

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Onkologie, Klinik für Stammzelltransplantation

Prof. Dr. med. Francis Ayuk
Prof. Dr. rer. nat. Boris Fehse

Entwicklung und Anwendung neuer diagnostischer Verfahren zur Prognoseabschätzung und Therapiesteuerung im Rahmen der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. biol. hum.
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Anita Badbaran
aus Abadan/ Iran

Hamburg 2025

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:** 01.10.2025

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Boris Fehse

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Kerstin Cornils

Inhaltsverzeichnis

1. Synopse	5
1.1 Fragestellung	5
1.1.1 Zelluläre Therapien	5
1.1.2 Indikation zur allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation	6
1.1.2.1 Indikation zur allo-HSCT bei AML	7
1.1.2.3 Indikation zur allo-HSCT bei MDS	7
1.1.2.2 Indikation zur allo-HSCT bei CMML	7
1.1.2.3 Indikation zur allo-HSCT bei primärer Myelofibrose	8
1.1.3 Immunologische Rekonstitution nach allo-HSCT	9
1.1.4 Konditionierungsregime vor allo-HSCT	10
1.1.5 Graft-versus-Host (GvH-) und Graft-versus-Leukemia (GvL-) Effekte	11
1.1.6 Prognostische Faktoren im Rahmen der allo-HSCT	11
1.1.6.1 Therapeutische Herausforderungen für die Posttransplantationsphase	11
1.1.7 Präzisionsmedizin	12
1.1.8 Minimale Resterkrankung (MRD) bei myeloischen Neoplasien	12
1.1.8.1 Vergleich verschiedener Methoden zur Diagnostik und Überwachung hämatologischer Erkrankungen: Sensitivität, Präzision und klinische Anwendung	13
1.1.9 Ziel dieser Arbeit	17
1.2 Material und Methoden zu den vier Veröffentlichungen	18
1.2.1 Material und Methodik zum Paper: <i>Impact of TP53 on outcome of patients with myelofibrosis undergoing hematopoietic stem cell transplantation</i>	18
1.2.1.1 Patienten	18
1.2.1.2 Mutationsanalyse und Zytogenetik	18
1.2.1.3 Endpunkte und statistische Analyse	19
1.2.2 Material und Methodik zum Paper: <i>A prognostic score including mutation profile and clinical features for patients with CMML undergoing stem cell transplantation</i>	19
1.2.2.1 Patienten und Studiendesign	19
1.2.2.2 Mutations- und Zytogenetikanalysen	20
1.2.2.3 Statistische Analyse	20
1.2.3 Patienten und Methodik zum Paper: <i>Post-Transplantation Multicolored Flow Cytometry-Minimal Residual Disease Status on Day 100 Predicts Outcomes for Patients with Refractory Acute Myeloid Leukemia</i>	21
1.2.3.1 Patienten, Studiendesign und Methodik	21
1.2.3.2 Statistische Analyse	22
1.2.4 Patienten und Methodik zum Paper: <i>Donor Lymphocyte Infusion and Molecular Monitoring for Relapsed Myelofibrosis after Hematopoietic Cell Transplantation</i>	22
1.2.4.1 Patienten und Studiendesign	22
1.2.4.2 Statistische Analyse	23
1.3 Ergebnisse	23

1.3.1 Ergebnisse zum Paper: <i>Impact of TP53 on outcome of patients with myelofibrosis undergoing hematopoietic stem cell transplantation</i>	23
1.3.2 Ergebnisse zum Paper: <i>A prognostic score including mutation profile and clinical features for patients with CMML undergoing stem cell transplantation</i>	24
1.3.3 Ergebnisse zum Paper: <i>Post-Transplantation Multicolored Flow Cytometry-Minimal Residual Disease Status on Day 100 Predicts Outcomes for Patients with Refractory Acute Myeloid Leukemia</i>	26
1.3.4 Ergebnisse zum Paper: <i>Donor Lymphocyte Infusion and Molecular Monitoring for Relapsed Myelofibrosis after Hematopoietic Cell Transplantation</i>	27
1.4 Diskussion.....	27
1.4.1 Einfluss genetischer und klinischer Risikofaktoren auf den Verlauf der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation:	28
1.4.2 Prognostischer Einfluss der minimalen Resterkrankung (MRD) nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation.....	32
1.4.3 Nutzen der MRD-Bestimmung zur Steuerung der weiterführenden Therapien nach allo-HSCT	33
2. Literaturverzeichnis	36
3.1 Publikation 1.....	44
3.2 Publikation 2.....	56
3.3 Publikation 3.....	67
3.4 Publikation 4.....	75
4. Zusammenfassung.....	84
5. Erklärung des Eigenanteils an den Publikationen	88
5.1 Publikation 1.....	88
5.2 Publikation 2.....	88
5.3 Publikation 3.....	88
5.4 Publikation 4.....	89
6. Danksagung.....	90
7. Lebenslauf.....	91
8. Eidesstattliche Erklärung.....	92

1. Synopse

1.1 Fragestellung

Unter dem Begriff der zellulären Therapie werden unterschiedliche Verfahren zusammengefasst. Allen gemeinsam ist, dass sie im Gegensatz zu den „konventionellen“ Therapien wie Operationen, Bestrahlung oder medikamentösen Therapien auf „lebende“ Zellen als Therapeutikum setzen. Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HSCT) stellt die am weitesten verbreitete und etablierteste dieser zellulären Therapien dar, die vor allem bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien zum Einsatz kommt. Dabei werden hämatopoetische Stammzellen eines anderen, gesunden Menschen per Infusion auf einen Empfänger übertragen. Der Empfänger hat dafür vorbereitend eine Konditionierungstherapie erhalten mit dem Ziel, kranke Zellen der Hämatopoese abzutöten und eine Immunsuppression zu erzeugen. Der Erfolg einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) hängt von verschiedenen prognostischen Faktoren ab, darunter klinische Parameter und genetische Marker. Insbesondere der molekulare Mutationsstatus der Neoplasie spielt eine entscheidende Rolle bei der Risikostratifizierung und kann das Transplantationsergebnis erheblich beeinflussen. Bestimmte Mutationen sind mit einem höheren Rezidivrisiko oder einer schlechteren Gesamtprognose assoziiert, was die Therapieentscheidung und das Patientenmanagement nach HSCT beeinflusst. In diesem Zusammenhang stellen sich u.a. folgende Fragen, die in den jeweils referierten Publikationen adressiert wurden:

Welche Rolle spielen *TP53*-Mutationen bei Patienten mit primärer Myelofibrose?¹

Welche prognostischen Auswirkungen hat der Einbezug des molekularen Mutationsstatus zusammen mit klinischen Faktoren auf das Transplantationsergebnis bei neu diagnostizierten Patienten mit chronisch myelomonozytärer Leukämie (CMML)?²

Welche prognostische Rolle spielt die Detektion minimaler Resterkrankungen (MRD) mittels Durchflusszytometrie in der Posttransplantationsphase bei Patienten mit refraktärer akuter myeloischer Leukämie (AML), insbesondere hinsichtlich des progressionsfreien und des Gesamtüberlebens?³

Welchen Effekt hat die Infusion von Spenderlymphozyten (donor lymphocyte infusion, DLI) bei Patienten mit molekularem oder hämatologischem Rückfall nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) auf das Behandlungsergebnis?⁴

1.1.1 Zelluläre Therapien

In der Hämatologie und Hämatoonkologie sind verschiedene zelluläre Therapieverfahren etabliert: allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HSCT), autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation (auto-HSCT), Donorlymphozytengabe (DLI) sowie, seit neuerem, auch CAR-T-Zelltherapien (CAR = chimärer Antigenrezeptor). Bereits seit vielen Jahrzehnten ist die allo-HSCT bei Patienten mit hämatoonkologischen Erkrankungen fest etabliert. Sie kommt vor allem bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien zum Einsatz. Dabei werden hämatopoetische Stammzellen eines anderen, gesunden Menschen per Infusion auf einen Empfänger übertragen.⁵ Der Empfänger hat zuvor eine Konditionierungstherapie (ausführlich unter 1.1.4) mit dem Ziel erhalten, kranke Zellen der eigenen Hämatopoese abzutöten und eine Immunsuppression zu erzeugen. Letzteres ist für das Anwachsen („Engraftment“) der neuen Stammzellen nötig. Auf die Konditionierung folgt eine Phase der Aplasie, die vor allem durch ein hohes Infektions-, aber auch Blutungsrisiko gekennzeichnet ist. Als Engraftment bezeichnet man die Bildung neuer, von den Spenderzellen abstammender, reifer

Blutzellen. Es wird über das Erreichen definierter Zielwerte für neutrophile Granulozyten, Thrombozyten und die Transfusionsunabhängigkeit von Erythrozyten definiert (Neutrophilenwerte über 0,5/nl für mindestens zwei aufeinanderfolgende Tage und Thrombozytenwerte über 20/nl für drei aufeinanderfolgende Tage).⁶⁻⁸ Das Engraftment sollte vollständig aus Spenderstammzellen erfolgen – diesen Zustand bezeichnet man als kompletten (Spender-) Chimärismus.

Passweg et al. berichteten in ihrem EBMT-Bericht⁹ über die Nutzung der hämatopoetischen Stammzelltransplantation und zellulärer Therapietechnologien in Europa und assoziierten Ländern: Basierend auf den Aktivitätsdaten von 2022, die zur Korrelation mit wirtschaftlichen und demografischen Faktoren herangezogen wurden, wurden insgesamt 46.143 hämatopoetische Stammzelltransplantationen (HSCT) in 689 Zentren durchgeführt, darunter 19.011 (41,2 %) allogene und 27.132 (58,8 %) autologe Transplantationen. Zudem erhielten 4.329 Patienten eine fortgeschrittene zelluläre Therapie, davon 3.205 eine CAR-T-Zelltherapie. Diese Zahlen verdeutlichen die immense Bedeutung der allo-HSCT, die nicht nur seit langem etabliert ist, sondern deren Zahlen auch kontinuierlich zunehmen. Insbesondere hat der vermehrte Einbezug älterer Patienten, basierend auf verbesserten Supportivtherapien sowie der Anwendung modifizierter, weniger toxischer Konditionierungsschemata, die Transplantationszahlen weiter gesteigert.

Dabei stellt die allo-HSCT immer noch ein risikoreiches Therapieverfahren dar. Es besteht das Risiko einer schweren Spender-gegen-Wirt-Erkrankung (engl. *graft-versus-host disease*, GvHD), bei der das neue, allogene Immunsystem des Patienten gegen dessen eigenes Gewebe reagiert (s. 1.1.5).

Verkompliziert wird dies durch die auch nach der Aplasiephase gesteigerte Infektanfälligkeit der Patienten, die einerseits auf das zunächst noch unvollständig wiederhergestellte Immunsystem zurückzuführen ist, und andererseits durch die medikamentöse Immunsuppression, mit der eine GvHD verhindert werden soll, noch verstärkt wird.

Darüber hinaus kann trotz allo-HSCT wiederum ein Rezidiv der hämatologischen Grunderkrankung auftreten.¹⁰ Um das Wiederauftreten der hämatologischen Grunderkrankung frühzeitig zu bekämpfen, zeigten Kolb et al. bereits 1990 bei Patienten mit einer chronischen myeloischen Leukämie (CML) den potenziell kurativen Effekt so-genannter Spenderlymphozyteninfusionen (*donor lymphocyte infusion*, DLI) (s. 1.1.5).¹¹ Bei dieser Technik werden Lymphozyten des vormaligen Stammzellspenders eingesetzt, um residuelle Tumorzellen und Rezidive in einem sehr frühen Stadium gezielt zu bekämpfen. Dieser innovative Ansatz eröffnete neue Möglichkeiten für die Behandlung von Rückfällen nach einer Transplantation.

In den letzten Jahren haben die CAR-T-Zelltherapien an Bedeutung gewonnen. Hierbei werden die T-Zellen des Patienten genetisch modifiziert, um nach Retransfusion die malignen Zellen über die Erkennung tumorassoziierter Oberflächenantigene gezielt anzugreifen.¹² CAR-T-Zell-Therapien haben die Behandlung aggressiver, rezidivierender bzw. refraktärer B-Zell-Malignome grundlegend verändert. Dies gilt für verschiedene B-Zell-Lymphome, vor allem diffuse großzellige B-Zell Lymphomen (DLCL), aber auch Mantelzelllymphom, primär mediastinales B-Zell-Lymphom (PMBCL) sowie Follikuläre Lymphome (FL) wie auch für akute B-Zell-Leukämien (B-ALL), für die inzwischen mehrere, gegen CD19 gerichtete CAR-T-Präparate zugelassen sind.¹³ Zwei weitere Zulassungen wurden für gegen BCMA (*B-cell maturation antigen*) gerichtete CAR-T-Zellen zur Behandlung des rezidivierten / refraktären Multiplen Myeloms (MM) erteilt.¹³

1.1.2 Indikation zur allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation

Die allo-HSCT ist eine kurative Therapieoption für Patienten mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen wie akuter myeloischer Leukämie (AML), BCR::ABL1-negativen myeloproliferativen

Neoplasien (MPN) und chronischer myelomonozytärer Leukämie (CMML).^{14,15} Durch die rasante Entwicklung neuer Methoden und Technologien in der Stammzelltransplantation bleibt die Indikationsstellung für eine allo-HSCT ein dynamischer und sich kontinuierlich transformierender Prozess. Ein Beispiel dafür ist der Einfluss von Tyrosinkinase-Inhibitoren, die zu einem drastischen Rückgang der Transplantationen bei chronischer myeloischer Leukämie (CML) führte. Im Gegensatz dazu sind die Indikationen für Erkrankungen wie MDS und AML deutlich gestiegen. Ein weiterer Grund für die Zunahme der Zahl von allo-HSCT ist die Einführung sogenannter reduzierter Konditionierungsprotokolle, die es ermöglichen, diese Therapieform auch bei älteren Patienten erfolgreich durchzuführen. Besonders hervorzuheben ist der Anstieg der Zahl an Transplantationen von Stammzellen, die von unverwandten Spendern stammen.¹⁴

Laut WHO-Klassifikation wird die Indikation zur allo-HSCT bei den jeweiligen Erkrankungen wie im Folgenden beschrieben bewertet.¹⁶

1.1.2.1 Indikation zur allo-HSCT bei AML

AML ist eine heterogene und aggressive maligne Erkrankung, die zur unkontrollierten Vermehrung unreifer Leukämiezellen (Blasten) und damit zu einer gestörten Blutbildung führt. Die Klassifikation erfolgt nach der WHO (2022)¹⁶ bzw. den ICC-Richtlinien¹⁷, basierend auf verschiedenen Merkmalen. Die Therapieentscheidungen berücksichtigen die Biologie der Erkrankung, Begleiterkrankungen und individuelle Wünsche der Patienten. Eine kurative Behandlung ist bei jüngeren sowie bei älteren, fitten Patienten möglich. Trotz der Fortschritte in der AML-Behandlung bleibt die allo-HSCT die Standardtherapie für Patienten mit Hochrisiko-AML. Für die Risikoeinteilung der AML spielt die genetische Analyse, inklusive Zytogenetik und Molekulargenetik, eine große Rolle. Der allogene HSCT, der als Konsolidierungstherapie dient, wird von einer Induktionstherapie eingeleitet.

1.1.2.3 Indikation zur allo-HSCT bei MDS

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind eine Gruppe von klonalen Stammzellerkrankungen des blutbildenden Systems, die durch eine ineffektive Hämatopoese und ein erhöhtes Risiko für eine Transformation in eine akute myeloische Leukämie (AML) gekennzeichnet sind. Typisch für MDS sind Zytopenien, also ein Mangel an roten und weißen Blutkörperchen sowie Thrombozyten, die zu Anämie, Infektanfälligkeit und Blutungsneigung führen können. Die Erkrankung tritt überwiegend bei älteren Menschen auf, und ihre Prognose wird durch zugrundeliegende Faktoren wie genetische Mutationen und Zytogenetik sowie den International Prognostic Scoring System (IPSS-R) Risikostatus bestimmt.¹⁸ Die allo-HSCT ist die einzige potenziell kurative Therapieoption für Patienten mit myelodysplastischem Syndrom. Sie wird in der Regel für Patienten mit Hochrisiko-MDS empfohlen. Allerdings sollte die Indikation zur allo-SCT auch bei jüngeren Patienten mit Niedrigrisiko-MDS und schwerer Zytopenie, insbesondere Thrombozytopenie, in Betracht gezogen werden, besonders wenn eine Erstlinientherapie versagt hat und/oder zytogenetische oder molekulare Marker auf eine ungünstige Prognose hinweisen (z. B. Mutationen in *TP53* oder *ASXL1*).¹⁹

1.1.2.2 Indikation zur allo-HSCT bei CMML

Die CMML wird durch den Nachweis von Monozyten im Blut und Dysplasien im Knochenmark diagnostiziert, nachdem andere Ursachen für reaktive Monozytosen ausgeschlossen wurden. Bei der Diagnose spielen die Zytogenetik und zunehmend auch molekularbiologische Untersuchungen eine entscheidende Rolle. CMML kann sich ähnlich wie MDS mit begleitender Monozytose (Leukozyten <13.000/ μ l) oder wie myeloproliferative Neoplasien (MPN, s.u.) mit erhöhten Leukozytenzahlen ($\geq$ 13.000/ μ l) darstellen. Risiko-Scores wie der CPSS (CMML-specific prognostic scoring system) und der

CPSS-molecular ermöglichen eine Einschätzung des Gesamtüberlebens und des Risikos einer Progression zu einer sekundären AML. CMML wird meist bei älteren Patienten diagnostiziert. Patienten mit dysplastischer CMML leiden oft an Symptomen einer hämatopoetischen Insuffizienz, während Patienten mit proliferativer CMML häufiger konstitutionelle Symptome und Organomegalie zeigen.²⁰

Die Therapie sollte auf den individuellen Patienten abgestimmt werden, mit dem Ziel, die Lebensqualität und die Lebensdauer zu verbessern. Hierzu gehören unterstützende Maßnahmen und, bei ausgeprägter Leukozytose, eine Zytoreduktion. Die einzige kurative Behandlungsoption ist die allo-HSCT, die jedoch aufgrund des Alters und häufiger Begleiterkrankungen nur für wenige Patienten in Frage kommt²¹. Für Patienten mit dysplastischer CMML und Hochrisikokonstellation, die nicht für eine allo-HSCT geeignet sind, ist Azacitidin zugelassen, das bei einigen Patienten ein Ansprechen bewirken kann.

1.1.2.3 Indikation zur allo-HSCT bei primärer Myelofibrose

Die Erkrankungen Polycythaemia vera (PV), essentielle Thrombozythämie (ET) und primäre Myelofibrose (PMF) gehören zu den myeloproliferativen Neoplasien (MPN), die keine BCR::ABL1-Translokation (9;22) aufweisen. Die PMF ist eine klonale myeloproliferative Störung, die von hämatopoetischen Stammzellen ausgeht und in einer krankhaften klonalen Proliferation verschiedener Zellkompartimente, insbesondere der Megakaryozyten, resultiert. Diese Proliferation geht mit einer erhöhten Ausschüttung verschiedener Zytokine einher, die zu einer sekundären intramedullären Fibrose, Osteosklerose, Angiogenese und extramedullärer Hämatopoese führt²². PMF zeichnet sich klinisch durch Zytopenien, Hepatosplenomegalie und konstitutionelle Symptome aus²³. Die sekundäre Myelofibrose (MF) kann aus der PV und der ET hervorgehen und wird dann als post-PV und post-ET MF bezeichnet.²⁴ Es wurden Treiber- (*driver*-) Mutationen in den Genen Janus-Kinase-2 (*JAK2*), Calreticulin (*CALR*) und Myeloproliferatives Leukämie-Virus-Onkogen (*MPL*) sowie zusätzliche somatische Mutationen identifiziert, darunter in *TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*, *U2AF1*, *TP53* und *SRSF2*¹, die die Prognose unterschiedlich beeinflussen. Es wird angenommen, dass diese zusätzlichen Mutationen das Wachstum von Klonen mit "*driver*"-Mutationen, wie zum Beispiel in *JAK2* fördern und damit den Übergang der Krankheit in eine sekundäre (s)AML beschleunigen können.^{25,26}

Die Prognose bei PMF wird maßgeblich vom Alter der Patienten, konstitutionellen Symptomen sowie hämatologischen und genetischen Faktoren beeinflusst. Dabei gewinnen zytogenetische und molekulargenetische Parameter immer mehr an Bedeutung. Zu den häufigsten Todesursachen zählen die Transformation in eine AML, kardiovaskuläre Erkrankungen und Infektionen. Die einzige potenziell heilende Therapie ist die allo-HSCT, die vor allem bei Patienten mit ungünstiger Prognose (Intermediärrisiko 2 oder Hochrisiko) indiziert ist. Für die symptomatische Behandlung gibt es verschiedene medikamentöse Optionen.²⁷ Seit Februar 2020 sind der JAK2-Inhibitor Ruxolitinib und der FLT3-Inhibitor Fedratinib in der EU zugelassen. Klinische Studien zu weiteren JAK-Inhibitoren, Kombinationstherapien und neuen Medikamenten zeigen vielversprechende Ergebnisse für zukünftige Therapieansätze.²⁸

Das durchschnittliche Alter bei der Diagnose von PMF liegt zwischen 60 und 65 Jahren. Patienten mit PV oder ET werden oft in jüngerem Alter diagnostiziert, aber aufgrund ihres in der Regel langwierigen Verlaufs sind sie oft ähnlich alt wie PMF-Patienten, wenn eine allo-HSCT als Therapieoption in Betracht kommt.²⁶ Die Inzidenz somatischer Mutationen wie *SRSF2*, die mit einem verkürzten Gesamtüberleben einhergehen, nimmt mit zunehmendem Alter zu. Dies könnte dazu führen, dass eine frühere allo-HSCT

in Betracht gezogen wird, selbst wenn relevante Begleiterkrankungen vorliegen.^{29,30} Der allo-HSCT-spezifische Begleiterkrankungsindex DIPS (Dynamic International Prognostic Scoring System) umfasst neben dem Alter (>40 Jahre) 15 Parameter für organspezifische Dysfunktionen, Autoimmun- und Stoffwechselkrankheiten, Infektionen sowie eine Diagnose von vorherigen soliden Tumoren.^{30,31}

1.1.3 Immunologische Rekonstitution nach allo-HSCT

Die allo-HSCT basiert auf dem Prinzip der immunologischen Tumorkontrolle durch die Spenderzellen. Zugleich muss sich vor allem das adaptive Immunsystem in weiten Teilen erst wieder neu ausbilden (=“Rekonstitution“). Die Rekonstitution erfolgt allerdings vor dem Hintergrund einer Immunsuppression. Sie ist zudem abhängig von der Stammzellquelle und von Art und Zahl der im Transplantat enthaltenen Immunzellen. In den meisten Fällen werden heute ins periphere Blut mobilisierte Stammzellen (PBSC) für die Transplantation verwendet, seltener Knochenmark (KM) oder Nabelschnurblut (NB). Während mit PBSC viele reife Immunzellen übertragen werden, sind es bei KM weniger und bei NB praktisch keine. Die immunologische Rekonstitution ist entscheidend für das Überleben und den langfristigen Behandlungserfolg, da das Immunsystem wiederaufgebaut werden muss, um Infektionen und Rückfälle der zugrundeliegenden Krankheit zu verhindern. Die Immunrekonstitution umfasst die Erholung von angeborenen und adaptiven Immunzellen, darunter Neutrophile, T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und dendritische Zellen.³²

Phasen der Immunrekonstitution

1. Frühe Phase (angeborenes Immunsystem): Die Erholung des angeborenen Immunsystems erfolgt relativ schnell, insbesondere hinsichtlich der Neutrophilen und NK-Zellen. Diese Zellen sind wichtig für die Abwehr bakterieller und viraler Infektionen in den ersten Wochen nach der Transplantation.³³
2. Adaptive Immunität (T- und B-Zellen): Die Wiederherstellung der adaptiven Immunität ist langsamer und erfolgt über Monate bis Jahre. T-Zellen, die eine Schlüsselrolle bei der Abwehr von Infektionen und der Kontrolle von Tumoren spielen, erholen sich allmählich. Zunächst werden die mittransplantierten T-Zellen reaktiviert, sodass der Immunschutz des Spenders übernommen wird. Aber es dauert Monate bis Jahre, bis aus den Stammzellen ein funktionell vielseitiges T-Zell-Repertoire aufgebaut ist.³³
3. B-Zellen und die humorale Immunität brauchen ebenfalls Zeit, um sich vollständig zu erholen. Die Produktion von Immunglobulinen und die Entwicklung einer spezifischen Antikörperantwort können verzögert sein, was zu einem erhöhten Infektionsrisiko führt, insbesondere gegenüber viralen Infektionen.³³ Auch hier kommt es zu einer weitgehenden Übernahme der Immunität des Spenders durch mittransplantierte antigenspezifische B-Zellen.

Einflussfaktoren

Verschiedene Faktoren beeinflussen die Immunrekonstitution, darunter:

- Spender-gegen-Wirt Krankheit (GvHD): Die GvHD, bei der die transplantierten Immunzellen gesunde Gewebe des Empfängers angreifen, stellt eine bedeutende Komplikation nach allo-HSCT dar (s. 1.1.5). Die GvHD kann die Immunrekonstitution erheblich verzögern und zusätzliche Immunsuppressiva erfordern, was das Infektionsrisiko weiter erhöht.³⁴
- Konditionierungsregime (intensive Chemotherapie oder Bestrahlung zur Vorbereitung auf die Transplantation).

- Auswahl des Spenders – HLA-passende (*matched*) vs. HLA-nicht-passende (*mismatched*) Transplantate: Eine möglichst hohe HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger verringert das Risiko für schwerwiegende Komplikationen wie die o.g. GvHD. Bei idealer HLA-Übereinstimmung – wie bei einem HLA-identen Geschwister – sind die Chancen auf eine erfolgreiche Transplantation am höchsten, allerdings auch das Risiko eines Rezidivs der malignen Erkrankung, das bei einer syngenen HSCT (von einem eineiigen Zwilling) am höchsten ist. Falls kein HLA-identer Spender verfügbar ist, wird ein möglichst HLA-kompatibler Fremdspender gesucht, oder es werden Inkompatibilitäten (Mismatches) einzelner HLA-Moleküle toleriert. Durch verbesserte Transplantationsprotokolle ist in den letzten Jahren die Zahl sog. haploidenter („halb-passender“) SCT deutlich angestiegen. Hierfür kommen neben Eltern und Geschwistern auch entferntere Verwandte wie Cousins/Cousinen oder Onkel/Tanten als Spender infrage.
- Alter des Patienten.
- Verwendung von Immunsuppressiva zur Kontrolle und Behandlung der GvHD und von Infektionen.^{35,36}

1.1.4 Konditionierungsregime vor allo-HSCT

Konditionierungsregime vor einer allo-HSCT sind entscheidend für den Erfolg der Transplantation und beinhalten die Vorbereitung des Transplantat-Empfängers auf die Transplantation durch eine Kombination aus Chemotherapie ± Bestrahlung.

- **Myeloablative Konditionierung (MAC)**

Die myeloablative Konditionierung wird mit hochdosierter Chemotherapie und/oder Ganzkörperbestrahlung durchgeführt und hat das Ziel, das gesamte Knochenmark des Empfängers zu zerstören. MAC-Konditionierung bietet ein geringeres Risiko für ein Rezidiv, da potenziell verbliebene Tumorzellen effektiv eliminiert werden, und somit höhere Erfolgschancen. Der Nachteil ist die relativ hohe Toxizität und die daraus resultierende transplantationsassoziierte Morbidität und auch Mortalität. Dieses Regime wird daher typischerweise bei Patienten angewendet, die jünger sind, keine signifikanten Begleiterkrankungen aufweisen und eine Erkrankung haben, die eine intensive Behandlung erfordert, wie z.B. AML oder myelodysplastische Syndrome (MDS).³⁷

- **Dosisreduzierte Konditionierung (*reduced-intensity conditioning, RIC*)**

Die intensitätsreduzierte Konditionierung RIC wird mit niedrigeren Dosen von Chemotherapie und/oder Bestrahlung durchgeführt. Ziel ist es, das Immunsystem des Empfängers so weit zu unterdrücken, dass die transplantierten Zellen anwachsen können, ohne das Knochenmark vollständig zu zerstören.³⁷ Es wurde gezeigt, dass die RIC mit geringerer Toxizität verbunden ist und sich somit auch für stärker vorbehandelte Patienten und/oder ältere Patienten eignet, jedoch führt dieser Ansatz zu einer höheren Rezidivrate nach allo-HSCT.^{38,39} Das Anwachsen der Spenderzellen ermöglicht eine immunologische Bekämpfung der Tumorzellen durch den Graft-versus-Leukemia- (GvL-) Effekt, der bei der RIC-HSCT eine essentielle Rolle für die Heilung spielt (s. 1.1.5).

In unserer Klinik haben wir gezeigt, dass eine RIC, gefolgt von einer allo-HSCT, sowohl von verwandten als auch von nicht-verwandten Spendern bei Patienten mit Myelofibrose gut vertragen wird und vielversprechende klinische Ergebnisse liefert.⁴⁰ In einer weiteren Studie haben Klyuchnikov et al. (ebenfalls aus unserer Klinik) demonstriert, dass Infusionen von Spenderlymphozyten und eine zweite

Transplantation effektive Salvage-Therapien für Patienten mit Myelofibrose sind, die nach einer RIC ein Rezidiv erlitten haben.⁴¹

1.1.5 Graft-versus-Host (GvH-) und Graft-versus-Leukemia (GvL-) Effekte

Die Spender-gegen-Wirt-Erkrankung (GvHD) ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation. Sie entsteht durch T-Lymphozyten im Transplantat, die gesundes Gewebe des Empfängers als fremd erkennen und angreifen, was zu einer potenziell tödlichen Erkrankung führt. Gleichzeitig sind Spender-T-Lymphozyten für den antileukämischen GvL-Effekt verantwortlich. Nachdem man die Spender-T-Lymphozyten als Verursacher der GvHD identifiziert hatte, wurde versucht, letztere durch umfassende T-Zell-Depletion zu verhindern. Dies führte jedoch zu häufigeren Infektionen infolge verschlechterter immunologischer Rekonstitution wie auch zu mehr Rezidiven durch den fehlenden GvL-Effekt, sodass sich das Gesamtüberleben verschlechterte.³⁴ Während die GvHD eine der Hauptkomorbiditäten der allo-HSCT und führende Ursache für therapiebedingte Sterblichkeit ist, ist der GvL-Effekt entscheidend für die Heilung von Leukämie und anderen malignen Blutkrankheiten. Auch wurde beobachtet, dass die GvHD mit niedrigerem Risiko für Rezidive assoziiert ist¹⁵. Daher wurden in der Folge verschiedene Ansätze entwickelt, um GvHD und GvL zu trennen, was jedoch bis heute nicht gelingt³⁴, wahrscheinlich, weil beide Effekte zu großen Teilen überlappend sind. Daher bleibt es weiter eine große Herausforderung in der HSCT, das richtige Gleichgewicht zu finden, das den GvL-Effekt erhält, aber die GvHD minimiert, um Komplikationen zu vermeiden und das Rückfallrisiko zu reduzieren.³⁴

Bei Spenderlymphozyteninfusionen (DLI) handelt es sich um eine allogene Immuntherapie, die nach der allo-HSCT eingesetzt wird. DLI nutzen den GvL-Effekt, der durch die infundierten T-Zellen ausgelöst wird, können jedoch auch eine GvHD verursachen. DLI werden verwendet, um hämatologische Rückfälle bei Patienten zu verhindern, die einen unvollständigen bzw. gemischten Chimärismus, einen molekularen Rückfall oder bereits eine minimale Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) aufweisen. Auch als Erhaltungstherapie bei Patienten mit hohem Risiko für hämatologische Malignitäten kommen Spenderlymphozyteninfusionen zum Einsatz (prophylaktische DLI).⁴² In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die MRD einen erheblichen Einfluss auf den Verlauf nach der Transplantation hat.^{4,43,44}

1.1.6 Prognostische Faktoren im Rahmen der allo-HSCT

Studien zeigen, dass der klinische Status vor der Transplantation ein entscheidender Prädiktor für den Therapieerfolg ist. Patienten, die vor ihrer allo-HSCT in kompletter Remission (CR) waren, haben signifikant höhere Langzeit-Überlebensraten als solche, die sich in partieller (PR) oder keiner Remission befanden.⁴⁵

Auch vor der allo-HSCT kann das Vorliegen einer MRD prognostisch bedeutsam sein, wie in der Behandlung von Kindern mit rezidivierter ALL von Bader et al. gezeigt wurde.⁴⁶ Die ALL-REZ BFM Studiengruppe führt prospektive Studien durch, um neue Strategien mit modifizierten Transplantationsverfahren zu evaluieren, die auf die MRD abzielen.⁴⁶

1.1.6.1 Therapeutische Herausforderungen für die Posttransplantationsphase

Das Rezidiv der Grunderkrankung und eine schwere GvHD sind aktuell die wichtigsten Herausforderungen in der Posttransplantationsphase. In der frühen Phase nach einer allo-HSCT (innerhalb der ersten 180 Tage) spielt die medikamentöse Erhaltungstherapie eine große Rolle, um ein Rezidiv der Grunderkrankung zu verhindern. Während dieser Zeit ist die Immunsuppression ein

zentrales Element der Therapie, gleichzeitig spielt das wiederhergestellte Immunsystem eine entscheidende Rolle bei der Krankheitskontrolle, insbesondere durch den GvL-Effekt.⁴⁷ Um diesen Effekt wirkungsvoll zu nutzen, ist das frühzeitige Erkennen von Rezidiven von extremer Bedeutung. Fallender Chimärismus (Anteil der Spenderzellen an der Hämatopoese) kann als Frühindikator für ein Rezidiv verwendet werden, ist jedoch nicht sehr sensitiv und zudem oft unspezifisch.^{48,49} Letzteres gilt vor allem nach einer RIC-HSCT da sich hier in der ersten Zeit nach der Transplantation noch kein vollständiger Chimärismus einstellt. Die hochsensitive Bestimmung der MRD stellt dagegen eine vielversprechende Option dar, um Rückfälle präziser zu überwachen und frühzeitig zu intervenieren.⁵⁰

1.1.7 Präzisionsmedizin

Präzisionsmedizin, auch als personalisierte Medizin oder individualisierte Medizin bekannt, ist ein innovativer Ansatz im Gesundheitswesen, der individuelle Unterschiede in Genetik, Umwelt und Lebensstil berücksichtigt. Das Ziel der Präzisionsmedizin ist es, medizinische Behandlungen und präventive Maßnahmen auf die spezifischen Merkmale jedes Patienten zuzuschneiden, anstatt einen Einheitsansatz zu verfolgen. In der onkologischen Behandlung von Patienten wird unter Präzisionsonkologie verstanden, dass Tumore nach gezielten, erkrankungstreibenden Mutationen untersucht werden, um diese Mutationen anschließend spezifisch als Behandlungsziel (Target) zu nutzen. Hierdurch werden höhere Ansprechraten bei gleichzeitig weniger unspezifischen Nebenwirkungen erwartet.

1.1.8 Minimale Resterkrankung (MRD) bei myeloischen Neoplasien

Um die MRD sensitiv zu bestimmen, haben sich in den letzten Jahrzehnten molekulare Techniken durchgesetzt. Damit ist es möglich, bei entsprechendem Design und Einsatz von ausreichend Material Sensitivitäten von 1×10^{-6} (eine Tumorzelle in einer Million gesunder Zellen) zu erreichen. Um eine solche Sensitivität zu gewährleisten, ist es aber von entscheidender Bedeutung, dass der Marker entsprechend stabil ist und die aktuelle Erkrankung repräsentiert. Modellerkrankungen für die Nutzung der MRD-Messung zur Steuerung der Therapie ist, neben der chronisch myeloischen Leukämie (CML), die akute lymphatische Leukämie (ALL). Die CML ist durch das krankheitsspezifische BCR::ABL1 Fusionsgen charakterisiert, über das die Resterkrankung gemessen und somit die Therapie gesteuert werden kann.^{51,52} Bei der ALL steht mit der Bestimmung des Gens für die schwere Kette der Immunglobulin (Immunoglobulin heavy chain, IGH) ebenfalls ein stabiler und per PCR sehr gut nachweisbarer Marker zur Verfügung.⁵³

Bei Erkrankungen wie der AML lassen sich zwar somatische Mutationen nachweisen, die als MRD-Marker in Frage kämen, jedoch stellt die klonale Evolution eine besondere Herausforderung dar. So können Marker, die initial nachweisbar waren, z.T. im Rezidiv verloren gehen.^{54,55} Dieses Problem kann mittels Next-Generation Sequencing (NGS) adressiert werden, jedoch sind dafür jeweils Panelsequenzierungen notwendig, die in der bioinformatischen Auswertung aufwendig sind und deren Sensitivität stark von der eingesetzten Materialmenge abhängt.⁵⁶ Die Mehrfarb-Durchflusszytometrie (MCF) stellt eine Möglichkeit dar, eine aberrante Antigenexpression bei der AML als MRD-Marker zu nutzen. Dabei besteht auch dort die Herausforderung, einen Assay zu nutzen, der dem möglichen Verlust von Antigenen Rechnung trägt. Mit dem Assay, der von Schuurhuis et al publiziert wurde, kann aber auf diese Problematik eine Antwort gegeben werden.⁵⁷ Inwieweit der Assay sich auch für die Situation nach allo-HSCT einsetzen lässt, wurde in einer Arbeit unserer Klinik untersucht.⁵⁸

Messenger- bzw. mRNA ist ein direkter Marker für die Transkription von Genen, die mit der malignen Zellpopulation assoziiert sind. Die Sensitivität der mRNA-Analyse über eine Reverse-Transkription /

quantitative PCR (RT-qPCR) hängt stark von der Fähigkeit ab, spezifische, tumorassoziierte Transkripte zu erkennen. Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit und der spezifischen Expression bestimmter Gene in Krebszellen (wie z. B. Fusionsgene in Leukämien) kann die RT-PCR eine sehr hohe Sensitivität für die Detektion von MRD bieten, vor allem, wenn tumor-spezifische Transkripte nachgewiesen werden. Aufgrund der begrenzten Anzahl geeigneter molekularer Marker ist diese Methode jedoch nur für 40-50% der AML-Patienten geeignet.^{59,60} Ein Nachteil der mRNA ist ihre relative Instabilität im Probenmaterial sowie die aufwendigere Gewinnung. Genomische DNA ist stabiler und leichter in verschiedenen Probenmaterialien (z. B. Blut, Knochenmark) zu detektieren. Sie ist weniger anfällig für Abbauprozesse und ermöglicht daher eine bessere Langzeitaufbewahrung von Proben. DNA-basierte MRD-Tests per qPCR sind besonders gut geeignet, wenn es darum geht, bekannte genetische Mutationen oder Rearrangements zu erkennen, die mit dem Tumor assoziiert sind (z. B. durch Fusionsgene, Punktmutationen oder CNVs – Copy Number Variations). Ein deutlicher Nachteil gegenüber mRNA-basierten Tests ist die geringere Sensitivität, da von der jeweiligen Mutation nur 1 bis max. 2 Kopien pro Zelle vorliegen, während von einem mutierten Gen Tausende Transkripte pro Zelle gebildet werden können. Umgekehrt sind DNA-basierte Tests nicht transkriptionsabhängig. NGS und digitale (d) PCR zum MRD-Nachweis befinden sich noch in der Entwicklung und werden bisher nur in wenigen Zentren angewendet.⁶¹

1.1.8.1 Vergleich verschiedener Methoden zur Diagnostik und Überwachung hämatologischer Erkrankungen: Sensitivität, Präzision und klinische Anwendung

Für die molekulare Untersuchung von Leukämien und anderen hämatologischen Erkrankungen stehen verschiedene diagnostische Methoden zur Verfügung, die sich in ihrer Sensitivität, Genauigkeit und Anwendbarkeit unterscheiden. Die Wahl der Methode hängt oft von der klinischen Fragestellung, den Ressourcen und den jeweiligen Zielsetzungen der Analyse ab.

- **Multiparametrische Durchflusszytometrie (MFC)**

Die MFC ist eine weit verbreitete Methode zur Analyse von hämatologischen Neoplasien mit einer Sensitivität von etwa 10^{-4} . Sie kann allerdings auch zur MRD-Messung mit einer Sensitivität von 10^{-6} eingesetzt werden.^{62,63} Sie ist relativ schnell durchführbar. Allerdings ist es oft schwierig, bestimmte Zelltypen, wie z. B. ALL-Blasten und Hämatogonen, sicher zu unterscheiden. MFC erfordert technisches Fachwissen und kann durch immunphänotypische Verschiebungen (auch „Antigen Shifting“ genannt) verfälscht werden. Zudem gibt es nach wie vor Herausforderungen in der Standardisierung dieser Methode, was zu unerwünschter Variabilität in den Ergebnissen führen kann. Sie ist besonders nützlich für die Detektion von MRD bei Leukämien und Lymphomen.^{3,58}

- **RT-qPCR für IgH/TCR-Rearrangements**

Die **RT-qPCR für IgH/TCR-Rearrangements** ist eine sehr sensitive Methode und bietet eine hohe Standardisierung. Sie wird verwendet, um rekombinierte Gensequenzen der Immunzellen zu analysieren, was bei der Diagnose und Überwachung lymphatischer Leukämien hilfreich ist. Diese Methode ist jedoch zeitaufwändig und arbeitsintensiv. Hauptsächlichster Nachteil ist, dass dieses Verfahren nur bei lymphatischen Neoplasien angewendet werden kann, da myeloische Neoplasien keine IgH-TCR Rearrangements aufweisen.^{64,65}

- **RT-qPCR/ qPCR für Genfusionen und spezifische Mutationen**

Die RT-qPCR für Genfusionen und Mutationen hat eine Sensitivität von bis zu 10^{-6} . Sie ist vergleichsweise einfach durchführbar, da sie auf der Verwendung von Standardprimern basiert. Allerdings ist diese Methode nur bei einem begrenzten Teil der Patienten mit akuten Leukämien anwendbar: weniger als 50 % der ALL- und etwa 30 % der AML-Fälle^{60,66}, dafür aber bei der Mehrheit der CML-Patienten (BCR::ABL; CML) sowie zum Nachweis spezifischer driver-Mutationen bei MF-Patienten (JAK2V617F, etc.) per RT-qPCR.⁶⁷ Der Nachweis der Treiber-Mutationen auf gDNA-Ebene per qPCR erlaubt routinemäßig Sensitivitäten von bis zu 10^{-4} .

- **Digitale PCR (dPCR)**

Die Digitale PCR (dPCR) ist eine weitere äußerst sensitive Methode zur Detektion von Mutationen. Sie teilt einige der Vorteile von NGS (s.u.), bietet jedoch eine größere Präzision bei der Quantifizierung seltener Mutationen und ermöglicht den absoluten Nachweis von Mutationen ohne die Notwendigkeit von Standardkurven.^{68,69} Da die dPCR sehr präzise ist, eignet sie sich hervorragend für die MRD-Überwachung und für die Erkennung von Mutationen mit sehr niedriger Häufigkeit.^{70,71}

Vorteile der dPCR: Die hochsensitive und sehr reproduzierbare dPCR ist kostengünstiger als das NGS. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Datenanalyse weniger komplex und somit schneller ist.

Nachteile der dPCR: Die Anwendung von dPCR ist auf bekannte Mutationen beschränkt, im Gegensatz zum NGS, das eine breitere Palette genetischer Veränderungen aufdecken kann. Daher eignet sich dPCR weniger für die Entdeckung neuer Mutationen. Auch wenn die Methode technisch weniger komplex ist als NGS, erfordert sie dennoch Fachwissen und optimierte Protokolle für eine zuverlässige und reproduzierbare Durchführung.

- **Eignung und Anwendungsbereiche der dPCR**

Die dPCR ermöglicht die präzise Quantifizierung sowohl niedrig konzentrierter Pathogene als auch seltener genetischer Sequenzen, seltener Mutationen, von Kopiezahlvarianten sowie der relativen Genexpressionen. Sie eignet sich darüber hinaus hervorragend zur Chimärismusanalyse und wird zunehmend in der klinischen Diagnostik, der Forschung und der Forensik eingesetzt.^{68,72} Bei der dPCR wird die Amplifikation in einer Vielzahl von Reaktionskammern oder Partitionen durchgeführt, wodurch eine zuverlässigere Erfassung und empfindlichere Messung von Nukleinsäuren ermöglicht wird. Die Ergebnisse werden ermittelt, indem die Anzahl der Partitionen mit amplifizierten Zielsequenzen (= positive Partitionen) wie auch die ohne Amplifikation (= negative Partitionen) anhand von Fluoreszenzsignalen gemessen wird.⁷³ Die Berechnung der mittleren Anzahl von Zielsequenzen erfolgt mittels Poisson-Algorithmus, der Mehrfachkopien des Zielgens in einzelnen Tropfen berücksichtigt. Aufgrund der Kompartimentalisierung ist die Methode weniger anfällig für Inhibitoren im Vergleich zur quantitativen PCR (qPCR).⁷³

Das in dieser Arbeit benutzte QX100-System der Firma Bio-Rad basiert auf der Kompartimentalisierung des 20-µl-Reaktionsansatzes in ca. 20.000 sog. droplets (Lipidtröpfchen) mit einem Volumen von 1 nL. Aufgrund der Poisson-Korrektur deckt die dPCR damit einen dynamischen Messbereich von rund 0-120.000 ab. Es verfügt über zwei Fluoreszenzdetektoren und ermöglicht daher die gleichzeitige Analyse von zwei Parametern in einer duplex-PCR. Das neuere QX600-System von Bio-Rad bietet sogar die Möglichkeit einer 6-Farben-Analyse, die eine differenzierte Analyse mehrerer Zielmoleküle in einer Probe erlaubt. Andere dPCR-Geräte nutzen Array-Technologien, um eine physische Trennung des Reaktionsansatzes in (möglichst viele) Kompartimente zu erreichen und ermöglichen ebenfalls Mehrfachbestimmungen über Multiplex-Ansätze.

