationsstellung zur nichtmyeloablativen Stammzelltransplantation. Patienten mit M. Hodgkin [Sureda 2003] oder MDS [Parker 2002] hatten in retrospektiven Vergleichsuntersuchungen keine erhöhte Rezidivrate nach NST; anders dagegen CLL-Patienten [Dreger 2003b]. Die zugrundeliegende Erkrankung muss damit bei der Auswahl des Konditionierungsverfahrens neben den be-

kannten Risikofaktoren für eine Standardtransplantation in die Entscheidung über das geeignete Konditionierungsprotokoll mit einfließen.

Die Überlebenskurven der Patienten mit akuten Leukämien in Kapitel 4.4. verdeutlichen, dass der höheren Rezidivrate nach nichtmyeloablativer Stammzelltransplantation eine deutlich höhere Rate transplantationsassoziiierter Todesfälle nach myeloablativer Transplantation gegenüberstand. Letztere waren vor allem durch Infektionen und GvHD bedingt. Das erkrankungsfreie und das Gesamt-Überleben in beiden Gruppen waren aber nach 3 Jahren fast identisch.

Nach unseren Ergebnissen hat das gewählte Konditionierungsprotokoll keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben akuter Leukämien nach allogener Stammzelltransplantation im Unterschied zu bekannten Faktoren des erkrankungsfreien Überlebens nach Transplantation wie Stadium der Erkrankung, zytogenetischer Risikogruppe und GvHD. Die von uns vorgelegten Untersuchungen zeigen, dass trotz höherer Rezidivrate das Überleben nach NST dem nach Standardtransplantation vergleichbar ist. Dies ist bedingt durch die Absenkung der TRM bei Patienten mit akuten Leukämien. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den bisher ausschließlich retrospektiven und im Unterschied zu unserer Untersuchung unkontrollierten Vergleichsstudien anderer Autoren bei MDS, CLL und Morbus Hodgkin wider [Parker 2002, Dreger 2003b, Sureda 2003]. Nur große kontrollierte und randomisierte Studien, die möglichst krankheitsspezifisch durchgeführt werden sollten, können die Frage nach Gleichwertigkeit der beiden Konditionierungsregime beantworten.

5.8. Nichtmyeloablative Stammzelltransplantation bei metastasierten Nierenzellkarzinomen

Die Erfahrungen mit der NST bei akuten Leukämien und anderen hämatologischen Neoplasien haben zu einer raschen Etablierung dosisreduzierter Konditionierungsregime und der adoptiven Immuntherapie geführt. Diese Entwicklung hat zu einer Indikationserweiterung der allogenen Stammzelltransplantation auch auf chemo- und immuntherapierefraktäre solide Tumore geführt. Vor allem bei metastasierten Nierenzellkarzinomen mit ihrer ausgeprägten Chemotherapieresistenz und nur moderaten Ansprechraten auf eine Immuntherapie wurde die allogene Stammzelltransplantation nach dosisreduzierter Konditionierung untersucht [Amato 2000, Childs 2000, Atzpodien 2001].

Von sechs weiteren Studiengruppen wurden bisher 70 Patienten mit Nierenzellkarzinomen nach NST veröffentlicht [Childs 2000, Bregni 2002, Pedrazzoli 2002, Rini 2002, Hentschke 2003, Ueno 2003]. Die meisten Patienten hatten vor Stammzelltransplantation Operationen, Radio- und

Chemotherapien und Lasertherapie erhalten. Der Primärtumor war bei fast allen Patienten reseziert worden, da nephrektomierte Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen ein besseres Ansprechen und Überleben nach Interferon-haltiger Immuntherapie aufweisen [Mickisch 2001]. 64/70 Patienten (91%) hatten in einer gepoolten Datenanalyse eine Immuntherapie erhalten und wurden nach Versagen der Immuntherapie einer Transplantation zugeführt.

Das optimale Konditionierungsregime für diese Patienten ist unbekannt; unsere 7 Patienten sowie die meisten bisher behandelten Patienten erhielten ein Fludarabin- und Cyclophosphamidhaltiges Konditionierungsregime. 91% der Patienten in der Literatur sowie unsere 7 Patienten hatten ein rasches und stabiles Anwachsen des Transplantates [Childs 2000, Bregni 2002, Pedrazzoli 2002, Rini 2002, Hentschke 2003, Ueno 2003].

Diese Arbeiten und eigene Erfahrungen bestätigen die Durchführbarkeit der NST bei refraktären fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen. Wegen der ausgeprägten Chemotherapieresistenz erwarteten wir kein frühes Ansprechen auf die NST. Komplette und partielle Remission wurden erst nach mehreren Monaten beobachtet, ebenso wie bei Childs et al., der bei mehreren Patienten eine rasche Tumorprogression in den ersten Monaten nach NST feststellte, bei längerer Nachsorgezeit dann aber eine Tumorrückbildung beobachtete [Childs 2000].

Erst nach stabilem Transplantatanwachsen durch suffiziente Immunsuppression und Substitution der Empfängerhämatoopoese durch Spenderzellen kommt es zur Chimärismuskonversion, die als entscheidend für den Erfolg der Therapie angesehen wird [Childs 1999]. Der verzögerte gemischte Chimärismus, den wir in den verschiedenen Leukozytensubpopulationen beobachteten, ist mit dem Konzept der NST gut vereinbar und wurde bereits diskutiert [Storb 1999, Spitzer 2000].

Die Konversion zu einem kompletten Spenderchimärismus wurde durch Gabe von Spenderlymphozyten bei 4 Patienten und Auftreten einer GvHD bei 2 Patienten nach Absetzen der Immunsuppression beschleunigt. Ein GvT-Effekt durch DLI oder GvHD scheint bei Nierenzellkarzinomen, wie bei hämatologischen Erkrankungen, in der Lage zu sein, eine Chimärismuskonversion und Remission zu induzieren [Kolb 1995, Childs 2000, Orsini 2000, Massenkeil 2003].

Die Häufigkeit akuter und chronischer GvHD variierte erheblich in den publizierten Studien, die kleine Zahl der Patienten in den einzelnen Studien sowie Heterogenität der Patientencharakteristika und Therapieführung ist dafür wahrscheinlich verantwortlich. Über alle Studien zusammengekommen war die GvHD-Rate allerdings hoch (akute GvHD 46%, chronische GvHD 42%), erklärbar durch das fortgeschrittene Patientenalter und die frühe Reduktion der GvHD-Prophylaxe bei Tumorprogression oder protrahiertem gemischtem Chimärismus. Bei diesen Patienten wurden ebenso wie in unserer Studie DLI frühzeitig verabreicht, um einen GvT-Effekt zu provozieren.

