

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Tübingen**

**Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und
Onkologie)**

**Haploidente Stammzelltransplantation mit CD3/CD19
depletierten Stammzellen bei pädiatrischen Patienten
mit therapierefraktären hämatologischen und
onkologischen Erkrankungen
Eine prospektive multizentrische Phase I/II Studie**

**Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Eichholz, Thomas**

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Bethge

Tag der Disputation: 21.10.2019

Gewidmet den Kindern und Familien,
die an dieser Studie teilgenommen haben.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Transplantationszahlen und Spenderverfügbarkeit.....	2
1.2.	Indikation zur allogenen HSCT bei Kindern	3
1.3.	Spenderauswahl.....	3
1.3.1.	Das MHC-System.....	4
1.3.2.	Der haploidente Spender	6
1.3.3.	Killer-Cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR)	7
1.3.4.	Weitere Spenderkriterien.....	8
1.4.	Graft Manipulation	10
1.5.	Konditionierung und Serotherapie.....	11
1.6.	Graft Failure – Graft vs. Host Disease – Graft vs. Tumor Effekt.....	13
1.7.	Engraftment und Graft Failure.....	13
1.7.1.	Definition Engraftment und Graft Failure.....	13
1.7.2.	Mechanismen von Engraftment und Transplantatabstoßung	14
1.7.3.	Gemischter Chimärismus und schwache Transplantatfunktion	15
1.7.4.	Risikofaktoren für ein Graft Failure.....	16
1.7.5.	Therapieoptionen bei Graft Failure.....	17
1.8.	Immunrekonstitution	19
1.9.	Infektionen	21
1.9.1.	Phasen der Infektionsgefährdung	22
1.9.2.	Bakterielle Infektionen	22
1.9.3.	Pilzinfektionen	23
1.9.4.	Parasitäre Infektionen.....	23
1.9.5.	CMV.....	23
1.9.6.	ADV	24
1.9.7.	EBV und PTLD	25
1.9.8.	BKV.....	26
1.9.9.	Andere Viren.....	26
1.10.	Adoptiver Immuntransfer	27
1.11.	GvHD	28
1.11.1.	akute GvHD	30
1.11.2.	chronische GvHD	32
1.12.	Komplikationen und Spätfolgen einer Stammzelltransplantation.....	33
1.12.1.	Veno-Occlusive Disease	33
1.12.2.	Bronchiolitis obliterans.....	35
1.12.3.	Bronchiolitis Obliterans Organizing Pneumonia	35
1.12.4.	Zweitmalignome	35
1.13.	Non-Relapse-Mortality	36
1.14.	Graft-versus-Leukämie- / Graft-versus-Tumor-Effekt.....	36
1.15.	Rezidiv und therapeutische Optionen nach HSCT.....	37
1.16.	Fragestellung	39
2.	Material und Methoden	40
2.1.	Prüfplan	40
2.1.1.	Ein- und Ausschlusskriterien	40
2.1.2.	Rekrutierungszeitraum	41
2.1.3.	Teilnehmende Zentren	41
2.1.4.	Abbruchkriterien	41

2.2.	Patienten	41
2.3.	Spender	44
2.3.1.	HLA-Mismatch	44
2.4.	Transplantat.....	45
2.4.1.	Mobilisierung und Sammlung der Spender-Stammzellen	45
2.4.2.	Transplantat – Bearbeitung	45
2.4.3.	Transplantatzusammensetzung	46
2.4.4.	Stammzelltransplantation und zusätzlicher Zelltransfer	46
2.5.	Konditionierung, Serotherapie und Rekonditionierung.....	47
2.5.1.	Rekonditionierung.....	48
2.6.	Überwachung und Supportivtherapie	48
2.6.1.	GvHD-Prophylaxe.....	48
2.6.2.	Monitoring von Immunrestitution und Chimärismus	48
2.6.3.	Remissionsbeurteilung	49
2.6.4.	Infektiologisches Monitoring	49
2.6.5.	Infektionsprophylaxe.....	49
2.7.	Nachbeobachtungszeitraum.....	50
2.8.	Datenerfassung	50
2.9.	Statistische Auswertung	51
3.	Ergebnisse	51
3.1.	Engraftment	51
3.1.1.	Chimärismus.....	54
3.1.2.	Weiterbehandlung nach Graft Failure	56
3.2.	Immunrestitution	57
3.3.	Infektionen	59
3.4.	GvHD	61
3.5.	Andere transplantationsassoziierte Komplikationen	64
3.6.	OAS und Non-Relapse Mortality	65
3.7.	Rezidiv	67
3.8.	Therapiestrategien nach Transplantation.....	72
3.9.	Ereignisfreies Überleben (EFS).....	73
3.10.	Beobachtungspatienten.....	77
4.	Diskussion	78
5.	Zusammenfassung	87
6.	Literaturverzeichnis.....	89
7.	Erklärung zum Eigenanteil.....	102
8.	Veröffentlichung	103
9.	Danksagung.....	103

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Diagnosen Studienpatienten.	Seite 42
Abb. 2: Zeit bis zum Anstieg der neutrophilen Granulozyten / Thrombozyten.	Seite 52
Abb. 3: Zeitpunkt des Erreichens von >500/ μ l neutrophiler Granulozyten mit und ohne G-CSF.	Seite 53
Abb. 4: Zahl CD34+, CD3+ und CD56+ Zellen im Transplantat bei Engraftment und Graft Failure.	Seite 53
Abb. 5: Immunrekonstitution der T-Lymphozyten.	Seite 57
Abb. 6: Immunrekonstitution der B-Lymphozyten und NK-Zellen.	Seite 58
Abb. 7: Kumulative Inzidenz der Reaktivierung von CMV, ADV oder EBV im Blut.	Seite 59
Abb. 8: Kumulative Inzidenz der Reaktivierung von BKV im Urin und ADV im Stuhl.	Seite 60
Abb. 9: Kumulative Inzidenz aGvHD.	Seite 62
Abb. 10: Gesamtüberleben (OAS).	Seite 66
Abb. 11: Kumulative Inzidenz nicht rezidivbedingter Todesfälle.	Seite 66
Abb. 12: Kumulative Inzidenz nicht rezidivbedingter Todesfälle nach angewandter Konditionierung.	Seite 67
Abb. 13: Kumulative Inzidenz von Rezidiven bei maligner Grunderkrankung je nach Remissionsstatus vor Transplantation.	Seite 68
Abb. 14: Kumulative Inzidenz von Rezidiven bei soliden Tumoren je nach Remissionsstatus vor Transplantation.	Seite 68
Abb. 15: Kumulative Inzidenz von Rezidiven bei Neuroblastom, Rhabdomyosarkom und Ewing Sarkom je nach Remissionsstatus vor Transplantation.	Seite 69
Abb. 16: Kumulative Inzidenz von Rezidiven bei Leukämien je nach Remissionsstatus vor Transplantation und vorheriger Transplantation.	Seite 69
Abb. 17: Kumulative Inzidenz von Rezidiven bei maligner Grunderkrankung je nach Auftreten einer aGvHD.	Seite 70
Abb. 18: Kumulative Inzidenz von Rezidiven bei maligner Grunderkrankung je nach Auftreten einer cGvHD.	Seite 70
Abb. 19: Immunrekonstitution der CD3+ T-Lymphozyten bei Patienten mit maligner Grunderkrankung mit bzw. ohne Rezidiv.	Seite 71
Abb. 20: Immunrekonstitution der CD56+ NK-Zellen bei Patienten mit maligner Grunderkrankung mit bzw. ohne Rezidiv.	Seite 71
Abb. 21: Gesamtüberleben (OAS) der Patienten mit maligner Erkrankung und Rezidiv / Progress nach HSCT.	Seite 72
Abb. 22: Ereignisfreies Überleben (EFS) gesamte Studiengruppe.	Seite 73
Abb. 23: Ereignisfreies Überleben (EFS) ALL und AML nach Remissionsstatus.	Seite 74
Abb. 24: Ereignisfreies Überleben (EFS) ALL je nach Remissionsstatus vor Transplantation und vorheriger Transplantation.	Seite 74
Abb. 25: Ereignisfreies Überleben (EFS) AML je nach Remissionsstatus vor Transplantation, MDS-RAEB und JMML.	Seite 75
Abb. 26: Ereignisfreies Überleben (EFS) Neuroblastom, Ewing Sarkom und Rhabdomyosarkom nach Remissionsstatus.	Seite 75
Abb. 27: Ereignisfreies Überleben (EFS) Neuroblastom, Ewing Sarkom und Rhabdomyosarkom nach Remissionsstatus.	Seite 76
Abb. 28: Ereignisfreies Überleben (EFS) Neuroblastom, Ewing Sarkom und Rhabdomyosarkom.	Seite 76
Abb. 29: Ereignisfreies Überleben (EFS) nicht maligner Erkrankungen.	Seite 77
Abb. 30: Ereignisfreies Überleben (EFS) aller Patienten bei erster allogener HSCT bzw. allogener Folgetransplantation.	Seite 77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gradeinteilung der aGvHD	Seite 31
Tabelle 2: Patienteneigenschaften	Seite 43
Tabelle 3: Spendereigenschaften	Seite 44
Tabelle 4: HLA – Übereinstimmung	Seite 45
Tabelle 5: Transplantatzusammensetzung	Seite 46
Tabelle 6: intensitätsreduzierte Konditionierungsprotokolle (RIC)	Seite 47
Tabelle 7: Einflussfaktoren auf das Engraftment	Seite 54
Tabelle 8: Inzidenz relevanter Infektionen / symptomatische Virusreaktivierung	Seite 61
Tabelle 9: Inzidenz GvHD	Seite 61
Tabelle 10: Einflussfaktoren auf das Auftreten einer aGvHD	Seite 63
Tabelle 11: Einflussfaktoren auf das Auftreten einer cGvHD	Seite 64
Tabelle 12: Todesursache	Seite 65

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
ADV	Adenovirus
aGvHD	Acute Graft versus Host Disease
ALCL	Anaplastic large cell lymphoma
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ANC	Absolute neutrophil count
APC	Antigen presenting cell
ATG	Antithymozytenglobulin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCR/ABL	BCR/ABL-Gen
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BKV	BK-Virus
BO	Bronchiolitis obliterans
BOOP	Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia
CAR-NK	Chimeric Antigen Receptor – NK-Cell
CAR-T	Chimeric Antigen Receptor – T-Cell
CD	Cluster of differentiation
cGvHD	Chronic Graft versus Host Disease
CI	Confidence Interval
Clof	Clofarabin
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
CPCS	Centre for Pediatric Clinical Studies
CR	Complete Remission
CSA	Cyclosporin A
CT	Computertomographie
CVID	Common variable immunodeficiency
d	Tag
DLCO	Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität
DLI	Donor leukocyte infusion
DNA	Desoxyribonucleic acid
EBMT	European Society for Blood and Marrow Transplantation
EBV	Epstein Barr Virus
ECP	Extracorporeal Photopheresis
EFS	Event Free Survival
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FEV1	Einsekundenkapazität
Flud	Fludarabin
GCP	Good Clinical Practice
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GD2	Disialoganglioside GD2
GF	Graft Failure
GI	Gastrointestinal
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GMP	Good Manufacturing Practice
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Graft comp.	Graft Composition
GvH / GvHD	Graft versus Host / Graft versus Host Disease
GvL	Graft versus Leukemia
GvT	Graft versus Tumor
h	Stunde
HA	Hochauflösend

Häm.	Hämatogen
Häm. Mal.	Hämatogen Maligne
HHV6	Humanes Herpesvirus 6
HLA	Human Leukocyte Antigen
HLA-Ag	HLA-Antigen
HLH	Hämophagozytische Lymphohistiozytose
HSCT	Hematopoietic Stem Cell Transplantation
HSV	Herpes Simplex Virus
i.th.	Intrathekal
ICH-GCP	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use – Good Clinical Practice
IFN-alpha	Interferon alpha
IFN-γ	Interferon gamma
IL2	Interleukin 2
IPA	Inherited Paternal Antigen
IPD-IMGT/HLA Data-base	Immuno Polymorphism Database - International ImMunoGeneTics / Human Leukocyte Antigen Data-base
JMML	Juvenile myelomonozytäre Leukämie
kg / kgKG	Kilogramm / Kilogramm Körpergewicht
KI	Karnofsky Index
KIR	Killer Cell Immunoglobulin-like receptors
KOF	Körperoberfläche
m ²	Quadratmeter
MAC	Myeloablative Conditioning
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MAS	Makrophagenaktivierungssyndrom
Mb	Morbus
MC	Mixed Chimerism
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MDS RAEB T	Myelodysplastisches Syndrom, refraktäre Anämie mit Blastenüberschuß in Transformation
MDS RC	Myelodysplastisches Syndrom mit refraktärer Zytopenie
Mel	Melphalan
µg	Mikrogramm
mg	Miligramm
mHAg	Minor Histocompatibility Antigen
MHC	Major Histocompatibility Complex
MM	Mismatch
MMF	Mycophenolat-Mofetil
Mnl	Männlich
MRD	Minimal Residual Disease
MSC	Mesenchymal Stem Cells
MSD	Matched Sibling Donor
MTX	Methotrexat
MUD	Matched Unrelated Donor
NB	Neuroblastom
Neg	Negativ
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NIH	National Institute of Health
NIMA	Noninherited Maternal Antigen
NK	Natural Killer cells
NMA	Nicht Myeloablative
NR	Non Response
NRM	Non Relapse Mortality
OAS	Overall Survival
OKT 3	Muromonab-CD3
PBSC	Peripheral Blood Stem Cells

PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Progressive Disease
PGF	Primary Graft Failure
Pos	Positiv
PTLD	Post-Transplant Lymphoproliferative Disease
PUVA	Psoralen plus UV-A
Rekond	Rekonditionierung
RI / RIC	Reduced Intensity / Reduced Intensity Conditioning
RMS	Rhabdomyosarkom
RSW	Rachenspülwasser
SAA	Severe Aplastic Anemia
s.c.	subkutan
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SCT	Stem Cell Transplantation
SGF	Secondary Graft Failure
SySa	Synovialsarkom
SZ-Boost	Stammzellboost
T/B-Ratio	Verhältnis der T- zu B-Lymphozyten
Tab	Tabelle
TBI	Total Body Irradiation
TCD	T-Cell Depletion
TCR	T-Cell Receptor
TLI	Total Lymphoid Irradiation
TMA	Thrombotic Microangiopathy
TREC	T-Cell Receptor excision circles
Treg	Regulatorische T-Zellen
TRM	Transplant-related Mortality
TT	Thiotepa
Undiff.	Undifferenziert
VOD	Veno-occlusive disease
VP16	Etoposid
VZV	Varizella Zoster Virus
Wahrscheinlichk	Wahrscheinlichkeit
Wbl	Weiblich
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

Das Knochenmark jedes Menschen, mit den in ihm enthaltenen hämatopoetischen Stammzellen, stellt ein lebenswichtiges Organ dar, das bei gesunden Personen kontinuierlich und lebenslang Blutzellen nachbildet. Die Transplantation von Knochenmark oder PBSC kann eine kongenitale unzureichende, gestörte, krankhaft veränderte oder eine durch Noxen geschädigte Knochenmarkfunktion ersetzen. Durch eine allogene Transplantation wird aber nicht nur das blutbildende Organ ersetzt, sondern auch ein neues Immunsystem etabliert. Zudem können bestimmte Enzymfunktionen durch eine solche Transplantation ersetzt werden.

Die erste Infusion von Knochenmark in einen Menschen erfolgte im Jahr 1939 bei aplastischer Anämie, jedoch ohne Heilungserfolg.^{1,2} Einige grundlegende Erkenntnisse zur Knochenmarktransplantation gehen auf Forschungsarbeiten über die Folgen der Nukleartechnik zurück.^{3,4,5} Die erste allogene Knochenmarktransplantation wurde 1957 von E.D. Thomas an einem Patienten mit Leukämie durchgeführt.^{5,6} Für seine Arbeit auf dem Gebiet der Knochenmark- und Stammzelltransplantation wurde E.D. Thomas 1990 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Die frühen allogenen Knochenmarktransplantationen gelangten lediglich mit „isologem“ Knochenmark identischer Zwillinge⁷ oder dem Knochenmark HLA-identischer Geschwisterkinder.⁸ Stand kein solches Zwilings- oder Geschwisterkind als Spender[†] zur Verfügung, entfiel aufgrund der lebensbedrohlichen Nebenwirkungen auch die Option einer Transplantation,⁹ wie am Beispiel des an SCID erkrankten Jungen David Vetter.^{10,11} Erkenntnisse über immunologische Grundlagen, wie dem HLA-System, und der Aufbau von Spenderregistern ermöglichten die Identifikation passender Spender und Transplantationen von freiwilligen Fremdspendern. Die erste Transplantation eines HLA übereinstimmenden nichtverwandten Spenders (MUD) fand 1973 bei einem Kind mit SCID-Erkrankung statt.¹² Dennoch konnte bei zunehmender Indikationsstellung nicht für jeden Patienten zeitgerecht ein passender Spender

[†] Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit lediglich die männliche Form verwendet. Die weibliche Form ist, wenn nicht explizit anders erwähnt, selbstverständlich eingeschlossen.

gefunden werden. Die Suche nach Möglichkeiten zur Transplantation von alternativen Spendern wurde fortgeführt. Transplantationen von nicht HLA-identen Spendern bergen ein besonderes Risiko einer unter Umständen tödlichen Graft-versus-Host-Erkrankung. Neue Immunsuppressiva wie MTX und Cyclosporin,⁹ sowie die Möglichkeit der Transplantatbearbeitung eröffneten den Weg zur Stammzelltransplantation von nur partiell übereinstimmenden Spendern bis hin zur haploidenten Transplantation über die HLA-Barriere hinweg. Gegenstand aktueller Studien ist es, die haploidente Transplantationsform weiter zu entwickeln, um möglichst allen Patienten eine benötigte Transplantation mit vertretbarer Rate an Nebenwirkungen anbieten zu können und gleichzeitig einen optimalen Graft-versus-Leukämie/Tumor-Effekt zu erzielen.^{13,14} Die vorliegende Phase I/II Studie ist meines Wissens die größte Studie zu haploidenter Stammzelltransplantation mit CD3 und CD19 Depletion bei Kindern.

1.1. Transplantationszahlen und Spenderverfügbarkeit

Die Auswertung der Transplantationszahlen durch die EBMT in Europa und assoziierten Ländern verzeichnet eine jährliche Zunahme an durchgeführten Stammzelltransplantationen. Im Jahr 2012 wurden insgesamt 4041 Transplantationen an Kindern durchgeführt, wobei 2877 (71,2%) von allogenen Spendern erfolgten.¹⁵ Bei 1373 Transplantationen wurde auf einen unverwandten Spender und in 354 Fällen auf einen haploidenten zurückgegriffen.¹⁵ Im Vergleich zu erwachsenen Patienten wurden bei Kindern weniger autologe und mehr allogene Transplantationen durchgeführt, was auf ein unterschiedliches Krankheitsspektrum zurückzuführen ist.¹⁵

Im Jahr 2014 stieg die Zahl der durchgeführten allogenen Transplantationen bei Kindern weiter auf 3279.¹⁶ Die Zunahme der Transplantationstätigkeit ist auf eine breitere Indikationsstellung, die Verfügbarkeit und Ausstattung der transplantierenden Zentren sowie auf die Verfügbarkeit passender Spender durch Spenderdateien zurückzuführen.¹⁷ Nur ca. 35% der Patienten mit einer Indikation zur HSCT verfügen über einen HLA-passenden Geschwisterspender. Weltweit sind heute über 28 Millionen freiwillige Stammzellspender in 75 Stammzellspender-Registern erfasst,¹⁸ wodurch sich die Chance, einen passenden

Fremdspender zu finden, deutlich erhöht. Diese Chance ist allerdings je nach ethnischer Abstammung unterschiedlich und reicht von weniger als 10% bei Minoritäten bis zu ca. 50% bei Patienten kaukasischer Abstammung.^{19, 20, 21, 22} Die Angaben hierzu variieren stark und hängen von der Definition eines passenden Spenders ab.²³ Die Zeitdauer von Initiierung der Spendersuche bis zur möglichen Transplantation liegt durchschnittlich bei 4 Monaten²³ welche damit unter Umständen für den zu transplantierenden Patienten zu spät kommt. Allo-gene Stammzelltransplantationen akuter Leukämien sind am erfolgversprechendsten, solange die Erkrankung kontrolliert und in Remission gehalten werden kann. Lässt sich für diese Patienten kein passender Familien- oder Fremdspender zeitgerecht finden, hängt die mögliche kurative Therapie einer Stammzelltransplantation von alternativen Spendern ab.^{24, 25, 26}

1.2. Indikation zur allogenen HSCT bei Kindern

Zu den ersten Indikationen einer Knochenmark- und Stammzelltransplantation bei Kindern gehörten neben Leukämien⁷ die aplastische Anämie²⁷ und Immundefekte.^{28,29} Seither sind neue Indikationen aufgrund maligner als auch nicht-maligner Erkrankungen hinzugekommen. Das Spektrum der Erkrankungen und ihr jeweiliger Anteil an den Transplantationszahlen bei Kindern unterscheidet sich von dem Erwachsener sowohl bei den malignen Erkrankungen als auch durch typischerweise pädiatrische, angeborene Erkrankungen wie Immundefekten, Stoffwechselerkrankungen oder Hämoglobinopathien.

Die häufigste Indikation für eine allogene Stammzelltransplantation bei Kindern ist die ALL (26%), gefolgt von primären Immundefekten (16%) und der AML (14%). Solide Tumore stellen mit 2% nur einen geringen Anteil zur Indikation einer allogenen Transplantation.¹⁵

1.3. Spenderauswahl

Die Auswahl des „passenden“ Spenders ist entscheidend für den Erfolg einer Stammzelltransplantation sowie für das Risiko für das Auftreten bestimmter Komplikationen wie einer GvHD. Die Definition eines „passenden“ Spenders richtet sich maßgeblich nach dem MHC-System. Darüber hinaus konnten weitere

immunologische und klinische Faktoren identifiziert werden, die eine Auswirkung auf den Transplantationserfolg haben und bei der Auswahl der Spender zusätzlich berücksichtigt werden sollten.³⁰

1.3.1. Das MHC-System

Die Entdeckung der HLA-Antigene Ende der 1960er Jahre^{31, 32} lieferte eine Erklärung für Phänomene der Transplantationsmedizin wie Transplantatabstoßung oder GvHD. Die verschiedenen HLA-Antigene bilden das sogenannte MHC-System des Menschen,³³ die Grundlage der immunologischen Fremd- bzw. Selbsterkennung und der T-Zell-vermittelten Immunreaktion.³²

HLA-Antigene sind Glykoproteine auf den Oberflächen von Zellen, von denen zwei Klassen unterschieden werden. Klasse I – Antigene (HLA-A, HLA-B und HLA-C) werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und bestehen aus einer alpha-Kette und einem beta2-Mikroglobulin. Die alpha-Kette bindet zytoplasmatische Peptidstücke und präsentiert diese zytotoxischen CD8-positiven T-Lymphozyten.

Die aus einer alpha- und einer beta-Kette bestehenden Klasse II – Antigene (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP) werden hauptsächlich auf antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten und aktivierten T-Lymphozyten exprimiert. Diese Zellen nehmen extrazelluläre Antigene durch Endozytose auf und spalten sie in Peptide. Diese werden an die alpha- und beta-Kette der HLA II – Antigene gebunden und CD4-positiven T-Lymphozyten präsentiert.^{20, 34}

Die Gene für die HLA-Moleküle liegen auf Chromosom 6 und gehören zu den polymorphsten Genen des menschlichen Genoms. In der IPD-IMGT/HLA Database waren zum 14.09.2016 15.020 Allelsequenzen (Klasse I: 11.100 Allele; Klasse II: 3920 Allele) erfasst.³⁵ Die einzelnen Gene liegen als MHC-Komplex in enger Beziehung zueinander. Sie werden nicht unabhängig, sondern in ihrer Kombination als HLA-Haplotyp vererbt. Diese gekoppelte Vererbung einzelner Gene unterschiedlicher Loci wird als Linkage Disequilibrium bezeichnet.³²

Die Vererbung der HLA-Haplotypen folgt den Mendelschen Gesetzen und die jeweiligen HLA-Allele beider Chromosomen 6 werden kodominant exprimiert.

Somit ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit eines HLA-identen Geschwisterkindes von 25%, eines HLA-haploidenten Geschwisterkindes von 50%.²⁰ Beide leiblichen Eltern sind jeweils HLA-haploident.

Rekombination, Genkonversion und Mutationen führten zur Ausbildung des HLA – Polymorphismus.³⁶ Aufgrund eines unterschiedlich stark ausgeprägten Linkage Disequilibriums ist die Rate von Rekombinationen nicht gleichmäßig innerhalb des MHC-Komplexes verteilt. Rekombinationen zwischen HLA-A und HLA-B kommen in einer Rate von 0,8%,³² zwischen HLA-B und HLA-DRB1 von 0,94% und zwischen HLA-DRB1 und HLA-DPB1 von 0,74% vor.³⁷ Zwischen HLA-DRB1 und HLA-DQB1 besteht ein starkes Linkage Disequilibrium.

Erste Testungen zur Histokompatibilität zwischen Spender und Empfänger erfolgten mittels Hauttransplantation.⁷ Die Kompatibilität wurde anhand des Überlebens des Hauttransplantats beurteilt. Der Nachweis von HLA-Antigenen gelang zunächst mit serologischen Methoden.^{31, 33} Hierzu wurden Seren von polytransfunden Patienten, mehrfachgebährenden Frauen oder speziell immunisierten Freiwilligen verwendet.³³ Die Bedeutung der identifizierten Antigene für den Verlauf einer Transplantation konnte wieder anhand von Hauttransplantationen bestätigt werden.³¹ Mit Hilfe einer solchen serologischen Typisierung des HLA-Phänotyps war es möglich, „identische“ Spender mit niedrigem Auflösungsvermögen zu identifizieren. Eine hochauflösende molekulargenetische Typisierung des zugrundeliegenden Genotyps mittels PCR war ab 1990 für HLA-Allele Klasse II und seit 1996 für HLA-Allele Klasse I möglich.³⁸ Diese neuen Methoden zeigten eine noch größere Heterogenität der HLA-Allele, als serologisch nachgewiesen werden konnte, und sie ermöglichten den Nachweis neuer Allele. Einzelnen serologisch definierten HLA Typen können molekulargenetisch verschiedene Allele zugrunde liegen,³⁹ deren Unterscheidung transplantationsrelevant ist.

Die WHO - Nomenklatur des HLA-Systems beschreibt mit den Buchstaben den Genlocus (HLA-A). Für Klasse II Allele folgen die Buchstaben der Familie und der Kette sowie ggf. die Nummerierung des Genortes (HLA-DRB1). Es folgen die ersten beiden Ziffern der Allel-Familie, welche meist der serologischen Antigengruppe entspricht. Das folgende Ziffernfeld identifiziert das Allel in der Folge

seiner Entdeckung (z.B. HLA-B*15:01).⁴⁰ In weiteren Feldern können die Allele hinsichtlich Differenzen in der kodierenden oder nicht kodierenden Region noch umfassender beschrieben werden. Für den klinischen Gebrauch erfolgt in der Regel eine Aufschlüsselung der ersten beiden Felder.³⁰

Mit zunehmender Anzahl nicht übereinstimmender HLA-Allele zwischen Spender und Empfänger erhöht sich das Risiko eines Transplantatversagens, einer GvHD bzw. des Versterbens.^{41, 42, 43} Nicht jedes Allel-Mismatch hat hierbei die gleiche Auswirkung auf den klinischen Verlauf. So scheint ein Mismatch der HLA-Klasse I bei haploidenter HSCT eher Auswirkung auf ein Transplantatversagen, ein HLA-DR oder HLA-DQ Mismatch auf eine GvHD zu haben.^{44, 45} Während bestimmte HLA-Konstellationen klar mit einer höheren Morbidität und höheren Mortalität assoziiert sind, können andere, wie ein C*03:03 vs. C*03:04 Mismatch toleriert werden.^{44, 46} Zur Identifizierung eines solchen „permissiven Mismatch“ könnte in Zukunft eine Epitop-basierte HLA-Bestimmung beitragen.^{47, 48}

Auf Grundlage des Erkenntniszuwachses und der diagnostischen Möglichkeiten änderte sich auch die Definition eines passenden Spenders. Der vierte deutsche Konsensus sieht einen identen Fremdspender gegeben, wenn er hochauflösend in 10 der 10 HLA-Allele HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 und HLA-DRQ1 übereinstimmt.³⁰ Eine Spenderauswahl muss aber auch vor dem Hintergrund des individuellen Krankheitsrisikos und der Dringlichkeit der Transplantation gesehen werden.^{30, 44}

1.3.2. Der haploidente Spender

Sind Stammzellspender und -empfänger zueinander haploident, teilen sie lediglich einen HLA-Haplotyp. Wie oben dargestellt, werden die HLA-Allele „en bloc“ als Haplotyp vererbt. Kindern wird von jedem Elternteil je ein Haplotyp vererbt und sie sind sowohl zur Mutter als auch zum Vater haploident. Zur Bestimmung der HLA-Haplotypen und deren Segregation genügt bei der Spendersuche innerhalb der Kernfamilie die Testung von HLA-A, B und DRB1.³⁰

Der zweite, nicht gemeinsame HLA-Haplotyp bedingt ein Mismatch in bis zur Hälfte der HLA-Allele. Zufallsbedingt können Spender und Empfänger zusätzlich in Allelen des nicht geteilten Haplotyps übereinstimmen. Sollten Spender oder

Empfänger in einem HLA-Allel homozygot sein, kann sich ein Mismatch lediglich in GvHD- oder in Abstoßungsrichtung auswirken.⁴¹

Das hohe Maß an nicht übereinstimmenden HLA-Merkmalen bei haploidenter HSCT ist mit einem besonderen Risiko eines Transplantatversagens oder einer GvHD verbunden.⁴⁹ Der Vorteil haploidenter Spender (bei Kindern in der Regel die Eltern) liegt in der schnellen Verfügbarkeit der Spender, auch für eventuelle spätere Stammzell- oder Spenderlymphozytengaben.^{19, 50}

1.3.3. Killer-Cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR)

Natural Killer (NK) – Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems und im Stammzelltransplantat enthalten. Sie sind in der Lage, körperfremde Zellen als fremd zu erkennen und zu lysieren. Dabei unterliegen sie komplexen Regulationsmechanismen, die über eine Vielzahl aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren vermittelt werden, unter anderem den Killer-Cell Immunoglobulin-like Rezeptoren (KIR).⁵¹ Alle NK-Zellen verfügen über mindestens einen inhibitorischen KI-Rezeptor.⁵²

Bindung inhibitorischer KIR an ein passendes HLA I – Molekül hemmt die NK-Zell-Aktivierung. Zellen, die keine entsprechenden HLA-Moleküle exprimieren oder diese im Rahmen einer Infektion bzw. malignen Erkrankung herunterreguliert haben, sind hingegen den zytotoxischen Angriffen der NK-Zellen ausgesetzt.⁵² HLA-C Moleküle der Gruppe 1 stellen spezifische Liganden für KIR 2DL2 dar. KIR 2DL1 erkennen HLA-C Moleküle der Gruppe 2; KIR 3DL1 binden an HLA-Bw4 und KIR 3DL2 an HLA-A1 und A11.^{53, 56} Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren konnten bisher nicht gut definiert werden.

Die KIR werden von 15 Genen sowie 2 Pseudogenen auf Chromosom 19 kodiert und unabhängig von den Genloci der HLA-Moleküle auf Chromosom 6 vererbt. Die Vererbung der polymorphen KIR-Gene erfolgt ebenfalls in Form von Haplotypen, wobei hier vereinfacht in die Haplotypen A und B unterschieden werden kann.^{54, 55}

Spender-NK-Zellen, deren Hemmung durch fehlenden KIR-Ligand entfällt, sind in der Lage, durch Lyse von Empfänger T-Zellen das Risiko einer Abstoßung zu verringern und einen gemischten Chimärismus zugunsten des Spenders zu ver-

schieben.^{52, 57} Im Gegensatz zu T-Zellen scheinen die NK-Zellen selbst keine GvHD zu verursachen, sondern das Risiko einer GvHD durch Lyse antigenpräsentierender Zellen (APC) des Empfängers zu senken. Dieser Mechanismus könnte höhere T-Zellzahlen im Transplantat zulassen und hierdurch die Immunregeneration verkürzen.⁵⁷ Schließlich sind alloreaktive NK-Zellen in der Lage, Tumorzellen zu lysieren und einen GvL bzw. GvT-Effekt zu vermitteln.^{52, 57} Mittels hochauflösender HLA-Typisierung kann das Vorliegen passender KIR-Liganden auf Empfängerzellen bestimmt und damit die Alloreaktivität der NK-Zellen abgeschätzt werden.^{53, 56} Das Ligand-Ligand-Modell orientiert sich an der Nicht-Übereinstimmung der als KIR-Ligand in Frage kommenden HLA-Allele zw. Spender und Empfänger in GvH-Richtung.^{57, 58, 60} Das Rezeptor-Ligand-Modell berücksichtigt neben der Ligand-Expression auf Empfängerzellen auch die zu diesem HLA-Typ korrespondierenden KIR auf den Spender-NK-Zellen.^{58, 60, 61} Zudem wird das KIR-Haplotyp-Modell herangezogen, um die Alloreaktivität der NK-Zellen vorherzusagen.^{55, 59, 60} Ein KIR-Haplotyp B des Spenders, war mit weniger Rezidiven sowie längerem Gesamtüberleben assoziiert.⁵⁹ Sowohl bei Transplantationen unverwandter Spender mit KIR-Mismatch als auch bei haploidenten Transplantationen mit T-Zell-Depletion und KIR-Mismatch konnte ein NK-Zell vermittelter GvL-Effekt mit niedrigerer Rezidivrate myeloischer Leukämien und verbessertem Überleben gezeigt werden.^{53, 56} Andere Studien konnten einen Überlebensvorteil nicht bestätigen, wobei unterschiedliche Konditionierungsregimen, Patientenpopulationen, Immunsuppression, der Einsatz von ATG und insbesondere eine T-Zell-Depletion als Ursache diskutiert wurden.^{44, 51, 60, 62, 63} Auch wurde eine erhöhte infektbedingte TRM beschrieben, welche einen möglichen GvL-bedingten Überlebensvorteil aufwiegen könnte.^{63, 64}

1.3.4. Weitere Spenderkriterien

Für nachfolgende Spendereigenschaften wurde ebenfalls ein Einfluss auf den Erfolg einer Stammzelltransplantation beschrieben. Ihre Wertigkeit für die Spenderauswahl ist der der HLA-Kompatibilität nachrangig und Studienergebnisse sind hinsichtlich einzelner der genannten Faktoren nicht immer konstant.