- **Praktische Einschränkungen und empfohlene Sensitivität**

Für die Chimärismusanalyse in der Routinediagnostik reicht eine Sensitivität von etwa 0,03 % aus, um zuverlässige Ergebnisse zu gewährleisten und Kontaminationen, etwa durch Empfängerzellen in Blut- oder Knochenmarkproben, zu minimieren.^{68,72,74} Die dPCR-Technologie zeigt großes Potenzial für die MRD-Diagnostik und wird zunehmend zur Mutationsanalyse in der Onkologie sowie bei myeloproliferativen Neoplasien und Leukämien verwendet, wie z. B. bei der Analyse von *JAK2V617F*⁷⁵- und *CALR*-Mutationen^{70,71} sowie des *NPM1*-Gens bei AML.⁷⁶

Darüber hinaus hat sich die dPCR auch als wertvolles Werkzeug zur Messung von zellfreier DNA (cfDNA) etabliert, die zunehmend für Anwendungen wie die Mutationsanalyse bei Krebs eingesetzt wird.⁷⁷ Da seltene Mutationen oft in sehr geringer Konzentration in cfDNA vorhanden sind, lässt sich die Sensitivität durch das parallele Durchführen mehrerer Läufe erheblich steigern.

Zusammengefasst bietet die dPCR eine hochpräzise und sensitive Analysemethode, die für die Molekulardiagnostik, die MRD-Überwachung, genetische Mutationsanalyse und die Forensik von erheblicher Bedeutung ist.

• **Next-Generation-Sequencing (NGS)**

Die NGS-Technologie kann eine hohe Sensitivität bieten (bis zu 10^{-5}) und ermöglicht durch die parallele Sequenzierung vieler potenziell relevanter Gene die Erkennung von Subklonen und klonaler Evolution. NGS ist zudem relativ schnell und eine ausgezeichnete Methodik, um die klonale Zusammensetzung und Evolution von Myelomzellen hochauflösend zu analysieren. Thiele et al. haben in einer Studie gezeigt, dass NGS den sensitiven Nachweis von post-switch klonotypischen Rearrangements ermöglicht.⁷⁸ Die Analyse kann aufgrund der Datenmenge jedoch sehr komplex sein und erfordert fortgeschrittenes technisches Wissen. Ein weiteres Hindernis ist die noch fehlende Standardisierung der Methode und die minimale klinische Validierung, was ihre breite Anwendung in der Routine noch limitiert.^{1,2,79}

Im Gegensatz zur klassischen Sanger-Sequenzierung bietet die NGS-Technologie die Möglichkeit, in einem einzigen Schritt hunderte bis tausende Gene gleichzeitig zu sequenzieren, wodurch selbst kleinste Veränderungen in der DNA wie Mutationen, oder kleine Insertionen / Deletionen (Indels) erfasst werden können.⁸⁰

Es gibt viele unterschiedliche NGS-Techniken, die je nach dem diagnostischen Ziel eingesetzt werden. Dazu gehören gezielte Panels, die eine Auswahl relevanter Gene beinhalten, oder eine umfassende Analyse des gesamten Genoms (Whole Genome Sequencing, WGS) bzw. der kodierenden Bereiche des Genoms (Whole Exome Sequencing, WES). Des Weiteren kann auch das Transkriptom, also die gesamte exprimierte RNA der Zellen analysiert werden, oder, alternativ, einzelne, pathogenetisch relevante transkribierte Gene. Für diese Verfahren ist in der Regel eine kleine Gewebeprobe, meistens eine Blutentnahme von 2 bis 3 ml, ausreichend.

NGS-Verfahren beruhen auf unterschiedlichen Technologien, auf die hier nicht im Detail eingegangen werden kann (zur Übersicht siehe ⁸¹). In der vorliegenden Arbeit wurde die sog. **Pyrosequenzierung** benutzt. Dabei werden die DNA-Basen einzeln zu einer Reaktionsmischung hinzugefügt, die mit Pyrophosphat verbunden ist. Wenn eine Basenpaarung erfolgt, wird Pyrophosphat freigesetzt. Dieses wird in einer enzymatischen Kaskade zu Adenosinatriphosphat (ATP) umgewandelt. Das ATP löst eine chemische Reaktion aus, die im Rahmen eines Luciferin-Luciferase-Systems Licht produziert. Dieses Licht wird von einem Detektor aufgezeichnet, um die Sequenz der DNA zu bestimmen ^{82,83}.

Weitere häufig verwendete Verfahren sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden:

- ***Illumina-Sequenzierung***

Die Illumina-Sequenzierung basiert auf dem Verfahren des „Sequencing-by-Synthesis“. Dabei sind die DNA-Nukleotide mit einem fluoreszierenden Farbstoff und einem Terminator gekoppelt. Wenn die Basen in der richtigen Reihenfolge einander paaren, wird der Farbstoff aktiviert, und das emittierte Licht wird von einem Detektor registriert. Nach jeder Basenpaarung wird der Terminator entfernt, wodurch der nächste Nukleotid-Einbau ermöglicht wird, und der Zyklus wiederholt sich.⁸⁴

- ***SOLiD-Sequenzierung***

Die SOLiD-Sequenzierung nutzt das Prinzip des „Sequencing-by-Ligation“. In diesem Verfahren kommen 16 unterschiedliche Oligonukleotid-Sonden zum Einsatz, die jeweils mit einem spezifischen Farbstoff markiert sind. Jede Sonde enthält zwei feste Basen und sechs variable Basen. Ein Primer bindet an einen Adapter, und mithilfe einer Ligase wird die passende Oligonukleotidsonde an das zu sequenzierende DNA-Molekül angeheftet. Das Signal des Farbstoffs wird anschließend erfasst, um die DNA-Sequenz zu entschlüsseln.⁸⁵

- ***Halbleiter-Sequenzierung***

Bei der Halbleiter-Sequenzierung werden DNA-Cluster auf einem Halbleiter-Chip platziert, der als pH-Sensor fungiert. Wenn eine Basenpaarung stattfindet, wird ein Proton freigesetzt, das eine pH-Wert-Veränderung zur Folge hat. Diese Änderung im pH-Wert wird vom Halbleiter erfasst und dient dazu, die Sequenz der DNA zu bestimmen.⁸¹

- **NGS Nachteile:**

Neben den o.g. Vorteilen hat die NGS-Analyse auch einige bedeutende Nachteile. Einer der Hauptnachteile sind die hohen Kosten, sowohl für die Durchführung der Sequenzierung als auch für die notwendige Auswertung und Datenanalyse. Die Analyse der riesigen Datenmengen, die durch NGS erzeugt werden, erfordert spezialisierte Software und Bioinformatik-Expertise, was den gesamten Prozess komplex und zeitaufwendig macht. Dazu kommt, dass die Interpretation der Ergebnisse oft schwierig ist, insbesondere wenn es sich um unbekannte oder seltene genetische Varianten handelt.

Ein weiteres Problem sind die potenziell falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnisse, die insbesondere bei unzureichender Probenqualität oder geringer Sequenzierungstiefe auftreten können. Auch die Qualität und Quantität der Ausgangs-DNA oder -RNA spielen eine wichtige Rolle – minderwertige Proben können die Genauigkeit der Ergebnisse beeinträchtigen. Zudem kann NGS bei der Erkennung struktureller Varianten wie Translokationen oder größeren Insertionen und Deletionen limitiert sein, was die Sensitivität für bestimmte genetische Veränderungen einschränkt.

Technische Fehler und Bias, etwa durch PCR, können ebenfalls zu einer ungleichmäßigen Abdeckung des Genoms führen und somit die Zuverlässigkeit der Ergebnisse beeinträchtigen. Darüber hinaus kann die Validierung von NGS-Ergebnissen eine weitere Herausforderung darstellen, da häufig zusätzliche Techniken erforderlich sind, um die entdeckten Varianten zu bestätigen. Schließlich gibt es auch ethische und rechtliche Bedenken bezüglich des Umgangs mit den sensiblen genetischen Daten, die durch NGS gewonnen werden, was Datenschutz und Vertraulichkeit betrifft.

Zusätzlich bleibt die Standardisierung von NGS-Protokollen ein ungelöstes Problem. Die Variabilität der Ergebnisse je nach Labor und verwendetem System kann die Vergleichbarkeit der Daten

beeinträchtigen. Trotz dieser Herausforderungen bleibt NGS jedoch ein äußerst wertvolles Werkzeug in der Genomforschung und klinischen Diagnostik.

Fazit:

In der modernen Diagnostik von hämatologischen Erkrankungen bietet jede Methode ihre eigenen Stärken und Schwächen:

- **MFC** ist schnell und kostengünstig, hat aber Probleme bei der Unterscheidung von Zelltypen und ist weniger sensitiv.
- **RT-qPCR**-basierte Verfahren sind gut standardisiert, hochsensitiv und im Vergleich zu NGS und MFC auch kostengünstiger. RNA-Isolationsaufwand und -Instabilität sind nachteilig.
- **NGS** bietet eine hohe Sensitivität und kann auch die klonale Evolution und das Auftreten von Subklonen erkennen, ist aber sehr komplex und weniger standardisiert.
- **dPCR** ist eine hochsensitive, gut standardisierbare Methode, die besonders bei der quantitativen Messung seltener Mutationen hervorsticht. Sie ist präziser und schneller als NGS, aber begrenzt auf die Analyse bekannter Mutationen.

Die Wahl der Methode hängt von der jeweiligen klinischen Situation, der Verfügbarkeit der Ressourcen und der Fragestellung ab. Während NGS am besten für umfassende genetische Analysen (inkl. der initialen Leukämiediagnostik) geeignet ist, bieten qPCR und dPCR hochsensitive, schnelle und kostengünstige Optionen für die Überwachung bekannter Mutationen. MFC ist vor allem dann von Vorteil, wenn keine genetischen Veränderungen der malignen Klone bekannt sind.

1.1.9 Ziel dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, innovative diagnostische Methoden zu etablieren und ihre Wertigkeit in Bezug auf die Vorhersage der individuellen Patientenprognose sowohl vor der Stammzelltransplantation als auch in der Posttransplantationsphase zu untersuchen. Mit der validierten Nutzung dieser Methoden soll die Lücke geschlossen werden, die Ärztinnen und Ärzte bei der optimalen Beratung vor einer zellulären Therapie haben, und gleichzeitig sollen Behandelnde in die Lage versetzt werden, eine minimale Resterkrankung früher als bisher zu detektieren, um so durch Intensivierung des Immuntherapeutischen Effekts die Erkrankung doch noch erfolgreich zu behandeln. Diese Zielsetzung wird an vier Publikationen verdeutlicht:

1. In der Arbeit *„Impact of TP53 on outcome of patients with myelofibrosis undergoing hematopoietic stem cell transplantation“* konnte durch eine detaillierte molekulare Analyse von *TP53* bei Patienten mit Myelofibrose gezeigt werden, dass eine Mehrfachmutation einen erheblichen Einfluss auf das Ergebnis einer allo-HSCT hat.¹
2. In der Arbeit *„A prognostic score including mutation profile and clinical features for patients with CMML undergoing stem cell transplantation“* zeigten wir, dass eine umfassende molekulare und genetische Analyse der CMML nur in Zusammenhang mit klinischen Daten eine exakte Vorhersage zum Prognose dieser Patientengruppe nach allo-HSCT ermöglicht.²
3. Weiterhin zeigten wir in der Arbeit *„Post-Transplantation Multicolored Flow Cytometry-Minimal Residual Disease Status on Day 100 Predicts Outcomes for Patients With Refractory Acute Myeloid Leukemia“* durch den Einsatz der multiparametrischen Durchflusszytometrie bei Patienten mit refraktärer AML nach allo-HSCT, dass das Vorhandensein einer MRD früh nach Transplantation (Tag 100) einen erheblichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat. Die präzise und frühe MRD-Detektion

ermöglicht es, therapeutisch frühzeitig zu intervenieren und potenziell den Behandlungserfolg zu verbessern.³

4. Eine Anwendung unserer Erkenntnisse zur MRD-gesteuerten Therapie findet sich in der Publikation „*Donor Lymphocyte Infusion and Molecular Monitoring for Relapsed Myelofibrosis After Hematopoietic Cell Transplantation*“, in der wir herausarbeiten konnten, dass sich durch die Detektion der molekularen MRD eine Möglichkeit bietet, therapeutisch mit Spender-Lymphozyten Gaben (DLI) zu arbeiten und so erneut Remissionen bei Patienten mit Myelofibrose zu erreichen.⁴

1.2 Material und Methoden zu den vier Veröffentlichungen

1.2.1 Material und Methodik zum Paper: *Impact of TP53 on outcome of patients with myelofibrosis undergoing hematopoietic stem cell transplantation*

1.2.1.1 Patienten

Insgesamt wurden 349 Patienten mit primärer oder sekundärer Myelofibrose, die sich einer ersten HSCT unterzogen hatten und bei welchen Informationen zum Mutationsprofil und zur Zytogenetik vorlagen, einbezogen. Die Patientendaten wurden vom Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Hamburg, Deutschland); dem westdeutschen Krebszentrum (Essen, Deutschland); dem Hôpital Saint-Louis (Paris, Frankreich); dem Fred Hutchinson Cancer Research Center (Seattle, USA); dem Leukämieprogramm, Abteilung für Hämatologie und medizinische Onkologie, Cleveland Clinic (Cleveland, USA); der Abteilung für Hämatologie, Brabois-Krankenhaus, Centre Hospitalier Régional Universitaire (Nancy, Frankreich); und der Medizinischen Hochschule Hannover (Hannover, Deutschland) gesammelt. Patienten mit MF, die sich zum Zeitpunkt der HSCT in der Progression zur akuten Leukämie befanden, wurden ausgeschlossen. Die Patienten mussten die HSCT vor 2021 erhalten haben. Alle relevanten klinischen und transplantationsrelevanten Variablen sowie Proben für Sequenzierungs- und Zytogenetikanalysen wurden zum Zeitpunkt der HSCT gesammelt. Die Konditionierungsregime und Dosisintensitäten wurden zuvor berichtet. Die Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Aktuelle Risikostratifizierungen einschließlich des dynamischen International Prognostic Scoring System (DIPSS)⁸⁶, der mutationsgestützten IPSS (MIPSS70)⁸⁷ und des Transplantations-Score-Systems für Myelofibrose (MTSS) wurden zum Zeitpunkt der HSCT berechnet.⁷⁹ Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 1 der Publikation zu finden.¹

1.2.1.2 Mutationsanalyse und Zytogenetik

Knochenmark- oder periphere Blutproben wurden vor der Transplantation entnommen und Mutationen wurden per NGS nachgewiesen.⁸⁸ Zytogenetische Analysen und Berichterstattung wurden gemäß den Kriterien des Internationalen Systems für die menschliche Zytogenetik unter Verwendung standardisierter Techniken durchgeführt. Zytogenetische Risikoklassifikationen wurden gemäß früheren Berichten angewendet.⁸⁹ Molekulare Hochrisiko-Mutationen (HMR) wurden entsprechend Vannucchi et al.^{29,87} kategorisiert.

Das Tumorsuppressorgen *TP53* spielt eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur, der Apoptose und der Regulation des Zellzyklus. Während zellulärem Stress stoppt *TP53* das Zellwachstum und repariert DNA-Schäden. *TP53* ist in mehr als der Hälfte aller Krebsarten verändert. Für die gezielte Sequenzierung wurden 20 ng für die manuelle Library-Vorbereitung mit dem Ion AmpliSeq Library Kit Plus in 3 Schritten verwendet (DNA-Ziel Amplifikation, partieller Verdau (digest) der Amplicons und Ligation von Adaptern an die Amplicons sowie Reinigung). Das Ion AmpliSeq *TP53* Panel ist ein 2-Pool-Panel mit 24 Amplicons, das alle kodierenden Exons des *TP53*-Gens umfasst und als Community Panel

von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bereitgestellt wird. Die Quantifizierung der Library erfolgte mittels qPCR. Aus der fertigen Bibliothek wurden 50 µl für den nächsten Schritt, das sogenannte Templating, mithilfe des ION Chef via Ion 540™ Kit-Chef verwendet. Die Sequenzierung wurde auf Ion S5 Plus (Thermo Fisher Scientific) mit einem 540-Chip durchgeführt. Die Ampliconlänge lag zwischen 125 und 175 Basenpaaren (bp). Die durchschnittliche Abdeckung (coverage) betrug ca. 8.000-10.000x bei einer Abdeckungs gleichmäßigkeit (uniformity) von 95%. On-Target-Reads waren 97%, und die durchschnittliche Abdeckungstiefe betrug 92%. Der Analyse-Workflow war spezifisch für dieses Panel und wurde auf Ion Reporter entwickelt.

1.2.1.3 Endpunkte und statistische Analyse

Der primäre Endpunkt der Studie war das Gesamtüberleben, welches als die Zeit von der HSCT bis zum letzten Follow-up oder Tod aus jeglicher Ursache definiert wurde. Sekundäre Endpunkte waren die leukämische Transformation, die nicht-rezidivbedingte Mortalität (NRM), das progressionsfreie Überleben und die kumulative Gesamtinzidenz des Rückfalls. Das progressionsfreie Überleben wurde definiert als die Zeit von der Transplantation bis entweder zum Rückfall oder Tod aus jeglicher Ursache. Die NRM wurde als Tod aus jeglicher Ursache definiert, wobei der Rückfall als konkurrierendes Risiko betrachtet wurde. Die Überlebenswahrscheinlichkeiten wurden mittels Kaplan-Meier-Schätzungen berechnet. Wahrscheinlichkeiten der NRM und des Rückfalls wurden mit der kumulativen Inzidenzfunktion unter Berücksichtigung konkurrierender Risiken berechnet. Multivariable Analysen wurden durchgeführt, um Assoziationen zwischen *TP53*-Mutationen, Zytogenetik, patientenbezogenen, krankheitsbezogenen, spenderbezogenen und HSCT-bezogenen Variablen sowie den interessierenden Ergebnissen zu evaluieren. Hierzu wurde ein Cox-Proportional-Hazards-Regressionsmodell für Überleben und ein Fine- und Gray-Modell für konkurrierende Risikofaktoren verwendet. Hazard Ratios (HRs) mit den entsprechenden 95%-Konfidenzintervallen (CIs) wurden berechnet. Eine rückwärts gerichtete schrittweise Selektion wurde verwendet, um signifikante Kovariaten zu identifizieren, die die Ergebnisse beeinflussten. Interaktionsanalysen wurden für univariate und multivariate Analysen durchgeführt. Die Vorhersagekraft des Modells wurde durch die Schätzung der Diskriminationsfähigkeit, gemessen mit dem Konkordanzindex sowie der zeitabhängigen Fläche unter der Kurve, bewertet. Ein Schwellenwert von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Bei fehlenden Informationen wurde eine multiple Imputation verwendet.

Alle Analysen wurden mit der R-Software Version 3.6.1 (R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>) durchgeführt.

1.2.2 Material und Methodik zum Paper: *A prognostic score including mutation profile and clinical features for patients with CMML undergoing stem cell transplantation*

1.2.2.1 Patienten und Studiendesign

An dieser internationalen multizentrischen Studie nahmen insgesamt 240 CMML-Patienten aus 10 Zentren teil, die sich einer ersten allo-HSCT unterzogen hatten und zum Zeitpunkt der Transplantation gemäß den Kriterien der revidierten Weltgesundheitsorganisation (WHO) Klassifikation von 2016 für myeloide Neoplasien diagnostiziert worden waren.⁹⁰ Die teilnehmenden Zentren waren das Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Hamburg, Deutschland), das Universitätsklinikum Essen (Essen, Deutschland), das Universitätsklinikum Carl Gustav Carus (Dresden, Deutschland), die Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf, Deutschland), das Medizinische Zentrum - Universität Freiburg (Freiburg, Deutschland), das Universitätsklinikum Heidelberg

(Heidelberg, Deutschland), die Medizinische Hochschule Hannover (Hannover, Deutschland), das Hôpital Saint-Louis (Paris, Frankreich), das Radboud-Universitätsklinikum (Nijmegen, Niederlande) und das Fred Hutchinson Cancer Research Center (FHCRC) (Seattle, Washington). Die Ergebnisse aus der Kohorte des FHCRC wurden kürzlich veröffentlicht⁹¹, und nur die CMML-Patienten aus dieser Kohorte, für die Daten zum Mutationsstatus vorlagen, wurden in diese Studie aufgenommen. Die Transplantation erfolgte zwischen 1996 und 2019, und Patienten mit CMML, die zum Zeitpunkt der Transplantation bereits zu akuter Leukämie fortgeschritten waren, wurden ausgeschlossen. Akute Leukämie wurde definiert als mindestens 20% Blasten im peripheren Blut oder Knochenmark. Diese Studie wurde von den örtlichen institutionellen Ethikkommissionen genehmigt. Die durchgeführten Verfahren entsprachen der Deklaration von Helsinki von 1975, wie sie 2000 überarbeitet wurde. Patientencharakteristika sind in Tabelle 1 der Publikation zu finden.²

1.2.2.2 Mutations- und Zytogenetikanalysen

Die zytogenetische Analyse erfolgte gemäß den Kriterien des Internationalen Systems für die Nomenklatur der menschlichen Zytogenetik unter Verwendung standardisierter Techniken.⁹² Die zytogenetische Risikokategorie wurde gemäß der zuvor etablierten zytogenetischen Risikostratifizierung definiert.⁹² Aktuelle prognostische Analysen, die für die nicht-transplantationsbezogene CMML entwickelt wurden, wie der MD Anderson Prognose-Score (MDAPS)⁹³, das CMML-spezifische prognostische Bewertungssystem (CPSS) und seine molekulare Anpassung und Erweiterung (CPSS-mol)⁹⁴, das Molekulare Mayo-Modell⁹⁵ (MMM) und das Groupe Francophone de Myelodysplasies (GFM), wurden verwendet, um den jeweiligen Score zum Zeitpunkt der Transplantation zu berechnen.⁹⁶ Die Mutationsanalyse wurde an 20 ng genomischer DNA aus Zellen aus dem Knochenmark oder aus peripherem Blut, die vor der Transplantation gesammelt worden waren, durchgeführt. Die meisten Proben (114 von 240) wurden zentral in Hamburg analysiert (einschließlich aller Proben aus Hamburg, Hannover und Dresden, 27 Proben aus Essen und 8 Proben aus Düsseldorf). Für die Analyse wurde eine Amplicon-basierte NGS mit einem benutzerdefinierten Panel, bestehend aus 313 Amplicons in 2 Primerpools (Pool 1 mit 159 Amplicons und Pool 2 mit 154 Amplicons) für 18 verschiedene Gene durchgeführt. Die Amplicons überspannten folgende Regionen: *ZRSR2*, *TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, *TP53*, *DNMT3A*, *SF3B1*, *SH2B3*, *SRSF2* (vollständige Gene), *KRAS*, *NRAS* Codons 12-13 und 61), *U2AF1* (Exons 2 und 4), *RUNX1* (Exons 1-8), *CBL* (Exons 8-9), *ETV6* (Exon 8), *IDH1* (Exon 4), *IDH2* (Exon 4) und *SETBP1* (Exon 4). Die Amplicon-Größe lag zwischen 125 und 225 bp und die Panelgröße betrug 45,01 kb. Die Sequenzierung wurde für alle Patienten unter Verwendung einer Ion Personalized Genome Maschine (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Mutationen in *JAK2*V617F wurden per dPCR als Mutationsnachweis im QX100 (Bio-Rad, Foster City, CA; Katalognummer dHsaCP2000062 für WT-Gen, HEX-markiert, und dHsaCP2000061 für Mutation V617F, FAM-markiert) bestimmt. Das Panel und die Analysen wurden von Anfang an als Teil des üblichen klinischen Prozesses in Hamburg konzipiert, und die Proben wurden vor der Transplantation entnommen.^{91,97} Detaillierte Informationen zur Mutationsanalyse sind in der angehängten Veröffentlichung zu finden.²

1.2.2.3 Statistische Analyse

Die Patienteneigenschaften wurden als Anzahl und Prozentsätze oder Median und Spanne zusammengefasst. Für den Vergleich kategorialer Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Um den Anteil der durch den Genotyp erklärten Variabilität des klinischen Phänotyps abzuschätzen, wurde ein lineares Regressionsmodell eingesetzt. Das Follow-up wurde mit der inversen Methode berechnet. Der primäre Endpunkt des Gesamtüberlebens wurde als die Zeit vom Datum der

Transplantation bis zum Tod aus jeglicher Ursache definiert. Das sekundäre Ziel der kumulativen Inzidenz der NRM wurde mit einem Ansatz unter Berücksichtigung konkurrierender Risiken geschätzt, wobei der Rückfall als konkurrierendes Ereignis betrachtet wurde. Die Überlebensverteilung wurde mit der Kaplan-Meier-Methode geschätzt und durch den Log-Rank-Test verglichen. Hazard Ratios (HR) und die entsprechenden 95%-Konfidenzintervalle (CI) wurden für Variablen in univariaten und multivariaten Analysen unter Verwendung der Cox-Regression berechnet. Die Proportionalitätsannahme der Hazardfunktion wurde durch visuelle Inspektion und Prüfung der Schoenfeld-Residuals validiert. Der Effekt quantitativer Kovariaten auf die NRM wurde durch das Fine-Gray-Regressionsmodell geschätzt.

Interaktionsanalysen zwischen Kovariaten wurden durch die Einführung von Interaktionstermen in univariaten und multivariaten Modellen getestet, und bei fehlenden Informationen wurde eine multiple Imputation verwendet. Das endgültige Modell für das Überleben wurde basierend auf klinischer Einschätzung und der Bewertung der Diskriminationsfähigkeit des Modells durch den Konkordanzindex ausgewählt. Der Konkordanzindex gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass bei zwei zufällig ausgewählten Patienten derjenige, der das Ereignis zuerst erlebte, laut Modell eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Ereignis hatte. Ein Konkordanzindex von 0,5 repräsentiert eine Übereinstimmung, die rein zufällig ist, während ein Wert von 1 eine perfekte Diskriminierung darstellt. Die Genauigkeit der Vorhersagen wurde durch die Schätzung der Kalibrierung des Modells weiter bewertet, und die Leistungsfähigkeit des Modells wurde mittels 10-facher Kreuzvalidierung überprüft. Für die endgültige Prognosebewertung wurden Punkte relativ zu den Beta-Koeffizienten aus dem multivariaten Modell vergeben.

Alle Werte mit $P < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet und alle Analysen wurden mit der R-Software Version 3.6.1 (R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>) durchgeführt.

1.2.3 Patienten und Methodik zum Paper: *Post-Transplantation Multicolored Flow Cytometry-Minimal Residual Disease Status on Day 100 Predicts Outcomes for Patients with Refractory Acute Myeloid Leukemia*

1.2.3.1 Patienten, Studiendesign und Methodik

In diese retrospektive, monozentrische Studie wurden erwachsene (≥ 18 Jahre) Patienten eingeschlossen, die an AML erkrankt waren, die Kriterien für eine komplette Remission (CR) vor der allo-HSCT nicht erfüllten, eine allo-HSCT nach myeloablativer Konditionierung oder RIC erhielten, am Tag 100 nach der Transplantation mindestens einen morphologisch leukämiefreien Zustand im Knochenmark erreicht hatten (morphologische Blastenzahlen $< 5\%$) und für die verfügbare MFC-MRD-Daten am Tag 100 nach der allo-HSCT vorlagen. Zur Bestimmung des krankheitsabhängigen Risikos wurden die genetischen ELN-Kriterien (2017) verwendet.⁹⁸ Kriterien für das Ansprechen auf die Therapie entsprachen einem internationalen Konsensus.⁹⁹ Alle Patienten stimmten der Studienteilnahme gemäß der Deklaration von Helsinki zu. Der Follow-up-Stand war aktuell bis zum 15. August 2021. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 1 der Publikation zu finden.³ Immunphänotypische Analysen wurden am Tag 100 nach der allo-HSCT an Knochenmarksproben nach den zuvor ausführlicher beschriebenen Standardverfahren für Färben-Lyse-Waschen-Techniken durchgeführt.⁵⁸ Es wurde eine achtfarbige Immunfärbung mit direkt Fluorochrom-konjugierten, monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Die Analyse erfolgte gemäß den ELN-

Konsensempfehlungen.⁵⁷ Bis zu 2.000.000 Events pro Röhrchen (6.000.000 Events pro Probe) wurden ausgewertet. Alle Antikörper wurden von Beckman-Coulter Inc. (Southfield, USA) oder Becton Dickinson (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) bezogen. Die Auswertung der Dateien erfolgte unter Verwendung der Infinicyte-Flow cytometry-Software (Cytognos, Salamanca, Spanien). Die Bewertungen wurden unter Verwendung des LAIP und der "abweichend von normal" Strategie durchgeführt. Gemäß den ELN-Richtlinien definierte ein Schwellenwert von 0,1 % oder mehr aberranter Zellen (Kombination aus der Bewertung aberranter Hämatopoese und LAIP-positiver Zellen) im Knochenmark die MRD-Positivität⁵⁷, dies wurde als limit of quantification (LOQ) definiert und lag bei 10^4 bis 10^5 .

1.2.3.2 Statistische Analyse

Die Wahrscheinlichkeiten für das Gesamtüberleben (OS) und das leukämiefreie Überleben (LFS) wurden unter Verwendung der Kaplan-Meier- und Cox-Regressionsmethoden geschätzt. Die Wahrscheinlichkeiten für NRM und Rückfall wurden anhand der kumulativen Inzidenz zusammengefasst. NRM wurde als Tod ohne Rückfall definiert und galt als konkurrierendes Risiko für Rückfälle, während Rückfälle ein konkurrierendes Risiko für NRM darstellten. Variablen mit einem P-Wert $\leq 0,10$ wurden als signifikant betrachtet und in die multivariate Analyse einbezogen. Die multivariate Analyse zum Vergleich von NRM und Rückfällen basierte auf einem sub-verteilten Hazard-Modell für die kumulative Inzidenz. Die Wahrscheinlichkeit, eine akute (Grad II-IV) GVHD und eine chronische GVHD zu entwickeln, wurde durch Berechnung der kumulativen Inzidenz mit Tod ohne GVHD als konkurrierendes Risiko dargestellt. Kategoriale Merkmale wurden mit dem Pearson- oder Fisher-Exakt-Test verglichen. Kontinuierliche Variablen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test verglichen. Die statistische Analyse wurde mit IBM SPSS Version 25 (SPSS, Inc., Chicago, USA) und der R-Software Version 3.5.1 (R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>) durchgeführt,

1.2.4 Patienten und Methodik zum Paper: *Donor Lymphocyte Infusion and Molecular Monitoring for Relapsed Myelofibrosis after Hematopoietic Cell Transplantation*

1.2.4.1 Patienten und Studiendesign

Es wurden Patienten mit primärer oder sekundärer Myelofibrose (entstanden entweder aus PV oder ET) eingeschlossen, die zwischen 2002 und 2019 allogene transplantiert worden waren (erste oder zweite allo-HSCT) und zudem DLI zur Behandlung eines molekularen oder hämatologischen Rezidivs in unserer Klinik erhielten. Hämatologische Rückfälle traten häufiger in den früheren Jahren auf, bevor die standardisierte Implementierung der molekularen Überwachung gemäß den institutionellen Richtlinien erfolgte. Alle Patienten erhielten eine RIC mit Busulfan-Fludarabin und anti-T-Lymphozyten-Globulin (ATLG) als GvHD-Prophylaxe, wie kürzlich berichtet.¹⁰⁰ Patienten, die eine zweite allo-HSCT erhielten, wurden am Tag der zweiten Transplantation zensiert. Patienten mit transformierter akuter Leukämie zum Zeitpunkt der Transplantation oder des Rückfalls wurden aus der Studie ausgeschlossen. Patienten waren berechtigt, DLI zu erhalten, wenn sie frei von GvHD und keine immunsuppressive Therapie erhielten (Abbildung 1 aus Publikation⁴). Bei Patienten mit Rückfall, die immer noch prophylaktische Immunsuppression erhielten, wurde die Immunsuppression mindestens 4 Wochen vor der Verabreichung eskalierender DLI-Dosen abgesetzt. Wenn innerhalb von 6 Wochen keine GvHD oder Reaktion auftrat, wurde eine weitere eskalierende Dosis (halb-logarithmisch) von DLI verabreicht. Die übliche Ausgangsdosis betrug nach HLA-identischer Geschwister-HSCT 1×10^6 CD3+ Zellen pro kg Körpergewicht (KG) und 5×10^5 CD3+ Zellen nach allo-HSCT von nicht-verwandten

Spendern, was zu einer medianen Dosis des ersten DLI von $1 \times 10^6/\text{kg KG}$ führte (Spanne: $1 \times 10^5 - 1 \times 10^7$), gefolgt von einer anschließenden halb-logarithmisch eskalierten Dosis nach mindestens 6 Wochen, wenn keine Reaktion und keine GvHD auftraten (Abbildung 1 aus Publikation ⁴). Bei Patienten mit hohem Risiko für oder vorhandener Infektion zum Zeitpunkt des Rückfalls wurden CD4-selektierte DLI verwendet.

1.2.4.2 Statistische Analyse

Die primären Endpunkte waren molekulare komplette Remission (mCR), das Auftreten von akuter und chronischer GvHD, ereignisfreies Überleben (EFS) und OS. Die Patienteneigenschaften wurden für kontinuierliche Variablen mit Median und Spanne sowie für kategoriale Variablen mit Häufigkeiten beschrieben. EFS wurde definiert als die Zeit zwischen Beginn der DLI-Behandlung bis zum Rückfall, Fortschreiten der Erkrankung, Tod aus jeglicher Ursache oder einer nachfolgenden allo-HSCT. Kontinuierliche Variablen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test und dem Kruskal-Wallis-Test untersucht, kategoriale Variablen mit dem Chi-Quadrat-Test. Überlebenskurven wurden mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet und mittels Log-Rank-Test überprüft; ein P-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant bewertet. Das mediane Follow-up wurde mit der umgekehrten Kaplan-Meier-Methode berechnet. Zur Bewertung des ursachenspezifischen Effekts von Faktoren auf jeden Endpunkt verwendeten wir das Cox-Proportional-Hazards-Modell zur Schätzung von Hazard Ratios (HRs) und bewerteten Landmark-Ansätze ab der ersten DLI sowie kontinuierliche und zeitabhängige Analysen. Die Proportionalitätsannahme der Hazards wurde mit grafischen Methoden überprüft.

Alle Tests waren zweiseitig, wobei die Typ-I-Fehlerrate auf $\alpha = 0,05$ festgelegt wurde. Es wurden nur die Ergebnisse der finalen Modelle im Hinblick auf eine Referenzkategorie (Hazard Ratio, 1,00) zusammen mit dem 95%-Konfidenzintervall (CI) und den P-Werten präsentiert. Alle Analysen wurden mit R Version 4.0.5 (R-Software Version 4.0.5 (R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria <https://www.R-project.org/>) unter Verwendung der folgenden Pakete durchgeführt: ggalluvial, ggplot2, tidyverse, survival, cmprsk, prodlm und rms.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Ergebnisse zum Paper: *Impact of TP53 on outcome of patients with myelofibrosis undergoing hematopoietic stem cell transplantation*

- **Patienten:** Die Studie umfasste 349 Patienten mit Myelofibrose, die eine erste allo-HSCT erhielten, darunter 49 (14%) mit *TP53*-Mutation. Das Durchschnittsalter betrug 58 Jahre. Beide Gruppen hatten mehr männliche Patienten (52% bei *TP53*-Mutation, 60% bei non-*TP53*-Mutation). Mehr Patienten in der *TP53* Mutationsgruppe erhielten eine myeloablative Konditionierung vor der allo-HSCT ($P < 0.001$).
- **Molekulargenetische Mutationslandschaft:** Sechzehn *TP53*-mutierte-Patienten zeigten eine Multi-Hit-Konfiguration mit einer mittleren Allelvariantenfrequenz (VAF) von 20,3%. Häufigste Begleitmutation war *JAK2*, gefolgt von *CALR*. *SH2B3* trat bei 11% mit *TP53*-Mutation und 1% mit *TP53*-Wildtyp auf ($P = 0.01$). Keine signifikanten Unterschiede gab es bei der Häufigkeit von *ASXL1* oder anderen Hochrisiko-Mutationen.
- **Zytogenetik** Die Zytogenetik-Risikoklassifikation war wie folgt: günstig (71%), ungünstig (23%), sehr hohes Risiko (6%). Ein komplexer Karyotyp war bei 10% der Patienten vorhanden, häufiger bei ungünstigem Risiko (43%) im Vergleich zu günstigem (0%) und sehr hohem Risiko (9%; $P < 0.001$). *TP53*-mutierte-Träger waren häufiger in der Kategorie ungünstiges Risiko (20% vs. 39%, $P = 0.01$) und bei komplexem Karyotyp (7% vs. 29%, $P < 0.001$).

- **Einfluss auf das post-HSCT-Ergebnis** Das 6-Jahres-OS betrug 36% (*TP53*-Mutation) vs. 64% (non-*TP53*-Mutation; $P<0.001$). Medianes OS: 1,5 Jahre (*TP53*-Mutation) vs. 13,5 Jahre (non-*TP53*-Mutation). *TP53*-Mutation-Träger hatten eine höhere 6-Jahres-Rückfallinzidenz (39% vs. 21%; $P=0.001$) und eine kürzere Zeit bis zur leukämischen Transformation (0,6 Jahre vs. 2,7 Jahre).
- **Einfluss der Zytogenetik und *TP53*-Mutation:** Die zytogenetische Risikostratifizierung zeigte keine signifikanten Überlebensunterschiede ($P=0.40$). Ein komplexer Karyotyp beeinflusste das post-HSCT-Ergebnis stark, mit einem medianen Gesamtüberleben von 1,9 Jahren vs. 13,5 Jahren ($P<0.001$). Trisomie 8 verschlechterte das Überleben signifikant ($P=0.02$) und war oft mit einem komplexen Karyotyp verbunden (54% vs. 7%; $P<0.001$).
- **Andere Einflussfaktoren** Molekulare Marker wie Treibermutationsgenotyp ($P=0.005$) und *ASXL1*-Mutationen ($P=0.02$) beeinflussten das Überleben nach allo-HSCT. DIPSS war nicht signifikant mit dem Überleben nach allo-HSCT- assoziiert ($P=0.80$), MIPSS70 zeigte bessere Stratifikationsnützlichkeit ($P=0.07$). MTSS zeigte eine signifikante Assoziation mit dem Überleben ($P<0.001$).
- **Multivariable Anpassung:** *TP53*-Mutation war unabhängig mit schlechterem Überleben assoziiert. Der komplexe Karyotyp war nur in Modellen mit DIPSS und MTSS signifikant. Das Modell mit MTSS, *TP53*-Mutation und komplexem Karyotyp zeigte die beste prognostische Nützlichkeit. *TP53*-Mutation, komplexer Karyotyp, zirkulierende Blasten und steigende MTSS-Werte waren unabhängig mit post-HSCT-Ergebnissen assoziiert.¹

1.3.2 Ergebnisse zum Paper: *A prognostic score including mutation profile and clinical features for patients with CMML undergoing stem cell transplantation*

Patientenmerkmale:

Die Studie umfasste 240 CMML-Patienten mit einem mittleren Alter von 59 Jahren (Bereich 19-74 Jahre) zum Zeitpunkt der Transplantation. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 5,5 Jahre (95% CI, 4,0-7,0 Jahre). Die Mehrheit der Patienten war männlich (72%). Zum Zeitpunkt der Transplantation wurde die CMML nach WHO-Klassifikation wie folgt eingeteilt: 10% CMML-0 Patient, 50% CMML-1 Patient und 40% CMML-2 Patienten. Die Hälfte der Patienten war vor der Transplantation transfusionsabhängig. Die Verteilung der Spender-Empfänger-Beziehungen war: 21% passender verwandter Spender (MRD), 54% passender unverwandter Spender (MUD), 3% verwandter Spender mit Mismatch (MMRD) und 22% unverwandter Spender mit Mismatch (MMUD). Die Mehrheit der Patienten erhielt apheresierte periphere Blutstammzellen (93%) als Transplantat. 56% der Patienten erhielten eine RIC, 44% eine myeloablative Konditionierung. Die Hälfte der Patienten hatte einen Komorbiditätsindex von 0 oder 1 nach Sorror et al.¹⁰¹, während 21% einen Index von über 3 aufwiesen. Detaillierte klinische Informationen zur Kohorte sind in Tabelle 1 und der Supplement Tabelle 1 zusammengefasst.

- **Zytogenetik und Mutationsmuster:** Informationen zur Zytogenetik lagen bei 88% der Patienten vor. Das zytogenetische Risiko nach Such et al.⁹² war wie folgt verteilt: 61% niedrig, 15% intermediär und 12% hoch. 91% der Patienten hatten zum Zeitpunkt der Transplantation mindestens eine Mutation, die mittlere Anzahl der Mutationen betrug 3 (Bereich 0-8). Am häufigsten fanden sich Mutationen in den Genen *SRSF2* (34,5%), *TET2* (34,2%), *ASXL1* (34,2%), *RUNX1* (20,3%), *NRAS* (19,3%), *DNMT3A* (17,4%), *SETBP1* (16,0%), *CBL* (15,4%), *U2AF1* (14,4%), *ZRSR2* (11,2%), *KRAS* (10,9%), *EZH2* (9,0%), *IDH1* (7,9%), *SF3B1* (8,0%), *JAK2* (7,8%) und *TP53* (6,9%). Mutationen in *TET2* und *ASXL1* ($P=0.01$) sowie *TET2* und RNA-Splicing-Faktoren ($P=0.001$) traten häufig gemeinsam auf. Mutationen

in *NRAS* ($P=0.003$) und *CBL* ($P=0.01$) waren signifikant mit dem proliferativen Subtyp assoziiert, während *TP53*-Mutationen ($P=0.01$) mit CMML-0 assoziiert waren. Bei älteren Patienten (≥ 60 Jahre) waren Mutationen in *SETBP1*, *JAK2* und *ZRSR2* häufiger. Eine vollständige Liste der Mutationen, ihrer Häufigkeiten und Muster ist in Abbildung 1 der Veröffentlichung dargestellt.² Basierend auf diesen Daten wurde ein prognostischer CMML-Transplantationsscore entwickelt: 4 Punkte wurden für *ASXL1*- und/oder *NRAS*-Mutationen sowie Blasten $>2\%$ vergeben, 1 Punkt für jeden Anstieg im Komorbiditätsindex. Der Score (Bereich: 0–20) zeigte eine klare Vorhersagekraft für Überleben und NRM. Die 5-Jahres-Überlebensraten betrugen 81 % (Score 0–1), 49 % (Score 2–4), 43 % (Score 5–7), 31 % (Score 8–10) und 19 % (Score >10). Die entsprechenden NRM-Raten waren 5 %, 22 %, 31 %, 46 % und 51 %. *NRAS*- ($P = 0,001$) und *CBL*-Mutationen ($P = 0,04$) korrelierten unabhängig mit erhöhten Leukozytenzahlen, wobei *JAK2* mit höherem Alter ($P = 0,03$) und *KRAS* mit jüngerem Alter ($P = 0,02$) assoziiert waren. Kein Zusammenhang bestand zwischen Blastenanteil und anderen Variablen. Die Ergebnisse wurden anhand von drei Risikogruppen (Score 0–4, 5–10, >10) validiert und zeigten eine robuste Vorhersagekraft (Abbildung 1, 2A/B, ergänzende Tabellen 3 und 4 aus dem Paper).²

- **Multivariable Analyse auf das Überleben und die Entwicklung eines CMML-Transplantations-Scores zur Prognose von Überleben und NRM:** In der multivariaten Analyse behielten *ASXL1*- und/oder *NRAS*-Mutationen (HR 1.63, $P=0.006$), Knochenmarkblasten $>2\%$ (HR 1.70, $P=0.02$) und ein steigender Komorbiditätsindex (HR 1.16, $P<0.001$) unabhängige prognostische Wertigkeit. Basierend auf diesen Variablen wurde ein CMML-Transplantations-Score entwickelt, der das Überleben vorhersagte und bis zu 5 Risikogruppen unterschied. Eine steigende Score war auch signifikant mit einer höheren TRM assoziiert ($P<0.001$).

- **Vergleich mit bestehenden prognostischen Scores:** Die prognostischen Scoring-Systeme CPSS-mol, GFM und MMM, die den Mutationsstatus einbeziehen, wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, das Überleben zu unterscheiden (Abbildungen A–C). **CPSS-mol** (berücksichtigt genetische Scores, Transfusionsabhängigkeit, Leukozytenzahl und Blasten im Knochenmark) zeigte eine 5-Jahres-Überlebensrate von 42 % (niedriges Risiko), 62 % (intermediär-1), 38 % (intermediär-2) und 37 % (hohes Risiko; $P = 0,04$). **GFM** (Alter, Hämoglobin, Leukozyten-, Thrombozytenzahl und *ASXL1*-Mutation) ergab Überlebensraten von 50 % (niedrig), 29 % (intermediär) und 28 % (hoch; $P < 0,001$). **MMM** (Hämoglobin, absolute Monozytenzahl, unreife myeloische Zellen, Thrombozytenzahl und *ASXL1*-Mutation) zeigte Überlebensraten von 46 % (niedrig), 51 % (intermediär-1), 36 % (intermediär-2) und 35 % (hoch; $P = 0,05$). Klinisch basierte Scores wie **CPSS** (FAB-/WHO-Subtypen, zytogenetisches Risiko, Transfusionsabhängigkeit) und **MDAPS** (Hämoglobin, unreife myeloische Zellen, Lymphozyten, Blasten) unterschieden Überlebensraten nicht signifikant (Abbildung 4D–E).² Die 5-Jahres-Überlebensraten lagen für CPSS zwischen 59 % (niedriges Risiko) und 33 % (intermediär-2) und für MDAPS zwischen 43 % (niedriges Risiko) und 28 % (hohes Risiko). Ein Vergleich der Scores anhand des Konkordanzindex zeigte, dass der **CMML-Transplantationsscore** besser abschnitt (0,68 original, 0,67 korrigiert) als CPSS-mol (0,60), GFM (0,60), MMM (0,59), CPSS (0,56) und MDAPS 0,58 (Abbildung 3).² Kreuztabellen (Abbildung 3) zeigten, dass der CMML-Transplantationsscore Patienten, insbesondere aus niedrigen und intermediären Risikogruppen, signifikant neu klassifizierte ($P < 0,001$ für CPSS-mol und GFM; $P < 0,01$ für MMM). In der Klassifikation von Hochrisikopatienten stimmten die Scores weitgehend überein.²

1.3.3 Ergebnisse zum Paper: *Post-Transplantation Multicolored Flow Cytometry-Minimal Residual Disease Status on Day 100 Predicts Outcomes for Patients with Refractory Acute Myeloid Leukemia*

Patientenmerkmale:

Die Merkmale der Studienpopulation sind in Tabelle 1 zusammengefasst.³ Es wurden 56 Patienten in die Analyse einbezogen. Die allo-HSCT (erste, n = 44 [79%]; zweite, n = 12 [21%]) nach MAC (n = 31 [55%]) und RIC (n = 25 [45%]) wurden im UKE im Zeitraum von 01/2015 bis 12/2020 durchgeführt. Alle Patienten erfüllten nicht die Kriterien für CR und zeigten erhöhte Knochenmarkblasten (>5%) oder erhöhte periphere Blutblasten zum Zeitpunkt der allo-HSCT. 36 Patienten (64%) waren refraktär gegenüber der Erstlinienbehandlung, während 20 Patienten waren refraktär gegenüber der Rezidivtherapie (erstes Rezidiv, n = 18; zweites Rezidiv, n = 2). Die mediane Anzahl der Knochenmarkblasten (zytomorphologisch) zum Zeitpunkt der allo-HSCT betrug 25% (Spanne: 6% bis 91%). Am Tag 100 nach der allo-HSCT waren 40 Patienten (71%) MFC-MRD-negativ, während 16 Patienten (29%) MRD-positiv waren. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den Patientenmerkmalen zwischen denjenigen, die ein FLAMSA-basiertes Konditionierungsregime und denen, die andere Regime erhielten, beobachtet. Tag-100-MRD-negative Patienten neigten eher dazu, ein zweites Allograft zu erhalten (11/40 [27%] versus 1/16 [6%], P = 0,08). Die Tag-100-MRD-positiven Patienten erlebten signifikant mehr Rezidive als Todesursache im Vergleich zu den Tag-100-MRD-negativen Patienten (9/12 [75%] versus 7/11 [64%], P = 0,007; Tabelle 1).³

Von allen Patienten erhielten 8 Posttransplantations-Interventionen (DLIs, n = 6; hypomethylierende Agenzien, n = 2) bei gemischtem Chimärismus oder Tag-100-MRD-Positivität innerhalb einer medianen Zeit von 180 Tagen (Spanne: 130 bis 240). Davon entwickelten 3 ein Rezidiv (38%) mit 2 Todesfällen. Ein Patient sprach auf die Salvage-Therapie mit hypomethylierendem Agens an und überlebte 589 Tage nach der allo-SCT.