Einer unserer 7 Patienten verstarb an einer Sepsis nach protrahierter Panzytopenie im Anschluß an DLI. 14 der 70 publizierten Patienten verstarben an Infektionen und GvHD. Damit ist die TRM mit 20% in der Literaturzusammenfassung dieser Patientengruppe relativ hoch verglichen mit hämatologischen Systemerkrankungen nach NST [Slavin 1998, Mc Sweeney 2001, Kröger 2002].

Von 29 initial für eine NST in Betracht gekommenen Patienten unseres Zentrums wurden nur 7 allogenen transplantiert. Von den nicht transplantierten 22 Patienten hatten zum Evaluationszeitpunkt nur noch 3 Patienten ein stabiles Tumorstadium, die anderen waren progredient oder bereits an der Erkrankung verstorben. Keiner dieser Patienten hatte eine partielle oder komplette Remission nach Ausschluß von der Transplantation durch andere Therapiemodalitäten erreicht. Die kleinen Patientenzahlen lassen keinen statistischen Vergleich zwischen transplantierten und nicht transplantierten Patienten zu. Erwähnenswert ist aber die Tatsache, dass 5/7 Patienten schwere Komplikationen nach NST entwickelten, an denen 1 Patient verstarb.

Eine komplette Remission erreichten 6 Patienten, eine partielle Remission 16 von 66 auswertbaren Patienten der Literatur (Ansprechrate 33%). Die Tumorrückbildungen traten bei den meisten Patienten jenseits von Tag + 100 auf. Die Ansprechraten liegen damit günstiger als die Ergebnisse der Immuntherapie [Atzpodien 2001].

Bei 20/22 Patienten, die ein Tumoransprechen hatten, trat eine akute oder chronische GvHD auf. Diese scheint eine Voraussetzung für die Tumorregression zu sein, ein Befund, der durch die Existenz eines GvT-Effektes bei Nierenzellkarzinomen erklärt werden kann. Allerdings fand sich eine akute oder chronische GvHD auch bei 19/44 Patienten, deren Tumor sich nach NST nicht zurückbildete. Einzelne Patienten der Literatur sowie einer unserer eigenen Patienten hatten objektivierbare Tumorrückbildungen ohne GvHD, was für einen GvT-Effekt auch ohne GvHD spricht.

Eigene Erfahrungen und publizierte Ergebnisse zeigen die Risiken der NST bei metastasierten Nierenzellkarzinomen, aber auch die Durchführbarkeit eines immunologischen Therapiekonzeptes bei soliden fortgeschrittenen Tumoren. Das Therapieverfahren ist bei diesen meist über 50-jährigen daher nach wie vor als experimenteller Therapieansatz zu betrachten.

6. Zusammenfassung und Perspektiven

Unsere Untersuchungen belegen, dass nichtmyeloablative Stammzelltransplantationen bei Patienten mit Hochrisiko-ALL oder –AML eine neue therapeutische Option darstellen.

Die nichtmyeloablative Stammzelltransplantation (NST) ermöglichte eine allogene Stammzelltransplantation bei Transplantationskandidaten mit Kontraindikationen gegen eine hochdosierte Strahlen- und Chemotherapie (Standardtransplantation). Nach NST kam es häufig zur Entwicklung von Infektionen und einer spät auftretenden akuten GvHD; im Unterschied zur Standardtransplantation waren diese jedoch mit einer geringeren Mortalität verbunden.

Das erkrankungsfreie Überleben und das Gesamt-Überleben waren nach nichtmyeloablativer und nach myeloablativer Stammzelltransplantation fast gleich. Der höheren Rezidivrate nach NST stand eine höhere transplantationsassoziierte Mortalität nach Standardtransplantation gegenüber.

Durch eine adoptive Immuntherapie konnte bei der Mehrzahl der Leukämiepatienten mit gemischtem Chimärismus nach Transplantation, aber ohne Rezidiv eine Chimärismuskonversion und damit einhergehend eine lang anhaltende komplette Remission induziert werden, ein wichtiger Hinweis auf einen GvL-Effekt der Spender-T-Lymphozyteninfusionen.

Sequenzielle Chimärismusuntersuchungen von Leukozytensubpopulationen erlaubten eine frühe Diagnose eines gemischten Chimärismus, der einen prädiktiven Wert für das Auftreten eines Rezidivs hatte. Ein stabiler gemischter Chimärismus wurde bei diesen Patienten nicht beobachtet.

Das Konditionierungsregime selber war kein entscheidender Faktor für das Überleben der Patienten. Die Reduktion der Konditionierungsintensität senkte die Akuttoxizität der Transplantation. Engmaschige Chimärismusuntersuchungen steuerten die Dauer und Art der GvHD-Prophylaxe und den Einsatz einer adoptiven Immuntherapie.

Durch die NST rückt der immunologische Effekt der Transplantation gegenüber der Zytoreduktion bei der Standardtransplantation stärker in den Vordergrund.

Unsere Ergebnisse sprechen für die Wirksamkeit eines GvL-Effektes bei akuten Leukämien auch nach nichtmyeloablativer Stammzelltransplantation.

Die Erfahrungen mit der NST bei akuten Leukämien haben zu einer Erprobung der NST bei Patienten mit refraktären Nierenzellkarzinomen geführt. Eine verzögerte Tumorregression wurde bei unseren Patienten nach Chimärismuskonversion und der Entwicklung einer GvHD beobachtet; diese Befunde sind vereinbar mit einem Transplantat-gegen-Tumor Effekt (GvT-Effekt) nach NST. Die transplantationsassoziierte Morbidität und Mortalität war allerdings bei diesen meist älteren Patienten trotz dosisreduzierter Konditionierung erheblich. Es ist damit offensichtlich,

dass eine sorgfältige Patientenauswahl notwendig ist und die Therapie ausschließlich im Rahmen klinischer Studien erfolgen sollte, da es sich nach wie vor um ein experimentelles Therapieverfahren handelt. Die beobachtete Toxizität bei akuten Leukämien und Nierenzellkarzinomen zeigt die Nachteile des Therapiekonzeptes auf.

In Zukunft könnte die Verstärkung der GvHD-Prophylaxe in der frühen Phase nach nichtmyeloablative Stammzelltransplantation und eine Verschiebung der Spenderlymphozyteninfusionen zu einer Senkung der Morbidität nach Transplantation führen. Durch Einsatz hochauflösender Chimärismusuntersuchungen mit Hilfe von Mikroarrays sowie zusätzlicher Untersuchung minimal residueller Erkrankung könnte eine zeitgerechte Analytik für die Indikation zum Einsatz von Spenderlymphozyteninfusionen erfolgen. Die Analyse minimal residueller Erkrankung und Korrelation mit der Chimärismusuntersuchung von Leukozytensubpopulationen sollte die Bedeutung des gemischten Chimärismus in Zukunft weiter klären.