Das Risiko einer Transplantatabstoßung ist erhöht, wenn beim Empfänger präformierte spenderspezifische HLA-Antikörper vorhanden sind. Kann bei Nachweis derartiger Antikörper nicht auf einen anderen Spender gewechselt werden, kann eine Vorbehandlung des Empfängers mit Rituximab, Plasmapherese oder Immunglobulinen das Risiko einer Abstoßung vermindern.⁶⁵

Selbst bei Transplantation von HLA-identen Spendern können Minor-Histokompatibilitätsantigene (mHAg) eine GvHD vermitteln. Klasse I HLA präsentieren T-Zellen körpereigene Peptide. Erkennen Spenderlymphozyten auf diese Art prä-sentierete empfängerspezifische Peptide, setzt dies eine zytotoxische T-Zell-Antwort und damit eine GvH-Reaktion in Gang.^{66, 67} Sind Stammzellspender und -empfänger unterschiedlichen Geschlechts, ist eine immunologische Antwort von Frauen stammender Lymphozyten gegen Y-Chromosom-spezifische Proteine (H-Y-Antigene) möglich.⁶⁷ Diese Anti-H-Y-Alloimmunisierung kann sowohl T-Zell- als auch antikörpervermittelt sein, mit den Folgen einer Transplantatabstoßung oder einer GvHD.⁶⁸

Eine vorausgegangene Schwangerschaft einer Stammzellspenderin ist mit einem höheren Risiko einer cGvHD assoziiert.^{68, 69}

Sowohl Vater als auch Mutter vererben ihrem Kind jeweils einen HLA-Haplotyp. In utero wird durch den Kontakt des kindlichen Immunsystems mit Antigenen des nichtvererbten mütterlichen HLA-Haplotyps (non-inherited maternal antigens) eine alloreaktive Toleranz induziert. Dieser immunmodulatorische Effekt hält lebenslang an und es wurde ein geringeres GvHD-Risiko für haploidente, NIMA-nicht übereinstimmende Geschwisterspender berichtet.^{70, 71}

Eine Toleranzinduktion des mütterlichen Immunsystems gegenüber Antigenen des vererbten väterlichen HLA-Haplotyps (inherited paternal antigens) ist ebenfalls möglich. Sie ist allerdings nicht immer präsent und es ist auch die Ausbildung von Antikörpern oder ein Priming von T-Zellen gegen IPA ist möglich.⁷⁰

Eine CMV-Erkrankung ist mit einer erhöhten Rate an Komplikationen wie einer GvHD oder TRM verbunden. Durch die Auswahl eines CMV negativen Spenders für einen CMV negativen Empfänger kann eine Übertragung des Virus und somit eine CMV-Erkrankung vermieden werden. Bei einem CMV positiven Empfänger kann jedoch die Auswahl eines CMV positiven Spenders und die damit

verbundene Übertragung einer CMV - spezifischen Immunität günstig ausfallen.^{43, 72} Dieser Effekt wird allerdings durch eine T-Zell-Depletion wieder abgeschwächt.⁷²

Weitere Spendereigenschaften mit möglichem Einfluss auf den Transplantationserfolg sind Alter und klinischer Zustand des Spenders; die Blutgruppenkompatibilität sowie Genpolymorphismen bestimmter Zytokine.^{69, 73, 74}

1.4. Graft Manipulation

Es existieren verschiedene Methoden zur Bearbeitung von Stammzellpräparaten. Diese zielen bei haploidenter Transplantation auf eine T-Zell-Depletion zur Reduktion einer inakzeptabel hohen GvHD-Rate ab. Die T-Zell-Depletion stellt eine der ersten Transplantatmanipulationen dar.⁷⁵ Hierfür wurden ex vivo Prozeduren wie Sojabohnenagglutination und Rosettenbildung mit Schafs-Erythrozyten oder gegen T-Zellen gerichtete Antikörper mit Zusatz von Komplementfaktoren angewandt.^{14, 75, 76} Die genannten Verfahren waren zeitaufwendig und für PBSC-Transplantate mit hohem Zellgehalt wenig geeignet. Die Effizienz dieser Depletionsmethoden war mit einer Logstufe gering.^{14, 75}

Die magnetic activated cell sorting (MACS) – Technik eröffnet die Möglichkeit einer automatisierten Transplantatbearbeitung auch von zellreichen PBSC-Präparaten. Die Methode lässt sowohl eine Positiv- als auch eine Negativselektion (Depletion) zu. Mit magnetischen Mikropartikeln (Microbeads) konjugierte Antikörper werden mit den Stammzellen inkubiert und binden spezifisch an Oberflächenproteine der zu selektionierenden Zellen. Die so markierten Zellen können mit Hilfe des CliniMACS-Systems über ein Magnetfeld von den nicht markierten Zellen abgetrennt werden.^{76, 77}

Bei der CD34 oder CD133 Positivselektion werden die Stammzellpräparate mit CD34 bzw. CD133 spezifischen Antikörpern inkubiert, von den anderen Zellen getrennt und transplantiert. Auf diese Weise gehen allerdings auch für Engraftment, Infektabwehr oder einen GvL-Effekt wichtige Zellen (z.B. NK-Zellen, dendritische Zellen) verloren. Mittels intensiverer Konditionierung und hoher Stammzellzahl (Megadose-Konzept) kann dennoch eine hohe Engraftmentrate erreicht werden.^{19, 76}

Bei der CD3/CD19 Depletion werden CD3 und CD19 positive und mit entsprechenden Antikörpern markierte Lymphozyten selektioniert und verworfen. Das Transplantat beinhaltet alle nicht markierten Zellen, neben hämatopoietischen Stammzellen auch Monozyten, NK-Zellen, CD34 negative Stammzellen und dendritische Zellen. Der Verlust an Stammzellen durch diese Methode ist gering und ihre biologische Funktion nicht wesentlich beeinträchtigt. Eine gleichzeitige Depletion der CD19 positiven B-Lymphozyten begründet sich durch das erhöhte Risiko einer PTLD infolge der CD3-Depletion.^{13, 75, 77}

1.5. Konditionierung und Serotherapie

Die Konditionierung des Empfängers schafft die Voraussetzung für eine erfolgreiche Transplantation. Sie soll der Behandlung der Grunderkrankung dienen, das Immunsystem des Empfängers zur Verhinderung einer Abstoßung supprimieren und freie Nischen für die hämatopoietischen Spenderzellen schaffen.^{78, 79} Letzter Punkt wird hierbei kontrovers diskutiert.

Die Beseitigung einer malignen Grunderkrankung wurde zunächst als wesentlicher Therapiebestandteil einer Konditionierung gesehen. Die nachfolgende Stammzellgabe sollte lediglich das notwendige Rettungsmanöver darstellen, die Nebenwirkungen der hochdosierten (Radio-) Chemotherapie zu überleben. Die Toxizität der Konditionierung war dennoch limitierend. Eine Dosisescalation führte zwar zu einer geringeren Rezidivrate, welche allerdings durch eine höhere TRM relativiert wurde.^{78, 79, 80} Das Konzept eines immunologisch vermittelten Graft-versus-Leukämie- bzw. -Tumor-Effekts führte zu einem Paradigmenwechsel. Konditionierungsschemata mit reduzierter Intensität zielen auf eine ausreichende Immunsuppression des Empfängers. Die Elimination residueller Tumorzellen soll durch alloreaktive Spenderlymphozyten erfolgen.^{80, 81, 82}

Durch die Verminderung der Konditionierungsintensität kann die Toxizität und TRM vermindert werden. Somit können Transplantationen auch Patientengruppen mit schwerwiegenden Begleiterkrankungen zugänglich gemacht werden. Auch Kindern mit nicht malignen Erkrankungen bietet sich hierdurch die Möglichkeit einer kurativen Therapie mit akzeptabler Organtoxizität.⁸¹

Konditionierungsschemata werden anhand der zu erwartenden Zytopenie und der Notwendigkeit einer nachfolgenden Stammzellgabe in myeloablative Konditionierung (MAC), Konditionierung mit reduzierter Intensität (RIC) und nicht-myeloablative Konditionierung (NMA) unterteilt.⁷⁹

Eine MAC bewirkt in der Regel eine tiefe, anhaltende und irreversible Panzytopenie. Die hämatopoietische Regeneration gelingt nur nach Stammzelltransfusion. MAC-Schemata basieren zumeist auf einer Ganzkörperbestrahlung oder auf einer Kombinationschemotherapie mit alkylierenden Substanzen wie Busulfan.^{79, 82}

Demgegenüber ist eine NMA-Konditionierung durch eine geringgradigere Zytopenie gekennzeichnet, die in der Regel ohne Stammzellsupport überwunden werden kann.⁷⁹ Die Immunablation des Empfängers ermöglicht ein Engraftment der Spenderstammzellen und die Ausbildung eines gemischten Chimärismus. Dieser kann bei nicht-malignen Erkrankungen bereits ausreichen, die Grunderkrankung erfolgreich zu behandeln. Vom Spender abstammende Lymphozyten sind in der Lage, die Empfängerhämatopoiese zu eliminieren und den Chimärismus zugunsten des Spenders zu verschieben, was durch Gabe zusätzlicher DLI gezielt verstärkt werden kann.^{78, 80, 81} Das Purinanaloga Fludarabin bildet in vielen NMA Konditionierungsschemata die immunsupprimierende Grundlage.⁸³ Nicht-myeloablative Konditionierungen sind mit einer geringeren TRM aber höheren Rezidivrate verbunden.⁷⁸

Unter RIC werden Schemata zusammengefasst, welche sich weder den MAC noch den NMA zurechnen lassen. In der Regel ist ein Stammzellsupport notwendig, um eine stabile Hämatopoiese wiederherzustellen. Die Elimination einer residualen Empfängerhämatopoiese und von Tumorzellen erfolgt immunvermittelt durch Spenderzellen. Dieser Effekt lässt sich durch das Absetzen einer Immunsuppression, der Gabe von DLI oder Zytokinen (IL-2, IFN-alpha) verstärken.^{78, 79, 81, 82} RIC sind mit einem erhöhten Abstoßungsrisiko verbunden,⁸⁴ konnten aber dennoch erfolgreich auch im haploidenten Transplantationssetting angewandt werden.⁴⁹

Die zusätzliche Gabe gegen CD3 gerichteter Antikörper (OKT3 oder ATG) im Rahmen der Konditionierung führt zu einer in vivo Depletion von Lymphozyten

des Empfängers. Diese Serotherapie wirkt, wie auch eine TLI (total lymph node irradiation), immunsuppressiv und reduziert das Risiko eines Transplantatversagens. Eine Serotherapie kann gezielt bei Patienten mit hohem Abstoßungsrisiko oder vorausgegangener Abstoßung eingesetzt werden.⁸²

Eine wiederholte myeloablative Konditionierung in kurzem Zeitabstand nach Abstoßung oder Rezidiv ist mit einer hohen Toxizität verbunden.^{85, 86, 87} Für diese Patienten wurden erfolgreich immunablative Rekonditionierungsschemata angewandt, welche eine ausreichende Immunsuppression bei gleichzeitig reduzierter Toxizität erzielen (siehe unten).^{88, 89, 90}

1.6. Graft Failure – Graft vs. Host Disease – Graft vs. Tumor Effekt

Der Verlauf einer Stammzelltransplantation wird von verschiedenen immunologischen Phänomenen bestimmt. Diese werden im Wesentlichen zellulär durch die Lymphozyten des Spenders bzw. Empfängers beeinflusst. Eine Transplantat-abstoßung und eine GvHD erscheinen zueinander invers korreliert.⁹¹ Maßnahmen zur Verhinderung einer drohenden Abstoßung, wie das Absetzen einer Immunsuppression oder DLI-Gabe, können eine GvHD hervorrufen.^{80, 81} Dagegen kann eine stärkere Immunsuppression einer GvHD entgegenwirken, aber auch einen möglichen Graft-versus-Leukämie/Tumor-Effekt abschwächen. Eine Trennung eines GvL/GvT Effektes von einer GvHD ist weiterhin Gegenstand der Forschungsbemühungen.

1.7. Engraftment und Graft Failure

Ein wesentliches Erfolgskriterium einer hämatopoietischen Stammzelltransplantation ist das Anwachsen des Transplantats mit dauerhafter Etablierung einer Spenderhämatopoiese (Engraftment), die Funktionsaufnahme der antransplantierten Blut- und Immunzellen und sowie eine Toleranzausbildung.⁹²

1.7.1. Definition Engraftment und Graft Failure

Das Engraftment wird im Allgemeinen anhand der Zahl neutrophiler Granulozyten definiert. Der erste von drei aufeinanderfolgenden Tagen mit $>500/\mu\text{l}$ neutrophilen Granulozyten gilt als Tag des Engraftments.^{93, 94} Alternativ wird in

gleicher Weise der erste von drei aufeinanderfolgenden Tagen mit $>1000/\mu\text{l}$ Leukozyten zur Definition des Leukozytenengraftments herangezogen.⁹⁴ Das Anwachsen der verschiedenen Zellreihen (trilineage engraftment) kann unterschiedlich lange Zeit in Anspruch nehmen. Insbesondere das Engraftment der Thrombozyten, definiert als erster von drei Tagen mit Thrombozytenzahlen $>20.000/\mu\text{l}$ ohne Transfusion in den vorangegangenen 7 Tagen, kann verzögert erfolgen.⁹³

Kann sich dauerhaft keine Spenderhämatopoiese etablieren, spricht man von einem Transplantatversagen (Graft Failure). Beim primären Graft Failure etabliert sich nie eine Spenderhämatopoiese (Non-Engraftment), die neutrophilen Granulozyten steigen nicht $>500/\mu\text{l}$ an drei aufeinanderfolgenden Tagen innerhalb von 21 Tagen.^{95, 96, 97} Auch nach Tag 21 kann es spontan noch zu einem Anwachsen des Transplantats kommen¹⁰² und andere Definitionen eines PGF wählen eine anhaltende Neutropenie $<500/\mu\text{l}$ bis Tag 28 oder bis zur Gabe eines Stammzellboosts bzw. von DLI.⁹⁸ Bei einem PGF bleibt die konditionierungsbedingte Zytopenie bestehen, selten kommt es zu einer autologen Rekonstitution.⁹⁸

Beim sekundären Graft Failure kommt es nach initialem Engraftment entsprechend den oben genannten Kriterien zu einem Verlust der Spenderhämatopoiese (Abstoßung).^{98, 99} Der Transplantatverlust kann entweder hyperakut erfolgen, oder auch allmählich mit ansteigendem autologen Chimärismusanteil (siehe unten).^{84, 105}

Ein Transplantatversagen tritt meist innerhalb der ersten 100 Tage auf. In der Literatur finden sich seltene Fälle mit einer späteren Abstoßung, z.T. Jahre nach dem Transplantationszeitpunkt.^{100, 101}

1.7.2. Mechanismen von Engraftment und Transplantatabstoßung

Für ein Engraftment müssen die in die Blutbahn applizierten Zellen des Transplantats in ausreichender Zahl ihren Weg ins Knochenmark finden (Homing).⁹² Nur ca. 10% der transplantierten Stammzellen wandern aus der Blutbahn ins Knochenmark ein, der Anteil lässt sich mittels Injektion direkt ins Knochenmark erhöhen, was speziell bei Transplantaten mit wenig Stammzellen vorteilhaft sein

kann.⁸⁴ Die Stammzellen benötigen ein intaktes Microenvironment im Knochenmark aus Stromazellen, extrazellulären Proteinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren.⁹² Eine HLA-Inkompatibilität kann sowohl das Homing als auch die Zellinteraktion und Bildung von Wachstumsfaktoren beeinträchtigen.¹⁰² Infektionen oder Medikamententoxizität können sich ebenfalls negativ auf diese Abläufe auswirken.^{84, 99, 103}

Entscheidend für ein dauerhaftes Engraftment ist, dass die Spenderzellen nicht vom Immunsystem des Empfängers als fremd erkannt und eradiziert werden. Ein T-Zell vermittelter Mechanismus lässt sich als entscheidend für eine solche Abstoßung aufzeigen.⁹⁹ So geht die Abstoßung i.d.R. mit einem Anstieg autologer T-Zellen einher.^{84, 102, 103} Während Patienten mit geringerer immunosuppressiven Konditionierung und höherer Rate verbleibender immunkompetenter Empfängerzellen öfter eine Abstoßung erlitten, trat diese bei Patienten mit SCID seltener auf.^{102, 104} Auch die mit der Anzahl des HLA-Mismatches zunehmende Abstoßungsrate weist auf einen T-Zell vermittelten Mechanismus hin.⁹⁸ Eine Serotherapie mit ATG reduziert die Zahl residuärer Empfänger T-Zellen und damit das Abstoßungsrisiko.⁹⁵ Spender-T-Zellen können über die Eradikation residuärer Empfänger-T-Zellen eine Abstoßung abwenden,^{92, 104} wodurch sich ein höheres Abstoßungsrisiko nach T-Zell-Depletion des Transplantats erklärt.

Daneben sind auch Empfänger-NK-Zellen in der Lage, ein Transplantat abzustoßen.^{84, 99, 103, 104} Eine durch Antikörper vermittelte Abstoßung verläuft im Gegensatz zu einer zellvermittelten eher subakut, wobei diese Form der Abstoßung noch kontrovers diskutiert wird.^{84, 95, 102, 105}

1.7.3. Gemischter Chimärismus und schwache Transplantatfunktion

Ein gleichzeitiges Vorliegen von Empfänger- und Spenderblutzellen nennt man Chimärismus. Liegt der Anteil der vom Spender stammenden Zellen >95% spricht man von vollständigem Spenderchimärismus (complete chimerism).⁸⁴ Ein gemischter Chimärismus mit steigendem autologen Anteil kann eine Abstoßung oder ein Rezidiv ankündigen.^{84, 106}

Nach einer RIC liegt zunächst häufiger ein gemischter Chimärismus vor und regelmäßige Chimärismuskontrollen sind notwendig, um früh eine drohende Ab-

stoßung zu erkennen. Die Chimärismusanalyse kann anhand aller kernhaltigen Zellen oder in Subpopulationen, wie den CD3-Lymphozyten durchgeführt werden, wobei sich der Chimärismus in den Populationen unterscheiden kann. Bei der Chimärismusbestimmung kommen neben zytogenetischen und FACS-Analysen zumeist DNA-basierte Methoden, beispielsweise die Analyse von Short Tandem Repeat-Polymorphismen, zur Anwendung.¹⁰⁶

Ein gemischter Chimärismus (Spenderanteil zwischen 5% und 95%)⁸⁵ kann auch dauerhaft bestehen bleiben, ohne in ein Transplantatversagen überzugehen. Ein über zwei Jahre bestehender stabiler gemischter Chimärismus definiert einen persistierenden Chimärismus.⁸⁴

Weiterhin kann die Funktion des Transplantats stark eingeschränkt sein, ohne dass ein Graft Failure vorliegt.⁹⁶ Diese mit Zytopenien einhergehende Funktionsstörung kann langfristig oder auch temporär im Zusammenhang mit Infektionen oder Medikamenteneinnahme stehen.⁹⁴

1.7.4. Risikofaktoren für ein Graft Failure

Aus den genannten Überlegungen lassen sich folgende Risikofaktoren eines Transplantatversagens ableiten und auch in Studien belegen. Eine HLA-Inkompatibilität ist mit einem erhöhten Risiko eines Graft Failures assoziiert.^{84, 102} Dieses Risiko korreliert mit dem Grad der Inkompatibilität, wobei ein Mismatch der verschiedenen HLA-Loki in ihrer Auswirkung nicht gleichwertig ausfällt.¹⁰² Auch mHAg können ein Transplantatversagen vermitteln.¹⁰⁵

Eine T-Zell-Depletion und eine RIC gehen wesentlich häufiger mit einem Graft Failure einher. Immunkompetente Zellen des Empfängers werden unzureichend eliminiert und können eine Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat vermitteln.^{84, 92, 99, 105}

Höhere Graft Failure Raten wurden bei Patienten gesehen, die sich zum Transplantationszeitpunkt nicht in Remission befanden, was durch die residuelle Grunderkrankung, eine intensivere Vortherapie oder durch die Auswahl eines weniger passenden Spenders bedingt sein kann.^{102, 108}

Eine Sensibilisierung des Empfängers durch (unbestrahlte) Bluttransfusionen, begünstigt eine Abstoßung. Die ausgebildeten Gedächtnis-T-Zellen lassen sich nur schwer durch die Konditionierung eliminieren.^{84, 104, 105}

Andere Faktoren, die mit einer erhöhten Rate eines Transplantatversagens einhergehen, sind eine niedrige Stammzellzahl im Transplantat, eine Schädigung des Knochenmarkstromas durch die Grunderkrankung oder Vortherapie, eine Beeinträchtigung des Transplantats durch Kryokonservierung oder eine ABO-Inkompatibilität.^{84, 92, 95, 98, 107, 108} Nicht gesichert ist, ob die ABO-Inkompatibilität selbst oder die hierbei angewandte Erythrozytendepletion, die mit einer Reduktion von Stammzellen und Lymphozyten im Transplantat einhergeht, ursächlich ist.^{98, 105}

Zudem können sich Infektionen (CMV, HHV6, Parvoviren, bakt. Sepsis) oder myelotoxische Medikamente negativ auf ein Engraftment auswirken.⁸⁴ Spenderalter, -geschlecht, klinischer Zustand, Transplantatquelle (PBSC oder Knochenmark) wurden als weitere Einflussfaktoren in der Literatur beschrieben.⁹⁸

1.7.5. Therapieoptionen bei Graft Failure

Ein Transplantatversagen stellt eine lebensbedrohliche Komplikation einer Stammzelltransplantation dar und speziell ein primäres Graft Failure ist mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität verbunden.^{84, 103} Die Patienten sind sowohl durch Infektionen infolge der langen Aplasiephase gefährdet, als auch durch die kumulative Toxizität der Konditionierung bei erneuter Transplantation in kurzer zeitlicher Folge.⁹⁰ Die therapiebedingte Mortalität nimmt mit kürzerem Abstand zur vorherigen Transplantation zu.¹⁰⁰ Es existieren keine standardisierten Therapieempfehlungen zum Vorgehen bei Transplantatversagen.⁸⁹

Prävention eines Graft Failures

Zur Vermeidung eines durch das Empfänger-Immunsystem vermittelten Graft Failures ist eine ausreichend immunsuppressive Konditionierung notwendig.¹⁰⁵ Eine zusätzliche Serotherapie mit ATG oder OKT3 verstärkt einen solchen immunsuppressiven Effekt bei insgesamt guter Verträglichkeit.^{92, 95} Patienten mit hohem Abstoßungsrisiko können darüber hinaus von einer zusätzlichen totalen

Lymphknotenbestrahlung (TLI), welche die Empfänger-Lymphozyten in Zahl und Funktion unterdrückt, profitieren.^{89, 109}

Lassen sich HLA-spezifische Antikörper beim Empfänger nachweisen, kann durch eine Behandlung mit Immunglobulinen, Immunabsorption oder B-Zell-Antikörpern eine Reduktion dieser versucht werden.¹⁰⁵

Schließlich begünstigen höhere Stammzellzahlen im Transplantat ebenfalls ein Engraftment.^{99,105}

Therapieoptionen bei drohendem Transplantatversagen

Die regelmäßige Bestimmung des Chimärismus erlaubt es, frühzeitig ein drohendes Transplantatversagen zu erkennen und therapeutisch darauf zu reagieren.^{84, 110}

Das Absetzen einer Immunsuppression begünstigt die Erholung des Spenderchimärismus.⁸⁴ Spender-Lymphozyteninfusionen haben das Potential, über die Beseitigung residualer Empfängerlymphozyten, einen gemischten Chimärismus zugunsten des Spenders zu verschieben und eine Transplantatabstoßung abzuwenden.^{84, 103, 105} Die Gabe eines Stammzellboosts wurde ebenfalls erfolgreich bei drohendem Graft Failure angewandt.⁹⁶

Andere Therapieoptionen umfassen die Gabe mesenchymaler Stammzellen (MSC) welche durch die Interaktion mit hämatopoietischen Stammzellen und ihren immunmodulatorischen Effekt ein Engraftment begünstigen.^{84, 99, 107}

Der Einsatz von Wachstumsfaktoren, das Absetzen potentiell myelotoxischer Medikamente sowie die Behandlung von Infektionen oder einer GvHD bilden weitere Therapieansätze.⁸⁴

Therapieoptionen bei schlechter Transplantatfunktion

Bei noch bestehendem Spenderchimärismus aber schlechter Transplantatfunktion in Form von Zytopenien kann, neben den oben aufgeführten Maßnahmen, ein Stammzellboost diese Funktion verbessern.^{84, 105}

Therapieoptionen bei Transplantatversagen

Ein Transplantatversagen mit ausbleibender autologer Rekonstitution gefährdet die Patienten durch die anhaltende Aplasiephase. Bei nicht malignen Erkrankungen und soliden Tumoren kann diese mit Gabe eines autologen Backups als Rescue-Manöver überwunden werden.⁸⁴ Ist nach autologer Regeneration / autologem Backup eine erneute Stammzelltransplantation vorgesehen, so ist in der Regel eine erneute myeloablative Konditionierung erforderlich. Ein kurzer Zeitabstand zu einer erneuten Konditionierung, insbesondere unter 60 Tagen, ist aufgrund der kumulativen Toxizität mit einer hohen transplantationsassoziierten Mortalität verbunden.¹⁰⁰

Lässt die Grunderkrankung z.B. bei Leukämien eine autologe Rekonstitution nicht zu, kann eine Rekonditionierung mit erneuter Stammzellgabe versucht werden.⁸⁴ Die hierdurch verkürzte Aplasiephase senkt das Risiko lebensbedrohlicher Infektionen bei einem vergleichsweise geringer toxischem und verträglicherem Rekonditionierungsregime.¹⁰³ Die Rekonditionierung muss eine ausreichend immunablative Wirkung haben, um eine erneute Abstoßung durch das residuale Empfänger-Immunsystems zu verhindern.¹⁰³ Diese Anforderung erfüllen Protokolle mit Fludarabin, Serotherapie, TLI oder einer Kombination dieser Elemente.^{84, 89, 90, 103, 111} Ausgehend von einer Immunisierung gegen den ersten Spender erscheint ein Spenderwechsel nach Rekonditionierung erfolgsversprechend.^{103, 111}

1.8. Immunrekonstitution

Einer allogenen Stammzelltransplantation folgt zunächst eine globale Immundefizienz.¹¹² Während die vorangegangene Konditionierung und Serotherapie das Immunsystem des Empfängers gezielt supprimiert, muss sich das transplantierte Immunsystem erst etablieren. Die Rekonstitution des neuen Immunsystems ist entscheidend für die Kontrolle von Infektionen und die Ausbildung eines GvL/GvT-Effektes.^{113, 114}

Die Immunrekonstitution mit der Ausbildung neuer myeloischer und lymphoider Zellreihen sowie deren vollständige Funktionsaufnahme erfolgt in unterschiedlichem Tempo.^{115, 116} Sie wird durch Faktoren wie Spenderalter, Grunderkran-

kung, HLA-Mismatch und Konditionierung / Serotherapie beeinflusst.¹¹⁶ Eine T-Zell-Depletion oder GvHD verzögern die Immunrekonstitution,^{116, 117, 118} während nach RIC mit einer schnelleren Rekonstitution zu rechnen ist.¹¹⁹

Bei Kindern entwickelt sich das neue Spenderimmunsystem aufgrund einer besseren Thymusfunktion i.d.R. schneller als bei Erwachsenen. Eine intensive Vortherapie oder eine GvHD beeinträchtigen jedoch diese thymusabhängige Reifung.^{120, 121}

Der erste Monat nach Transplantation ist von der Erholung des unspezifischen zellulären Immunsystems mit neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen gekennzeichnet.^{114, 116} Der Anstieg neutrophiler Granulozyten definiert das Engraftment. Gleichzeitig kann eine normale Funktion der Granulozyten angenommen werden.¹¹²

Die Zahl der Monozyten steigt innerhalb der ersten zwei Monate nach HSCT und nach ca. drei Monaten finden sich Monozyten in Lungen- und Lebergewebe. Ihre Funktion ist zunächst aber noch gestört.¹¹²

Dendritische Zellen steigen in ihrer Zahl nach haploidenter Transplantation nur langsam und normalisieren sich erst nach etwa einem Jahr.^{114, 122}

Für einen Anstieg der Lymphozyten über 300/μl bis Tag 30 wurde ein geringeres Rezidivrisiko und eine verminderte TRM nach haploidenter Transplantation berichtet.¹¹⁴ NK-Zellen stellen die erste sich regenerierende Lymphozytenpopulation nach haploidenter HSCT dar. Nach Transplantation mit CD34-Positivselektion steigt ihre Zahl schnell an und erreicht Normalwerte innerhalb von ca. 4 Wochen.^{117, 123} Bei Transplantation mit CD3/CD19-Depletion wurden Normalwerte früher, bereits nach 2 Wochen erreicht.¹²⁴ Trotz des schnellen Anstiegs der NK-Zellzahl dauert die Ausreifung ihrer Funktion mit Ausbildung eines reifen Rezeptorprofils an. Die zytotoxische Aktivität des zunächst vorherrschenden NK-Phänotyps CD56^{bright} ist noch reduziert.^{114, 122} Der Anstieg reiferer und zytotoxisch aktiverer CD56^{dim}/CD16⁺ NK-Zellen ist nach Transplantation mit CD3/CD19 Depletion schneller als nach CD34-Selektion.¹²⁴ Die NK-Zellen können sowohl einen Schutz gegen Infektionen als auch einen GvL/GvT-Effekt vermitteln und so in der frühen Posttransplantationsphase die langsamere T-Zell-Rekonstitution teilweise kompensieren.^{113, 125}

Die Rekonstitution des spezifischen Immunsystems nimmt mehrere Monate in Anspruch. Ein Anstieg von T-Zellen geht zunächst auf die Expansion transplan- tierter CD45RO+ Gedächtnis-T-Zellen zurück.^{116, 122, 125} Das T-Zell-Rezeptor- Repertoire ist zu diesem Zeitpunkt noch eingeschränkt.¹²³ Über die nachfolgen- den Monate steigt der Anteil naiver CD45RA+ T-Lymphozyten, welche eine thymusabhängige Reifung durchlaufen. Mit ihnen nimmt auch das TCR- Repertoire zu.^{114, 116, 120, 125} Als Zeichen der thymusabhängigen Rekonstitution lassen sich TREC bestimmen.¹¹⁶ Eine geringe Zahl von TREC sechs Monate nach Transplantation bedingten ein höheres Rezidivrisiko.¹¹⁴

Die Rekonstitution der CD4+ T-Lymphozyten verläuft nach allogener HSCT im Vergleich zu CD8+ Lymphozyten verzögert, was zu einer veränderten CD4:CD8- Ratio führt.^{112, 114, 120} Die Rekonstitution regulatorischer T-Zellen ist aufgrund ihrer Fähigkeit, eine GvHD zu modulieren, von klinischer Bedeutung.¹¹⁶

Für die Erholung der B-Lymphozytenzahl und -funktion ist nach haploidenter Transplantation mit einer langen Zeitspanne von über einem Jahr zu rechnen. Ursächlich kommt hier neben einer CD19-Depletion auch eine fehlende Inter- aktion mit T-Lymphozyten zum Tragen.^{114, 125} Die Funktion der B-Lymphozyten mit Bildung funktionaler Immunglobuline ist in der Regel ebenfalls noch ver- mindert, so dass Immunglobuline substituiert werden müssen.¹¹²

Die Immunrekonstitution wird beeinflusst von der Transplantatbearbeitung, der Wahl des Konditionierungsregimes und der Serotherapie.¹¹⁵ Strategien zur Ver- besserung der Immunrekonstitution beinhalten die Gabe von Zytokinen (IL2), Wachstumsfaktoren^{112, 117} oder die Gabe von Immunzellen, wie NK-Zellen, Spenderlymphozyten oder einen adaptiven Immuntransfer.^{114, 117, 121}

1.9. Infektionen

Infektionen tragen bedeutend zur Morbidität nach allogener Stammzelltransplan- tation bei und stellen die Hauptursache der nicht rezidivbedingten Mortalität dar.^{126, 127} Nach haploidenter HSCT liegt die Zahl der infektionsbedingten Todesfälle bei 11%-26%.^{126, 128}

1.9.1. Phasen der Infektionsgefährdung

Je nach Abschnitt der graduell erfolgenden Immunrestitution und der noch bestehenden Immundefizienz variiert das Risiko, eine spezifische Infektion zu erleiden. Direkt nach Transplantation sind die Patienten durch eine Neutropenie und Mukosiden als potentielle Eintrittspforte von Candida und gramnegativer Erreger sowie durch einliegende Katheter als Eintritt für grampositive Bakterien gefährdet. Diese Prä-Engraftment-Phase fällt nach nicht myeloablativer Konditionierung kürzer aus, mit einer verringerten Infektionsrate.^{127, 129}

Die Post-Engraftment-Phase ist von einer weiterhin bestehenden Defizienz der zellvermittelten spezifischen Immunität geprägt. Viren wie CMV und ADV sind neben Aspergillen zunehmend Ursache für Infektionen. Das Auftreten einer aGvHD und ihre Behandlung verschärfen das Risiko für virale, fungale als auch bakterielle Infektionen.^{127, 129, 130}

In der späten Post-Transplantationsphase, nach Tag 100, sind die Patienten zunehmend durch bekapselte Erreger gefährdet. Eine chronische GvHD und eine Behandlung mit Steroiden prädisponieren für Pilz- (Aspergillose) und virale Infektionen.^{127, 129, 130}

Ungeachtet dieser besonderen Vulnerabilität gegenüber bestimmten Erregern je nach Zeitpunkt nach Transplantation können zu jedem Zeitpunkt auch andere Infektionen auftreten. Infektionen werden durch eine Immunsuppression oder GvHD begünstigt. Eine T-Zell-Depletion und Behandlung mit ATG sind Risikofaktoren einer viralen Infektion bzw. Reaktivierung.^{126, 127, 131}

1.9.2. Bakterielle Infektionen

Bakterielle Infekte treten meist als Pneumonie oder Sepsis auf. Neben einer Neutropenie und GvHD stellen einliegende Katheter einen Risikofaktor für Infektionen durch grampositive Erreger und Mukosiden für gramnegative Darmkeime dar.^{126, 129} Ein kultureller Erregernachweis bei neutropenem Fieber gelingt allerdings nur in ca. 30%.¹²⁷ In einer Studie mit allogenen transplantierten Kindern überwogen Infektionen mit grampositiven Erregern (Staphylokokkus epidermidis,

Streptokokken viridans Gruppe) über gramnegativen (Klebsiellen, E. coli).¹³⁰ Die durch Bakteriämie bedingte Sterblichkeit lag bei 6%.¹³⁰

1.9.3. Pilzinfektionen

Zur sicheren Diagnose einer invasiven Pilzinfektion wird der Erregernachweis kulturell oder histopathologisch gefordert (proven infection). Dieser Nachweis ist nicht immer möglich oder klinisch vertretbar. Es wurden Kriterien festgelegt (Patienteneigenschaften, klinische Informationen, indirekter Pilznachweis durch Galaktomanantest), deren Kombination eine invasive Pilzinfektion wahrscheinlich macht (probable infection).¹³²

Die kumulative Inzidenz invasiver (probable und proven) Pilzinfektionen lag bei 8,8% nach allogener Transplantation¹³³ und reichte bis 27% bei HSCT mit alternativem Spender.¹²⁶ Invasive Pilzinfektionen sind mit einer Mortalität von 20% bis über 50% bei Aspergillosen behaftet.^{127, 133} Aspergillen stellen mit 81% den häufigsten Pilzerreger vor Candida mit ca. 11% dar¹³³ und manifestieren sich vor allem pulmonal.¹²⁷ Eine Neutropenie, eine höhergradige GvHD oder eine langfristige Steroidtherapie sind Risikofaktoren solcher Infektionen. Bei Patienten mit früherer invasiver Pilzinfektion rekurriert diese in ca. 1/3 der Fälle.¹³⁴

1.9.4. Parasitäre Infektionen

Infektionen durch *Pneumocystis jiroveci* lassen sich weitgehend durch eine konsequente Prophylaxe vermeiden. Toxoplasmoseinfektionen treten in Europa bei ca. 6% der Patienten nach allogener HSCT auf,¹²⁶ oft nach Absetzen der *Pneumocystis*-Prophylaxe mit Cotrimoxazol, welches auch gegenüber Toxoplasmose eine protektive Wirkung zeigt.¹²⁷