Einfluss des Tag-100-MRD-Status auf OS, DFS, Rezidiv und NRM: Univariate Analyse

Das mediane Follow-up betrug 16 Monate (Spanne: 3 bis 66), es gab insgesamt 21 Todesfälle, 20 Rezidive und vier NRM-Ereignisse. Die 3-Jahres-Wahrscheinlichkeiten für OS und LFS betrugen 52% (95%-Konfidenzintervall [KI]: 35% bis 69%) bzw. 49% (95%-KI: 35% bis 64%). Die kumulierte Inzidenz von Rezidiven und NRM nach 3 Jahren betrug 42% (95%-KI: 28% bis 58%) bzw. 8% (95%-KI: 3% bis 20%) (siehe Tabelle 2).³ Die 1-Jahres-OS-Rate für Tag-100-MRD-negative Patienten war signifikant höher als bei MRD-positiven (76% [95%-KI: 60% bis 87%] vs. 35% [95%-KI: 17% bis 59%], P = 0,001) (siehe Figure 1).³ Die 1-Jahres-LFS-Rate für Tag-100-MRD-negative Patienten war ebenfalls signifikant höher (73% [95%-KI: 58% bis 84%] vs. 23% [95%-KI: 9% bis 49%], P < 0,001). Die kumulierte Inzidenz von Rezidiven nach 1 Jahr war bei MRD-positiven Patienten höher: 70% (95%-KI: 45% bis 87%) vs. 30% (95%-KI: 16% bis 49%), P < 0,001. Es gab keinen Unterschied in der Inzidenz von NRM zwischen beiden Gruppen (siehe Tabelle 2 der Publikation).³

Einfluss des Prätransplantations-MRD-Status auf OS, LFS, Rezidiv und NRM: multivariate Analyse

Die Ergebnisse der multivariaten Analyse sind in Tabelle 3 der Publikation dargestellt.³ Basierend auf den Ergebnissen der univariaten Analyse wurden die folgenden Faktoren in das multivariate Modell aufgenommen: MFC-MRD-Status am Tag 100 und Konditionierung (FLAMSA-basiert vs. andere Regime). Eine multivariate Analyse für NRM wurde aufgrund der begrenzten Anzahl von Ereignissen nicht durchgeführt. Patienten nach FLAMSA-basierter Konditionierung, die Tag-100-MRD-negativ waren, erlebten tendenziell weniger Rezidive, was zu einer verbesserten OS und LFS führte.

GvHD: Die kumulierte Inzidenz von akuter schwerer (II-IV) GvHD nach 1 Jahr für die gesamte Kohorte betrug 39% (95%-KI: 27% bis 52%). Es wurde keine Korrelation zwischen akuter GvHD und dem Erreichen eines negativen MRD-Status nach allo-SCT festgestellt. Die kumulierte Inzidenz von chronischer GvHD nach 3 Jahren betrug 50% (95%-KI: 35% bis 65%).

1.3.4 Ergebnisse zum Paper: *Donor Lymphocyte Infusion and Molecular Monitoring for Relapsed Myelofibrosis after Hematopoietic Cell Transplantation*

Patienten: Wir untersuchten 37 rezidierte Patienten, von denen 22 eine primäre Myelofibrose (60%) und 30 eine JAK2-Treiber-Mutation (81%) hatten. Die mediane Zeit von der allo-HSCT bis zum Rückfall betrug 19 Monate (Spanne: 2–118 Monate). 17 Patienten erhielten die erste DLI wegen eines molekularen Rückfalls und 20 wegen eines hämatologischen Rückfalls nach allo-HSCT. 33 Patienten (89%) erhielten die DLI nach der ersten Transplantation, die restlichen 4 nach der zweiten. Drei Patienten erhielten CD4-selektierte DLI. Insgesamt wurden 91 DLI verabreicht, und die Anzahl der kumulativen DLI-Gaben per Patient reichte von 1 bis 5. Die Mehrheit (57%) erhielt nur 1 (n=11) oder 2 DLI (n=10). Die mediane Zeit von der Transplantation bis zur ersten DLI betrug 68 Wochen (Spanne: 15–523 Wochen). Die mediane Zeit zwischen den nachfolgenden DLI betrug jeweils 6 Wochen.

Gesamtansprechen: Die Gesamt-mCR-Rate betrug 73% (n=27). 10 Patienten (27%) erreichten keine mCR. Nach der ersten DLI erreichten 16 von 37 Patienten (43%) eine mCR. Patienten, die nach der ersten DLI eine mCR erreichten, hatten eine geringere Wahrscheinlichkeit eines Rückfalls. Der Spenderchimärismus war signifikant mit der mCR nach der ersten DLI assoziiert.

Antwort bei molekularem versus hämatologischen Rückfall: Patienten mit molekularem Rückfall nach HSCT erreichten häufiger eine mCR (88% vs. 60%). Die mediane Zeit von HSCT bis zur ersten DLI war kürzer bei molekularem Rückfall (40 Wochen) im Vergleich zum hämatologischen Rückfall (145 Wochen). Für mehr Informationen zur DLI-Infusion in Bezug auf molekularen und hämatologischen Rückfall - siehe Abbildung 2 aus der Veröffentlichung.⁴

Akute und chronische GvHD: Im Zuge der 91 Infusionen traten insgesamt 8 akute GvHD-Ereignisse auf (9%). Akute GvHD war nicht mit der mCR verbunden. Chronische GvHD trat bei 8 Patienten auf (9%) und war mit einer besseren Antwort verbunden.

Überleben: Die mediane Nachbeobachtungszeit nach der ersten DLI betrug 6,1 Jahre. Das Gesamtüberleben (OS) betrug 77% für molekularen Rückfall und 32% für hämatologischen Rückfall nach HSCT. Das OS war nach Ansprechen (Responder) höher als bei fehlendem Ansprechen (Nicht-Responder).⁴

1.4 Diskussion

Die Bedeutung einer präzisen und umfassenden Diagnostik kann in der modernen Medizin nicht hoch genug eingeschätzt werden. Insbesondere in der hämatologischen Diagnostik, einem Bereich, der sich in den letzten Jahrzehnten erheblich weiterentwickelt hat, ist die Diagnostik von entscheidender Bedeutung. Traditionell galt die Mikroskopie lange Zeit als Goldstandard in der hämatologischen Diagnostik. Doch im Zuge des technologischen Fortschritts haben sich neue Methoden etabliert, die die Genauigkeit und Effizienz der Diagnosestellung erheblich verbessert haben.

Eine bedeutende Entwicklung war die Einführung der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR), die eine präzise Bestimmung bestimmter genetischer Marker ermöglichte. Diese Technik wurde in den letzten Jahren durch die digitale PCR (dPCR) ergänzt, die die Sensitivität und Spezifität

der molekularen Diagnostik weiter revolutioniert hat.¹⁰² Trotz dieser Fortschritte bleiben einige diagnostische Methoden wie die Zytogenetik und der Nachweis von Oberflächenmarkern durch Multicolor-Durchflusszytometrie unverzichtbar. Diese Techniken bieten einzigartige Einblicke, die mit anderen Methoden nicht zu erreichen sind.

Ein weiterer Meilenstein in der hämatologischen Diagnostik ist die Next-Generation-Sequenzierung (NGS). Diese Technologie erlaubt es, gleichzeitig mehrere Mutationen in einem einzigen Testlauf nachzuweisen, was die Diagnose von Erkrankungen mit komplexen genetischen Ursachen erheblich vereinfacht und beschleunigt.^{1,56,70,79,103-105}

Jede der genannten diagnostischen Methoden hat ihre spezifischen Vor- und Nachteile (s. 1.1.8.1). Während die Mikroskopie nach wie vor durch ihre Einfachheit und Zugänglichkeit besticht, bieten die molekularen Techniken wie qPCR, dPCR und NGS eine weitaus höhere Genauigkeit und die Möglichkeit, subtile genetische Veränderungen zu detektieren. Die Wahl der geeigneten Diagnostik hängt somit stark vom klinischen Kontext und den spezifischen Anforderungen des jeweiligen Falls ab. Die Integration dieser unterschiedlichen diagnostischen Ansätze ermöglicht eine präzisere und personalisierte Patientenversorgung, was letztlich zu besseren Therapieergebnissen führt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Hauptziel der optimierten Diagnostik darin besteht, die prä- und posttransplantationsdiagnostische Vorgehensweise zu verbessern. Dies umfasst eine genauere prognostische Einordnung vor der allogenen Stammzelltransplantation (insbesondere bei MF und CMML), ein besseres Monitoring unmittelbar nach der Transplantation (insbesondere bei AML) sowie den Einsatz der MRD-Analyse zur Steuerung einer präemptiven Therapie.

1.4.1 Einfluss genetischer und klinischer Risikofaktoren auf den Verlauf der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation:

(Impact of TP53 on outcome of patients with myelofibrosis undergoing hematopoietic stem cell transplantation und A prognostic score including mutation profile and clinical features for patients with CMML undergoing stem cell transplantation)

Die Wertigkeit der molekularen Diagnostik vor der Transplantation wurde in einer großen internationalen Studie gezeigt, in der Myelofibrose-Patienten, die eine erste allo-HSCT erhielten und bei denen der Mutationsstatus und die Zytogenetik bekannt waren, untersucht wurden. Es wurde die Rolle der TP53-Mutation bei MF im Kontext der allo-HSCT untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass MF-Patienten mit TP53-Mutation eine schlechtere Gesamtüberlebensrate hatten als solche ohne TP53-Mutation, unabhängig von anderen Hochrisiko-Zytogenetik-Merkmalen. Besonders schlecht war die Prognose bei Patienten mit gleichzeitigem komplexem Karyotyp. Dies wurde als Folge einer leukämischen Transformation angesehen, die bei TP53-mutierter MF häufiger und schneller nach der allo-HSCT auftrat. Ein TP53-mutierter und ein komplexer Karyotyp erwiesen sich als unabhängige Prognosefaktoren neben bestehenden Risikostratifikationstools wie dem MTSS. Unsere Daten zeigen, dass TP53-Mutationen das Risiko eines Rückfalls und insbesondere einer leukämischen Progression bei MF-Patienten nach der Transplantation signifikant erhöhen. Diese Ergebnisse müssen in weiteren Studien validiert werden, stimmen jedoch mit bisherigen Erkenntnissen bei akuter myeloischer Leukämie und Hochrisiko-MDS überein.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸

Wir fanden keinen Zusammenhang zwischen TP53-Mutationen und der Krankheitsentwicklung vor der allo-HSCT. Auch die Rolle der von uns im Kontext von TP53-Mutationen häufiger beobachteten SH2B3-Mutationen muss bestätigt werden. Der hohe Anteil an komplexen Karyotypen bei Patienten mit TP53-mutierter-MF könnte eine höhere zytogenetische Instabilität und Toleranz gegenüber groben

Karyotyp-Abweichungen widerspiegeln. Eine Kombination aus komplexem Karyotyp und *TP53*-Mutation wurde auch bei akuter myeloischer Leukämie beobachtet.^{108,109}

Posttransplant-Rückfälle der hämatologischen Grundkrankheiten bleiben die Hauptursache für das Scheitern der allo-HSCT bei Patienten mit *TP53*-Mutationen, weshalb Strategien zu deren Reduktion weiter erforscht werden müssen. Donor-Lymphozyten-Infusionen sind der aktuelle Standard bei post-HSCT-Rückfällen von MF-Patienten und zeigen gute Langzeitergebnisse.¹¹⁰ Inwieweit hier ein prophylaktischer Einsatz beim Vorliegen von *TP53*-Mutationen (*TP53*^{mut}) sinnvoll sein kann, müssen nachfolgende Untersuchungen bei dieser besonderen Hoch-Risiko-Patientengruppe zeigen.

Bei der Betrachtung der klinischen Merkmale von Patienten mit *TP53*^{mut} zeigte sich, dass diejenigen mit einer Multi-Hit-Konstellation häufiger mit schwerer Anämie und Thrombozytopenie im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp-*TP53* (*TP53*^{WT}) oder Single-Hit *TP53*^{mut} präsentierten, während die meisten krankheitsspezifischen und patientenspezifischen Merkmale im Allgemeinen ausgeglichen waren. In Bezug auf Mutationsmuster wiesen Patienten mit einer Multi-Hit-Konstellation häufiger Genotypen mit *JAK2*-Treibermutation sowie Mutationen in *SRSF2*, *SF3B1*, *DNMT3A*, *NRAS* und *KRAS* auf. In unserer Studie war die Mutation *SH2B3*, die in beiden *TP53*^{mut}-Gruppen häufiger vorkam als in der *TP53*^{WT}-Gruppe, die einzige Mutation, die mit signifikant erhöhter Frequenz auftrat. Ihre Rolle ist noch nicht eindeutig definiert und erfordert weitere Untersuchungen.

Die Bedeutung der Multi-Hit-*TP53*^{mut}-Konfiguration wurde auch bei AML nach einem allo-HSCT gezeigt, einem Szenario, in dem gleichzeitige 17p-Abnormalitäten zusätzliche, schlechte prognostische Faktoren bei Patienten mit *TP53*^{mut}-AML darstellen.¹⁰⁸ Jüngst wurde im überwiegenden Teil der Studien außerhalb des HSCT-Kontexts gezeigt, dass der biallelische Verlust der *TP53*-Aktivität und dessen allelischer Zustand wichtig für das Überleben von Patienten mit MDS sind.¹¹¹ In zwei weiteren Studien war die Variante-Allel-Häufigkeit ein unabhängiger prognostischer Faktor für die Vorhersage der Reaktion auf hypomethylierende Mittel bei Patienten mit *TP53*^{mut}-MDS, wobei ihre Rolle bei Patienten mit AML von der Behandlungsintensität abhing.¹¹² Es ist bemerkenswert, dass keine dieser Studien speziell darauf ausgerichtet war, die Wechselwirkung zwischen der Variante-Allel-Häufigkeit und den Ergebnissen nach HSCT zu bestimmen. Darüber hinaus zeigen wir in unserer Studie deutlich eine signifikante Rolle der Multi-Hit-*TP53*^{mut} im Kontext der Myelofibrose, was darauf hindeutet, dass das Screening auf *TP53*^{mut} für Patienten, die für eine allo-HSCT in Frage kommen, entscheidend sein könnte. Mehr Patienten mit Multi-Hit-*TP53*^{mut} erhielten eine myeloablative Konditionierung (65 % vs. 44 %), was möglicherweise die Wahl der Ärzte für intensivere Behandlungen bei einer Hochrisikopopulation in dieser retrospektiven multizentrischen Kohorte widerspiegelt. Insgesamt betonen unsere Ergebnisse die Notwendigkeit für mehr grundlegende, translationale und klinische Forschung bei Patienten mit Myelofibrose, die *TP53*-Mutationen tragen, wie auch zu deren Rolle in verschiedenen Behandlungsszenarien, einschließlich allo-HSCT und darüber hinaus.

Für Patienten mit MDS und akuter Leukämie mit mutiertem *TP53* könnten therapeutische Strategien mit niedrigerer Intensität, wie Venetoclax-basierte Regime, zumindest vergleichbare Antworten wie bei intensiveren Behandlungen zeigen. In diesem Kontext umfasst die Entscheidung, mit HSCT fortzufahren, viele Faktoren, wobei die Fitness der Patienten dynamisch nach Abschluss der ersten Behandlungszyklen berücksichtigt werden sollte. In der Myelofibrose hat die Kombination von Venetoclax mit hypomethylierenden Mitteln robuste Antworten in der Blastenphase gezeigt und könnte eine potenzielle Strategie darstellen, um Patienten mit Multi-Hit-*TP53*^{MT} oder komplexem Karyotyp auf die HSCT vorzubereiten.¹¹³

Frühere Arbeiten zeigten die Bedeutung des hochsensitiven molekularen Monitorings von Treibermutationen und des Chimärismus für die Vorhersage der post-HSCT-Ergebnisse.¹¹⁴ Die Verwendung von post-HSCT-Sequenzierungen für Nicht-Treiber-Mutationen wurde in den meisten Patienten in unserer Kohorte nicht angewendet, was die Untersuchung ihrer Rolle in unserer Studie ausschloss. Ihre Sensitivität und Relevanz in einer chronischen Krankheit wie der Myelofibrose ist jedoch ein wichtiges Thema für zukünftige Forschungen, insbesondere für bestimmte Untergruppen von Fällen wie denen, die *TP53*-Mutationen tragen.

Andere präemptive oder Erhaltungsstrategien nach HSCT mit hypomethylierenden Mitteln oder neuen, spezifisch gegen *TP53*^{mut} gerichteten Therapien könnten weitere Optionen für diese Patientengruppe ohne das Risiko einer GvHD bieten und sollten daher Gegenstand weiterer Forschung sein.¹¹⁵

Jüngste Studien zur AML legen nahe, dass *TP53*-Mutationen mit einem immunsuppressiven Milieu im Knochenmarkmikromilieu assoziiert sein könnten. Dies könnte neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen. Insbesondere könnten bereits bestehende Therapien, die das Immunumfeld umgestalten, wie zum Beispiel durch gezielte Blockade von PD-1, Anwendung finden. Möglicherweise könnte dadurch wieder ein Graft-versus-Leukämie (oder Graft-versus-Myelofibrose)-Effekt induziert werden.¹¹⁶

Ein möglicher Selektionsbias kann nicht ausgeschlossen werden, insbesondere aufgrund der retrospektiven Analyse. Um die komplexe Rolle von *TP53* besser zu verstehen, wurde der Fokus auf Patienten mit verfügbaren Daten zum Mutationsprofil und zur Zytogenetik gelegt. Ein Selektionsbias könnte insbesondere durch die Fokussierung auf Patienten entstanden sein, die eine HSCT erhalten haben, da dieses Verfahren häufiger bei Hochrisikopatienten angewendet wird. Dadurch könnte der Anteil von *TP53*^{mut}-Patienten in unserer Kohorte höher sein als in anderen veröffentlichten Studien, die ausschließlich im Nicht-HSCT-Kontext durchgeführt wurden. Um diesem potenziellen Bias entgegenzuwirken, führten wir eine multivariable Anpassung durch, die zusätzliche Risikofaktoren berücksichtigte, die mit einer schlechteren Prognose nach HSCT assoziiert sind (darunter Leistungsstatus, Alter, Treibermutationsgenotyp, Spenderrelation sowie Leukozyten- und Thrombozytenzahlen). Dies bestätigt die Vergleichbarkeit unserer Kohorte.^{104,117}

Zusammengefasst bietet unsere Publikation die erste umfassende Analyse der Bedeutung von *TP53*-Mutationen bei Myelofibrose für den Erfolg der allo-HSCT. Die erhobenen Daten legen nahe, dass eine spezifische Beratung bezüglich HSCT für Myelofibrose-Patienten mit *TP53*-Mutation notwendig ist. Trotz schlechterer Überlebensraten bleibt die allo-HSCT eine wichtige Behandlungsstrategie für diese Patienten. Diese neuen Daten sind nicht nur klinisch relevant, sondern unterstreichen auch den Bedarf an weiteren grundlagenwissenschaftlichen und klinischen Studien zu *TP53*-Mutationen bei der Myelofibrose.

Als zweite Entität für die Evaluation der Wertigkeit der molekularen Diagnostik haben wir die CMML genutzt. Diese Erkrankung bietet durch die große Heterogenität des klinischen Verlaufes eine sehr gute Möglichkeit, diejenigen Patienten zu identifizieren, die durch eine allo-HSCT besonders profitieren. Zudem ist besonders bei der CMML unklar, welche Faktoren auf den Erfolg der Transplantation Einfluss haben. Durch die Untersuchung einer internationalen multizentrischen Kohorte von 240 Patienten, die sich einer allo-HSCT unterzogen hatten und deren Langzeitverlauf sowie NGS-Daten vorlagen, konnten

wir zeigen, dass folgende Faktoren zur Verfeinerung der Risikostratifizierung für CMML nach der Transplantation integriert werden können: Knochenmark-Blasten zum Zeitpunkt der Transplantation, *ASXL1*- und/oder *NRAS*-Mutationen sowie Komorbiditäten.

Mehrere Studien haben den prognostischen Wert klinischer, hämatologischer und transplantationsbezogener Variablen für die Ergebnisse bei CMML-Patienten untersucht, die sich einer Transplantation unterziehen^{118,119}. Jedoch unterscheiden sich diese Ergebnisse erheblich, möglicherweise aufgrund unterschiedlicher Populationen und geringer Datenverfügbarkeit.¹²⁰ Beispielsweise war ein höherer CPSS-Wert zum Zeitpunkt der Transplantation in einer Studie mit schlechterem Überleben verbunden, aber die Risikogruppen mussten für angemessenere Analysen zusammengefasst werden, und es wurde keine Assoziation zwischen CPSS-Wert und NRM gefunden. Für 20 % der Patienten war der CPSS unbekannt, was auf einen gewissen prognostischen Wert, aber eine begrenzte Diskriminationsfähigkeit und Nützlichkeit im Transplantationskontext hinweist.¹²¹

Durch die Identifizierung der *ASXL1*-Mutation als prädiktiv für das Überleben nach der Transplantation konnten wir die Rolle dieser spezifischen Mutation weiter bestätigen, die von allen drei zuvor definierten Scores als Prädiktor für das Ergebnis bei Nicht-Transplantationspatienten geteilt wird.^{95,96} Es wurde keine Assoziation zwischen *ASXL1*- und *TET2*-Mutationen festgestellt, wie kürzlich vorgeschlagen¹²², was jedoch durch die Anzahl der Patienten in unserer Kohorte beeinflusst worden sein könnte. Die Rolle von *NRAS* und der Gesamtzahl der Mutationen für das Posttransplantations-Ergebnis wurde kürzlich gezeigt, allerdings in Bezug auf das Rückfallrisiko der Patienten.⁹¹ In unserer Studie fanden wir eine signifikante und konsistente Assoziation von *NRAS* mit dem Überleben, die weiter verfeinert wurde durch eine Wechselwirkung mit *ASXL1* und der Anzahl der Mutationen.¹²³ Durch die Fokussierung unserer Analysen auf das Überleben und nicht auf die Häufigkeit von Rückfällen wollten wir eine bessere Patientenberatung hinsichtlich des langfristigen Ergebnisses sicherstellen. Darüber hinaus wurden die Leukozytenzahlen unabhängig von Mutationen in *NRAS* und *CBL* vorhergesagt, was die Ergebnisvariabilität entsprechend der FAB-Subtypen erklärt. Andere zuvor vorgeschlagene Mutationen, die mit schlechterem Überleben assoziiert sind, wie *SETBP1* und *RUNX1*, waren nicht prädiktiv für das Posttransplantations-Überleben, mit HRs von 0,91 bzw. 1,27.^{95,124}

Prognoseschätzungen für mehrere Malignome haben gezeigt, dass sie Patienten bei komplexen Diskussionen über die Risiken und Vorteile von Behandlungsoptionen helfen können.¹²⁵ Illustrationen können die Kommunikation zwischen Arzt und Patient erheblich verbessern und Patienten dabei helfen, aktiv an ihren Behandlungsentscheidungen teilzunehmen.¹²⁶ Patienten können Online-Rechner und mobile Anwendungen nutzen. So sind Online-Risikoabschätzungen basierend auf unseren Daten verfügbar <https://cmml-transplantscore.shinyapps.io/cmml-transplantscore/>. Weitere Verbesserungen im Verständnis der molekularen Genetik und der Posttransplantations-Ergebnisse sind erforderlich. Diese könnten helfen, die Heterogenität der Zentren zu berücksichtigen und die sich entwickelnde Landschaft des Managements sowie Fortschritte in den Transplantationstechniken zu erfassen. Bis dahin könnte die Implementierung unseres vorgeschlagenen, einfachen und integrierten CMML-Transplantationsscores die Beratung von Patienten hinsichtlich der wahrscheinlichen Vorteile und Risiken nach allo-SCT erleichtern.

Unsere Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit und den besseren Nutzen einer integrierten klinisch-molekularen Prognosebewertung für CMML¹²⁷, indem sie die bessere Aussagekraft von Scores zeigen, die den Mutationsstatus einbeziehen, wie CPSS-mol-, GFM- und MMM-Score, im Vergleich zu Scores, die nur klinische Variablen einbeziehen, wie MDAPS und CPSS.²¹

1.4.2 Prognostischer Einfluss der minimalen Resterkrankung (MRD) nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation

(Post-Transplantation Multicolored Flow Cytometry-Minimal Residual Disease Status on Day 100 Predicts Outcomes for Patients with Refractory Acute Myeloid Leukemia)

Die Behandlung von rezidivierter oder refraktärer akuter myeloischer Leukämie (AML) bleibt trotz einiger Fortschritte in der jüngsten Vergangenheit eine große Herausforderung. Zwar haben neue Therapieansätze zu einer Reduktion der Toxizität und längeren Remissionen geführt, dennoch bleibt die Prognose für die meisten Patienten ungünstig.¹²⁸ Die allo-HSCT gilt weiterhin als die einzige potenziell kurative Option, ist jedoch mit hohen Rückfallraten nach der Transplantation verbunden, was zu einer insgesamt niedrigen Überlebensrate bei AML-Patienten führt.⁵⁷

Seit Jahrzehnten wird daran gearbeitet, Rückfälle nach der Transplantation besser vorherzusagen und zu verhindern. Hierzu wurden verschiedene Strategien entwickelt, darunter prognostische Scores, innovative "Brückenstrategien", Erhaltungstherapien nach der Transplantation, Immuntherapien und die engmaschige MRD-Überwachung.^{129,130} Prognostische Scores haben zwar geholfen, Patienten mit einem hohen Risiko für Post-Transplantations-Rückfälle zu identifizieren, aber selbst bei als "Niedrigrisiko" eingestufte AML bleiben die Überlebensraten eher enttäuschend und überschreiten selten 40 %. Auch die Anwendung der allo-HSCT als Salvage-Therapie führte zu ähnlichen Ergebnissen.

Einen wesentlichen Fortschritt in der frühen Rezidivdiagnostik brachte das MRD-Monitoring nach der Transplantation. Verschiedene Methoden zur MRD-Detektion, wie die MFC, PCR oder NGS haben gezeigt, dass sie Rückfälle frühzeitig erkennen und, bei frühzeitiger Intervention, möglicherweise verhindern können.¹³¹ Unsere Studie in einer Kohorte von 56 Patienten mit refraktärer AML wies nach, dass die Bestimmung des MRD-Status am Tag 100 nach der allo-HSCT prädiktiv für den Erfolg der allo-HSCT war (HR 0.23 [Spanne: 0.1 bis 0.54], $P = 0.001$), was sich unmittelbar aus einem geringeren Rezidivrisiko ergab (HR 0.20 [Spanne: 0.1 bis 0.49], $P = 0.0005$). Patienten, die am Tag 100 MRD-negativ waren, hatten ein deutlich und signifikant geringeres Rückfallrisiko und bessere Überlebenschancen.^{132,133}

Bemerkenswert ist, dass unsere Studie als eine der ersten zeigte, dass das Erreichen einer MRD-Negativität am Tag 100 nach der allo-HSCT bei Patienten mit refraktärer AML einen günstigen prognostischen Einfluss auf das Rückfallrisiko und das Gesamtüberleben hat. Damit konnten wir auch zeigen, dass die MRD auch bei der AML nach allo-HSCT eine hohe prognostische Relevanz hat. Während sich viele frühere Studien auf Patienten konzentrierten, die vor der Transplantation eine vollständige Remission (CR) erreicht hatten, liefert unsere Untersuchung neue Erkenntnisse für Patienten, die trotz einer refraktären Erkrankung transplantiert wurden.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung einer stringenten MRD-Überwachung nach der Transplantation. Insbesondere bei Hochrisikopatienten könnte eine frühzeitige Intervention, basierend auf dem MRD-Status, von Vorteil sein. Zu den möglichen Interventionen gehören die frühzeitige Reduktion der Immunsuppression, die Gabe von Spender-Lymphozyten¹³⁴ oder der Einsatz von hypomethylierenden Substanzen bzw. die Kombinationen verschiedener Ansätze.¹³⁵ Solche präventiven Maßnahmen könnten die Rückfallraten weiter senken und die Überlebenschancen verbessern.

Darüber hinaus zeigen unsere Ergebnisse, dass die Art des Konditionierungsschemas vor der Transplantation ebenfalls einen Einfluss auf das Rückfallrisiko und das Überleben haben kann. In unserer Studie zeigte sich, dass ein FLAMSA-basiertes Konditionierungsschema im Vergleich zu anderen Regimen einen unabhängigen positiven Effekt auf das Überleben hatte.

Zusammenfassend ist die MRD-Überwachung nach der Transplantation essenziell für die Nachsorge bei refraktärer AML, da sie Hochrisikopatienten identifiziert, die von gezielten Maßnahmen wie DLI profitieren könnten. Besonders das MFC-MRD-Monitoring am Tag 100 gemäß ELN-Richtlinien⁵⁷ kann Patienten mit schlechter Prognose erfassen und frühzeitige Interventionen beispielsweise mit Hilfe Immunsuppressionsreduktion, Spenderlymphozyten oder Hypomethylierungsreagenzien ermöglichen. Dies könnte die Therapie optimieren und die Überlebenschancen dieser gefährdeten Patientengruppe verbessern.

1.4.3 Nutzen der MRD-Bestimmung zur Steuerung der weiterführenden Therapien nach allo-HSCT

(Donor Lymphocyte Infusion and Molecular Monitoring for Relapsed Myelofibrosis after Hematopoietic Cell Transplantation)

Der klinische Nutzen der hochsensitiven MRD-Messung wird abschließend durch eine Studie belegt, die wir bei Patienten mit Myelofibrose nach allogener Stammzelltransplantation durchgeführt haben. Diese Patienten wurden bei erneutem Nachweis der JAK2V617F-Mutation mittels Spenderlymphozyten behandelt. Diese Untersuchung zeigt, wie die Ergebnisse der molekularen Diagnostik direkt in die Behandlung übertragen werden können und wie auf der Basis hoch sensitiver Diagnostik eine frühzeitige Behandlung möglich wird.⁶⁷

Ein wichtiges Merkmal unserer Studie ist der einheitliche Ansatz für die Konditionierung und die GvHD-Prophylaxe unter Verwendung von ATLG, der auch am häufigsten in Transplantationszentren in Europa umgesetzt wird, während viele US-basierte Zentren eine GvHD-Prophylaxe ohne ATLG verwenden. In Bezug auf die Sicherheit von DLI wurden niedrige Raten von akuter und chronischer GvHD beobachtet (jeweils 22 %), die vergleichbar waren mit früheren Berichten zu anderen Indikationen. Ein Patient erlitt eine akute GvHD Grad IV nach der ersten DLI und verstarb an Sepsis und Multiorganversagen. Es wurde keine klare Korrelation zwischen der DLI-Dosis (weder insgesamt noch pro Einzeldosis) und GvHD gefunden, während nur chronische GvHD mit der Gesamtzahl der DLIs assoziiert zu sein schien ($P = 0,01$). Zwei Fälle mit schwerer (akute GVHD) aGvHD erhielten jedoch eine höhere Startdosis. Demgegenüber schien das Ansprechen nicht mit der DLI-Dosis zu korrelieren. Unsere Daten legen daher nahe, höhere Startdosen für die erste DLI zu vermeiden und nachfolgende DLIs in homogener Weise vorsichtig zu eskalieren, um diese Therapie sicher anzuwenden und gleichzeitig die gleiche Wirksamkeit zu erzielen (siehe Tabelle 3 der Publikation¹³⁶).

Ein Vorbehalt gegenüber unserer Studie könnte der Fokus auf Treibermutationen für die molekulare Überwachung sein. Es ist wichtig zu erwähnen, dass Patienten mit einem *MPL*-Treibermutations-Genotyp tendenziell signifikant niedrigere Rückfallraten und auch ein besseres Gesamtergebnis zeigen. Wir schlossen 4 triple-negative Patienten ein. Drei Patienten erreichten einen vollen Chimärismus und waren bei der letzten Nachuntersuchung am Leben. Ein triple-negativer Patient erreichte nie vollständigen Chimärismus, zeigte einen hämatologischen Rückfall, und starb anschließend. Für diese Patienten werden derzeit neue Methoden basierend auf der NGS entwickelt, um mehr Patienten mit unterschiedlichem Risiko für Rückfälle oder Progression zu identifizieren. Wir schlossen Sequenzierungsdaten von 23 evaluierbaren Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation ein und fanden einen leichten absoluten Unterschied in der Verteilung des hohen molekularen Risikos bei molekularem Rückfall (27 %) im Vergleich zu hämatologischem Rückfall (58 %). Ein weiteres Limit unserer Studie könnte ein Selektionsbias sein, da die molekulare Überwachung der Patienten nicht für den gesamten Studienzeitraum Standard war. Informationen zum molekularen Status waren zum Zeitpunkt der Behandlung für einige Patienten, die zuerst wegen hämatologischem Rückfall DLI

erhielten, nicht verfügbar, und Proben wurden in diesen Fällen retrospektiv analysiert. Daher könnte der unterschiedliche Zeitraum vom Rückfall bis zum DLI durch die Verfügbarkeit der molekularen Analyse verfälscht worden sein. Allerdings deutet die Tatsache, dass Patienten mit initialem hämatologischem Rückfall signifikant schlechtere Antworten wie auch etwas höhere Raten von hohem molekularem Risiko zeigten und durch eine zweite allo-HSCT therapiert werden mussten, auf eine aggressivere Erkrankung hin, die möglicherweise durch eine verzögerte Behandlungsaufnahme beeinflusst wurde.

Unsere Studie hat fünf wesentliche Ergebnisse. Erstens ermöglicht die molekulare Überwachung die Entdeckung eines molekularen Rückfalls nach allo-HSCT, der mit deutlich verbesserten Ergebnissen im Vergleich zu einem hämatologischen Rückfall verbunden ist. Zweitens kann dieser Ansatz Rückfallpatienten frühzeitig nach allo-HSCT identifizieren und behandeln. Drittens konnten alle Patienten, die nach dem ersten DLI eine molekulare komplette Remission (mCR) erreicht hatten und anschließend einen Rückfall erlitten, mit einem weiteren DLI erfolgreich behandelt werden, was zu einem langfristigen Überleben führte. Viertens erreichte die Hälfte der Patienten eine mCR, ohne eine GvHD zu entwickeln. Fünftens benötigte kein Patient, der anfangs wegen eines molekularen Rückfalls behandelt wurde, eine zweite HSCT als Salvage-Therapie. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse eine hohe Wirksamkeit bei gleichzeitig niedriger GvHD-Inzidenz durch eskalierende DLIs bei rezidivierenden Myelofibrose-Patienten nach allo-HSCT. Darauf aufbauend haben wir in der Publikation vorgeschlagen, dass die Anwendung der molekularen Überwachung zusammen mit DLI der Standard der Versorgung für die Behandlung von rezidivierender Myelofibrose nach einer allo-HSCT sein sollte.

Zusammengefasst hat in den letzten Jahren die Bedeutung der MRD-Diagnostik bei hämatologischen Malignomen im Kontext der allo-HSCT stetig zugenommen. Unsere Arbeiten liefern nicht nur eine Bestätigung bestehender Erkenntnisse, sondern tragen auch neue, relevante Einsichten bei.

Bei Myelofibrose konnten wir in der bisher größten Kohorte zeigen, dass nach der allo-HSCT Interventionen wie die Reduktion der Immunsuppression und DLI besonders effektiv sind, wenn die molekulare Tumorlast gering ist.⁴ Diese Maßnahmen fördern einen ausgeprägten GvL-Effekt, um die MRD zu beseitigen, während dies bei voll ausgeprägten Rezidiven nicht mehr möglich ist.⁴ Das Risiko einer GvHD bleibt dabei akzeptabel. Dies unterstreicht die Bedeutung der allo-HSCT als derzeit einzige kurative Option bei MF, insbesondere bei Patienten mit Posttransplantations-Rezidiven, die ansonsten eine schlechte Prognose aufweisen.

Bei den Patienten mit AML haben wir den Einfluss der MRD-Bestimmung nicht nur, wie hier² beschreiben, nach, sondern auch vor der Transplantation⁵⁸ untersucht. Die Ergebnisse aus unserer Klinik wie auch von anderen Gruppen zeigen, dass die MRD-Negativität vor allo-HSCT ein wichtiger Faktor für ein geringeres Rezidivrisiko und ein verbessertes Überleben ist.^{58,137} Interessanterweise ergab die myeloablative Konditionierung bei MRD-positiven Patienten mit intermediärem Risiko deutliche Vorteile.¹³⁸ Dies deutet darauf hin, dass eine Optimierung der Konditionierungstherapie die Prognose dieser Patienten verbessern könnte. In Bezug auf den Chimärismus haben wir gezeigt, dass sein prädiktiver Wert für Rezidive bei AML im Vergleich zur MRD-Analyse begrenzt ist. PCR-basierte MRD-Diagnostik erwies sich hier als überlegen und könnte als Surrogatmarker für post-transplantäre Interventionen genutzt werden.^{60,66,76,139}

Untersuchungen aus unserer Klinik zu $\gamma\delta$ -T-Zellen belegen, dass eine schnelle Post-Transplantations-Rekonstitution dieser Zellen mit einem verringerten Rezidivrisiko bei MRD-positiven AML-Patienten

assoziiert ist. Diese einzigartige T-Zell-Population, die einen GvL-Effekt ohne GvHD induzieren kann, könnte ein vielversprechendes Ziel für zukünftige Strategien sein.¹⁴⁰

Die hierarchische Struktur der AML mit Leukämienstammzellen (LSCs) an der Spitze wurde ebenfalls in weiteren Arbeiten aus unserer Klinik untersucht.^{58,141} Wir konnten zeigen, dass die Kombination der PCR-basierten MRD-Detektion mit LSC-Analysen die Vorhersagekraft für Rezidive deutlich verbessern kann. LSC-positive Patienten vor der Transplantation weisen ein erhöhtes Rückfallrisiko auf, auch wenn sie nach der Transplantation negativ werden.¹⁴¹ Die Kombination dieser Ansätze könnte somit die Risikostratifizierung und das Behandlungsmanagement weiter optimieren.

Bei refraktärer oder rezidivierter AML, einem besonders herausfordernden klinischen Szenario, zeigt die MRD-Analyse ebenfalls Potenzial. Unsere Ergebnisse³ legen nahe, dass die MRD-Bestimmung am Tag +100 nach allo-HSCT Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko identifizieren und gezielte post-transplantation Maßnahmen wie DLI oder hypomethylierende Substanzen ermöglichen könnte, wie unsere weitergehenden Studien nahelegen.^{58,139}

Abschließend kann festgehalten werden, dass die MRD-Diagnostik im Kontext der allo-HSCT zunehmend relevant wird. Sie hat bereits in bestimmten Indikationen, wie beispielsweise bei der ALL, Einzug in die klinische Routine gefunden, birgt jedoch weiterhin auch Herausforderungen biologischer (z. B. klonale Evolution, CHIP) und technischer (z. B. Standardisierung) Aspekte. Der Einsatz komplementärer Methoden wie PCR und Durchflusszytometrie sowie die Entwicklung MRD-getriggelter peri- und post-Transplantations-Strategien werden jedoch voraussichtlich dazu beitragen, die Ergebnisse der allo-HSCT weiter zu verbessern.

2. Literaturverzeichnis

1. Gagelmann N, Badbaran A, Salit RB, Schroeder T, Gurnari C, et al. Impact of TP53 on outcome of patients with myelofibrosis undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2023;141(23):2901-2911.
2. Gagelmann N, Badbaran A, Beelen DW, Salit RB, Stölzel F, et al. A prognostic score including mutation profile and clinical features for patients with CMML undergoing stem cell transplantation. *Blood Adv*. Mar 23 2021;5(6):1760-1769.
3. Klyuchnikov E, Badbaran A, Massoud R, Fritsche-Friedland U, Janson D, et al. Post-Transplantation Multicolored Flow Cytometry-Minimal Residual Disease Status on Day 100 Predicts Outcomes for Patients With Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Transplant Cell Ther*. May 2022;28(5):267 e1-267 e7.
4. Gagelmann N, Wolschke C, Badbaran A, Janson D, Berger C, et al. Donor Lymphocyte Infusion and Molecular Monitoring for Relapsed Myelofibrosis After Hematopoietic Cell Transplantation. *Hemasphere*. Jul 2023;7(7):2-8.
5. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E, et al. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *Nati cancer Inst*. 1951;58:197-201.
6. Goodman JW HG. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice *Blood*. 1962;
7. Storb R, Yu C, Wagner JL, Deeg HJ, Nash RA, et al. Methotrexate and Cyclosporine Compared with Cyclosporine Alone for Prophylaxis of Acute Graft versus Host Disease after Marrow Transplantation for Leukemia. *N Engl J Med*. 1986;314:3048-3054.
8. Holtan SG, Pasquini M, Weisdorf DJ. Acute graft-versus-host disease: a bench-to-bedside update. *Blood*. Jul 17 2014;124(3):363-73.
9. Passweg JR, Baldomero H, Alexander T, Angelucci E, Averbuch D, et al. Utilization of hematopoietic cell transplantation and cellular therapy technology in Europe and associated Countries. Using the 2022 activity survey data to correlate with economic and demographic factors. A report from the EBMT. *Bone Marrow Transplant*. Nov 2024:1-10.
10. Storb R, Yu C, Wagner JL, Deeg HJ, Nash RA, et al. Stable Mixed Hematopoietic Chimerism in DLA-Identical Littermate Dogs Given Sublethal Total Body Irradiation Before and Pharmacological Immunosuppression After Marrow Transplantation. *Blood*. 1997;89(8):3048-3054.
11. Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. 1990;76(12):2462-2465.
12. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 1989;86(24):10024-10028.
13. Steinhardt MJ, Reinhardt L, Luu M, Danhof S, Hudecek M, et al. CAR-T-Zell-basierte Immuntherapien in der Hämatoonkologie. *Die Onkologie*. 2023;29(2):160-172.
14. Gratwohl A, Baldomero H, Horisberger B, Schmid C, Passweg J, et al. Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood*. Oct 1 2002;100(7):2374-2386.
15. Kröger N, Zander AR. *Allogene Stammzelltherapie-Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*. 2015.
16. Khoury JD, Solary E, Abela O, Akkari Y, Alaggio R, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. Jul 2022;36(7):1703-1719.
17. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022;140:1200-1228.
18. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. Sep 20 2012;120(12):2454-2465.
19. Platzbecker U. Treatment of MDS. *Blood* 2019:1096-1107.