In naher Zukunft müssen prospektive vergleichende Studien durchgeführt werden, um den Stellenwert der NST besser beurteilen zu können. Durch prospektive Studien können Informationen gewonnen werden, die eine Entscheidungshilfe bei der Indikationsstellung zur nichtmyeloablative Stammzelltransplantation bieten.

Literaturverzeichnis

ACCP/SCCM Consensus conference (1992) **Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis.** Crit Care Med 20: 864-874

Anasetti C, Amos D, Beatty PG, Appelbaum FR, Bensinger W, Buckner CD, Clift R, Doney K, Martin PJ, Mickelson E, Nisperos B, O'Quigley J, Ramberg R, Sanders JE, Stewart P, Storb R, Sullivan KM, Witherspoon RP, Thomas ED, Hansen JA (1989) **Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma.** N Engl J Med 320: 197-204

Andreani M, Manna M, Lucarelli G, Tonucci P, Agostinelli F, Ripalti M, Rapa S, Talevi N, Galimberti M, Nesci S (1996) **Persistence of mixed chimerism in patients transplanted for the treatment of thalassemia.** Blood 87: 3494-3499

Amato RJ (2000) **Chemotherapy for renal cell carcinoma.** Semin Oncol 27: 177-186

Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giral S, Mackinnon S, Spitzer T, Weisdorf D (2001) **Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation.** Biol Blood Marrow Transplant 7: 473-485

Appelbaum FR (1987) **Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia.** Semin Oncol 24: 114-123

Arnold R, Massenkeil G, Bornhäuser M, Ehninger G, Beelen DW, Fauser AA, Hegenbart U, Hertenstein B, Ho AD, Knauf W, Kolb HJ, Kolbe K, Sayer HG, Schwerdtfeger R, Wandt H, Hoelzer D (2002) **Non-myeloablative stem cell transplantation in adults with high-risk ALL may be effective in early but not in advanced disease.** Leukemia 16: 2423-2428

Atzpodien J, Kirchner H, Illiger HJ, Metzner B, Ukena D, Schott H, Funke PF, Gramatzki M, von Jürgen S, Wandert T, Patzelt T, Reitz and DGCIN (German Cooperative Renal Carcinoma Chemo-Immunotherapy Trials Group) (2001) **IL-2 in combination with IFN- alpha and 5-FU versus tamoxifen in metastatic renal cell carcinoma: long-term results of a controlled randomized clinical trial.** Br J Cancer 85: 1130-1136

Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, Einsele H, Niemeyer C, Benda N, Faul C, Kanz L, Niethammer D, Klingebiel T (1998) **Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT.** Bone Marrow Transplant 21: 487-495

- Bader P, Klingebiel T, Schaudt A, Theurer-Mainka U, Handgretinger R, Lang P, Niethammer D, Beck JF (1999) **Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children.** *Leukemia* 13: 2079-2086
- Barnes DW, Loutit JF (1957) **Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow.** *Br J Haematol* 3; 241-252
- Barrett AJ, Rezvani K, Solomon S, Dickinson AM, Wang XN, Stark G, Cullup H, Jarvis M, Middleton PG, Chao N (2003) **New developments in allotransplant immunology.** *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*: 350-371
- Beatty PG, Clift RA, Mickelson EM, Nisperos BB, Flournoy N, Martin PJ, Sanders JE, Stewart P, Buckner CD, Storb R, Thomas ED, Hansen JA (1985) **Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings.** *N Engl J Med* 313: 765-771
- Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, Kashyap A, Flowers ME, Lilleby K, Chauncey TR, Storb R, Appelbaum FR (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
- Blaise D, Kuentz M, Fortanier C, Bourhis JH, Milpied N, Sutton L, Jouet JP, Attal M, Bordigoni P, Cahn JY, Boiron JM, Schuller MP, Moatti JP, 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
- Blin N, Stafford DW (1976) **A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes.** *Nucleic Acids Res* 3: 2303-2308
- Bornhäuser M, Kiehl M, Siegert W, Schetelig J, Hertenstein B, Martin H, Schwerdtfeger R, Sayer HG, Runde V, Kröger N, Theuser C, Ehninger G; Cooperative German Transplant Study Group (2001) **Dose-reduced conditioning for allografting in 44 patients with chronic myeloid leukaemia: a retrospective analysis.** *Br J Haematol* 115: 119-124
- Bow EJ (1998) **Infection risk and cancer chemotherapy: The impact of the chemotherapeutic regimen in patients with lymphoma and solid tissue malignancies.** *J Antimicrob Chemother* 41: 1-5
- Bregni M, Doderio A, Peccatori J, Pescarollo A, Bernardi M, Sassi I, Voena C, Zaniboni A, Bordignon C, Corradini P (2002) **Nonmyeloablative conditioning followed by hematopoietic cell allografting and donor lymphocyte infusions for patients with metastatic renal and breast cancer.** *Blood* 99: 4234-4236

Buckner CD, Clift RA, Fefer A, Lerner KG, Neiman PE, Storb R, Thomas ED (1974) **Marrow transplantation for the treatment of acute leukemia using HL-A-identical siblings.** Transplant Proc 6: 365-366

Chakrabarti S, Mackinnon S, Chopra R, Kottaridis PD, Peggs K, O’Gorman P, Chakraverty R, Marshall T, Osman H, Mahendra P, Craddock C, Waldmann H, Hale G, Fegan CD, Yong K, Goldstone AH, Linch DC, Milligan DW (2002) **High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution.** Blood 99: 4357-4363

Chakraverty R, Peggs K, Chopra R, Milligan DW, Kottaridis PD, Verfuert S, Geary J, Thurai Sundaram D, Branson K, Chakrabarti S, Mahendra P, Craddock C, Parker A, Hunter A, Hale G, Waldmann H, Williams CD, Yong K, Linch DC, Goldstone AH, Mackinnon S (2002) **Limiting transplantation-related mortality following unrelated donor stem cell transplantation by using a nonmyeloablative conditioning regimen.** Blood 99: 1071-1078

Chang AE, Li Q, Jiang G, Sayre DM, Braun TM, Redman BG (2003) **Phase II trial of autologous tumor vaccination, anti-CD3-activated vaccine-primed lymphocytes, and interleukin-2 in stage IV renal cell cancer.** J Clin Oncol 21: 884-890

Childs R, Clave E, Contentin N, Jayasekera D, Hensel N, Leitman S, Read EJ, Carter C, Bahceci E, Young NS, Barrett AJ (1999) **Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses.** Blood 94: 3234-3241