1.9.5. CMV

CMV ist einer der bedeutendsten viralen Erreger im Rahmen einer Stammzelltransplantation. Durch Auswahl eines CMV-negativen Stammzellspenders für CMV-negative Empfänger und durch Transfusion CMV-negativer Blutprodukte lässt sich das Risiko einer CMV Neuinfektion verringern.^{135, 136} Nach vorausgegangener Infektion persistiert CMV allerdings im Körper und kann bei Wegfall der

T-Zell-Kontrolle reaktiviert werden, nach HSCT in bis zu 70%.¹²⁹ Eine verzögerte Immunrekonstitution im T-Zell-Kompartiment (gekennzeichnet durch niedrige TREC) erhöht das Risiko einer CMV-Reaktivierung.¹³⁰

Eine CMV-Virämie kann asymptomatisch verlaufen, das Auftreten klinischer Symptome zusammen mit CMV-Nachweis im betroffenen Gewebe definiert eine CMV-Erkrankung.¹³⁵ Eine CMV-Pneumonie stellt die gefährlichste Manifestation mit erhöhter Mortalität dar. Darüber hinaus kann sich CMV gastrointestinal, seltener als Retinitis oder Enzephalitis manifestieren.¹³⁶ CMV vermittelt selbst einen immunsuppressiven Effekt.¹³⁶

CMV kann mittels Antigennachweis (pp65) oder durch eine sensitivere PCR im Blut (Vollblut, Leukozyten oder Plasma) diagnostiziert werden. Die PCR erlaubt auch, den Verlauf der Viruslast quantitativ zu überwachen.^{135, 136} Der kulturelle Virusnachweis ist hingegen weniger sensitiv.¹³⁵

Der Benefit einer antiviralen Prophylaxe ist hinsichtlich einer CMV-Erkrankung oder dem Gesamtüberleben nicht belegt, die Prophylaxe mit Nebenwirkungen wie einer Knochenmarksuppression verbunden.¹³⁶ Eine präemptive Strategie setzt auf ein enges Monitoring einer CMV-Virämie (z.B. wöchentlich CMV-PCR im Blut) und frühen Therapie bei noch asymptomatischer Infektion.¹³⁵ Die quantitative Viruslast im zeitlichen Verlauf ist prognostisch relevant.¹³⁵ Eine klinisch manifeste CMV-Erkrankung ist weiterhin mit einer hohen Mortalität verbunden.¹³⁵ Die CMV-Therapie umfasst Virostatika, die Reduktion einer Immunsuppression und die Gabe von Immunglobulinen. Resistenzen wurden v.a. gegen Ganciclovir beobachtet, gängige Resistenzen können mittels DNA-Sequenzierung identifiziert werden.^{135, 136} Ein Vorteil CMV-spezifischer Immunglobuline gegenüber normalen Immunglobulinpräparaten ist nicht belegt.¹³⁵ Neue Therapieansätze verfolgen den adoptiven Immuntransfer CMV-spezifischer T-Zellen.^{129, 135, 136}

1.9.6. ADV

ADV-Infektionen kommen bei Kindern endemisch vor. Die Viren persistieren und können bei Lymphopenie in Form einer asymptomatischen Ausscheidung im Stuhl oder Virämie reaktiviert werden.^{137, 138} Symptome und Virusnachweis in

einem betroffenen Organ beweisen eine ADV-Erkrankung.¹³⁸ Virämien treten in 6-28% nach allogener Stammzelltransplantation auf¹³⁸ und können sich in eine manifeste Erkrankung mit Fieber, Zytopenie, Leberenzymanstieg und bis hin zu Leber- und Multiorganversagen entwickeln. Die Mortalität einer disseminierten ADV-Erkrankung bei Kindern liegt bei 19 – 83%.^{126, 137}

ADV kann mittels PCR sensitiv im Stuhl als auch im Blut überwacht und die Viruslast quantifiziert werden. Die Viruslast im Blut korreliert mit dem Risiko einer ADV-Erkrankung.¹³⁷ Das Konzept der präemptiven Therapie wird auch für ADV-Infektionen verfolgt. Die Reduktion einer Immunsuppression, Virostatika sowie eine adoptive Immuntherapie mit ADV-spezifischen T-Zellen werden in der Therapie einer ADV-Reaktivierung bzw. Erkrankung eingesetzt.^{137, 138}

1.9.7. EBV und PTLD

EBV kommt im Rahmen einer HSCT eine Bedeutung als Auslöser einer PTLD zu. Der Virus persistiert nach vorangegangener Infektion in den B-Zellen. Durch Wegfall der T-Zell-Kontrolle bei noch nicht abgeschlossener Immunrestitution kann EBV reaktivieren und eine Lymphoproliferation induzieren. Es kommt zu einer malignen Transformation der B-Lymphozyten mit Immortalisierung, unkontrollierter Proliferation, und der Ausbildung eines monoklonalen Lymphoms. Die typischen Oberflächenmarker der B-Zellen können sich hierbei verändern.^{139, 140, 141} Die Lymphome leiten sich in der Regel von B-Lymphozyten des Spenders und nur in Einzelfällen des Empfängers ab.^{139, 142}

Eine PTLD manifestiert sich meist innerhalb der ersten 6 Monate nach Transplantation,^{140, 142} kann aber noch nach mehreren Jahren auftreten.¹³⁹ Nach allogener HSCT liegt die Inzidenz bei 1-4%, die Mortalität bei über 50%.^{142, 143} Eine ZNS-Beteiligung ist mit einer schlechten Prognose assoziiert.¹⁴¹

Unter den Risikofaktoren einer PTLD ist die T-Zell-Depletion hervorzuheben. Eine tiefgreifende selektive TCD führt zu einem massiven Anstieg der PTLD-Inzidenz auf 71%.¹³¹ Erst die gleichzeitige Depletion der B-Zellen, als Ort der Viruspersistenz und Ursprung der PTLD, minimiert dieses Risiko wieder. Eine T/B-Ratio von $>0,25$ wurde zur Vermeidung einer PTLD postuliert.¹³¹

EBV kann ebenfalls mittels PCR im Blut, samt quantitativer Bestimmung der Viruslast, gemonitort werden, was bei Hochrisikopatienten bis zur Erholung der T-Zell-Funktion in regelmäßigen Abständen empfohlen wird.¹⁴⁴ Eine EB-Virämie geht einer PTLD meist voraus. Als Indikation einer präemptiven Therapie wurde eine Viruslast >1000 Kopien/ml oder eine steigende Viruslast vorgeschlagen, ist aber noch Gegenstand der Diskussion.¹³⁹

Virostatika haben sich in der Behandlung einer EBV-Infektion oder PTLD als unwirksam erwiesen.¹³⁹ Rituximab wird sowohl präemptiv als auch therapeutisch eingesetzt. Das Ansprechen ist insbesondere bei präemptivem Einsatz gut, bei manifester PTLD geringer.¹³⁹ Führen Rituximab, eine reduzierte Immunsuppression oder die Gabe EBV-spezifischer T-Zellen^{139, 143} nicht zum Erfolg, ist eine Chemotherapie notwendig.¹⁴⁵

Neben der EBV assoziierten B-Zell-PTLD gibt es auch EBV-negative B-Zell-PTLD- und T-Zell-PTLD- Formen, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll.¹⁴⁰

1.9.8. BKV

Bei BK-Viren handelt es sich ebenfalls um Erreger, die nach primärer Infektion im Körper persistieren und bei Immunsuppression reaktivieren können. Eine Infektion kann eine hämorrhagische Zystitis und selten auch ein Nierenversagen verursachen und trägt somit zur Morbidität nach HSCT bei. Die kumulative Inzidenz einer hämorrhagischen Zystitis bei Kindern nach allogener HSCT wird mit 9% angegeben.¹⁴⁶ Neben supportiven Maßnahmen wie Blasenspülung und Hydrierung wird Cidofovir zur Behandlung einer BKV-Infektion angewandt.¹⁴⁶

1.9.9. Andere Viren

Weitere im Rahmen einer Stammzelltransplantation durch Neuinfektion aber insbesondere durch Reaktivierung relevante Viren sind HSV und VZV. Sie können mit Aciclovir und Immunglobulinen behandelt werden.¹²⁷ Durch HHV6-Infektionen bedingte Pneumonien, Enzephalitiden und Transplantatversagen wurden beschrieben.^{126, 129} Zudem kann HHV6 wohl eine GvHD triggern.¹²⁹ Infektionen

durch respiratorische Viren spielen v.a. in der Spätphase nach Transplantation eine Rolle.¹³⁰

1.10. Adoptiver Immuntransfer

Die Ausbildung einer pathogenspezifischen T-Zell-Antwort gegen virale Infektionen kann nach haploidenter HSCT mit T-Zell-Depletion bis zu 12 Monate in Anspruch nehmen,¹⁴⁷ in denen die Patienten durch eine höhere Infektionsrate und kompliziertere Infektionsverläufe gefährdet sind. Eine besondere Bedeutung haben hierbei die Reaktivierung von CMV, EBV und bei Kindern auch ADV.¹⁴⁹ Die zur Verfügung stehenden antiviralen Medikamente sind gerade bei manifester Erkrankung oft nicht effizient genug, die Infektion zu kontrollieren und sie können zudem mit schwerwiegenden Nebenwirkungen behaftet sein.^{149, 150}

Die Verabreichung unspezifischer Spenderlymphozyten-Präparate kann zu einer Infektkontrolle führen, da diese auch pathogenspezifische Lymphozyten enthalten können. Durch den gleichzeitigen Transfer alloreaktiver Zellen ist allerdings die Gefahr einer GvHD nicht unerheblich.¹⁴⁹

Die adoptive Immuntherapie zielt auf den Transfer lediglich pathogenspezifischer Spenderlymphozyten, um die Immunität gegen bestimmte Pathogene wiederherzustellen.¹⁴⁸ Durch den Transfer spezifischer CD8+ T-Lymphozyten kann eine Infektionskontrolle vermittelt werden. Ohne spezifische CD4+ T-Zellen können die CD8+ Lymphozyten allerdings keinen andauernden Schutz vermitteln und ihre Zahl nimmt im Verlauf ab.^{149, 151} Die Gabe spezifischer CD4+ T-Lymphozyten allein oder in Kombination mit spezifischen CD8+ Lymphozyten kann eine anhaltende Immunantwort induzieren.^{147, 151}

Es existieren verschiedene Protokolle zur Isolation pathogenspezifischer T-Lymphozyten. Ältere Protokolle sind zeit- und ressourcenaufwendig und schwer standardisierbar.¹⁵² Neue Methoden wie der IFN- γ capture assay oder die Streptamer basierte Isolation haben den Zeitaufwand deutlich verkürzt, sind effektiv, standardisierbar und entsprechen GMP-Bedingungen.¹⁵² Beim IFN- γ capture assay werden Spenderlymphozyten ex vivo mit einem entsprechenden Antigen stimuliert. Die hierdurch aktivierten Lymphozyten sezernieren IFN- γ und

können anhand dieses Merkmals erkannt und abgetrennt werden. Hierdurch werden sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Lymphozyten gewonnen. Diese werden nach Testung auf Alloreaktivität und ohne weitere ex vivo – Expansion dem Patienten transfundiert.^{148, 149, 152} Die Zellen expandieren in vivo und vermitteln die spezifische Immunität. Mit dieser Methode lassen sich virusspezifische T-Zellen innerhalb von Tagen herstellen, die einen langanhaltenden Schutz vermitteln ohne eine höhergradige GvHD auszulösen. Sie wurden erfolgreich gegen CMV, EBV, ADV und auch Aspergillus hergestellt und am Patienten sowohl therapeutisch als auch präemptiv angewandt.^{147, 148, 149, 150, 152}

Falls der Spender über keine Immunität gegen einen spezifischen Krankheitserreger verfügt (z.B. CMV negativer Spender), ist auch ein adoptiver Immuntransfer von einer dritten Partei oder dem Empfänger selbst möglich.^{147, 150}

1.11. GvHD

Eine Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) stellt die häufigste Komplikation nach allogener HSCT dar, trägt wesentlich zur Morbidität und Mortalität bei und bestimmt damit am Ende auch den Transplantationserfolg mit. Bereits in frühen Tierversuchen einer Knochenmarktransplantation wurde die GvHD beobachtet und als „secondary disease“ beschrieben.^{153, 154} Sie begrenzte die Spenderauswahl und Transplantationen von sogenannten alternativen Spendern.⁹ Gleichzeitig wurde auch schon ein möglicher Effekt einer allogenen Transplantation selbst auf die Rezidivhäufigkeit einer malignen Grunderkrankung gesehen (Graft-versus-Leukämie-Effekt, Graft-versus-Tumor-Effekt).^{153, 155}

Die GvHD wird in eine akute und eine chronische Form unterteilt, klassischerweise anhand des Abstandes innerhalb von oder über 100 Tagen nach Transplantation. Diese rein zeitliche Unterscheidung ist nicht länger haltbar. Insbesondere nach RIC oder nach DLI-Gabe kann es zum Auftreten typischer Zeichen einer aGvHD nach Tag 100 kommen, umgekehrt können klassische Symptome einer cGvHD auch vor Tag 100 auftreten. Um dem gerecht zu werden, schlägt die NIH Konsensus Konferenz eine auf klinischen Zeichen basierende Definition vor.¹⁵⁶ Eine akute GvHD liegt bei typischem klinischen Bild ohne gleichzeitige Zeichen einer cGvHD vor. Bei Auftreten über Tag 100 hinweg spricht man

von einer persistierenden, bei Wiederauftreten nach Tag 100 von einer rekurrenten und bei Neuauftreten nach Tag 100 von einer späten aGvHD.¹⁵⁶ Die chronische GvHD definiert sich durch das typische Krankheitsbild. Zu ihr wird auch das overlap-Syndrom gerechnet, bei dem Zeichen einer akuten als auch einer chronischen GvHD gleichzeitig auftreten.¹⁵⁶

Die GvHD wird durch immunkompetente alloreaktive Spenderlymphozyten verursacht, die nicht vom Immunsystem des Empfängers beseitigt werden können. Sie kann nach Stammzellgabe, Stammzellboost oder DLI-Gabe auftreten, aber auch nach Transfusion nicht leukozytendepotierter Blutkonserven bei Kindern mit Immundefekten.^{157, 158} Die Immunreaktion richtet sich in erster Linie gegen divergente HLA-Antigene des Empfängers. Der Grad eines HLA-Mismatches bestimmt das Risiko des Auftretens einer GvHD mit entsprechend hohem Risiko nach haploidenter Transplantation.¹⁵⁹ Aber auch nach Transplantation eines HLA-identen Spenders kann eine GvHD auftreten, vermittelt durch mHAg oder Polymorphismen.^{157, 160}

Zentraler Vermittler der Graft-versus-Host-Erkrankung sind Spender T-Lymphozyten. Deren Depletion im Transplantat kann das Auftreten einer GvHD effektiv verhindern^{161, 163} und ermöglicht so überhaupt erst die haploidente HSCT.¹⁶² Mit zunehmender T-Zell Depletion sinkt das Risiko einer GvHD.⁷⁵ Neben den T-Lymphozyten sind auch antigenpräsentierende Zellen, Zytokine und regulatorische T-Zellen an der Entstehung der GvH-Erkrankung beteiligt.^{157, 163}

Initiiert wird eine akute GvHD über die Aktivierung antigenpräsentierender Zellen durch inflammatorische Zytokine. Die Zytokine werden im Rahmen der Grunderkrankung, als Folge einer Therapietoxizität, Infektion oder gastrointestinaler Mukosaschädigung freigesetzt. Die so stimulierten Empfänger-APC aktivieren Spender-T-Lymphozyten, welche expandieren und weitere Zytokine wie IL2 freisetzen. Anschließend kommt es sowohl über Effektorzellen (zytotoxische T-Lymphozyten, aktivierte NK-Zellen), als auch über Zytokine zu einer Gewebeschädigung und dem klinischen Bild der GvHD. Regulatorische T-, NK-T- und $\gamma\delta$ -T-Zellen können die Proliferation konventioneller T-Zellen herunterregulieren und einer GvHD entgegenwirken.^{157, 158, 162, 164}

Mechanismen, die zu einer cGvHD führen sind weniger gut verstanden. Neben einer gestörten thymischen Reifung der T-Lymphozyten, scheinen zudem auch B-Lymphozyten eine Rolle in der Pathogenese zu spielen.^{165, 166, 167}

Die Inzidenz einer GvHD ist bei Kindern, möglicherweise durch eine bessere Thymusfunktion, geringer als bei Erwachsenen.¹⁶⁸

Somit ergeben sich als Risikofaktoren einer aGvHD insbesondere eine Nicht-Übereinstimmung der HLA-Antigene, Nicht-Übereinstimmung anderer Zielantigene alloreaktiver T-Lymphozyten (u.a. mHAg), eine Inflammation (Infektion, Mukositis, Konditionierung) oder die Transplantatzusammensetzung (PBSC, TCD).^{158, 169, 170} Als Risikofaktor einer cGvHD ist weiterhin zu den genannten eine vorherige akute GvHD zu nennen.^{165, 167}

1.11.1. akute GvHD

Eine akute GvHD manifestiert sich oft 2-3 Wochen nach Transplantation, insbesondere nach RIC aber auch später. Die Haut ist meist das zuerst und gleichzeitig das am häufigsten betroffene Organ mit einer Beteiligung in ca. 80%. Die Symptome reichen von einem makulopapulösen, oft juckenden Ausschlag bis hin zur Desquamation. Eine gastrointestinale Beteiligung tritt in über 50% der Fälle auf und äußert sich in wässrigen bis blutigen Diarrhoen, Übelkeit, Schmerzen und Appetitmangel. Eine Leberbeteiligung zeigt sich als cholestatische Hepatopathie. Zusätzlich können Fieber, Gewichtsverlust, Lymphadenopathie oder ein Befall anderer Schleimhäute auftreten.^{157, 160} Die Symptome können denen einer Infektion oder therapiebedingter Toxizität gleichen.

Ein Grading der aGvHD nach Glucksberg orientiert sich am Ausmaß der Haut-, Darm- und Leberbeteiligung (Tab. 1).¹⁶⁰ Dieses System wurde wiederholt revidiert, um subjektive Einflüsse auf das Grading zu verringern.^{158, 171, 172} Keines hat sich gegenüber dem von Glucksberg beschriebenen als besser erwiesen.¹⁵⁸ Klinische Signifikanz erreicht eine aGvHD ab Grad II-IV mit vermehrten Infektionen und höherer Sterblichkeit, hauptsächlich infolge infektiöser Komplikationen.^{158, 160}

Die Diagnose der aGvHD wird anhand klinischer Zeichen und Laborwerte gestellt. Aufgrund der Differentialdiagnosen wird eine histologische Sicherung em-

pflohen, auch wenn hierzu keine einheitlichen Standards existieren und die Histologie nicht immer eindeutig ist.¹⁷³

Maßnahmen zur Prävention einer aGvHD umfassen die Gabe von Immunsuppressiva (CSA, Calcineurininhibitoren, MTX, MMF, Cyclophosphamid).^{163, 168} Im Zuge der thymusabhängigen Immunrestitution ist eine Toleranzentwicklung möglich,¹⁶⁸ welche es im Gegensatz zur Transplantation solider Organe erlaubt, die immunsuppressive Prophylaxe im Verlauf auszuschleichen.^{27, 174} Zumindest bei alternativen Spendern mit einem HLA-Mismatch in ≥ 3 Loci ist eine TCD zur Verhinderung einer aGvHD notwendig.¹⁶³ Residuale T-Zellen von $<25 \times 10^3/\text{kg}$ bis $40 \times 10^3/\text{kg}$ im Transplantat lösten keine höhergradige GvHD aus,^{75, 175} während für residuale CD3+ Lymphozyten von 60×10^3 CD3/kg eine Zunahme der aGvHD berichtet wurde.⁷⁵ Ein Überschreiten von 50×10^3 CD3/kg im Rahmen einer haploidenten Transplantation erfordert in der Regel eine zusätzliche GvHD Prophylaxe.^{75, 163} Die präventive Gabe immunmodulatorischer Zellen (Treg, MSC) ist noch Gegenstand von Studien.¹⁶³

Tabelle 1: Gradeinteilung der aGvHD nach Glucksberg und Thomas¹⁷¹

Stadium	Haut	Darm	Leber
0	Kein GvHD - Exanthem	Keine Durchfälle	Bilirubin < 2mg/dl
1	Makulopapulöser Ausschlag, <25% KOF	Durchfall >500ml/d	Bilirubin 2-3mg/dl
2	Makulopapulöser Ausschlag, 25-50% KOF	Durchfall >1000ml/d	Bilirubin >3-6mg/dl
3	Generalisierte Erythrodermie	Durchfall >1500ml/d	Bilirubin >6-15mg/dl
4	Generalisierte Erythrodermie mit Desquamation / Blasenbildung	Schwere Bauchschmerzen +/- Ileus	Bilirubin >15mg/dl
Grad			
I	Haut Stadium 1-2; keine Leber- oder GI-Beteiligung; keine Allgemeinbeeinträchtigung		
II	Haut Stadium 1-3; Leber und/oder GI Stadium 1; milde Allgemeinbeeinträchtigung		
III	Haut Stadium 2-3; Leber Stadium 2-4 und/oder GI Stadium 2-3; deutliche Allgemeinbeeinträchtigung		
IV	Haut Stadium 2-4; Leber und/oder GI Stadium 2-4; extreme Allgemeinbeeinträchtigung		

Die Erstlinientherapie einer manifesten aGvHD umfasst neben einer topischen Behandlung¹⁷⁶ den Einsatz von Steroiden.^{157, 163, 173} Es existiert kein einheitlicher

Standard in Bezug auf Dosierung, Dauer und Ausschleichen der Immunsuppression.^{173, 177} Ein Vorteil einer frühen Intensivierung der Erstlinientherapie durch zusätzliche Immunsuppressiva ist nicht belegt.^{163, 176, 177} Das Ansprechen auf die primäre Behandlung ist prognostisch für den weiteren Verlauf der aGvHD relevant.¹⁷⁶ Die Therapieaussichten bei Versagen der Erstlinientherapie sind weiterhin unbefriedigend,^{158, 170, 177} trotz einer Vielzahl von Behandlungsansätzen mit Immunsuppressiva (Steroide, Calcineurininhibitoren, MMF, Etanercept, Pentostatin), Antikörpern (Basiliximab, Alemtuzumab, OKT3, ATG, Infliximab), ECP, PUVA oder zellulärer Therapien (MSC).^{163, 170, 173, 177} Daneben kommen supportiven Maßnahmen^{158, 170, 176} sowie einem engen Monitoring auf Infektionen eine maßgebliche Bedeutung zu.¹⁷⁷

1.11.2. chronische GvHD

Das Erscheinungsbild der chronischen GvHD ähnelt Autoimmunerkrankungen. Die cGvHD kann unterschiedliche Organe einzeln oder in Form einer Multiorganerkrankung in verschieden starker Ausprägung betreffen.^{156, 178} In der Folge können schwere Funktionsverluste, wie Sehverlust oder Kontrakturen auftreten und bedeutend zur Spätmorbidität beitragen.¹⁵⁸ Neben den für eine aGvHD bekannten Risikofaktoren stellt gerade das vorherige Auftreten einer aGvHD ein eigenes Risiko für eine cGvHD dar.¹⁷⁹ Allerdings führt die aGvHD Prävention nicht unbedingt zu einer Reduktion einer cGvHD.¹⁶⁷

Historisch wurde die cGvHD in „limited disease“ (lokalisierte Hautbeteiligung und/oder Leberfunktionsstörung) oder „extensive disease“ (generalisierte Hautbeteiligung oder histologischer Nachweis einer chronisch aggressiven Hepatitis oder Befall eines weiteren Organsystems) eingeteilt.¹⁷⁸ Ein Scoring des National Institute of Health trifft eine Einteilung in milde, moderate und schwere cGvHD.¹⁵⁶ Die Diagnosestellung erfolgt aufgrund klinisch sicherer Zeichen oder einem nicht sicheren aber charakteristischen Symptom, bestätigt durch eine Biopsie oder einen spezifischen Test.¹⁵⁶ Die Diagnosestellung ist von der Erfahrung der betreuenden Ärzte abhängig und stellt eine besondere Herausforderung dar, wenn seltene Manifestationsformen auftreten oder die Symptome erst im langfristigen Verlauf in der hausärztlichen Betreuung zu Tage treten.¹⁶⁷

Neben einer topischen Therapie wird ab einer cGvHD moderaten Grades eine Behandlung mit Steroiden und Calcineurininhibitoren empfohlen.^{166, 168, 180} Zur Zweitlinientherapie gibt es kein standardisiertes Behandlungskonzept.^{166, 180} Therapieansätze umfassen unter anderen die Anwendung von Calcineurininhibitoren, MMF, Thalidomid, Azathioprin, Sirolimus, Rituximab, Imatinib, ECP, eine TLI sowie eine symptomatische und supportive Therapie.^{157, 165, 167, 180} Die Therapie ist i.d.R. über Monate notwendig,¹⁶⁵ ein Ansprechen kann gemischt ausfallen.¹⁵⁷ Kompliziert wird die cGvHD vor allem durch Infektionen aufgrund der Immunsuppression durch die cGvHD selbst und deren Therapie. Eine cGvHD stellt wiederum einen Risikofaktor für Zweitmalignome dar.¹⁵⁸

1.12. Komplikationen und Spätfolgen einer Stammzelltransplantation

Neben Transplantatversagen, Infektionen und einer GvHD kann der Verlauf einer HSCT durch weitere Nebenwirkungen, therapieinduzierte Toxizität oder andere Folgeerkrankungen kompliziert werden. Die Erfassung der Toxizität auf verschiedene Organsysteme kann anhand der Common Toxicity Criteria vorgenommen werden.¹⁸¹ Zu den typischen reversiblen Nebenwirkungen einer Stammzelltransplantation zählen Mukositiden mit Schmerzen und Ernährungsproblemen, Anämien und Thrombozytopenien oder hämorrhagische Zystitiden. Über eine Schädigung des Gefäßendothels können Folgeerkrankungen wie eine veno-occlusive Erkrankung (VOD), eine thrombotische Mikroangiopathie (TMA), ein „Engraftment Syndrome“ oder ein „Capillary Leak Syndrome“ ausgelöst werden, die jeweils früh nach Transplantation auftreten.¹⁸²

Zu den möglichen Spätfolgen einer Stammzelltransplantation zählen u.a. endokrine Störungen, Knochennekrosen, restriktive und obstruktive Lungenerkrankungen und auch Sekundärmalignome.¹⁴²

1.12.1. Veno-Occlusive Disease

Eine VOD stellt eine potentiell lebensbedrohliche Erkrankung der Leber dar mit einer Mortalität von 20-25%, bei schwerer VOD bis 75-95%.^{182, 183, 184} Sie tritt typischerweise innerhalb der ersten 30 Tage nach Transplantation auf. Die Konditionierung führt auf Grundlage einer durch Vortherapie, Hepatitis oder Eisen-

überladung geschädigter Leber zu einem Endothelschaden der Lebersinuse mit nachfolgender Thrombose und Obstruktion. Es bildet sich eine intrahepatische portale Hypertension aus. Kommt es zusätzlich zu einer Fibrosierung, ist dies mit einer schlechten Prognose verbunden.¹⁸³ Typische Symptome einer VOD sind eine Gewichtszunahme durch Flüssigkeitsretention, eine druckschmerzhaftes Hepatomegalie, eine refraktäre Thrombozytopenie und eine Hyperbilirubinämie. Zur Diagnose werden die Seattle-Kriterien, Baltimore-Kriterien und die revidierten Seattle-Kriterien herangezogen – bei gleichzeitigem Ausschluss anderer Ursachen wie Infektion, GvHD oder Medikamententoxizität.¹⁸⁴ Neben dem Monitoring klinischer VOD-Zeichen, insbesondere bei Risikopatienten, kann eine Sonographie oder im Zweifelsfall eine transjuguläre Leberbiopsie weiterreichende Informationen liefern.¹⁸⁴

Eine VOD kann einen milden und selbstlimitierenden Verlauf nehmen, einen moderaten Verlauf mit kompletter Erholung oder einen schweren Verlauf mit andauernden Symptomen über Tag 100 oder gar tödlichem Ausgang. In der Regel bessert sich die Symptomatik innerhalb von zwei bis vier Wochen.¹⁸³

Eine Vorschädigung der Leber durch vorherige Chemotherapie, Bestrahlung oder HSCT; eine Konditionierung insbesondere mit alkylierenden Substanzen wie Busulfan oder Melphalan; eine CMV-Infektion; eine HLH; ein Glutathionmangel oder Medikamententoxizität (CSA, MTX und andere) stellen Risiken für eine VOD dar.^{183, 184} Ggf. kann durch Anpassung der Konditionierung oder dem Verschieben der Transplantation bis zur Ausheilung einer Hepatitis das Risiko einer VOD vermindert werden. Eine prophylaktische Heparinisierung wird kontrovers gesehen. Bei hohem Risiko kann Defibrotide prophylaktisch gegeben werden.^{182, 183, 184}

Die Therapie der VOD besteht neben supportiven Maßnahmen (Flüssigkeits- und Elektrolytbalance, Substitution von Albumin, Katecholamingabe, Dialyse und Behandlung hepatischer Enzephalopathie) aus der Gabe von Defibrotide.^{183, 184} Bei Versagen dieser Behandlung bleiben die Anlage eines portosystemischen Shunts oder eine Lebertransplantation als ultimo ratio.^{182, 183}

1.12.2. Bronchiolitis obliterans

Eine Bronchiolitis obliterans (BO) ist mit einer cGvHD assoziiert bzw. wird als eine Organmanifestation der cGvHD gewertet.^{142, 185} Die Inzidenz nach allogener HSCT reicht von 5% bis zu 13% bei Patienten mit cGvHD an anderer Lokalisation.¹⁸⁵ Die BO befällt die kleinen Atemwege und macht sich durch chronischen Husten bemerkbar. Ein FEV1-Abfall oder air trapping im CT tragen zur Diagnosestellung bei.¹⁸⁵ Neben der Behandlung bestehender Infekte werden β -Mimetika, Azithromycin, Montelukast und Immunsuppressiva (Steroide, Calcineurininhibitoren, ECP) zur Therapie der BO eingesetzt.¹⁸⁵ Die Mortalität beträgt bis zu 50%.¹⁴²

1.12.3. Bronchiolitis Obliterans Organizing Pneumonia

Eine Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP) ist ebenfalls oft mit einer GvHD verbunden, kann aber auch ohne diese vorkommen. Diagnostisch wegweisend sind trockener Husten, Dyspnoe, Fieber und radiologische Veränderungen im CT. Die BOOP spricht in der Regel gut auf Steroide an.¹⁶⁸

1.12.4. Zweitmalignome

Eine hämatopoietische Stammzelltransplantation kann die Entwicklung von Malignomen induzieren. Zweitmalignome treten, abgesehen von Lymphomen, meist >5 Jahre nach Transplantation auf. Ihre Inzidenz erreicht im Verlauf ca. 8% nach 20 Jahren, ohne dass hier eine Plateauphase erreicht wird.^{142, 187} Das Risiko für die Entstehung solider Tumore nach allogener HSCT ist im Vergleich zur Normalbevölkerung achtfach erhöht.¹⁸⁷ Risikofaktoren für ein solides Zweitmalignom sind insbesondere eine vorrausgegangene Bestrahlung, eine Behandlung mit Azathioprin und eine orale cGvHD für die Entwicklung eines Malignoms der Mundhöhle.^{141, 187} Es werden oft ungewöhnliche Tumore erworben.¹⁸⁷ Solide Tumore manifestieren sich bei Kindern insbesondere als Hirn- oder Schilddrüsentumore nach kranialer Bestrahlung. Die höchste Inzidenz an Zweittumoren wurde bei Patienten mit Fanconi-Anämie als Grunderkrankung gefunden.¹⁴¹ Die Therapie solider Zweitmalignome orientiert sich an der Primärbehandlung entsprechender de novo entstandener Tumore.¹⁴¹

Über die Entstehungsmechanismen der von Spenderzellen ausgehenden Leukämien oder myelodysplastischer Syndrome ist bisher wenig bekannt.¹⁴¹ Lymphome treten im Vergleich zu anderen Sekundärmalignomen früher nach HSCT auf, wozu insbesondere die EBV-positive B-Zell-PTLD beiträgt. Von den EBV-positiven PTLD-Lymphomen können sogenannte late onset Lymphome (typischerweise Non Hodgkin Lymphome) abgegrenzt werden, zu denen wohl auch die T-Zell-PTLD zu zählen ist.¹⁴¹

1.13. Non-Relapse-Mortality

Die „non-relapse-mortality“ bezieht sich auf alle Todesfälle nach HSCT, die nicht einem Rezidiv oder Progress der Grunderkrankung zuzuordnen sind.¹⁸⁸ Als Ursachen nicht rezidivbedingter Todesfälle sind besonders eine GvHD, Infektionen oder ein Organversagen hervorzuheben. Haploidente Stammzelltransplantationen tragen aufgrund ihres höheren GvHD-Risikos und höherer Infektgefährdung auch ein höheres Risiko für nicht rezidivbedingte Todesfälle.⁴⁴ Eine milde cGvHD mit geringerer Rezidivrate wiegt möglicherweise das Risiko einer erhöhten NRM auf. Bei höhergradiger cGvHD überwiegt allerdings das Risiko eines nicht rezidivbedingten Versterbens.¹⁸⁹ Durch verbesserte Supportivtherapie konnte die NRM reduziert werden. So sank z.B. die infektbedingte Sterblichkeit durch Monitoring viraler Infektionen und präemptiver Therapie von 18% auf 8%.^{190, 191} Bei haploidenter HSCT mit CD34+ Selektion lag die NRM bei 25-40%.^{49, 50, 128}

1.14. Graft-versus-Leukämie- / Graft-versus-Tumor-Effekt

Bereits in frühen Versuchen einer HSCT bei Tieren fiel eine niedrigere Rezidivrate bei den Tieren auf, welche nach allogener Transplantation an einer GvHD erkrankten.^{153, 155} Dieser als Graft-versus-Leukämie (GvL) bezeichnete Effekt konnte später auch nach allogener HSCT bei Menschen gezeigt werden.^{155, 192} In Analogie zu Leukämien konnte gegenüber soliden Tumoren auch ein Graft-versus-Tumor-Effekt gezeigt werden.¹⁹³

Vermittelt wird diese GvL/GvT-Reaktion durch alloreaktive Spenderlymphozyten, allen voran T-Lymphozyten aber auch NK-Zellen. Eine Beteiligung von B-

Lymphozyten an der GvL/GvT-Reaktion wird ebenfalls diskutiert.^{194, 195} Das Konzept der allogenen HSCT bei malignen Erkrankungen entwickelte sich von einem reinen Stammzellersatz nach Radiochemotherapie zu einer Immuntherapie mit dem GvL/GvT-Effekt als zentralem therapeutischen Mechanismus.^{155, 194}

Eine GvL bzw. GvT-bewirkende Alloreaktivität kann durch nicht identische HLA-Antigene, mHAg oder tumorassoziierte bzw. tumorspezifische Antigene vermittelt werden. Ideale Zielantigene zeigen eine im Vergleich zu anderen Körperzellen hohe Expression auf den malignen Zellen, sind von funktioneller Bedeutung für die malignen Zellen und werden spezifisch von den Rezeptoren der Abwehrzellen erkannt.¹⁹⁶

Die GvL/GvT-Reaktion ist eng mit der GvHD verbunden.^{195, 198} In Tierversuchen korrelierte der Grad eines GvL-Effekts jedoch nicht immer mit dem Schweregrad einer GvHD.¹⁹⁷ Es konnte sogar ein GvL-Effekt ohne klinische GvHD beobachtet werden. Bei allogenen Transplantationen auch ohne GvHD wurden weniger Rezidive beobachtet, als nach syngener bzw. autologer HSCT.^{198, 199} Umgekehrt garantiert eine GvHD keinen gleichzeitigen GvL-Effekt.¹⁵⁵

Viele Bestrebungen konzentrieren sich darauf, einen GvL/GvT-Effekt sicher von einer GvHD zu trennen und gezielt zu induzieren. Trotz intensiver Forschung ist dies jedoch bisher nicht zufriedenstellend gelungen.^{155, 195}

Strategien, einen GvL/GvT-Effekt zu optimieren, umfassen Spenderauswahl und Wahl der Konditionierung.¹⁹⁵ Der GvL/GvT-Effekt wird von der Diagnose sowie dem Remissionsstatus beeinflusst. Bei Leukämien wurde ein besseres Ansprechen in erster kompletter Remission, verglichen mit nachfolgender CR, gesehen. Der GvT-Effekt solider Tumore ist stärker bei niedriger Tumormasse.^{194, 195}

1.15. Rezidiv und therapeutische Optionen nach HSCT

Ein Rückfall oder Progress einer hämatologisch malignen Erkrankung als auch solider Tumore nach HSCT ist mit einer schlechten Prognose behaftet und stellt die Haupttodesursache nach HSCT dar.^{190, 200}

Das Rückfallrisiko wird wesentlich vom Remissionsstatus bzw. dem Nachweis einer MRD zum Zeitpunkt der Transplantation beeinflusst.^{200, 201} Die Patienten

sind in der Regel bereits intensiv zytostatisch vorbehandelt. Die meisten Konzepte zur Vermeidung bzw. Therapie von Rezidiven zielen auf eine Ausschöpfung des immunologisch vermittelten GvL/GvT-Effektes ab. Dieser scheint z.B. bei MDS-Rezidiven einer erneuten zytostatischen Therapie überlegen zu sein.²⁰² Eine zytostatische Therapie kommt insbesondere zur initialen Reduktion einer hohen Tumorlast in Betracht. Immuntherapien bergen allerdings das Potential, ebenfalls eine GvHD auszulösen oder zu verstärken.