20. Neukirchen J, Schoonen WM, Strupp C, Gattermann N, Aul C, et al. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Dusseldorf MDS-registry. *Leuk Res.* Dec 2011;35(12):1591-1606.
21. Gagemann N, Bogdanov R, Stolzel F, Rautenberg C, Panagiota V, et al. Long-Term Survival Benefit after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Transplant Cell Ther.* Jan 2021;27(1):95 e1-95 e4.
22. Kröger N, Barbui T, Tefferi A. *Myeloproliferative Neoplasm*. 2012.
23. Smith R.E., Chelmowski M.K., Szabo E. J. Myelofibrosis: A Review of Clinical and Pathologic Features and Treatment. *Oncology hematology*. 1990;10(4):305-314.
24. Mesa RA, Verstovsek S, Cervantes F, Barosi G, Reilly JT, et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). *Leuk Res.* Jun 2007;31(6):737-740.
25. Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, Wedge DC, Angelopoulos N, et al. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med.* Oct 11 2018;379(15):1416-1430.
26. Kröger N, Giorgino T, Scott BL, Ditschkowski M, Alchalby H, et al. Impact of allogeneic stem cell transplantation on survival of patients less than 65 years of age with primary myelofibrosis. *Blood.* May 21 2015;125(21):3347-3350.
27. Arber DA, Hasserjian RP, Orazi A, Mathews V, Roberts AW, et al. Classification of myeloid neoplasms/acute leukemia: Global perspectives and the international consensus classification approach. *Am J Hematol.* May 2022;97(5):514-518.
28. Finazzi G, Vannucchi AM, Barbui T. Prefibrotic myelofibrosis: treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J.* Nov 7 2018;8(104)
29. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia.* Sep 2013;27(9):1861-1869.
30. Scott B. L., Gooley TA, Sorrow ML, Rezvani AR, Linenberger ML, et al. The Dynamic International Prognostic Scoring System for myelofibrosis predicts outcomes after hematopoietic cell transplantation. *Blood.* Mar 15 2012;119(11):2657-2664.
31. Sorrow ML, Logan BR, Zhu X, Rizzo JD, Cooke KR, et al. Prospective Validation of the Predictive Power of the Hematopoietic Cell Transplantation Comorbidity Index: A Center for International Blood and Marrow Transplant Research Study. *Biol Blood Marrow Transplant.* Aug 2015;21(8):1479-1487.
32. Fehse N, Fehse B, Kröger N, Zabelina T, Freiburger P, et al. influence-of-anti-thymocyte-globulin-as-part-of-the-conditioning-regimen-on-immune-reconstitution. *J Hematother Stem Cell Res.* 2003;12:237-242.
33. Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, Sureda A. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* 2019.
34. Di Ianni M, Liberatore C, Santoro N, Ranalli P, Guardalupi F, et al. Cellular Strategies for Separating GvHD from GvL in Haploidentical Transplantation. *Cells.* Jan 11 2024;13(2):2-21.
35. Sosa R, Weiden PL, Storb R, Syrotuck J, Thomas ED, et al. Granulocyte function in human allogeneic marrow graft recipients *Exp Hematol.* 1980;1183-1189.
36. Clark RA, Johnson FL., Klebanoff S., Thomas ED. Defective neutrophil chemotaxis in bone marrow transplant patients. *J Clin Invest.* Jul 1976;58(1):22-31.
37. Scott BL, Pasquini MC, Logan BR, Wu J, Devine SM, et al. Myeloablative Versus Reduced-Intensity Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Journal of Clinical Oncology.* 2017;35(11):1154-1161.
38. Rosée PL, Horne AC, Hines M, von Bahr Greenwood T, Machowicz R, et al. Recommendations for the management of hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults *Blood.* 2019 133(23):2465-2477.
39. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giral S, Lazarus H, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant.* Dec 2009;15(12):1628-1633.

40. Kröger N, Zabelina T, Schieder H, Panse J, Ayuk F, et al. Pilot study of reduced-intensity conditioning followed by allogeneic stem cell transplantation from related and unrelated donors in patients with myelofibrosis. *Br J Haematol*. Mar 2005;128(5):690-697.
41. Klyuchnikov E, Holler E, Bornhauser M, Kobbe G, Nagler A, et al. Donor lymphocyte infusions and second transplantation as salvage treatment for relapsed myelofibrosis after reduced-intensity allografting. *Br J Haematol*. Oct 2012;159(2):172-181.
42. Harada K. Pre-emptive and prophylactic donor lymphocyte infusion following allogeneic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. Aug 2023;118(2):158-168.
43. Ravandi F, Walter RB, Freeman SD. Evaluating measurable residual disease in acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. Jun 12 2018;2(11):1356-1366.
44. Gagelmann N, Quarder M, Badbaran A, Rathje K, Janson D, et al. Clearance of Driver Mutations after Transplantation for Myelofibrosis. *N Engl J Med*. Jan 2025;392(2):150-160.
45. Al Hamed R, Ngoya M, Galimard JE, Sengeloev H, Gedde-Dahl T, et al. Unrelated or haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in second complete remission for acute myeloid leukemia-Improved outcomes over time: A European Society for Blood and Marrow Transplantation Acute Leukemia Working Party study. *Cancer*. Sep 2023;129(17):2645-2654.
46. Bader P, Kreyenberg H, Henze G, HR, Eckert C, Reising M, et al. Prognostic Value of Minimal Residual Disease Quantification Before Allogeneic Stem-Cell Transplantation in Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: The ALL-REZ BFM Study Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(3):377-384.
47. Sahin U, Toprak SK, Atilla PA, Atilla E, Demirer T, et al. An overview of infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Chemother*. Aug 2016;22(8):505-514.
48. Thiede C, Bornhäuser M, Oelschlägel U, Brendel C, Leo R, et al. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia*. 2001;
49. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T, et al. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant*. Jan 2005;35(2):107-119.
50. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? *Blood*. Nov 27 2014;124(23):3345-3355.
51. Cross N. CP, Ernst T, Branford S, Cayuela JM, Deininger M, et al. European LeukemiaNet laboratory recommendations for the diagnosis and management of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. Nov 2023;37(11):2150-2167.
52. Shah NP, Bhatia R, Altman JK, Amaya M, Begna KH, et al. Chronic Myeloid Leukemia, Version 2.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. Feb 2024;22(1):43-69.
53. van der Velden VHJ, Dombrink I, Alten J, Cazzaniga G, Clappier E, et al. Analysis of measurable residual disease by IG/TR gene rearrangements: quality assurance and updated EuroMRD guidelines. *Leukemia*. Jun 2024;38(6):1315-1322.
54. Onecha E, Rapado I, Luz Morales M, Carreno-Tarragona G, Martinez-Sanchez P, et al. Monitoring of clonal evolution of acute myeloid leukemia identifies the leukemia subtype, clinical outcome and potential new drug targets for post-remission strategies or relapse. *Haematologica*. Sep 1 2021;106(9):2325-2333.
55. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*. Jul 20 2012;150(2):264-278.
56. Bacher U, Shumilov E, Flach J, Porret N, Joncourt R, et al. Challenges in the introduction of next-generation sequencing (NGS) for diagnostics of myeloid malignancies into clinical routine use. *Blood Cancer J*. Nov 12 2018;8(11):113.
57. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Bene MC, Buccisano F, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. Mar 22 2018;131(12):1275-1291.
58. Klyuchnikov E, Christopeit M, Badbaran A, Bacher U, Fritzsche-Friedland U, et al. Role of pre-transplant MRD level detected by flow cytometry in recipients of allogeneic stem cell transplantation with AML. *Eur J Haematol*. May 2021;106(5):606-615.

59. Heuser M, Freeman SD, Ossenkoppele GJ, Buccisano F, Hourigan CS, et al. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2021;138:2753-2767.
60. Bacher U, Zander AR, Haferlach T, Schnittger S, Fehse B, et al. Minimal residual disease diagnostics in myeloid malignancies in the post transplant period. *Bone Marrow Transplant*. Aug 2008;42(3):145-57.
61. Thol F, Gabbouline R, Liebich A, Klement P, Schiller J, et al. Measurable residual disease monitoring by NGS before allogeneic hematopoietic cell transplantation in AML. *Blood*. 2018;132:1703-1713.
62. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, Garcia-Sanche O, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*. Oct 2017;31(10):2094-2103.
63. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. Jan 19 2017;129(3):347-357.
64. Talha M, Cairns D. A., Bloor A, Allsup D, Cwynarski K, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia Therapy Guided by Measurable Residual Disease. *New England Journal of Medicine*. 2024;390(4):326-337.
65. Cavo M, San-Miguel J, Usmani ZS, Weisel K, Dimopoulos MA, et al. Prognostic value of minimal residual disease negativity in myeloma: combined analysis of POLLUX, CASTOR, ALCYONE, and MAIA. *Blood*. 2022;139:835-844.
66. Bacher U, Badbaran A, Fehse B, Zabelina T, Zander AR, et al. Quantitative monitoring of NPM1 mutations provides a valid minimal residual disease parameter following allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol*. Jan 2009;37(1):135-42.
67. Kröger N, Badbaran A, Holler E, Hahn J, Kobbe G, et al. Monitoring of the JAK2-V617F mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood*. Feb 1 2007;109(3):1316-1321.
68. Stahl T, Rothe C, Böhme MU, Kohl A, Kröger N, et al. Digital PCR Panel for Sensitive Hematopoietic Chimerism Quantification after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Int J Mol Sci*. Sep 2016;17(9):1515.
69. Fehse B, Badbaran A, Berger C, Sonntag T, Riecken K, et al. Digital PCR Assays for Precise Quantification of CD19-CAR-T Cells after Treatment with Axicabtagene Ciloleucel. *Mol Ther Methods Clin Dev*. Mar 13 2020;16:172-178.
70. Badbaran A, Fehse B, Christopeit M, Aranyosy T, Ayuk FA, et al. Digital-PCR assay for screening and quantitative monitoring of calreticulin (CALR) type-2 positive patients with myelofibrosis following allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. Jun 2016;51(6):872-873.
71. Mannina D, Badbaran A, Wolschke C, Klyuchnikov E, Christopeit M, et al. Digital-droplet PCR assays for IDH, DNMT3A and driver mutations to monitor after allogeneic stem cell transplantation minimal residual disease of myelofibrosis. *Bone Marrow Transplant*. Mar 2022;57(3):510-512.
72. Stahl T, Böhme MU, Kröger N, Fehse B, et al. Digital PCR to assess hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol*. Jun 2015;43(6):462-8 e1.
73. Manoj P. Droplet digital PCR technology promises new applications and research areas. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*. 2016;27(1):742-746.
74. Willasch AM, Kreyenberg H, Shayegi N, Rettinger E, Meyer V, et al. Monitoring of hematopoietic chimerism after transplantation for pediatric myelodysplastic syndrome: real-time or conventional short tandem repeat PCR in peripheral blood or bone marrow? *Biol Blood Marrow Transplant*. Dec 2014;20(12):1918-1925.
75. Kinz E, Leihner A, Lang AH, Drexel H, Muendlein A. Accurate quantitation of JAK2 V617F allele burden by array-based digital PCR. *Int J Lab Hematol*. Apr 2015;37(2):217-224.
76. Bacher U, Dicker F, Haferlach C, Alpermann T, Rose D, et al. Quantification of rare NPM1 mutation subtypes by digital PCR. *Br J Haematol*. Dec 2014;167(5):710-4.

77. Nitschke C, Markmann B, Walter P, Badbaran A, Tolle M, et al. Peripheral and Portal Venous KRAS ctDNA Detection as Independent Prognostic Markers of Early Tumor Recurrence in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Chem*. Mar 1 2023;69(3):295-307.
78. Thiele B, Kloster M, Alawi M, Indenbirken D, Trepel M, et al. Next-generation sequencing of peripheral B-lineage cells pinpoints the circulating clonotypic cell pool in multiple myeloma. *Blood*. Jun 5 2014;123(23):3618-3621.
79. Gagelmann N, Ditschkowski M, Bogdanov R, Bredin S, Robin M, et al. Comprehensive clinical-molecular transplant scoring system for myelofibrosis undergoing stem cell transplantation. *Blood*. Feb 13 2019;133(20):2233-2242.
80. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. Dec 2013;98(6):236-238.
81. Quail MA, Smith M, Coupland P, D Otto T, Harris SR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012;13(341):1-13.
82. Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med*. Sep 2013;137(9):1296-1303.
83. Siqueira JF, Fouad AF, Rocas IN. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *J Oral Microbiol*. 2012;4:1-15.
84. Hook PW, Timp W. Beyond assembly: the increasing flexibility of single-molecule sequencing technology. *Nat Rev Genet*. Sep 2023;24(9):627-641.
85. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem*. Apr 2009;55(4):641-658.
86. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, et al. Dynamic International Prognostic Scoring System (DIPSS) predicts progression to acute myeloid leukemia in primary myelofibrosis. *Blood* 2010;116
87. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G., Mudireddy M, Mannarelli C, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol*. Feb 1 2018;36(4):310-318.
88. Kröger N, Panagiota V, Badbaran A, Zabelina T, Trivai I, et al. Impact of Molecular Genetics on Outcome in Myelofibrosis Patients after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. Jul 2017;23(7):1095-1101.
89. Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, Mannelli F, Mudireddy M, et al. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia*. Jul 2018;32(7):1631-1642.
90. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. May 19 2016;127(20):2391-405.
91. Woo J, Choi DR, Storer BE, Yeung C, Halpern AB, et al. Impact of clinical, cytogenetic, and molecular profiles on long-term survival after transplantation in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. Jul 2019;652-660.
92. Such E, Cervera J, Costa D, Sole F, Vallespi T, et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. Mar 2011;96(3):375-83.
93. Onida F, Kantarjian HM, Smith TL, Ball G, Keating MJ, et al. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients *Blood*. 2002;99:840-849.
94. Such E, Germing U, Malcovati L, Cervera J, Kuendgen A, et al. Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. Apr 11 2013;121(15):3005-15.
95. Patnaik MM, Itzykson R, Lasho TL, Kosmider O, Finke CM, et al. ASXL1 and SETBP1 mutations and their prognostic contribution in chronic myelomonocytic leukemia: a two-center study of 466 patients. *Leukemia*. Nov 2014;28(11):2206-2212.
96. Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Gelsi-Boyer V, Meggendorfer M, et al. Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol*. Jul 1 2013;31(19):2428-36.

97. Heuser M, Gabdoulline R, Loffeld P, Dobbernack V, Kreimeyer H, et al. Individual outcome prediction for myelodysplastic syndrome (MDS) and secondary acute myeloid leukemia from MDS after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Ann Hematol.* Aug 2017;96(8):1361-1372.
98. Dohner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, Dinardo CD, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood.* Sep 22 2022;140(12):1345-1377.
99. Cheson BD, Bennett J M, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL., et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol.* Dec 15 2003;21(24):4642-4649.
100. Kröger N, Holler E, Kobbe G, Bornhäuser M, Schwerdtfeger R, et al. Allogeneic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning in patients with myelofibrosis: a prospective, multicenter study of the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood.* 2009;114(26):5264-5270.
101. Sorror ML, Storb RF, Sandmaier BM, Maziarz RT, Pulsipher MA, et al. Comorbidity-age index: a clinical measure of biologic age before allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol.* Oct 10 2014;32(29):3249-3256.
102. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad* 1999;9236-9241.
103. Christopeit M, Badbaran A, Alawi M, Zabelina T, Zeck G, et al. Correlation of somatic mutations with outcome after FLAMSA-busulfan sequential conditioning and allogeneic stem cell transplantation in patients with myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol.* Sep 2016;97(3):288-296.
104. Gagelmann N, Salit RB, Schroeder T, Badbaran A, Rautenberg C, et al. High Molecular and Cytogenetic Risk in Myelofibrosis Does Not Benefit From Higher Intensity Conditioning Before Hematopoietic Cell Transplantation: An International Collaborative Analysis. *Hemasphere.* Oct 2022;6(10):e784.
105. Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, Hidalgo-Curtis C, Cervantes F, et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood.* Nov 10 2011;118(19):5227-5234.
106. Lindsley RC, Saber W, Mar BG, Redd R, Wang T, et al. Prognostic Mutations in Myelodysplastic Syndrome after Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med.* Feb 9 2017;376(6):536-547.
107. Grob T, Al Hinai ASA, Mathijs A, Sanders MA, Francois G, et al. Molecular characterization of mutant TP53 acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2022;139:2347–54:2347-2354.
108. Loke J, Labopin M, Craddock C, Cornelissen JJ, Labussiere-Wallet H, et al. Additional cytogenetic features determine outcome in patients allografted for TP53 mutant acute myeloid leukemia. *Cancer.* Aug 1 2022;128(15):2922-2931.
109. Yoshizato T, Nannya Y, Atsuta Y, Shiozawa Y, Iijima-Yamashita Y, et al. Genetic abnormalities in myelodysplasia and secondary acute myeloid leukemia: impact on outcome of stem cell transplantation. *Blood.* Apr 27 2017;129(17):2347-2358.
110. Kröger NM, Deeg JH, Olavarria E, Niederwieser D, Bacigalupo A, et al. Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: a consensus process by an EBMT/ELN international working group. *Leukemia.* Nov 2015;29(11):2126-2133.
111. Bernard E, Nannya Y, Hasserjian RP, Devlin SM, Tuechler H, et al. Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Nat Med.* Oct 2020;26(10):1549-1556.
112. Montalban-Bravo G, Kanagal-Shamanna R, Benton C, Class C, Chien K, et al. Genomic context and TP53 allele frequency define clinical outcomes in TP53-mutated myelodysplastic syndromes. *Blood Adv.* Feb 11 2020;4(3):482-495.
113. Gangat N, Guglielmelli P, Szuber N, Begna K, Patnaik MM, et al. Venetoclax with azacitidine or decitabine in blast-phase myeloproliferative neoplasm: A multicenter series of 32 consecutive cases. *Am J Hematol.* Jul 1 2021;96(7):781-789.
114. Wolschke C, Badbaran A, Zabelina T, Christopeit M, Ayuk F, et al. Impact of molecular residual disease post allografting in myelofibrosis patients. *Bone Marrow Transplant.* Nov 2017;52(11):1526-1529.

115. David AS, Amy FM, Amy LA, Rami SK, Kathy LM, et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndromes and secondary AML confer an immunosuppressive phenotype. *Blood*. 136:2812-2823.
116. Daver N, Garcia-Manero G, Basu S., Boddu PC, Alfayez M, et al. Efficacy, Safety, and Biomarkers of Response to Azacitidine and Nivolumab in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia: A Nonrandomized, Open-Label, Phase II Study. *Cancer Discov*. Mar 2019;9(3):370-383.
117. McLornan D, Szydlo R, Koster L, Chalandon Y, Robin M, et al. Myeloablative and Reduced-Intensity Conditioned Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Myelofibrosis: A Retrospective Study by the Chronic Malignancies Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. Nov 2019;25(11):2167-2171.
118. Kröger N, Zabelina T, Guardiola P, Runde V, Sierra J, et al. Allogeneic stem cell transplantation of adult chronic myelomonocytic leukaemia. A report on behalf of the Chronic Leukaemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Br J Haematol*. Jul 2002;118(1):67-73.
119. Symeonidis A, van Biezen A, de Wreede L, Piciocchi A, Finke J, et al. Achievement of complete remission predicts outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in patients with chronic myelomonocytic leukaemia. A study of the Chronic Malignancies Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Br J Haematol*. Oct 2015;171(2):239-246.
120. Sanz GF, Ibanez M, Mora E. Are next-generation sequencing results knocking on Heaven's door for transplantation planning in chronic myelomonocytic leukemia? *Haematologica*. Mar 2020;105(3):530-533.
121. Liu HD, Ahn KW, Hu Z. H., Hamadani M, Nishihori T, et al. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Adult Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. May 2017;23(5):767-775.
122. Coltro G, Mangaonkar AA, Lasho TL, Finke CM, Pophali P, et al. Clinical, molecular, and prognostic correlates of number, type, and functional localization of TET2 mutations in chronic myelomonocytic leukemia (CMML)-a study of 1084 patients. *Leukemia*. May 2020;34(5):1407-1421.
123. Guillermo MB., Koichi T, Keyur P, Feng W, Song X, et al. Impact of the number of mutations in survival and response outcomes to hypomethylating agents in patients with myelodysplastic syndromes or myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Oncotarget*. 2017 2018;9:9714-9727.
124. Elena C, Galli A, Such E, et al. Integrating clinical features and genetic lesions in the risk assessment of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. Sep 8 2016;128(10):1408-1417.
125. Laine C, Davidoff F. Patient-Centered Medicine A Professional Evolution. *JAMA*. 1996;275:152-156.
126. Adibi A, Sadatsafavi M, Ioannidis J. PA, et al. Validation and Utility Testing of Clinical Prediction Models: Time to Change the Approach. *JAMA*. Jul 21 2020;324(3):235-236.
127. Padron E, Garcia-Manero G, Patnaik MM, Itzykson R, Lasho T, et al. An international data set for CMML validates prognostic scoring systems and demonstrates a need for novel prognostication strategies. *Blood Cancer J*. Jul 31 2015;5(7):e333.
128. Rashidi A, Weisdorf DJ, Bejanyan N. Treatment of relapsed/refractory acute myeloid leukaemia in adults. *Br J Haematol*. Apr 2018;181(1):27-37.
129. Craddock C, Labopin M, Pillai S, Finke J, Bunjes D, et al. Factors predicting outcome after unrelated donor stem cell transplantation in primary refractory acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. May 2011;25(5):808-813.
130. Wong R, Shahjahan M, Wang X, Thall PF, De Lima M, et al. Prognostic factors for outcomes of patients with refractory or relapsed acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndromes undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. Feb 2005;11(2):108-114.
131. Wienecke CP, Heida B, Venturini L, Gabdoulline R, Kruger K, et al. Clonal relapse dynamics in acute myeloid leukemia following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. Jul 18 2024;144(3):296-307.
132. Shah MV, Jorgensen JL, Saliba RM, Wang SA, Alousi AM, et al. Early Post-Transplant Minimal Residual Disease Assessment Improves Risk Stratification in Acute Myeloid Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. Jul 2018;24(7):1514-1520.

133. Bastos-Oreiro M, Perez-Corral A, Martinez-Laperche C, Bento L, Pascual C, et al. Prognostic impact of minimal residual disease analysis by flow cytometry in patients with acute myeloid leukemia before and after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol*. Sep 2014;93(3):239-246.
134. Biederstadt A, Rezvani K. How I treat high-risk acute myeloid leukemia using preemptive adoptive cellular immunotherapy. *Blood*. Jan 5 2023;141(1):22-38.
135. Schroeder T, Stelljes M, Christopeit M, Esseling E, Scheid C, et al. Azacitidine, lenalidomide and donor lymphocyte infusions for relapse of myelodysplastic syndrome, acute myeloid leukemia and chronic myelomonocytic leukemia after allogeneic transplant: the Azalena-Trial. *Haematologica*. Nov 1 2023;108(11):3001-3010.
136. Gagelmann N, Wolschke C, Badbaran A, et al. Donor Lymphocyte Infusion and Molecular Monitoring for Relapsed Myelofibrosis After Hematopoietic Cell Transplantation. *Hemasphere*. Jul 2023;7(7):e921. doi:10.1097/HS9.0000000000000921
137. Zhou Y, Othus M, Araki D, Wool BL, Radich JP, et al. Pre- and post-transplant quantification of measurable ('minimal') residual disease via multiparameter flow cytometry in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia*. Jul 2016;30(7):1456-64.
138. Hourigan CS, Dillon LW, Gui G, Logan BR, Fei M, et al. Impact of Conditioning Intensity of Allogeneic Transplantation for Acute Myeloid Leukemia With Genomic Evidence of Residual Disease. *J Clin Oncol*. Apr 20 2020;38(12):1273-1283.
139. Klyuchnikov E, Badbaran A, Massoud R, Fritzsche-Friedland U, Freiburger P, et al. Post-Transplantation Day +100 Minimal Residual Disease Detection Rather Than Mixed Chimerism Predicts Relapses after Allogeneic Stem Cell Transplantation for Intermediate-Risk Acute Myelogenous Leukemia Patients Undergoing Transplantation in Complete Remission. *Transplant Cell Ther*. Jul 2022;28(7):374 e1-374 e9.
140. Klyuchnikov E, Badbaran A, Massoud R, Fritzsche-Friedland U, Janson D, et al. Enhanced Immune Reconstitution of $\gamma\delta$ T Cells after Allogeneic Stem Cell Transplantation Overcomes the Negative Impact of Pretransplantation Minimal Residual Disease-Positive Status in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Transplantation and Cellular Therapy*. 2021;27(10):841-850.
141. Klyuchnikov E, Badbaran A, Massoud R, Freiburger P, Wolschke C, et al. Peri-transplant flow-MRD assessment of cells with leukemic stem cells (LSC) associated phenotype in AML patients undergoing allogeneic stem cell transplantation in CR. *Leukemia*. 2024;38(2):386-388.

3.1 Publikation 1

TRANSPLANTATION

Impact of *TP53* on outcome of patients with myelofibrosis undergoing hematopoietic stem cell transplantation

Nico Gagelmann,^{1,*} Anita Badbaran,^{1,*} Rachel B. Salit,² Thomas Schroeder,³ Carmelo Gumari,^{4,5} Simona Pagliuca,⁶ Victoria Panagiota,⁷ Christina Rautenberg,³ Bruno Cassinat,⁸ Felicitas Thol,⁷ Christine Wolschke,¹ Marie Robin,⁹ Michael Heuser,⁷ Marie-Thérèse Rubio,⁶ Jaroslaw P. Maciejewski,^{4,10} Hans Christian Reinhardt,³ Bart L. Scott,² and Nicolaus Kröger¹

¹Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ²Clinical Research Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA; ³Department of Hematology and Stem Cell Transplantation, West German Cancer Center, University Hospital of Essen, Essen, Germany; ⁴Translational Hematology and Oncology Research Department, Taussig Cancer Center, Cleveland Clinic, Cleveland, OH; ⁵Department of Biomedicine and Prevention, Tor Vergata University of Rome, Rome, Italy; ⁶Department of Hematology, Brabo Hospital, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Nancy, France; ⁷Department of Hematology, Hemostasis, Oncology and Stem Cell Transplantation, Hannover Medical School, Hannover, Germany; ⁸Laboratoire de Biologie Cellulaire and ⁹Service d'Hématologie-Greffe, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France; and ¹⁰Leukemia Program, Department of Hematology and Medical Oncology, Taussig Cancer Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH

KEY POINTS

- Multihit *TP53*^{MT} represents a novel very high-risk group in patients with myelofibrosis undergoing HSCT.
- Multihit *TP53*^{MT} was particularly associated with high rates of leukemic transformation early after transplantation.

***TP53* mutations (*TP53*^{MTs}) have been associated with poor outcomes in various hematologic malignancies, but no data exist regarding its role in patients with myelofibrosis undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Here, we took advantage of a large international multicenter cohort to evaluate the role of *TP53*^{MT} in this setting. Among 349 included patients, 49 (13%) had detectable *TP53*^{MT}, of whom 30 showed a multihit configuration. Median variant allele frequency was 20.3%. Cytogenetic risk was favorable (71%), unfavorable (23%), and very high (6%), with complex karyotype present in 36 patients (10%). Median survival of patients with *TP53*^{MT} was 1.5 vs 13.5 years for those with wild-type *TP53* (*TP53*^{WT}; *P* < .001). Outcome was driven by multihit *TP53*^{MT} constellation (*P* < .001), showing 6-year survival of 56% for individuals with single-hit vs 25% for those with multihit *TP53*^{MT} vs 64% for those with *TP53*^{WT}. Outcome was independent of current transplantation-specific risk factors and conditioning intensity. Similarly, cumulative incidence of relapse was 17% for single-hit vs 52% for multihit vs 21% for *TP53*^{WT}. Ten patients**

with *TP53*^{MT} (20%) presented as leukemic transformation vs only 7 (2%) in the *TP53*^{WT} group (*P* < .001). Out of the 10 patients with *TP53*^{MT}, 8 showed multihit constellation. Median time to leukemic transformation was shorter for multihit and single-hit *TP53*^{MT} (0.7 and 0.5 years, respectively) vs 2.5 years for *TP53*^{WT}. In summary, multihit *TP53*^{MT} represents a very high-risk group in patients with myelofibrosis who are undergoing HSCT, whereas single-hit *TP53*^{MT} alone showed similar outcome to patients with nonmutated *TP53*, informing prognostication for survival and relapse together with current transplantation-specific tools.

Introduction

In the past 40 years, researchers have described the protein structure, functions, and regulation mechanism of *TP53*.¹⁻³ The use of alternate promoters and alternate splicing of introns result in multiple transcript variants in a tissue-dependent manner.⁴ In addition, the dominant-negative and gain-of-function effects are associated with specific mutations.⁵ Hence, ascertaining the tumorigenic mechanism of *TP53* is essential for developing a precise treatment regimen in specific tumors.³

As the most frequently mutated gene, the frequency of *TP53* mutations (*TP53*^{MTs}) is highly variable in different types and

different stages of (hematologic) cancers. For instance, in patients with myelodysplastic syndromes, *TP53*^{MTs} are associated with high-risk disease, rapid transformation to acute myeloid leukemia (AML), resistance to conventional therapies and dismal outcomes, even after intensive treatment with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT).^{6,7}

Myelofibrosis is a chronic myeloproliferative neoplasm that develops either de novo (as primary myelofibrosis) or that evolves from essential thrombocythemia or polycythemia vera (as secondary myelofibrosis).⁸ Although significant progress has been achieved over recent years in understanding the effects of mutation profiles,⁹⁻¹² the role of *TP53*^{MT} in the prognosis of

myelofibrosis is still poorly understood and has not yet been reported in the setting of curative treatment using HSCT.¹³

Here, we aim to investigate the impact of *TP53*^{MT} and cytogenetics on the outcomes of patients with myelofibrosis undergoing HSCT by using a large collaborative international cohort.

Methods

Patients

A total of 349 patients with primary or post-essential thrombocythemia/polycythemia vera myelofibrosis undergoing first HSCT between 1997 and 2021 with information available on mutation profile and cytogenetics were included in this study. Patient data were collected from the University Medical Center Hamburg-Eppendorf (Hamburg, Germany); the West German Cancer Center (Essen, Germany); Hôpital Saint-Louis (Paris, France); the Fred Hutchinson Cancer Research Center (Seattle, WA); Leukemia Program, Department of Hematology and Medical Oncology, Cleveland Clinic, (Cleveland, OH); Department of Hematology, Brabois Hospital, Centre Hospitalier Régional Universitaire (Nancy, France); and Hannover Medical School (Hannover, Germany). Patients with myelofibrosis in progression to acute leukemia at the time of HSCT were excluded. All relevant clinical and transplantation-specific variables and samples for sequencing and cytogenetic analyses were collected at time of HSCT. Conditioning regimens and dose intensities have been reported previously.^{14,15} The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and all patients provided informed consent for analysis of the data.

Current risk stratification, including the dynamic international prognostic scoring system (DIPSS),¹⁶ the mutation-enhanced IPSS (MIPSS70),¹⁷ and the myelofibrosis transplant scoring system (MTSS), was calculated at the time of HSCT.¹²

Mutational and cytogenetic analysis

Bone marrow or peripheral blood samples were obtained before transplantation (start of conditioning), and mutations were detected using next-generation sequencing, as previously described.¹⁸⁻²¹ Cytogenetic analysis and reporting were performed in accordance with the international system for human cytogenetic nomenclature criteria, using standardized techniques. Cytogenetic risk classifications were applied in accordance with previous reports.²² High-molecular risk mutations were categorized in accordance with that proposed by Vanucchi et al.^{11,17}

Most samples were analyzed using targeted sequencing of *TP53*, for which 20-ng samples were used for manual library preparation with Ion AmpliSeq Library Kit Plus in 3 steps (amplifies the DNA target, partially digests amplicons, and ligates adapters to the amplicons and purifies them). The Ion AmpliSeq *TP53* panel was a 2-pool panel with 24 amplicons designed to analyze all coding exons of the *TP53* gene as a community panel by Thermo Fisher. The library was amplified via quantitative polymerase chain reaction. A 50-pM sample of library was used for templating via Ion Chef, using Ion 540 Kit-Chef. The sequencing run was done on Ion S5 Plus with 540-Chip. The

amplicon length was between 125 and 175 bp. On average, the coverage ranged from 8000× to 10 000×, with uniformity of 95%, achieving 97% on target reads, and with an average depth of coverage of 92%. The analysis workflow was specific for this panel and has been developed with Ion Reporter software. The detection threshold was 2%, and detailed information of all analyses are described in the supplemental Material, available on the *Blood* website.

To analyze the role of *TP53*^{MT} in more detail, we categorized patients with single-hit or multihit constellation and defined this in accordance with the international consensus classification (multihit constellation: the presence of ≥2 distinct mutations in *TP53* with a variant allele frequency of ≥10%, 1 mutation plus 1 deletion involving the *TP53* locus at 17p, 1 mutation with a variant allele frequency ≥50%, or 1 mutation plus complex karyotype, and single-hit constellation as the absence of multihit with a variant allele frequency <50%).²³

End points and statistical analysis

The primary end point of the study was overall survival, which was defined as the time from HSCT to last follow-up or death from any cause. Secondary end points were leukemic transformation, nonrelapse mortality, progression-free survival, and overall cumulative incidence of relapse. Progression-free survival was defined as the time from transplantation to either relapse or death from any cause. Nonrelapse mortality was defined as death from any cause as a cumulative incidence estimate, with relapse as the competing risk.

Probabilities of survival were calculated using Kaplan-Meier estimates. Probabilities of nonrelapse mortality and relapse were calculated using the cumulative incidence function, accounting for competing risks. Multivariable analyses were performed to evaluate associations among *TP53*^{MT}; cytogenetics; patient-related, disease-related, donor-related, and HSCT-related variables; and outcomes of interest using a Cox proportional hazards regression model for survival and a Fine and Gray model for competing risk outcomes. Hazard ratios (HRs) with corresponding 95% confidence intervals (CIs) were calculated. Backward stepwise selection was used to identify significant covariates that influenced outcomes. Interaction analyses were performed for univariate and multivariate analysis. The utility of prediction was evaluated by estimating the model's discrimination measured with the concordance index as well as the time-dependent area under the curve.²⁴ A threshold of *P* < .05 was considered significantly different. In case of missing information, multiple imputation was used. All analyses were performed using R statistical software version 4.0.5.

Results

Patients

This study collected data from 349 patients with myelofibrosis undergoing first HSCT from a multicenter international cohort, of whom 49 patients (14%) had *TP53*^{MT}. When analyzing patient and transplantation characteristics at baseline, patients with *TP53*^{MT} who more frequently harbored complex karyotype and unfavorable cytogenetic risk were less likely to receive pretransplantation ruxolitinib and more frequently underwent high-

intensity conditioning regimens as compared with individuals in the $TP53^{WT}$ group. The median age of patients was 58 years and was similar in both groups. The remaining patient and transplantation characteristics are summarized in Table 1.

Molecular-genetic landscape of patients with $TP53^{MT}$ undergoing HSCT

The median variant allele frequency was 20.3% (range, 2.9%-97.6%), and 30 patients with $TP53^{MT}$ showed a multihit

Table 1. Patient characteristics

Characteristic	$TP53^{WT}$ (n = 300)	$TP53^{MT}$ single-hit (n = 19)	$TP53^{MT}$ multihit (n = 30)	P
Age, y, median (range)	58 (22-75)	52 (44-74)	58 (24-75)	.62
Female sex, n (%)	99 (40)	8 (47)	14 (48)	.58
Diagnosis, n (%)				.23
Primary myelofibrosis	214 (71)	14 (74)	17 (57)	
Secondary myelofibrosis	86 (29)	5 (26)	13 (43)	
Circulating blasts, %, median (range)	1 (0-19)	1 (0-12)	1 (0-19)	.85
Platelets, $\times 10^9/L$, median (range)	144 (4-2437)	160 (20-975)	90 (5-623)	.02
WBC, $\times 10^9/L$, median (range)	7.0 (0.1-107.1)	9.8 (0.2-43.0)	6.2 (0.2-168.8)	.44
Hb, g/dL, median (range)	9.4 (5.6-17.9)	9.3 (7.3-13.6)	8.4 (6.8-11.9)	.03
KPS <90%, n (%)	115 (39)	10 (53)	18 (60)	.04
Constitutional symptoms, n (%)	168 (56)	11 (42)	14 (47)	.33
Driver mutation, n (%)				.16
CALR	61 (20)	8 (42)	5 (17)	
JAK2	175 (58)	7 (37)	17 (57)	
MPL	16 (5)	1 (5)	0 (0)	
Triple negative	48 (16)	3 (16)	8 (27)	
High molecular risk, n (%)	104 (44)	6 (35)	10 (35)	.54
Cytogenetic risk, n (%)				.004
Favorable	220 (73)	13 (68)	15 (50)	
Unfavorable	60 (20)	4 (21)	15 (50)	
Very high risk	20 (7)	2 (11)	0 (0)	
Complex karyotype, n (%)	22 (7)	0 (0)	14 (47)	<.001
Ruxolitinib pre-HSCT, n (%)	124 (42)	6 (32)	6 (20)	.05
Donor relation, n (%)				.15
MRD	68 (23)	9 (48)	6 (20)	
MUD	161 (54)	7 (37)	13 (43)	
MMRD	9 (3)	0 (0)	2 (7)	
MMUD	62 (21)	3 (16)	9 (30)	
Conditioning intensity, n (%)				<.001
Reduced	261 (87)	9 (47)	15 (50)	
Myeloablative	39 (13)	10 (53)	15 (50)	
ATG for GVHD prophylaxis, n (%)	206 (69)	12 (63)	20 (67)	.87
Time to HSCT in months, median (range)	26 (0.5-567)	33 (4.6-266.3)	14.2 (2.0-356.6)	.58

High molecular risk was defined as the presence of mutations in *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, or *IDH1/2*.¹⁷

ATG, antithymocyte globulin; GVHD, graft-versus-host disease; Hb, hemoglobin; KPS, Karnofsky Performance Status; MMRD, mismatched related donor; MMUD, mismatched unrelated donor; MRD, matched related donor; MUD, matched unrelated donor; WBC, white blood cell.

Bold font indicates statistical significance.

configuration. Patients with $TP53^{MT}$ showed similar cooccurrence of driver mutations compared with those with $TP53^{WT}$, with JAK2 being the most frequent, followed by CALR and triple negative driver mutation genotype. The remaining distribution of cooccurring additional mutations was generally balanced between both groups, except for $SH2B3$, which occurred in 11% of patients with $TP53^{MT}$ vs 1% of those with $TP53^{WT}$ ($P = .01$). In addition, we found enrichment of $TP53^{MT}$ in patients with mutated $SH2B3$ ($n = 2$, 50%) vs patients with nonmutated $SH2B3$ ($n = 17$; 19%; $P = .04$). In addition, no significant differences between patients with $TP53^{MT}$ and $TP53^{WT}$ were observed for cooccurrence of $ASXL1$ or other high-molecular risk mutations (Table 1; Figure 1A-C). In terms of mutation patterns within the $TP53^{MT}$ group, patients with multihit constellation more frequently presented with JAK2 driver

mutation genotype, $SRSF2$, $SF3B1$, $DNMT3A$, $NRAS$, and $KRAS$ mutations (Figure 1D). In terms of phenotype, patients with $TP53^{MT}$ multihit presented with more severe anemia and thrombocytopenia at the time of HSCT (Table 1; Figure 2).

In terms of cytogenetics, risk classification in the total cohort (in accordance with that by Tefferi et al²²) was favorable ($n = 248$; 71%), unfavorable ($n = 79$; 23%), and very high risk ($n = 22$; 6%). The median number of cytogenetic aberrations was 0 (range, 0-6 aberrations). Complex karyotype (defined as presence of at least 3 aberrations) was present in a total of 36 patients (10%), and significantly more patients in the unfavorable risk group had complex karyotype (43%) vs patients in the favorable risk (0%) and very high-risk (9%; $P < .001$) groups. Furthermore, when compared with $TP53^{WT}$ cases, $TP53^{MT}$ cases were

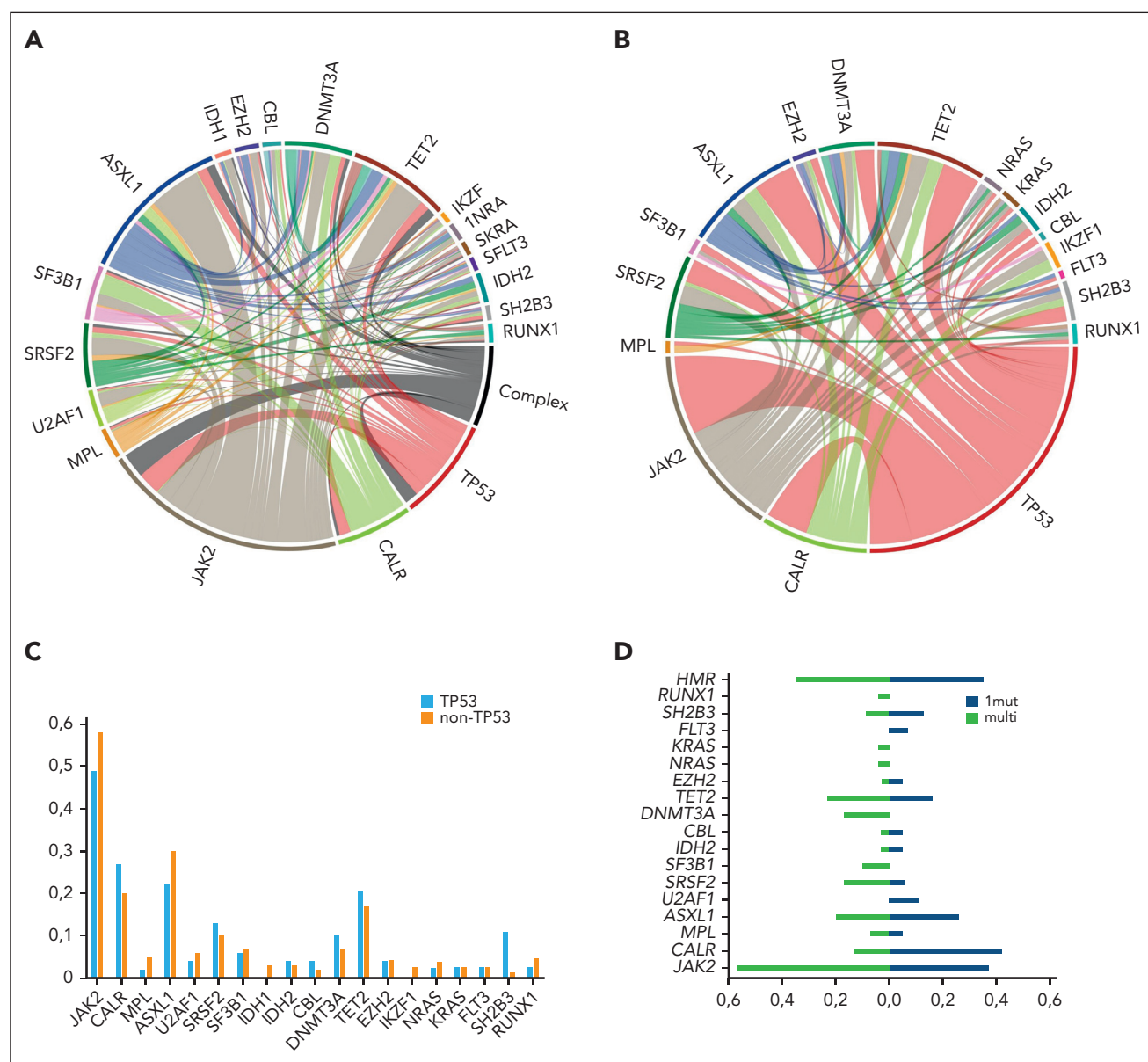


Figure 1. Distribution of mutations in the total cohort based on $TP53^{MT}$ status. (A) The mutation landscape and network with complex karyotype of the total cohort ($n = 349$). (B) The mutation landscape in a chord diagram for all patients with $TP53^{MT}$ ($n = 49$). (C) Frequencies of cooccurring driver and other mutations in patients with $TP53^{MT}$ and $TP53^{WT}$. (D) Frequencies of cooccurring driver and other mutations in patients with $TP53^{MT}$ with single- vs multihit constellations.

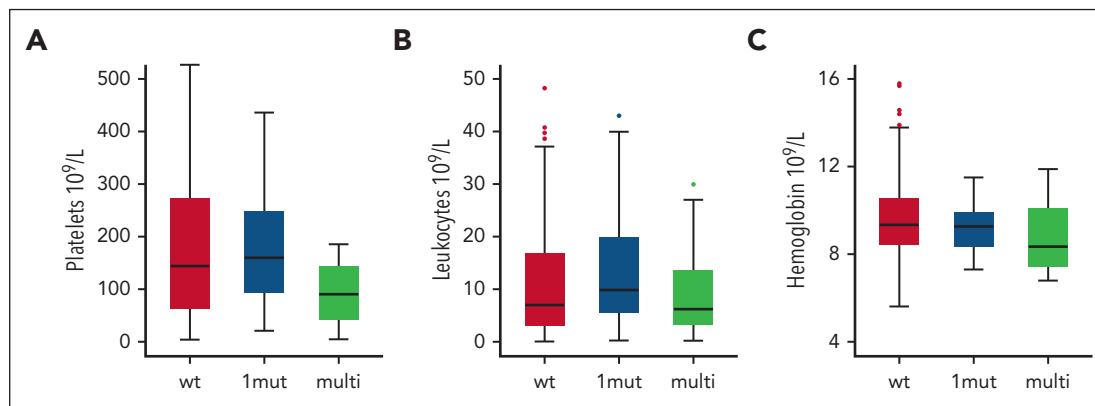


Figure 2. $TP53^{MT}$ state is associated with distinct clinical phenotypes at time of HSCT. The graphs show levels of platelets (A), leukocytes (B), and hemoglobin (C) in patients with wild-type (wt), single-hit (1mut), and multihit $TP53^{MT}$.

enriched in the unfavorable cytogenetic risk category (20% vs 39%, $P = .01$) and, importantly, in patients with complex karyotype (7% vs 29%; $P < .001$).

Impact of $TP53^{MT}$ on post-HSCT outcome

With a median follow-up from HSCT of 5.8 years for the $TP53^{MT}$ group and 9.2 years for the non- $TP53^{MT}$ group, the 6-year overall survival was 36% (95% CI, 20-50) vs 64% (95% CI, 58-70), respectively ($P < .001$; Figure 3A). As a result, median overall survival was 1.5 years (95% CI, 0.3-2.8 years) for the $TP53^{MT}$ group vs 13.5 years (95% CI, 9.2-17.8) for the $TP53^{WT}$ group (HR, 2.08; 95% CI, 1.37-3.15).

When stratified based on $TP53^{MT}$ status, 6-year overall survival was 56% (95% CI, 33-79) for individuals with single-hit vs 25% for those with multihit $TP53^{MT}$ (vs 64% for those with $TP53^{WT}$; $P < .001$; Figure 3B). Stratified only based on variant allele frequency, 6-year overall survival was 46% vs 27% for variant allele frequency $<20\%$ vs $\geq 20\%$, respectively ($P = .21$). Furthermore, no significant impact of variant allele frequency as continuous variable was observed, independent of multihit constellation.