Childs R, Chernoff A, Contentin N, Bahceci E, Schrupp D, Leitman S, Read EJ, Tisdale J, Dunbar C, Linehan WM, Young NS, Barrett J (2000) **Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation.** N Engl J Med 343: 750-758

Clift RA, Buckner CD, Appelbaum FR, Bearman SI, Petersen FB, Fisher LD, Anasetti C, Beatty P, Bensinger WI, Doney K (1990) **Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: A randomised trial of two irradiation regimens.** Blood 76: 1867-1871

Collins RH Jr, Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL, Giralt S, Champlin R, Goodman SA, Wolff SN, Hu W, Verfaillie C, List A, Dalton W, Ognoskie N, Chetrit A, Antin JH, Nemunaitis J (1997) **Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation.** J Clin Oncol 15: 433-444

Corradini P, Tarella C, Olivieri A, Gianni AM, Voena C, Zallio F, Ladetto M, Falda M, Lucesole M, Doderio A, Ciceri F, Benedetti F, Rambaldi A, Sajeve MR, Tresoldi M, Pileri A, Bordignon C, Bregni M (2002) **Reduced-intensity conditioning followed by allografting of hematopoietic cells can produce clinical and molecular remissions in patients with poor-risk hematologic malignancies.** Blood 99: 75-82

Cox DR (1972) **Regression models and life tables.** J R Stat Soc B 34: 187-220

Davies S, Kollman C, Anasetti C, Antin JH, Gajewski J, Casper JT, Nademane A, Noreen H, King R, Confer D, Kernan NA (2000) **Engraftment and survival after unrelated-donor bone marrow transplantation: a report from the national marrow donor program.** Blood 96: 4096-4102.

Dazzi F, Szydlo RM, Craddock C, Cross NC, Kaeda J, Chase A, Olavarria E, van Rhee F, Kanfer E, Apperley JF, Goldman JM (2000) **Comparison of single-dose and escalating-dose regimens of donor lymphocyte infusion for relapse after allografting for chronic myeloid leukemia.** Blood 95: 67-71

Deeg HJ, Flournoy N, Sullivan KM, Sheehan K, Buckner CD, Sanders JE, Storb R, Witherspoon RP, Thomas ED (1984) **Cataracts after total body irradiation and marrow transplantation: a sparing effect of dose fractionation.** Int J Radiat Oncol Biol Phys 10: 957-964

Deutsches Register für Stammzelltransplantationen (DRST). Jahresbericht 2000/2001 www.drst.de

Dreger P, Brand R, Hansz J, Milligan D, Corradini P, Finke J, Deliliers GL, Martino R, Russell N, van Biezen A, Michallet M, Niederwieser D on behalf of the Chronic Leukemia Working Party of the EBMT (2003a) **Treatment-related mortality and graft-versus-leukemia activity after allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia using intensity-reduced conditioning.** Leukemia 17: 841-848

Dreger P, van Biezen A, Brand R, Esteve J, Martino R, Deliliers GL, Hansz J, Fine J, Kimby E, Milligan D, Michallet M, Niederwieser DW (2003b) **Reduced-intensity conditioning lowers treatment-related mortality (TRM) of allogeneic stem cell transplantation (SCT) for CLL: A retrospective study on 448 patients.** Blood 102:197a [abs. 689]

Eibl B, Schwaighofer H, Nachbaur D, Marth C, Gächter A, Knapp R, Böck G, Gassner C, Schiller L, Petersen F, Niederwieser D (1996) **Evidence for a graft-versus-tumor effect in a patient treated with marrow ablative chemotherapy and allogeneic bone marrow transplantation for breast cancer.** Blood 88: 1501-1508

Elmaagacli AH, Beelen DW, Opalka B, Seeber S, Schaefer UW (1999) **The risk of residual molecular and cytogenetic disease in patients with Philadelphia-chromosome positive first chronic phase chronic myelogenous leukemia is reduced after transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells compared with bone marrow.** Blood 94: 384-389

Fairlamb DJ (1981) **Spontaneous regression of metastases of renal cancer: A report of two cases including the first recorded regression following irradiation of a dominant metastasis and review of the world literature.** Cancer 47: 2102-2106

Ferrara JL, Deeg HJ (1991) **Graft-versus-host disease.** N Engl J Med 324: 667-674

Ferrara and Antin (1998) **The Pathophysiology of Graft-versus-host disease.** In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ. Hematopoietic Cell Transplantation. 2nd ed. Blackwell Science, Malden, MA, 305-315

Figlin RA, Thompson JA, Bukowski RM, Vogelzang NJ, Novick AC, Lange P, Steinberg GD, Belldegrun AS (1999) **Multicenter, randomized, phase III trial of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma.** J Clin Oncol 17: 2521-2529

Fredriksson M, Barbany G, Liljedahl U, Hermanson M, Kataja M, Syvänen A-C (2004) **Assessing hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation by multiplexed SNP genotyping using microarrays and quantitative analysis of SNP alleles.** Leukemia 18: 255-266

Fukuda T, Hackman RC, Guthrie KA, Sandmaier BM, Boeckh M, Maris MB, Maloney DG, Deeg HJ, Martin PJ, Storb RF, Madtes DK (2003) **Risks and outcomes of idiopathic pneumonia syndrome after nonmyeloablative and conventional conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** Blood 102: 2777-2785

Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K, Rondon G, Anderlini P, O'Brien S, Khouri I, Gajewski J, Mehra R, Claxton D, Andersson B, Beran M, Przepiorka D, Koller C, Kornblau S, Korbling M, Keating M, Kantarjian H, Champlin R (1997) **Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy.** Blood 89: 4531-4536

Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED (1974) **Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors.** Transplantation 18: 295-304

Gökbuget N, Hoelzer D, Arnold R, Böhme A, Bartram CR, Freund M, Ganser A, Kneba M, Langer W, Lipp T, Ludwig W-D, Maschmeyer G, Roeder H, Thiel E, Weiss A, Messerer D (2000) **Treatment of adult ALL according to protocols of the German multicenter study group for adult ALL (GMALL).** Hematol Oncol Clin North Am 14: 1307-1325

Goulmy E (1997) **Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy.** Immunol Rev 157: 125-140

Gratwohl A, Baldomero H, Passweg J, Urbano-Ispizua A for the Accreditation Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) (2002) **Increasing use of reduced intensity conditioning transplants: report of the 2001 EBMT activity survey.** Bone Marrow Transplant 30: 813-831

Greinix, HT, Nachbaur, D, Krieger, O, Eibl M, Knöbl P, Kalhs P, Lutz D, Linkesch W, Niederwieser D, Hinterberger W, Lechner K, Rosenmayr A, Gritsch B (2002) **Factors affecting long-term outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia: a retrospective study of 172 adult patients reported to the Austrian Stem Cell Transplantation Registry.** Br J Hematol 117: 914-923