Bei Rezidiv oder steigender MRD-Last kann zunächst eine bestehende Immunsuppression reduziert bzw. beendet werden.^{200, 203} Als Vermittler eines GvL/GvT-Effektes können Spenderlymphozyten sowohl präemptiv bei Hochrisikopatienten, als auch therapeutisch nach manifestem Rezidiv eingesetzt werden. Die Potenz von DLI konnte eindrücklich bei Patienten mit CML gezeigt werden. Allerdings sprechen nicht alle Leukämien gleichermaßen auf DLI an.²⁰⁴ DLI konnten auch bei HLA-Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger sicher eingesetzt werden, eine schrittweise Dosisescalation soll dabei das GvHD-Risiko vermindern.^{204, 205} Eine frühe Lymphozytengabe innerhalb der ersten neun Monate nach Transplantation ist mit einem schlechteren Outcome verbunden.²⁰⁵ Die Wirksamkeit der DLI kann ggf. durch z.B. ein Priming der Lymphozyten mit dendritischen Zellen gesteigert werden.²⁰¹

NK-Zellen sind ebenfalls, gerade nach haploidenter Transplantation mit TCD, in der Lage einen GvL/GvT-Effekt zu vermitteln,¹³ wobei verschiedene Tumore ein unterschiedliches Ansprechen zeigen.²⁰⁷ Spender-NK-Zellen oder IL15 stimulierte Stammzellboosts konnten bei Rezidiv nach HSCT sicher infundiert werden. Die zytolytische Aktivität der NK-Zellen kann durch eine Stimulation mit IL2 oder IL15 verstärkt werden.^{201, 206, 208, 209}

Andere Behandlungsansätze umfassen eine „targeted therapy“ zum Beispiel mit Tyrosinkinasehemmern,²⁰³ eine immunmodulatorische Therapie mit Interleukinen (IL2) oder Checkpointinhibitoren (Ipilimumab, Pembrolizumab) allein bzw. zusammen mit DLI.^{195, 196, 204}

Neben diesen eher unspezifischen Maßnahmen zielt die Therapie mit tumorspezifischen (CH14.18) oder bispezifischen Antikörpern (Blinatumomab) auf charakteristische Oberflächenantigene der malignen Zellen.¹⁹⁶ Die Antikörper sind in der

Lage, eine ADCC zu vermitteln.¹²⁴ Dies wird in der Therapie von Patienten mit Neuroblastom mit dem monoklonalen Antikörper gegen GD2 (CH14.18) angewandt und ist Gegenstand aktueller Studien.^{210, 211, 212}

Durch gentechnische Modifikation von Lymphozyten können diese gezielt mit einem „chimeric antigen receptor“ ausgestattet werden, der spezifische Tumorantigene erkennt. Der adoptive Transfer derart hergestellter CAR-T- oder CAR-NK-Zellen richtet die zelluläre Immunantwort gezielt gegen Zellen, die entsprechende Antigene exprimieren.^{195, 196, 204}

Schließlich stellt die Tumorstimmung einen weiteren Ansatz dar, eine tumorspezifische Immunität nach Transplantation auszubilden.^{151, 195}

Der Einsatz dieser Maßnahmen kann bereits präventiv, zur Verhinderung eines Rezidivs, oder therapeutisch erfolgen. Einer erneuten Reinduktionstherapie schließt sich zumeist eine Konsolidierung mit anschließender erneuter HSCT an. Ein Spenderwechsel könnte hier vorteilhaft sein. Die Vortherapie, die kumulative Toxizität und der zeitliche Abstand zur vorherigen Transplantation beeinflussen wiederum das Ergebnis der erneuten Transplantation. Die TRM einer Zweittransplantation wird mit 30% beziffert.²⁰⁰

1.16. Fragestellung

Die oben aufgeführten Grundlagen zeigen das mögliche Potential einer haploidenten HSCT, einer CD3/CD19 Depletion verglichen mit CD34 Positivselektion sowie einer Konditionierung mit reduzierter Intensität. Aufgrund der HLA-Inkompatibilität, TCD und RIC ergeben sich jedoch auch spezielle Risiken für ein Transplantatversagen, GvHD, Infektionen, Morbidität und Mortalität.

In der vorliegenden Phase I/II Studie soll ein neues Transplantationsprotokoll auf seine Durchführbarkeit, sein Sicherheits- und Nebenwirkungsprofil geprüft werden. Das zu überprüfende Protokoll sieht eine auf Melphalan basierende RIC und Transplantation mit CD3 und CD19 depletierten hämatopoietischen Stammzellen haploidenter Spender vor.²¹³ Die primären Endpunkte sind die

- I. Evaluation des Engraftments
- II. Evaluation der Toxizität einer Konditionierung mit Fludarabin, Thiotepa und Melphalan
- III. Evaluation der therapieinduzierten Mortalität und Morbidität

Sekundäre Endpunkte der Studie sind die

- I. Evaluation der Inzidenz bakterieller, viraler und mykotischer Infektionen
- II. Evaluation der Inzidenz einer GvHD
- III. Evaluation der Immunrestitution
- IV. Evaluation von Therapieansprechen, Rezidivrate und Überleben
- V. Evaluation der Langzeittoxizität

2. Material und Methoden

2.1. Prüfplan

Bei der hier vorgestellten Studie handelt es sich um eine prospektive multizentrische Phase I/II Studie unter der Leitung von Prof. Dr. P. Lang und Prof. Dr. R. Handgretinger. Der Prüfplan wurde durch die zuständige Ethikkommission der Universitätsklinik Tübingen geprüft und bewilligt. Die Studiendurchführung folgt den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki von 1964 und deren revidierter Fassung²¹⁴ sowie den Prinzipien der GCP.²¹⁵ Die Studie wurde beim BfArM und der Kassenärztlichen Vereinigung entsprechend Arzneimittelgesetz §67 angemeldet.²¹⁶ Die Teilnahme erfolgte freiwillig nach ausführlicher Aufklärung. Die teilnehmenden Probanden wurden gegen mögliche gesundheitliche Schäden versichert.

2.1.1. Ein- und Ausschlusskriterien

Eine Studienteilnahme war für Patienten mit primär therapierefraktären malignen hämatologischen Erkrankungen, malignen soliden Tumoren oder einem entsprechenden Rezidiv möglich. Zudem konnten Patienten mit nichtmaligner Erkrankung und erhöhter Gefahr der Transplantatabstoßung eingeschlossen werden. Weitere Einschlusskriterien umfassten ein Alter bis zu 25 Jahren bei Diagnosestellung, das Fehlen eines HLA-identen Familien- oder Fremdspenders und

die Zustimmung der Patienten bzw. Sorgeberechtigten bei minderjährigen Kindern.

Nachfolgende Kriterien führten zu einem Ausschluss an der Studienteilnahme:

- Karnofsky-Index ≤ 50
- vorausgegangene HSCT innerhalb der letzten 6 Monate
- massive Progression einer malignen Erkrankung vor geplanter HSCT
- eingeschränkte Herzfunktion mit Ejektionsfraktion $<25\%$
- eingeschränkte Nierenfunktion mit einer Kreatininclearance $<40\text{ml/min}$
- respiratorische Insuffizienz mit Sauerstoffbedarf oder einer DLCO $<30\%$
- Bilirubin $>4\text{ mg/dl}$; GOT/GPT $>400\text{U/l}$
- aktives zerebrales Krampfleiden
- schwerwiegende, nicht beherrschte Infektion

2.1.2. Rekrutierungszeitraum

Zwischen dem 25.04.2003 und dem 05.11.2013 wurden insgesamt 157 haploidente HSCT mit CD3/CD19 Depletion entsprechend Studienprotokoll bei 151 Patienten durchgeführt. Die meisten HSCT ($n=30$) wurden 2007 durchgeführt.

2.1.3. Teilnehmende Zentren

An der Studie nahmen sieben Transplantationszentren teil. In Tübingen wurden mit 135 Transplantationen (86%) die meisten HSCT durchgeführt. Die weiteren Transplantationen verteilten sich auf Zentren in Jena ($n=12$); Graz ($n=3$); Halle ($n=2$); Kiel ($n=2$); München ($n=2$) und Greifswald ($n=1$).

2.1.4. Abbruchkriterien

Die Abbruchkriterien nach den ersten fünf Transplantationen (Transplantatabstoßung oder GvHD $\geq \text{III}^\circ$ bei ≥ 3 von 5 Patienten) traten nicht ein,²³⁷ so dass die Studie über den besagten Zeitraum weitergeführt werden konnte.

2.2. Patienten

Eine Beschreibung der Stichprobe findet sich in Tabelle 2. Das Patientenkollektiv stellt sich äußerst heterogen dar. Es wurden Kinder aufgrund 25 verschiedener

Diagnosen transplantiert. Die Verteilung der Diagnosen unterscheidet sich von der für allogene Transplantationen bekannten. So wurden 67 HSCT (42,7%) aufgrund eines soliden Tumors durchgeführt. Die häufigste Diagnose stellt ein Neuroblastom (n=41) dar.

Das Alter bei Transplantation reicht von 4 Monaten bis zu 26,5 Jahren (Median 8,1 Jahre). Die Altersverteilung ist nicht gleichmäßig und spiegelt in erster Linie das Erkrankungsalter der verschiedenen Diagnosen und deren Anteil an den durchgeführten Transplantationen wider.

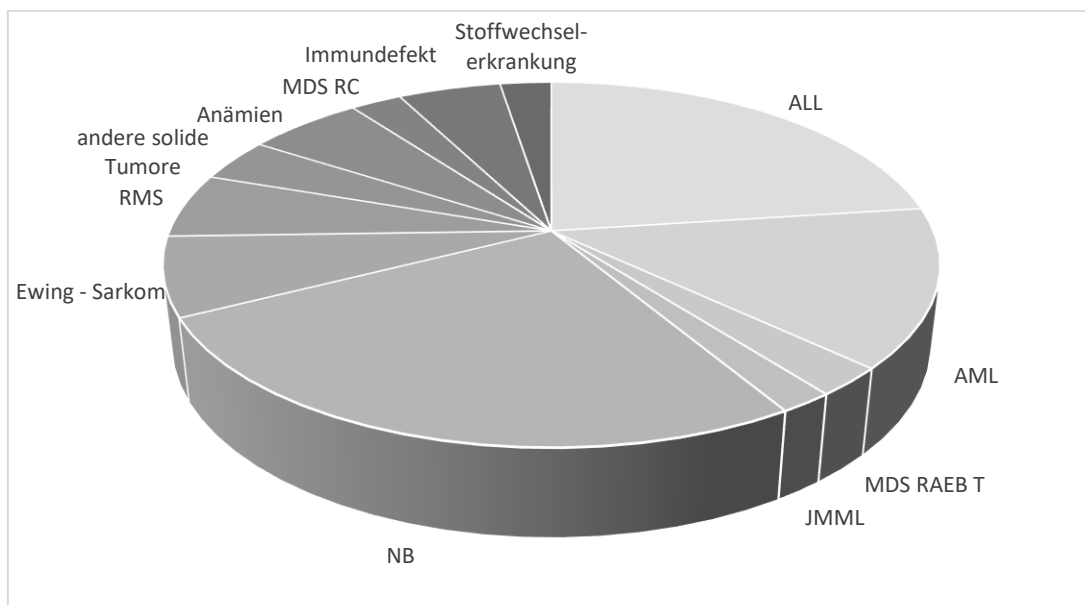


Abb. 1: Diagnosen Studienpatienten

Unter den Patienten mit maligner Grunderkrankung befanden sich 29,5% nicht in Remission (NR) bzw. litten an einer fortschreitenden Erkrankung (PD), 77,3% hatten im Vorfeld mind. ein Rezidiv und 26,5% mehr als ein Rezidiv erlitten. Die Patienten waren entsprechend intensiv vorbehandelt, einschließlich vorausgegangener autologer/syngener und allogener Stammzelltransplantationen.

Unter den Patienten, welche die Studie aufgrund einer erneuten Transplantation bzw. Gabe eines autologen Backups vorzeitig beendeten, wurden sechs im weiteren Verlauf erneut in die Studie eingeschlossen und ein zweites Mal nach Studienbedingungen transplantiert.

Tabelle 2: Patienteneigenschaften

	Gesamte Population	Leukämien	Solide Tumore	Nicht Maligne Erkrankungen
Anzahl HSCT	n=157	n=65	n=67	n=25
Anzahl Patienten	n=151	n=63	n=65	n=23
Alter in Jahren Median Range; Anzahl	8,1 0,3–26,5; n=157	10 1,0–26,3; n=65	8,6 2,4–26,5; n=67	5,6 0,3–16,3; n=25
Geschlecht m:w	95:62	35:30	50:17	10:15
KI Median Range; Anzahl	90 40–100; n=140	90 40–100; n=59	80 40–100; n=57	100 50–100; n=24
Diagnose		ALL* n=36 AML** n=22 MDS-RAEB n=4 JMML n=3	NB n=41 Ewing n=11 RMS n=9 Hodgkin n=2 ALCL n=1 Hepatobl. n=1 SySa n=1 Undiff. Sarkom n=1	Anämien*** n=13 Immundefekt**** n=8 Stoffwechsel- Erkrankung ***** n=4
Remissionsstatus		CR1 n=10 CR2 n=13 CR >2 n=14 NR1/RAEB-T n=7 NR2/RAEB-T n=13 NR>2/RAEB-T n=8	CR1 n=3 CR2 n=8 CR >2 n=1 PR1 n=10 PR2 n=25 PR >2 n=9 NR/PD1 n=0 NR/PD2 n=8 NRPD>2 n=3	
Vortransplantation • nur autolog • mind. eine allogene autolog & allogene • eine allogene • zwei allogene	n=48 n=30 n= 1 n=26 n= 3	n=1 n=23 n=0 n=20 n=3	n=47 n=2 n=1 n=1 n=0	n=0 n=5 n=0 n=5 n=0
Konditionierung • MAC • RIC • Zusätzliche TLI	n=26 n=131 n=14	n=15 n=50 n=2	n=4 n=63 n=2	n=7 n=18 n=10
Serotherapie • ATG • OKT • Keine Serotherapie	n=39 n=117 n=1	n=10 n=54 n=1	n=25 n=42 n=0	n=4 n=21 n=0

ALL*– ALL, B-NHL, undiff. Leukämie als Rezidiv ALL. BCR/ABL pos n=7, Infant-Leukämie n=1

AML**– MDS-assoziiert n=1, sekundäre AML nach T-NHL bzw. T-ALL n=2

Anämien***– SAA, Sichelzellanämie, Thalassämie, MDS-RC

Immundefekt****– SCID, MHC-II-Defizienz, CVID, Mb. Kostmann, B-Zell-Mangel, IFN- γ -Rez-Defekt, Chediak-Higashi

Stoffwechselerkrankung*****– Tay-Sachs, metachromatische Leukodystrophie

Weitere sechs Patienten wurden haploident CD3/CD19 depletiert transplantiert, jedoch ohne jegliche vorherige Konditionierung oder im Rahmen einer Rekonditionierung nach vorheriger Nicht-Studien-Transplantation. Diese sechs Patienten wurden als Beobachtungspatienten geführt, flossen aber nicht in die Studienauswertung ein.

2.3. Spender

Als Spender wurden haploidente Familienspender, in der Regel ein Elternteil, gewählt. Bei mehreren gleichwertigen möglichen Spendern wurde dem Spender mit einem KIR-Mismatch der Vorzug gegeben. Voraussetzung für eine Spende waren guter gesundheitlicher Zustand sowie das Einverständnis. Alle Spender wurden von unabhängiger Seite auf das Vorliegen von Kontraindikationen oder Ausschlusskriterien entsprechend dem Prüfplan untersucht. Im Rahmen einer Rekonditionierung erfolgte in neun Fällen ein Spenderwechsel.

Tabelle 3: Spendereigenschaften

	Spender	
Geschlecht männlich / weiblich	n=80	n=77
Verwandschaftsgrad	Vater n=73 Bruder n=5 Onkel n=2	Mutter n=74 Schwester n=1 Tante n=2
Alter	Median 39,1 Jahre (17,4 -57,5 Jahre)	
CMV-Status positiv / negativ	n=100 / n=57	

Spenderwechsel bei Rekonditionierung nicht berücksichtigt

2.3.1. HLA-Mismatch

Die HLA-Typisierung wurde in unterschiedlicher Auflösung durchgeführt, wobei entweder 6 HLA-Antigene; 8 HLA-Antigene; 10 HLA-Antigene niedrigauflösend oder 10 HLA-Allele hochauflösend untersucht wurden. Bei Einbeziehung der nicht getesteten Allele und hochauflösender Untersuchungsmethoden könnte die Anzahl der HLA-Nichtübereinstimmungen höher liegen, als in der Testung nachgewiesen wurden.

Alle nachgewiesenen Nicht-Übereinstimmungen wurden gleichwertig behandelt, unabhängig vom betroffenen HLA-Antigen. Lag eine Nicht-Übereinstimmung lediglich in GvHD- oder Abstoßungs-Richtung vor, wurde diese dennoch immer als Mismatch gewertet.

Für vier Patienten lagen keine oder uneindeutige Typisierungsergebnisse bei der Auswertung vor.

Tabelle 4: HLA - Übereinstimmung

	Anzahl HSCT	kein MM	1 MM	2 MM	3 MM	4 MM	5 MM
6 HLA-Ag	n= 4	n= 0	n= 0	n= 2	n= 2		
8 HLA-Ag	n= 14	n= 0	n= 0	n= 0	n= 4	n= 10	
10 HLA-Ag	n= 92	n= 1	n= 2	n= 4	n= 7	n= 19	n= 59
10 HLA-Allele HA	n= 43	n= 0	n= 0	n= 1	n= 3	n= 14	n= 25
Keine Information	n= 4						
Gesamt	n= 157	n= 1	n= 2	n= 7	n= 16	n= 43	n= 84

Spenderwechsel bei Rekonditionierung nicht berücksichtigt

2.4. Transplantat

2.4.1. Mobilisierung und Sammlung der Spender-Stammzellen

Zur Mobilisierung der Stammzellen wurde den Spendern G-CSF (Granocyte®) in einer Dosierung von 10µg/kg/d über 5 Tage subkutan verabreicht (ggf. mit vorheriger Gabe von GM-CSF (Leukine®) 250µg/m²/d s.c. über 3 Tage). Die Stammzellen wurden aus dem peripheren Blut mittels Leukapheresen an Tag 6 und 7 gewonnen. Bei nicht ausreichend gewonnener Stammzellzahl wurde an Tag 8 eine weitere Leukapherese durchgeführt. Bei weiterhin unzureichender Stammzellspende wurde nach 4 Wochen eine erneute Stammzellmobilisation und Sammlung nach oben beschriebenem Prinzip vorgenommen. Es wurden nur PBSC verwendet. Zur Gewinnung von Spender T-Lymphozyten oder virus-spezifischen T-Zellen war eine erneute Leukapherese möglich.

2.4.2. Transplantat – Bearbeitung

Die Stammzellen wurden direkt nach Apherese mit speziellen, gegen CD3 bzw. CD19 gerichteten und an magnetische Mikropartikel konjugierten Antikörpern (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) inkubiert. Im Anschluss erfolgte die automatische Depletion der so markierten CD3 und CD19 positiven Zellen

mittels CliniMACS-Apparatur, Miltenyi. Eine detaillierte Beschreibung der CD3/CD19 Depletion findet sich bei Gordon und Schumm.^{75, 77}

Zusätzlich zur CD3 und CD19 Negativselektion wurde in 61 Transplantaten teilweise eine CD34 oder CD133 Positivselektion durchgeführt. Mit Hilfe gegen CD34 bzw. CD133 gerichteter und mit magnetischen Microbeads konjugierter Antikörper wurden die entsprechenden Zellen des Apheresats in zusätzlichen Separationsdurchgängen mit dem CliniMACS System herausselektioniert.⁷⁶

2.4.3. Transplantatzusammensetzung

Stammzellen konnten in der Regel in ausreichendem Maß mobilisiert und gesammelt werden. Die angestrebte Zahl von $\geq 10 \times 10^6$ CD34/kgKG wurde in 121 Transplantaten (77%) erreicht. In 15 Transplantaten lag die Zahl CD34+ Zellen unter 6×10^6 /kgKG.

Mit der oben beschriebenen Methode wurde eine ausreichende T- und B-Zell Depletion erreicht. 89 Transplantate enthielten $\leq 50 \times 10^3$ /kgKG CD3+ Zellen. Transplantate von Patienten mit maligner Erkrankung und Remissionsstatus NR/PD enthielten mehr CD3+ Zellen/kgKG als von Patienten in CR/PR (Mann-Whitney-Test, $p=0,0091$).

Tabelle 5: Transplantatzusammensetzung

	CD34 x 10 ⁶ /kg	CD3 x 10 ³ /kg	CD19 x 10 ³ /kg	CD56 x 10 ⁶ /kg	CD14 x 10 ⁶ /kg
Anzahl mit Daten zur Zellzahl	157	155	129	126	111
Minimum	1,80	2,84	0,38	9,1	32,83
Median	14,87	44,51	26,09	73,9	472,68
Maximum	55,98	172,67	561,03	379,05	3299,13

Rekonditionierung und zusätzliche Stammzellboosts nicht berücksichtigt

2.4.4. Stammzelltransplantation und zusätzlicher Zelltransfer

Die Stammzelltransplantation erfolgte an Tag 0 oder in zwei Portionen an Tag 0 und 1. Eine Stimulation der Hämatopoiese mit G-CSF war entsprechend Protokoll möglich aber nicht obligat.

Ein späterer Stammzellboost aufgrund geringer initialer Stammzellzahl oder schlechter Transplantatfunktion wurde bei 42 Transplantationen verabreicht. Bei drohendem Transplantatversagen oder zur Verstärkung eines GvL/GvT-Effektes

erhielten 25 Patienten DLI. Ein adoptiver Immuntransfer virusspezifischer T-Zellen erfolgte in sechs Patienten. Acht Patienten wurden zusätzlich NK-Zellen infundiert. Die in diesem Rahmen zusätzlich verabreichten Zellzahlen werden in der weiteren Auswertung aufgrund der großen individuellen Unterschiede der Indikation und zeitlichen Abfolge nicht berücksichtigt.

2.5. Konditionierung, Serotherapie und Rekonditionierung

Patienten mit soliden Tumoren, eingeschränkter Organfunktion oder Nachweis potentiell gefährlicher Erreger wurden vorzugsweise mit einem auf Melphalan basierenden RIC-Schema konditioniert (n=131). Die verbleibenden Konditionierungen erfolgten entsprechend den Vorgaben der Therapiestudien mit myeloablativen Schemata basierend auf Busulfan (n=11), TBI (n=11) oder Treosulfan (n=4).

Tabelle 6: intensitätsreduzierte Konditionierungsprotokolle (RIC)

RIC	Medikament	Zeitraum	Einzel-dosis	Gesamtdosis
Mel - Flud - TT	Fludarabin	Tag -8 bis -5	40mg/m ² / 1h	160mg/m ²
	Thiotepa	Tag -4	2 x 5mg/kg / 4h	10mg/kg
	Melphalan	Tag -3 bis -2	70mg/m ² / 1h	140mg/m ²
	Serotherapie			
Mel - Clof - TT	Clofarabin	Tag -8 bis -5	50mg/m ²	200mg/m ²
	Thiotepa	Tag -4	2 x 5mg/kg / 4h	10mg/kg
	Melphalan	Tag -3 bis -2	70mg/m ² / 1h	140mg/m ²
	Serotherapie			

Die Konditionierungsprotokolle wurden dem Zustand der Patienten angepasst und ggf. modifiziert. So erhielten Patienten nach vorheriger Abstoßung oder erhöhtem Abstoßungsrisiko eine zusätzliche TLI (n=14). Weiterhin erhielten Patienten zusätzlich Myelotarg (n=3), Schädelbestrahlung / Bestrahlung (n=2), Depocyte i.th. (n=1) oder eine Radioimmuntherapie (n=1).

Abgesehen von einem Patienten erhielten alle zur Prophylaxe einer Transplantat-abstoßung eine Serotherapie. Diese wurde zunächst mit OKT-3 (n=117) durchgeführt. Nachdem OKT-3 im Jahr 2012 nicht mehr erhältlich war, wurde die Serotherapie auf ATG (n=39) umgestellt.

2.5.1. Rekonditionierung

Aufgrund eines Transplantatversagens erhielten 11 Patienten eine Rekonditionierung mit erneuter Gabe eines CD3/CD19 depletierten Transplantats. Zur Rekonditionierung wurden Schemata bestehend aus Fludarabin, Thiotepa und TLI (n=9), Fludarabin, VP16 und TLI (n=1) oder Cyclophosphamid, Thiotepa und TLI (n=1) verwandt. Eine erneute Serotherapie erfolgte mit OKT3 und ATG (n=8) oder lediglich ATG (n=3). Patienten mit erfolgreicher Rekonditionierung wurden als Studienpatienten fortgeführt, nachbeobachtet und hinsichtlich GvHD, Immunrekonstitution, Komplikationen und Überleben mit in die Auswertung einbezogen. Dabei wurden die Eigenschaften des neuen Spenders und Transplantats berücksichtigt.

Drei weitere Patienten erhielten eine Rekonditionierung mit anschließender Gabe eines nicht CD3/CD19 depletierten Transplantats. Diese Patienten schieden zum Zeitpunkt der Transfusion des neuen Transplantats aus der Studie aus.

2.6. Überwachung und Supportivtherapie

Die Patienten wurden bis Tag 100 nach HSCT mind. wöchentlich zu klinischen Kontrollen einbestellt und insbesondere auf das Auftreten von Infektionen, einer GvHD oder Toxizitätszeichen untersucht. Zwischen Tag 100 und 200 waren die Kontrollen in monatlichen, danach vierteljährlichen Abständen vorgesehen. Ein Grading der aGvHD erfolgte entsprechend den Glucksberg-Kriterien.

2.6.1. GvHD-Prophylaxe

Eine GvHD-Prophylaxe wurde standardmäßig bei einem T-Zell-Gehalt von $>25 \times 10^3$ CD3/kgKG mit Cyclosporin A oder Mofetilmycophenolat durchgeführt. Bei manifester GvHD \geq II° wurde eine Behandlung nach jeweiligem Standard der teilnehmenden Zentren und gängigen Therapieempfehlungen eingeleitet.

2.6.2. Monitoring von Immunrekonstitution und Chimärismus

Die Rekonstitution des Immunsystems und der Chimärismus wurden regelmäßig vom Zeitpunkt des Engraftments gemonitort. Bis Tag 100 erfolgten die Messungen aus dem peripheren Blut wöchentlich, bis Tag 200 monatlich und darauf-

hin 3-monatlich. Die Messung der Immunrestitution von T- und B-Lymphozyten sowie der NK-Zellen erfolgte per FACS mit fluorochrom markierten Antikörpern gegen die Oberflächenproteine CD3, CD4, CD8, CD19 und CD56. Die Bestimmung des Chimärismus wurde mittels PCR-Bestimmung von Mikrosatelliten-Markern in mononukleären Zellen durchgeführt.²¹⁷ Zudem wurde der T-Zell-Chimärismus mittels FACS analysiert.²¹⁸

2.6.3. Remissionsbeurteilung

Zur Remissionsbeurteilung wurde bei malignen hämatologischen Erkrankungen eine Knochenmarkpunktion an Tag 30, 60 und 100 und bei soliden Tumoren eine geeignete Bildgebung an Tag 100 durchgeführt.

2.6.4. Infektiologisches Monitoring

Ein infektiologisches Monitoring wurde bis Tag 100 wöchentlich, danach in Abhängigkeit der T-Zell-Regeneration und individuellen Infektionsgefährdung durchgeführt. Es umfasste ein Screening auf virale Infektionen / Reaktivierung mittels PCR auf CMV (Plasma, Urin und Rachenspülwasser) sowie ADV im Stuhl. Bei Bedarf wurde das Screening auf BKV im Urin, ADV, EBV, BKV und HHV6 im Plasma erweitert. Wöchentlich wurden Aspergillus- und Candida-Antigen mittels Galaktomannantest bestimmt und mikrobiologische Überwachungskulturen von Rachenabstrichen und Urinproben angelegt.

2.6.5. Infektionsprophylaxe

Alle Patienten erhielten spätestens mit Beginn der Konditionierung eine Prophylaxe gegen *Pneumocystis carinii* (z.B. Cotrimoxazol); Pilzinfektionen (z.B. liposomales Amphotericin B, Caspofungin oder nach vorheriger invasiver Pilzinfektion Voriconazol) und ggf. Darmbakterien (z.B. Colistin, ab Tag 0 Metronidazol). Eine antivirale Prophylaxe wurde bei CMV seronegativem Empfänger und Spender mit Aciclovir durchgeführt. Bei CMV seropositivem Empfänger und/oder Spender erfolgte die Prophylaxe vor HSCT mit Ganciclovir und danach mit Foscavir i.v. gefolgt von Valganciclovir p.o.. Das Prophylaxeschema wurde dem

Risikoprofil der Patienten und den aktuellen Standards der jeweiligen Klinik angepasst. Die Prophylaxe wurde mindestens bis Tag 100 fortgeführt.

2.7. Nachbeobachtungszeitraum

Die Auswertung erfolgte mit dem Informationsstand zum gewählten Stichtag 30.04. 2016. Die Nachbeobachtung endete mit der letzten dokumentierten Vorstellung (n=44), dem Versterben des Patienten (n=74) oder dem Ausscheiden aus der Studie (n=39). Gründe für ein Ausscheiden waren die Gabe eines autologen Backups / syngene Transplantation (n=10), erneute HSCT (n=7), Rekonditionierung mit nachfolgender Gabe eines nicht CD3/CD19 depletierten Transplantats (n=3) oder die Teilnahme an einer anderen Therapiestudie (CH14.18, Blinatumomab; n=19). Die Nachbeobachtungszeit der noch lebenden Patienten betrug im Median 71 Monate (1,3 – 12,2 Jahre).

2.8. Datenerfassung

Die Dokumentation der Patientendaten, der diagnostischen Maßnahmen und Untersuchungsbefunde sowie der therapeutischen Maßnahmen und Medikamentengaben erfolgte in den behandelnden Zentren in deren regulärer Behandlungsdokumentation.

Die für die vorliegende Studie relevanten Daten wurden, nach Einwilligung der Patienten oder deren gesetzlicher Vertreter, durch die Universitäts-Kinderklinik Tübingen, Abteilung für pädiatrische Hämatologie und Onkologie, erfasst. Die Daten wurden sowohl in standardisierten Dokumentationsbögen als auch durch spezifische Nachfrage erhoben. Für die in Tübingen transplantierten Patienten wurden die Daten zusätzlich durch Recherche in der Originaldokumentation (Labordaten, Kurven, Arztbriefe) ergänzt und stichpunktartig überprüft. Die Daten wurden in Form einer Microsoft Excel Tabelle (Version 1802) auf den Rechnern der Universitäts-Kinderklinik Tübingen abgelegt.

Die erhobenen Daten unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht, zudem werden die ICH-GCP-Richtlinie²¹⁵ und das Landesdatenschutzgesetz²¹⁹ berücksichtigt.

2.9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde durch die Universitäts-Kinderklinik Tübingen, Abteilung für pädiatrische Hämatologie und Onkologie in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie vorgenommen.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel (Version 1802). Für die statistische Analyse (t-Test, Anova, Fisher's Exact Test, Kaplan-Meier-Analyse, Mann-Whitney-Test, Kruskal-Wallis-Test) und graphische Darstellung wurde Graph Pad Prism, Version 7 und Version 8, der Firma GraphPad Software, Inc. verwendet.

Zudem wurde eine univariate post – hoc Analyse durch das CPCS („Centre for Pediatric Clinical Studies“) der Universitäts-Kinderklinik Tübingen entsprechend dem „Statistischer Auswertungsplan für posthoc Analysen. V2.2 (19.10.2016)“ vorgenommen. Die Auswertung wurde mittels SAS, unter Verwendung der Log Regression, Kruskal-Wallis-Test, Wilcoxon-Test, Kaplan-Maier-Analyse und Log Rank-Test, Kumulative Inzidenz aufgrund konkurrierender Risiken und Cox-Regression, vorgenommen. Aufgrund der univariaten Ergebnisse kam keine multivariate Auswertung zu Stande.

3. Ergebnisse

Die hier dargestellten Ergebnisse der Studie sind zur Veröffentlichung geplant. Die Veröffentlichung bezieht neben den eigenen Ergebnissen auch die statistische Auswertung des CPCS ein. Die hier dargestellten Ergebnisse basieren, wenn nicht anders gekennzeichnet, auf meinen eigenen mit GraphPad-Prism durchgeführten Analysen. Durch die Verwendung unterschiedlicher statistischer Testverfahren können die Ergebnisse (z.B. p-Wert, Odds Ratio) geringfügig differieren, eine Signifikanzänderung ergibt sich dabei nicht.

3.1. Engraftment

Ein erfolgreiches Anwachsen des Transplantates konnte bei 150 Transplantationen erreicht werden, in 144 Fällen innerhalb von 28 Tagen, in den verbleibenden 6 innerhalb von 40 Tagen. In 7 Fällen kam es zu einem primären Transplantatversagen (PGF). Bei 17 Patienten trat nach initialem Engraftment eine Ab-

stoßung (SGF) auf. Somit erlitten insgesamt 24 Patienten ein Graft Failure (15,3%).

Unter Anwendung einer Rekonditionierung mit erneuter Infusion eines CD3/CD19 depletierten Transplantats (s.u.) konnte schließlich bei 143 Patienten ein Engraftment erzielt werden (Final Engraftment mit CD3/CD19 depletiertem Transplantat 91,1%).