In terms of relapse, individuals with $TP53^{MT}$ also showed significantly higher 6-year cumulative incidence of relapse (39% [95% CI, 25-54] vs 21% [95% CI, 17-25]) when compared with individuals in the $TP53^{WT}$ group ($P = .001$; Figure 3C). Digging into $TP53^{MT}$ configurations, this outcome was specifically driven by multihit constellation (Figure 3D), resulting in cumulative incidence of relapse of 17% (95% CI, 1-34) for single-hit and 52% (95% CI, 34-70) for multihit (HR, 1.42; 95% CI, 1.16-14.56; $P = .03$). A total of 81 patients (19 [39%] with $TP53^{MT}$, 62 [21%] with $TP53^{WT}$) experienced disease relapse; notably, 17 presented as leukemic transformation, of whom 10 were carried $TP53^{MT}$ (20% of all patients) vs only 7 (2%) who carried $TP53^{WT}$ ($P < .001$). When considering only cases presenting with leukemic transformation, multihit $TP53^{MT}$ were observed in 80% of patients compared with 29% in $TP53^{WT}$ cases. The median time to leukemic transformation was significantly shorter for multi- and single-hit $TP53^{MT}$ (0.7 and 0.5 years, respectively) vs 2.5 years for $TP53^{WT}$ (Figure 4A). Furthermore, nonrelapse mortality was not significantly different between all groups ($P = .54$; Figure 4B).

Impact of cytogenetics alone and in the presence of $TP53^{MT}$

Current cytogenetic risk stratification showed no discrete survival differences ($P = .40$), with a 6-year overall survival of 63% (95% CI, 57-69) for favorable, 53% (95% CI, 41-65) for unfavorable, and 62% (95% CI, 41-83) for very high-risk groups. Conversely, complex karyotype still affected post-HSCT outcomes, with a median overall survival of 1.9 years (95% CI, 0-4.2) in such a setting vs 13.5 years in cases with other karyotypes ($P < .001$), which translates into 6-year overall survival rates of 34% vs 63%, respectively. The impact of complex karyotype was verified by analyzing the number of cytogenetic aberrations, showing superimposable overall survival of 63% and 65% for 0 and 1 aberration, 56% for 2 aberrations, 45% for 3 aberrations, and 0% for >3 aberrations ($P = .001$). The presence of trisomy 8 showed significantly worse survival compared with cases without such alteration ($P = .02$). However, we noticed that trisomy 8 cooccurred with complex karyotype in the majority of cases (54% vs 7%; $P < .001$), and the interaction test for trisomy 8 and complex karyotype in terms of outcome was significant ($P < .001$), suggesting that the outcome is driven by a complex karyotype. The remaining impact of other cytogenetic features on overall survival is shown in Table 2. There was a significant interaction between complex karyotype and $TP53^{MT}$, and the outcome was driven by mutation status, especially multihit constellation ($P < .001$).

The current cytogenetic risk stratification also failed to separate patients with different relapse risks ($P = .73$), whereas the 6-year cumulative incidence of relapse was 31% in cases harboring complex karyotype as compared with 19% in patients with other cytogenetic configurations ($P = .03$).

Other factors influencing the posttransplantation outcome

In terms of molecular markers, driver mutation genotype and *ASXL1* mutations were the only other variables affecting post-HSCT overall survival. The complete univariate analysis of patient-, HSCT-, and molecular-related factors is shown in the supplemental Table 1. Regarding currently adopted risk stratification, the 6-year overall survival per DIPSS was 64% for low risk, 64% for intermediate-1 risk, 57% for intermediate-2 risk, and 57% for high-risk ($P = .83$) cases. For the MIPSS70, the

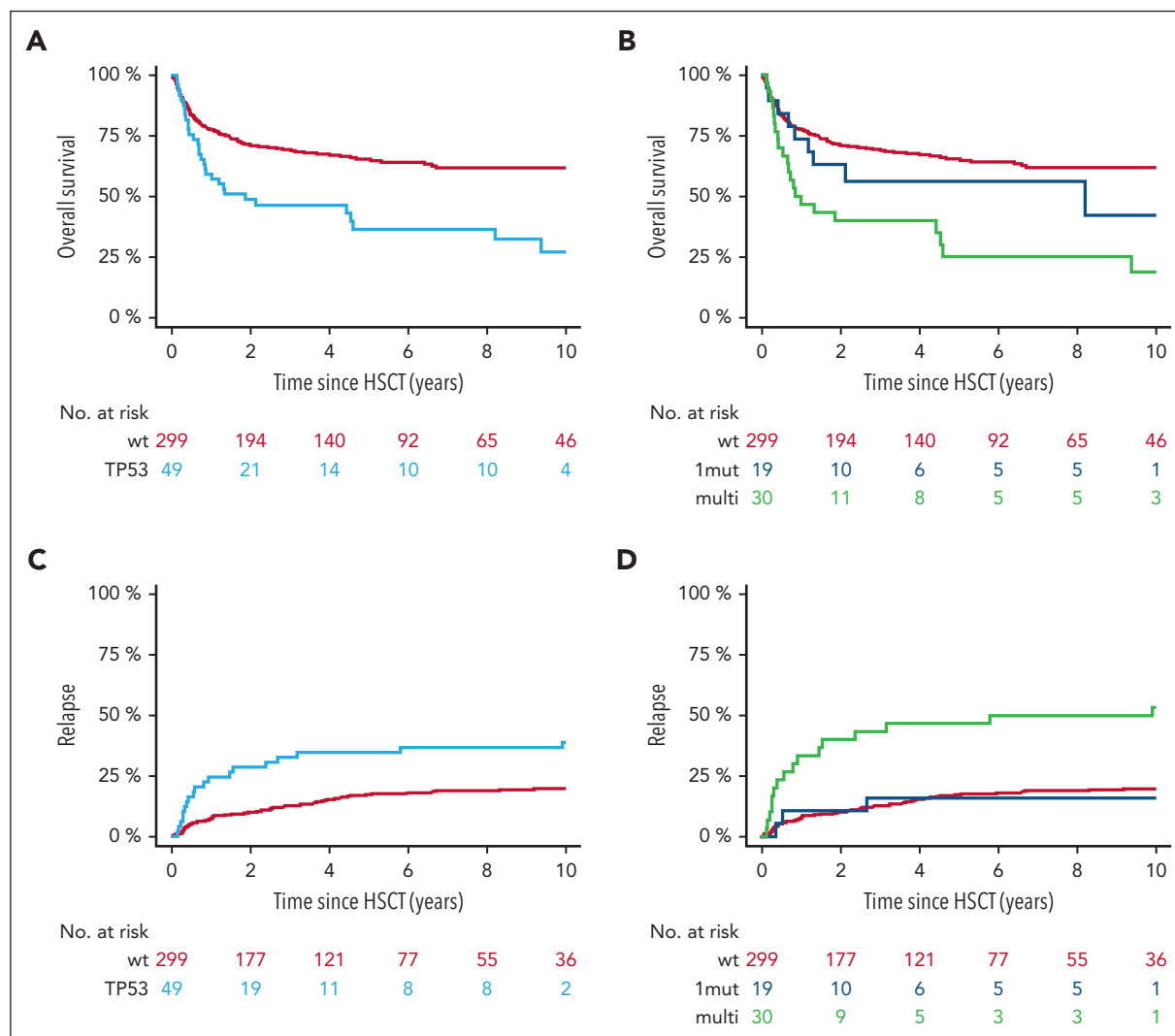


Figure 3. *TP53*^{MT} state is associated with distinct outcomes after HSCT. (A,C) Overall survival (A) and relapse incidence (C) for the comparison of patients with wt *TP53*^{MT} and all patients. (B,D) Overall survival (B) and relapse incidence (D) for the comparison of patients with wt *TP53*^{MT}, *TP53*^{MT} single-hit (1mut), and *TP53*^{MT} multihit (multi).

overall survival was 100% for low risk, 64% for intermediate risk, and 57% for high-risk ($P = .09$) categories. The MTSS also showed significant association with overall survival ($P < .001$), with 6-year overall survival rates of 88% for low, 69% for intermediate, 46% for high, and 31% for very high risk. The concordance index was 0.52 for the DIPSS, 0.55 for the MIPSS70, and 0.69 for the MTSS. The time-dependent area under the curve for the 3 scoring systems was 0.60, 0.55, and 0.72, respectively. In terms of relapse, neither the DIPSS nor the MIPSS70 showed prognostic utility, whereas the MTSS appeared to separate groups with discrete relapse rates, showing 18%, 22%, 27%, and 31% for low, intermediate, high, and high-risk groups, respectively ($P = .08$). Concordance index was 0.57 for the DIPSS, 0.57 for the MIPSS70, and 0.67 for the MTSS; and the time-dependent area under the curve was 0.51, 0.57, and 0.67, respectively.

Multivariable adjustment

Lastly, we analyzed the multivariable effect on the outcomes, selecting previously established transplantation-specific risk

stratification (namely, the MTSS) and other potentially confounding characteristics that were unequally distributed between the mutation groups (ie, conditioning intensity). Overall, the model combining MTSS, *TP53*^{MT}, and conditioning intensity (controlling for more frequent use of higher intensity conditioning in *TP53*^{MT}) confirmed the significant impact of a multihit constellation on the overall survival after HSCT, whereas single-hit showed a similar outcome compared with *TP53*^{WT}. In addition, the impact of MTSS on the overall survival was maintained, whereas no significant difference in survival was observed for different conditioning intensities. Moreover, multihit *TP53*^{MT} confirmed its association with worse outcomes when analyzing relapse risk. For MTSS, the very high risk group was associated with significantly higher risk of relapse when compared with the low risk group. No influence of conditioning intensity was observed. (Table 3). The influence of each variable within the MTSS in addition to *TP53* status was confirmed in a separate analysis, adjusting for all variables (supplemental Table 2). No interaction was observed for *TP53* status and platelet count.

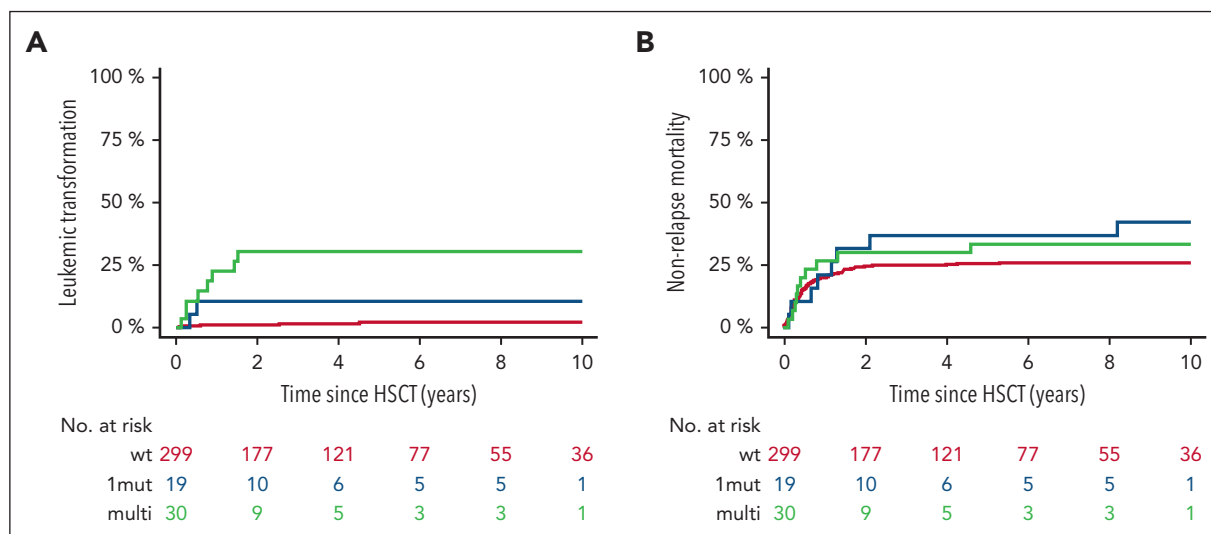


Figure 4. Leukemic transformation and nonrelapse mortality according to *TP53* status. Cumulative incidence of leukemic transformation (A) and nonrelapse mortality (B) based on single-hit or multihit constellation vs *TP53*^{WT}.

Discussion

In this large international collaborative study delving into the outcomes of patients with myelofibrosis undergoing their first HSCT with information on their mutation status and cytogenetics available, we, to the best of our knowledge, for the first

time, specifically evaluated the role of *TP53*^{MT} in myelofibrosis. We showed that individuals with *TP53*^{MT} had an inferior overall survival compared with those with *TP53*^{WT}, and this was mainly driven by multihit constellation. Furthermore, dismal outcome seemed to be triggered by leukemic transformation, which occurred significantly more often, and sooner, after HSCT in patients with multihit *TP53*^{MT}.

Table 2. Univariate analysis of the impact of cytogenetics on overall survival

Characteristic	Overall survival at 6 y (%)	95% CI	P
Cytogenetic risk			.40
Low	63	57-69	
Unfavorable	53	41-65	
Favorable	62	41-83	
Number of aberrations			.001
0	63	56-70	
1	65	54-76	
2	56	36-76	
3	45	23-67	
>3	0		
Complex karyotype			<.001
No	63	57-69	
Yes	34	16-52	
Trisomy 8			.02
No	61	55-67	
Yes	52	33-71	
Trisomy 9			.68
No	61	55-67	
Yes	54	27-81	

n = 28 with trisomy 8 and n = 13 with trisomy 9.

Bold font indicates statistical significance.

Our data, in line with those of previous reports in the non-transplantation setting investigating patients with myelodysplastic syndromes and AML,^{7,25,26} clearly show that (multihit) *TP53*^{MT} significantly increases the risk of relapse and, more importantly, leukemic relapse in patients with myelofibrosis receiving HSCT. Reportedly, *TP53*^{MTs} often occur later in the disease course but dominate the genomic and clinical features of such patients regardless of the initial driver of the myeloproliferative neoplasm.²⁷ In addition, previous work in patients with myelofibrosis and a non-HSCT setting confirmed that, as in patients with other blood cancers with *TP53*^{MT}, these patients also have a dismal prognosis, with an especially high risk of transformation to AML in myelofibrosis.^{27,28}

When looking at baseline clinical features of patients with *TP53*^{MT}, those with multihit constellations were more likely to present with more severe anemia and thrombocytopenia compared with patients with *TP53*^{WT} or *TP53*^{MT} single-hit, whereas most disease-specific and patient-specific characteristics were generally balanced. In terms of mutation patterns, patients with multihit constellation more frequently presented with *JAK2* driver mutation genotype, *SRSF2*, *SF3B1*, *DNMT3A*, *NRAS*, and *KRAS* mutations. However, comparisons regarding other previously established high-molecular risk constellations showed similar distributions between both groups. In our study, the only mutation that was significantly more frequent in both *TP53*^{MT} groups compared with *TP53*^{WT} was *SH2B3*, whose role is still ill defined and warrants further confirmation. *SH2B3* adapter protein 3 is a protein that is encoded by the *SH2B3* gene on chromosome 12 in humans.²⁹ It is ubiquitously expressed in many tissues and cell types, functioning as a

Table 3. Multivariable adjustment for overall survival per current risk stratification

Characteristic	HR	95% CI	P
Model for survival			
Concordance index: 0.71 AIC: 979.11			
TP53 status			
WT	Reference		
Single-hit	1.44	0.69-3.01	.33
Multihit	2.12	1.29-3.49	.003
MTSS			
Low	Reference		
Intermediate	2.44	1.25-4.79	.01
High	5.11	2.60-10.03	<.001
Very high	7.53	3.85-14.74	<.001
Myeloablative conditioning	1.35	0.88-2.09	.17
Model for relapse			
Concordance index: 0.68 AIC: 1252.43			
TP53 status			
WT	Reference		
Single-hit	0.85	0.26-2.81	.79
Multihit	3.30	1.78-6.09	<.001
MTSS			
Low	Reference		
Intermediate	1.25	0.64-2.44	.51
High	1.55	0.76-3.18	.23
Very high	2.26	1.10-4.67	.03
Myeloablative conditioning	1.10	0.62-1.94	.75

MTSS was in accordance with that given by Gagelmann et al.¹²
AIC, Akaike information criterion.

regulator in signaling pathways related to hematopoiesis, inflammation, and cell migration. As a result, it is involved in several hematologic malignancies,²⁹ autoimmune disorders, and cardiovascular disease (including associations with coronary artery disease).³⁰ It has also been reported specifically in patients with myeloproliferative neoplasms, indicating that changes in its expression and JAK2 binding may control JAK2-mediated signaling.³¹ In such a context, the finding of an enrichment of *TP53*^{MT} *JAK2*⁻ status in the *SH2B3*-mutant group in our study may not be surprising but may be limited because of the small sample of mutated cases and, thus, warrants further investigation in more patients to give more insights into molecular and clinical correlates.

Regarding cytogenetics, the high frequency of complex karyotype among patients with *TP53*^{MT} with myelofibrosis may reflect a higher cytogenetic instability and higher tolerance to gross karyotypic aberrancies in preleukemic cells lacking functional *TP53*^{WT} protein. Indeed, the combined poor prognostic impact

of a complex karyotype and *TP53*^{MT} has been observed in the setting of other myeloid neoplasms, especially in cases arising from prior hematologic disorders because acquisition of *TP53*^{MT} drives clonal evolution and is associated with disease ontogeny.^{26,32-34} For all these reasons, *TP53* mutational status and allelic state are currently taken into account in both classification and prognostic schemes of myeloid neoplasia.^{23,26,32,35}

The importance of multihit *TP53*^{MT} configuration has been shown for AML after an allograft, a scenario in which concomitant 17p abnormalities constitute additional poor prognostic factors among patients with *TP53*^{MT} AML.²⁶ More recently, in a largely non-HSCT setting, the biallelic loss of *TP53* activity and its allelic state have been shown to be important for outcomes of patients with myelodysplastic syndromes.⁶ In 2 additional studies, variant allele frequency was an independent prognostic factor in predicting the response to hypomethylating agents among patients with *TP53*^{MT} myelodysplastic syndromes,³⁶ whereas its role was dependent on the treatment intensity among patients with AML.³⁷ Other evidence, however, show contradicting results as to the role of *TP53* clonal burden in patients with AML.^{25,38} Of note, none of these studies were powered to specifically determine the interaction between variant allele frequency and outcomes after HSCT. Moreover, in our study, we clearly demonstrate a significant role of multihit *TP53*^{MT} in the setting of myelofibrosis, suggesting that screening for *TP53*^{MT} might be essential for patients eligible for HSCT. More patients with multihit *TP53*^{MT} received myeloablative conditioning (65% vs 44%), potentially reflecting physicians' choice for more intensive treatment in a high-risk population in this retrospective multicenter cohort. Overall, our results emphasize the need for more basic, translational, and clinical research in patients with myelofibrosis carrying *TP53*^{MT} and its role in various treatment environments, including HSCT and beyond.

For patients with myelodysplastic syndromes and acute leukemia harboring *TP53*^{MT}, lower intensity therapeutic strategies, such as venetoclax-based regimens, may have at least comparable responses to intensive treatment. In such a context, the decision to proceed to HSCT entails many factors, with consideration of fitness in a dynamic fashion upon completion of the first treatment cycles.³⁹ In myelofibrosis, the combination of venetoclax with hypomethylating agents has been shown to produce robust responses in the blast phase and may serve as a potential strategy to bridge patients with (particularly multihit) *TP53*^{MT} or complex karyotype to HSCT.⁴⁰

Posttransplantation relapse remains a major cause of treatment failure in patients with myelofibrosis carrying *TP53*^{MT}, warranting further investment of effort to determine the exact role of post-HSCT next-generation sequencing monitoring and treatment strategies. Indeed, previous work showed the importance of molecular monitoring for driver mutations and highly sensitive chimerism, predicting post-HSCT outcomes.⁴¹ The feasibility of molecular monitoring has been proven among patients with AML, using a targeted gene panel at diagnosis and before and early after HSCT (at day 21).⁴² In a subset of patients, mutations were observed in both the pre- and post-HSCT sampling, and the assessment of variant allele frequency showed that an overall threshold of >0.2% post-HSCT was associated with an increased risk of relapse and worse overall

survival. The use of post-HSCT sequencing for nondriver mutations was not used in most patients in our cohort, thereby precluding the exploration of its role in our study. However, its sensitivity and relevance in a more chronic disease such as myelofibrosis is an important subject of future research, especially for certain subgroups of cases such as those harboring *TP53*^{MT}. With respect to post-HSCT treatments, donor lymphocyte infusions are the current standard of care for post-HSCT relapse in myelofibrosis,⁴³ showing relatively high and deep responses with excellent long-term outcome in comparison to other myeloid malignancies such as AML or myelodysplastic syndromes.^{44,45} Our study was not designed to evaluate the role of donor lymphocyte infusions.⁷ Other preemptive or maintenance strategies after HSCT using hypomethylating agents or even newly introduced *TP53*^{MT}-targeted therapy may provide other options for this group of patients without the risk of graft-versus-host disease and should be a question for further work.⁴⁶

We did not identify a significant HSCT-related variable, including conditioning intensity, graft-versus-host disease prophylaxis, or T-cell depletion, which could have altered post-HSCT outcomes of patients with *TP53*^{MT} myelofibrosis. Furthermore, assuming a priori that *TP53*^{MT} myelofibrosis might have a more aggressive disease phenotype, clinicians may choose pretreatment before transplantation to reduce the disease burden. None of the patients with *TP53*^{MT} in our study received chemotherapy or other agents as a bridge to HSCT, and further research is needed to investigate whether particularly patients with a multihit constellation could benefit from such an approach, given the promising results of new drugs and the observed dismal outcomes. Conversely, patients with single-hit *TP53*^{MT} showed results comparable with WT cases, suggesting prioritizing the timely recourse to HSCT in this setting. Recent studies of AML suggested that *TP53*^{MT} may be associated with an immunosuppressive milieu in the bone marrow microenvironment.⁴⁷ This may open new therapeutic possibilities with the application of existing treatments that can remodel the immune environment, potentially reinducing a graft-versus-leukemia (or graft-versus-myelofibrosis) effect, for example, PD-1 blockade.⁴⁸ However, a recent study reported that use of pembrolizumab showed improved T-cell responses but did not lead to clinical responses among patients with myelofibrosis.⁴⁹

Lastly, we acknowledge several limitations. We cannot exclude the possibility of selection bias, mostly because of the retrospective design of our study. In order to fully capture the complex role of *TP53*, we focused our study on patients with available information of mutation profile and cytogenetics. The selection bias might have been specifically introduced by a focus of patients undergoing HSCT, which is indicated more frequently in patients at higher risk and thus might have resulted in higher frequency of patients with *TP53*^{MT} than that in other published cohorts, which were all done in the non-HSCT setting.^{50,51} To control for this, we applied multivariable adjustment, which confirms other risk factors that have previously shown to predict worse outcomes after HSCT (including performance status, age, driver mutation genotype, donor relation, leukocyte, and platelet counts), suggesting comparability of the present cohort.¹² Furthermore, physicians who are aware of the *TP53* status at time of HSCT might have opted for

higher intensity conditioning to address a more aggressive disease. However, we could show that conditioning intensity did not significantly influence post-HSCT outcomes, which is in line with previous results from our group and others.^{14,52}

In summary, this report provides, to our knowledge, the first comprehensive analysis of the role of *TP53*^{MT} in myelofibrosis in the setting of HSCT. These data suggest that specific counseling regarding HSCT is necessary for patients with myelofibrosis and *TP53*^{MT} with and without complex karyotypes. Despite the worse overall survival observed for this high-risk group, which seems to be inherent to the biology of the disease and independent of transplantation-specific variables, HSCT still remains the only cure for these patients. Our data are not only of immediate clinical relevance for the transplantation and nontransplantation community but also highlight the need for translational and clinical studies focused on understanding the mechanism of *TP53*^{MT} specifically in patients with myelofibrosis.

Authorship

Contribution: N.G. and N.K. conceived the study, collected and analyzed data, interpreted results, and wrote the first draft of the manuscript; A.B. collected and analyzed data, interpreted results, and wrote the first draft of the manuscript; R.B.S., T.S., C.G., S.P., V.P., C.R., B.C., F.T., C.W., M.R., M.H., M.-T.R., J.P.M., H.C.R., and B.L.S. collected data, interpreted results, and wrote the manuscript; and all authors approved the final version of the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: N.G., 0000-0002-0891-1744; C.G., 0000-0001-6829-5544; S.P., 0000-0003-4688-2478; B.C., 0000-0002-6514-3905; M.R., 0000-0003-1388-9876; B.L.S., 0000-0001-9620-7839; N.K., 0000-0001-5103-9966.

Correspondence: Nicolaus Kröger, Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr 52, 20246 Hamburg, Germany; email: nkroeger@uke.uni-hamburg.de.

Footnotes

Submitted 4 January 2023; accepted 8 March 2023; prepublished online on *Blood First Edition* 20 March 2023. <https://doi.org/10.1182/blood.2023019630>.

*N.G. and A.B. contributed equally to this study.

The authors deposited the code used to generate the results to github for open-source access at <https://github.com/ngagelmann/TP53inMFandHSCT>.

Genomic data of the study participants are available upon request from the corresponding author, Nicolaus Kröger (nkroeger@uke.de).

The online version of this article contains a data supplement.

There is a [Blood Commentary](#) on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

REFERENCES

- Leroy B, Anderson M, Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Hum Mutat*. 2014;35(6):672-688.
- Agupitan AD, Neeson P, Williams S, Howitt J, Haupt S, Haupt Y. P53: a guardian of immunity becomes its saboteur through mutation. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10):3452.
- Levine AJ. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(8):471-480.
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 2007;28(6):622-629.
- Hu J, Cao J, Topatana W, et al. Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. *J Hematol Oncol*. 2021;14(1):157.
- Bernard E, Nannya Y, Hasserjian RP, et al. Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Nat Med*. 2020;26(10):1549-1556.
- Lindsley RC, Saber W, Mar BG, et al. Prognostic mutations in myelodysplastic syndrome after stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2017;376(6):536-547.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405.
- Gagelmann N, Kröger N. Improving allogeneic stem cell transplantation in myelofibrosis. *Int J Hematol*. 2022;115(5):619-625.
- Passamonti F, Giorgino T, Mora B, et al. A clinical-molecular prognostic model to predict survival in patients with post polycythemia vera and post essential thrombocythemia myelofibrosis. *Leukemia*. 2017;31(12):2726-2731.
- Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1861-1869.
- Gagelmann N, Ditschkowski M, Bogdanov R, et al. Comprehensive clinical-molecular transplant scoring system for myelofibrosis undergoing stem cell transplantation. *Blood*. 2019;133(20):2233-2242.
- Shahin OA, Chifotides HT, Bose P, Masarova L, Verstovsek S. Accelerated phase of myeloproliferative neoplasms. *Acta Haematol*. 2021;144(5):484-499.
- Gagelmann N, Salit RB, Schroeder T, et al. High molecular and cytogenetic risk in myelofibrosis does not benefit from higher intensity conditioning before hematopoietic cell transplantation: an International Collaborative Analysis. *Hemasphere*. 2022;6(10):e784.
- Samuelson Bannow BT, Salit RB, Storer BE, et al. Hematopoietic cell transplantation for myelofibrosis: the dynamic international prognostic scoring system plus risk predicts post-transplant outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24(2):386-392.
- Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*. 2010;115(9):1703-1708.
- Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. MIPSS70: mutation-enhanced international prognostic score system for transplantation-age patients with primary myelofibrosis. *J Clin Oncol*. 2018;36(4):310-318.
- Kröger N, Panagiota V, Badbaran A, et al. Impact of molecular genetics on outcome in myelofibrosis patients after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(7):1095-1101.
- Thol F, Bollin R, Gehlhaar M, et al. Mutations in the cohesin complex in acute myeloid leukemia: clinical and prognostic implications. *Blood*. 2014;123(6):914-920.
- Panagiota V, Thol F, Markus B, et al. Prognostic effect of calreticulin mutations in patients with myelofibrosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2014;28(7):1552-1555.
- Awada H, Durmaz A, Gurnari C, et al. Machine learning integrates genomic signatures for subclassification beyond primary and secondary acute myeloid leukemia. *Blood*. 2021;138(19):1885-1895.
- Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, et al. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2018;32(7):1631-1642.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, et al. International consensus classification of myeloid neoplasms and acute leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022;140(11):1200-1228.
- Blanche P, Dartigues J-F, Jacquemin-Gadha H. Estimating and recovering time-dependent areas under receiver operating characteristic curves for censored event times with competing risks. *Stat Med*. 2013;32(30):5381-5397.
- Grob T, Al Hinai ASA, Sanders MA, et al. Molecular characterization of mutant TP53 acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2022;139(15):2347-2354.
- Loke J, Labopin M, Craddock C, et al. Additional cytogenetic features determine outcome in patients allografted for TP53 mutant acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2022;128(15):2922-2931.
- Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, et al. Classification and personalized prognosis in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2018;379(15):1416-1430.
- Luque Paz D, Riou J, Verger E, et al. Genomic analysis of primary and secondary myelofibrosis redefines the prognostic impact of ASXL1 mutations: a FIM study. *Blood Adv*. 2021;5:1442-1451.
- Willman CL. SH2B3: a new leukemia predisposition gene. *Blood*. 2013;122(14):2293-2295.
- Mega JL, Stitziel NO, Smith JG, et al. Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: an analysis of primary and secondary prevention trials. *Lancet*. 2015;385(9984):2264-2271.
- Baran-Marszak F, Magdoud H, Desterke C, et al. Expression level and differential JAK2-V617F-binding of the adaptor protein Lnk regulates JAK2-mediated signals in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;116(26):5961-5971.
- Yoshizato T, Nannya Y, Atsuta Y, et al. Genetic abnormalities in myelodysplasia and secondary acute myeloid leukemia: impact on outcome of stem cell transplantation. *Blood*. 2017;129(17):2347-2358.
- Gurnari C, Pagliuca S, Prata PH, et al. Clinical and molecular determinants of clonal evolution in aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Oncol*. 2023;41(1):132-142.
- Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 2015;125(9):1367-1376.
- Khoury JD, Solary E, Abal O, et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703-1719.
- Montalban-Bravo G, Kanagal-Shamanna R, Benton CB, et al. Genomic context and TP53 allele frequency define clinical outcomes in TP53-mutated myelodysplastic syndromes. *Blood Adv*. 2020;4(3):482-495.
- Short NJ, Montalban-Bravo G, Hwang H, et al. Prognostic and therapeutic impacts of mutant TP53 variant allelic frequency in newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 2020;4(22):5681-5689.
- Prochazka KT, Pregartner G, Rücker FG, et al. Clinical implications of subclonal TP53 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2019;104(3):516-523.
- DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naïve, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2019;133(1):7-17.
- Gangat N, Guglielmelli P, Szuber N, et al. Venetoclax with azacitidine or decitabine in blast-phase myeloproliferative neoplasm: a multicenter series of 32 consecutive cases. *Am J Hematol*. 2021;96(7):781-789.
- Wolschke C, Badbaran A, Zabelina T, et al. Impact of molecular residual disease post allografting in myelofibrosis patients. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52(11):1526-1529.

42. Kim T, Moon JH, Ahn J-S, et al. Next-generation sequencing-based posttransplant monitoring of acute myeloid leukemia identifies patients at high risk of relapse. *Blood*. 2018;132(15):1604-1613.
43. Kröger NM, Deeg JH, Olavarria E, et al. Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: a consensus process by an EBMT/ELN international working group. *Leukemia*. 2015;29(11):2126-2133.
44. Kröger N, Alchalby H, Klyuchnikov E, et al. JAK2-V617F-triggered preemptive and salvage adoptive immunotherapy with donor-lymphocyte infusion in patients with myelofibrosis after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2009;113(8):1866-1868.
45. Klyuchnikov E, Holler E, Bornhäuser M, et al. Donor lymphocyte infusions and second transplantation as salvage treatment for relapsed myelofibrosis after reduced-intensity allografting. *Br J Haematol*. 2012;159(2):172-181.
46. Sallman DA, DeZern AE, Garcia-Manero G, et al. Eprenetapopt (APR-246) and azacitidine in TP53-mutant myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2021;39(14):1584-1594.
47. Sallman DA, McLemore AF, Aldrich AL, et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndromes and secondary AML confer an immunosuppressive phenotype. *Blood*. 2020;136(24):2812-2823.
48. Daver N, Garcia-Manero G, Basu S, et al. Efficacy, safety, and biomarkers of response to azacitidine and nivolumab in relapsed/refractory acute myeloid leukemia: a nonrandomized, open-label, phase II study. *Cancer Discov*. 2019;9(3):370-383.
49. Hobbs G, Cimen Bozkus C, Moshier E, et al. PD-1 inhibition in advanced myeloproliferative neoplasms. *Blood Adv*. 2021;5(23):5086-5097.
50. Santos FPS, Getta B, Masarova L, et al. Prognostic impact of RAS-pathway mutations in patients with myelofibrosis. *Leukemia*. 2020;34(3):799-810.
51. Guglielmelli P, Coltro G, Mannelli F, et al. ASXL1 mutations are prognostically significant in PMF, but not MF following essential thrombocythemia or polycythemia vera. *Blood Adv*. 2022;6(9):2927-2931.
52. McLoman D, Szydlo R, Koster L, et al. Myeloablative and reduced-intensity conditioned allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in myelofibrosis: a retrospective study by the Chronic Malignancies Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(11):2167-2171.

© 2023 by The American Society of Hematology

3.2 Publikation 2

A prognostic score including mutation profile and clinical features for patients with CMML undergoing stem cell transplantation

Nico Gagelmann,¹ Anita Badbaran,¹ Dietrich W. Beelen,² Rachel B. Salit,³ Friedrich Stölzel,⁴ Christina Rautenberg,⁵ Heiko Becker,⁶ Aleksandar Radujkovic,⁷ Victoria Panagiota,⁸ Rashit Bogdanov,² Maximilian Christopeit,¹ Yong Park,³ Olivier Nibourel,⁹ Thomas Luft,⁷ Michael Koldehoff,² Maarten Corsten,¹⁰ Michael Heuser,⁸ Jürgen Finke,⁶ Guido Kobbe,⁵ Uwe Platzbecker,¹¹ Marie Robin,¹² Bart L. Scott,³ and Nicolaus Kröger¹

¹Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ²Department of Bone Marrow Transplantation, West German Cancer Center, University Hospital of Essen, Essen, Germany; ³Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA; ⁴Medical Clinic I, University Hospital Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Dresden, Germany; ⁵Department of Hematology, Oncology and Clinical Immunology, Medical Faculty Heinrich-Heine University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; ⁶Department of Medicine I, Medical Center–University of Freiburg, Freiburg, Germany; ⁷Department of Internal Medicine V, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany; ⁸Department of Hematology, Hemostasis, Oncology and Stem Cell Transplantation, Hannover Medical School, Hannover, Germany; ⁹Centre Hospitalier Régional Universitaire Lille, Lille, France; ¹⁰Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands; ¹¹Medical Clinic and Policlinic 1, Hematology and Cellular Therapy, Leipzig University Hospital, Leipzig, Germany; and ¹²Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Université Paris, Paris, France

Key Points

- An *ASXL1*- and/or *NRAS*-mutated genotype, bone marrow blasts, and comorbidities independently predict survival in CMML after transplantation.
- These variables may build a CMML transplant score predictive of survival and nonrelapse mortality and may facilitate patient counseling.

The inclusion of mutation status improved risk stratification for newly diagnosed patients with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). Stem cell transplantation is a potentially curative treatment option, and patient selection is critical because of relevant transplant-related morbidity and mortality. We aimed to evaluate the impact of mutation status together with clinical presentations on posttransplant outcome. Our study included 240 patients with a median follow-up of 5.5 years. A significant association with worse survival was identified for the presence of mutations in *ASXL1* and/or *NRAS*. In multivariable analysis, *ASXL1*- and/or *NRAS*-mutated genotype (hazard ratio [HR], 1.63), marrow blasts >2% (HR, 1.70), and increasing comorbidity index (continuous HR, 1.16) were independently associated with worse survival. A prognostic score (CMML transplant score) was developed, and the following points were assigned: 4 points for an *ASXL1*- and/or *NRAS*-mutated genotype or blasts >2% and 1 point each for an increase of 1 in the comorbidity index. The CMML transplant score (range, 0–20) was predictive of survival and nonrelapse mortality ($P < .001$ for both). Up to 5 risk groups were identified, showing 5-year survival of 81% for a score of 0 to 1, 49% for a score of 2 to 4, 43% for a score of 5 to 7, 31% for a score of 8 to 10, and 19% for a score >10. The score retained performance after validation (concordance index, 0.68) and good accuracy after calibration. Predictions were superior compared with existing scores designed for the nontransplant setting, which resulted in significant risk reclassification. This CMML transplant score, which incorporated mutation and clinical information, was prognostic in patients specifically undergoing transplantation and may facilitate personalized counseling.

Introduction

Chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is a clonal hematopoietic stem cell disorder characterized by persistent monocytosis in the peripheral blood and overlapping features between myelodysplastic syndromes and myeloproliferative neoplasms in the bone marrow (BM).^{1,2} The clinical presentation is heterogeneous with symptoms of pancytopenia and BM failure (recurrent infections, bleeding, and

Submitted 13 October 2020; accepted 26 January 2021; published online 23 March 2021. DOI 10.1182/bloodadvances.2020003600.

To request data, please send an e-mail to Nicolaus Kröger at nkroeger@uke.uni-hamburg.de.

The full-text version of this article contains a data supplement.
© 2021 by The American Society of Hematology

transfusion dependence) as well as signs and symptoms of myeloproliferation (leukocytosis, splenomegaly, presence of B-symptoms). Both phenotypes are associated with a variable risk of transformation into secondary acute myeloid leukemia with very poor prognosis.³

Standard treatment approaches for CMML include supportive care and cytoreductive therapy with hydroxycarbamide for controlling leukocytosis.⁴ Hypomethylating agents have also been incorporated into clinical practice extending the therapeutic options for CMML.⁴⁻⁶ Nevertheless, no such therapies have been shown to alter the natural course of the disease.

Allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) remains the only potentially curative treatment option to date, but it is associated with relevant transplant-related morbidity and mortality.^{7,8} Transplantation is currently indicated in patients age 70 years or younger and is considered as standard of care in patients with higher-risk CMML.^{4,8} Although risk stratification for diagnosed CMML may rely on several established prognostic systems that include clinical and genetic features,⁹ uncertainty remains with respect to adequate clinical-molecular risk stratification specifically regarding posttransplant outcome.¹⁰ Therefore, patients who may benefit the most from allo-SCT and the timing of allo-SCT have yet to be identified.^{4,8,10}

Here, we aimed to propose and validate a comprehensive prognostic index specifically for patients with CMML who are undergoing allo-SCT that includes clinical and molecular features that may improve patient selection by allowing personalized counseling regarding patients' individual posttransplant outcome.

Methods

Patients and data collection

This international multicenter study included a total of 240 CMML patients from 10 centers who were undergoing their first allo-SCT, diagnosed at the time of transplantation according to the criteria of the 2016 revised World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms.¹ The participating centers were the University Medical Center Hamburg-Eppendorf (Hamburg, Germany), University Hospital of Essen (Essen, Germany), University Hospital Carl Gustav Carus (Dresden, Germany), Medical Faculty Heinrich-Heine University (Duesseldorf, Germany), Medical Center-University of Freiburg (Freiburg, Germany), University Hospital Heidelberg (Heidelberg, Germany), Hannover Medical School (Hannover, Germany), Hôpital Saint-Louis (Paris, France), Radboud University Medical Center (Nijmegen, the Netherlands), and Fred Hutchinson Cancer Research Center (FHCRC) (Seattle, Washington). Results from the FHCRC cohort have been reported recently,¹¹ and only the CMML patients from that cohort who had data on mutation status were included in this study. Transplantation was received between 1996 and 2019, and patients with CMML who had already progressed to acute leukemia at the time of transplantation were excluded. Acute leukemia was defined as at least 20% blasts in peripheral blood or BM. This study was approved by the local institutional review boards. The procedures followed were in accordance with the Declaration of Helsinki of 1975, as revised in 2000.

Cytogenetic and mutation analysis

Cytogenetic reporting was performed according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature criteria, using

standardized techniques. Cytogenetic risk category was defined according to previously established cytogenetic risk stratification.¹² Current prognostic systems that were developed for nontransplant CMML, such as the MD Anderson Prognostic Score (MDAPS),¹³ the CMML-specific prognostic scoring system (CPSS)¹⁴ and its molecular refinement (CPSS-mol),¹⁵ the Molecular Mayo Model (MMM),¹⁶ and the Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM), were used to calculate score at the time of transplantation.¹⁷

Mutation analysis was performed on DNA from BM mononuclear cells or from peripheral blood granulocytes collected before transplantation. Most samples (114 of 240) were analyzed centrally in Hamburg (including all samples from Hamburg, Hannover, and Dresden, 27 samples from Essen, and 8 samples from Duesseldorf) using amplicon-based next-generation sequencing of a custom panel consisting of 18 different genes and 313 amplicons in 2 primer pools (pool 1 with 159 amplicons and pool 2 with 154 amplicons) with 20 ng of DNA, targeting regions in *ZRSR2*, *TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, *TP53*, *DNMT3A*, *SF3B1*, *SH2B3*, *SRSF2* (full gene), *KRAS*, *NRAS* codons 12-13 and 61), *U2AF1* (exons 2 and 4), *RUNX1* (exons 1-8), *CBL* (exons 8-9), *ETV6* (exon 8), *IDH1* (exon 4), *IDH2* (exon 4), and *SETBP1* (exon 4). The amplicon range was 125 to 225 bp and the panel size was 45.01 kb. The sequencing was performed for all patients by using an Ion Personalized Genome Machine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Mutations in *JAK2* V617F were determined by using digital polymerase chain reaction as a mutation assay (Bio-Rad, Foster City, CA; catalog No. dHsaCP2000062 for WT gen HeX labeled and dHsaCP2000061 for mutation V617F FAM labeled). The panel and analyses were designed as part of the usual clinical process in Hamburg from the beginning, and samples were always taken before transplantation. The remaining analyses were performed as previously described, and all samples were taken before transplantation.^{11,18,19} Detailed information on mutation analyses is provided in the supplemental Data.

Statistical analysis

Patient characteristics are summarized as number and percentage or median and range. χ^2 was estimated for comparison of categorical variables, and linear regression modeling was used to estimate the fraction that explained variability of clinical phenotype by genotype. Follow-up was calculated using the inverse method.²⁰ The primary outcome of overall survival (OS) was defined as time from date of transplantation to death from any cause. The secondary objective of the cumulative incidence of nonrelapse mortality (NRM) was estimated with a competing risk approach, considering relapse as a competing event. The distribution of survival was estimated by the Kaplan-Meier method and compared by the log-rank test. Hazard ratios (HRs) and corresponding 95% confidence intervals (CIs) using Cox regression were applied for variables in univariable and multivariable analyses. The proportional hazard assumption was validated by visual inspection and testing of Schoenfeld residuals.²¹ The effect of quantitative covariates on NRM was estimated by the Fine-Gray regression model.

Interaction analyses between covariates were tested by introducing interaction terms in univariable and multivariable models, and multiple imputation was used for missing information. The final model for survival was selected on the basis of clinical judgment and by evaluating the model's discrimination using the concordance

index.²² The concordance index is the probability that for 2 randomly selected patients, the patient who experienced the event first had a higher probability of having the event according to the model. A concordance index of 0.5 represents agreement by chance alone, and a concordance index of 1 represents perfect discrimination. The accuracy of predictions was further evaluated by estimating the model's calibration, and the performance of the model was evaluated with 10-fold cross-validation.²² For the final prognostic score, points were assigned relative to the beta coefficients produced from the multivariable model.

All values with $P < .05$ were considered statistically significant. All analyses were performed using R software version 3.6.1 (R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>).

Results

Patient characteristics

A total of 240 CMML patients were included, with a median age of 59 years at the time of transplantation (range, 19-74 years). The median follow-up was 5.5 years (95% CI, 4.0-7.0 years). Male patients were more frequent (72%), and at time of transplantation, CMML classification according to WHO was 0 in 10% (24 patients), 1 in 50% (119 patients), and 2 in 40% (97 patients). Half the patients were transfusion dependent before transplantation. The recipient-donor relationship of the transplant was matched related in 21%, matched unrelated in 54%, mismatched related in 3%, and mismatched unrelated in 22% of patients. Graft type was mainly peripheral blood (93%), and 56% of patients received reduced intensity conditioning compared with 44% of patients who received myeloablative conditioning. Half the patients had a comorbidity index of 0 or 1 according to Sorror et al²³ (supplemental Table 2), whereas 21% of patients had a comorbidity index of >3 . Detailed clinical information regarding the cohort is summarized in Table 1 and supplemental Table 1.

Cytogenetics and patterns of mutational information

Information on cytogenetics was available in 88% of patients. Cytogenetic risk according to Such et al^{12,14} was low in 61%, intermediate in 15%, and high in the remaining 12% of patients. Ninety-one percent of patients had at least 1 mutation at the time of transplantation, and the median number of mutations was 3 (range, 0-8 mutations). The most frequently mutated genes were *SRSF2* (34.5%), *TET2* (34.2%), *ASXL1* (34.2%), *RUNX1* (20.3%), *NRAS* (19.3%), *DNMT3A* (17.4%), *SETBP1* (16.0%), *CBL* (15.4%), *U2AF1* (14.4%), *ZRSR2* (11.2%), *KRAS* (10.9%), *EZH2* (9.0%), *IDH1* (7.9%), *SF3B1* (8.0%), *JAK2* (7.8%), and *TP53* (6.9%). A significant association was found for *TET2* and *ASXL1* ($P = .01$), with co-occurrence of both mutations in 16% of patients. In line with previous findings,¹⁵ another association was found for *TET2* and RNA splicing factors ($P = .001$), with co-occurrence of *TET2* and *SRSF2* in 17% of patients. A complete list of mutations, frequencies of mutations, and mutation patterns are depicted in Figure 1.