Guglielmi C, Arcese W, Dazzi F, Brand R, Bunjes D, Verdonck LF, Schattenberg A, Kolb HJ, Ljungman P, Devergie A, Bacigalupo A, Gomez M, Michallet M, Elmaagacli A, Gratwohl A, Apperley J, Niederwieser D on behalf of the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation (2002) **Donor lymphocyte infusion for relapsed chronic myelogenous leukemia: prognostic relevance of the initial cell dose.** Blood 100: 397-405

Hentschke P, Barkholt L, Uzunel M, Mattsson J, Wersäll P, Pisa P, Martola J, Albini N, Wernerson A, Söderberg M, Remberger M, Thörne A, Ringdén O (2003) **Low-intensity conditioning and hematopoietic stem cell transplantation in patients with renal and colon carcinoma.** Bone Marrow Transplant 31: 253-261

Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara J (1997) **Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines.** Blood 90: 3204-3213

Hinchey J, Chaves C, Appignani B, Breen J, Pao L, Wang A, Pessin MS, Lamy C, Mas JL, Caplan LR (1996) **A reversible posterior leukoencephalopathy syndrome.** N Engl J Med 334: 494-500

Holler E (2002) **Cytokines, viruses, and graft-versus-host disease.** Opin Hematol 9: 479-484

Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan FE, Bortin MM (1990) **Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation.** Blood 75: 555-562

Horowitz MM, Rowlings PA (1997) **An update from the International Bone Marrow Transplant Registry and the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry on current activity in hematopoietic stem cell transplantation.** Curr Opin Hematol 4: 395-400

Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, Bow EJ, Brown AE, Calandra T, Feld R, Pizzo PA, Rolston KV, Shenep JL, Young LS (2002) **2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer.** Clin Infect Dis 34: 730-751

Huss R, Deeg HJ, Gooley T, Bryant E, Leisenring W, Clift R, Buckner CD, Martin P, Storb R, Appelbaum FR (1996) **Effect of mixed chimerism on graft-versus-host disease, disease recurrence and survival after HLA-identical marrow transplantation for aplastic anemia or chronic myelogenous leukemia.** Bone Marrow Transplant 18: 767-776

International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) Database (2003) **Current use and outcome of blood and marrow transplantation 2003** www.ibmtr.org

Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Eldredge JH (1951) **Recovery from radiation injury.** Science 113: 510-511

Junghanss C, Boeckh M, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, Chauncey T, Mc Sweeney PA, Little MT, Corey L, Storb R (2002) **Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study.** Blood 99: 1978-1985

Kalbfleisch JD and Prentice RL (1980) **The statistical analysis of failure time data.** J Wiley, New York

Kaplan EL and Meier P (1958) **Nonparametric estimation for incomplete observations.** J Am Stat Assoc 53: 457-481

Khouri IF, Keating M, Korbling M, Przepiorka D, Anderlini P, O'Brien S, Giralt S, Ippoliti C, von Wolff B, Gajewski J, Donato M, Claxton D, Ueno N, Andersson B, Gee A, Champlin R (1998) **Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies.** J Clin Oncol 16: 2817-2824

Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermueller J, de Witte T, Holler E, Ansari H for the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leucemia (1995) **Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients.** Blood 86: 2041-2050

Kröger N, Sayer HG, Schwerdtfeger R, Kiehl M, Nagler A, Renges H, Zabelina T, Fehse B, Ayuk F, Wittkowsky G, Schmitz N, Zander AR (2002) **Unrelated stem cell transplantation in multiple myeloma after a reduced-intensity conditioning with pretransplantation antithymocyte globulin is highly effective with low transplantation-related mortality.** Blood 100: 3919-3924

Krüger W, Russmann B, Kröger N, Salomon C, Ekopf N, Elsner HA, Kaulfers PM, Mack D, Fuchs N, Durken M, Kabisch H, Erttmann R, Zander AR (1999) **Early infections in patients undergoing bone marrow or blood stem cell transplantation – a 7 year single centre investigation of 409 cases.** Bone Marrow Transplant 23: 589-597

Lion T, Daxberger H, Dubovsky J, Filipcik P, Fritsch G, Printz D, Peters C, Matthes-Martin S, Lawitschka A, Gadner H (2001) **Analysis of chimerism within specific leukocyte subsets for detection of residual or recurrent leukemia in pediatric patients after allogeneic stem cell transplantation.** Leukemia 15: 307-310

Ljungman P (2002) **Prevention and treatment of viral infections in stem cell transplant recipients.** Br J Haematol 118: 44-57

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

Mackinnon S, Papadopoulos EB, Carabasi MH, Reich L, Collins NH, Boulad F, Castro-Malaspina H, Childs BH, Gillio AP, Kernan NA, Small TN, Young JW, O'Reilly RJ (1995) **Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease.** Blood 86: 1261-1268

Mapara MY, Kim Y-M, Wang S-P, Bronson R, Sachs DH, Sykes M (2002) **Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting cells.** Blood 100: 1903-1909

Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Anasetti C, Appelbaum FR, Beatty PG, Doney K, McDonald GB, Sanders JE, Sullivan KM, Storb R, Thomas ED, Witherspoon RP, Lomen P, Hannigan, Hansen JA (1990) **A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment.** Blood 76: 1464-1472

Massenkeil G, Genvresse I, Reich G, le Coutre P, Rackwitz S, Dörken B, Arnold R (2002) **Complications after nonmyeloablative stem cell transplantation (NST) in acute leukemias.** Onkologie 25: 100 [abs. 344]

Massenkeil G, Rackwitz S, Genvresse I, Rosen O, Dörken B, Arnold R (2002) **Basiliximab is well tolerated and effective in the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation.** Bone Marrow Transplant 30: 899-903

Massenkeil G, Nagy M, Lawang M, Rosen O, Genvresse I, Geserick G, Dörken B, Arnold R (2003) **Reduced intensity conditioning and prophylactic DLI can cure patients with high-risk acute leukemias if complete donor chimerism can be achieved.** Bone Marrow Transplant 31: 339-345

Mc Sweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, Sandmaier BM, Molina AJ, Maloney DG, Chauncey TR, Gooley TA, Hegenbart U, Nash RA, Radich J, Wagner JL, Minor S, Appelbaum FR, Bensinger WI, Bryant E, Flowers ME, Georges GE, Grumet FC, Kiem HP, Torok-Storb B, Yu C, Blume KG, Storb RF (2001) **Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects.** Blood 97: 3390-3400