Der erste von drei aufeinanderfolgenden Tagen mit neutrophilen Granulozyten (Take) lag im Median bei 10 Tagen (Spanne 7-40d). Mit G-CSF Gabe wurde dieser früher erreicht (Median 10 vs. 19d; Mann Whitney Test $p < 0,0001$). Transfusionsunabhängige Thrombozytenzahlen $> 20.000/\mu\text{l}$ wurden im Median nach 11 Tagen (Spanne 2-188d) erreicht.

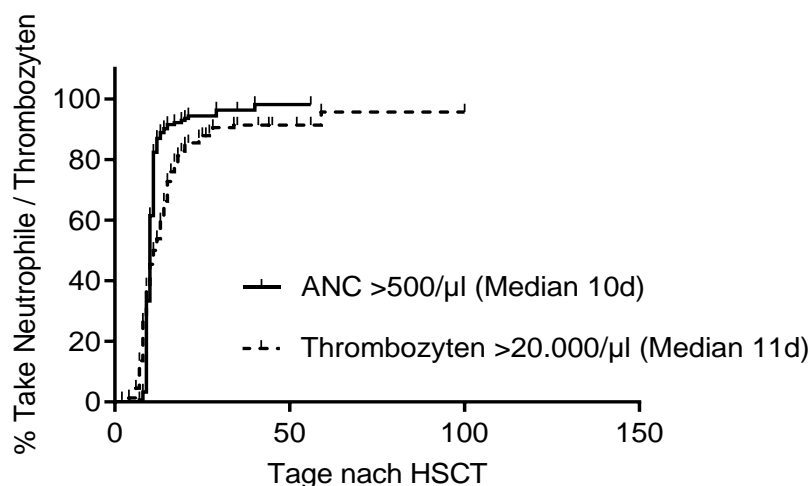


Abb. 2: Zeit bis zum Anstieg der neutrophilen Granulozyten $> 500/\mu\text{l}$ / Thrombozyten $> 20.000/\mu\text{l}$

Patienten nach vorheriger allogener Transplantation erlitten signifikant weniger oft ein Graft Failure (GF, SGF) als Patienten, die erstmals allogene transplantiert wurden. Patienten nach allogener Vortransplantation erhielten allerdings auch öfter eine TLI im Rahmen der Konditionierung (23,3% vs. 5,5%) und die Transplantate enthielten mehr CD3+ Zellen (Median 56,9 vs. $43 \times 10^3/\text{kg}$), in der univariaten Auswertung hatten beide Parameter selbst keinen Einfluss auf das Engraftment. Eine multivariate Auswertung war, wie oben ausgeführt, nicht möglich.²²⁰

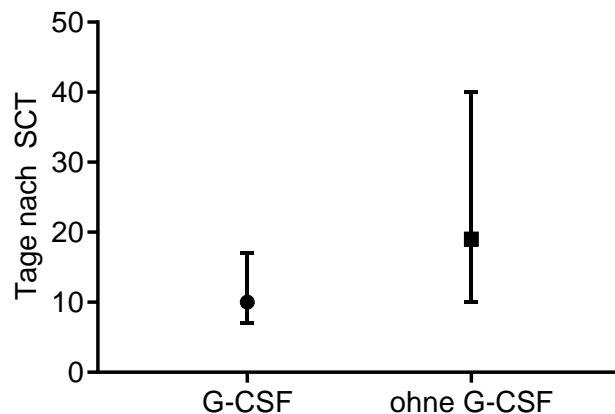


Abb. 3: Zeitpunkt des Erreichens von >500/ μ l neutrophiler Granulozyten (Median und Range) mit und ohne G-CSF

Ein positiver CMV-Serostatus sowohl des Spenders als auch des Empfängers war jeweils mit einem schlechteren Engraftment (GF) assoziiert. Bei Transplantation von $>60 \times 10^3/\text{kg}$ CD3 traten weniger Fälle mit Transplantatversagen (GF, SGF) auf. Eine geringere Zahl an PGF war nach Serotherapie mit OKT im Vergleich zu ATG zu verzeichnen, dieser Effekt war unter Einbeziehung sekundärer Graft Failure nicht mehr darstellbar.

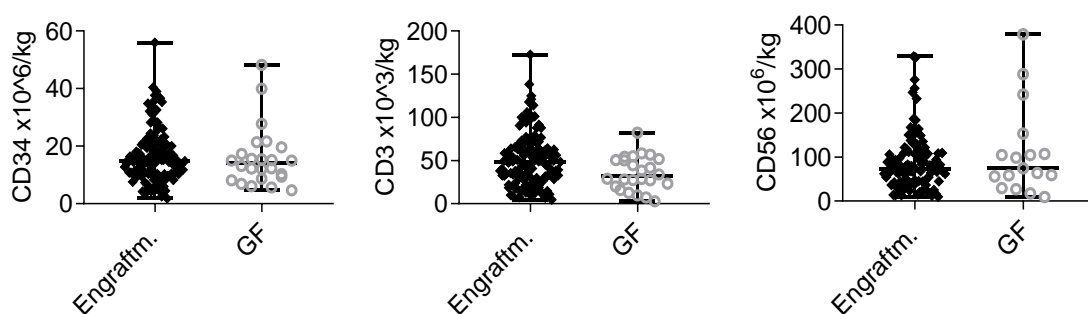


Abb. 4: Zahl CD34+, CD3+ und CD56+ Zellen im Transplantat (Median, Range) bei Engraftment und Graft Failure (GF)

Patientenalter, -geschlecht, Diagnosegruppe (hämatogen maligne vs. solide vs. nicht maligne), Remissionsstatus, Karnofsky-Index, Konditionierung (MAC vs. RIC), zusätzliche TLI, G-CSF Gabe, Spenderalter, -geschlecht, HLA-Mismatch

(<3 vs. 3-5MM, <4 vs. 4-5MM, <5 vs. 5MM), Verwandtschaftsgrad (Eltern vs. Geschwister, Onkel, Tante), und die Zahl der transplantierten CD34+ und CD56+ Zellen (< vs. > Median) hatten statistisch keinen Einfluss auf ein erfolgreiches Engraftment. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 aufgeführt. Alle Patienten mit Graft Failure wiesen ein Mismatch in mind. 3 HLA-Allelen auf.

3.1.1. Chimärismus

Informationen zum Chimärismus (PCR-Gesamt-, PCR CD3- oder FACS CD3-Chimärismus) an Tag 100 lagen für 116 Patienten vor. Bei 12 Patienten war der Chimärismus gemischt, davon in 4 Fällen der Gesamtchimärismus. In den verbleibenden 7 Fällen lag ein MC ausschließlich im CD3-Kompartiment vor, bei komplettem Gesamtchimärismus von 95-100%. Bei drei dieser Patienten mit gemischtem CD3-Chimärismus lag eine Diskrepanz zwischen PCR und FACS-Befund vor, drei weitere Patienten befanden sich bereits in einer Rezidivsituation einer Leukämie.

Nach einem Jahr lagen Informationen zu 56 Patienten vor. Zwei der zwölf Kinder mit MC an Tag 100 hatten weiterhin einen gemischten Chimärismus, drei der Patienten zeigten nach einem Jahr einen kompletten Spenderchimärismus, fünf hatten ein Rezidiv erlitten oder waren verstorben und zu den verbleibenden zwei Kindern lagen keine Informationen vor. Ein neu aufgetretener gemischter Chimärismus nach komplettem Chimärismus an Tag 100 trat nicht auf.

Tabelle 7: Einflussfaktoren auf das Engraftment

Einflussfaktoren	Anzahl Patienten	Engraftment	(%) Wahrscheinlk.	p-Wert	Odds ratio	95% CI
Geschlecht Patient						
Männlich	95	79	83,2	0,65	0,73	0,3 – 1,83
Weiblich	62	54	87,1			
CMV Patient						
CMV positiv	77	60	77,9	0,03	0,34	0,13 – 0,87
CMV negativ	80	73	87,95			
Diagnose						
Maligne	132	115	87,1	0,07	0,38	0,14 – 0,99
Nicht Maligne	25	18	72,0			
Remissionsstatus						
Häm. Maligne CR	37	31	83,8	0,72	0,62	0,16 – 2,34
Häm. Mal. NR /	28	25	89,3			

Solide CR / PR	56	49	87,5	>0,99	0,7	0,06 – 5,14
Solide NR / PD	11	10	90,9			
Vorherige HSCT						
1. allogene HSCT	127	103	81,1	0,01	∞	1,85 – ∞
≥ 2. allogene HSCT	30	30	100			
Spendergeschlecht						
Männlich	80	67	83,8	0,83	0,86	0,37 – 2,13
Weiblich	77	66	85,7			
Geschlecht - match						
Mnl-Mnl / Wbl-Wbl	86	71	82,6	0,51	0,69	0,29 – 1,69
Mnl-Wbl/Wbl-Mnl	71	62	87,3			
Spender CMV						
CMV positiv	100	80	80,0	0,04	0,30	0,11 – 0,86
CMV negativ	57	53	93,0			
CMV match						
CMV neg/neg	50	47	94	0,03	0,26	0,08 – 0,86
CMV mind. 1 positiv	107	86	80,4			
HLA match						
5 Mismatch	84	67	79,8	0,07	0,38	0,14 – 1,02
<5 Mismatch	69	63	91,3			
Konditionierung						
MAC	26	23	88,5	0,77	0,68	0,2 – 2,43
RIC	131	110	83,97			
Serotherapie						
ATG	39	32	82,1	0,61	0,78	0,29 – 1,98
OKT	117	100	85,5			
Zusätzliche TLI						
TLI	14	14	100	0,13	∞	0,82 – ∞
keine TLI	143	119	83,2			
Graft Manipulation						
CD3/CD19 Depletion	96	81	84,4	>0,99	0,93	0,4 – 2,31
Zusätzl. Selektion	61	52	85,3			
Graft comp. CD34						
< 14,87 x 10 ⁶ /kg	78	66	84,6	>0,99	0,98	0,43 – 2,22
≥ 14,87 x 10 ⁶ /kg	79	67	84,8			
Graft comp. CD3						
< 44,51 x 10 ³ /kg	77	62	80,5	0,19	0,54	0,23 – 1,33
≥ 44,51 x 10 ³ /kg	78	69	88,5			
< 60 x 10 ³ /kg	113	90	79,7	0,005	0,095	0,01 – 0,57
≥ 60 x 10 ³ /kg	42	41	97,6			
Graft comp. CD56						
< 73,9 x 10 ⁶ /kg	63	55	87,3	>0,99	0,87	0,31 – 2,34
≥ 73,9 x 10 ⁶ /kg	63	54	85,7			
G-CSF						
G-CSF	147	123	83,7%	0,36	∞	0,53 – ∞
No G-CSF	10	10	100%			

3.1.2. Weiterbehandlung nach Graft Failure

Die Patienten mit Transplantatversagen wurden wie folgt weiterbehandelt:

- > Rekonditionierung mit Gabe CD3/CD19 depletierter haploidenter Stammzellen (n=11)
- > Rekonditionierung mit Gabe eines anderweitigen Transplantats (n=3)
- > Gabe eines autologen Backup / syngene Transplantation (n=10)

Die Wahl der nachfolgenden Behandlung wurde maßgeblich von der Diagnose bestimmt. Während alle 9 Patienten mit hämatogener maligner Erkrankung rekonduktioniert wurden, erhielten acht der neun Patienten mit solidem Tumor ein autologes Backup.

Durch Rekonditionierung mit Gabe CD3/CD19 depletierter Stammzellen wurde bei 10 Patienten erfolgreich ein „finales Engraftment“ erzielt. Ein Patient verstarb noch vor einem möglichen Engraftment. In zwei Fällen wurde auf den ursprünglichen Spender zurückgegriffen, in neun Fällen ein Wechsel auf einen anderen haploidenten Familienspender vollzogen. Die Transplantate bei Rekonditionierung enthielten mehr CD3+ Zellen [Median 44,5 (2,8-172,7) $\times 10^3/\text{kg}$ vs. 74,8 (33,3-162,4) $\times 10^3/\text{kg}$] und CD56+ Zellen [Median 73,9 (9,1-379,1) $\times 10^6/\text{kg}$ vs. 129,1 (43,8-377,9) $\times 10^6/\text{kg}$]. Die rekonduktionierten Patienten wurden weiter entsprechend Studienprotokoll nachbeobachtet und in der Auswertung berücksichtigt.

Drei Patienten wurden rekonduktioniert mit anschließender Gabe eines nicht CD3/CD19 depletierten Transplantats (MUD, haploident CD34-Selektion, haploident α/β -Depletion). Bei allen Patienten konnte hierdurch ein Engraftment erreicht werden. Ab dem Zeitpunkt der erneuten Stammzellgabe endete die Studienbeobachtung.

Neun Patienten mit GF und solidem Tumor oder nicht-maligner Erkrankung erhielten ein Backup ihrer autologen Stammzellen. Eine Patientin wurde syngent transplantiert. Die Studienbeobachtung endete mit Gabe des Backups. Eine erneute allogene Stammzelltransplantation zu einem späteren Zeitpunkt wurde bei sechs dieser Patienten durchgeführt (haploident CD3/CD19 depletiert n=4; haploident α/β -depletiert n=2).

Der Zeitabstand zwischen Transplantation und erneuter Stammzellgabe bei Re-
konditionierung lag im Median bei 44 (34-93) Tagen, zwischen Transplantation
und Gabe des autologen Backups bei 23,5 (17-85) Tagen.

3.2. Immunrekonstitution

Daten zur Immunrekonstitution lagen von den in Tübingen und Greifswald trans-
plantierten Patienten vor. Die Immunrekonstitution nach Rekonditionierung
wurde in der Auswertung mitberücksichtigt.

Die Rekonstitution der Lymphozyten setzte früh ein. So waren bereits nach zwei
Wochen im Mittel >500/ μ l und nach 150 Tagen fast 1000/ μ l Lymphozyten zähl-
bar.

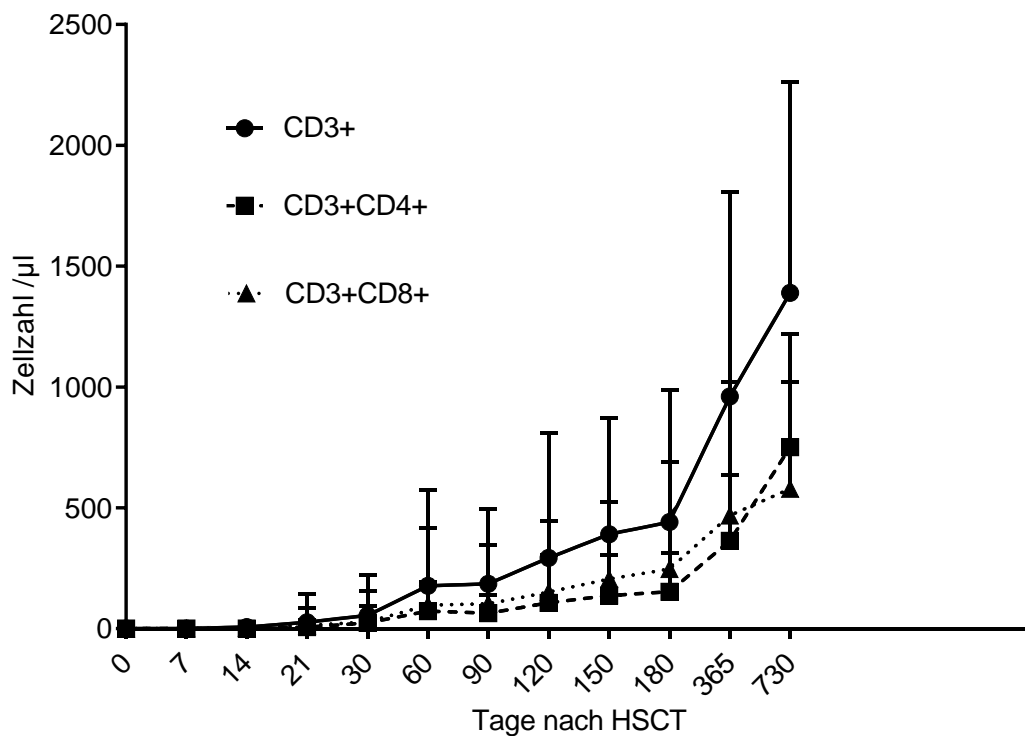


Abb. 5: Immunrekonstitution der T-Lymphozyten. Mittelwert und Standardabweichung

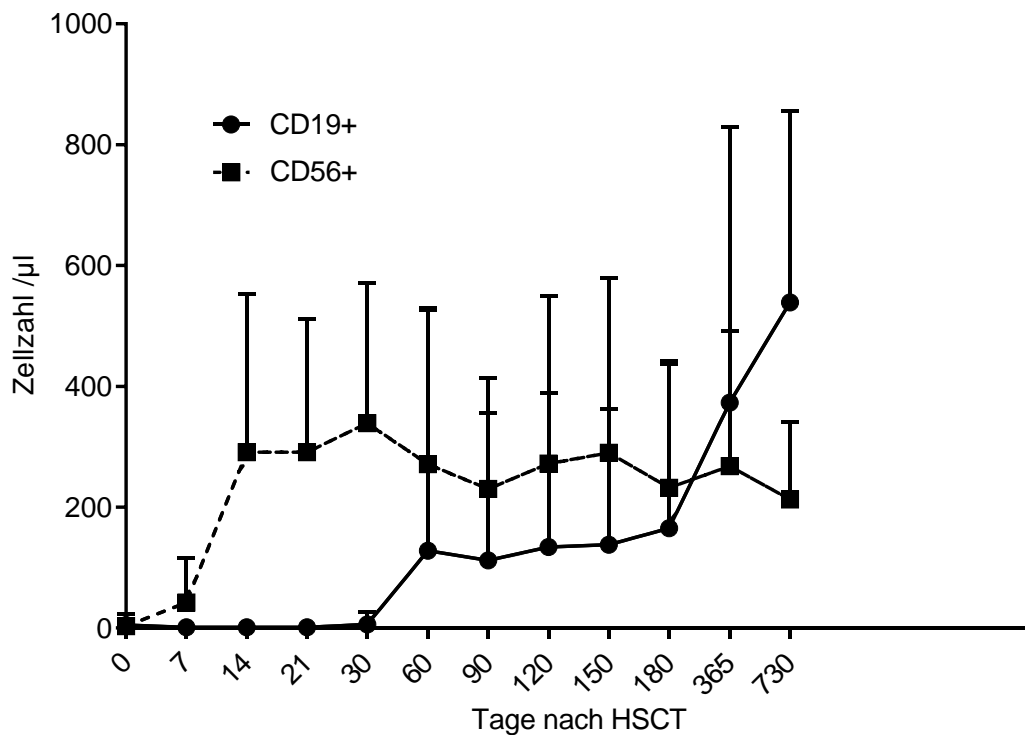


Abb. 6: Immunrekonstitution der B-Lymphozyten und NK-Zellen. Mittelwert und Standardabweichung

CD56+ NK-Zellen stellten die erste sich regenerierende Lymphozyten-Subpopulation dar. Sie dominierten innerhalb der ersten drei Monate. Ihre Zahl stieg auf fast 300/µl an Tag 14.

Ein Anstieg der CD3+ T-Lymphozyten begann ca. 3 Wochen nach HSCT (Mittelwert 27/µl, Spanne 0 – 1352/µl). Im Verlauf stiegen die Zahlen auf 186/µl (0 – 1977/µl) an Tag 90; 441/µl (9 – 2845/µl) an Tag 180; 961/µl (42 – 3658/µl) an Tag 365 und 1390/µl (59 – 2972/µl) an Tag 730. Die CD3+CD4+ und CD3+ CD8+ T-Lymphozytenzahlen stiegen im Mittel >50/µl an Tag 60; >100/µl an Tag 120 und >500/µl an Tag 730.

Die Rekonstitution der CD19+ B-Lymphozyten begann an Tag 30. Nach 60 Tagen lag die Zahl der B-Zellen im Mittel bei >100/µl und nach 2 Jahren bei >500/µl.

Die Auswahl der Serotherapie hatte Einfluss auf die Immunrekonstitution an Tag 90. Nach ATG-Therapie lag die Zahl der CD3+, CD3+CD4+ und CD3+CD8+

Lymphozyten unter der Zahl nach OKT3 – Serotherapie. Die Zahl der CD19+ Lymphozyten lag hingegen darüber. Nach Tag 180 ließ sich kein Unterschied der Immunrekonstitution zwischen den mit ATG oder OKT3 behandelten Patienten aufzeigen.

Diagnosegruppe, allogene Vortransplantation, Konditionierung, HLA-Mismatch (5MM vs. <5MM) sowie die Transplantatzusammensetzung (Zahl CD34+, CD3+, CD56+ Zellen) zeigten statistisch keinen Einfluss auf die Immunrekonstitution.

3.3. Infektionen

Die Überwachung auf mögliche virale Infektionen zeigte eine CMV-Virämie bzw. einen CMV-Nachweis in einer BAL bei 27 Patienten. Bei drei der Patienten bestand die CMV-Reaktivierung bereits vor Beginn der Konditionierung. Eine CMV-Erkrankung wurde bei 9 Patienten unter dem klinischen Bild einer Pneumonie (n=7) oder Knochenmarksuppression (n=2) diagnostiziert.

Eine ADV-Reaktivierung wurde bei 48 Patienten im Stuhl / RSW detektiert. Bei 17 Patienten lag eine Virämie vor, 7 Patienten entwickelten eine symptomatische Erkrankung (Pneumonie / positive BAL n=4; Sepsis / Meningitis n=2; MAS n=1). Eine Reaktivierung im Blut / positive BAL von sowohl CMV als auch ADV trat bei 5 Patienten auf.

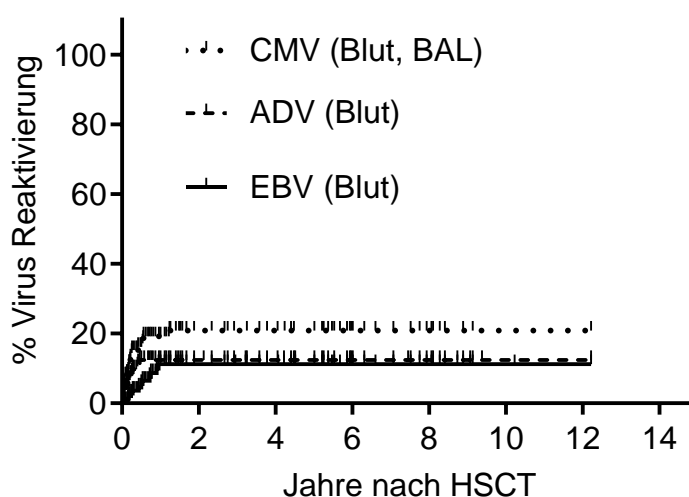


Abb. 7: Kumulative Inzidenz der Reaktivierung von CMV, ADV und EBV im Blut. 1-Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, Tod, letzte dokumentierte Vorstellung

Zwölf Patienten reaktivierten EBV, von diesen entwickelten 3 eine PTLD. BKV wurde im Urin von 66 Patienten erfasst, eine hämorrhagische Zystitis manifestierte sich bei 23 Patienten.

Ein adoptiver Immuntransfer ADV-spezifischer T-Zellen erfolgte bei 4 Patienten, zwei weiteren wurden ADV und CMV spezifische T-Lymphozyten verabreicht.

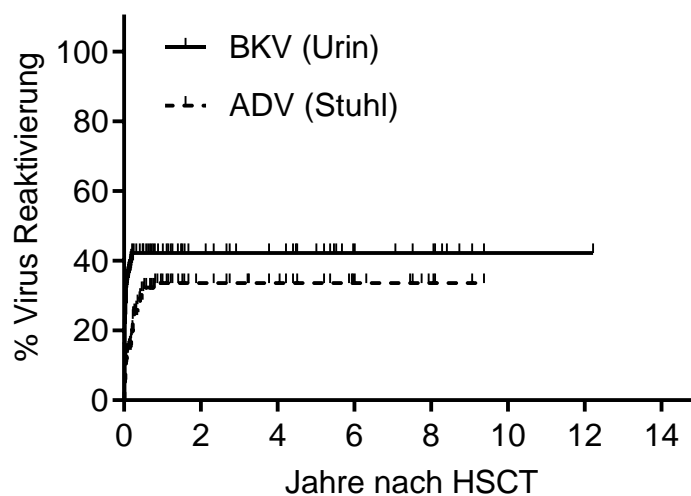


Abb. 8: Kumulative Inzidenz der Reaktivierung von BKV im Urin und ADV im Stuhl. 1-Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, Tod, letzte dokumentierte Vorstellung

Vier Patienten wurden mit vorbestehender aktiver Aspergillusinfektion (probable infection) transplantiert. Zwei erwarben eine Aspergillusinfektion nach Transplantation (proven n=1, probable n=1). Drei Patienten erlitten eine Candidainfektion (proven n=1, probable n=2) in Form einer Sepsis (n=2) oder einer Pneumonie (n=1). Einer der Patienten wies zeitgleich eine Fusarium-Sepsis auf.

Pneumocystis carinii verursachte eine Pneumonie bei zwei Patienten. Eine bakterielle Sepsis mit katecholaminpflichtiger Hypotension oder Beeinträchtigung einer Organfunktion komplizierte den Transplantationsverlauf von 15 Patienten. Ein Erregernachweis in einer Blutkultur gelang lediglich in einem Fall mit Nachweis von E. coli.

Tabelle 8: Inzidenz relevanter Infektionen / symptomatische Virusreaktivierung

Erreger	Patientenzahl
CMV Erkrankung	n= 9 (5,7%)
Pneumonie	n=7
Myelosuppression	n=2
ADV Erkrankung	n= 7 (4,5%)
Pneumonie	n=4
Sepsis / Meningitis	n=2
MAS	n=1
BKV Zystitis	n= 23 (14,6%)
EBV PTLD	n= 3 (1,9%)
Aspergillose, neu erworben	n= 2 (1,3%)
Candidose / Candida Pneumonie	n= 3 (1,9%)
Pneumocystis carinii Pneumonie	n= 2 (1,3%)
Bakterielle Sepsis	n= 15 (9,6%)
Blutkultur negativ	n=14
Blutkultur positiv	n=1

3.4. GvHD

Die Diagnose einer akuten GvHD wurde bei 90 Patienten, zumeist aufgrund klinischer Kriterien gestellt. Bei 55 Patienten trat lediglich eine milde aGvHD I° auf, während 35 Patienten eine relevante aGvHD II-IV° (aGvHD II° n=25; aGvHD III° n=7; aGvHD IV° n=3) entwickelten. Patienten, deren Serotherapie ATG beinhaltete, entwickelten seltener eine aGvHD II-IV°. Patienten, welche nach Transplantation nochmals DLI oder einen SZ-Boost erhielten erkrankten häufiger an einer aGvHD II-IV° (Tab. 10).

Tabelle 9: Inzidenz GvHD

GvHD			
aGvHD	Grad	Grad I	n=55
		Grad II	n=25
		Grad III-IV	n=10
	Manifestation	Haut	n=63
		Haut + Darm / Darm	n=23
		Haut + Darm + Leber / Haut + Leber	n=4
cGvHD	Grad	Limited disease	n=8
		Extended disease	n=19
	Manifestation	Haut / Haut + Auge	n=10
		Haut + Darm / Haut + Darm + Leber	n=6
		Darm	n=7
		+ Lungenbeteiligung	n=4

Eine cGvHD trat bei 27 Patienten auf (limited disease n=8; extended disease n=19). Das Vorliegen eines overlap Syndroms wurde nicht erfasst. Eine ATG beinhaltende Serotherapie war mit einer geringeren cGvHD Inzidenz verbunden. Patienten mit soliden Tumoren und ohne ausreichendes Therapieansprechen vor Transplantation (NR, PD) entwickelten häufiger eine cGvHD (Tab. 11).

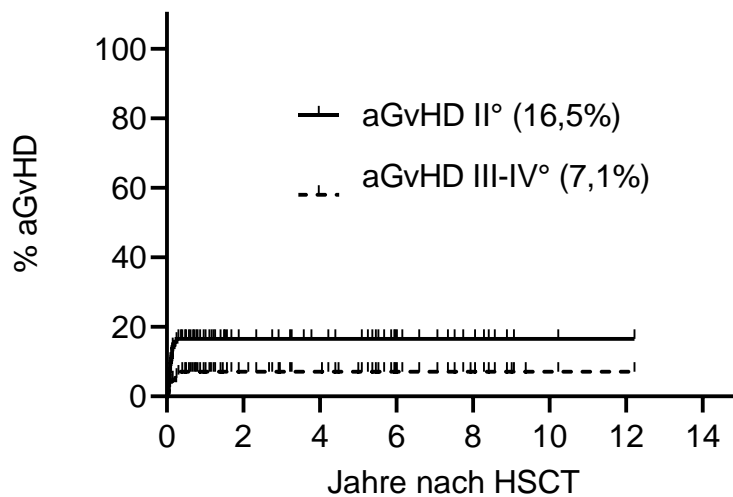


Abb. 9: Kumulative Inzidenz aGvHD. 1-Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, Tod, letzte dokumentierte Vorstellung

Zur Behandlung der GvHD kamen Steroide, MMF, CSA, Tacrolimus, Etanercept, Infliximab, Basiliximab, PUVA, ECP, MSC sowie Soderm und Protopic zum Einsatz.

Vier Patienten verstarben aufgrund einer GvHD (aGvHD III° n=1; cGvHD, extended disease Haut + Darm +/- Lunge n=3).

Tabelle 10: Einflussfaktoren auf das Auftreten einer aGvHD

Einflussfaktoren	Anzahl Patienten	aGvHD II-IV°	(%) Wahrscheinlk.	p-Wert	Odds ratio	95% CI
Diagnose						
Maligne	132	29	21,97	0,8	1,12	0,41 – 3,14
Nicht Maligne	25	6	24,0			
Remissionsstatus						
Häm. Maligne CR	37	10	27,0	0,59	0,59	0,19 – 2,04
Häm. NR / RAEB	28	5	17,9			
Solide CR / PR	56	10	17,9	0,22	2,63	0,74 – 9,63
Solide NR / PD	11	4	36,4			
Vorherige HSCT						
1. allogene HSCT	127	28	22,1	>0,99	0,93	0,37 – 2,36
≥ 2. allogene HSCT	30	7	23,3			
Konditionierung						
RIC	122	32	26,2	0,08		
MAC	24	2	8,3			
Rekonditionierung	11	1	9,1			
Serotherapie						
OKT	107	30	28,0	0,01	0,29	0,12 – 0,77
ATG / Rekond ATG +/- OKT	49	5	10,2			
HLA Mismatch						
5 Mismatch	87	17	19,5	0,55	0,76	0,34 – 1,7
<5 Mismatch	66	16	24,2			
Graft comp. CD34						
< 15,16 x 10 ⁶ /kg	78	15	19,2	0,44	1,42	0,68 – 3,0
≥ 15,16 x 10 ⁶ /kg	79	20	25,3			
Graft comp. CD3						
< 47,42 x 10 ³ /kg	77	13	16,9	0,17	1,8	0,85 – 3,92
≥ 47,42 x 10 ³ /kg	78	21	26,9			
< 60 x 10 ³ /kg	113	22	19,5	0,28	0,6	0,26 – 1,43
≥ 60 x 10 ³ /kg	42	12	28,6			
Graft comp. CD56						
< 73,9 x 10 ⁶ /kg	64	14	21,9	>0,99	1,1	0,46 – 2,66
≥ 73,9 x 10 ⁶ /kg	64	13	20,3			
DLI / SZ-Boost						
Gabe DLI/SZ-Boost	56	18	32,1	0,04	0,43	0,19 – 0,92
Keine DLI/SZ-Boost	101	17	16,8			

Tabelle 11: Einflussfaktoren auf das Auftreten einer cGvHD

Einflussfaktoren	Anzahl Patienten	cGvHD	(%) Wahrscheinlk.	p-Wert	Odds ratio	95% CI
Diagnose						
Maligne	132	24	18,2	0,57	0,61	0,18 – 2,14
Nicht Maligne	25	3	12,0			
Remissionsstatus						
Häm. Maligne CR	37	7	18,9	0,74	0,71	0,21 – 2,75
Häm. NR / RAEB	28	4	14,3			
Solide CR / PR	56	8	14,3	0,03	0,2	0,05 – 0,81
Solide NR / PD	11	5	45,5			
Vorherige HSCT						
1. allogene HSCT	127	24	18,9	0,3	2,1	0,62 – 6,99
≥ 2. allogene HSCT	30	3	10			
Konditionierung						
RIC	122	21	17,2	0,19		
MAC	24	6	25,0			
Rekonditionierung	11	0	0			
Serotherapie						
OKT	107	24	22,4	0,01	0,23	0,07 – 0,72
ATG / Rekond ATG +/- OKT	49	3	6,1			
HLA Mismatch						
5 Mismatch	87	13	14,9	0,39	0,65	0,28 – 1,5
<5 Mismatch	66	14	21,2			
Graft comp. CD34						
< 15,16 x 10 ⁶ /kg	78	15	19,2	0,53	0,75	0,33 – 1,7
≥ 15,16 x 10 ⁶ /kg	79	12	15,2			
Graft comp. CD3						
< 47,42 x 10 ³ /kg	77	11	14,3	0,66	0,76	0,33 – 1,82
≥ 47,42 x 10 ³ /kg	78	14	17,9			
< 60 x 10 ³ /kg	113	18	15,9	>0,99	0,95	0,36 – 2,41
≥ 60 x 10 ³ /kg	42	7	16,7			
Graft comp. CD56						
< 73,9 x 10 ⁶ /kg	64	5	7,8	0,07	0,33	0,12 – 1
≥ 73,9 x 10 ⁶ /kg	64	13	20,3			
DLI / SZ-Boost						
Gabe DLI/SZ-Boost	56	12	21,4	0,38	0,64	0,28 – 1,46
Keine DLI/SZ-Boost	101	15	14,9			

3.5. Andere transplantationsassoziierte Komplikationen

Eine VOD komplizierte den Transplantationsverlauf bei drei Patienten (1,9%). Bei ihnen kam je ein auf Busulfan, TBI oder Melphalan basierendes Konditionierungsschema zum Einsatz. Es traten keine VOD-bedingten Todesfälle auf, zwei der Patienten mit VOD verstarben jedoch an einer CMV-Infektion.

An einer BO bzw. BOOP erkrankten 10 Patienten (6,4%). Einer verstarb an einer GvHD mit BOOP.

Eine EBV positive PTLD trat bei drei Patienten (1,9%) im Anschluss an die HSCT auf. Die Zahl der CD19 positiven Zellen im Transplantat unterschied sich nicht von Patienten ohne PTLD, das T/B-Verhältnis lag bei $>0,25$. Weitere zwei Patienten (1,3%) entwickelten ein Zweitmalignom in Form eines Angiosarkoms bzw. einer vulvären intraepithelialen Neoplasie 3,6 respektive 2 Jahre nach HSCT. Beide Patienten wurden im Rahmen der Studie mit einem auf Melphalan basierenden Protokoll konditioniert, beide wurden zu einem früheren Zeitpunkt bereits autolog bzw. allogent transplantiert. Eine PTLD/ Zweitmalignom stellte die Todesursache bei zwei Patienten dar (PTLD, Angiosarkom).

Es wurde kein Fall einer TMA beobachtet, allerdings wurde während des Studienzeitraumes nicht systematisch auf diese Komplikation hin untersucht.