We analyzed the distribution of mutations and cytogenetic risk according to French-American-British (FAB) subtypes (dysplastic or proliferative) and WHO classification and found that mutations in *NRAS* ($P = .003$) and *CBL* ($P = .01$) were significantly associated

Table 1. Clinical characteristics

Characteristic	No. (%)	Median (range)
Total cohort	240	
Age at transplant, y		59 (19-74)
Sex		
Female	68 (28)	
Male	172 (72)	
WHO classification		
0	24 (10)	
1	119 (50)	
2	97 (40)	
Bone marrow blasts, %		5 (0-19)
Circulating blasts, %		0 (0-19)
Hemoglobin, g/dL		10 (6-16)
Platelets, $\times 10^9/L$		78 (1-737)
Leukocytes, $\times 10^9/L$		11.0 (0.1-82.6)
Neutrophils, $\times 10^9/L$		5.6 (0.1-59.8)
Transfusion before transplant	122 (51)	
Time from diagnosis to transplant, y		0.7 (0.01-9.2)
Donor relation		
Matched related	50 (21)	
Matched unrelated	131 (54)	
Mismatched related	7 (3)	
Mismatched unrelated	52 (22)	
Conditioning intensity		
Myeloablative	106 (44)	
Reduced	134 (56)	
Peripheral blood graft	224 (93)	
Pretreatment		
No	67 (28)	
Hydroxyurea	63 (26)	
Hypomethylating agents	59 (25)	
Other	31 (13)	
Unknown	20 (8)	
Comorbidity index*		
0-1	121 (50)	
2-3	69 (29)	
>3	50 (21)	
Cytogenetic risk†		
Low	146 (61)	
Intermediate	36 (15)	
High	29 (12)	
Unknown	29 (12)	

*As defined in Sorror et al.²³

†As defined in Such et al¹²: low, normal and isolated deletion of Y (isolated -Y); intermediate, other abnormalities; and high, trisomy 8, complex karyotype (≥ 3 abnormalities), and abnormalities of chromosome 7.

with a proliferative subtype, whereas mutations in *TP53* ($P = .01$) were significantly associated with CMML-0 (supplemental Table 3). Mutations were also stratified according to age groups (younger

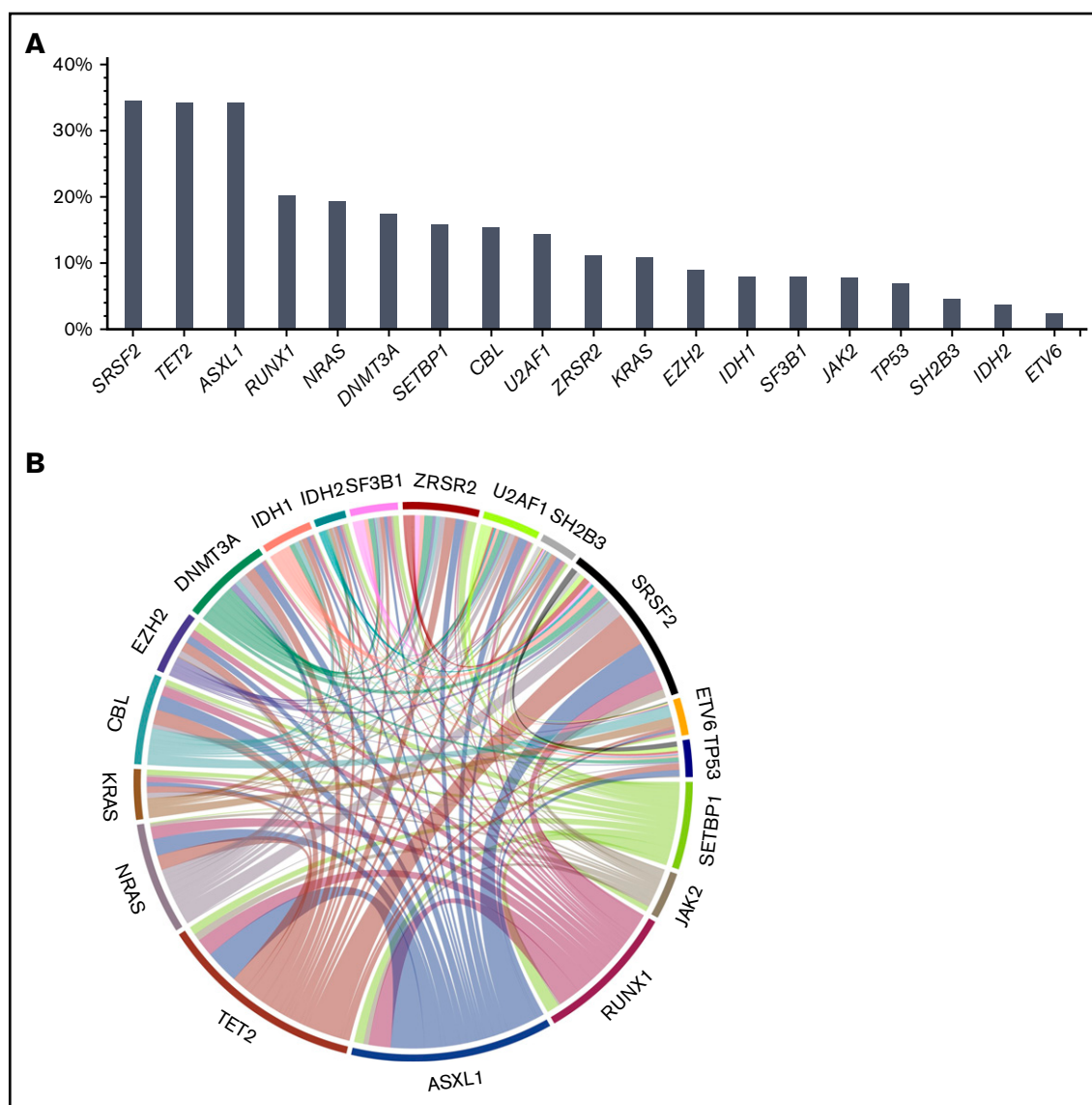


Figure 1. Mutation frequencies and patterns. At time of transplantation, 91% of patients had at least 1 mutation, and the median number of mutations was 3 (range, 0-8 mutations). (A) The most frequently mutated genes were *SRSF2* (34.5%), *TET2* (34.2%), *ASXL1* (34.2%), *RUNX1* (20.3%), *NRAS* (19.3%), *DNMT3A* (17.4%), *SETBP1* (16.0%), *CBL* (15.4%), *U2AF1* (14.4%), *ZRSR2* (11.2%), *KRAS* (10.9%), *EZH2* (9.0%), *IDH1* (7.9%), *SF3B1* (8.0%), *JAK2* (7.8%), and *TP53* (6.9%). A significant association was found for *TET2* and *ASXL1* ($P = .01$), showing co-occurrence of both mutations in 16% of patients. (B) In line with previous findings,¹⁵ another association was found for *TET2* and RNA splicing factors ($P = .001$), showing co-occurrence of *TET2* and *SRSF2* in 17% of patients.

than age 60 years vs age 60 years or older) and comparisons in *SETBP1*, *JAK2*, and *ZRSR2* showed higher frequencies in patients age 60 years or older. Furthermore, comparison of cytogenetic risk classification identified higher frequencies of high-risk patients in patients age 60 years or older (18%) vs those younger than age 60 years (9%).

After applying regression modeling by calculating the R^2 coefficient (meaning the ratio between the explained variation and the total variation of the model), leukocyte counts were independently predicted by mutations in *NRAS* ($P = .001$) and *CBL* ($P = .04$), accounting for 0.21 and 0.17 of the variability, respectively, whereas no significant association was found for BM blasts. With respect to age, *JAK2* was significantly associated with older age ($P = .03$),

and *KRAS* was associated with younger age ($P = .02$). The remaining mutations showed no significant association with age (supplemental Table 4).

Prognostic value of cytogenetics and mutations

In univariable analysis, current cytogenetic risk stratification was not associated with distinctive survival ($P = .30$), with HRs of 0.71 for the intermediate-risk and 1.19 for the high-risk groups compared with the low-risk group. Moreover, current molecular-genetic categories included in the CPSS-mol (using cytogenetic risk together with mutations in *ASXL1*, *NRAS*, *SETBP1*, and *RUNX1*) were not significantly associated with survival ($P = .09$); HRs were 1.01 for intermediate-1-risk, 1.20 for intermediate-2-risk, and 1.72 for high-risk groups compared with the low-risk group.

The complete univariable analysis of molecular features is summarized in Table 2. The number of mutations was not significantly associated with survival ($P = .10$). More than 2 mutations resulted in an HR of 1.39 ($P = .08$). Regarding specific mutations, *ASXL1* ($P = .05$) and *NRAS* ($P = .01$) were significantly associated with worse survival, with HRs of 1.45 and 1.67 compared with unmutated genotypes (supplemental Figure 1). Furthermore, an interaction of mutation number and both mutations was identified ($P < .001$), and the association of *NRAS* and worse outcome was not influenced by the presence or absence of *KRAS* ($P = .41$) or *KRAS/CBL/JAK2* ($P = .98$).

Subsequently, when compared with an *ASXL1*-/*NRAS*-unmutated genotype, the presence of 1 ($P = .01$) or 2 ($P = .03$) mutations was significantly associated with worse survival, with HRs of 1.62 and 1.97 (supplemental Figure 1). Notably, all patients with an absent *ASXL1* or *NRAS* mutation had none of the other sequenced mutations. The full results of the univariable analysis are provided in Table 2.

Prognostic value of clinical variables

According to WHO classification, no significant difference was identified between CMML-0 compared with CMML-1 ($P = .49$) and CMML-2 ($P = .09$), with HRs of 1.28 and 1.84. BM blasts as a continuous variable were not significantly associated with survival ($P = .19$), but likelihood ratio analyses identified blasts $>2\%$ as the best predictor for worse outcome ($P = .008$), with an HR of 1.77 compared with 0% to 2% BM blasts. Another predictor for worse outcome in univariable analysis was increasing comorbidity index, as previously defined by Sorror et al²³ ($P < .001$), showing a continuous HR of 1.19. Categorization into 3 risk groups (0-1 vs 2-3 vs >3) did not provide benefit for prediction accuracy or discrimination. The remaining results of the univariable analysis are summarized in Table 3.

Multivariable effects on survival and development of a CMML transplant score prognostic of survival and NRM

The following variables retained independent prognostic value regarding OS: *ASXL1*- and/or *NRAS*-mutated genotype with an HR of 1.63 ($P = .006$), BM blasts $>2\%$ with an HR of 1.70 ($P = .02$), and increasing comorbidity index with an HR of 1.16 ($P < .001$; Table 4). The original concordance index for the model was 0.68 (95% CI, 0.63-0.73), and the corrected index was 0.67 (95% CI, 0.63-0.71). The model showed good calibration (supplemental Figure 2), and no difference in model accuracy was identified after further adjustment for age, platelet count, and FAB category.

On the basis of regression coefficients, a clinical-molecular prognostic score (the CMML transplant score) was developed, and the following points were assigned to each variable: 4 points for an *ASXL1*- and/or *NRAS*-mutated genotype and BM blasts $>2\%$ and 1 point each for an increase of 1 in the comorbidity index. The resulting score then ranged from 0 to 20 and was predictive of survival, showing a continuous HR of 1.14 ($P < .001$). On the basis of this score, we were able to distinguish up to 5 risk groups with a distinct risk for death after transplantation ($P < .001$; Figure 2A), showing a corresponding 5-year survival of 81% (95% CI, 64%-100%) for a score of 0 to 1, 49% (95% CI, 36%-66%) for a score of 2 to 4, 43% (95% CI, 30%-60%) for a score of 5 to 7, 31% (95%

Table 2. Univariable analysis of effect of molecular-genetic features on survival

Factor	HR	95% CI	P
Cytogenetic risk*			
Low	Reference		
Intermediate	0.71	0.42-1.18	.18
High	1.19	0.71-1.97	.51
Mutation			
<i>TET2</i>	1.11	0.76-1.61	.60
<i>ASXL1</i>	1.45	1.00-2.10	.05
<i>NRAS</i>	1.67	1.11-2.52	.01
<i>KRAS</i>	1.34	0.78-2.32	.29
<i>SETBP1</i>	0.91	0.55-1.53	.73
<i>JAK2</i>	0.80	0.37-1.71	.56
<i>CBL</i>	1.08	0.62-1.68	.95
<i>DNMT3A</i>	0.90	0.57-1.44	.68
<i>EZH2</i>	1.09	0.62-1.91	.76
<i>IDH1</i>	1.28	0.68-2.38	.44
<i>IDH2</i>	0.67	0.25-1.83	.44
<i>ZRSR2</i>	0.74	0.40-1.38	.34
<i>U2AF1</i>	0.93	0.55-1.58	.79
<i>SH2B3</i>	1.09	0.48-2.48	.83
<i>SRSF2</i>	1.28	0.88-1.86	.19
<i>ETV6</i>	0.75	0.18-3.02	.68
<i>TP53</i>	1.31	0.70-2.42	.40
<i>RUNX1</i>	1.27	0.83-1.95	.26
<i>SF3B1</i>	0.86	0.44-1.71	.68
No. of mutations			
Continuous	1.09	0.98-1.22	.10
0-2	Reference		
>2	1.39	0.97-2.01	.08
Genetic risk†			
Low	Reference		
Intermediate-1	0.96	0.57-1.62	.88
Intermediate-2	1.02	0.56-1.85	.95
High	1.34	0.79-2.27	.27

*As defined in Such et al¹²: low, normal and isolated -Y; intermediate, other abnormalities; and high, trisomy 8, complex karyotype (≥ 3 abnormalities), and abnormalities of chromosome 7.

†As defined in Elenea et al¹⁵: cytogenetic risk, presence or absence of *ASXL1* and/or *NRAS* and/or *RUNX1* and/or *SETBP1* mutations.

CI, 20%-49%) for a score of 8 to 10, and 19% (95% CI, 11%-36%) for a score of >10 .

Next, the proposed CMML transplant score was evaluated regarding its prognostic utility for the secondary objective of NRM using a competing risks framework. The continuous hazard for death, with relapse as a competing event, was 1.14 (95% CI, 1.07-1.20) for an increasing score. An increasing CMML transplant score was thus significantly associated with higher NRM ($P < .001$; Figure 2B). Accordingly, the corresponding 5-year NRM was 5% (95% CI, 0%-15%) for a score of 0 to 1, 22% (95% CI, 11%-33%)

Table 3. Univariable analysis of effect of clinical features on survival

Factor	HR	95% CI	P
Continuous age at transplant	1.01	0.99-1.03	.22
Sex			
Female	Reference		
Male	1.24	0.85-1.83	.27
WHO classification			
0	Reference		
1	1.28	0.64-2.58	.49
2	1.84	0.92-3.70	.09
Bone marrow blasts, %			
Continuous	1.02	0.99-1.06	.19
>2	1.77	1.16-2.72	.008
Hemoglobin, g/dL	0.97	0.90-1.05	.46
Platelets, × 10⁹/L			
Continuous	1.00	1.00-1.00	.09
≥150	Reference		
<150	1.16	0.78-1.72	.46
Leukocytes, × 10⁹/L (FAB)			
<13	Reference		
≥13	1.36	0.97-1.91	.08
Neutrophils, × 10 ⁹ /L	1.00	0.98-1.02	.95
Transfusion dependency	1.01	0.67-1.52	.95
Donor relation			
Matched related	Reference		
Matched unrelated	0.96	0.62-1.48	.86
Mismatched related	1.59	0.48-5.25	.45
Mismatched unrelated	1.38	0.84-2.26	.20
Conditioning intensity			
Myeloablative	Reference		
Reduced	1.16	0.83-1.65	.37
Graft type			
Peripheral blood	Reference		
Other	1.68	0.91-3.07	.10
Pretreatment			
No	Reference		
Hydroxyurea	1.02	0.65-1.60	.94
Hypomethylating agents	1.13	0.71-1.79	.61
Other	1.26	0.74-2.16	.40
Comorbidity index*			
Continuous	1.27	1.16-1.39	<.001
0-1	Reference		
2-3	1.44	0.97-2.14	.07
>3	2.06	1.35-3.15	.001

*As defined in Sorror et al.²³**Table 4. Multivariate analysis**

Factor	Beta	HR	95% CI	P	Points
Continuous comorbidity index	0.15	1.16	1.07-1.25	<.001	1
>2 BM blasts, %	0.53	1.70	1.11-2.61	.02	4
Genotype					
ASXL1- and/or NRAS-mutated	0.49	1.63	1.15-2.31	.006	4

Concordance index: 0.68; corrected: 0.67.

populations are available, 3 risk groups (score 0-4, 5-10, >10) provided comparable performance regarding survival and NRM (supplemental Figure 3).

Comparison with previously defined prognostic scores

We then calculated previously defined prognostic scoring systems that included mutation status (CPSS-mol, GFM, and MMM) and evaluated their ability to discriminate distinct survival (supplemental Figure A-C). The CPSS-mol (which included genetic scores, red blood cell transfusion dependency, leukocyte count, and BM blasts) showed 5-year survival for the low-risk group of 42%, whereas survival was 62% in the intermediate-1-risk group, 38% in the intermediate-2-risk group, and 37% in the high-risk group (overall $P = .04$). In contrast, the GFM scoring system (which included age, hemoglobin, leukocyte and platelet counts, and *ASXL1* mutation), had a 5-year survival rate of 50% for the resulting low-risk group, 29% for the intermediate-risk group, and 28% for the high-risk group (overall $P < .001$). The MMM (which included hemoglobin, absolute monocyte count, circulating immature myeloid cell and platelet counts, and *ASXL1* mutation) had a 5-year survival rate of 46% for the low-risk group, 51% for the intermediate-1-risk group, 36% for the intermediate-2-risk group, and 35% for the high-risk group (overall $P = .05$).

Previously established systems that included only clinical variables (CPSS and MDAPS) were also evaluated (supplemental Figure 4D-E). The CPSS (which included FAB and WHO CMML subtypes, CMML-specific cytogenetic risk classification, and red blood cell transfusion dependency) was not significantly associated with different survival rates (overall $P = .20$). Corresponding 5-year survival was 59% in the low-risk group, 47% in the intermediate-1-risk group, 33% in the intermediate-2-risk group, and 48% in the high-risk group. The MDAPS (which included hemoglobin level, presence of circulating immature myeloid cells, absolute lymphocyte counts, and BM blasts) was not significantly associated with different survival rates (overall $P = .10$) and showed 5-year survival of 43% for the low-risk group, 34% for the intermediate-1-risk group, 30% for the intermediate-2-risk group, and 28% for the high-risk group.

The comparison of current prognostic scores according to the performance evaluated by the concordance index showed that the CMML transplant score performed better, showing an original and corrected concordance index of 0.68 and 0.67 compared with previously established systems including mutation status (0.60 for the CPSS-mol, 0.60 for the GFM, and 0.59 for the MMM) as well as only clinical variables (0.56 for the CPSS and 0.58 for the MDAPS; Figure 3).

for a score of 2 to 4, 31% (95% CI, 19%-43%) for a score of 5 to 7, 46% (95% CI, 32%-60%) for a score of 8 to 10, and 51% (95% CI, 36%-67%) for a score of >10. To depict general applicability of the score and utility for validation situations in which only smaller

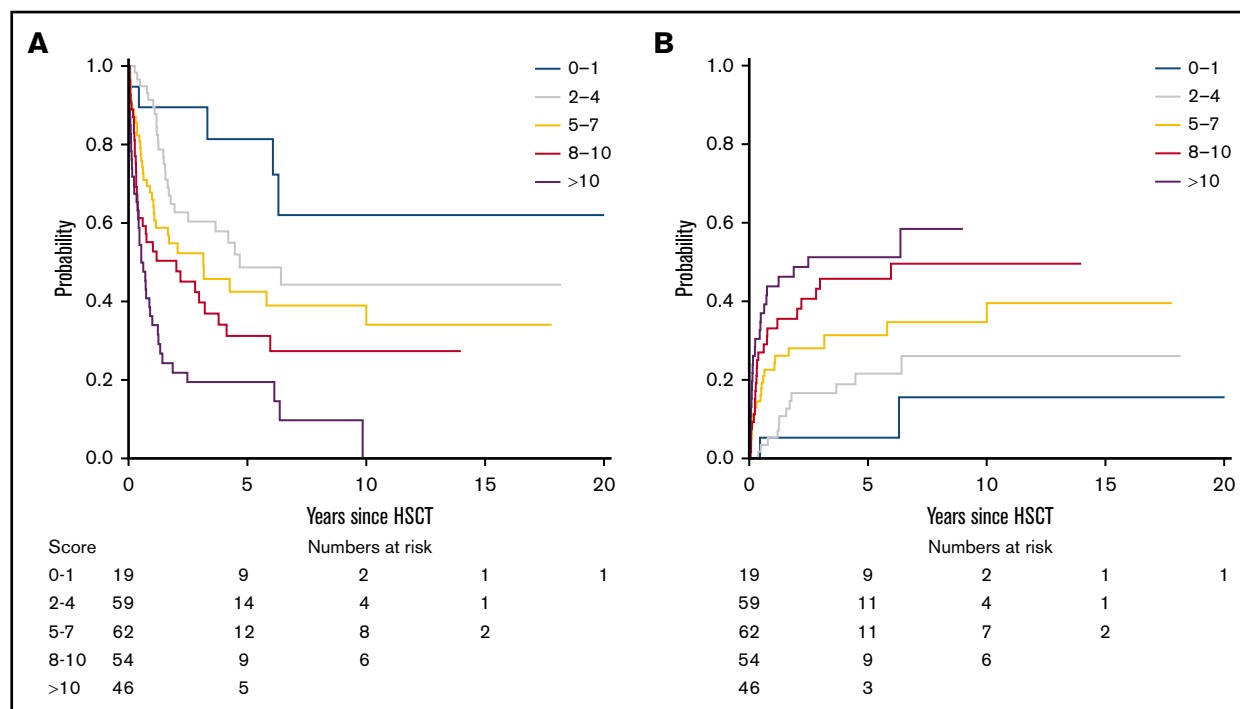


Figure 2. Survival and NRM according to the CMML transplant score. (A) On the basis of the CMML transplant score (range, 0-20), 5 risk groups with distinct risk for death after transplantation could be distinguished ($P < .001$), showing a corresponding 5-year survival of 81% (95% CI, 64%-100%) for a score of 0 to 1, 49% (95% CI, 36%-66%) for a score of 2 to 4, 43% (95% CI, 30%-60%) for a score of 5 to 7, 31% (95% CI, 20%-49%) for a score of 8 to 10, and 19% (95% CI, 11%-36%) for a score of >10 . An increasing CMML transplant score was also significantly associated with higher NRM ($P < .001$). (B) Accordingly, the corresponding 5-year NRM was 5% (95% CI, 0%-15%) for a score of 0 to 1, 22% (95% CI, 11%-33%) for a score of 2 to 4, 31% (95% CI, 19%-43%) for a score of 5 to 7, 46% (95% CI, 32%-60%) for a score of 8 to 10, and 51% (95% CI, 36%-67%) for a score of >10 .

Finally, we generated cross tables of proposed patient classifications (rows), with classifications represented in colors on the x-axis according to previous scores including mutation status (supplemental Figure 5). We found significant differences compared with all 3 scores ($P < .001$ compared with CPSS-mol and GFM and $P < .01$ compared with MMM). The CMML transplant score and the CPSS-mol and MMM generally agreed on patients at higher risk. However, the proposed CMML transplant score resulted in significant reclassification of patients previously in the low- and intermediate-risk classifications.

Discussion

By studying an international multicenter cohort of 240 patients undergoing allo-SCT with long-term follow-up and next-generation sequencing available, we showed that BM blasts at time of transplantation, *ASXL1* and/or *NRAS* mutations, and comorbidities can be integrated to refine risk stratification for CMML after transplantation.

Several studies have evaluated the prognostic value of clinical, hematologic, and transplant-related variables for outcomes in CMML patients undergoing transplantation,^{7,24-26} but results differed substantially, possibly owing to different populations and to limited data availability.¹⁰ For example, higher CPSS score at the time of transplantation was associated with worse survival in 1 study,²⁵ but risk groups had to be combined into low/intermediate-1 and intermediate-2/high for more adequate analyses, and no association was found for CPSS score and NRM. For 20% of

patients, the CPSS was unknown, which suggests some prognostic value but limited discrimination and utility for the transplant setting. Other studies found better survival for patients with higher BM blasts at time of transplantation but may have been confounded by including patients with secondary leukemia in the analyses.^{7,24,26}

In view of the limited evidence on the specific impact of certain clinical variables in the transplant setting and because the inclusion of mutation status led to improved risk stratification in the nontransplant setting,²⁷ we aimed to analyze the impact of mutation status in a large multicenter cohort and to evaluate its role in combination with clinical presentation of the patients. Our results underscore the rationale and better utility for integrated clinical-molecular prognostication for CMML²⁷ by showing better performance of scores that included mutation status such as the CPSS-mol, GFM, and MMM scores when compared with scores that included only clinical variables such as the MDAPS and CPSS.²⁸ Prognostic utility specifically for posttransplant outcome was comparable between the scores but it was still modest, with a concordance index of 0.60 for the CPSS-mol and GFM and 0.59 for the MMM compared with 0.58 for the MDAPS and 0.56 for the CPSS.

By identifying *ASXL1* mutation as predictive for survival after transplantation, we could further confirm the role of this specific mutation, shared by all 3 previously defined scores as a predictor for outcome in nontransplant patients.¹⁵⁻¹⁷ No association of *ASXL1* and *TET2* mutations were identified as was recently suggested,²⁹ but that may have been influenced by the number of patients in our

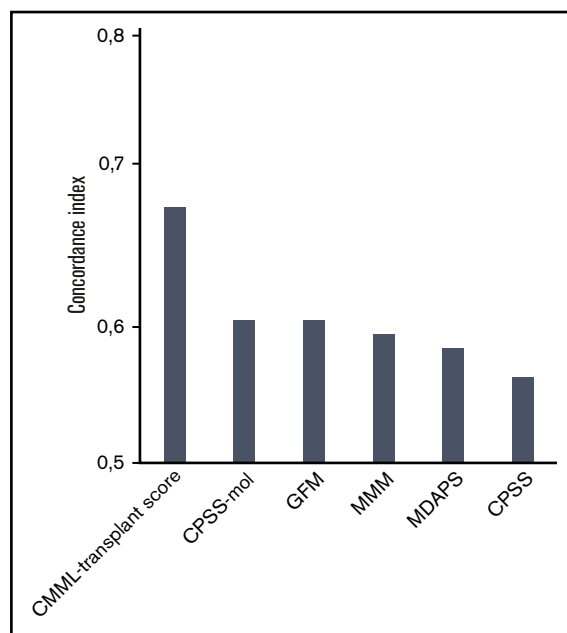


Figure 3. Concordance index for different prognostic scores in patients with CMML undergoing transplantation. The comparison of current prognostic scores according to the performance evaluated by the concordance index showed that the CMML transplant score performed better, showing an original concordance index of 0.68 and a corrected concordance index of 0.67 compared with previously established systems that included mutation status (0.60 for the CPSS-mol, 0.60 for the GFM, and 0.59 for the MMM) as well as clinical variables only (0.56 for the CPSS and 0.58 for the MDAPS). A concordance index of 0.5 represents agreement by chance alone, and a concordance index of 1 represents perfect discrimination.

cohort. The role of *NRAS* and the overall number of mutations on posttransplant outcome was recently shown, albeit regarding relapse.¹¹ Here, we found a significant and consistent association of *NRAS* and survival, which was further refined by an interaction with *ASXL1* and number of mutations.³⁰ By focusing our analyses on survival rather than incidence of relapse, we aimed to better ensure counseling regarding long-term outcome. Furthermore, leukocyte counts were independently predicted by mutations in *NRAS* and *CBL*, which accounts for the outcome variability according to FAB subtypes. Other previously suggested mutations associated with worse survival, such as *SETBP1* and *RUNX1*,^{15,16} were not predictive of posttransplant survival, with HRs of 0.91 and 1.27, respectively.

Prognostic scores for several malignancies have been shown to help patients with complex discussions regarding the risks and benefits of treatment options.³¹ Illustrations can significantly augment physician-patient communication and help patients participate actively in their treatment decisions.³² Patients can access calculators online and on mobile applications. Online risk calculations based upon our data are available (<https://cmml-transplantscore.shinyapps.io/cmml-transplantscore/>). These estimates allow clinicians and patients to establish information-based communication, thereby helping to explain the risks and benefits of an allo-SCT. Of note, the risk for NRM, especially in patients with high scores, should always be taken into account and balanced with life expectancy without transplantation and other treatment options.

We acknowledge several limitations. We cannot exclude the potential for bias in our model because we focused on CMML patients specifically screened for available information on genetics. In addition, we cannot exclude the possibility of residual confounding after threshold selection for BM blasts and mutational risk. However, previous studies and cross-validation confirmed the predictive ability of the proposed model. Conditioning regimens or intensity before transplantation were not associated with survival, and other treatment-related variables such as pretransplant therapies were not included in analyses to minimize selection and time bias.^{33,34} Importantly, the proposed CMML transplant score was associated with survival when stratified according to conditioning intensity ($P < .001$). Limited univariable comparisons of pretreatment in our cohort did not show differences in survival compared no treatment or treatment with hydroxyurea, hypomethylating agents, or other agents, in line with data from a recent randomized trial.³⁵ More research is needed to clarify whether specific pretransplant therapies would improve outcome after transplantation.^{36,37} Furthermore, age was not associated with outcome, even after evaluating interactions including the age-adjusted comorbidity index and mutations,³⁸ which overall were in line with previous analyses.^{24,25,37} Finally, as with any study of prognostic systems, the focus on 1 outcome, here OS, may limit translation into other outcomes. However, the proposed CMML transplant score was also associated with other secondary outcomes such as NRM and relapse-free survival ($P < .001$ for both). Relapse-free survival at 5 years according to risk group was 75% for a score of 0 to 1, 41% for a score of 2 to 4, 37% for a score of 5 to 7, 28% for a score of 8 to 10, and 14% for a score of >10 (supplemental Table 5; supplemental Figure 6).

Further improvements in the understanding of molecular genetics and posttransplant outcome are needed. They may be able to account for center heterogeneity and to capture the evolving management landscape and progress in transplantation techniques. Until then, implementation of our proposed simple and integrated CMML transplant score may facilitate patient counseling regarding probable benefits and risks after allo-SCT.

Authorship

Contribution: N.G. and N.K. designed the study, gathered, analyzed, and interpreted data, and wrote the first draft of the manuscript; A.B. designed the panel, sequenced samples, performed variance analyses, and managed all samples for the study; F.S., C.R., H.B., A.R., V.P., R.B., M. Christopeit, M.R., and B.L.S. gathered data; A.B., D.W.B., R.B.S., F.S., C.R., H.B., A.R., V.P., R.B., M. Christopeit, Y.P., O.N., T.L., M.K., M. Corsten, M.H., J.F., G.K., U.P., M.R., and B.L.S. analyzed and interpreted data and wrote the manuscript; and all authors approved the final version of the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: N.G., 0000-0002-0891-1744; R.B., 0000-0002-6615-7540; M. Christopeit, 0000-0003-4627-0412; M.R., 0000-0003-1388-9876; N.K., 0000-0001-5103-9966.

Correspondence: Nicolaus Kröger, Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr 52, 20246 Hamburg, Germany; e-mail: nkroeger@uke.uni-hamburg.de.

References

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405.
2. Patnaik MM, Parikh SA, Hanson CA, Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukaemia: a concise clinical and pathophysiological review. *Br J Haematol*. 2014;165(3):273-286.
3. Kröger N, Eikema D-J, Köster L, et al; Chronic Malignancies Working Party of the European Society for Blood Marrow Transplantation. Impact of primary disease on outcome after allogeneic stem cell transplantation for transformed secondary acute leukaemia. *Br J Haematol*. 2019;185(4):725-732.
4. Itzykson R, Fenaux P, Bowen D, et al. Diagnosis and treatment of chronic myelomonocytic leukemias in adults: recommendations from the European Hematology Association and the European LeukemiaNet. *HemaSphere*. 2018;2(6):e150.
5. Braun T, Itzykson R, Renneville A, et al; Groupe Francophone des Myélodysplasies. Molecular predictors of response to decitabine in advanced chronic myelomonocytic leukemia: a phase 2 trial. *Blood*. 2011;118(14):3824-3831.
6. Santini V, Allione B, Zini G, et al. A phase II, multicentre trial of decitabine in higher-risk chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 2018;32(2):413-418.
7. Kröger N, Zabelina T, Guardiola P, et al. Allogeneic stem cell transplantation of adult chronic myelomonocytic leukaemia. A report on behalf of the Chronic Leukaemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Br J Haematol*. 2002;118(1):67-73.
8. de Witte T, Bowen D, Robin M, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for MDS and CMML: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(13):1753-1762.
9. Onida F. Models of prognostication in chronic myelomonocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2017;12(6):513-521.
10. Sanz GF, Ibañez M, Mora E. Are next-generation sequencing results knocking on Heaven's door for transplantation planning in chronic myelomonocytic leukemia? *Haematologica*. 2020;105(3):530-533.
11. Woo J, Choi DR, Storer BE, et al. Impact of clinical, cytogenetic, and molecular profiles on long-term survival after transplantation in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2020;105(3):652-660.
12. Such E, Cervera J, Costa D, et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2011;96(3):375-383.
13. Onida F, Kantarjian HM, Smith TL, et al. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood*. 2002;99(3):840-849.
14. Such E, Germing U, Malcovati L, et al. Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(15):3005-3015.
15. Elena C, Galli A, Such E, et al. Integrating clinical features and genetic lesions in the risk assessment of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2016;128(10):1408-1417.
16. Patnaik MM, Itzykson R, Lasho TL, et al. ASXL1 and SETBP1 mutations and their prognostic contribution in chronic myelomonocytic leukemia: a two-center study of 466 patients. *Leukemia*. 2014;28(11):2206-2212.
17. Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, et al. Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2013;31(19):2428-2436.
18. Heuser M, Gabdoulline R, Löffeld P, et al. Individual outcome prediction for myelodysplastic syndrome (MDS) and secondary acute myeloid leukemia from MDS after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Ann Hematol*. 2017;96(8):1361-1372.
19. Kaivers J, Schuler E, Hildebrandt B, et al. Improving the accuracy of prognostication in chronic myelomonocytic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2020;20(8):703-714.
20. Korn EL. Censoring distributions as a measure of follow-up in survival analysis. *Stat Med*. 1986;5(3):255-260.
21. Grambsch PM, Therneau TM. Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals. *Biometrika*. 1994;81(3):515-526.
22. Harrell FE Jr., Lee KL, Mark DB. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med*. 1996;15(4):361-387.
23. Sorrow ML, Maris MB, Storb R, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood*. 2005;106(8):2912-2919.
24. Symeonidis A, van Biezen A, de Wreede L, et al; Chronic Malignancies Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Achievement of complete remission predicts outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in patients with chronic myelomonocytic leukaemia. A study of the Chronic Malignancies Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Br J Haematol*. 2015;171(2):239-246.
25. Liu HD, Ahn KW, Hu Z-H, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult chronic myelomonocytic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(5):767-775.
26. Eissa H, Gooley TA, Sorrow ML, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia: relapse-free survival is determined by karyotype and comorbidities. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(6):908-915.
27. Padron E, Garcia-Manero G, Patnaik MM, et al. An international data set for CMML validates prognostic scoring systems and demonstrates a need for novel prognostication strategies. *Blood Cancer J*. 2015;5(7):e333.

28. Gagelmann N, Bogdanov R, Stölzel F, et al. Long-term survival benefit after allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020;S1083-8791(20):30661-30663.
29. Coltro G, Mangaonkar AA, Lasho TL, et al. Clinical, molecular, and prognostic correlates of number, type, and functional localization of TET2 mutations in chronic myelomonocytic leukemia (CMML)-a study of 1084 patients. *Leukemia*. 2020;34(5):1407-1421.
30. Montalban-Bravo G, Takahashi K, Patel K, et al. Impact of the number of mutations in survival and response outcomes to hypomethylating agents in patients with myelodysplastic syndromes or myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Oncotarget*. 2018;9(11):9714-9727.
31. Laine C, Davidoff F. Patient-centered medicine. A professional evolution. *JAMA*. 1996;275(2):152-156.
32. Adibi A, Sadatsafavi M, Ioannidis JPA. Validation and utility testing of clinical prediction models: time to change the approach. *JAMA*. 2020;324(3):235-236.
33. Robin M, Fenaux P. Hypomethylating agents as bridging therapy before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with chronic myelomonocytic leukemia? *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(1):1-2.
34. Pleyer L, Leisch M, Kouraki A. Effects of the therapeutic armamentarium on survival and time to next treatment in CMML subtypes: an international analysis of 950 cases coordinated by the AGMT study group [abstract]. *Blood*. 2019;134(suppl_1). Abstract 844.
35. Itzykson R, Santini V, Chaffaut C. Decitabine versus hydroxyurea for advanced proliferative CMML: results of the Emsco randomized phase 3 Dakota trial. *Blood*. 2020;136(suppl 1):53-54.
36. Woo J, Howard NP, Storer BE, et al. Mutational analysis in serial marrow samples during azacitidine treatment in patients with post-transplant relapse of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2017;102(6):e216-e218.
37. Kongtim P, Popat U, Jimenez A, et al. Treatment with hypomethylating agents before allogeneic stem cell transplant improves progression-free survival for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(1):47-53.
38. Sorror ML, Storb RF, Sandmaier BM, et al. Comorbidity-age index: a clinical measure of biologic age before allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2014;32(29):3249-3256.

3.3 Publikation 3



Full Length Article Analysis

Post-Transplantation Multicolored Flow Cytometry–Minimal Residual Disease Status on Day 100 Predicts Outcomes for Patients With Refractory Acute Myeloid Leukemia



Evgeny Klyuchnikov¹, Anita Badbaran¹, Radwan Massoud¹, Ulrike Fritsche-Friedland¹, Dietlinde Janson¹, Francis Ayuk¹, Maximilian Christopeit², Christine Wolschke¹, Ulrike Bacher³, Nicolaus Kröger^{1,*}

¹ Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

² Department for Hematology, Oncology, Clinical Immunology and Rheumatology, University of Tübingen, Germany

³ Department of Hematology and Central Hematology Laboratory, Inselspital, Bern University Hospital, Switzerland

Article history:

Received 4 October 2021

Accepted 15 January 2022

Key Words:

Allogeneic stem cell transplantation
Minimal residual disease
Flow cytometry
Refractory AML
Acute myeloid leukemia

A B S T R A C T

Patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia (AML) have a dismal prognosis. Allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) provides a curative approach; however, the overall survival (OS) remains low (20% to 40%). In this setting, although some effective approaches have been evaluated in recent years, the management of such patients still remains challenging. In this study we evaluated the predictive role of post-transplant day 100 minimal residual disease (MRD) detection for post-transplantation outcomes for patients with refractory AML. Fifty-six adult patients with refractory AML (median age 58, range 20–76; male, 61%) who underwent allo-SCT were included in this retrospective monocentric study. Twenty-nine patients (52%) received fludarabine, amsacrine, and cytarabine (FLAMSA)–based conditioning. MRD was assessed using multicolored flow cytometry (MFC) according to European Leukemia Net guidelines (“different from normal” and leukemia-associated phenotype). The sensitivity of the method was 10^{-4} to 10^{-5} . The median marrow blast count at allo-SCT was 25% (range 6% to 91%). At day 100 after transplantation, 40 patients (71%) experienced MFC-MRD negativity, and 16 patients (29%) were MRD positive. All included patients survived at least 100 days after transplantation without relapse. Univariate and multivariate analysis based on Kaplan-Meier and Cox proportional hazards method were performed. The median follow-up was 16 months (range 3 to 66). The post-transplantation day 100 MRD-negative patients instead received 2 allografts (27% versus 6%, $P = .08$). In multivariate analysis, day 100 MRD status (negative versus positive) (OS: 0.23 [0.1 to 0.54], $P = 0.001$; relapses: 0.20 [0.1 to 0.49], $P = .0005$) and FLAMSA versus other regimens (0.34 [0.1 to 0.83], $P = .018$; relapses: 0.43 [0.17 to 1.1], $P = .07$) independently impacted post-transplantation survival. We suggest that post-transplantation day 100 MFC-MRD detection plays predictive role in refractory AML patients and may help to define possible candidates for early post-transplantation interventions aiming to decrease the relapse risk and improve survival.

© 2022 The American Society for Transplantation and Cellular Therapy. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

The outcomes for patients with acute myeloid leukemia (AML) have been stagnating since last decades, reaching a long-term survival of about 10%. Several factors including allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) were found to be associated with improved outcomes [1].

Up to 30% of adults with newly diagnosed AML fail to achieve complete remission (CR) after 2 courses of intensive chemotherapy. Moreover, the failure to achieve CR

increases in older (>60 years) patients [2]. Some of these patients (30% to 45%) may achieve a second CR when using a more aggressive reinduction regimen [3], although this rate can be even as low (10% to 15%) in patients whose first CR lasted for 1 year only [4]. In general, the treatment options for relapsed/refractory AML patients have been extremely limited and are associated with poor outcomes [5]. Moreover, outcomes of the patients relapsing after allo-SCT are very dismal [6].

A number of previously published, mostly retrospective studies showed a curative potential of allo-SCT for such patients with survival reaching around 30% [7]. Further studies revealed prognostic significance of some factors such as that

Financial disclosure: See Acknowledgments on page 267.e6.

*Correspondence and reprint requests: Nicolaus Kröger, MD, Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg.

E-mail address: n.kroeger@uke.de (N. Kröger).

donor type [8], length of CR [9], circulating peripheral blasts [9,10], number of pretransplantation bone marrow blasts [11–13], performance status [9,10,14], cytogenetics [9,13], number of pretransplantation salvage therapy lines [11,15], and patients' cytomegalovirus status [11] for post-transplantation outcomes. On the basis of these data, some prognostic scores were created, showing an improved 3-year overall survival (OS) of 40% for patients with favorable versus 6% for those with adverse risk constellation [9]. Incorporation of allo-SCT and prophylactic donor lymphocytes infusions (DLIs) or hypomethylating agents into a salvage strategy led to improved outcomes for this group of patients, especially for those with primary induction failure [16].

Other options to improve the outcomes for those patients may include optimization of “bridging” strategies, maintenance therapy, and improving post-transplantation relapse prediction. Although previous studies showed that “bridging” strategies may improve the outcomes, long-term OS rarely exceeds 50% [17,18]. Recently, DiNardo et al [19], reported on dramatically improved OS of 80% in relapsed/refractory AML patients, who underwent allo-SCT after “bridging” strategy including a combination of chemotherapy with venetoclax. Although data on refractory AML patients are scarce, maintenance therapy has been shown to significantly improve outcomes for relapses and survival in high-risk AML patients [20–22]. Thus the post-transplantation outcomes for relapsed/refractory AML patient have been improving recently.

Nevertheless, optimizing prediction of post-transplantation relapse and defining patients who may benefit from post-transplantation interventions remains an important issue. In this context, several studies showed independent impact of MRD detection for AML patients achieving CR before and after allo-SCT [23–30]. Data on post-transplantation MRD detection in relapsed/refractory AML patients are scarce. Recently, Short et al [31], reported on the importance of MRD negativity in relapsed/refractory AML patients in a nontransplantation setting.

In this study, we suggest a significant impact of the post-transplant MRD status at day 100 assessed by multicolored flow cytometry (MFC) according to modern European Leukemia Net (ELN) guidelines (combining the “different from normal” method and leukemia-associated immunophenotypes [LAIPs]) on survival outcomes in refractory AML patients. We postulated that a negative post-transplantation MFC-MRD status on day 100 may be associated to a reduced relapse risk and improved survival even in this prognostically unfavorable subgroup of AML patients.

PATIENTS AND METHODS

Study cohort

Adult (≥ 18 years old) patients were included in this monocentric retrospective study if they had AML, did not fulfill the criteria for CR before allo-SCT, underwent allo-SCT after myeloablative or reduced-intensity conditioning and achieved at least morphologic leukemia-free state in the bone marrow (morphological blast counts $< 5\%$) at day 100, and had available MFC MRD data on day 100 after allograft. All patients received a calcineurin-based GVHD prophylaxis. The tapering of the post-transplant immunosuppression had been performed prior to post-transplant interventions. We used the genetic ELN criteria (2017) to assign a disease-dependent risk [32]. Criteria for response to therapy were used as proposed by an International Working Group [33]. All patients consented in accordance with the Declaration of Helsinki. Follow-up was current as of August 15, 2021.

MFC detection of MRD

Immunophenotypic analysis was performed at day 100 after allo-SCT on whole bone marrow specimens after stain-lyse-wash standard techniques, as described previously in more detail [26]. Eight-color immunostaining with fluorochrome directly conjugated with monoclonal antibodies was performed. The analysis was performed according to ELN consensus

recommendation [34]. Up to 2,000,000 events per tube (6,000,000 events per sample) were evaluated. All antibodies were obtained from Beckman-Coulter Inc. (Southfield, MI) or Becton Dickinson (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ). Analysis of list mode files was performed using Infinicyte Flow Cytometry Software (Cytognos, Salamanca, Spain). The assessments were performed using the LAIP and the “different from normal” strategy. Following ELN guidelines, a threshold of 0.1% or more of aberrant cells (combining the assessment of aberrant hematopoiesis and LAIP positive cells) in the bone marrow defined MRD positivity [34]. The sensitivity of our MFC-based approach was 10^{-4} to 10^{-5} .

Statistical analysis

Unadjusted probabilities of OS and leukemia-free survival (LFS) were estimated by using the Kaplan-Meier and Cox regression methods. Probabilities of non-relapsed mortality (NRM) and relapse were summarized by using cumulative incidence estimates. NRM was defined as death without relapse and was considered a competing risk for relapse, whereas relapse was a competing risk for NRM. Variables with a P value $\leq .10$ were considered to be significant and were included into multivariate analysis. Multivariate analysis for OS and LFS was performed with Cox regression method. The multivariate analysis for comparison of NRM and relapses was based on a sub-distributive hazard model for cumulative incidence function. The probability of developing acute (grade II–IV) graft-versus-host disease (GVHD) and chronic GVHD was depicted by calculating the cumulative incidence with death without GVHD as a competing risk.

Categorical characteristics were compared by Pearson's or Fisher's exact test. Continuous variables were compared using non-parametric Mann-Whitney test. Statistical analysis was performed with IBM SPSS Version 25 (SPSS, Inc., Chicago, IL) and R software (Version 3.5.1; R Foundation, Vienna, Austria) with competing risks calculated using the package “cmprsk” (<http://CRAN.R-project.org/package=cmprsk>).

RESULTS

Patients' characteristics

The characteristics of the study population are summarized in Table 1. Fifty-six patients were included in to the analysis. The allografts (first, $n = 44$ [79%]; second, $n = 12$ [21%]) after myeloablative ($n = 31$ [55%]) and reduced intensity conditioning ($n = 25$ [45%]) were performed at University Hospital of Hamburg in the period 01/2015 to 12/2020. All patients failed to fulfill the criteria for CR/CRi and showed increased marrow blasts ($> 5\%$) or increased peripheral blood blasts at the time of allo-SCT. Thirty-six patients (64%) were refractory to first-line therapy, whereas 20 were refractory to relapse therapy (first relapse, $n = 18$; second relapse, $n = 2$). The median amount of marrow blasts (cytomorphology) at the time of allo-SCT was 25% (range 6% to 91%). At day 100 after allo-SCT, 40 patients (71%) experienced MFC-MRD negativity, whereas 16 patients (29%) were MRD positive. We did not observe any significant difference in patients' characteristics between those who received FLAMSA-based conditioning and those after other regimens. Day 100 MRD-negative patients tended rather to receive a second allograft (11/40 [27%] versus 1/16 [6%], $P = .08$). The day 100 MRD-positive patients experienced significantly more relapses as cause of death compared to day 100 MRD-negative patients (9/12 [75%] versus 7/11 [64%], $P = .007$; Table 1).