Mermel LA, Farr BM, Sherertz RJ, Raad II, O'Grady N, Harris JS, Craven DE; Infectious Diseases Society of America; American College of Critical Care Medicine; Society for Healthcare Epidemiology of America (2001) **Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections.** Clin Infect Dis 32: 1249-1272

Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, Flowers M, Maloney DG, Sandmaier BM, Maris MB, Storb R (2003) **Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation.** Blood 102: 756-762

Mickisch GHJ, Garin A, van Pappel H, de Prijck L, Sylvester R, and members of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Genitourinary Group (2001) **Radical nephrectomy plus interferon-alpha-based immunotherapy compared with interferon-alpha alone in metastatic renal-cell-carcinoma: a randomised trial.** Lancet 358: 966-970

Mohty M, Faucher C, Vey N, Stoppa AM, Viret F, Chabbert I, Chabannon C, Bouabdallah R, Ladaïque P, Collet L, Zandotti C, Maraninchi D, Blaise D (2000) **High rate of secondary viral and bacterial infections in patients undergoing allogeneic bone marrow mini-transplantation.** Bone Marrow Transplant 26: 251-255

Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM (1996) **Renal-cell carcinoma.** N Engl J Med 335:865-75

Nagy M, Massenkeil G, Anders P, Hahne C, Krüger C, Otremba P, Arnold R, Geserick G (2000) **Short Tandem Repeat Analysis to Monitor Chimerism after Allogeneic Stem Cell Transplantation.** In: Sensabaugh GF, Lincoln PJ, Olaisen B (eds). Progress in Forensic Genetics 8: Proceedings of the 18th International ISFH Congress. San Francisco, CA; 561-563

National Marrow Donor Program (2003) www.marrow.org

Offner F, Cordonnier C, Ljungman P, Prentice HG, Engelhard D, De Bacquer D, Meunier F, De Pauw B (1998) **Impact of previous aspergillosis on the outcome of bone marrow transplantation.** Clin Infect Dis 26: 1098-1103

Or R, Shapira MY, Resnick I, Amar A, Ackerstein A, Samuel S, Aker M, Naparstek E, Nagler A, Slavin S (2003) **Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation for the treatment of chronic myeloid leukaemia in first chronic phase.** Blood 101: 441-445

Orsini E, Alyea EP, Chillemi A, Schlossman R, McLaughlin S, Canning C, Soiffer RJ, Anderson KC, Ritz J (2000) **Conversion to full donor chimerism following donor lymphocyte infusion is associated with disease response in patients with multiple myeloma.** Biol Blood Marrow Transplant 6: 375-386

Oudard S, Levalois C, Andrieu JM, Bougaran J, Validire P, Thiounn N, Poupon MF, Fourme E, Chevillard S (2002) **Expression of genes involved in chemoresistance, proliferation and apoptosis in clinical samples of renal cell carcinoma and correlation with clinical outcome.** Anticancer Res 22: 121-128

Parker JE, Shafi T, Pagliuca A, Mijovic A, Devereux S, Potter M, Prentice G, Garg M, Yin JA, Byrne J, Russell NH, Mufti GJ (2002) **Allogeneic stem cell transplantation in the myelodysplastic syndromes: interim results of outcome following reduced-intensity conditioning compared with standard preparative regimens.** Br J Haematol 119: 144-154

Parmar MKB and Machin D (1996) **Survival analysis – a practical approach.** J Wiley, New York.

Pedrazzoli P, Da Prada GA, Giorgiani G, Schiavo R, Zimbelli A, Giralid E, Landonio G, Locatelli F, Siena S, della Cuna GR (2002) **Allogeneic blood stem cell transplantation after a reduced-intensity, preparative regimen: a pilot study in patients with refractory malignancies.** Cancer 94: 2409-2415

Porter DL, Collins RH Jr, Shpilberg O, Drobyski WR, Connors JM, Sproles A, Antin JH (1999) **Long-term follow-up of patients who achieved complete remission after donor leukocyte infusions.** Biol Blood Marrow Transplant 5: 253-261

Porter DL, Collins RH Jr, Hardy C, Kernan NA, Drobyski WR, Giralt S, Flowers ME, Casper J, Leahey A, Parker P, Mick R, Bate-Boyle B, King R, Antin JH (2000) **Treatment of relapsed leukemia after unrelated donor marrow transplantation with unrelated donor leukocyte infusions.** Blood 95: 1214-1221

Przepiorcka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, Thomas ED (1995) **1994 Consensus conference on acute GvHD grading.** Bone Marrow Transplant 15: 825-828

Reisner Y, Martelli MF (1995) **Bone marrow transplantation across HLA barriers by increasing the number of transplanted cells.** Immunol Today 16: 37-40

Riddell SR, Greenberg PD (1998) **Adoptive immunotherapy with antigen-specific T cells.** In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ. Hematopoietic Cell Transplantation. 2nd ed. Blackwell Science, Malden, MA, 327-341

Ringdén O, Labopin M, Gluckman E, Reiffers J, Vernant JP, Jouet JP, Harrousseau JL, Fiere D, Bacigalupo A, Frassoni F, Gorin NC (1996) **Graft-versus-leukemia effect in allogeneic marrow transplant recipients with acute leukemia is maintained using cyclosporin A combined with methotrexate as**

prophylaxis. Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Bone Marrow Transplant 18: 921-929

Rini BI, Zimmermann T, Stadler WM, Gajewski TF, Vogelzang NJ (2002) **Allogeneic stem-cell transplantation of renal cell cancer after nonmyeloablative chemotherapy: feasibility, engraftment, and clinical results.** J Clin Oncol 20: 2017-2024

Rivoltini L, Barracchini KC, Viggiano V, Kawakami Y, Smith A, Mixon A, Restifo NP, Topalian SL, Simonis TB, Rosenberg SA, Marincola FM (1995) **Quantitative correlation between HLA class I allele expression and recognition of melanoma cells by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes.** Cancer Res 55: 149-157

Roigas J, Deger S, Taymoorian K, Wille AH, Johannsen M, Turk I, Schnorr D, Loening SA (2003) **Effects of 13-cis-retinoic acid on chemoimmunotherapy of metastatic renal cell carcinoma - results of a retrospective analysis.** Cancer Biother Radiopharm 18: 157-163

Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT Seipp CA, Simpson CG, White DE (1987) **A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone.** N Engl J Med 316: 889-897

Sandmaier BM, Maris M, Maloney DG, Gooley TA, Stuart MJ, Hegenbart U, Sahebi F, Chauncey T, Agura E, Bruno B, Mc Sweeney PA, Maziarz R, Pulsipher M, Epner E, Little MT, Forman SJ, Niederwieser DW, Blume KG, Storb R (2003) **Low-dose total body irradiation (TBI) conditioning for hematopoietic cell transplants (HCT) from HLA-matched related (MRD) and unrelated (URD) donors for patients with hematologic malignancies: a five-year experience.** Blood 102: 78a [abs. 264]