3.6. OAS und Non-Relapse Mortality

Bis zum 30.04.2016 verstarben insgesamt 90 der 157 Patienten. Die Todesursache war in 71 Fällen ein Rezidiv oder ein Progress der Grunderkrankung und in 19 Fällen nicht rezidivbedingt. 16 Todesfälle (11 rezidiv-, 5 nicht rezidivbedingt) traten bei Patienten auf, welche bereits aus der Studie ausgeschieden waren (autologes Backup, Folgetransplantation, Einschluss in Folgestudie). In der Betrachtung des OAS und der NRM wurden diese mitberücksichtigt.

Tabelle 12: Todesursache

Todesursache	Anzahl (n=90)
Rezidiv / progrediente Erkrankung / Rezidivbehandlung	n=71
Non-Relapse Mortality	n=19
Virale Infektion	n=5
CMV	n=2
ADV	n=2
EBV-PTLD	n=1
Bakterielle Sepsis	n=2
GvHD	n=4
Sekundärmalignom (ohne PTLD)	n=1
Kardiomyopathie	n=1
Sekundäre HLH	n=1
Unbekannt	n=3
Rekonditionierung, nachfolgende Transplantation	n=2

Sechs Monate nach hämatopoietischer Stammzelltransplantation betrug die kumulative Inzidenz der nicht rezidivbedingten Todesfälle 4,8%, nach einem Jahr 8,7%. Der früheste nicht rezidivbedingte Todesfall ereignete sich 3 Tage nach Rekonditionierung, der letzte über 4 Jahre nach Transplantation, bedingt durch ein Sekundärmalignom. Haupttodesursache stellten nach Rezidiven Infektionen, insbesondere durch Viren, dar gefolgt von einer GvHD. Die Todesursachen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

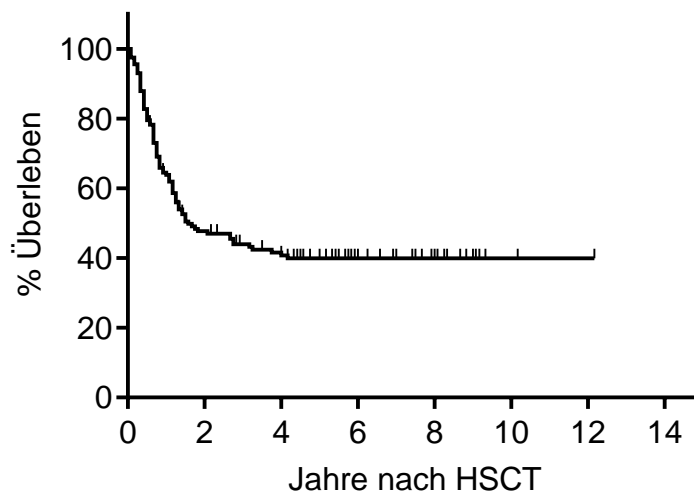


Abb. 10: Gesamtüberleben (OAS). Kaplan Meier Kurve, zensiert: letzte dokumentierte Vorstellung

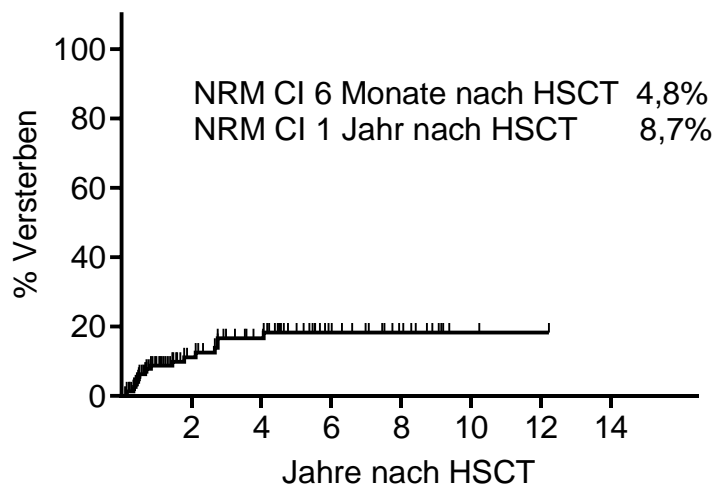


Abb. 11: Kumulative Inzidenz nicht rezidivbedingter Todesfälle. 1-Kaplan Meier Kurve, zensiert: Tod durch Rezidiv, letzte dokumentierte Vorstellung

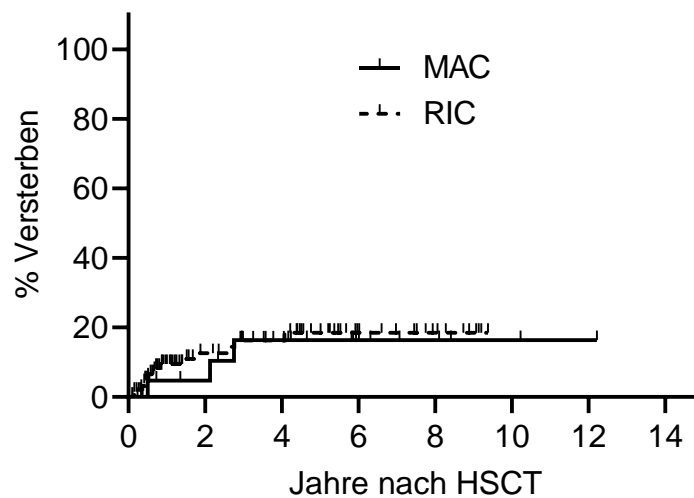


Abb. 12: Kumulative Inzidenz nicht rezidivbedingter Todesfälle nach angewandter Konditionierung. 1-Kaplan Meier Kurve, zensiert: Tod durch Rezidiv, letzte dokumentierte Vorstellung

Die NRM lag bei Patienten mit nicht maligner Grunderkrankung höher als bei Patienten mit maligner. Eine aGvHD Grad II-IV bzw. eine cGvHD waren ebenfalls mit einer erhöhten, nicht rezidivbedingten, Sterblichkeit assoziiert, während Alter, Karnofski-Index, eine vorausgegangene Transplantation, Konditionierung, die Graftzusammensetzung, HLA-Mismatch oder Immunrestitution an Tag 90 keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die NRM hatten.

3.7. Rezidiv

Es wurden 132 Transplantationen aufgrund einer malignen Grunderkrankung durchgeführt. Von diesen Patienten erlitten 71 ein Rezidiv, Rezidive nach Beendigung der Studienteilnahme werden hier nicht berücksichtigt. Rezidive stellten das häufigste Ereignis der Studie dar. Ihre kumulative Inzidenz beträgt 58,1% ein Jahr (63 Rezidive) und 64,3% zwei Jahre (69 Rezidive) nach Transplantation. Das früheste Rezidiv trat nach 22 Tagen auf, das späteste nach 3 Jahren (Median 151 Tage).

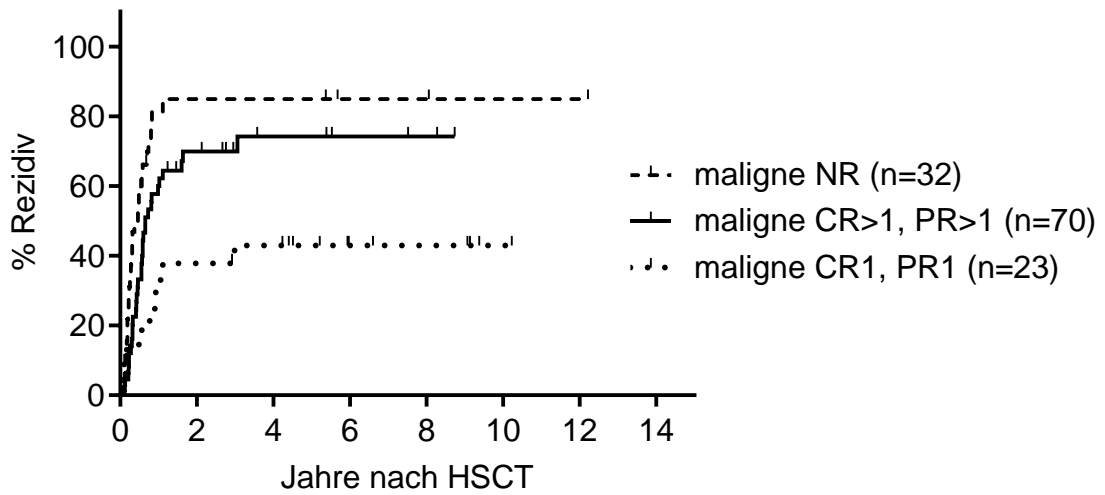


Abb. 13: Kumulative Inzidenz von Rezidiven bei maligner Grunderkrankung (ALL, AML, solide Tumore) je nach Remissionsstatus vor Transplantation. 1-Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, Tod, letzte dokumentierte Vorstellung

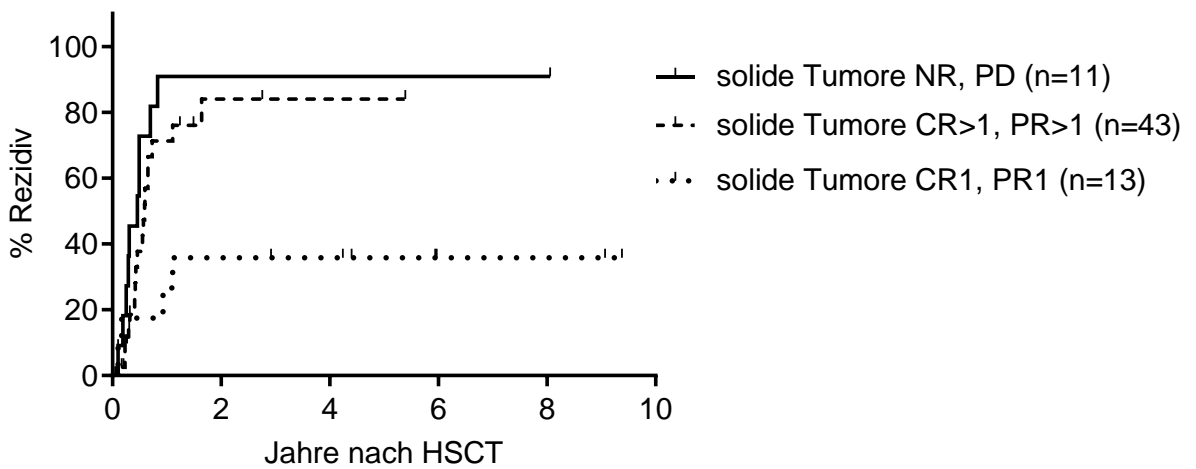


Abb. 14: Kumulative Inzidenz von Rezidiven bei soliden Tumoren je nach Remissionsstatus vor Transplantation. 1-Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, Tod, letzte dokumentierte Vorstellung

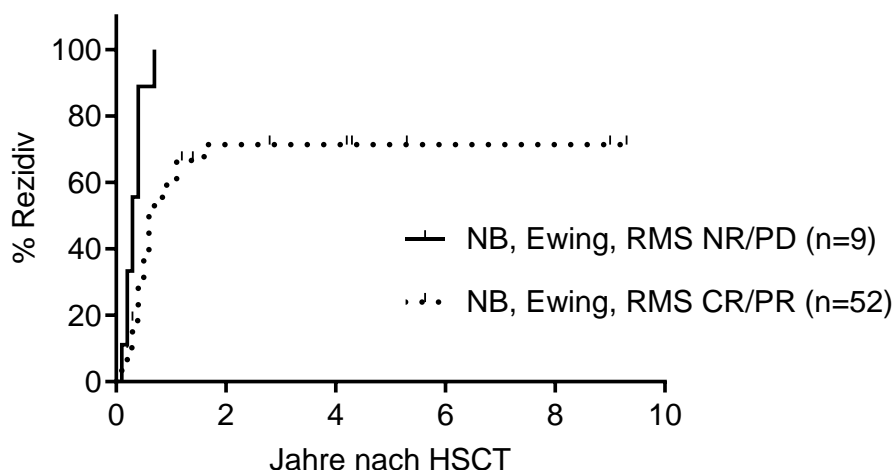


Abb. 15: Kumulative Inzidenz von Rezidiven bei Neuroblastom, Rhabdomyosarkom und Ewing Sarkom je nach Remissionsstatus vor Transplantation. 1-Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, Tod, letzte dokumentierte Vorstellung

Der Remissionsstatus vor Transplantation stellte einen statistisch signifikanten Einflußfaktor für das Auftreten eines späteren Rezidivs dar. Patienten in erster kompletter Remission oder mit erstem partiellen Ansprechen erlitten weniger Rezidive als Patienten mit vorausgegangenem Rezidiv oder ohne Therapieansprechen vor HSCT.

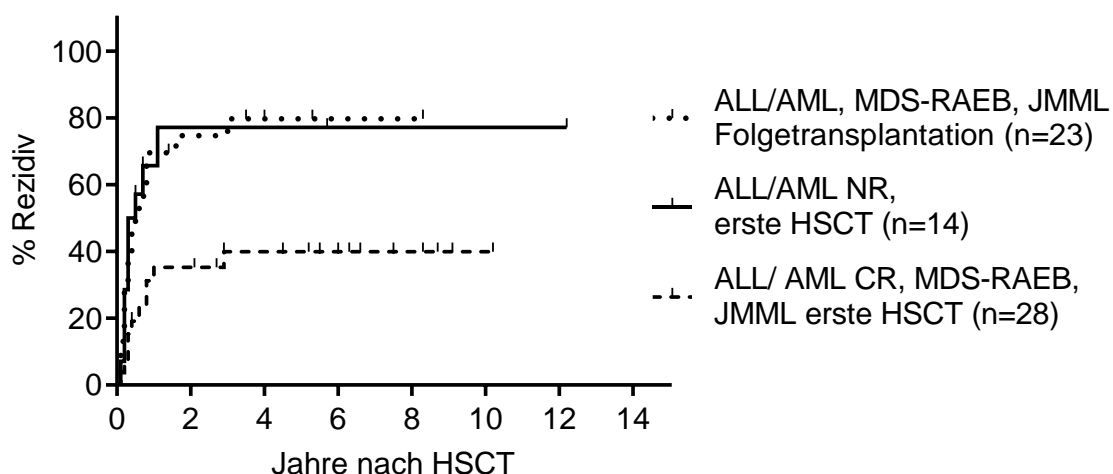


Abb. 16: Kumulative Inzidenz von Rezidiven bei Leukämien je nach Remissionsstatus vor Transplantation und vorheriger Transplantation. 1-Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, Tod, letzte dokumentierte Vorstellung

Das Konditionierungsregime, ein HLA-Mismatch, die Transplantatzusammensetzung und das Auftreten einer akuten oder chronischen GvHD hatten keinen signifikanten Einfluss auf eine spätere Rezidiventstehung.

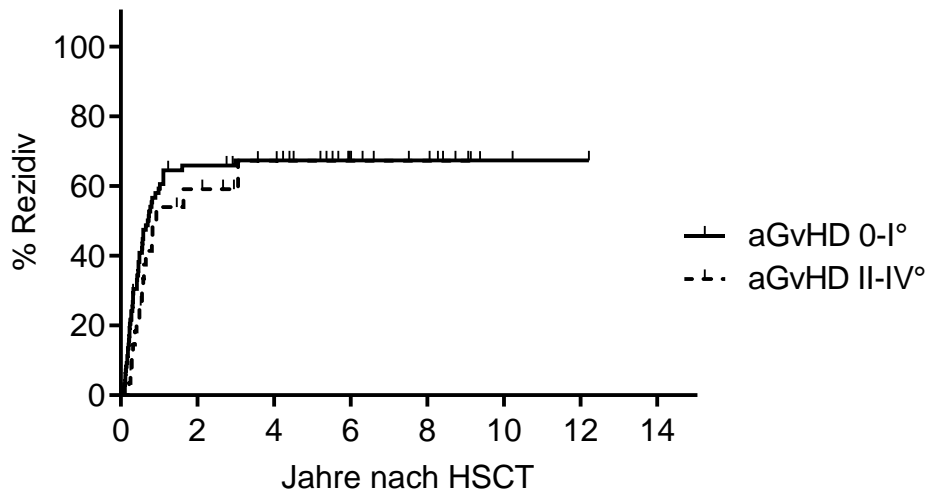


Abb. 17: Kumulative Inzidenz von Rezidiven bei maligner Grunderkrankung je nach Auftreten einer aGvHD. 1-Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, Tod, letzte dokumentierte Vorstellung

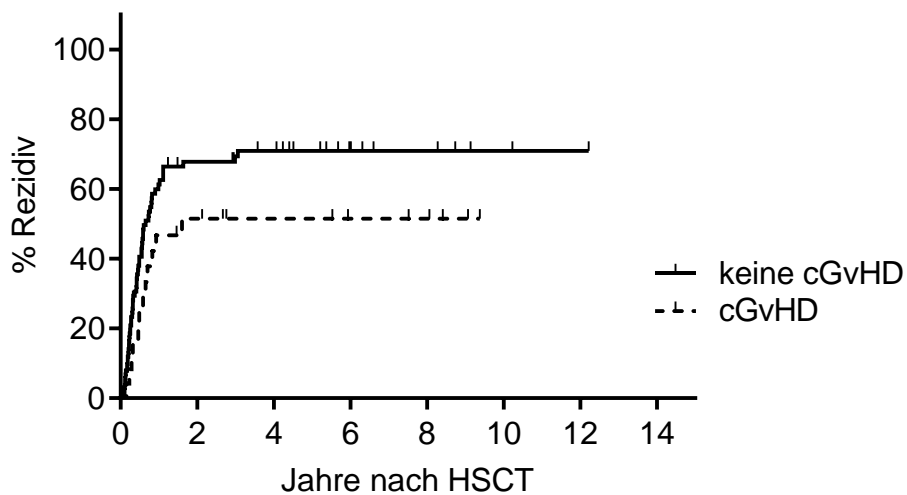


Abb. 18: Kumulative Inzidenz von Rezidiven bei maligner Grunderkrankung je nach Auftreten einer cGvHD. 1-Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, Tod, letzte dokumentierte Vorstellung

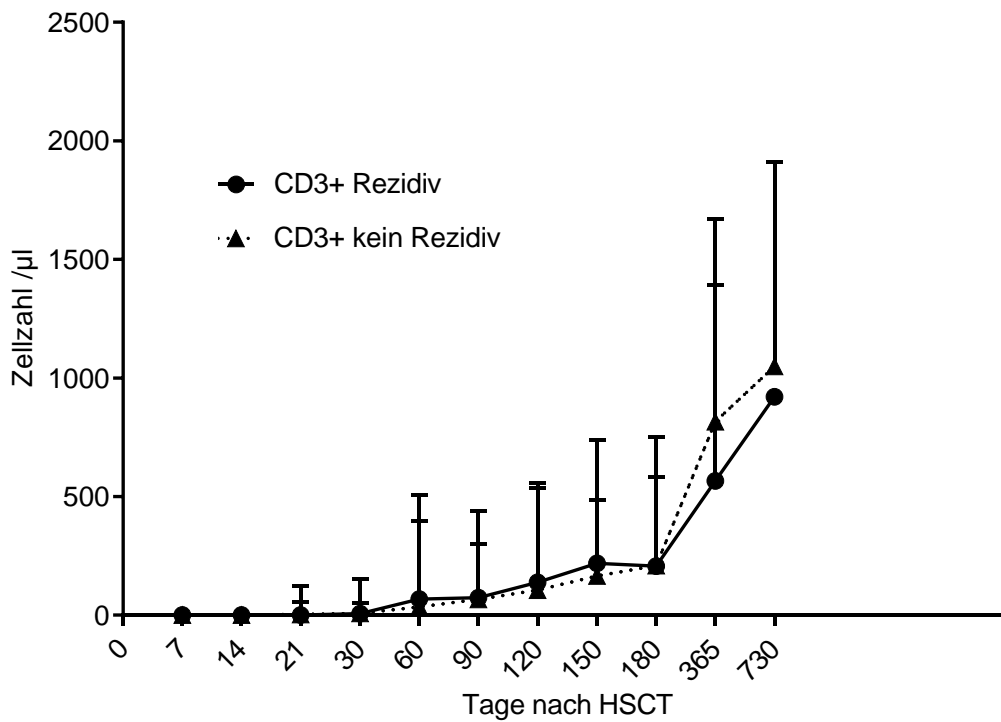


Abb. 19: Immunrekonstitution der CD3+ T-Lymphozyten bei Patienten mit maligner Grunderkrankung mit bzw. ohne Rezidiv. Mittelwert und Standardabweichung

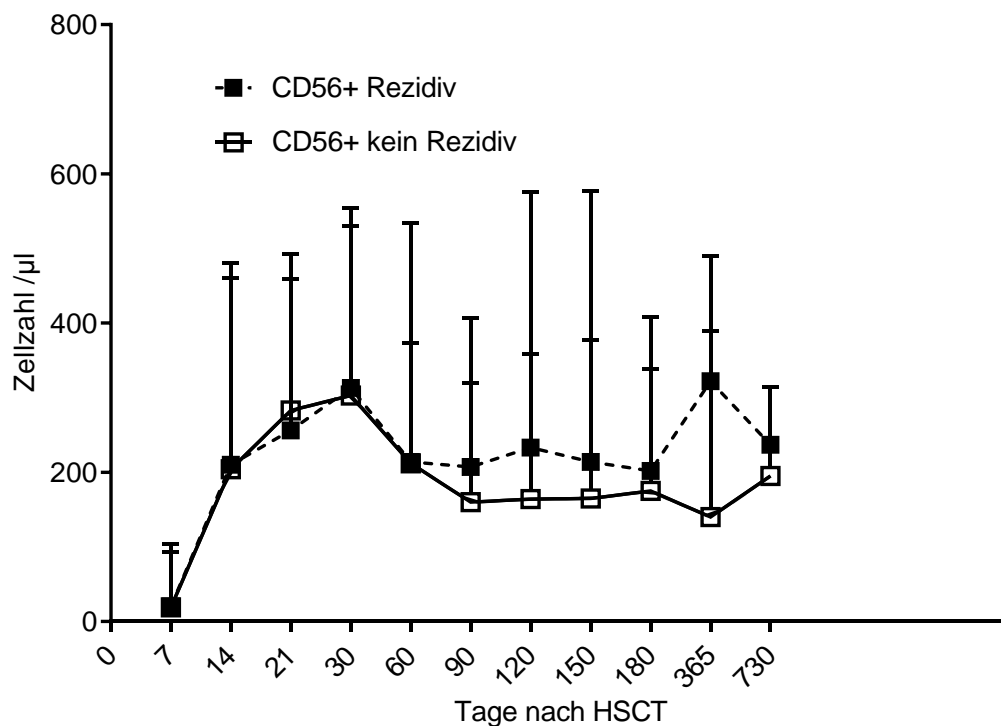


Abb. 20: Immunrekonstitution der CD56+ NK-Zellen bei Patienten mit maligner Grunderkrankung mit bzw. ohne Rezidiv. Mittelwert und Standardabweichung

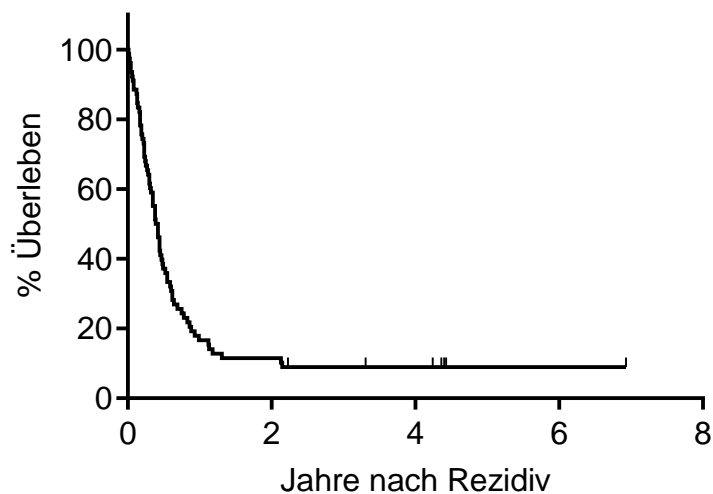


Abb. 21: Gesamtüberleben (OAS) der Patienten mit maligner Erkrankung und Rezidiv / Progress nach HSCT. Kaplan Meier Kurve, zensiert: letzte dokumentierte Vorstellung

Berücksichtigt man zusätzlich die Patienten, welche nach Ausscheiden aus der Studie ein Rezidiv / Progress der Grunderkrankung erlitten (n=7), traten Rezidive / Progress bei 87 der 132 Patienten mit maligner Erkrankung auf. Von diesen verstarben 71 Patienten an dem Rezidiv / Progress. Keiner der Patienten verstarb an einer nicht rezidivbedingten Ursache. Sieben Patienten mit Rezidiv befanden sich weiterhin unter Studienbeobachtung. Das Überleben der Patienten mit Rezidiv lag 5 Jahre nach Transplantation bei 9% (Abb. 21).

3.8. Therapiestrategien nach Transplantation

Verschiedene Therapien zur Verstärkung eines immunologischen, gegen die maligne Grunderkrankung gerichteten Effekts wurden nach Transplantation präemptiv bzw. nach erneutem Rezidiv versucht. Hierzu zählte die Gabe von Effektorzellen. Acht Patienten mit Leukämien und zwölf Patienten mit soliden Tumoren wurden DLI transfundiert. Acht Patienten erhielten NK-Zellen.

Zur Induktion einer ADCC wurden der bispezifische Antikörper Blinatumomab oder der monoklonale CD19-Antikörper bei Patienten mit ALL sowie der monoklonale Antikörper CH14.18 bei Patienten mit Neuroblastom angewandt. Die Wirksamkeit von CH14.18 bei Neuroblastompatienten nach haploidenter Trans-

plantation wurde in einer eigenen Studie untersucht, in welche 18 Patienten aus der vorliegenden Studie eingeschlossen wurden.²²¹

Eine erneute HSCT nach Rezidiv wurde in acht Fällen durchgeführt, wobei zwei Patienten erneut haploident mit CD3/CD19-Depletion, vier Patienten haploident mit alpha/beta-Depletion und zwei Patienten von einem unverwandten Spender transplantiert wurden.

3.9. Ereignisfreies Überleben (EFS)

Für das Ereignisfreie Überleben wurde das jeweils zuerst eintretende Ereignis Rezidiv (n=70), Tod in Remission (n=13) oder Sekundärmalignom (n=2) gezählt. Durch das Überwiegen von Rezidiven wird das EFS maßgeblich von den Faktoren beeinflusst, die auch für die Entstehung von Rezidiven von Bedeutung sind (Diagnosegruppe, Remissionsstatus vor Transplantation).

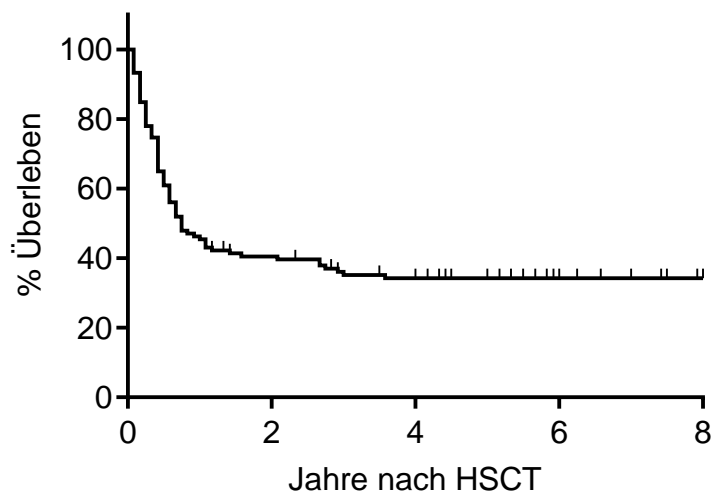


Abb. 22: Ereignisfreies Überleben (EFS) gesamte Studiengruppe. Ereignis: Tod, Rezidiv, Sekundärmalignom. Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, letzte dokumentierte Vorstellung.

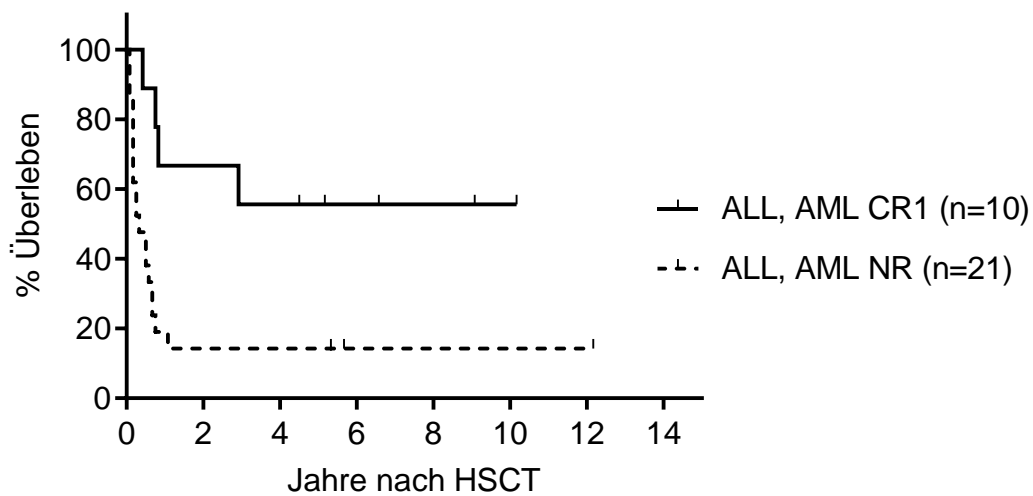


Abb. 23: Ereignisfreies Überleben (EFS) ALL und AML nach Remissionsstatus. Ereignis: Tod, Rezidiv, Sekundärmalignom. Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, letzte dokumentierte Vorstellung.

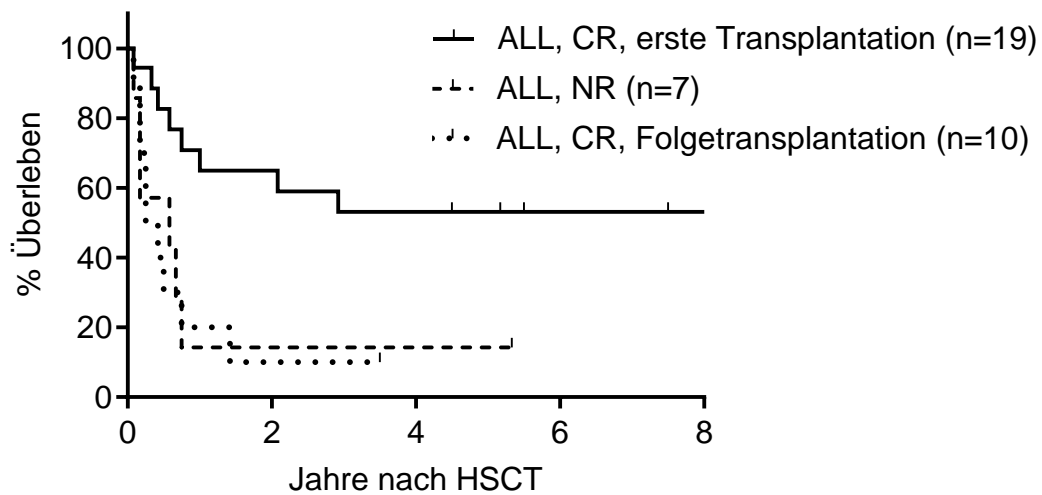


Abb. 24: Ereignisfreies Überleben (EFS) ALL je nach Remissionsstatus vor Transplantation und vorheriger Transplantation. Ereignis: Tod, Rezidiv, Sekundärmalignom. Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, letzte dokumentierte Vorstellung.

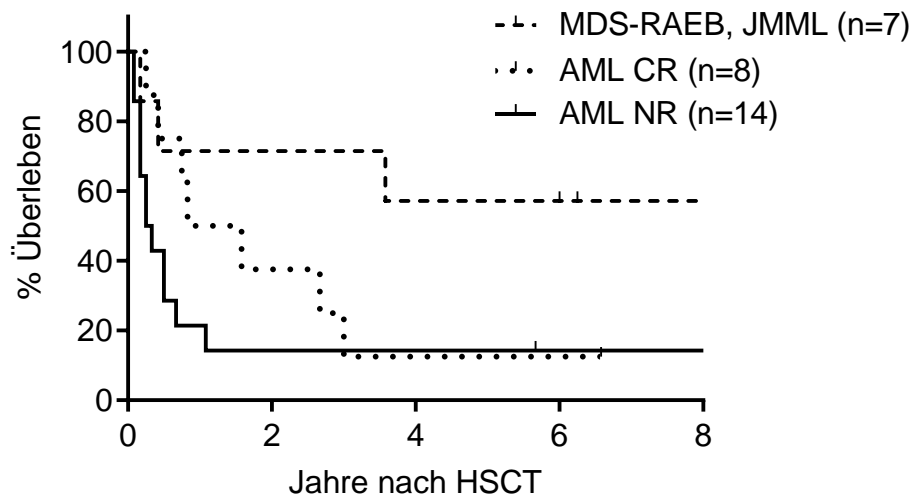


Abb. 25: Ereignisfreies Überleben (EFS) AML je nach Remissionsstatus vor Transplantation, MDS-RAEB und JMML. Ereignis: Tod, Rezidiv, Sekundärmalignom. Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, letzte dokumentierte Vorstellung.

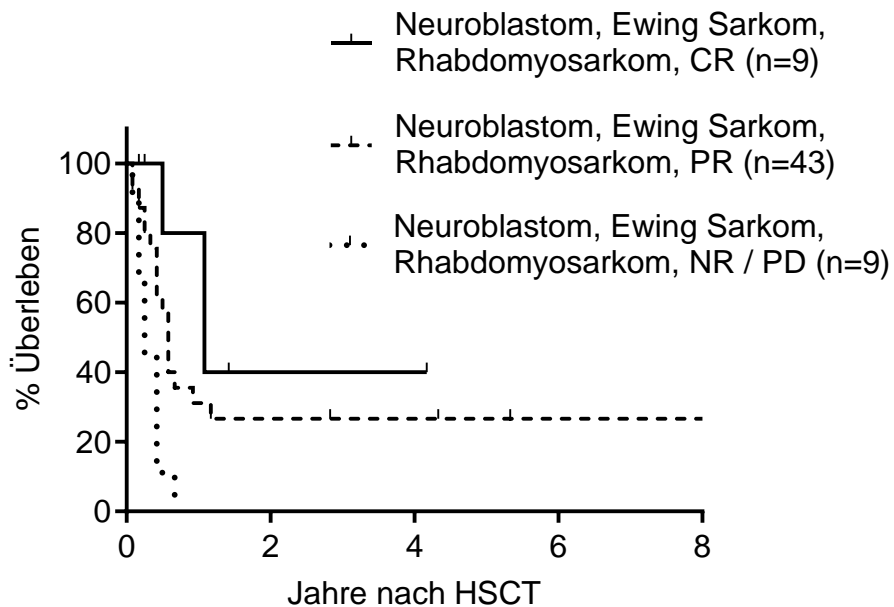


Abb. 26: Ereignisfreies Überleben (EFS) Neuroblastom, Ewing Sarkom und Rhabdomyosarkom nach Remissionsstatus. Event: Tod, Rezidiv, Sekundärmalignom. Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, letzte dokumentierte Vorstellung.