Of all patients, 8 received post-transplantation interventions (DLIs, $n = 6$; hypomethylating agents, $n = 2$) in case of mixed chimerism or day 100 MRD positivity within a median of 180 days (range 130 to 240). Of those, 3 developed relapses (38%) with death in 2 cases. One patients responded on the salvage therapy with hypomethylating agent and was alive 589 days after allo-SCT.

Impact of day 100 MRD status on OS, DFS, Relapse, and NRM: univariate analysis

The median follow-up among survivors was 16 months (range 3 to 66), there were a total of 21 deaths, 20 relapses, and four NRM events. The 3-year probabilities for OS and LFS

Table 1
Patients' Characteristics (n = 56)

Characteristic	Day 100 MRD neg(n = 40)	Day 100 MRD pos (n = 16)	No. (%)	P value
Patient's sex: Males/females	24/16 (1.5)	10/6 (1.7)	34/22 (1.5)	.55
Patient's age, median (range)	58 (20-76)	58 (30-70)	58 (20-76)	.73
Donor age, median (range)	33 (19-70)	34 (4-61)	33 (4-70)	.67
Origin of disease				.59
De novo	18 (45%)	7 (44%)	25 (45%)	
s/tAML	22 (55%)	9 (56%)	31 (55%)	
Cytogenetics at diagnosis				.30
Normal	16 (44%)	4 (31%)	20 (41%)	
Abnormal	20 (56%)	9 (69%)	29 (59%)	
n.a.	4	3	7	
ELN genetic risk group				.96
Favorable	2 (5%)	1 (6%)	3 (5%)	
Intermediate	24 (60%)	9 (56%)	33 (59%)	
Adverse	14 (35%)	6 (38%)	20 (36%)	
Remission duration (d), median (range)	160 (7-763)	258 (78-579)	182 (7-763)	.42
Time from relapse to allo-SCT (d), median (range)	73 (7-1311)	59 (14-61)	65 (7-1311)	.16
Extramedullary involvement	4 (10%)	3 (19%)	7 (13%)	.31
Remission status				.23
Primary refractory	24 (60%)	12 (75%)	36 (64%)	
Refractory to relapse therapy	16 (40%)	4 (25%)	20 (36%)	
Bone marrow blasts prior to allo-SCT, median (range)	28 (6-91%)	21 (6-57%)	25% (6-91%)	.18
Number of allo-SCT				.08
1	29 (73%)	15 (94%)	44 (79%)	
2	11 (27%)	1 (6%)	12 (21%)	
Donor type				.57
MSD	5 (12%)	4 (25%)	9 (16%)	
MUD	23 (58%)	7 (44%)	30 (54%)	
MMUD	5 (12%)	3 (19%)	8 (14%)	
Haploidentical/Cord blood	7 (18%)	2 (12%)	9 (16%)	
CD34+ cell count/kg, median (range)	7 (2.4-11.9)	7.6 (1-11.1)	7.0 (1-11.9)	.55
CMV constellation (P/D)				.40
Pos/Pos	21 (53%)	11 (69%)	32 (57%)	
Pos/Neg	9 (23%)	1 (6%)	10 (18%)	
Neg/Pos	5 (12%)	1 (6%)	6 (11%)	
Neg/Neg	5 (12%)	3 (19%)	8 (14%)	
Conditioning				.41
MAC	23 (58%)	8 (50%)	31 (55%)	
RIC	17 (42%)	8 (50%)	25 (45%)	
FLAMSA	21 (53%)	8 (50%)	29 (52%)	.55
Others	19 (47%)	8 (50%)	27 (48%)	
Bu/Flu	1	1	2	
TT/Bu(Flu)	7	4	11	
Treosulfan-based	2	1	3	
TBI-based	8	2	10	
Flu/Ara-C/Ida/Gemtuzumab	1	0	1	
Immunosuppression				.34
ATG	31 (78%)	14 (88%)	45 (80%)	
Post-Cy	6 (15%)	1 (6%)	7 (13%)	
No immunosuppression	2 (5%)	1 (6%)	3 (5%)	
Both	1 (2%)	0	1 (2%)	
Causes of death (n = 23)				.007
Relapse	7 (64%)	9 (75%)	16 (70%)	
Sepsis/severe infection	3 (27%)	3 (25%)	6 (26%)	
Secondary malignancy	1 (9%)	0	1 (4%)	
Median follow up, months (range)	21 (4-67)	19 (8-36)	16 (4-67)	.81

N indicates number; s/tAML, secondary/therapy-related AML; n.a., not available; MSD, matched sibling donor; MUD, matched unrelated donor; MMUD, mismatched unrelated donor; CMV, cytomegalovirus; Neg, negative; Pos, positive; MAC, myeloablative conditioning; RIC, reduced intensity conditioning; Bu, busulfan; Flu, fludarabine; TT, thiotepa; TBI, total body irradiation; Ara-C, cytarabine; Ida, idarubicine; ATG, anti-thymocyte globulin.

Table 2
Results of Univariate Analysis (n = 56)

Characteristic	1y OS	1y LFS	Relapse at 1y	NRM at 1y
Patient's sex: male versus female	1.5 (0.6–3.6), <i>P</i> = .38	1.6 (0.7–3.6), <i>P</i> = .30		
Patient's age, median (range)	1.03 (0.99–1.1), <i>P</i> = .19	1.02 (0.98–1.1), <i>P</i> = .38		
Origin of disease, de novo versus s/tAML	0.84 (0.4–1.9), <i>P</i> = .68	1.01 (0.5–2.3), <i>P</i> = .93		
Remission duration, days	<i>P</i> = .45	<i>P</i> = .62		
≤150 vs refractory	1.4 (0.4–4.2), <i>P</i> = .59	1.2 (0.4–3.7), <i>P</i> = .75		
>150 vs refractory	1.9 (0.7–4.9), <i>P</i> = .21	1.6 (0.6–4.2), <i>P</i> = .33		
>150 vs ≤150	1.4 (0.24–2.3), <i>P</i> = .59	1.4 (0.4–4.9), <i>P</i> = .65		
Time from relapse to allo-SCT, days	<i>P</i> = .49	<i>P</i> = .69		
≤60 vs refractory	1.5 (0.48–4.5), <i>P</i> = .51	1.3 (0.4–4.0), <i>P</i> = .61		
>60 vs refractory	1.8 (0.66–4.7), <i>P</i> = .51	1.5 (0.6–3.8), <i>P</i> = .42		
>60 vs ≤60	0.88 (0.24–3.2), <i>P</i> = .84	1.1 (0.3–3.9), <i>P</i> = .87		
Bone marrow blasts prior to allo-SCT ≤25% vs >25%	0.83 (0.4–2.0), <i>P</i> = .67	0.83 (0.4–1.8), <i>P</i> = .64	—	—
ELN risk score Intermediate vs adverse	0.8 (0.34–1.9), <i>P</i> = .60	0.73 (0.33–1.6), <i>P</i> = .43		
Extramedullary manifestation: no vs yes	1.4 (0.33–6.1), <i>P</i> = .65	1.2 (0.4–4.0), <i>P</i> = .78		
Donor code	<i>P</i> = .12	<i>P</i> = .28		
MUD vs MSD	0.32 (0.1–0.9), <i>P</i> = .037	0.38 (0.1–1.05), <i>P</i> = .06		
MMUD vs MSD	0.76 (0.2–2.5), <i>P</i> = .65	0.72 (0.2–2.4), <i>P</i> = .59		
Haploidentical/CB vs MSD	0.97 (0.3–3.5), <i>P</i> = .96	0.67 (0.2–2.4), <i>P</i> = .54		
Matched vs mismatched	0.54 (0.2–1.3), <i>P</i> = .15	0.71 (0.3–1.6), <i>P</i> = .41		
CD34+ cell count, median (range)	0.99 (0.8–1.2), <i>P</i> = .98	1.1 (0.88–1.3), <i>P</i> = .59		
Number of allo-SCT, 1 vs 2	0.99 (0.4–2.7), <i>P</i> = .99	1.1 (0.4–3.0), <i>P</i> = .79		
Patient's CMV status, Neg vs Pos	1.5 (0.6–3.8), <i>P</i> = .34	1.6 (0.7–3.8), <i>P</i> = .26		
Conditioning				
MAC vs RIC	0.68 (0.3–1.5), <i>P</i> = .35	0.72 (0.3–1.6), <i>P</i> = .41		
FLAMSA vs others	0.42 (0.2–0.98), <i>P</i> = .047	0.42 (0.2–0.95), <i>P</i> = .04	0.43 (0.2–1.1), <i>P</i> = .07	0.41 (0.2–1.0), <i>P</i> = .05
Immunosuppression ATG vs post-Cy	0.84 (0.2–3.6), <i>P</i> = .81	1.2 (0.3–5.2), <i>P</i> = .80		
MFC-MRD status on day 100, Neg vs Pos	0.26 (0.1–0.6), <i>P</i> = .002	0.23 (0.1–0.5), <i>P</i> < .001	0.20 (0.1–0.47), <i>P</i> < .001	0.19 (0.1–0.43), <i>P</i> < .001

post-Cy indicates post-transplantation cyclophosphamide.

were 52% (95% confidence interval [CI] 35% to 69%) and 49% (95% CI 35% to 64%), respectively. The cumulative incidences of relapse and NRM at 3 years were 42% (95% CI 28% to 58%) and 8% (95% CI 3% to 20%), respectively.

The results of univariate analysis are represented in the Table 2. The 1-year OS rate for day 100 MRD negative patients was significantly higher than that for MRD positive ones: 76% (95% CI 60% to 87%) versus 35% (95% CI 17% to 59%), *P* = .001. The 1-year LFS rate for day 100 MRD negative patients was significantly higher than that for MRD positive ones: 73% (95% CI: 58% to 84%) versus 23% (95% CI: 9% to 49%), *P* < .001. The cumulative incidence of relapse at 1 year was higher in MRD positive patients: 70% (95% CI 45% to 87%) versus 30% (95% CI 16% to 49%), *P* < .001 (Figure 1) for negative ones. There was no difference in the NRM incidence between both groups. Among the other factors, we found FLAMSA-based conditioning to be associated with better survival outcomes for refractory AML patients because of significant favorable impact on the relapse rate (Table 2).

Impact of pretransplantation MRD status on OS, LFS, Relapse, and NRM: multivariate analysis

The results of the analysis are represented in the Table 3. Based on the results of univariate analysis, the following factors were included into the multivariate model: MFC-MRD status on day 100 and conditioning (FLAMSA-based versus other regimens). The multivariate analysis for NRM was not done due to limited number of events. Patients after FLAMSA-based

conditioning who achieved day 100 MRD negativity experienced a trend to lower relapses resulting in improved OS and LFS.

GVHD

The cumulative incidence of acute severe (II–IV) GVHD at 1 year for the whole patients cohort was 39% (95% CI 27% to 52%). We found no correlation between acute GVHD and achieving a negative MRD status after allo-SCT. The cumulative incidence of chronic GVHD at 3 years was 50% (95% CI 35% to 65%).

DISCUSSION

Although the treatment of relapsed/refractory AML has been improving since recently in terms of lower toxicity and longer remissions, it still remains challenging in most of the patients [18]. Allo-SCT as only curative strategy is still associated with low survival in AML patients mainly because of high post-transplantation relapse rates. Efforts to improve post-transplant prediction and prevention of relapses have been ongoing for decades (e.g., development of prognostic scores, novel “bridging” strategies, post-transplant maintenance/immunotherapy, and MRD detection) [34].

The available prognostic scores allow to reveal patients with highest risk of post-transplantation relapse; nevertheless, the survival for “low risk” patients remains unsatisfactory and did not exceed 40% [9,11]. Also, incorporation of allo-SCT as a salvage strategy led to similar outcomes. Interestingly, patients

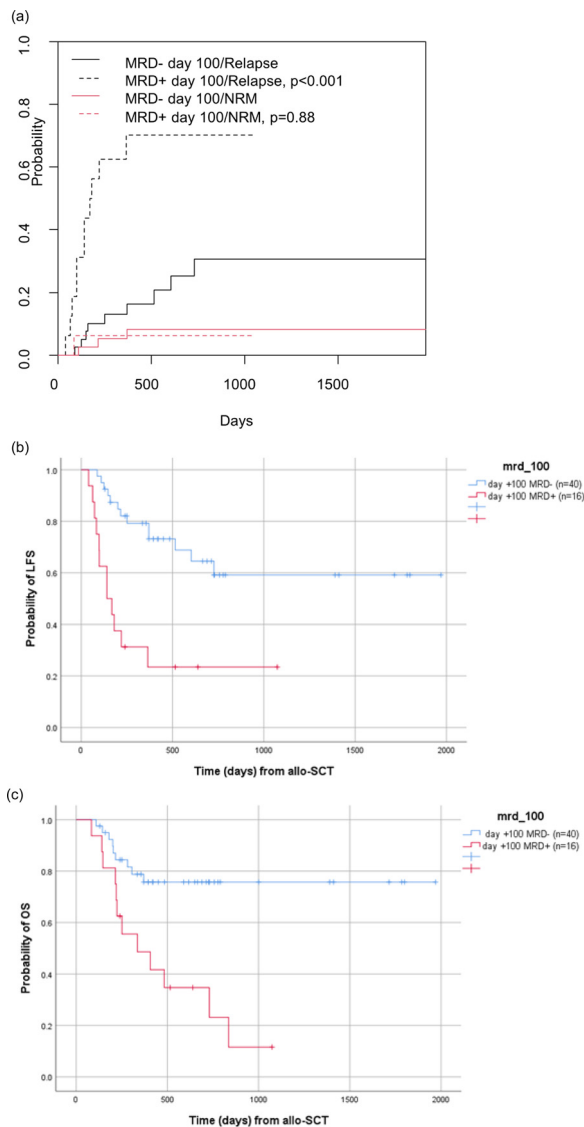


Figure 1. OS, LFS, relapses and NRM according to the post-transplant day 100 MFC-MRD status in 56 relapsed/refractory AML patients: (a) relapse and NRM; (b) LFS ($P < .001$); (c) OS ($P = .001$).

with primary induction failure experienced better survival of 60%, which could be further improved up to 87% after the use of prophylactic DLI [16].

Regarding the novel “bridging” strategies, DiNardo et al [19] evaluated a salvage strategy consisting of chemotherapy and venetoclax in patients with relapsed/refractory AML. A significant improvement in 1-year OS of 78% has been shown in patients after allo-SCT.

Another option would be focusing on the post-transplantation setting (e.g., proper definition of patients who may benefit from possible post-transplantation strategies). This may be based on the post-transplantation MRD detection. Different

approaches for MRD detection such as MFC-based, polymerase chain reaction (PCR)-based, or next-generation sequencing (NGS)-based strategies may be used. Of those, the PCR-based method can provide higher sensitivity. However, it is not applicable in majority of AML patients.

The aim of this study was to evaluate the prognostic meaning post-transplantation MFC-MRD detection for relapse prediction and survival outcomes in refractory AML patients. By combining the “different from normal” strategy and the identification of LAIP positive cells following ELN guidelines [26,34], we performed MFC-MRD assessment in the bone marrow at day 100 in a cohort of 56 patients who had received allo-SCT because of refractory AML (either at diagnosis or at relapse) at our center. We showed an independent favorable impact of day 100 MRD negativity on survival (hazard ratio (HR) 0.23 [0.1 to 0.54], $P = .001$) because of reduced relapse risk (HR 0.20 [0.1 to 0.49], $P = .0005$). These results demonstrate that even in patients with a refractory status before allo-SCT, MFC-MRD analysis according to the recent ELN guidelines [34] at day 100 allows us to identify a subset of higher-risk patients that may benefit from additional pre-emptive strategies that will be outlined below in more detail. To our knowledge, the present study is the first showing a favorable prognostic impact of achieving of a MRD negative CR early after allo-SCT on relapses and survival in refractory AML patients.

Many studies investigating MRD in the post-transplantation period focused on AML patients who had achieved CR before the allo-SCT [25,29,30]. Some of these studies reported on improved outcomes for AML patients who achieved MRD negativity on day 100 after allo-SCT in CR [29,30]. For instance, Bastos-Oreiro et al [29] reported on a series of 29 AML patients in whom the MRD status was assessed with MFC at 1, 3, and 6 months post-transplantation. A number of 12 of 29 patients (41%) were MRD positive at any of that time points and underwent therapeutic interventions (e.g., tapering of immunosuppression, administration of DLIs or second allo-SCT). There were no difference in survival according to the MRD status in the respective study, which may of course be due to the successful implementation of the mentioned therapeutic consequences in the case of a positive MRD status [29].

In contrast to the patients in CR at the time of allo-SCT, data on the value of MRD in the post-transplantation period in patients being therapy refractory at transplantation are limited. Recently, Short et al. reported on the role of MRD detection (at the time of best response) in 141 relapsed/refractory AML patients and showed that achieving MRD-negative CR had an independent favorable impact on relapses (HR 0.5, 0.32–0.79, $P = .003$), relapse-free survival (HR 0.62, 0.41 to 0.93, $P = .02$), but not on overall survival [31]. However, the study did not focus on the transplant setting.

Being defined as the patients with the highest post-transplantation relapse risk, patients with a positive MRD status on day 100 may be candidates for post-transplantation interventions [35,36]. Again, data on relapsed/refractory AML in this setting remain limited because the most of the studies have been focusing on patients outside the allo-transplantation context [18]. The strongest data in the context of post-transplantation maintenance are related to use of tyrosine kinase inhibitors

Table 3
Results of Multivariate Analysis (n = 56)

Parameter	OS	LFS	Relapse
Conditioning, FLAMSA vs other	0.34 (0.1–0.83), $P = .018$	0.38 (0.2–0.87), $P = .023$	0.43 (0.17–1.1), $P = .07$
MFC-MRD day 100, neg vs pos	0.23 (0.1–0.54), $P = .001$	0.22 (0.1–0.49), $P < .001$	0.20 (0.1–0.49), $P = .0005$

(TKI) inhibitors for FLT3-ITD positive AML patients transplanted in CR [21,37]. Unfortunately, this option is limited to FLT3 mutation carriers.

Within a prospective randomized study, Platzbecker et al [22], evaluated an MRD-guided strategy (qPCR and CD34+ donor chimerism in transplanted patients) in 53 AML/MDS patients who received 6 cycles of a 5'-azacitidine in case of MRD positivity. Twenty-four patients (45%) experienced MRD positivity after allo-SCT. The response rate to azacitidine administered in the case of MRD positivity was around 60% of ongoing CR [22]. Also, chimerism-guided DLIs may enhance the graft-versus-leukemia effect, resulting in a considerably improved 5-year PFS of 70% in patients without morphologic relapse [38]. Post-transplantation prophylactic DLIs were also shown to be effective in patients with relapsed/refractory AML, although the risk of severe GVHD has to be considered [39]. In our study, the number of patients receiving post-transplantation interventions was limited to make any recommendations.

Some reports showed similar outcomes compared to our results after FLAMSA-based conditioning, TBI-based myeloablative, as well as thiotepe- and treosulfan-based conditioning [14,40]. Recently, Craddock et al [41], published results of a randomized analysis showing no difference in outcomes between FLAMSA/busulfan and other conventional fludarabine-based reduced-intensity conditioning regimens in 216 AML/MDS patients. Most of the AML patients in this study were in CR1 or CR2, and all allografts were performed after reduced-intensity conditioning regimens. There was no interaction between pretransplantation MRD status and conditioning intensity [41]. In contrast, in our study, FLAMSA-based conditioning had an independent favorable impact on the relapse and survival compared to other regimens. This observation may be explained as a result of the heterogeneity of patients included in the majority of the studies (e.g., patients with primary induction failure) [14,16,42]. Furthermore, we suggest that addition of induction to the conditioning regimen may provide an “debulking” effect on the tumor burden realizing in more powerful graft-versus-leukemia effect.

In conclusion, we suggest that post-transplantation MFC-MRD monitoring according to the recent ELN guidelines [34] on day 100 in refractory AML patients may identify a group of patients with the worst prognosis. These patients may benefit from timely post-transplantation interventions, such as early tapering of immunosuppression, use of donor lymphocytes, and hypomethylating agents. Thus post-transplantation MFC-MRD monitoring according to current standards may contribute to ameliorating the outcomes of patients receiving allo-SCT in a refractory state of AML at diagnosis or relapse.

Conflict of interest statement: There are no conflicts of interest to report.

REFERENCES

- Ganzel C, Sun Z, Cripe LD, et al. Very poor long-term survival in past and more recent studies for relapsed AML patients: the ECOG-ACRIN experience. *Am J Hematol*. 2018;93:1074–1081.
- Gardin C, Turlure P, Fagot T, et al. Postremission treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia in first complete remission after intensive induction chemotherapy: results of the multicenter randomized Acute Leukemia French Association (ALFA) 9803 trial. *Blood*. 2007;109:5129–5135.
- Martin MG, Augustin KM, Uy GL, et al. Salvage therapy for acute myeloid leukemia with fludarabine, cytarabine, and idarubicin with or without gemtuzumab ozogamicin and with concurrent or sequential G-CSF. *Am J Hematol*. 2009;84:733–737.
- Estey E, Kornblau S, Pierce S, Kantarjian H, Beran M, Keating M. A stratification system for evaluating and selecting therapies in patients with relapsed or primary refractory acute myelogenous leukemia. *Blood*. 1996;88:756.
- Thol F, Ganser A. Treatment of relapsed acute myeloid leukemia. *Curr Treat Options Oncol*. 2020;21:66.
- Bejanyan N, Weisdorf DJ, Logan BR, et al. Survival of patients with acute myeloid leukemia relapsing after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a center for international blood and marrow transplant research study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21:454–459.
- Nagler A, Savani BN, Labopin M, et al. Outcomes after use of two standard ablative regimens in patients with refractory acute myeloid leukaemia: a retrospective, multicentre, registry analysis. *Lancet Haematol*. 2015;2:e384–e392.
- Jaiswal SR, Zaman S, Chakrabarti A, et al. Improved outcome of refractory/relapsed acute myeloid leukemia after post-transplantation cyclophosphamide-based haploidentical transplantation with myeloablative conditioning and early prophylactic granulocyte colony-stimulating factor-mobilized donor lymphocyte infusions. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22:1867–1873.
- Duval M, Klein JP, He W, et al. Hematopoietic stem-cell transplantation for acute leukemia in relapse or primary induction failure. *J Clin Oncol*. 2010;28:3730–3738.
- Wong R, Shahjahan M, Wang X, et al. Prognostic factors for outcomes of patients with refractory or relapsed acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndromes undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:108–114.
- Craddock C, Labopin M, Pillai S, et al. Factors predicting outcome after unrelated donor stem cell transplantation in primary refractory acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2011;25:808–813.
- Hemmati PG, Terwey TH, Na IK, et al. Allogeneic stem cell transplantation for refractory acute myeloid leukemia: a single center analysis of long-term outcome. *Eur J Haematol*. 2015;95:498–506.
- Todisco E, Ciceri F, Boschini C, et al. Factors predicting outcome after allogeneic transplant in refractory acute myeloid leukemia: a retrospective analysis of Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). *Bone Marrow Transplant*. 2017;52:955–961.
- Saraceni F, Labopin M, Brecht A, et al. Fludarabine-treosulfan compared to thiotepe-busulfan-fludarabine or FLAMSA as conditioning regimen for patients with primary refractory or relapsed acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *J Hematol Oncol*. 2019;12:44.
- Pfreppep C, Klink A, Behre G, et al. Risk factors for outcome in refractory acute myeloid leukemia patients treated with a combination of fludarabine, cytarabine, and amsacrine followed by a reduced-intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142:317–324.
- Schmid C, Schleuning M, Schwerdtfeger R, et al. Long-term survival in refractory acute myeloid leukemia after sequential treatment with chemotherapy and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2006;108:1092–1099.
- Middeke JM, Herbst R, Parmentier S, et al. Long-term follow-up and impact of comorbidity before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia-lessons learned from the Prospective BRIDGE Trial. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23:1491–1497.
- Rashidi A, Weisdorf DJ, Bejanyan N. Treatment of relapsed/refractory acute myeloid leukaemia in adults. *Br J Haematol*. 2018;181:27–37.
- DiNardo CD, Lachowicz CA, Takahashi K, et al. Venetoclax combined with FLAG-IDA induction and consolidation in newly diagnosed and relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2021;39:2768–2778.
- Gao L, Zhang Y, Wang S, et al. Effect of rhG-CSF combined with decitabine prophylaxis on relapse of patients with high-risk MRD-negative AML after HSCT: an open-label, multicenter. *J Clin Oncol*. 2020;36:4249–4259.
- Burchert A, Bug G, Fritz LV, et al. Sorafenib maintenance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia with FLT3-internal tandem duplication mutation (SORMAIN). *J Clin Oncol*. 2020;38:2993–3002.
- Platzbecker U, Middeke JM, Sockel K, et al. Measurable residual disease-guided treatment with azacitidine to prevent hematological relapse in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia (RELAZA2): an open-label, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19:1668–1679.
- Diez-Campelo M, Pérez-Simón JA, Pérez J, et al. Minimal residual disease monitoring after allogeneic transplantation may help to individualize post-transplant therapeutic strategies in acute myeloid malignancies. *Am J Hematol*. 2009;84:149–152.
- Walter RB, Gooley TA, Wood BL, et al. Impact of pretransplantation minimal residual disease, as detected by multiparametric flow cytometry, on outcome of myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29:1190–1197.
- Zhou Y, Othus M, Araki D, et al. Pre- and post-transplant quantification of measurable (“minimal”) residual disease via multiparameter flow cytometry in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016;30:1456–1464.

26. Klyuchnikov E, Christoheit M, Badbaran A, et al. Role of pre-transplant MRD level detected by flow cytometry in recipients of allogeneic stem cell transplantation with AML. *Eur J Haematol*. 2021;106:606–615.
27. Gilleece MH, Labopin M, Yakoub-Agha I, et al. Measurable residual disease, conditioning regimen intensity, and age predict outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia in first remission: a registry analysis of 2292 patients by the Acute Leukemia Working Party European Society of Blood and Marrow Transplantation. *Am J Hematol*. 2018;93:1142–1152.
28. Percival ME, Wang HL, Zhang MJ, et al. Impact of depth of clinical response on outcomes of acute myeloid leukemia patients in first complete remission who undergo allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2021;56:2108–2117.
29. Bastos-Oreiro M, Perez-Corral A, Martínez-Laperche C, et al. Prognostic impact of minimal residual disease analysis by flow cytometry in patients with acute myeloid leukemia before and after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol*. 2014;93:239–246.
30. Shah MV, Jorgensen JL, Saliba RM, et al. Early post-transplant minimal residual disease assessment improves risk stratification in acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24:1514–1520.
31. Short NJ, Rafei H, Daver N, et al. Prognostic impact of complete remission with MRD negativity in patients with relapsed or refractory AML. *Blood Adv*. 2020;4:6117–6126.
32. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129:424–447.
33. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2003;21:4642–4649.
34. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018;131:1275–1291.
35. Lee CJ, Savani BN, Mohty M, et al. Post-remission strategies for the prevention of relapse following allogeneic hematopoietic cell transplantation for high-risk acute myeloid leukemia: expert review from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2019;54:519–530.
36. Molica M, Breccia M, Foa R, Jabbour E, Kadia TM. Maintenance therapy in AML: the past, the present and the future. *Am J Hematol*. 2019;94:1254–1265.
37. Gagelmann N, Wolschke C, Klyuchnikov E, Christoheit M, Ayuk F, Kröger N. TKI maintenance after stem-cell transplantation for FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia a systematic review and meta-analysis. *Front Immunol*. 2021;12: 630429.
38. Caldemeyer LE, Akard LP, Edwards JR, Tandra A, Wagenknecht DR, Dugan MJ. Donor lymphocyte infusions used to treat mixed-chimeric and high-risk patient populations in the relapsed and non-relapsed settings after allogeneic transplantation for hematologic malignancies are associated with high five-year survival if persistent full donor chimerism is obtained or maintained. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23:1989–1997.
39. Schmid C, Labopin M, Schaap N, et al. EBMT Acute Leukaemia Working Party. Prophylactic donor lymphocyte infusion after allogeneic stem cell transplantation in acute leukaemia - a matched pair analysis by the Acute Leukaemia Working Party of EBMT. *Br J Haematol*. 2019;184:782–787.
40. Decroocq J, Itzykson R, Vigouroux S, et al. Similar outcome of allogeneic stem cell transplantation after myeloablative and sequential conditioning regimen in patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia: a study from the Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. *Am J Hematol*. 2018;93:416–423.
41. Craddock C, Jackson A, Loke J, et al. Augmented reduced-intensity regimen does not improve postallogeneic transplant outcomes in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2021;39:768–778.
42. Holtick U, Shimabukuro-Vornhagen A, Chakupurakal G, et al. FLAMSA reduced-intensity conditioning is equally effective in AML patients with primary induction failure as well as in first or second complete remission. *Eur J Haematol*. 2016;96:475–482.

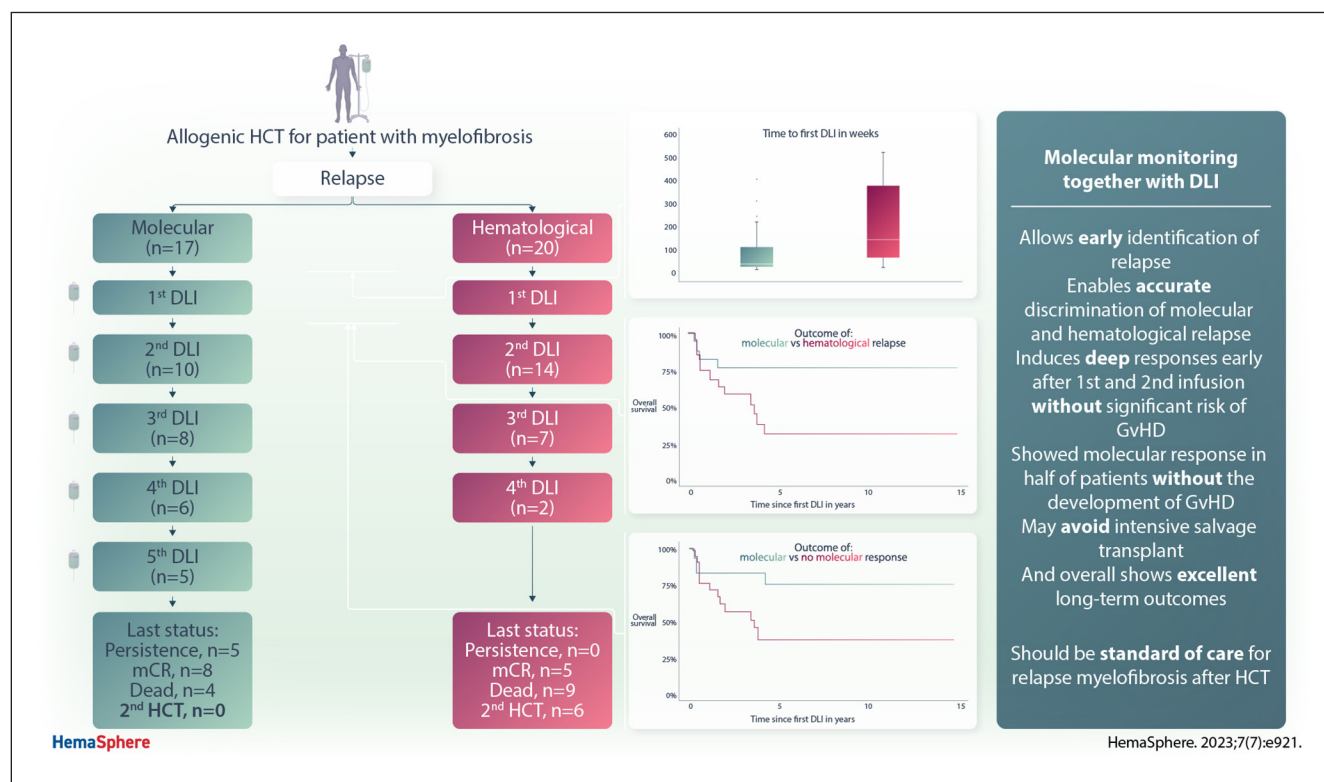
3.4 Publikation 4

Article
Open Access

Donor Lymphocyte Infusion and Molecular Monitoring for Relapsed Myelofibrosis After Hematopoietic Cell Transplantation

Nico Gagelmann¹, Christine Wolschke¹, Anita Badbaran¹, Dietlinde Janson¹, Carolina Berger¹, Evgeny Klyuchnikov¹, Francis Ayuk¹, Boris Fehse¹, Nicolaus Kröger¹

GRAPHICAL ABSTRACT



Article

Open Access

Donor Lymphocyte Infusion and Molecular Monitoring for Relapsed Myelofibrosis After Hematopoietic Cell Transplantation

Nico Gagelmann¹, Christine Wolschke¹, Anita Badbaran¹, Dietlinde Janson¹, Carolina Berger¹, Evgeny Klyuchnikov¹, Francis Ayuk¹, Boris Fehse¹, Nicolaus Kröger¹

Correspondence: Nicolaus Kröger (nkroeger@uke.de).

ABSTRACT

Hematopoietic cell transplantation (HCT) is a curative approach for myelofibrosis patients, but relapse is a major cause of treatment failure. We investigated the effect of donor lymphocyte infusion (DLI) in 37 patients with molecular ($n = 17$) or hematological relapse ($n = 20$) after HCT. Patients received median of 2 (range, 1–5) cumulative DLI (total of 91 infusions). Median starting dose was 1×10^6 cells/kg, escalated by half-log ≥ 6 weeks if no response nor graft-versus-host disease (GvHD) occurred. Median time to first DLI was 40 weeks for molecular relapse versus 145 weeks for hematological relapse. Overall molecular complete response (mCR) at any time was 73% ($n = 27$) and was significantly higher for initial molecular relapse (88%) versus hematological relapse (60%; $P = 0.05$). The 6-year overall survival was 77% versus 32% ($P = 0.03$). Acute GvHD 2–4 occurred in 22% and half of the patients achieved mCR without any GvHD. All patients who relapsed from mCR achieved after first DLI could be salvaged with subsequent DLI, showing long-term survival. No second HCT was needed for molecular relapse versus 6 for hematological relapse. This comprehensive and largest study to date suggests molecular monitoring together with DLI as standard of care and a crucial approach to achieve excellent outcomes in relapsed myelofibrosis.

INTRODUCTION

Myelofibrosis is a clonal myeloproliferative neoplasm with a heterogeneous clinical presentation and outcome,¹ with survival lasting from months to decades.² Despite the recent advances and the promising introduction of new targeted therapies,³ allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT) remains the only curative treatment option, which is, however, associated with relevant morbidity and mortality.^{4,5}

About 10%–30% of myelofibrosis patients who undergo allogeneic HCT will eventually experience relapse within 5 years.^{6,7} The median time to relapse was previously shown to be ~7 months, with a median overall survival (OS) from the time of relapse of ~2 years, being significantly worse for those who relapse early.^{7,8} While significant improvement has been achieved in stratifying patients according to their risk for post-transplant mortality,^{9–11} preventing and treating relapse remains an unmet clinical need.

The concept of transferring donor T cells aims at reinforcing a graft-versus-leukemia effect targeting the recurring

malignant cells, which has mainly been shown for acute and chronic leukemias.¹² Previous small sample studies also indicated a feasible and strong graft-versus-myelofibrosis effect of donor lymphocyte infusion (DLI) for elapsed patients.^{13–15} Additionally, in more recent years, molecular monitoring post-transplant was able to detect minimal measurable disease, which predicts a high risk of subsequent hematological relapse after allogeneic HCT and can be used for early intervention with DLIs.^{16,17}

Here, we evaluated the so far largest cohort to date of myelofibrosis patients with relapsed disease after HCT who received DLI as standard of care posttransplant management for either molecular relapse or hematological relapse. The aim of this study was to compare efficacy regarding achievement of molecular complete response (mCR), incidence of acute and chronic graft-versus-host disease (GvHD), and survival between both approaches.

METHODS**Transplant platform and DLI algorithm**

We included patients with primary or secondary myelofibrosis (evolving from either polycythemia vera or essential thrombocythemia) who underwent first or second HCT and received DLI for molecular or hematological relapse between 2002 and 2019 in the Department of Stem Cell Transplantation at the University Medical Center Hamburg/Germany. Hematological relapse occurred more frequently in earlier years before the standardized implementation of molecular monitoring according to the institutional guidelines. All patients received

¹Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Copyright © 2023 the Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the European Hematology Association. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License 4.0 (CCBY), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

HemaSphere (2023) 7:7(e921).

<http://dx.doi.org/10.1097/HS9.0000000000000921>.

Received: March 14, 2023 / Accepted: May 23, 2023

reduced intensity busulfan-fludarabine conditioning, with anti T-lymphocyte globulin (ATLG) as GvHD prophylaxis as recently reported.¹⁸ Patients who received a second transplantation were censored at day of second transplantation. Patients with transformed acute leukemia at the time of transplant or relapse were excluded from the study.

Patients were eligible to receive DLI if they were free of GvHD and immunosuppressive therapy (Figure 1). In relapsed patients who were still receiving prophylactic immunosuppression, immunosuppressive medication was stopped at least 4 weeks before the administration of dose-escalated DLI. If no GvHD or response occurred within 6 weeks, another escalating dose (half-log) of DLI was administered. The usual starting dose after HLA identical sibling HCT was 1×10^6 CD3+ cells per kg body weight (kgBW) and 5×10^5 CD3+cells after unrelated donor HCT resulting in a median dose of the first DLI of 1×10^6 /kgBW (range, 1×10^5 – 1×10^7) followed by a subsequent half-log escalated dose after at least 6 weeks if there was no response and no GvHD (Figure 1). CD4-selected DLI were used in patients with high risk for or present infection at the time of relapse.

Monitoring

Follow-up of patients after allograft included molecular monitoring (including chimerism analysis) every month (until day 360 posttransplant) and with half-year routine visits in the following 2 years and yearly visits after 3 years thereafter, while bone marrow histology was performed after engraftment, on day 100 and 360 posttransplant, and thereafter only if there were signs of relapse. We applied *JAK2V617F*-, *CALR*-, and *MPL*-specific quantitative or digital polymerase chain reactions (PCRs) as described recently (sensitivity for both: 0.01%).^{16,19} At the time of transplantation, next-generation sequencing was done using previously published methods,²⁰ and the following myelofibrosis-associated genes were sequenced: *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *ASXL1*, *IDH1/2*, *CBL*,

DNMT3A, *TET2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *EZH2*, *TP53*, *NRAS*, *KRAS*, *RUNX1*, and *FLT3*.

Definition of relapse and GvHD

Hematological relapse of myelofibrosis and response to therapy were defined according to the existing criteria,^{4,6,21} such as progressive splenomegaly, loss of complete response, morphological relapse (increasing bone marrow fibrosis, increase in age-adjusted cellularity and abnormal M:E ratio, megakaryocytic abnormalities typical of myelofibrosis such as pleomorphism, hyperchromasia, cloud-like nuclei, and megakaryocytic clusters), decrease in conventional donor chimerism, and worsening anemia. Additionally, detection of driver mutation in peripheral blood in previously negative patients was defined as molecular relapse. Molecular CR was defined as 2 subsequent negative driver mutation blood samples within at least 4-week interval in previously positive patients, or consecutive full highly sensitive chimerism in triple-negative patients. Acute GvHD was graded I–IV according to the standard criteria.²² Chronic GvHD was evaluated as mild or moderate disease according to the National Institutes of Health criteria.²³

Statistical analysis

Main end points were mCR, the occurrence of acute and chronic GvHD, event-free survival (EFS), and OS. Patient characteristics were described with median and range for continuous variables and frequencies for categorical variables. EFS was defined as the time between start of DLI treatment until relapse, progression, death from any cause or another subsequent allogeneic stem cell transplantation. Continuous variables were investigated with Mann-Whitney *U* test, Kruskal-Wallis test, and categorical variables with χ^2 test. Survival curves were calculated with the Kaplan-Meier method and tested by log-rank-test; a *P* value of 0.05 or less was rated as significant.

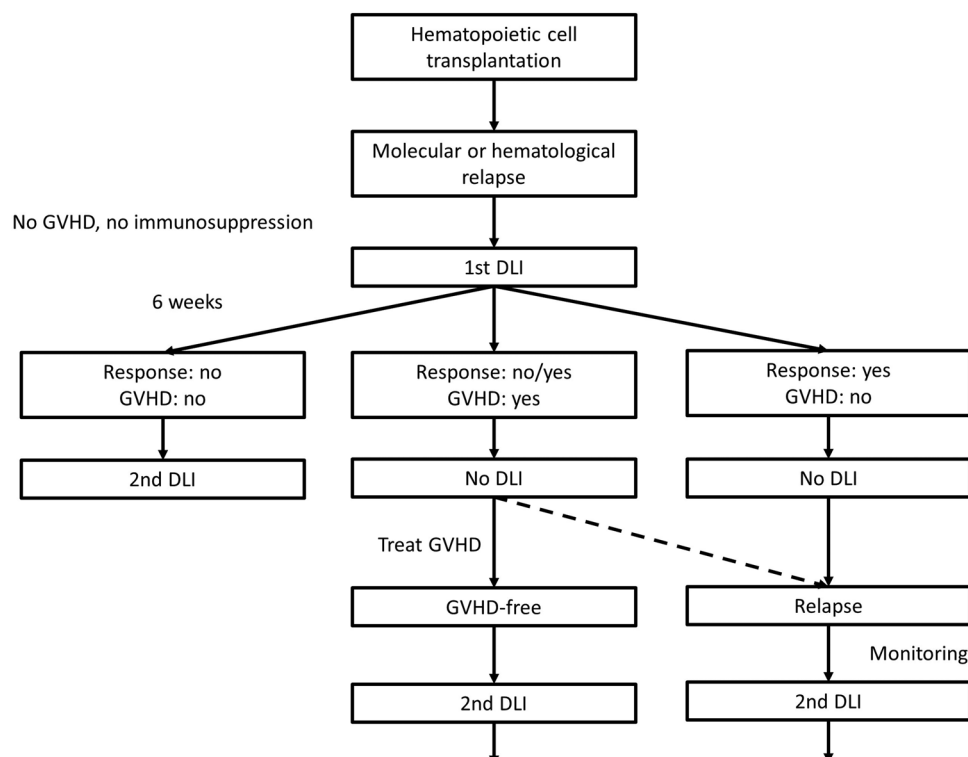


Figure 1. Algorithm for monitoring and treatment of relapsed myelofibrosis after hematopoietic cell transplantation. DLI = donor lymphocyte infusion; GVHD = graft-versus-host disease.

Median follow-up was calculated using the reverse Kaplan-Meier method. To assess the cause-specific effect of factors on each end point, we used the Cox proportional hazards model to estimate hazard ratios (HRs), evaluating landmark approaches from first DLI as well as continuous and time-dependent analysis. The proportional hazards assumption was verified using graphical methods.

All tests were 2-sided, with the type I error rate fixed at $\alpha = 0.05$. Only results of the final models are presented with respect to a reference category (HR, 1.00) together with the 95% confidence interval (CI) and *P* values. All analyses were performed using R version 4.0.5 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) using the following packages: ggalluvial, ggplot2, tidyverse, survival, cmprsk, prodlm, and rms.

RESULTS

Patients

We included 37 relapsed patients of whom 22 patients had primary myelofibrosis (60%) and 30 patients had *JAK2* driver mutation genotype (81%). The median time from HCT to relapse was 19 months (range, 2–118 months). Seventeen patients received first DLI for molecular relapse and 20 patients received first DLI for hematological relapse after HCT (Table 1 and Figure 2A).

Thirty-three patients (89%) received DLI after first transplantation while the remaining 4 received DLI after second transplantation. Three patients received CD4-selected DLI. A total of 91 escalating infusions were applied, and the number of cumulative infusions ranged from 1 to 5 per patient, and of all 37 patients, the majority (57%) received only 1 (*n* = 11) or 2 DLI (*n* = 10), while 19% (*n* = 7) received 3 DLI, 11% (*n* = 4) received 4 DLI, and 13% (*n* = 5) received 5 cumulative DLI. Median time from transplantation to first DLI was 68 weeks (range, 15–523 weeks), from first to second DLI 6 weeks (range, 6–323 weeks), from second to third DLI 6 weeks (range, 6–220 weeks), from third to fourth DLI 6 weeks (range, 6–103 weeks), and from fourth to fifth DLI 6 weeks (range, 6–276 weeks). Longer duration to next DLI resulted from patients who first achieved mCR but eventually relapsed and received subsequent DLI.

There was no significant difference in number of DLI when comparing different indication groups for first DLI. However, all patients who received 5 DLIs initially belonged to the molecular relapse group.

Overall response

Overall mCR rate (number of patients who achieved mCR at any time) was 73% (*n* = 27), and 10 patients (27%) never achieved mCR (Table 2). After first DLI, 16 of all 37 patients (43%) achieved an mCR. No significant association of DLI dose and achievement of mCR after first DLI was observed (*P* = 0.47). Patients who achieved mCR after first DLI showed less likelihood of relapse (*P* = 0.001) and thus necessity for subsequent DLIs (*P* < 0.001). There was no difference in overall response to DLI between patients after first versus second HCT (73% versus 75%). Time to relapse appeared to be associated with overall response (*P* = 0.08), showing higher likelihood of mCR for earlier relapse.