Schemper M, Smith TL (1996) **A note on quantifying follow-up in studies of failure time.** Control Clin Trials 17: 343-346

Schmitz N, Bacigalupo A, Hasenclever D, Nagler A, Gluckman E, Clark P, Bourquelot P, Greinix H, Frickhofen N, Ringden O, Zander A, Apperley JF, Gorin C, Borkett K, Schwab G, Goebel M, Russell NH, Gratwohl A (1998) **Allogeneic bone marrow transplantation vs filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation in patients with early leukaemia: first results of a randomised multicentre trial of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.** Bone Marrow Transplant 21: 995-1003

Shank B, O'Reilly RJ, Cunningham I, Kernan N, Yaholom J, Brochstein J, Castro-Malaspina H, Kutcher GJ, Mohan R, Bonfiglio P (1990) **Total body irradiation for bone marrow transplantation: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience.** Radiother Oncol 18: 68-81

- Sharabi Y, Sachs DH (1989) **Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a nonlethal preparative regimen.** J Exp Med 169: 493-502
- Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ, Emerson SG (1999) **Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells.** Science 285: 412-415
- Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE, Hackman R, Tsoi MS, Storb R, Thomas ED (1980) **Chronic graft-versus-host syndrome in man: a clinicopathological study of 20 long-term Seattle patients.** Am J Med 69: 204-217
- Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackersstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldor A, Or R (1998) **Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases.** Blood 91: 756-763
- Spitzer TR, McAfee S, Sackstein R, Colby C, Toh HC, Multani P, Saidman S, Weyouth DW, Preffer F, Poliquin C, Foley A, Cox B, Andrews D, Sachs DH, Sykes M (2000) **Intentional induction of mixed chimerism and achievement of antitumor responses after nonmyeloablative conditioning therapy and HLA-matched donor bone marrow transplantation for refractory hematologic malignancies.** Biol Blood Marrow Transplant 6: 309-320
- Stewart FM, Zhong S, Wu J, Hsieh C, Nilsson SK, Quesenberry PJ (1998) **Lymphohematopoietic engraftment in minimally myeloablated hosts.** Blood 91: 3681-3687
- Storb R, Deeg HJ, Pepe M, Appelbaum F, Anasetti C, Beatty P, Bensinger W, Berenson R, Buckner CD, Clift R, Doney K, Longton G, Hansen J, Hill R, Loughran T, Martin P, Singer J, Sanders J, Stewart P, Sullivan K, Witherspoon R, Thomas ED (1989a) **Methotrexate and cyclosporine versus cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients given HLA-identical marrow grafts for leukemia: long-term follow-up of a controlled trial.** Blood 73: 1729-1734
- Storb R, Raff RF, Appelbaum FR, Graham TC, Schuening FG, Sale G, Pepe M (1989b) **Comparison of fractionated to single-dose total body irradiation in conditioning canine littermates for DLA-identical marrow grafts.** Blood 74: 1139-1143
- Storb R, Yu C, Mc Sweeney P (1998) **Mixed chimerism after transplantation of allogeneic hematopoietic cells.** In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ. Hematopoietic Cell Transplantation. 2nd ed. Blackwell Science, Malden, MA, 287-295

Storb R, Yu C, Barnett T, Wagner JL, Deeg HJ, Nash RA, Kiem HP, Mc Sweeney P, Seidel K, Georges G, Zaucha JM (1999) **Stable mixed hematopoietic chimerism in dog leukocyte antigen-identical littermate dogs given lymph node irradiation before and pharmacologic immunosuppression after marrow transplantation.** Blood 94: 1131-1136

Sullivan KM, Agura E, Anasetti C, Appelbaum F, Badger C, Bearman S, Erickson K, Flowers M, Hansen J, Loughran T (1991) **Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation.** Seminars in Hematology 28: 250-259

Sureda A, Robinson S, de Elvira CR, Taghipour G, Carella AM, Mackinnon S, Boogaerts M, Caballero D, Michallet M, Russel N, Schmitz N (2003) **Non myeloablative allogeneic stem cell transplantation significantly reduces transplant related mortality in comparison with conventional allogeneic transplantation in relapsed or refractory Hodgkin's disease: results of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.** Blood 102: 198a [abs. 692]

Sykes M, Szot GL, Swenson KA, Pearson DA (1997) **Induction of high levels of allogeneic hematopoietic reconstitution and donor-specific tolerance without myelosuppressive conditioning.** Nat Med 3: 783-787

Sykes M, Preffer F, McAfee S, Saidman SL, Weymouth D, Andrews DM, Colby C, Sackstein R, Sachs DH, Spitzer TR (1999) **Mixed lymphohaemopoietic chimerism and graft-versus-lymphoma effects after non-myeloablative therapy and HLA-mismatched bone-marrow transplantation.** Lancet 353 (9166): 1755-1759

Thiede C, Florek M, Bornhäuser M, Ritter M, Mohr B, Brendel C, Ehninger G, Neubauer A (1999) **Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection.** Bone Marrow Transplant 23: 1055-1060

Thomas ED (1990) **Total body irradiation regimens for marrow grafting.** Int J Radiat Oncol Biol Phys 19: 1285-1288

Trentin JJ (1956) **Mortality and skin transplantability in X-irradiated mice receiving isologous, homologous or heterologous bone marrow.** Proc Soc Exp Biol Med 92: 688-693

Ueno NT, Cheng YC, Rondón G, Tannir NM, Gajewski JL, Couriel DR, Hosing C, de Lima MJ, Anderlini P, Khouri IF, Booser DJ, Hortobagyi GN, Pagliaro LC, Jonasch E, Giralt SA, Champlin RE (2003) **Rapid induction of complete donor chimerism by the use of a reduced-intensity conditioning regimen composed of fludarabine and melphalan in allogeneic stem cell transplantation for metastatic solid tumors.** Blood 102: 3829-3836

Visani G, Bernasconi P, Boni M, Castolid GL, Ciolli S, Clavio M, Cox MC, Cuneo A, Del Poeta G, Dini D, Falzetti D, Fanin R, Gobbi M, Isidori A, Leoni F, Liso V, Malagola M, Martinelli G, Mecucci C, Piccaluga PP, Petti MC, Rondelli R, Russo D, Sessarego M, Specchia G, Testoni N, Torelli G, Mandelli F, Tura S (2001) **The prognostic value of cytogenetics is reinforced by the kind of induction/consolidation therapy in influencing the outcome of acute myeloid leukemia--analysis of 848 patients.** *Leukemia* 15: 903-909

Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA (1997) **Epidemiology of Aspergillus infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation.** *J Infect Dis* 175: 1459-1466

Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R (1979) **Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts.** *N Engl J Med* 300: 1068-1073

Yu C, Storb R, Mathey B, Deeg HJ, Schuening FG, Graham TC, Seidel K, Burnett R, Wagner JL, Shulman H, Sandmaier BM (1995) **DLA-identical bone marrow grafts after low-dose total body irradiation: effects of high-dose corticosteroids and cyclosporine on engraftment.** *Blood* 86: 4376-4381

Yu C, Seidel K, Nash RA, Deeg HJ, Sandmaier BM, Barsoukov A, Santos E, Storb R (1998) **Synergism between mycophenolate mofetil and cyclosporine in preventing graft-versus-host disease among lethally irradiated dogs given DLA-nonidentical unrelated marrow grafts.** *Blood* 91: 2581-2587

Liste verwendeter Abkürzungen

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ATG	Antithymozytenglobulin
BU	Busulfan
c-ALL	Common-ALL
CC	Kompletter Spenderchimärismus (complete chimerism)
C.I.	Konfidenzintervall
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CP	Chronische Phase
CR	Komplette Remission
CSA	Cyclosporin A
CT	Computertomographie
DLI	Spenderlymphozyteninfusionen (donor lymphocyte infusions)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRST	Deutsches Register für Stammzelltransplantation
EFS	Erkrankungsfreies Überleben
F	Frau
FAB	Morphologische Einteilung der AML nach French-American-British-Classification
FL	Fludarabin
FUO	Fieber unklarer Genese (fever of unknown origin)
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt Reaktion (Graft-versus-host disease)
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (Graft-versus-Leukemia)
GvT	Transplantat-gegen-Tumor Effekt (Graft-versus-Tumor)
HLA	Haupthistokompatibilitätskomplex (human leukocyte antigen)
HvG	Abstoßungsreaktion (Host-versus-Graft)
IBMTR	Internationales Knochenmarktransplantationsregister
KI	Karnofsky-Index
KMT	Knochenmarktransplantation
M	Mann
MC	Gemischter Chimärismus (Mixed chimerism)
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MM	Multiple Myelom
MMF	Mycophenolat mofetil
MTX	Methotrexat
n.a.	Nicht analysiert
n.e.	Nicht erreicht
NHL	Non Hodgkin Lymphom
n.s.	Nicht signifikant
NMDP	Nationales Knochenmarkspenderprogramm der USA
NST	Nichtmyeloablative Stammzelltransplantation
PBSCT	Periphere Blutstammzelltransplantation
PCR	Polymerasekettenreaktion
Ph+	Philadelphia-Chromosom positiv
PD	Progrediente Erkrankung
PR	Partielle Remission
SD	Stabile Erkrankung
Standard SZT	Standardtransplantation
STR	Kurzketten repetitive Sequenzen (short tandem repeats)
SZT	Stammzelltransplantation
T-ALL	T-lymphoblastische ALL
TRM	Transplantationsassoziierte Mortalität
VNTR	Variable Anzahl Tandemwiederholungen (variable number of tandem repeats)
VOD	Venenverschlußkrankheit der Leber (veno-occlusive disease)
ZVK	Zentraler Venenkatheter

LEBENS LAUF

Geboren am		6. Mai 1961 in Köln
Staatsangehörigkeit		Deutsch
Zivilstatus		verheiratet, 1 Tochter
Studium	1982-1986 1986-1989 Mai 1989	Rhein. Friedrich-Wilhelm Universität Bonn Freie Universität Berlin Ärztliche Prüfung
	1989	Amerikanisches Staatsexamen
Promotion	1990	Dissertation zum Thema: „Sterilisation bei geistig behinderten Mädchen und Frauen“ Referent Prof. Dr. L. Beck, Direktor der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf
Arzt im Praktikum	1989-1990	Innere Medizin Medizinische Poliklinik, Departement für Innere Medizin (Direktor: Prof. Dr. W. Siegenthaler), Universitätsspital Zürich, Schweiz
Wissenschaftliche Tätigkeit	1991-1993	Stipendiat der Deutschen Krebshilfe Abteilung für Krebsforschung (Leiter: Prof. Dr. R. Schäfer), Departement Pathologie, Universitätsspital Zürich, Schweiz
Klinische Tätigkeit	1993-1994	Frauenklinik (Direktor: Prof. Dr. H.G. Bender), Universität Düsseldorf
	1994-2001	Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie (Direktor: Prof. Dr. K. Possinger), Universitätsklinikum Charité, Campus Mitte
	2001	Facharzt für Innere Medizin
	2001	Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie (Direktor: Prof. Dr. B. Dörken), Universitätsklinikum Charité, Campus Virchow-Klinikum
	2003	Oberarzt der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie (Direktor: Prof. Dr. B. Dörken), Universitätsklinikum Charité, Campus Virchow-Klinikum

Danksagung

Der erste Dank gilt meinen Eltern, die in vielfältiger Form die ideellen und intellektuellen Voraussetzungen für meinen akademischen Werdegang schufen.

Mein größter Dank gilt Frau Professor Dr. Renate Arnold. In langjähriger Zusammenarbeit hat sie meine klinische und wissenschaftliche Tätigkeit in der Stammzelltransplantation gefördert. Sie hat durch kritische Anregungen und starken persönlichen Einsatz die wissenschaftlichen Projekte, die meiner Arbeit zugrunde liegen, mit initiiert und unterstützt.

Herrn Professor Dr. Bernd Dörken bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Nach dem Wechsel in seine Klinik hat er durch die Förderung meiner Tätigkeit und Schaffen von wissenschaftlichen Freiräumen die Fertigstellung dieser Arbeit und meine weitere klinische Entwicklung ermöglicht.

Dr. Oliver Rosen danke ich für anregende und temperamentvolle Diskussionen, kritische Durchsicht des Manuskriptes und seine Freundschaft.

Dr. Stephan Rackwitz danke ich für Hilfestellungen bei kniffligen Computerfragen und Korrekturlesen des Manuskriptes.

Für die gute Kooperation bedanke ich mich bei Frau Dr. Marion Nagy und ihren Mitarbeiterinnen, die die Chimärismusuntersuchungen bei unseren Patienten durchgeführt haben und bei Dr. Jan Roigas, der die Initialzündung für die Untersuchungen bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen gab.

Den Schwestern und Pflegern der Station 50 danke ich für ihren großen Einsatz bei der Betreuung unserer gemeinsamen Patienten.

Ich danke vor allem meiner Frau Elisabeth für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und die aufmunternde Unterstützung meiner Arbeit.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

.....
Datum

.....
Unterschrift