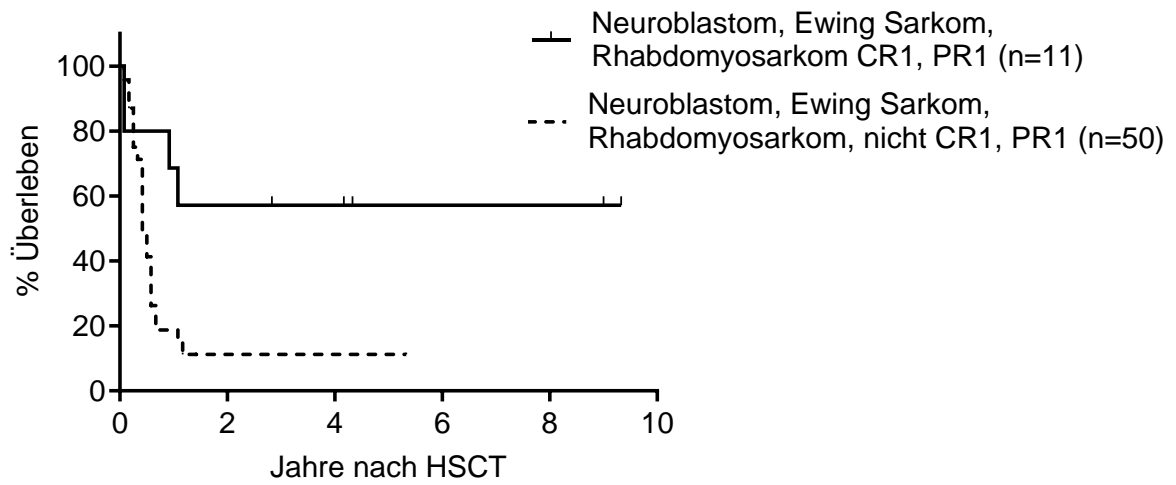


Abb. 27: Ereignisfreies Überleben (EFS) Neuroblastom, Ewing Sarkom und Rhabdomyosarkom nach Remissionsstatus. Event: Tod, Rezidiv, Sekundärmalignom. Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, letzte dokumentierte Vorstellung.

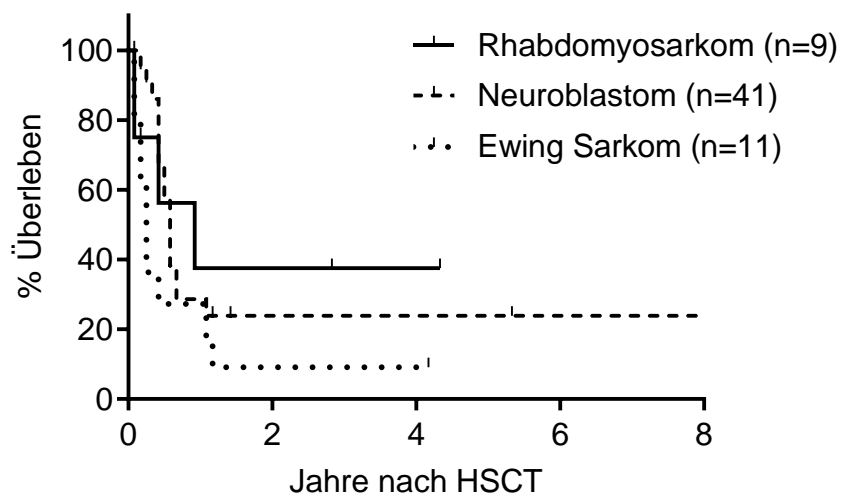


Abb. 28: Ereignisfreies Überleben (EFS) Neuroblastom, Ewing Sarkom und Rhabdomyosarkom. Event: Tod, Rezidiv, Sekundärmalignom. Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, letzte dokumentierte Vorstellung.

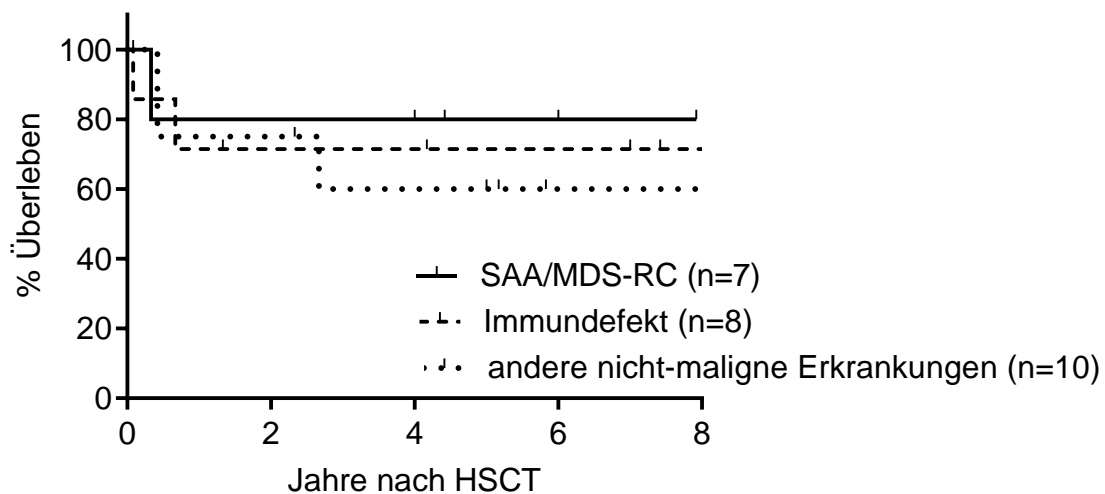


Abb. 29: Ereignisfreies Überleben (EFS) nicht maligner Erkrankungen. Event: Tod, Sekundär-malignom. Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, letzte dokumentierte Vorstellung.

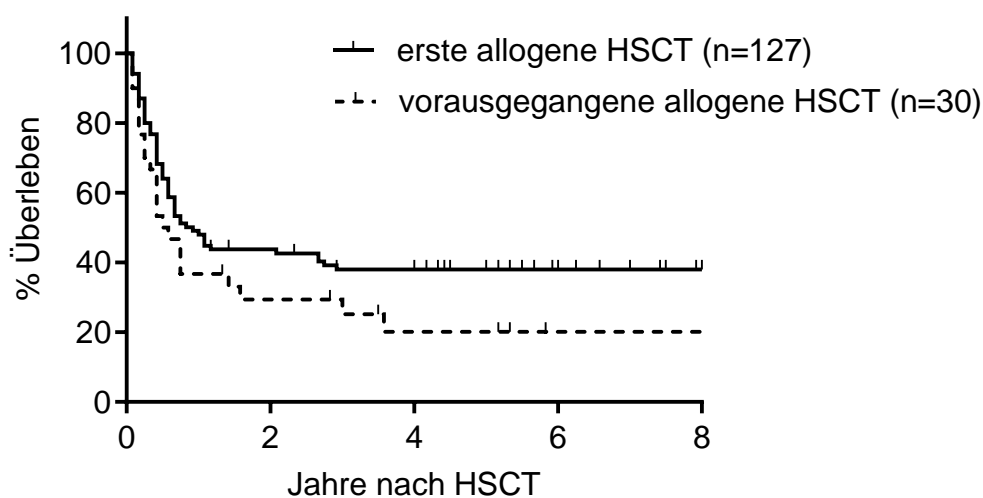


Abb. 30: Ereignisfreies Überleben (EFS) aller Patienten bei erster allogener HSCT bzw. allogener Folgetransplantation. Event: Tod, Rezidiv, Sekundär-malignom. Kaplan Meier Kurve, zensiert: Ausscheiden aus der Studie, letzte dokumentierte Vorstellung.

3.10. Beobachtungspatienten

Zusätzlich zu der bisher beschriebenen Studienpopulation wurden weitere sechs Patienten als Beobachtungspatienten geführt und flossen nicht in die obige Aus-

wertung ein. Bei Ihnen handelt es sich um Kinder mit Transplantation eines CD3/CD19 depletierten Transplantats ohne vorherige Konditionierung bzw. im Rahmen einer Rekonditionierung nach anderer HSCT.

- Transplantation ohne Konditionierung bei SCID n=1
- Transplantation ohne Konditionierung aus Aplasie bei AML n=1
- Rekonditionierung nach anderer HSCT (3x MUD, 1x MSD) n=4

Alle Beobachtungspatienten zeigten ein erfolgreiches Engraftment. Ein Patient entwickelte eine aGvHD Grad II und im Verlauf auch eine cGvHD. Zwei Patienten mit maligner Grunderkrankung entwickelten ein Rezidiv (AML NR2, Neuroblastom PR3) und verstarben hieran. Die anderen vier Patienten befanden sich zuletzt weiterhin unter Beobachtung.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war, die Durchführbarkeit einer haploidenten Stammzelltransplantation mit CD3 und CD19 depletierten Transplantaten zu prüfen. Die Methode der Zelldepletion peripher gewonnener Stammzellpräparate mittels magnetischer Mikropartikel und dem CliniMACS-System konnte in der klinischen Patientenversorgung erfolgreich etabliert werden. Es wurde eine ausreichende Depletion der CD3+ Lymphozyten auf $44,51 \times 10^3/\text{kgKG}$ Median und der CD19+ Lymphozyten auf $26,09 \times 10^3/\text{kg}$ Median erreicht. Die Zahl der CD34+ Stammzellen lag Median bei $14,87 \times 10^6/\text{kgKG}$, die angestrebte Stammzellzahl von $>10 \times 10^6/\text{kgKG}$ wurde mehrheitlich (n=121) erreicht.

Die Transplantate standen zeitnah zur Verfügung und ließen auch eine kurzfristige Rekonditionierung als Rescue – Maßnahme nach Abstoßung sowohl bei Studienpatienten als auch nach anderer vorheriger Transplantation (Beobachtungspatienten) zu.

Engraftment

Einer der primären Endpunkte der Studie ist das Engraftment nach Transplantation. Für allogene HSCT wurden in der Literatur Graft Failure Raten zwischen 5,6 und bis zu 15% beschrieben.^{92, 99, 102, 222} Ein primäres Transplantatversagen

nach erster myeloablativer Stammzelltransplantation von Kindern trat bei 6,8% auf.⁹⁸ Eine RI-Konditionierung erhöht das Risiko eines Transplantatversagens um das 2,6 bis 5-fache verglichen mit einer myeloablativen Konditionierung.^{84, 99} Die Nicht-Übereinstimmung von 2-3 HLA-Allelen oder eine haploidente Transplantation war mit Graft Failure Raten von 13 - 21% verbunden.^{41, 99, 102} Für Transplantationen eines HLA - nicht identen Spenders in Kombination mit einer T - Zell - Depletion wurden Graft Failure Raten bis zu 75% genannt.^{90, 92, 99, 109}

Wir konnten in der Studie ein primäres Engraftment in 95,5% (PGF 4,5%), ein dauerhaftes Engraftment ohne Abstoßung (SGF) in 84,7% erzielen. Durch die Anwendung einer zusätzlichen Rekonditionierung ließ sich die Graft Failure Rate von insgesamt 15,3% auf 8,9% senken (Final Engraftment 91,1%). Somit waren die Engraftment - Ergebnisse einer Transplantation unter Studienbedingungen trotz der Risikofaktoren eines HLA-Mismatch, einer T - Zell - Depletion und einer Konditionierung mit reduzierter Intensität denen einer allogenen Transplantation eines passenden unverwandten (MUD) oder teilweise passenden Spenders nicht unterlegen. Verglichen mit haploidenter Transplantation CD34+ selektionierter Transplantate kam es seltener zu einem primären Transplantatversagen (PGF 15%, early GF 20%),^{13, 90, 223} was am Ehesten durch andere im Transplantat verbleibende Zellen (T-Zellen, NK-Zellen) vermittelt wird. Die Ergebnisse decken sich mit denen anderer Studien bei Kindern und Erwachsenen, welche CD3 – depletierte Stammzellen transplantierten (PGF 8,2 – 27,8%, SGF 7,1 – 15,4%, GF 13 – 33,3%).^{122, 224, 225, 226, 227}

Späte sekundäre Abstoßungen wurden noch Jahre nach Transplantation berichtet.¹⁰⁰ Diese stehen möglicherweise in Konkurrenz zu früher auftretenden Todesfällen nach HSCT, wodurch die tatsächliche Rate eines SGF höher liegen könnte.

In der univariaten Auswertung hatten sowohl die verbleibende T-Zellzahl im Transplantat, eine vorherige allogene Transplantation, der CMV-Status von Spender und Empfänger als auch die Art der Serotherapie Einfluss auf das Engraftment.

Eine verbleibende T-Zellzahl $> 60 \times 10^3$ /kgKG war signifikant mit weniger Graft Failure verbunden, ohne eine Zunahme klinisch relevanter GvH – Erkrankungen

zu verursachen. Dieses Ergebnis ist jedoch mit Vorsicht zu interpretieren. Nur ein Patient mit Graft Failure erhielt $>60 \times 10^3$ /kgKG CD3+ Lymphozyten. Ein Engraftment war mit $4,73 \times 10^3$ /kgKG CD3+ Lymphozyten im Transplantat möglich und es konnte keine notwendige Mindestzahl an T- Zellen für ein erfolgreiches Engraftment abgegrenzt werden.

Die Zahl der CD34+ Zellen im Transplantat unterschied sich nicht signifikant zwischen Patienten mit Graft Failure und erfolgreichem Engraftment. Zellzahlen eines möglichen späteren Boosts oder die Gabe zusätzlicher DLI wurden nicht berücksichtigt.

Patienten, welche bereits im Vorfeld allogenen transplantiert wurden, erlitten weniger häufig ein Graft Failure. Auch hier sind die Ergebnisse bei einer Odds-Ratio von ∞ vorsichtig zu bewerten. Die Literatur zum Einfluss der Vortherapie ist ebenfalls nicht eindeutig. So wurde sowohl eine geringere Rate an PGF nach intensiver Vortherapie berichtet,⁹⁸ als auch ein vermehrtes Transplantatversagen durch ein therapiebedingt gestörtes Mikroenvironment des Knochenmarks.⁸⁴

Eine CMV-Infektion ist ein bekannter Risikofaktor eines Graft Failures.^{84, 96, 105} Ein positiver Serostatus sowohl des Spenders als auch des Empfängers war in unserer Studie mit einem schlechteren Engraftment verbunden.

Patienten, deren Konditionierung ATG beinhaltete erlitten häufiger ein primäres Transplantatversagen als Patienten mit OKT3 – Serotherapie. Dies kann durch die ATG-Wirkung auf die transplantierten Zellen bedingt werden.^{122, 228} Auf das Graft Failure insgesamt, unter Berücksichtigung eines SGF, war der Einfluss der Serotherapie nicht länger signifikant.

Rekonditionierung

Nach einem Transplantatversagen konnten Patienten, insbesondere solche mit Leukämien ohne Möglichkeit eines autologen Backups, erfolgreich mit einer Rekonditionierung und Infusion eines CD3/CD19 depletierten haploidenten Transplantats behandelt werden. Die Transplantate standen innerhalb kurzer Zeit (Median 44 Tage zwischen Transplantation und erneuter Stammzellgabe) zur Verfügung. Insgesamt war das Rekonditionierungsregime mit einem tolerablen

Toxizitätsprofil verbunden, ein Patient verstarb an einem MAS in Verbindung mit Reaktivierung verschiedener Viren.

Immunrekonstitution

Die Rekonstitution der NK-Zellen verlief schnell. Bereits nach zwei Wochen wurden im Mittel Normwerte (291 CD56+ NK-Zellen/ μ l) erreicht, die auch im weiteren Verlauf stabil zwischen 200 und 300/ μ l lagen. Der Anstieg der NK-Zellen erfolgte früher als nach haploidenter HSCT CD34+ selektionierter Transplantate,^{117,123} wahrscheinlich bedingt durch die Übertragung von NK- und anderen Zellen im Transplantat.¹²⁴

Die Erholung der T- und B- Lymphozyten setzte innerhalb von zwei Monaten nach HSCT ein und erreichte Werte $>100/\mu$ l innerhalb von 60 Tagen. Erwartungsgemäß verlief die Rekonstitution der T-Zellen zögerlicher als nach allogener HSCT eines passenden Spenders bei Erwachsenen²³⁰ oder Kindern.^{115, 231}

Andere Studien mit Verwendung CD3 depletierter Transplantate fanden eine schnellere Erholung der T-Lymphozyten, während die Erholung der anderen Zelllinien mit unseren Ergebnissen vergleichbar war.^{122, 227} Die im Vergleich zu den CD3+CD4+ Zellen höhere Zahl der CD3+CD8+ Lymphozyten im ersten Jahr nach HSCT entspricht der beschriebenen Immunrekonstitution nach allogener Transplantation.^{112, 114, 122}

Eine Serotherapie mit ATG bewirkte 90 Tage nach HSCT eine langsamere Regeneration der CD3+ T-Lymphozyten als nach OKT-Serotherapie. Wie für das Engraftment scheint hierfür der Einfluss von ATG auf die transplantierten Zellen verantwortlich zu sein.^{122, 228}

GvHD

Die CD3-Depletion war ausreichend, um eine GvHD als schwerwiegendste Komplikation der haploidenten HSCT weitgehend zu verhindern. Die kumulative Inzidenz einer klinisch relevanten aGvHD II-IV° lag bei 23,8% nach 150 Tagen (Grad III-IV° 7,1%) und nach diesem Zeitraum traten keine neuen Fälle einer aGvHD II-IV° mehr hinzu. Die Inzidenz lag somit unter der, welche nach allogener HSCT passender Geschwisterspender berichtet wurde (aGvHD II-IV° 35-

50%),^{223, 229} jedoch geringfügig über der nach haploidenter HSCT mit CD34+ Selektion (aGvHD II-IV° 7-19%, aGvHD III-IV° 1,5%).^{76, 110, 190, 232} Die Ergebnisse waren mit denen anderer Studien mit CD3 – Depletion vergleichbar (aGvHD II-IV° 22,2-48%; aGvHD III-IV° 8-13%).^{122, 225, 226, 228}

Während die Zahl der verbleibenden CD3+ Zellen im Transplantat keinen Einfluss auf die Entstehung einer aGvHD hatte, war nach zusätzlicher Stammzell- oder Spenderlymphozytengabe ein vermehrtes Auftreten einer klinisch relevanten aGvHD zu verzeichnen. Eine aGvHD nach Stammzellboost wurde mit einer Häufigkeit von über 30% beschrieben⁹⁶ und kann durch die neuerliche Transfusion immunkompetenter Spenderlymphozyten erklärt werden. Eine ATG-Serotherapie war mit einer geringeren Inzidenz einer akuter GvHD verbunden, wobei die ATG-Wirkung auf die transplantierten Zellen eine Rolle spielen dürfte.^{122,228}

Die kumulative cGvHD-Inzidenz lag nach einem Jahr bei 23,99% (extended cGvHD 16,96%). Danach trat keine neue cGvH-Erkrankung mehr auf. Für die Transplantation passender Geschwisterspender (cGvHD 13 – 46%)¹⁶⁷ und passender unverwandter Spender (cGvHD ~70%)¹⁶⁷ wurden höhere, für haploidente CD34+ selektionierte HSCT (10-15%)^{50, 76, 190} niedrigere Inzidenzen berichtet. Andere Studien zu haploidenter HSCT mit CD3-Depletion zeigten vergleichbare Ergebnisse (cGvHD 11-28%).^{122, 225, 226}

Wie auch für die aGvHD war eine ATG-Serotherapie mit einer niedrigeren Inzidenz einer cGvHD verbunden. Die Gabe zusätzlicher Stammzellpräparate oder DLI blieb ohne statistisch signifikanten Einfluss auf die Entstehung einer cGvHD. Patienten mit soliden Tumoren und ohne Therapieansprechen zum Transplantationszeitpunkt (NR, PD) entwickelten häufiger eine cGvHD. Ob hier weitere Faktoren, wie eine frühzeitigere Beendigung einer Immunsuppression zur Verstärkung eines GvT-Effektes eine Rolle spielen, konnte anhand der vorliegenden Daten nicht geprüft werden.

Eine GvHD war Ursache für 4 von 90 Todesfällen.

Infektionen

Infolge der T-Zell-Depletion stellt die Infektion bzw. Reaktivierung viraler Erreger ein häufiges Phänomen dar. Die kumulative Inzidenz einer systemischen Virusreaktivierung nach 5 Jahren betrug 21% für CMV, 12% für ADV und 11% für EBV. Durch konsequentes Monitoring, eine präemptive Therapie und den Einsatz virusspezifischer T-Zellen konnte bei den meisten Patienten jedoch eine manifeste Erkrankung verhindert werden.

Das Vorliegen manifester Aspergilloseinfektionen oder Virämien bereits vor Beginn der Konditionierung ist Ausdruck einer intensiv vorbehandelten Hochrisikopopulation.

Infektionen stellten die häufigste nicht rezidivbedingte Todesursache dar. Mit sieben infektbedingten Todesfällen lag die Rate fataler Infektionen deutlich unter der für passende Fremdspender beschriebenen,¹²⁶ möglicherweise durch eine intensivere infektiologische Überwachung innerhalb der Studie.

Toxizität

Die Mehrheit der Patienten wurde mit einem RIC-Schema konditioniert. Dieses wurde gut toleriert. Insgesamt wurde für die Studienpatienten keine das übliche Maß einer allogenen Transplantation überschreitende Toxizität beobachtet. Die CD19 – Depletion war suffizient, abgesehen von drei Patienten, eine PTLD zu verhindern. Eine VOD trat bei drei Patienten auf ohne einen Todesfall zu bedingen. In der Langzeitbeobachtung traten zwei sekundäre Neoplasien auf, ein Patient verstarb aufgrund einer Organtoxizität. Rekonditionierungen, zusätzliche Zellgaben und Folgetherapien wurden ebenfalls in einem vertretbaren Rahmen unerwünschter Nebenwirkungen vertragen.

NRM

Die nicht rezidivbedingte Mortalität lag bei 4,8% 6 Monate; 8,7% ein Jahr; 11,2% zwei Jahre und 18,3% fünf Jahre nach HSCT. Hierbei wurden zwei Todesfälle eingerechnet, die in Folge einer erneuten Transplantation auftraten. Die nicht rezidivbedingte Mortalität lag somit unter der beschriebenen für allogene HSCT (TRM an Tag 100: 13%; TRM nach 2 Jahren: 9-26%)^{17, 191} als auch für haplo-

idente HSCT mit CD34+ Selektion (TRM 25-40%).^{21, 49, 128} Andere Studien mit CD3-Depletion fanden eine TRM zwischen 20 und 33%.^{225, 226, 228} Obwohl 78 Patienten im Vorfeld bereits transplantiert wurden, liegt die NRM deutlich unter der für Zweittransplantationen beschriebenen von 30-60%.^{85, 200} Das Auftreten einer aGvHD Grad II-IV oder einer cGvHD war mit einer erhöhten NRM verbunden. Die Wahl des Konditionierungsregimes zeigte keine Auswirkung auf die NRM.

Ein Versterben aufgrund eines Rezidivs steht in „Konkurrenz“ mit dem Versterben aufgrund einer nicht rezidivbedingten Ursache, was die höhere NRM bei Patienten mit nicht maligner Erkrankung im Vergleich zu Patienten mit Malignomen erklären kann. Ohne ein Versterben aufgrund eines Rezidivs kann eine höhere NRM angenommen werden.

OAS und EFS

Das Gesamtüberleben nach 5 Jahren betrug 39,96%.

Rezidive stellten mit 71 Rückfällen innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums das häufigste unerwünschte Ereignis nach HSCT dar, so dass Ereignisfreies und Rezidivfreies Überleben sich weitgehend glichen. Das EFS nach einem halben Jahr betrug 60,9% und sank im weiteren Verlauf auf 34,2% nach 5 Jahren.

Erkrankungsansprechen

Die kumulative Inzidenz von Rezidiven der 132 Patienten mit maligner Grunderkrankung betrug 58,1% nach einem und 66,8% nach fünf Jahren. Zellzahlen im Transplantat, GvHD-Rate und die Immunrekonstitution unterschieden sich nicht zwischen Patienten mit oder ohne Rezidiv. Einziger statistisch signifikanter Einflussfaktor war der Remissionsstatus zum Transplantationszeitpunkt. Patienten mit maligner Erkrankung in CR (Leukämien) bzw. CR oder PR (solide Tumore) erlitten weniger Rezidive als Patienten ohne Therapieansprechen (NR) bzw. progredienter Erkrankung (PD). Bei soliden Tumoren ergaben sich signifikant weniger Rückfälle bei Patienten in erster CR oder PR verglichen mit Patienten nach vorausgegangenem Rezidiv. Andere Studien und Fallserien mit CD3 – depletierter HSCT fanden eine geringere Rezidivrate von ca. 33%, wobei sich

hier 80%-100% der Patienten mit maligner Erkrankung zum Transplantationszeitpunkt in kompletter Remission befanden.^{122, 226, 227} Die Ergebnisse stimmen mit Berichten überein, die einen Einfluss von Remissionsstatus oder früheren Rezidiven auf das erkrankungsfreie Überleben beschreiben.^{233, 234}

In unserer Patientenkohorte mit hohem Anteil von Patienten mit Remissionsstatus NR, PD bzw. Patienten nach vorherigem Rezidiv erscheint der GvL/GvT – Effekt unzureichend, weitere Rezidive effektiv zu verhindern. Dagegen könnten Patienten zu einem früheren Erkrankungszeitpunkt oder -stadium besser von der beschriebenen Transplantationsmethode profitieren.

Die Prognose der Patienten mit Rezidiv oder Progress nach Studientransplantation war schlecht. Mehr als 90% dieser Patienten verstarben an dem Rezidiv bzw. Progress ihrer Grunderkrankung.

Folgetherapie

Die haploidente HSCT mit Etablierung eines neuen Immunsystems bot eine Basis für nachfolgende zellulären Therapien (DLI, NK-Zellen), der Gabe spezifischer Antikörper zur Verstärkung einer ADCC^{124, 235} oder Immunmodulatoren (IL2). So wurden 19 Patienten im Anschluss an die Transplantation in Studien zu Folgetherapien eingeschlossen. 18 Patienten mit Neuroblastom nahmen an einer Studie mit dem CH14.18 Antikörper teil,²¹² ein Patient an einer Studie mit Blinatumomab. Die Evaluation dieser Therapieansätze ist nicht Teil dieser Auswertung. Die Patienten schieden mit Eintritt in die Folgestudie aus der vorliegenden Untersuchung aus und wurden ab dem Zeitpunkt zensiert.

Limitierung und Anmerkungen

Es finden sich diverse Faktoren, welche die Aussagekraft der Studie limitieren oder zumindest in der Bewertung der Ergebnisse beachtet werden sollten. Diese Phase I/II Studie erfolgte nicht randomisiert kontrolliert und ohne Vergleichsgruppe. Zum Vergleich wurden historische Daten und andere Studien herangezogen, welche unter Umständen andere Patienten, beispielsweise Erwachsene, einschlossen.

Das Patientenkollektiv war äußerst heterogen mit einer Vielzahl potenzieller Einflussfaktoren. Die vielen sich hieraus ergebenden Subgruppen mit jeweils geringer Patientenzahl schränkten die Auswertbarkeit ein. Unsere Studienpopulation schloss viele Hochrisikopatienten ein, deren Prognose bereits zum Studieneintritt als äußerst ungünstig zu bewerten war. Des Weiteren stellten Patienten mit soliden Tumoren, insbesondere Neuroblastomen, einen großen Anteil der Studienteilnehmer dar, welche außerhalb der hier vorliegenden Studie nicht regelhaft allogent transplantiert werden.

Für die Auswertung lagen nicht für alle Patienten vollständige Daten vor. Im langfristigen Verlauf wurden die Patienten auch von heimatnahen Kliniken oder Hausärzten betreut und es ist nicht auszuschließen, dass hier erhobene Befunde nicht an die Studienleitung weitergeleitet wurden.

Es ließen sich für Zielparameter wie das Engraftment Einflussfaktoren mit statistisch signifikanten p-Werten darstellen. Bei genauer Betrachtung z.B. der Odds Ratio sind einige dieser Ergebnisse jedoch kritisch zu hinterfragen. Die Studie war nicht zum Nachweis solcher Größen konzipiert.

Patienten nach Rekonditionierung wurden für die weitere Auswertung in der Studie belassen. Es müssen zusätzliche Einflussfaktoren und Nebenwirkungen durch das Rekonditionierungsregime und die Aplasiephase bis zur Rekonditionierung in Betracht gezogen werden.

Die HLA-Typisierung wurde hinsichtlich der Anzahl der typisierten Allele und dem Auflösungsvermögen nicht einheitlich durchgeführt. Hierdurch könnte die Anzahl der Nichtübereinstimmungen bei Patienten, die nicht in 10 Allelen HA typisiert wurden, höher liegen. Es wurde keine Unterscheidung getroffen, in welchem Allel eine Nichtübereinstimmung auftrat und in welcher Richtung (Graft versus Host oder umgekehrt).

Mögliche zusätzliche Variablen wie die Art, Dosierung und Dauer einer Immunsuppression, die Zahl später verabreichter Zellen bei DLI-Gabe oder Stammzellboost konnten aufgrund ihrer Vielzahl und individuellen Unterschiede nicht spezifischer in der Betrachtung berücksichtigt werden.

In die Auswertung des OAS und der NRM flossen alle Patienten ein. Mögliche Effekte nachfolgender Therapien, wie Antikörpergabe oder eine erneute Transplantation, ließen sich hier nicht ausschließen.

Das Auftreten einzelner Ereignisse stand in möglicher Konkurrenz zueinander (competing risk).²³⁶ Für einen an einer Infektion verstorbenen Patienten ließ sich nicht sagen, ob nicht zu einem späteren Zeitpunkt ein Rezidiv der Grunderkrankung hätte auftreten können. Ein Ausscheiden aus der Studie zugunsten einer nachfolgenden Studie konnte als konkurrierendes Ereignis gewertet werden, stellte aber kein zufälliges Risiko dar. Auch zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit vorherigen Studien wurde zur Auswertung dieser Studie auf die Kumulative Inzidenz anhand der Kaplan-Meier Methode, trotz ihrer Einschränkungen bei konkurrierenden Risiken, zurückgegriffen.

5. Zusammenfassung

Die hier vorgestellte Studie stellt die größte Studie zu haploidenter HSCT mit CD3/CD19 Depletion sowohl bei Kindern insgesamt, als auch bei kindlichen soliden Tumoren dar. Es konnte die breite klinische Anwendbarkeit mit den Vorteilen der schnellen Spenderverfügbarkeit gezeigt werden. Hinsichtlich der definierten primären Endpunkte war die Transplantation mit CD3/CD19 depletierten Transplantaten anderen allogenen Transplantationen passener Spender nicht unterlegen. Trotz RIC-Konditionierung und T-Zell-Depletion ließen sich zufriedenstellende Engraftmentraten erzielen. Ein schnell verfügbares Reconditionierungsregime bot eine Therapieoption nach Graft Failure. Unter Betrachtung der sekundären Endpunkte ergab sich ein akzeptables Nebenwirkungsprofil. GvHD, therapieassoziierte Toxizität und TRM überstiegen nicht das Maß allogener Transplantationen passender Spender. Die Immunrestitution verlief verzögert, durch intensives Monitoring und konsequente präemptive Therapie ließen sich infektiologische Komplikationen jedoch in vertretbarem Rahmen halten. Rezidive konnten allerdings weiterhin nur in nicht zufriedenstellendem Maß mit dem GvL/GvT-Effekt allein verhindert werden, wobei die Hochrisikokonstellation der Studienpatienten berücksichtigt werden muss. Kinder in einem früheren Erkrankungsstadium ohne rechtzeitig verfügbaren passenden Spender

könnten bedeutender von dieser Transplantationsmethode profitieren. Sie ist durch ein mit allogener MUD-Transplantation vergleichbares Maß an Nebenwirkungen vertretbar. Die untersuchte Transplantationsmethode bietet zudem die Grundlage für nachfolgende Immuntherapien, um den GvL/GvT zu verstärken.

Dem Prinzip der Negativdepletion der GvHD verursachenden Zellen folgend, sollen in neu initiierten Studien diese Zellen noch gezielter depletiert werden. In diesen Studien werden gezielt T-Zellen mit α/β -T-Zell-Rezeptor oder CD45RA+ T-Zellen negativ depletiert.^{238, 239} Andere für einen möglichen GvL/GvT-Effekt und die Infektabwehr verantwortlichen Immunzellen werden im Transplantat belassen.

6. Literaturverzeichnis

1. Thomas, E.D.: Nobel Lecture: Bone Marrow Transplantation – Past, Present and Future. December 8, 1990
2. Osgood, E.E.; et.al.: Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; case report. *Ann Intern Med.* 1939;13(2): 357-367
3. Gale, R.P.; Hoelzer, D.: The Age of the atomic Hematologists/Oncologists. *The ASCO Post*, July 10, 2016
4. Gale, R.P.: Lessons on haematopoietic stem cell transplantation. ESH-EBMT 20th training course on haemopoietic stem cell transplantation. Budapest 2016.
5. Thomas, E.D.; et al.: Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med.* 1957 Sep 12; 257(11):491-6
6. Henig, I.; Zuckerman, T.: Hematopoietic stem cell transplantation – 50 years of evolution and future perspectives. *Rambam Maimonides Med J.* 2014 Oct 29; 5(4)
7. Thomas, E.D.; et al.: Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest.* 1959 Oct; 38: 1709-16
8. Thomas, E.D.; et al.: Allogeneic marrow grafting for hematologic malignancy using HL-A matched donor-recipient sibling pairs. *Blood.* 1971 Sept; 38(3): 267-87
9. Thomas, E.D.: A history of haemopoietic cell transplantation. *Br J Haematol.* 1999 May; 105(2): 330-9
10. Rennie, D.: "Bubbe Boy". *JAMA* 1985 Jan 4; 253(1): 78-80
11. The Story of David. Immune Deficiency Foundation. <https://primaryimmune.org/living-pi-explaining-pi-others/story-david> Zugriff 02.05.2018
12. O'Reilly, R.J.; et al.: Reconstitution in severe combined immunodeficiency by transplantation of marrow from an unrelated donor. *N Engl J Med.* 1977 Dec 15; 297(24): 1311-8
13. Lang, P.; et al.: A comparison between three graft manipulation methods for haploidentical stem cell transplantation in pediatric patients: preliminary results of a pilot study. *Klin Padiatr.* 2005 Nov-Dec; 217(6): 334-8
14. Handgretinger, R.: Negative depletion of CD3(+) and TcR $\alpha\beta$ (+) T cells. *Curr Opin Hematol.* 2012 Nov; 19(6): 434-9
15. Passweg, J.R.; et al.: Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2012 with special consideration of pediatric transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2014 Jun; 49(6): 744-50
16. Passweg, J.R.; et al.: Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant.* 2016 Jun; 51(6): 786-92
17. Miano, M.; et al.: Haematopoietic stem cell transplantation trends in children over the last three decades: a survey by the paediatric diseases working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007 Jan; 39(2): 89-99
18. Bone Marrow Donors Worldwide Database. www.bmdw.org (Stand 10.09.2016)
19. Handgretinger, R.; et al.: Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parenteral donors in children. *Bone Marrow Transplant.* 2001 Apr; 27(8): 777-83
20. Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *The EBMT Handbook.* 5th Edition, 2008 Revised Edition. Chapter 3.1
21. Bader, P.; et al.: Rapid immune recovery and low TRM in haploidentical stem cell transplantation in children and adolescence using CD3/CD19-depleted stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011 Sep; 24(3): 331-7

22. Beatty, P.G.; et al.: Impact of racial genetic polymorphism on the probability of finding an HLA-matched donor. *Transplantation*. 1995 Oct 27; 60(8): 778-83
23. Tiercy, J.M.; et al.: Bone marrow transplantation with unrelated donors: what is the probability of identifying an HLA-A/B/Cw/DRB1/B3/B5/DQB1-matched donor? *Bone Marrow Transplant*. 2000 Aug; 26(4): 437-41
24. Aversa, F.; et al.: Haploidentical stem cell transplantation in leukemia. *Blood Rev*. 2001 Sep; 15(3): 111-9
25. Petersdorf, E.W.; et al.: Limits of HLA mismatching in unrelated haematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2004 Nov 1; 104(9): 2976-80
26. Anasetti, C.; Hansen, J.A.: Effect of HLA incompatibility in marrow transplantation from unrelated and HLA-mismatched related donors. *Transfus Sci*. 1994 Sep; 15(3): 221-30
27. Storb, R.; et al.: Allogeneic marrow grafting for treatment of aplastic anemia. *Blood*. 1974 Feb; 43(2): 157-80
28. Bach, F.H.; et al.: Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet*. 1968 Dec 28; 2(7583): 1364-6
29. Gatti, R.A. ; et al.: Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet*. 1968 Dec 28; 2(7583): 1366-9
30. Müller, C.R.; et al.: Deutscher Konsensus 2013 zur immungenetischen Spenderauswahl für die allogene Stammzelltransplantation. *Transfusionsmedizin* 2014; 4(4): 190-196
31. Van Rood, J.J.; Eernisse, J.G.: The detection of transplantation antigens in leukocytes. *Semin Hematol*. 1968 Apr; 5(2):187-214
32. Dausset, J.: Nobel lecture: The major histocompatibility complex in man – Past, Present, and future concepts. December 8, 1980
33. Dausset, J.; et al.: Genetic and biological aspects of the HL-A system of human histocompatibility. *Blood*. 1970 May; 35(5): 591-612
34. Klein, J.; Sato, A.: The HLA System. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000 Sep 7; 343(10): 702-9
35. Robinson, J.; et al.: The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan; 43(Database issue): D423-43.
<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html> Zugriff 14.09.2016
36. Cullen, M.; et al.: Characterization of recombination in the HLA Class II region. *Am J Hum Genet*. 1997 Feb; 60(2): 397-407
37. Martin, M.; et al.: Recombination rates across the HLA complex: use of microsatellites as a rapid screen for recombinant chromosomes. *Hum Mol Genet*. 1995 Mar; 4(3): 423-8
38. Ottinger, H.D.; et al.: Positive serum crossmatch as predictor for graft failure in HLA-mismatched allogeneic blood stem cell transplantation. *Transplantation*. 2002 Apr 27; 73(8): 1280-5
39. Scott, I.; et al.: Molecular typing shows a high level of HLA Class I incompatibility in serologically well matched donor/patient pairs: implications for unrelated bone marrow donor selection. *Blood*. 1998 Dec 15; 92(12): 4864-71
40. Marsh, S.G.E.; et al.: Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*. 2010 Apr; 75(4): 291-455
41. Anasetti, C.; et al.: Effect of HLA incompatibility on graft-versus-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma. *Human Immunol*. 1990 Oct; 29(2): 79-91
42. Pidala, J.; et al.: Nonpermissive HLA-DPB1 mismatch increases mortality after myeloablative unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2014 Oct 16; 124(16): 2596-606

43. Carreras, E.: Principles of HLA typing for the clinician and criteria of donor choice. 20th Training Course on Haemopoietic Stem Cell Transplantation, 2016, Budapest, Hungary
44. Petersdorf, E.W.: Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: histocompatibility. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007 Jun; 20(2): 155-70
45. Ottinger, H.D.; et al.: Hematopoietic stem cell transplantation: contrasting the outcome of transplantations from HLA-identical siblings, partially HLA-mismatched related donors, and HLA-matched unrelated donors. *Blood.* 2003 Aug 1; 102(3): 1131-7
46. Fernandez-Viña, M.A.; et al.: Identification of a permissible HLA mismatch in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2014 Feb 20; 123(8): 1270-8
47. Fleischhauer, K.; et al.: Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haematopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *Lancet Oncol.* 2012 Apr; 13(4): 366-74
48. Tiercy, J.M.: How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Haematologica.* 2016 Jun; 101(6): 680-7
49. Handgretinger, R.; et al.: Feasibility and outcome of reduced-intensity conditioning in haploidentical transplantation. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Jun; 1106: 279–89
50. Handgretinger, R.; Lang, P.: The history and future prospective of haplo-identical stem cell transplantation. *Cytotherapy.* 2008; 10(5): 443-51
51. Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *The EBMT Handbook.* 5th Edition, 2008 Revised Edition. Chapter 3.2
52. Passweg, J.R.; et al.: Use of natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2005 Apr; 35(7): 637-43
53. Ruggeri, L.; et al.: Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 1999 Jul 1; 94(1): 333-9
54. Oevermann, L.; et al.: KIR B haplotype donors confer a reduced risk for relapse after haploidentical transplantation in children with ALL. *Blood.* 2014 Oct 23; 124(17): 2744-7
55. Cooley, S.; et al.: Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood.* 2009 Jan 15; 113(3): 726-32
56. Giebel, S.; et al.: Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood.* 2003 Aug 1; 102(3): 814-9
57. Ruggeri, L.; et al.: Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002 Mar 15; 295(5562): 2097-100
58. Sun, J.Y.; et al.: Killer Ig-like receptor (KIR) compatibility plays a role in the prevalence of acute GVHD in unrelated hematopoietic cell transplants for AML. *Bone Marrow Transplant.* 2005 Sep; 36(6): 525-30
59. Cooley, S.; et al.: Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood.* 2010 Oct 7; 116(14): 2411-9
60. Oevermann, L.; Handgretinger, R.: New strategies for haploidentical transplantation. *Pediatr Res.* 2012 Apr; 71(4 Pt 2): 418-26
61. Leung, W.; et al.: Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol.* 2004 Jan 1; 172(1): 644-50
62. Bornhäuser, M.; et al.: Role of KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors. *Blood.* 2004 Apr 1; 103(7): 2860-1
63. Malmberg, K.J.; et al.: KIR-ligand mismatch in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Mol Immunol.* 2005 Feb; 42(4): 531-4
64. Schaffer, M.; et al.: Increased infection-related mortality in KIR-ligand-mismatched unrelated allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation.* 2004 Oct 15; 78(7): 1081-5

65. Yoshihara, S.; et al.: The role of HLA antibodies in allogeneic SCT: is the 'type-and-screen' strategy necessary not only for blood type but also for HLA? *Bone Marrow Transplant.* 2012 Dec; 47(12): 1499-506
66. Goulmy, E.; et al.: Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1996 Feb 1; 334(5): 281-5
67. Warren, E.H.; et al.: Effect of MHC and non-MHC donor/recipient genetic disparity on the outcome of allogeneic HCT. *Blood.* 2012 Oct 4; 120(14): 2796-806
68. Loren, A.W.; et al.: Impact of donor and recipient sex and parity on outcomes of HLA-identical sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006 Jul; 12(7): 758-69
69. Kollman, C.; et al.: Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood.* 2001 Oct 1; 98(7): 2043-51
70. Van Rood, J.J.; et al.: Effect of tolerance to noninherited maternal antigens on the occurrence of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation from a parent or an HLA-haploidentical sibling. *Blood.* 2002 Mar 1; 99(5): 1572-7
71. Ichinohe, T.; et al.: Feasibility of HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation between noninherited maternal antigen (NIMA)-mismatched family members linked with long-term fetomaternal microchimerism. *Blood.* 2004 Dec 1; 104(12): 3821-8
72. Ljungman, P.; et al.: Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood.* 2003 Dec 15; 102(13): 4255-60
73. Kimura, F.; et al.: Impact of AB0-blood group incompatibility on the outcome of recipients of bone marrow transplants from unrelated donors in the Japan Marrow Donor Program. *Haematologica* 2008 Nov; 93(11): 1686-93
74. *Haematopoietic Stem Cell Transplantation. The EBMT Handbook. 5th Edition, 2008 Revised Edition. Chapter 3.3*
75. Schumm, M.; et al.: Determination of residual T- and B-cell content after immunomagnetic depletion: proposal for flow cytometric analysis and results from 103 separations. *Cytotherapy.* 2006; 8(5): 465-72
76. Lang, P.; et al.: Bearbeitung und Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. Ergebnisse und klinischer Nutzen der Stammzellaufreinigung von alternativen Spendern für die allogene Transplantation im Kindesalter. *Monatsschrift Kinderheilkunde.* 2005 Oct; 153(10): 954-964
77. Gordon, P.R.; et al.: A large-scale method for T cell depletion: towards graft engineering of mobilized peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 2002 Jul; 30(2): 69-74
78. *Haematopoietic Stem Cell Transplantation. The EBMT Handbook. 5th Edition, 2008 Revised Edition. Chapter 6*
79. Bacigalupo, A.; et al.: Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 Dec; 15(12): 1628-33
80. Slavin, S.; et al.: 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.* 1998 Feb 1; 91(3): 756-63
81. Satwani, P.; et al.: Reduced intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation in childhood malignant and nonmalignant diseases. *Bone Marrow Transplant.* 2008 Jan; 41(2): 173-82

82. Gyurkocza, B.; Sandmaier, B.M.: Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood*. 2014 Jul 17; 124(3): 344-53
83. Petrus, M.J.; et al.: An immunoablative regimen of fludarabine and cyclophosphamide prevents fully MHC-mismatched murine marrow graft rejection independent of GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2000; 6(2A): 182-9
84. Locatelli, F.; et al.: Current and future approaches to treat graft failure after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Pharmacother*. 2014 Jan; 15(1): 23-36
85. Gyurkocza, B.; et al.: Salvage allogeneic hematopoietic cell transplantation with fludarabine and low-dose total body irradiation after rejection of first allografts. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Oct; 15(10): 1314-22
86. Stucki, A.; et al.: Decreased rejection and improved survival of first and second marrow transplants for severe aplastic anemia (a 26-year retrospective analysis). *Blood*. 1998 Oct 15; 92(8): 2742-9
87. Grandage, V.L.; et al.: Second allogeneic bone marrow transplants from unrelated donors for graft failure following initial unrelated donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1998 Apr; 27(7): 687-90
88. Chewing, J.H.; et al.: Fludarabine-based conditioning secures engraftment of second hematopoietic stem cell allografts (HSCT) in the treatment of initial graft failure. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Nov; 13(11): 1313-23
89. Heinzelmann, F.; et al.: Immunosuppressive total lymphoid irradiation-based reconditioning regimens enable engraftment after graft rejection or graft failure in patients treated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008 Feb 1; 70(2): 523-8
90. Schlegel P.G.; et al.: OKT-3-based reconditioning regimen for early graft failure in HLA-non-identical stem cell transplants. *Br J Haematol*. 2000 Nov; 111(2): 668-73
91. Gale, R.P.; Reisner, Y.: Graft rejection and graft-versus-host disease: mirror images. *Lancet*. 1986 Jun 28; 1(8496) 1468-70
92. Quinones, R.R.: Hematopoietic engraftment and graft failure after bone marrow transplantation. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1993 Feb; 15(1): 3-17
93. Chang, Y.L.; et al.: Platelet engraftment in patients with hematologic malignancies following unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation: effects of CD34⁺ cell dose and disease status. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 May; 15(5): 632-8
94. Ruutu, T.: Engraftment. Presentation EBMT 2011
95. Remberger, M.; et al.: Major ABO blood group mismatch increases the risk for graft failure after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Jun; 13(6): 675-82
96. Remberger, M.; et al.: Booster marrow or blood cells for graft failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1998 Jul; 22(1): 73-8
97. Dubovsky, J.; et al.: Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. *Leukemia*. 1999 Dec; 13(12): 2059-69
98. Olsson, R.F.; et al.: Primary graft failure after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies. *Leukemia*. 2015 Aug; 29(8): 1754-62
99. Olsson, R.; et al.: Graft failure in the modern era of allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2013 Apr; 48(4): 537-43
100. Eapen, M.; et al.: Late graft rejection and second infusion of bone marrow in children with aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 1999 Jan; 104(1): 186-8

101. Ehlert, K.; et al.: Late graft failure in FA – case report and review of the literature. *Pediatr Transplant* 2012 Dec; 16(8): E360-3
102. Anasetti, C.; et al.: Effect of HLA incompatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N Engl J Med.* 1989; Jan 26; 320(4): 197-204
103. Lang, P.; et al.: Retransplantation with stem cells from mismatched related donors after graft rejection in pediatric patients. *Blood Cells Mol Dis.* 2008 Jan-Feb; 40(1): 33-9
104. Storb, R.; Deeg, H.J.: Failure of allogeneic canine marrow grafts after total-body irradiation. Allogeneic “resistance” versus transfusion-induced sensitization. *Transplantation.* 1986 Dec; 42(6): 571-80
105. Mattsson, J.; et al.: Graft failure after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008 Jan; 14(1 Suppl 1):165-70
106. Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *The EBMT Handbook.* 5th Edition, 2008 Revised Edition. Chapter 13
107. Le Blanc, K.; et al.: Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 2007 Aug; 21(8): 1733-8
108. Lee, H.S.; et al.: Predictive factors for rapid neutrophil and platelet engraftment after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with acute leukemia. *Ann Hematol.* 2013 Dec; 92(12): 1685-93
109. Soiffer, R.J.; et al.: Total lymphoid irradiation to prevent graft rejection in recipients of HLA non-identical T cell-depleted allogeneic marrow. *Bone Marrow Transplant.* 1991 Jan; 7(1): 23-33
110. Lang, P.; et al.: Transplantation of CD34+ enriched allografts in children with nonmalignant diseases: does graft manipulation necessarily result in high incidence of graft failure? *Bone Marrow Transplant.* 2004 Jan; 33(1): 125-6; author reply 127
111. Park, J.A.; et al.: Successful rescue of early graft failure in pediatric patients using T-cell-depleted haploidentical hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2014 Feb; 49(2): 270-5
112. Lenarsky, C.: Mechanisms in immune recovery after bone marrow transplantation. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1993 Feb; 15(1): 49-55
113. de Lalla, C.; et al.: Invariant NKT cell reconstitution in pediatric leukemia patients given HLA-haploidentical stem cell transplantation defines distinct CD4+ and CD4- subset dynamics and correlates with remission state. *J Immunol.* 2011 Apr 1; 186(7): 4490-9
114. Chang, Y.J.; et al.: Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Apr; 20(4): 440-9
115. Bae, K.W.; et al.: Factors influencing lymphocyte reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children. *Korean J Hematol.* 2012 Mar; 47(1): 44-52
116. Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *The EBMT Handbook.* 5th Edition, 2008 Revised Edition. Chapter 15
117. Oevermann, L.; et al.: Immune reconstitution and strategies for rebuilding the immune system after haploidentical stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Aug; 1266: 161-70
118. Oshrine, B.R.; et al.: Immunologic recovery in children after alternative donor allogeneic transplantation for hematologic malignancies: comparison of recipients of partially T cell-depleted peripheral blood stem cells and umbilical cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013 Nov; 19(11): 1581-9
119. Chen, X.; et al.: Rapid immune reconstitution after a reduced-intensity conditioning regimen and a CD3-depleted haploidentical stem cell graft for paediatric refractory haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2006 Nov; 135 (4): 524-32

120. de Vries, E.; et al.: Reconstitution of lymphocyte subpopulations after paediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Feb; 25(3): 267-75
121. Small, T.N.; et al.: Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood.* 1999 Jan 15; 93(2): 467-80
122. Pérez-Martinez, A.; et al.: Early evaluation of immune reconstitution following allogeneic CD3/CD19-depleted grafts from alternative donors in childhood acute leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2012 Nov; 47(11): 1419-27
123. Eyrich, M.; et al.: A prospective analysis of the pattern of immune reconstitution in a paediatric cohort following transplantation of positively selected human leucocyte antigen-disparate haematopoietic stem cells from parental donors. *Br J Haematol.* 2001 Aug; 114(2): 422-32
124. Pfeiffer, M.M.; et al.: Reconstitution of natural killer cell receptors influences natural killer activity and relapse rate after haploidentical transplantation of T- and B-cell depleted grafts in children. *Haematologica.* 2010 Aug; 95(8): 1381-8
125. Federmann, B.; et al.: Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic cell transplantation: impact of reduced intensity conditioning and CD3/CD19 depleted grafts. *Leukemia.* 2011 Jan; 25(1): 121-9
126. Aversa, F.; et al.: Immunity to Infections after Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2016 Oct 25; 8(1): e2016057
127. Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *The EBMT Handbook.* 5th Edition, 2008 Revised Edition. Chapter 10
128. Aversa, F.; et al.: Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol.* 2005 May 20; 23(15): 3447-54
129. Kedia, S.; et al.: Infectious Complications of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Stem Cell Res Ther.* 2013 Jun 1; S3-002
130. Srinivasan, A.; et al.: Timeline, epidemiology, and risk factors for bacterial, fungal, and viral infections in children and adolescents after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013 Jan; 19(1): 94-101
131. Meijer, E.; et al.: Increased incidence of EBV-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic stem cell transplantation from matched unrelated donors due to a change of T cell depletion technique. *Bone Marrow Transplant.* 2002 Feb; 29(4): 335-9
132. De Pauw, B.; et al.: Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008 Jun 15; 46(12): 1813-21
133. Girmenia, C.; et al.: Incidence and outcome of invasive fungal diseases after allogeneic stem cell transplantation: a prospective study of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Jun; 20(6): 872-80
134. Offner, F.; et al.: Impact of previous aspergillosis on the outcome of bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis.* 1998 May; 26(5): 1098-103
135. Ljungman, P.; et al.: Management of CMV infections: recommendations from the infectious diseases working party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant.* 2004 Jun; 33(11): 1075-81
136. Boeckh, M.: Complications, diagnosis, management, and prevention of CMV infections: current and future. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011; 2011: 305-9
137. Wy Ip, W.; et al.: Management of adenovirus in children after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Adv Hematol.* 2013; 2013: 176418

138. Matthes-Martin, S.; et al.: European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transpl Infect Dis.* 2012 Dec; 14(6): 555-63
139. Rasche, L.; et al.: EBV-induced post transplant lymphoproliferative disorders: a persisting challenge in allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2014 Feb; 49(2): 163-7
140. Curtis, R.E.; et al.: Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood.* 1999 Oct 1; 94(7): 2208-16
141. Adès, L.; et al.: Second malignancies after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: new insight and current problems. *Blood Rev.* 2002 Jun; 16(2): 135-46
142. Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *The EBMT Handbook.* 5th Edition, 2008 Revised Edition. Chapter 12
143. Xu, L.P.; et al.: Epstein-Barr Virus-Related Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorder after Unmanipulated Human Leukocyte Antigen Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Incidence, Risk Factors, Treatment, and Clinical Outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Dec; 21(12): 2185-2191
144. Tomblyn, M.; et al.: Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 Oct; 15(10): 1143-238
145. Maecker-Kolhoff, B.; Klein, C.: Das pädiatrische PTLDRegister (Ped-PTLD-Register). *Nephrologie* 2009 (4): 339-344
146. Kwon, H.J.; et al.: Treatment of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients with cidofovir: a single-center experience. *Transpl Infect Dis.* 2013 Dec; 15(6): 569-74
147. Perruccio, K.; et al.: Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood.* 2005 Dec 15; 106(13): 4397-406
148. Feuchtinger, T.; et al.: Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood.* 2010 Nov 18; 116(20): 4360-7
149. Feuchtinger, T.; et al.: Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2006 Jul; 134(1): 64-76
150. Leen, A.M.; et al.: Multicenter study of banked third-party virus-specific T cells to treat severe viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2013 Jun 27; 121(26): 5113-23
151. Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *The EBMT Handbook.* 5th Edition, 2008 Revised Edition. Chapter 14
152. Fuji, S.; et al.: Adoptive immunotherapy with virus-specific T cells. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011 Sep; 24(3): 413-9
153. Barnes, D.W.; et al.: Treatment of murine leukaemia with x rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J.* 1956 Sep 15; 2(4993): 626-7
154. Van Bekkum, D.W.; et al.: The pathogenesis of the secondary disease after foreign bone marrow transplantation in x-irradiated mice. *J Natl Cancer Inst.* 1959 Jul; 23(1): 75-89.
155. Truitt, R.L.: The Mortimer M. Bortin Lecture: to destroy by the reaction of immunity: the search for separation of graft-versus-leukemia and graft-versus-host. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004 Aug; 10(8): 505-23
156. Filipovich, A.H.; et al.: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005 Dec; 11(12): 945-56

157. Ferrara, J.L.; et al.: Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009 May 2; 373(9674): 1550-61
158. Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *The EBMT Handbook*. 5th Edition, 2008 Revised Edition. Chapter 11
159. Yum, S.K.; et al.: Evaluation of risk for graft-versus-host disease in children who receive less than the full doses of mini-dose methotrexate for graft-versus-host disease prophylaxis in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Korean J Pediatr*. 2013 Nov; 56(11): 490-5
160. Glucksberg, H.; et al.: Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974 Oct; 18(4): 295-304
161. Prentice, H.G.; et al.: Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients. *Lancet*. 1984 Mar 3; 1(8375): 472-6
162. Di Ianni, M.; et al.: Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*. 2011 Apr 7; 117(14): 3921-8
163. Bacigalupo, A.: Management of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2007 Apr; 137(2): 87-98
164. Negrin, R.S.: Role of regulatory T cell populations in controlling graft vs host disease. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011 Sep; 24(3): 453-7
165. Baird, K.; et al.: Chronic graft-versus-host disease (GVHD) in children. *Pediatr Clin North Am*. 2010 Feb; 57(1): 297-322
166. Flowers, M.E.; Martin, P.J.: How we treat chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2015 Jan 22; 125(4): 606-15
167. Vogelsang, G.B.: How I treat chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2001 Mar 1; 97(5): 1196-201
168. Peters, C.; et al.: Statement of current majority practices in graft-versus-host disease prophylaxis and treatment in children. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Aug; 26(4): 405-11
169. Svennilson, J.; et al.: Risk factors for moderate-to-severe acute graft-vs.-host disease after allogeneic stem cell transplantation in children. *Pediatr Transplant*. 2003 Apr; 7(2): 130-6
170. Deeg, H.J.: How I treat refractory acute GVHD. *Blood*. 2007 May 15; 109(10): 4119-26
171. Rowlings, P.A.; et al.: IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br J Haematol*. 1997 Jun; 97(4): 855-64
172. Przepiorka, D.; et al.: 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant*. 1995 Jun; 15(6): 825-8
173. Wolff, D.; et al.: Current practice in diagnosis and treatment of acute graft-versus-host disease: results from a survey among German-Austrian-Swiss hematopoietic stem cell transplant centers. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 May; 19(5): 767-76
174. Little, M.T.; Storb, R.: History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Cancer*. 2002 Mar, 2(3): 231-8
175. Aversa, F.; et al.: Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med*. 1998 Oct 22; 339(17): 1186-93.
176. Carpenter, P.A.; Macmillan, M.L.: Management of acute graft-versus-host disease in children. *Pediatr Clin North Am*. 2010 Feb; 57(1): 273-95
177. Martin, P.J.; et al.: First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Aug; 18(8): 1150-63

178. Shulman, H.M.; et al.: Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med.* 1980 Aug; 69(2): 204-17
179. Carlens, S.; et al.: Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single centre analysis. *Bone Marrow Transplant.* 1998 Oct; 22(8): 755-61.
180. Dignan, F.L.; et al.; Haemato-oncology Task Force of British Committee for Standards in Haematology; British Society for Blood and Marrow Transplantation: Diagnosis and management of chronic graft-versus-host disease. *Br J Haematol.* 2012 Jul; 158(1): 46-61
181. Cancer Therapy Evaluation Program 1 Revised March 23, 1998 Common Toxicity Criteria, Version 2.0 DCTD, NCI, NIH, DHHS March 1998
182. Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *The EBMT Handbook.* 5th Edition, 2008 Revised Edition. Chapter 9
183. Carreras, E.: Veno-occlusive disease of the liver after hemopoietic cell transplantation. *Eur J Haematol.* 2000 May; 64(5): 281-91
184. Mohty, M.; et al.: Sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive disease: current situation and perspectives – a position statement from the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.* 2015 Jun; 50(6): 781-9
185. Williams, K.M.: How I treat bronchiolitis obliterans syndrome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2017 Jan 26; 129(4): 448-455
186. Afessa, B.; et al.: Bronchiolitis obliterans and other late onset non-infectious pulmonary complications in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2001 Sep; 28(5): 425-34
187. Curtis, R.E.; et al.: Solid cancers after bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1997 Mar 27; 336(13): 897-904
188. Labopin, M.; et al: Definitions and evaluation of endpoints following stem cells transplantation – Recommendation from the European group for Blood and Marrow transplantation (EBMT). CLINT, Work Package 5
189. Lee, S.J.; et al.: Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood.* 2002 Jul 15; 100(2): 406-14
190. Lang, P.; et al.: Long-term outcome after haploidentical stem cell transplantation in children. *Blood Cells Mol Dis.* 2004 Nov-Dec; 33(3): 281-7
191. Tanaka, Y.; et al.: Analysis of non-relapse mortality and causes of death over 15 years following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2016 Apr; 51(4): 553-9
192. Mathé, G.; et al.: Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res.* 1965 Oct; 25(9): 1525-31
193. Blaise, D.; et al.: Reduced-intensity preparative regimen and allogeneic stem cell transplantation for advanced solid tumors. *Blood.* 2004 Jan 15; 103(2): 435-41
194. Ringdén, O.; et al.: The allogeneic graft-versus-cancer effect. *Br J Haematol.* 2009 Dec; 147(5): 614-33
195. Warren, E.H.; Deeg, H.J.: Dissecting graft-versus-leukemia from graft-versus-host-disease using novel strategies. *Tissue Antigens.* 2013 Apr; 81(4): 183-93
196. Bonifant, C.L.; et al.: Advances in immunotherapy for pediatric acute myeloid leukemia. *Expert Opin Biol Ther.* 2018 Jan; 18(1): 51-63
197. Bortin, M.M.; et al.: Graft versus leukemia. 3. Apparent independent antihost and antileukemia activity of transplanted immunocompetent cells. *Transplantation.* 1973 Sep; 16(3): 182-8

198. Horowitz, M.M.; et al.: Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990 Feb 1; 75(3): 555-62
199. Ringdén, O.; et al.: Is there a graft-versus-leukaemia effect in the absence of graft-versus-host disease in patients undergoing bone marrow transplantation for acute leukaemia? *Br J Haematol*. 2000 Dec; 111(4): 1130-7
200. Petrovic, A.; Hale, G.: Clinical options after failure of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with hematologic malignancies. *Expert Rev Clin Immunol*. 2011 Jul; 7(4): 515-25; quiz 526-7
201. Huang, X.J.: Immunomodulatory strategies for relapse after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in hematologic malignancy patients. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011 Sep; 24(3): 351-8
202. Guièze, R.; et al.: Management of Myelodysplastic Syndrome Relapsing after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Study by the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Feb; 22(2): 240-247
203. Hu, Y.X.; et al.: Relapsing hematologic malignancies after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Aug; 17(8): 1099-111
204. Dickinson, A.M.; et al.: Graft- versus-Leukemia Effect Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Leukemia. *Front Immunol*. 2017 Jun 7;8: 496
205. Innes, A.J.; et al.: Escalating-dose HLA-mismatched DLI is safe for the treatment of leukaemia relapse following alemtuzumab-based myeloablative allo-SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2013 Oct; 48(10): 1324-8
206. Pfeiffer, M.M.; et al.: IL-15-stimulated CD3/CD19-depleted stem-cell boosts in relapsed pediatric patients after haploidentical SCT. *Leukemia* 2012 Nov; 26(11): 2435-9
207. Cho, D.; et al.: Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2010 Aug 1; 16(15): 3901-9
208. Koscielniak, E.; et al.: Graft-versus-Ewing sarcoma effect and long-term remission induced by haploidentical stem-cell transplantation in a patient with relapse of metastatic disease. *J Clin Oncol*. 2005 Jan 1; 23(1): 242-4
209. Rubnitz, J. E.; et al.: NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 20; 28(6): 955-9.
210. Handgretinger, R.; et al.: A phase I study of neuroblastoma with the anti-ganglioside GD2 antibody 14.G2a. *Cancer Immunol Immunother*. 1992; 35(3): 199-204
211. Parsons, K.; et al.: Targeted immunotherapy for high-risk neuroblastoma – the role of monoclonal antibodies. *Ann Pharmacother*. 2013 Feb; 47(2): 210-8
212. Lang, P.: CH14.18 1021 Antibody and IL2 After Haplo SCT in Children With Relapsed Neuroblastoma. *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02258815*
213. Prüfplan zur Vorlage bei der Ethikkommission einer prospektiven multizentrischen Phase I/II Studie mit dem Titel: Haploidente Stammzelltransplantation mit CD3/CD19 depletierten Stammzellen bei pädiatrischen Patienten mit therapierefraktären hämatologischen und onkologischen Erkrankungen. Version 6. 01.02.2009
214. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013 Nov 27; 310(20): 2191-4.
215. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guideline for Good Clinical Practice E6(R1). Current Step 4 version dated 10 June 1996

216. Arzneimittelgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 18. Juli 2017 (BGBl. I S. 2757) geändert worden ist
217. Bader, P.; et al.: Quantitative assessment of mixed hematopoietic chimerism by polymerase chain reaction after allogeneic BMT. Anticancer Res. 1996 Jul-Aug;16(4A):1759-63.
218. Schumm, M.; et al.: Flow cytometry with anti HLA-antibodies: a simple but highly sensitive method for monitoring chimerism and minimal residual disease after HLA-mismatched stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2007 Jun; 39(12): 767-73
219. Gesetz zum Schutz personenbezogener Daten (Landesdatenschutzgesetz – LDSG) in der Fassung vom 18. September 2000 (GBl. S. 648)¹, zuletzt geändert durch Gesetz vom 17. Dezember 2015 (GBl. S. 1198)
220. Auswertungsbericht V2.0 (22.11.2016) Studie Haploidente Stammzelltransplantation mit CD3/CD19 depletierten Stammzellen bei pädiatrischen Patienten mit therapierefraktären hämatologischen und onkologischen Erkrankungen. CPCS IV / CE 22.11.2016, Kinderklinik Tübingen
221. Phase II Feasibility Study Using ch14.18/CHO Antibody and Subcutaneous Interleukin 2 After Haploidentical Stem Cell Transplantation in Children With Relapsed Neuroblastoma. Clinical Trials.gov Identifier: NCT02258815
222. Caillat-Zucman, S.; et al.: Impact of HLA matching on outcome of hematopoietic stem cell transplantation in children with inherited diseases: a single-center comparative analysis of genoidentical, haploidentical or unrelated donors. Bone Marrow Transplant. 2004 Jun; 33(11): 1089-95
223. Lang, P.; et al.: Transplantation of highly purified peripheral-blood CD34+ progenitor cells from related and unrelated donors in children with nonmalignant diseases. Bone Marrow Transplant. 2004 Jan; 33(1): 25-32
224. Federmann, B; et.al.: Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: a phase II study. Haematologica. 2012 Oct; 97(10): 1523-31
225. Hale, G.A.; et al.: Mismatched family member donor transplantation for patients with refractory hematologic malignancies: long-term followup of a prospective clinical trial. ASH Annu Meet Abstr. Blood. 2006; 108(11): 3137
226. González-Llano, O.; et al.: Feasibility of an outpatient HLA haploidentical stem cell transplantation program in children using a reduced-intensity conditioning regimen and CD3-CD19 depletion. Hematology. 2014 Jan; 19(1): 10-7
227. Diaz, M.A.; et al.: Prognostic factors and outcomes for pediatric patients receiving an haploidentical relative allogeneic transplant using CD3/CD19-depleted grafts. Bone Marrow Transplant. 2016 Sep; 51(9): 1211-1216
228. Bethge, W.A.; et al.: Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: an update. Blood Cells Mol Dis. 2008 Jan-Feb; 40(1): 13-9
229. Martin, P.J.; et al.: Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts. Blood. 1985 Sep; 66(3): 664-72
230. Pei, X.; et al.: Comparison of reference values for immune recovery between event-free patients receiving haploidentical allografts and those receiving human leukocyte antigen-matched sibling donor allografts. Front Med. 2018 Apr; 12(2): 153-163
231. Kim, H.O.; et al.: Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children: a single institution study of 59 patients. Korean J Pediatr. 2013 Jan; 56(1): 26-31

232. McDonough, C.H.; et al.: High incidence of graft failure in children receiving CD34+ augmented elutriated allografts for nonmalignant diseases. *Bone Marrow Transplant.* 2003 Jun; 31(12): 1073-80
233. Lang, P.; et al.: Transplantation of CD3/CD19 depleted allografts from haploidentical family donors in paediatric leukaemia. *Br J Haematol.* 2014 Jun; 165(5): 688-98
234. Gonzalez-Vicent, M.; et al.: Graft manipulation and reduced-intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from mismatched unrelated and mismatched/haploidentical related donors in pediatric leukemia patients. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010 Apr; 32(3): e85-90
235. Lang, P.; et al.: Haploidentical stem cell transplantation in patients with pediatric solid tumors: preliminary results of a pilot study and analysis of graft versus tumor effects. *Klin Padiatr.* 2006 Nov-Dec; 218(6): 321-6
236. Kim, H.T.: Cumulative incidence in competing risks data and competing risks regression analysis. *Clin Cancer Res.* 2007 Jan 15; 13(2 Pt 1): 559-65
237. Lang, P.; et al.: Use of CD3+/CD19+ depleted grafts from mismatched related donors in children. *Bone Marrow Transplant.* 2004; 33: S94 (Abstract P453)
238. Lang, P.; et al.: Improved immune recovery after transplantation of TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted allografts from haploidentical donors in pediatric patients. *Bone Marrow Transplant.* 2015 Jun; 50 Suppl 2: S6-10
239. Shook, D.R.; et al.: Haploidentical stem cell transplantation augmented by CD45RA negative lymphocytes provides rapid engraftment and excellent tolerability. *Pediatr Blood Cancer.* 2015 Apr; 62(4): 666-73

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Abteilung I unter Betreuung von Prof. Dr. med. P. Lang durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. P. Lang, Bereichsleiter Stammzelltransplantation, stellvertretender ärztlicher Direktor.

Die in Tübingen transplantierten Patienten wurden von den Mitarbeitern der Kinderklinik und der angrenzenden Fachbereiche betreut. In diesem Rahmen habe ich einen Teil der Patienten selbst betreut und entsprechend Studienprotokoll behandelt und nachbeobachtet.

Die nicht in Tübingen transplantierten Patienten wurden in den jeweiligen Zentren betreut.

Die von der Dokumentarin Fr. B. Walter und Dr. med. H. M. Teltschik erfassten Daten der Tübinger Patienten wurden von mir anhand der Akten und Arztbriefe so weit wie möglich vervollständigt. Ausstehende Daten von Patienten anderer Zentren wurden von den jeweiligen Kliniken erfragt und ergänzt.

Die Daten wurden von mir stichprobenartig überprüft. Im Widerspruch stehende Daten und auffällig abweichende Daten wurden von mir ebenfalls anhand der klinischen Dokumentation geprüft.

Die statistische Auswertung erfolgte entsprechend einem Auswertungsplan durch Fr. Engel, CPCS. Der Auswertungsplan für diese uni- und multivariate Auswertung wurde von mir, in Absprache mit dem Studienleiter Prof. Dr. med. P. Lang, erstellt. Alle darüber hinaus gehenden sowie die in dieser Arbeit dargestellten statistischen Auswertungen erfolgten eigenständig durch mich. In enger Diskussion mit Prof. Dr. med. P. Lang nahm ich die Interpretation der Studienergebnisse vor.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren, als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

8. Veröffentlichung

Eine Veröffentlichung der Studienergebnisse ist angedacht.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. med. P. Lang für die Begleitung während der Arbeit und die vielen Ratschläge danken. Ebenfalls danke ich Fr. Walter für die Erfassung der Daten und Unterstützung bei Nachfragen zu diesen und Fr. Engel danke ich für die Diskussionen zur statistischen Auswertung der Arbeit.

Besonders danken möchte ich meiner Familie, Juliane Hinkel und Hannes Hinkel, für Ihre Unterstützung und Ihren Zuspruch während der Erarbeitung meiner Dissertation.