Donor chimerism was significantly associated with mCR after first DLI, showing median donor chimerism of 99.7% (range, 13%–100%) in patients with mCR versus 78.7% (range, 0%–100%) for patients without mCR (*P* = 0.003). The effect was mediated by type of relapse (*P* = 0.05), showing median donor chimerism after first DLI of 96.5% (range, 4%–100%) for molecular relapse versus 85% (range, 0%–100%) for hematological relapse. The prognostic utility, using concordance index, was 0.63 for molecular response and 0.51 for donor chimerism. The same was seen for second DLI, showing median

Table 1
Patient Characteristics

Characteristic	Total (<i>n</i> = 37)	Relapse	
		Molecular (<i>n</i> = 17)	Hematological (<i>n</i> = 20)
Age at transplantation, y	56 (32–74)	56 (33–74)	56 (32–72)
Transplantation			
First	33 (89)	14 (82)	19 (95)
Second	4 (11)	3 (18)	1 (5)
Diagnosis			
Primary myelofibrosis	22 (60)	10 (59)	12 (60)
Post-ET	7 (19)	3 (18)	4 (20)
Post-PV	8 (21)	4 (23)	4 (20)
DIPSS			
Intermediate-1	10 (27)	7 (42)	3 (15)
Intermediate-2	17 (46)	5 (29)	12 (60)
High	10 (27)	5 (29)	5 (25)
Karnofsky performance status			
90–100	23 (62)	9 (53)	14 (70)
70–80	14 (38)	8 (47)	6 (30)
Driver mutation status			
<i>CALR</i>	4 (11)	3 (18)	1 (5)
<i>JAK2</i>	30 (81)	14 (82)	16 (80)
Triple negative	3 (8)	0	3 (15)
High molecular risk ^a	10 (44)	3 (27)	7 (58)
Donor type			
Related	11 (30)	6 (35)	5 (25)
Unrelated	26 (70)	11 (65)	15 (75)
Cumulative number of DLI/ patient, median (range)	2 (1–5)	2 (1–5)	2 (1–4)
Total number of infusions	91	50	41
Dose of CD3 + cells/kgBW, median (range)			
First DLI	1 × 10 ⁶ (5 × 10 ⁵ –1 × 10 ⁷ /l)	1 × 10 ⁶ (5 × 10 ⁵ –5 × 10 ⁶ /l)	1 × 10 ⁶ (5 × 10 ⁵ –1 × 10 ⁷ /l)
Second DLI	5 × 10 ⁶ (1 × 10 ⁶ –1 × 10 ⁸ /l)	5 × 10 ⁶ (1 × 10 ⁶ –1 × 10 ⁷ /l)	5 × 10 ⁶ (1 × 10 ⁶ –6 × 10 ⁸ /l)
Time to 1st DLI in weeks	68 (15–523)	40 (15–407)	145 (25–523)

^aTwenty-three evaluable patients (12 with hematological relapse and 11 with molecular relapse). BW = body weight; DIPSS = dynamic International Prognostic Scoring System; DLI = donor lymphocyte infusions; ET = essential thrombocythemia; PV = polycythemia vera.

donor chimerism of 99.9% (range, 24%–100%) in patients with mCR versus 36.6% (range, 0%–100%) for patients without mCR (*P* = 0.004).

Response for molecular versus hematological relapse

Next, we compared outcomes of patients according to the type of initial relapse after HCT (molecular versus hematological). Median time from HCT to first DLI was shorter for patients with molecular relapse (40 weeks) compared with hematological relapse (145 weeks; Figure 2B). Patients who showed initial molecular relapse after HCT appeared to be more likely to achieve mCR at any time (88%; 15/17) versus hematological relapse (60%; *P* = 0.05). Median number of cumulative DLI for responders was 2 (range, 1–5) for molecular relapse and 3 (range, 1–4) for hematological relapse. Cumulative dose of all responders was 15 × 10⁶ cells/kgBW (range, 5 × 10⁵–1 × 10⁷) for patients with initial molecular versus 15 × 10⁶ cells/kgBW (range, 5 × 10⁵–6 × 10⁸) for hematological relapse, respectively.

Forty-seven percent of patients (8/17) with molecular relapse showed mCR after first DLI compared with 40% of patients (8/20) with initial hematological relapse. Median dose of first DLI for responders was 1 × 10⁶/kgBW (range, 5 × 10⁵–3.7 × 10⁶) for molecular relapse versus 1 × 10⁶ (range, 5 × 10⁵–1 × 10⁷) for hematological relapse. Importantly, significantly more patients

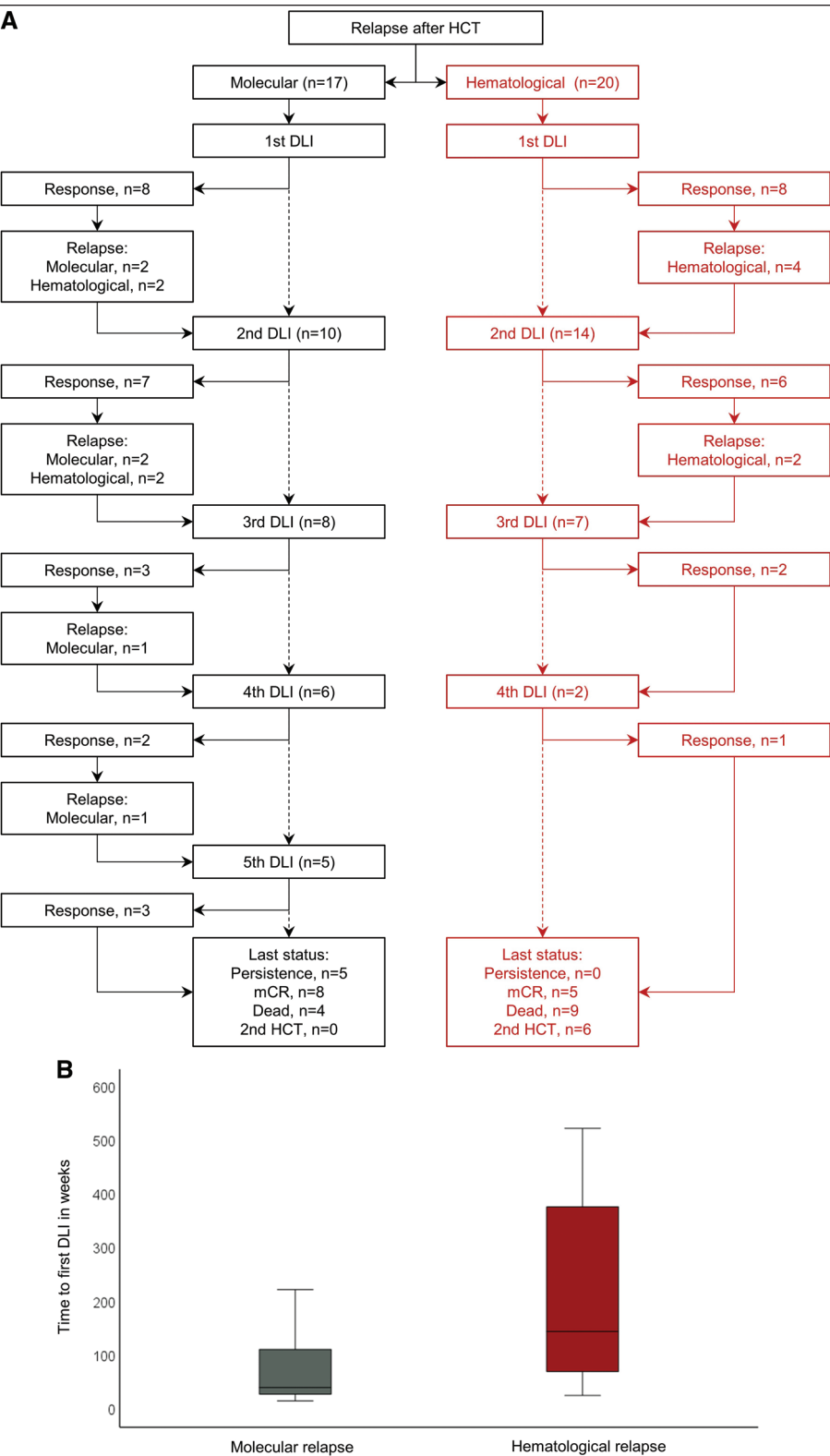


Figure 2. Donor Lymphocyte Infusion for molecular and hematological relapse after allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis. (A) Flow diagram for molecular or hematological relapse with numbers of DLI, response and subsequent relapse. (B) Time to first DLI according type of relapse. DLI = donor lymphocyte infusion; HCT = hematopoietic stem cell transplantation.

with initial molecular relapse after HCT who did not achieve mCR after first DLI eventually achieved mCR with subsequent DLI (78%; 7/9) compared with only 33% (4/12) of patients with hematological relapse after HCT and no response after first DLI ($P = 0.04$). After second DLI, mCR rate was 58% for

patients with initial molecular relapse compared with 43% for patients with initial hematological relapse. Of the 17 patients with molecular relapse, 13 (76%) also showed lack of full donor chimerism at the time of first DLI. mCR was associated with achievement of full donor chimerism

Table 2
Results

Outcome	Total (n = 37)	Relapse		PValue
		Molecular (n = 17)	Hematological (n = 20)	
Overall mCR, n (%)	27 (73)	15 (88)	12 (60)	0.05
Cumulative number of DLIs to achieve mCR, median (range)	2 (1–5)	2 (1–5)	3 (1–4)	0.41
Cumulative median T-cell dose to achieve mCR $\times 10^6$ (CD3+/kg)	3.5 (0.5–101)	3 (0.5–61)	5 (0.5–101)	0.53
Patients with 2nd HCT, n (%)	6 (16)	0 (0)	6 (30)	0.004
Overall acute GvHD II–IV, n (%)	8 (22)	3 (18)	5 (25)	0.59
Overall acute GvHD grade III/IV, n (%)	4 (11)	2 (12)	2 (10)	0.49
Overall chronic GvHD, n (%)	8 (22)	6 (35)	2 (10)	0.06
mCR without GvHD, n (%)	14 (38)	7 (52)	7 (58)	0.70
EFS at 5 y, % (95 CI)	40 (23–57)	59 (36–82)	25 (4–46)	0.11
OS at 5 y, % (95 CI)	53 (36–70)	77 (57–97)	32 (10–54)	0.03

EFS = event-free survival; GvHD = graft-versus-host disease; mCR = molecular complete response; OS = overall survival; TRM = treatment-related mortality.

($P < 0.001$), and 5 patients had persistent disease (lack of full donor chimerism and no mCR) but were alive at last follow-up after a total of 1 infusion ($n = 1$), 2 infusions ($n = 1$), 4 infusions ($n = 1$), and 5 infusions ($n = 2$), respectively.

Acute and chronic GvHD

In terms of acute GvHD, only 8 overall events occurred (Table 3) after a total number of 91 infusions (9%). Incidence of acute GvHD II–IV and grade III/IV with respect to all patients was 22% (8/37) and 11% (4/37). Acute GvHD was not associated with overall mCR. No association of acute GvHD and T-cell dose was observed ($P = 0.98$). There were 2 cases of severe acute GvHD after first DLI (grade III of the liver and IV of the skin, liver, and gastrointestinal, respectively). Both patients achieved mCR after first DLI ($P = 0.09$) and received a DLI dose of $5 \times 10^6/\text{kgBW}$ compared with a median of $1 \times 10^6/\text{kgBW}$ for patients without acute GvHD, while the patient with grade IV acute GvHD died of treatment-related mortality due to sepsis with multiorgan failure. All cases were steroid-responsive and resolved.

In terms of chronic GvHD, only 8 overall cases occurred (9%; Table 3) and appeared to be associated with response ($P = 0.05$). All patients with chronic GvHD achieved mCR, while 66% (19/29) of those without chronic GvHD achieved mCR. No association was observed for first or second DLI dose with occurrence of chronic GvHD. Other factors such as time between allograft and DLI, HLA mismatch donor transplantation, or CD4-selected products did not influence the incidence of acute or chronic GvHD. All 3 patients receiving CD4-selected products achieved mCR after first DLI without GvHD and were alive at last follow-up.

In terms of other toxicities, only 1 patient showed pancytopenia co-occurring to acute GvHD grade IV. However, bone marrow examination showed no significant aplasia and therefore, this presentation was explained by co-occurrence of GvHD and sepsis, of which this patient eventually died. The remaining patients showed no toxicities.

Survival

Median follow-up from first DLI of the entire cohort was 6.1 years (95% CI, 1.7–10.5 years). OS according to the initial indication for DLI was 77% (95% CI, 57%–97%) for molecular relapse compared with 32% (95% CI, 10%–54%) for

hematological relapse after HCT ($P = 0.03$). Of note, 6 patients received salvage second HCT after DLI failure, of whom all had hematological relapse after first HCT (Figure 3).

In terms of responders versus nonresponders, OS was 63% (95% CI, 43%–83%) versus 23% (95% CI, 0%–50%]; $P = 0.01$). Outcome of responders versus nonresponders to first DLI was 75% (95% CI, 52%–97%) versus 36% (95% CI, 13%–59%]; $P = 0.04$). Subsequent second allograft was a censored event. Outcome appeared to be impacted rather by initial relapse after HCT than by achievement of response ($P = 0.05$). Although responders appeared to have better outcomes, patients treated for molecular relapse appeared to have better outcome even for patients without initial response to first DLI in comparison with both responders and nonresponders treated for initial hematological relapse. Thus, OS for responders versus nonresponders to first DLI was 88% versus 68% for molecular relapse compared with 60% versus 12% for hematological relapse. Out of 12 total deaths in the hematological relapse cohort, 9 events occurred in patients who did not respond after first DLI, while 3 patients died, which showed mCR after first DLI for hematological relapse.

All 8 patients who relapsed after initial mCR to first DLI (out of 16 responders to first DLI, 50%) could be salvaged by another DLI exhibiting long-lasting mCR of a median of 7 years. Four patients had initial molecular relapse and 4 hematological relapse after HCT and are alive at last follow-up. Thus, OS was 100% versus 42% (95% CI, 16%–68%) for the 18 patients who did not show mCR after first DLI and who received subsequent salvage DLI.

Time to first DLI showed no significant association for OS ($P = 0.14$). No association between dose of first DLI and OS was observed ($P = 0.79$), while total number of DLI procedures appeared to be associated with longer OS in the entire cohort ($P = 0.07$). However, after adjustment for interaction with type of relapse after HCT (molecular versus hematological relapse), the impact of number of DLI was driven by type of relapse and not significant anymore ($P = 0.33$).

DISCUSSION

Our study has 5 main findings. First, molecular monitoring enables to differentiate between molecular relapse after HCT, which is associated with significantly improved outcome in comparison with hematological relapse after HCT. Second, this approach can identify and treat relapsed patients early after HCT. Third, all patients who experienced subsequent relapse after having achieved mCR after first DLI could be salvaged with subsequent DLI, exhibiting long-term survival. Fourth, half of the patients achieve mCR without developing GvHD. Fifth, no patient that was initially treated for molecular relapse was in need of a second HCT as salvage strategy. Taken together, these findings demonstrate high efficacy with low GvHD incidence by escalating DLIs in relapsed myelofibrosis patients after allograft. Here, we suggest that applying molecular monitoring together with DLI should be standard of care for treatment of relapsed myelofibrosis after HCT.

The significant difference in outcomes between mCR and less than mCR suggests a potent graft-versus-myelofibrosis effect, which underscores the relevance for molecular monitoring and adoptive immunotherapy in myelofibrosis undergoing HCT. If patients do not respond to either escalating dose regimen or salvage DLI and relapse has occurred, then patient suitability for a second transplantation should be considered.^{4,6} However, this is often reserved for fitter, younger individuals with a good performance status who are felt to have sufficient reserve to undergo such an approach. In the present study, 6 patients received a second HCT and all belonged to the hematological relapse group. Two patients were alive at last follow-up, showing survival of 24 and 26 years since their first transplantation, respectively.

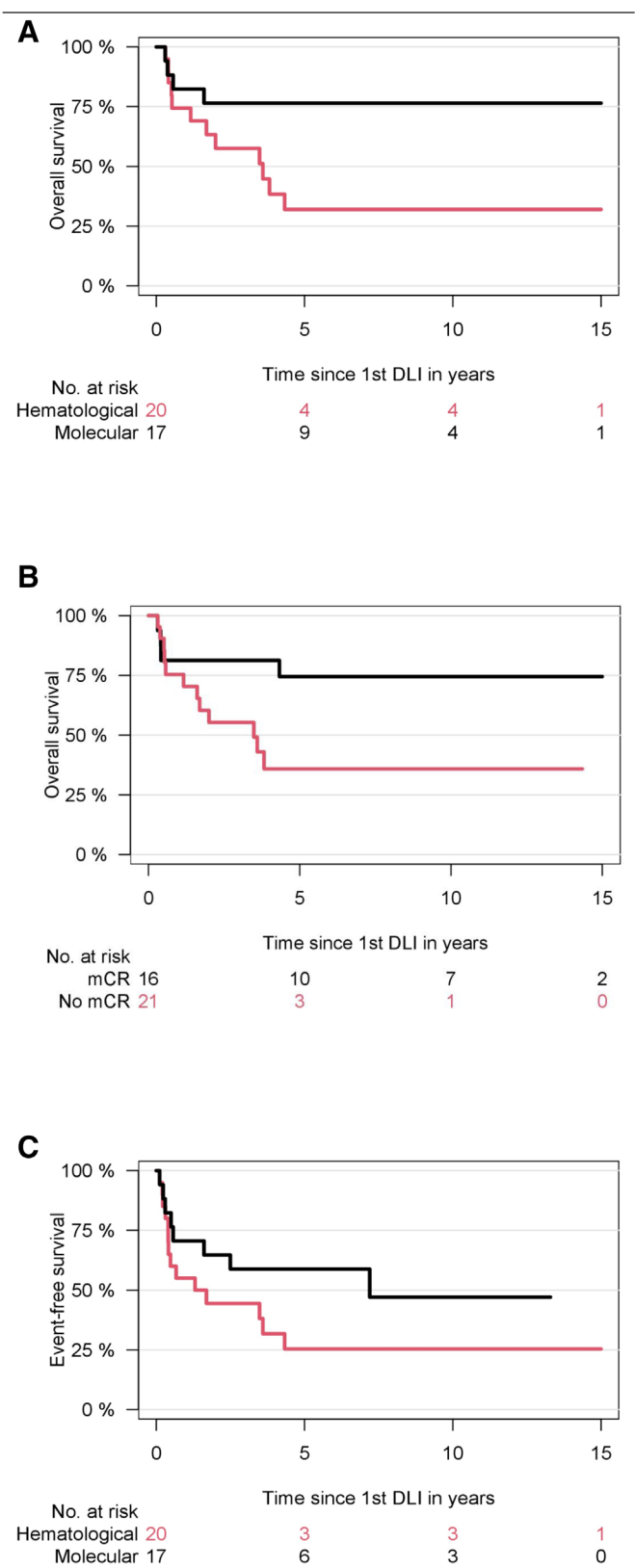


Figure 3. Survival after DLI for relapsed myelofibrosis. (A) Overall survival according molecular or hematological relapse. (B) Overall survival according molecular vs less than molecular remission after first DLI. (C) Event-free survival according type of initial relapse. All patients who relapsed after initial mCR to first DLI could be salvaged by another DLI exhibiting long-lasting mCR of a median of 7 years. DLI = donor lymphocyte infusion; mCR = molecular complete response.

Table 3		
Events and Severity of Graft-versus-host Disease After DLI		
DLI	Acute GvHD	Chronic GvHD
1st	2 (grade III: liver; grade IV: skin, liver, GI)	1 (moderate: skin, eyes)
2nd	4 (2 grade II: skin; 2 grade III: skin)	3 (1 mild: skin; 2 moderate: skin, mouth eyes)
3rd	0	1 (mild: skin)
4th	1 (grade II: skin)	4 (mild: skin)
5th	1 (grade II: liver)	0
Total	8	8

DLI = donor lymphocyte infusion; GI = gastrointestinal; GvHD = graft-versus-host disease.

One important feature of our study is the uniform approach for conditioning and GvHD prophylaxis using ATLG, which is also most frequently implemented in transplantation platforms in Europe,²⁴ while many US-based centers use non-ATLG-based GvHD prophylaxis.^{25,26} In a previous study comparing ATLG with non-ATLG approaches in the matched related donor setting, no significant difference was found in terms of disease-free survival, chronic GvHD, relapse-free survival, or relapse risk, while risk for acute GvHD was significantly reduced with ATLG.²⁷ Other sufficient comparative analyses in other settings are still lacking. Whether our results presented here can be fully translated to other settings remains to be determined but should prompt investigations.

In terms of safety of DLI, low rates of acute and chronic GvHD were observed (22%, respectively) and were comparable with previous reports in other indications.^{28,29} One patient experienced grade IV acute GvHD after first DLI and died of sepsis and multiorgan failure. No clear correlation was found for DLI dose (either in total or per single dose) and GvHD, whereas only chronic GvHD appeared to be associated with overall number of DLIs ($P = 0.01$). However, 2 cases with severe aGvHD received a higher starting dose. On the contrary, response did not seem to correlate with DLI dose. Thus, our data suggest to avoid higher starting doses for first DLI and carefully escalate subsequent DLI in homogenous manner to safely apply this therapy without and achieve same efficacy.

A caveat of our study may be the focus on driver mutations for molecular monitoring. Importantly, patients with an *MPL* driver mutation genotype tend to show significantly lower rates of relapse and also better overall outcome.^{9,17} We included 4 triple-negative patients. Three patients achieved full chimerism and were alive at last follow-up. One triple-negative patient showed hematological relapse, never achieved full chimerism, and subsequently died. For these patients, novel methods based on the next-generation sequencing are currently under investigation to identify more patients at different risk for relapse or progression.³⁰ We included sequencing data of 23 evaluable patients at the time of transplantation and found a slight absolute difference in distribution of high molecular risk in molecular relapse (27%) versus hematological relapse (58%). Another limitation of our study may be selection bias as molecular monitoring of patients was not standard practice for the whole study period. Information on molecular status was not available at the time of treatment for some patients who received first DLI for hematological relapse and samples were analyzed retrospectively in these cases. Thus, different time from relapse to DLI may have been confounded by availability of molecular analysis. However, the fact that patients with initial hematological relapse showed significantly worse responses, slightly higher rates of high molecular risk, and had to be salvaged by second HCT suggests a more aggressive disease, possibly affected by prolonged treatment initiation.

Last, we applied molecular monitoring in close sequences early after transplant, allowing for early detection but also requiring

resources and technical capabilities that may not be generalizable. However, our finding that particularly patients with molecular relapse received DLI significantly earlier than patients with hematological relapse may underline the importance of early detection of relapsed patients for achieving excellent outcomes. Based on these results, it may be recommended to monitor patients early after transplant as closely as possible. In terms of sensitivity, we showed that donor chimerism correlated with molecular response after DLI and that the impact of chimerism analysis was mediated by type of relapse, while some patients showed mCR and excellent outcomes despite incomplete donor chimerism. This underscores the importance of molecular monitoring for best possible prognostic utility after DLI.

In conclusion, DLI for relapsed myelofibrosis after HCT showed excellent survival, particularly for patients with molecular relapse and who showed mCR at any time. Molecular CR can be achieved in half of the patients without development of debilitating GvHD. Furthermore, molecular monitoring enabled to treat early and to target mCR, even after several infusions, resulting in long-lasting response and survival. Our results underscore the need for molecular monitoring and targeting molecular response in relapsed myelofibrosis and provide evidence for DLI together with these approaches as a safe and effective strategy, which should be standard of care for these patients.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

NG and NK designed the study, collected and analyzed data, interpreted results, and wrote the first draft of the article. AB performed molecular monitoring. MG provided product collection. NG, CW, DJ, EK, FA, and NK infused the products and care for patients. CW, AB, MQ, DJ, CB, EK, MG, FA, and BF collected data, interpreted results, and wrote the article. All authors approved of the final version of the article.

DATA AVAILABILITY

Data will be shared upon request via email to the corresponding author.

DISCLOSURES

The authors have no conflicts of interest to disclose.

REFERENCES

- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127:2391–2405.
- Barbui T, Barosi G, Birgegard G, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2011;29:761–770.
- Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2021;96:145–162.
- Kröger NM, Deeg JH, Olavarria E, et al. Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: a consensus process by an EBMT/ELN international working group. *Leukemia*. 2015;29:2126–2133.
- Kerbaui DMB, Gooley TA, Sale GE, et al. Hematopoietic cell transplantation as curative therapy for idiopathic myelofibrosis, advanced polycythemia vera, and essential thrombocythemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13:355–365.
- McLornan DP, Hernandez-Boluda JC, Czerw T, et al. Allogeneic haematopoietic cell transplantation for myelofibrosis: proposed definitions and management strategies for graft failure, poor graft function and relapse: best practice recommendations of the EBMT Chronic Malignancies Working Party. *Leukemia*. 2021;35:2445–2459.
- McLornan DP, Szydlo R, Robin M, et al. Outcome of patients with Myelofibrosis relapsing after allogeneic stem cell transplant: a retrospective study by the Chronic Malignancies Working Party of EBMT. *Br J Haematol*. 2018;182:418–422.
- Atagunduz IK, Klyuchnikov E, Wolschke C, et al. Treosulfan-based conditioning regimen for second allograft in patients with myelofibrosis. *Cancers (Basel)*. 2020;12:3098.
- Gagelmann N, Ditschkowski M, Bogdanov R, et al. Comprehensive clinical-molecular transplant scoring system for myelofibrosis undergoing stem cell transplantation. *Blood*. 2019;133:2233–2242.
- Gagelmann N, Eikema D-J, Wreede LC de, et al. Comparison of dynamic international prognostic scoring system and MYelofibrosis SECondary to PV and ET prognostic model for prediction of outcome in polycythemia vera and essential thrombocythemia myelofibrosis after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25:e204–e208.
- Passamonti F. Stem cell transplant in MF: it's time to personalize. *Blood*. 2019;133:2118–2120.
- Dickinson AM, Norden J, Li S, et al. Graft-versus-leukemia effect following hematopoietic stem cell transplantation for leukemia. *Front Immunol*. 2017;8:496.
- Kröger N, Alchalby H, Klyuchnikov E, et al. JAK2-V617F-triggered pre-emptive and salvage adoptive immunotherapy with donor-lymphocyte infusion in patients with myelofibrosis after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2009;113:1866–1868.
- Klyuchnikov E, Holler E, Bornhäuser M, et al. Donor lymphocyte infusions and second transplantation as salvage treatment for relapsed myelofibrosis after reduced-intensity allografting. *Br J Haematol*. 2012;159:172–181.
- Byrne JL, Beshti H, Clark D, et al. Induction of remission after donor leucocyte infusion for the treatment of relapsed chronic idiopathic myelofibrosis following allogeneic transplantation: evidence for a “graft vs. myelofibrosis” effect. *Br J Haematol*. 2000;108:430–433.
- Wolschke C, Badbaran A, Zabelina T, et al. Impact of molecular residual disease post allografting in myelofibrosis patients. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52:1526–1529.
- Mannina D, Gagelmann N, Badbaran A, et al. Allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis harboring the MPL mutation. *Eur J Haematol*. 2019;103:552–557.
- Kröger N, Holler E, Kobbe G, et al. Allogeneic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning in patients with myelofibrosis: a prospective, multicenter study of the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 2009;114:5264–5270.
- Alchalby H, Badbaran A, Zabelina T, et al. Impact of JAK2V617F mutation status, allele burden, and clearance after allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood*. 2010;116:3572–3581.
- Kröger N, Panagiota V, Badbaran A, et al. Impact of molecular genetics on outcome in myelofibrosis patients after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23:1095–1101.
- Tefferi A, Barosi G, Mesa RA, et al. International Working Group (IWG) consensus criteria for treatment response in myelofibrosis with myeloid metaplasia, for the IWG for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). *Blood*. 2006;108:1497–1503.
- Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. 1994 consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant*. 1995;15:825–828.
- Przepiorka D, Anderlini P, Saliba R, et al. Chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood*. 2001;98:1695–1700.
- McLornan D, Eikema DJ, Czerw T, et al. Trends in allogeneic haematopoietic cell transplantation for myelofibrosis in Europe between 1995 and 2018: a CMWP of EBMT retrospective analysis. *Bone Marrow Transplant*. 2021;56:2160–2172.
- Murthy GSG, Kim S, Estrada-Merly N, et al. Association between the choice of the conditioning regimen and outcomes of allogeneic hematopoietic cell transplantation for myelofibrosis. *Haematologica*. 2023 February 9. [Epub ahead of print].
- Gagelmann N, Salit RB, Schroeder T, et al. High molecular and cytogenetic risk in myelofibrosis does not benefit from higher intensity conditioning before hematopoietic cell transplantation: an International Collaborative Analysis. *HemaSphere*. 2022;6:e784.
- Robin M, Chevret S, Koster L, et al. Antilymphocyte globulin for matched sibling donor transplantation in patients with myelofibrosis. *Haematologica*. 2019;104:1230–1236.
- Simula MP, Markt S, Fozza C, et al. Response to donor lymphocyte infusions for chronic myeloid leukemia is dose-dependent: the importance of escalating the cell dose to maximize therapeutic efficacy. *Leukemia*. 2007;21:943–948.
- Raiola AM, van Lint MT, Valbonesi M, et al. Factors predicting response and graft-versus-host disease after donor lymphocyte infusions: a study on 593 infusions. *Bone Marrow Transplant*. 2003;31:687–693.
- Mannina D, Badbaran A, Wolschke C, et al. Digital-droplet PCR assays for IDH, DNMT3A and driver mutations to monitor after allogeneic stem cell transplantation minimal residual disease of myelofibrosis. *Bone Marrow Transplant*. 2022;57:510–512.

4. Zusammenfassung

Die allogene Stammzelltransplantation (allo-HSCT) bietet bei einer Vielzahl maligner Erkrankungen eine potenzielle Heilung, ist jedoch mit erheblichen Risiken therapieassoziierter Morbidität und Mortalität sowie, in einigen Fällen, dem Risiko eines Rückfalls der Erkrankung verbunden. Daher werden dringend präzise diagnostische Ansätze benötigt, die es erlauben, Patientinnen und Patienten vor der Transplantation zu stratifizieren sowie nach der Transplantation durch eine frühzeitige Anpassung der Therapie Rückfälle zu verhindern. Das Ziel der vorliegenden Arbeit mit dem Titel "Entwicklung und Anwendung neuer diagnostischer Verfahren zur Prognoseabschätzung und Therapiesteuerung bei zellulären Therapien" bestand darin, in verschiedenen Patientenkohorten (Myelofibrose, akute myeloische Leukämie [AML], chronisch myelomonozytäre Leukämie [CMML]) Prognosefaktoren für das Überleben und das Rückfallrisiko nach allo-HSCT zu identifizieren und zu validieren sowie die Auswirkung von Therapieinterventionen wie Spender-Lymphozyten-Infusionen (DLI) zu untersuchen. Dazu wurden verschiedene Faktoren analysiert, die Verlauf und Ergebnis nach allo-HSCT beeinflussen, darunter genetische Mutationen, der Status der minimalen Resterkrankung (MRD) und therapeutische Interventionen. Die Studien umfassten retrospektive Analysen von Patienten mit Myelofibrose (349 Patienten), CMML (240 Patienten), refraktärer AML (56 Patienten) und rezidivierter Myelofibrose (37 Patienten). Verschiedene prognostische Scores, molekulargenetische Analysen und der MRD-Status (z.B. am Tag 100 nach allo-HSCT) wurden genutzt, um das Überleben und das Risiko von Rezidiven und Transplantat-assoziiierter Mortalität (Nicht-rezidivbedingte Mortalität, NRM) zu bewerten. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Myelofibrose: Patienten mit *TP53*-Mutationen hatten ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben (OS) im Vergleich zu Patienten ohne *TP53*-Mutation (median: 1,5 Jahre vs. 13,5 Jahre) und höherer Rückfallrate assoziiert. Ein komplexer Karyotyp verschlechterte ebenfalls das Ergebnis nach allo-HSCT signifikant.

CMML: Ein im Rahmen der Arbeit entwickelter, prognostischer CMML-Transplantationsscore, der Mutationen in *ASXL1* und *NRAS* sowie den Blastenanteil berücksichtigt, zeigte eine starke Vorhersagekraft für das Gesamtüberleben und die nicht-rezidivbedingte Mortalität (NRM).

Refraktäre AML: Der MRD-Status am Tag 100 nach Transplantation war ein starker Prädiktor für das Gesamtüberleben und die Krankheitsfreiheit. MRD-negative Patienten hatten signifikant bessere Ergebnisse (1-Jahres-OS 76% vs. 35% bei MRD-positiven).

Rezidierte Myelofibrose: DLI-Gaben führten zu einer hohen Gesamtansprechrate (73%), wobei molekulare Komplettremissionen häufiger erreicht wurden, wenn nur ein molekulares Rezidiv vorlag. Chronische Spender-gegen-Wirt-Krankheit nach DLI war mit einem besseren Ansprechen assoziiert.

Zusammengefasst zeigten die im Rahmen der Arbeit veröffentlichten Studien, dass genetische Marker, insbesondere *TP53*-Mutationen, sowie der MRD-Status am Tag 100 nach der allo-HSCT starke prognostische Faktoren für das Überleben und das Rückfallrisiko sind. Der neu entwickelte CMML-Transplantationsscore erlaubt eine präzisere Risikostratifizierung für CMML-Patienten. DLI-Therapien bieten vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von rezidivierter Myelofibrose und refraktärer AML, insbesondere bei molekularem Rückfall. Insgesamt sind genetische Analysen und der MRD-Status entscheidend für die Optimierung der Therapie und das Management nach der Transplantation. Die in der vorliegenden Arbeit etablierten innovativen Diagnostikansätze können zukünftig dazu beitragen, die Behandlungsergebnisse in der klinischen Praxis zu verbessern und zellbasierte Therapien für eine breitere Patientengruppe zugänglicher und sicherer zu gestalten.

Abstract

Allogeneic stem cell transplantation (allo-HSCT) offers a potential cure for a variety of malignant diseases but is associated with significant risks of therapy-related morbidity and mortality, as well as relapse in some cases. Therefore, there is an urgent need for precise diagnostic approaches that allow for patient stratification prior to transplantation and for early post-transplant therapeutic adjustments to prevent relapse.

The aim of this thesis, titled *“Development and Application of Novel Diagnostic Methods for Prognostic Assessment and Therapy Management in Cellular Therapies”*, was to identify and validate prognostic factors for survival and relapse risk following allo-HSCT in various patient cohorts (myelofibrosis, acute myeloid leukemia [AML], and chronic myelomonocytic leukemia [CMML]), and to investigate the impact of therapeutic interventions such as donor lymphocyte infusions (DLI).

To this end, a variety of factors influencing outcomes after allo-HSCT were analyzed, including genetic mutations, minimal residual disease (MRD) status, and therapeutic interventions. The studies included retrospective analyses of patients with myelofibrosis (349 patients), CMML (240 patients), refractory AML (56 patients), and relapsed myelofibrosis (37 patients). Various prognostic scores, molecular genetic analyses, and MRD status (e.g., at day 100 post-transplant) were used to assess survival, relapse risk, and non-relapse mortality (NRM).

Key findings:

- **Myelofibrosis:** *TP53* mutations were associated with worse overall survival (median 1.5 years vs. 13.5 years in patients without *TP53* mutations) and a higher relapse rate. A complex karyotype also significantly worsened outcomes post-transplant.
- **CMML:** A novel CMML transplant score developed as part of this work, which incorporates *ASXL1* and *NRAS* mutations and blast percentage, showed strong predictive value for overall survival and NRM.
- **Refractory AML:** MRD status on day 100 post-transplant was a strong predictor of overall and disease-free survival. MRD-negative patients had significantly better outcomes (1-year OS: 76% vs. 35% in MRD-positive patients).
- **Relapsed Myelofibrosis:** DLI treatments led to a high overall response rate (73%), with molecular complete remissions more frequently achieved when relapse was molecular only. Chronic graft-versus-host disease following DLI was associated with better responses.

Conclusion:

The studies published as part of this thesis demonstrate that genetic markers—particularly *TP53* mutations—and MRD status at day 100 post-allo-HSCT are strong prognostic indicators for survival and relapse risk. The newly developed CMML transplant score enables more precise risk stratification in CMML patients. DLI therapies show promising outcomes in the treatment of relapsed myelofibrosis and refractory AML, especially in cases of molecular relapse. Overall, genetic analyses and MRD status are crucial for optimizing therapy and post-transplant management. The innovative diagnostic approaches established in this work have the potential to improve treatment outcomes in clinical practice and make cell-based therapies more accessible and safer for a broader group of patients.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
Allo-HSCT	Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
aGVHD	Akut Graft-versus-Host-Disease
AML	Akute Myeloische Leukämie
ASXL1	Additional sex combs-like 1
ATLG	Anti T-lymphocyte globulin
CALR	Calreticulin
CAR-T	Chimeric Antigen Receptor T-Zellen
CBL	Casitas B-lineage Lymphoma
cfDNA	Cell-free DNA
CHIP	Klonale Hämatopoese mit unbestimmtem Potenzial
CMML	Chronische Myelomonozytäre Leukämie
CPSS	CMML-spezifisches prognostisches Scoring-System
CPSS-mol	Molekulare Anpassung des CPSS
DGHO	Deutsche, Österreichische und Schweizerische Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
DIPSS	Dynamic International Prognostic Scoring System
DLI	Donor-Lymphozyten-Infusion
EBMT	European Society for Blood and Marrow Transplantation
EFS	Ereignisfreies Überleben (Event-free survival)
EPOR	Erythropoetin-Rezeptor
ESE	Exonische Splicing-Enhancer
ET	Essentielle Thrombozythämie
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FDC	Kompletter Spenderchimerismus (Full donor chimerism)
FERM	Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin
G-CSFR	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GFM	Groupe Francophone des Myélodysplasies
GIPSS	Genetisch inspiriertes internationales prognostisches Scoring-System
GVHD	Graft-versus-Host-Disease
HLA	Humanes Leukozytenantigen-System
HMR	Hochmolekulare Risikomutationen
IDH1	Isocitrat-Dehydrogenase 1
IDH2	Isocitrat-Dehydrogenase 2
IgH	Immunglobulin Heavy Chain
IL-3	Interleukin-3
JAK2	Janus-Kinase-2
KG	Körpergewicht
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Virus Onkogen
LFS	Leukämiefreies Überleben (Leukemia-free survival))

MAC	Myeloablative Konditionierung
MC	Mixed chimerism
mCR	Molekulare komplette Remission
MDAPS	MD Anderson Prognosescore
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MF	Myelofibrose
MFC	Multicolor Flow Cytometry
MIPSS70	Mutationserweitertes internationales prognostisches Scoring-System
MMM	Myelofibrose mit myeloischer Metaplasie (Molecular Myeloid Model)
MPL	Myeloproliferative Leukämie Virus Onkogen
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MTSS	Metastasis Suppressor 1
NGS	Next-Generation-Sequencing
NRAS	Neuroblastoma-RAS-Onkogen
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
NRM	Nicht-rezidivbedingte Mortalität (non-relapse mortality)
OS	Gesamtüberleben (overall survival)
PMF	Primäre Myelofibrose
PV	Polycythaemia Vera
RFS	Rezidivfreies Überleben (relapse-free survival)
RIC	Reduced-intensity conditioning
SETBP1	SET Binding Protein 1
SF3B1	Splicing Factor 3B Subunit 1
SH2	Src-Homologie-2
SRSF2	Serin-/Arginin-reicher Splicing-Faktor
TCR	T-Zell-Rezeptor
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TP53	Tumorprotein 53
TPOR	Thrombopoetin-Rezeptor
TRM	Transplantationsbedingte Mortalität
TYK2	Tyrosinkinase 2
U2AF1	U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1
VAF	Variant Allele Frequency
Abkürzung	Bedeutung
qPCR	quantitative (real-time) polymerase chain reaction
RTqPCR	Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

5. Erklärung des Eigenanteils an den Publikationen

5.1 Publikation 1

„Impact of TP53 on outcome of patients with myelofibrosis undergoing hematopoietic stem cell transplantation“

Erschienen in *Blood*, 2023;141(23):2901-2911

Darstellung des Eigenanteils:

Die Studie wurde durch Nico Gagelmann und Nicolaus Kröger konzipiert. Die Sammlung und Analyse der Daten sowie die Interpretation der Ergebnisse wurden von Anita Badbaran durchgeführt. Anita Badbaran stellte alle 349 Proben aus sechs Zentren zusammen, führte die NGS-Analyse durch, analysierte und interpretierte die Daten und bereitete die Ergebnisse für die statistische Auswertung vor. Der erste Entwurf des Manuskripts wurde ebenfalls von Anita Badbaran verfasst.

5.2 Publikation 2

„A prognostic score including mutation profile and clinical features for patients with CMML undergoing stem cell transplantation“²

Erschienen in *Blood Adv.* Mar 23 2021;5(6):1760-1769

Darstellung des Eigenanteils:

Die Studie wurde von Nico Gagelmann und Nicolaus Kröger konzipiert. Das Panel wurde von Anita Badbaran entworfen, die Proben wurden sequenziert, Variant-Analysen durchgeführt und alle Proben für die Studie verwaltet. Die Daten wurden von Anita Badbaran gesammelt, analysiert und interpretiert, und der erste Entwurf des Manuskripts wurde von Anita Badbaran und Nico Gagelmann verfasst.

5.3 Publikation 3

„Post-Transplantation Multicolored Flow Cytometry-Minimal Residual Disease Status on Day 100 Predicts Outcomes for Patients with Refractory Acute Myeloid Leukemia“³

Erschienen in *Transplant Cell Ther.* May 2022;28(5):267 e1-267 e7

Darstellung des Eigenanteils:

Die Studie wurde von Evgeny Klyuchnikov, Anita Badbaran und Nicolaus Kröger konzipiert. Das Panel für die durchflusszytometrische Analyse wurde von Anita Badbaran und Evgeny Klyuchnikov entworfen. Die Datenerhebung erfolgte durch Anita Badbaran, die auch die Analyse und Interpretation mithilfe der Cytognos-Software durchführte. Der erste Entwurf des Manuskripts wurde von Evgeny Klyuchnikov und Anita Badbaran verfasst.

5.4 Publikation 4

„Donor Lymphocyte Infusion and Molecular Monitoring for Relapsed Myelofibrosis After Hematopoietic Cell Transplantation“

Erschienen in *Hemasphere*. Jul 2023;7(7):2-8.

Darstellung des Eigenanteils:

Die Studie wurde von Nico Gagelmann und Nicolaus Kröger konzipiert. Anita Badbaran führte das molekulare Monitoring durch, sammelte die Daten, interpretierte die Ergebnisse und schrieb den Artikel mit.

6. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich während meiner Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mama, die mir in allen Phasen meiner Arbeit immer wieder Mut gemacht hat. Mit ihrer unermüdlichen Liebe und Unterstützung hat sie mich durch diese Zeit begleitet. Ohne ihre Fürsorge und ihren tiefen Glauben an mich hätte ich diese Dissertation nicht abschließen können. Ihre unerschütterliche Stärke und ihr Vertrauen in mich waren eine ständige Quelle der Motivation.

Ebenso danke ich meiner Tochter, die mir während meines gesamten Masterstudiums und der Dissertation geduldig zur Seite stand. Ihr ständiger Rückhalt und ihre liebevolle Ermutigung haben mir geholfen, nie aufzugeben und diese Arbeit zu vollenden. Ihre Geduld und ihr Glaube an mich haben mir immer wieder Kraft gegeben, das Ziel vor Augen zu behalten.

Diese Dissertation widme ich meinem Papa, dessen Erinnerung mich jeden Tag begleitet. Auch wenn er nicht mehr unter uns weilt, ist seine Liebe, sein Vertrauen und seine Unterstützung stets präsent. In allem, was ich tue, spüre ich seine Nähe. Diese Arbeit ist ein kleiner Ausdruck meiner Dankbarkeit für alles, was er mir mitgegeben hat, und für die Werte, die er mir vorgelebt hat.

Ein großer Dank geht auch an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dipl.-Med. Boris Fehse, sowie an Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Nicolaus Kröger, die ich bereits seit 1999 kenne. Beide haben mich auf meinem wissenschaftlichen Weg begleitet und mit ihren wertvollen Ratschlägen und Impulsen die Forschung maßgeblich bereichert. Prof. Kröger danke ich besonders für seine konstant kreativen Ideen und den regen Austausch, der mir oft neue Perspektiven eröffnete. Prof. Fehse danke ich insbesondere für seine wertvolle Anleitung und seine unermüdliche Unterstützung während der gesamten Dissertation. Durch seine Expertise und tiefgehende Erfahrung konnte er mich bei der Entwicklung zahlreicher innovativer Tests anleiten, die heute einen bedeutenden Beitrag zur Patientenüberwachung leisten. Diese Dissertation ist nicht nur das Ergebnis der intensiven Anleitung durch Prof. Fehse, sondern auch eine Fortsetzung jahrelanger, kontinuierlicher Forschungsarbeit, bei der neue Ansätze und Bausteine zur Verbesserung der Patientenversorgung entwickelt und immer weiter optimiert wurden. Unsere Arbeiten und Fortschritte wurden regelmäßig durch Veröffentlichungen in der wissenschaftlichen Welt geteilt und tragen so zur Weiterentwicklung der medizinischen Praxis bei.

Ein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Vera Ulrike Bacher für ihre moralische Unterstützung und die sorgfältige Korrektur meiner Arbeit. Ihr wertvoller Rat und ihre präzisen Hinweise haben mir nicht nur geholfen, die Arbeit auf einem hohen wissenschaftlichen Niveau zu halten, sondern sie auch inhaltlich entscheidend vorangebracht.

Ein großer Dank geht an Dr. Thomas Stübig, der die ersten Bausteine dieser Dissertation aufgebaut hat. Er legte damit den Grundstein für das gesamte Schreiben. Seine präzisen und hilfreichen Anmerkungen haben dazu beigetragen, die Qualität der Arbeit zu verbessern und den Fokus zu schärfen.

Piet Sonnemann, Dr. Stefan Horn und Dr. Kristoffer Riecken danke ich herzlich für ihre Korrekturen und wertvollen Hinweise, die mir bei der Optimierung der Arbeit sehr geholfen haben.

Nicht zuletzt möchte ich Dr. Nico Gagelmann für seine hervorragende Arbeit bei den statistischen Analysen und sein außergewöhnliches Engagement danken. Seine Expertise in der Datenanalyse hat einen entscheidenden Beitrag dazu geleistet, die Ergebnisse dieser Dissertation fundiert und aussagekräftig darzustellen.

Ich danke allen, die mich auf diesem Weg begleitet haben, von Herzen. Ohne Ihre Unterstützung, Ihre Expertise und Ihre Geduld wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Sie alle haben in unterschiedlicher Weise dazu beigetragen, dass ich dieses Ziel erreichen konnte.

7. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

8. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen. Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Datum:..... Unterschrift: