

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
Sektion für Pädiatrische Stammzelltransplantation und Immunologie

Prof. Dr. Ingo Müller

Einfluss von Anti-Lymphozytenglobulin-Spiegeln auf das Outcome von Kindern nach Stammzelltransplantation

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Valentina Vogelsang
aus Hamburg

Hamburg 2020

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.10.2020

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: PD Dr. Claudia Langebrake

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Ingo Müller

Inhaltsverzeichnis

1	Artikel in gedruckter Originalversion	4
2	Darstellung der Publikation	13
2.1	Einleitung	13
2.2	Methoden	17
2.3	Ergebnisse	18
2.4	Diskussion	20
3	Abkürzungsverzeichnis	25
4	Literaturverzeichnis	26
5	Zusammenfassung	30
6	Summary	31
7	Erklärung des Eigenanteils an der Publikation	32
8	Danksagung	33
9	Lebenslauf	35
10	Eidesstattliche Versicherung	36



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp

Influence of anti-thymocyte globulin plasma levels on outcome parameters in stem cell transplanted children

Valentina Vogelsang^a, Anne Kruchen^a, Katharina Wustrau^a, Michael Spohn^b, Ingo Müller^{a,*}

^a University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Division of Pediatric Stem Cell Transplantation and Immunology, Germany

^b Research Institute Children's Cancer Center Hamburg and Bioinformatics Core, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany

ABSTRACT

Introduction: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is a curative option for malignant and non-malignant pediatric diseases. Serotherapy is often employed to avoid graft-versus-host disease (GvHD) on one hand and graft rejection on the other hand. Therapeutic drug monitoring is increasingly used to allow for more precise dosing especially in pediatric patients due to their specific pharmacological characteristics. Application of T-cell directed antibodies is not routinely monitored, but may benefit from more precise dosing regimens.

Methods: Two different preparations of rabbit anti-thymocyte globulin (rATG), Thymoglobuline® and ATG-F (Grafalon®), are frequently used to prevent GvHD in pediatric patients by *in vivo* T-cell depletion. Total rATG levels and active rATG levels were analyzed prospectively in pediatric patients undergoing HSCT. Clinical and laboratory outcome parameters were recorded.

Results: rATG levels were measured in 32 patients, 22 received thymoglobuline and 10 received ATG-F. The median total peak plasma level was 419.0 µg/ml for ATG-F and 60.4 µg/ml for thymoglobuline. For ATG-F, exposure could be predicted from the calculated dose more precisely than for thymoglobuline. Active peak plasma levels neither of ATG-F, nor of thymoglobuline correlated significantly with the number of lymphocytes prior to serotherapy. There was no significant difference in incidence of aGvHD, cGvHD, rejection, mixed chimerism or viral infections in the two cohorts. However, in our cohort, patients with high thymoglobuline exposure showed a compromised reconstitution of T cells.

Conclusions: ATG-F and thymoglobuline show different pharmacological and immunological impact in children, whose clinical significance needs to be investigated in larger cohorts.

1. Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a curative option for malignant and non-malignant diseases in children. An important factor of mortality and morbidity is the occurrence of acute and chronic graft-versus-host disease (GvHD) [1,2]. Various regimens of GvHD prophylaxis are employed in allogeneic HSCT and typically include anti-thymocyte globulin (ATG) by *in vivo* T-cell depletion [3]. Functionality of ATG is diverse, but the depletion of circulating host and donor T lymphocytes through complement and cell mediated toxicity, is essential to the immunomodulatory effect of ATG. Furthermore, interaction of B lymphocytes and dendritic cells as well as induction of regulatory T cells contribute to immunosuppression in the host [4]. Predominantly, three different antibody preparations are being used. Two

polyclonal rabbit ATG preparations, namely thymoglobuline® and Grafalon® (formerly "ATG-Fresenius", ATG-F), as well as the humanized monoclonal anti-CD52 antibody alemtuzumab. The source of thymoglobuline are rabbits, immunized with human thymocytes, while ATG-F is produced from rabbits immunized with Jurkat cells, a T-lymphoblastoid cell line [5]. Cumulative doses of 4.5–10 mg/kg bodyweight (BW) for thymoglobuline and of 15–60 mg/kg BW for ATG-F are typically applied [5–8]. It has been appreciated that dosing and total levels of ATG impact on risk of GvHD and graft failure, while assessment of active ATG levels await further analyses [9,10]. Moreover, timing of ATG administration is also subject to discussion as a "proximal" schedule (days –5 to 0) has been reported to provide a better prophylaxis from acute GvHD [11]. A "distal" scheduling is often applied to diminish risk of graft rejection [12]. Taken together, while several publications highlight

Abbreviations: ADV, Adenovirus; aPPL, Active peak plasma level; ATG, Anti-thymocyte globulin; AUC, Area under the curve; BKV, BK virus; BSA, Body surface area; BW, Bodyweight; CI, Confidence interval; CMV, Cytomegalovirus; CsA, Cyclosporine A; EBV, Epstein-Barr virus; GvHD, Graft-versus-host disease; HHV-6, Human herpesvirus 6; HSCT, Hematopoietic stem cell transplantation; MC, Mixed chimerism; MMF, Mycophenolate mofetil; MNC, Mononuclear cell count; MTX, Methotrexate; MWU, Mann-Whitney-U test; PCR, Polymerase chain reaction; WBC, White blood cell count

* Corresponding author at: University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Clinic for Pediatric Hematology and Oncology, Division of Pediatric Stem Cell transplantation and Immunology, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany.

E-mail address: i.mueller@uke.de (I. Müller).

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106371>

Received 12 December 2019; Received in revised form 26 February 2020; Accepted 2 March 2020
1567-5769/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

the clinical relevance of dosing and timing of serotherapy, drug exposure may not correlate with the absolute dose applied [13,14]. Low lymphocyte counts prior to transplantation and high BW seem to result in higher active ATG levels than expected [15]. Also, half-life of ATG seems to be variable, ranging from two to six days [16]. Especially high doses of ATG lead to an exposure for several weeks after transplantation, which could hamper immune reconstitution [14,16,17].

Most studies investigated the influence of ATG levels on outcome parameters for children receiving cord blood transplantation [10,12,13,18,19]. A recently published pediatric study by Oostenbrink et al. showed a correlation of ATG dose and plasma level for thymoglobuline, but not for ATG-F [20]. Patients with low doses of thymoglobuline had an elevated incidence of severe acute GvHD, but faster reconstitution of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells, compared to patients who received a higher dose. High doses of thymoglobuline showed a slower clearance compared to low doses [20]. Overall, there is only sparse data on the pharmacokinetics in children treated with ATG-F compared to thymoglobuline. Here, we report on children transplanted with either peripheral blood stem cells or bone marrow grafts analyzing both, total rabbit immunoglobulin and active ATG.

2. Methods

2.1. Study cohort and sample collection

We analyzed children younger than 18 years of age who received thymoglobuline or ATG-F as part of the conditioning regimen for their allogeneic hematopoietic stem cell transplantation at the University Hospital Hamburg-Eppendorf, Germany, prospectively. Children with HSCT performed between April 2016 and August 2017 were included. Patients or legal guardians gave their written consent in accordance with the declaration of Helsinki. Ethical approval was given by the local ethics committee (approval No. PV5445).

If patients rejected the first graft and a second HSCT was performed within the time period of the study, they are marked by "B" following the patient number. Data regarding the second transplantation were analyzed to identify influencing factors on the absolute and active ATG plasma levels. Blood samples were collected immediately before start of conditioning and daily until day seven after transplantation. Subsequently, a minimum of two samples per week was collected until week four post stem cell transplantation. Blood was collected in lithium heparin tubes, centrifuged for 10 min at 2,000 × g and the plasma was stored up to one year at −20 °C.

2.2. Conditioning regimen

Out of 32 patients receiving their first allo-HSCT, 30 were conditioned using fludarabine (150 mg/m²), treosulfan (36–42 g/m²) and thiopeta (10 mg/kg BW). One patient received cyclophosphamide and fludarabine, one received etoposide phosphate (60 mg/kg) and total body irradiation (12 Gy). All children were treated with additional GvHD prophylaxis including cyclosporine A (CsA), combined with either methotrexate (MTX) or mycophenolate mofetil (MMF).

2.3. Serotherapy

Serotherapy was performed using either ATG-F (Neovii Biotech GmbH, Gräfenläng, Germany) for patients with malignant diseases or thymoglobuline (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt, Germany) for patients with non-malignant diseases. The cumulative dose applied was 45 or 60 mg/kg for ATG-F, given on 3–4 consecutive days, with the last day of administration being day −2 or −1 prior to HSCT. Thymoglobuline was administered at a dose of 7–10 mg/kg, one patient received 4.5 mg/kg. Thymoglobuline was applied over 3–4 days, the last dose was given between day −4 and −2 before HSCT. Patients receiving their second HSCT during the study period

received 4.5 mg/kg thymoglobuline (n = 2) or 30 mg/kg ATG-F (n = 1), respectively.

2.4. Absolute ATG assay

Absolute ATG plasma levels were analyzed by sandwich ELISA according to Jol-van der Zijde et al. [21]. In brief, 96-well Nunc MaxiSorp™ plates (Thermo Fisher Scientific) were coated with 1:750 diluted AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (Jackson Immuno Research Laboratories) over night at 4 °C. Plates were blocked, washed and diluted patients' plasma as well as standard (ATG-F, Neovii Biotech or thymoglobuline, Sanofi-Aventis, both at 4–1,000 ng/ml) were applied. Plates were then incubated for 60 min at 37 °C. The detection antibody (Alkaline Phosphatase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (Jackson Immuno Research Laboratories)) was diluted 1:2,000.

2.5. Active ATG assay

ATG in plasma samples binding to Jurkat cells (T-ALL from 14-year-old boy; ATCC® TIB-152™) was considered to be active ATG. Active ATG levels were determined by flow cytometry in modification of the method used by Rebello and Hale [22]. 10⁵ Jurkat cells were incubated for 60 min at 37°C with 50 µl heat inactivated plasma samples or ATG standards (ATG-F or thymoglobuline). For detection of bound ATG, 0.5 mg/ml PE-labelled Goat Anti-Rabbit IgG (Southern Biotech) was incubated at 4°C for 30 min. The samples were analyzed using a FACSCanto™ (BD Biosciences). Active ATG levels were calculated from mean fluorescence intensity of the Jurkat population. All data was processed using FACSDiva™ software (BD Biosciences).

2.6. Outcome data

Graft-versus-host disease. Acute GvHD was categorized according to the IBMTR grading system [23]. Study data is based on overall GvHD grades. Chronic GvHD was assessed using the NIH criteria [24].

Viral infections. PCR-testing for cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), adenovirus (ADV), human herpesvirus 6 (HHV-6) and BK virus (BKV) in the patients' blood was performed on a weekly basis. All positive PCR results in blood within the first 100 days post-transplantation were documented.

Immune reconstitution. Reconstitution of lymphocyte subsets was analyzed by flow cytometry. Absolute cell counts from measurements around day 30 (+/- 5), 60 (+/- 6), 100 (+/- 9) and 180 (+/- 10) post-transplantation were collected.

Chimerism. Chimerism analysis was performed by fragment analysis of short tandem repeat variabilities on peripheral blood samples. Standard chimerism analyses were started after engraftment, and performed once per week until day 100 and once per month after day 100. A chimerism < 95% was categorized as mixed chimerism (MC).

2.7. Statistical analysis

Differences in continuous variables between the patient groups (e. g. patient characteristics, immune reconstitution) were analyzed using the Mann-Whitney-U test (MWU-test). Fisher's exact test or Chi-squared test were used for categorical variables. P-values for patient characteristics were 2-sided. Potentially influencing factors on ATG level were identified using univariate linear regression and were then tested in a multivariate linear regression model ("enter" method for inclusion of variables). Statistical analysis of patient survival, relapse and re-transplantation was carried out using the Kaplan-Meier method, including the log-rank test and Wilcoxon test. The significance level was defined as a p-value ≤ 0.05. All confidence intervals (CI) are based on a confidence level of 95%. AUC calculation was performed using the linear-log trapezoidal method. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 24 software (IBM). Kaplan-Meier

Table 1
Patient characteristics.

N = 32		ATG-F		Thymoglobuline		P value ^a
		N	%	N	%	
Patients, n		10		22		
Sex	Female	5	50	9	41	0.631
	Male	5	50	13	59	
Age (years)	Median (range)	13.7	(1.5–17.2)	5.3	(0.1–17.3)	< 0.05
Body weight (kg)	Median (range)	50.7	(11.8–66.0)	18.1	(6.1–46.0)	< 0.01
Body surface area (m ²)	Median (range)	1.53	(0.50–1.84)	0.73	(0.31–1.44)	< 0.01
Diagnosis	Malignant	10	100	0	0	< 0.01
	Non-malignant	0	0	22	100	
Conditioning	FLU/TREO/TT	9	90	21	95	0.262
	NMA	0	0	1	5	
	TBI/VP-16	1	10	0	0	
GVHD prophylaxis	CSA + MTX	10	100	13	59	< 0.05
	CSA + MMF	0	0	9	41	
Donor type	MUD	6	60	13	59	0.086
	MMUD	4	40	3	14	
	MRD	0	0	6	27	
Stem cell source	BM	7	70	19	86	0.272
	PBSC ^b	3	30	3	14	
CMV status	D-/R-	6	60	7	32	0.237
	D+/R-	2	20	4	18	
	D+/R+	2	20	11	50	
Follow-up (days)	Median (range)	591	(15–888)	532	(327–798)	0.703

BM, bone marrow; CMV, cytomegalovirus; CSA, cyclosporine A; D, donor; FLU, fludarabine; MMF, mycophenolate mofetil; MMUD, mismatched unrelated donor; MRD, matched related donor; MTX, methotrexate; MUD, matched unrelated donor; NMA, nonmyeloablative conditioning; PBSC, peripheral blood stem cells; R, recipient; TREO, treosulfan; TT, thiotepea; VP-16, etoposide phosphate.

^a P values were calculated using Mann-Whitney-*U* test (continuous variables) and Chi²-Test (categorical variables) with a significance level of 0.05.

^b One aliquot of apheresis product containing 50×10^6 CD3⁺ cells/kg BW was administered unmanipulated, the remaining product was T-cell depleted by immunomagnetic sorting.

curves and area under the curve (AUC) analysis were created using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

3. Results

3.1. Patient characteristics

The cohort included 32 patients, 22 received thymoglobuline and 10 received ATG-F. Patient characteristics are shown in Table 1. The median follow up was 532 days (range 15 to 888). The median age of children who received ATG-F was 13.7 years (range 1.5–17.2). The median age of children receiving thymoglobuline was 5.3 years (range 0.1–17.3). Stem cell source was bone marrow in 26 patients (81%), and T-cell adjusted peripheral blood stem cells in 6 patients (19%). A detailed list of all patients is provided in Supporting Information Table S1.

3.2. ATG plasma levels

Absolute and active ATG levels of all plasma samples, collected daily from before the start of conditioning until day seven and twice a week until four weeks post HSCT, were measured. In total, 560 samples were analyzed. The median total ATG-F peak plasma level was 419.0 µg/ml (range, 350.5–622.0) and 60.4 µg/ml (range, 43.8–85.9) for thymoglobuline, respectively. Active peak plasma levels (aPPL) were reached at the day following the last dose of ATG in all but 3 cases, where aPPL was reached at the last day of ATG administration already. aPPL reached median values of 77.9 µg/ml for ATG-F and 8.11 µg/ml for thymoglobuline. Active plasma levels of all patients are shown in Fig. 1A. The median fraction of active ATG as assessed by binding to Jurkat cells, was 17.1% (range, 11.0–25.9) for ATG-F and 14.6% (range, 1.6–25.7) for thymoglobuline (Table 2). Distribution of active ATG levels for both preparations (day of peak level, day of HSCT, day + 1 and day + 7) are shown in Fig. 1C.

Overall ATG exposure was assessed by the area under the curve

(AUC) in these plots for each patient with the aim to compare aPPL and AUC. The median AUC was 612.7 µg/ml × day for patients receiving ATG-F and 38.6 µg/ml × day for patients receiving thymoglobuline. To correlate high or low exposure to clinical outcome parameters, two groups were distinguished within each patient cohort. The allocation of patients into the two groups with either high or low ATG exposure was the same, whether we split the patients by median aPPL or median AUC. We therefore concluded that both, aPPL and AUC, can be used as a reasonable measure of ATG exposure. Patients receiving ATG-F with an aPPL ≤ 77.9 µg/ml and AUC ≤ 612.7 µg/ml × day were considered to have a low ATG exposure and patients exceeding these cutoff values were categorized as patients with high ATG exposure. For thymoglobuline the cutoff value was an aPPL ≤ 8.11 µg/ml and AUC ≤ 38.6 µg/ml × day, respectively.

Relation of cumulative ATG dose and aPPL are shown in Fig. 1B. The coefficient of variation of aPPL for patients receiving the standard dosing (45 mg/kg for ATG-F and 10 mg/kg for thymoglobuline) varied between the two preparations. In the ATG-F group the aPPL showed a coefficient of variation of 20%, while it was 49% in the thymoglobuline group. We investigated further potentially influencing factors including age, BW, BSA, lymphocyte count prior to conditioning, CD3⁺ T cell count in the graft, as well as white blood cell count (WBC) and mononuclear cell count (MNC) in the graft. The cumulative dose was identified as influencing factor (R^2 0.677, $p < 0.01$) for patients receiving ATG-F by univariate linear regression analysis. Subsequently, it was included in the multivariate linear regression model. Patient age at the time of HSCT was also added, since it showed a significant correlation with aPPL in the Spearman test (R^2 0.673, $p < 0.05$). The multivariate linear regression model including cumulative ATG-F dose and age had an adjusted R^2 of 0.702 and was significant in the analysis of variance ($p < 0.01$). As only significant coefficient ($p < 0.01$) ATG-F dose was identified, while age was not statistically significant (p value = 0.130). Within the thymoglobuline group none of the examined factors (dose, age, BW, BSA, lymphocyte count, WBC, MNC and CD3⁺ T cell count in the graft) influenced the aPPL significantly.

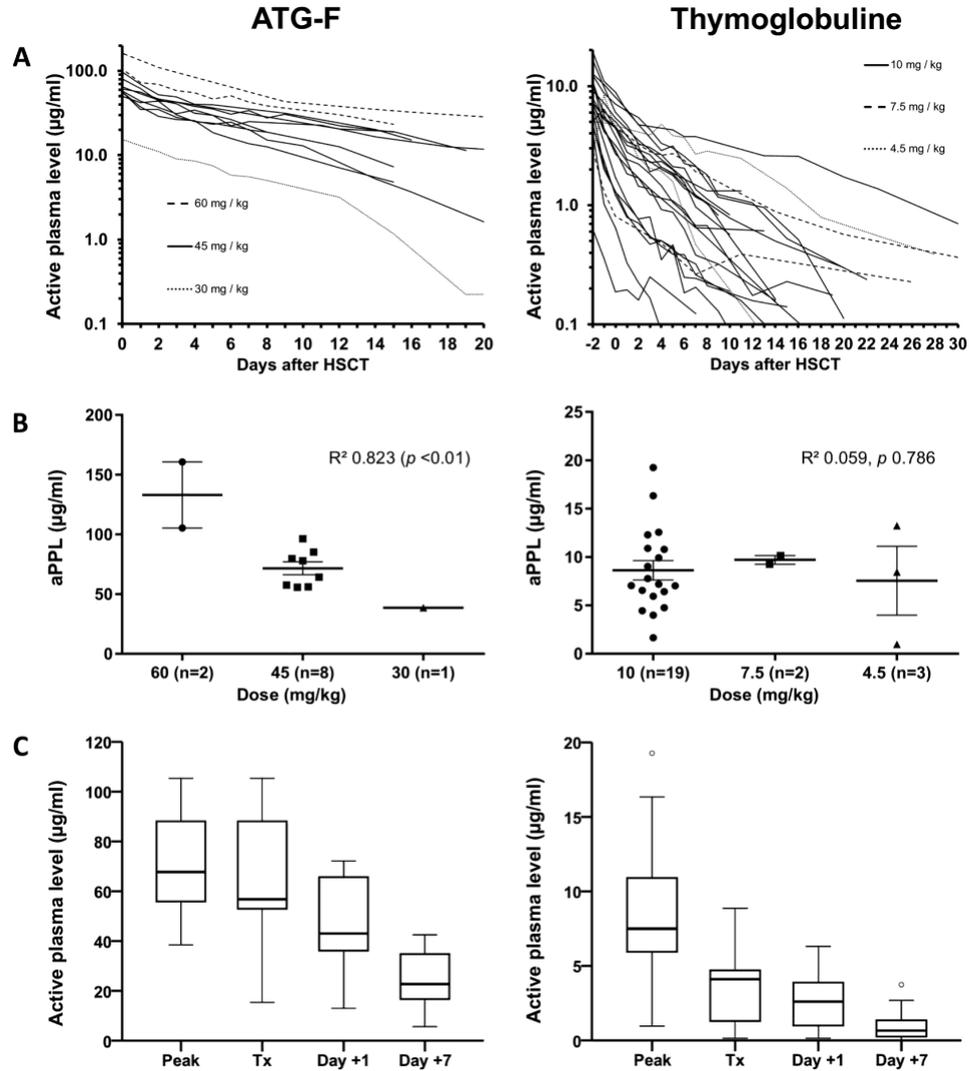


Fig. 1. ATG plasma levels. A Active ATG-F (n = 11) and thymoglobuline (n = 24) levels of all patients versus time. The legend shows ATG dosing in mg/kg bodyweight. Patient 1B, 18B and 24B are included in this figure. B Active peak plasma level versus cumulative ATG dose. The bold line indicates median aPPL. Whiskers indicate standard deviation. R² was calculated using the Pearson correlation. aPPL, active peak plasma level. C Active plasma levels of all patients receiving ATG-F and thymoglobuline. The peak plasma level and plasma level at the day of transplantation, day +1 and day +7 are shown in the boxplot. The boxes show interquartile range, whiskers indicate 95% CI and outliers are marked with a circle. Tx, day of transplantation.

3.3. GvHD

The incidence of acute GvHD within the first 100 days post transplantation is shown in Fig. 2A–D. Grade I–II aGvHD was seen in 10 patients (31%), i. e. in two patients with ATG-F and eight patients receiving thymoglobuline. There were three cases of acute GvHD (Grade III–IV) among the thymoglobuline group (9.4% of all patients), two patients with high and one with low ATG exposure. Grade III–IV acute GvHD did not occur in the ATG-F group. Chronic GvHD was seen in two patients (6.3%). One patient of the high exposure thymoglobuline group had a severe cGvHD, which was lethal on day 387 post-HSCT. One patient with low thymoglobuline exposure showed a mild cGvHD. None of the children in the ATG-F group suffered from chronic GvHD. The Pearson-Chi²-Test showed no correlation of ATG exposure and the occurrence of aGvHD or cGvHD. Considering the two different GvHD prophylaxis regimens that were used (CsA + MTX or CsA + MMF), we found that the incidence of

aGvHD and cGvHD was not significantly different whether MTX or MMF was added. Our data show no evidence that high ATG plasma levels have a stronger protective effect against occurrence of either acute or chronic GvHD within the first 100 days post-HSCT than lower levels in this limited cohort of patients.

3.4. Viral reactivations

During the first 100 days post HSCT, 49 viral infections or reactivations occurred in 32 patients. In 15 cases EBV and in 15 cases CMV was identified, each equaling 48.4% of all children who reached day 100 post-HSCT. Viral reactivations were not significantly unequally distributed between high and low ATG exposure groups (Fig. 2E–H). BKV was seen in 16.1%, HHV-6 in 29.0%, and ADV in 12.9%. ADV infection was only identified in children with high ATG exposure, which was confirmed as significant in the Pearson-Chi²-Test (p, 0.038).

Table 2
Serotherapy dosing, plasma level and engraftment.

Exposure	ATG-F (n = 11)				P value ^a	Thymoglobuline (n = 24)				P value ^a
	High		Low			High		Low		
	Median	Range	Median	Range		Median	Range	Median	Range	
Cumulative ATG dose (mg/kg)	45	45–60	45	45–45	0.177	10	4.5–10	10	10–10	0.347
Last ATG dose (day)	–1	–1 to –1	–1	–2 to –1		–3	–6 to –2	–3	–6 to –2	
Age (years)	16.9	13.0–17.2	7.7	1.5–16.5	< 0.05	5.8	0.1–17.3	4.7	0.9–16.4	0.713
Body weight (kg)	59.5	40.6–66.0	30.0	11.8–65.0	0.082	19.6	6.1–44.0	16.5	8.5–46.0	0.478
Body surface area (m ²)	1.70	1.34–1.84	1.07	0.50–1.72	0.082	0.77	0.31–1.35	0.69	0.41–1.44	0.478
Absolute PPL (µg/ml)	461.4	419.0–622.0	359.8	350.5–595.4	0.052	62.6	43.8–85.9	60.4	44.9–71.6	0.551
aPPL (µg/ml)	96.4	79.7–160.8	56.9	38.5–77.9	< 0.01	10.9	8.4–19.3	6.2	1.0–7.8	< 0.01
AUC (µg/ml)	758.9	677.3–1424.2	430.1	211.4–612.7	< 0.01	58.4	23.5–119.9	20.1	5.2–45.3	< 0.01
Active ATG (%)	20.4	17.9–25.9	15.5	11.0–17.1	< 0.01	18.7	14.0–25.7	9.9	1.6–15.5	< 0.01
Leukocyte engraftment (day) ^{b,c}	17	16–21	16	13–23	0.413	14	10–55	16	11–23	1.000
Thrombocyte engraftment (day) ^{b,d}	25	17–29	21	13–28	0.786	17	11–72	16	11–91	0.815
CD3 ⁺ cells > 500/µl (day)	137	60–321	111	32–167	0.556	36	17–91	24	18–105	0.349
CD4 ⁺ cells > 200/µl (day) ^b	257	77–371	147	102–247	0.486	86	20–214	27	18–137	< 0.05
Last dose of CsA (day) ^b	62	60–84	74	65–139	0.393	86	28–150	71	28–122	0.536

aPPL, active peak plasma level; AUC, area under the curve; BSA, body surface area; CsA, cyclosporine A; PPL, peak plasma level.

^a P values were calculated by Mann-Whitney-U test (significance level 0.05).

^b Patients no. 1B, 18B and 24B were not included for analysis of outcome parameters (n = 10 for ATG-F group and n = 22 for thymoglobuline group).

^c Leukocyte engraftment was defined as a leukocyte count > 1 × 10⁹/L.

^d t was defined as a thrombocyte count > 20 × 10⁹/L.

One patient with high ATG-F exposure died from a severe disseminated ADV infection at day 134 post-HSCT.

3.5. Engraftment and chimerism

The median time to leukocyte engraftment (> 10⁹/L) was 17.0 days (range, 13–23) in the ATG-F and 15.0 days (range, 10–55) in the thymoglobuline group, for platelet engraftment (> 20 × 10⁹/L) it was 23.0 (range, 13–29) and 17.0 (range, 11–91) days. There was no significant difference between high and low exposure groups of both ATG preparations (MWU-test), although the median time to engraftment took longer in children with high ATG exposure (Table 2). Time of CD3⁺ T cells exceeding 500/µl indicated a difference between the high and low exposure groups with accomplishment on day 137 vs. 111 days for ATG-F, and 36 vs. 24 days for patients treated with thymoglobuline (Table 2). The time period until CD4⁺ cells rose above 200/µl was 257 days in the high ATG-F group versus 147 days in the low ATG-F group. In the thymoglobuline group, it was 86 days (high group) versus 27 days (low group), with a p value of 0.035 (MWU-test). The day of the last dose of CsA given was not significantly different between high and low exposure group.

Donor chimerism was assessed at day 100 post HSCT. Two patients rejected the graft and were re-transplanted before day 100, one in the high and one in the low thymoglobuline exposure group. Additionally, there were two patients of the low exposure group with a mixed chimerism (MC) of 30.1% and 94.4%. None of the patients receiving ATG-F had a MC at day 100 or a graft rejection. However, it is noteworthy that these had been pre-treated with chemotherapy before conditioning. Pearson-Chi²-Test did not show a correlation of ATG exposure and mixed chimerism.

3.6. Immune reconstitution

To analyze possible differences in the immune reconstitution between the high and low exposure groups for ATG-F and thymoglobuline, four time points were assessed: day 30, 60, 100 and 180 post HSCT. Average cell counts for leukocytes, lymphocytes, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ and CD16/56⁺ cells were compared between the groups using MWU-test (Fig. 3). A decreased or delayed recovery of T cells was observed in patients with high, compared to low ATG exposure, as well as ATG-F compared to

thymoglobuline. B cells and NK cells were not affected consistently. At day 60 there were notable discrepancies of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cell counts between the high and low thymoglobuline group (p, < 0.05). At day 180 a significant difference in leukocyte counts was found between the two thymoglobuline groups. Comparing the two ATG preparations, the ATG-F group had significantly lower T cell counts at several time points. Comparing the high and low exposure group within the ATG-F group, the differences in cell counts were not significant as tested by MWU-test (n = 10). In summary, immune reconstitution of total leukocytes and in particular T cells is delayed by high ATG exposure. This holds true when comparing ATG-F in combination with CsA/MTX to thymoglobuline in combination with CsA/MMF.

3.7. Overall survival

Three patients died during the follow up period. Causes of death were acute respiratory syndrome (day 15), disseminated ADV infection (day 134), and chronic GvHD (day 387). Overall survival was 80.0% in the ATG-F and 95.5% in the thymoglobuline cohort. Survival of patients with high and low ATG exposure is shown in Fig. 4. The Kaplan-Meier curves did not differ significantly in the log-rank test (p, 0.609), high ATG exposure had a hazard ratio (HR) of 1.85 (CI 0.19 – 17.83). Relapse occurred once at day 330 within the high ATG-F exposure group.

4. Discussion

ATG has been frequently used for many years as part of GvHD prophylaxis in pediatric stem cell transplantation. Precise dosing regimen are crucial, but remain challenging due to highly variable pharmacokinetics in children⁵. Most pediatric studies described the effect of thymoglobuline serum levels on outcome parameters [9,13,17,21,25]. Several of these studies analyzed larger cohorts, however focused on exposure to one type of rATG. Our prospective study is limited in size and heterogenous diseases, however, we compared absolute and active plasma levels of pediatric patients receiving either ATG-F or thymoglobuline side-by-side to identify influencing factors on the respective plasma levels, and compared the outcome of patients with either high or low ATG exposure.

Thymoglobuline active plasma levels varied strikingly, while ATG-F active plasma levels were less variable. Similar findings were described

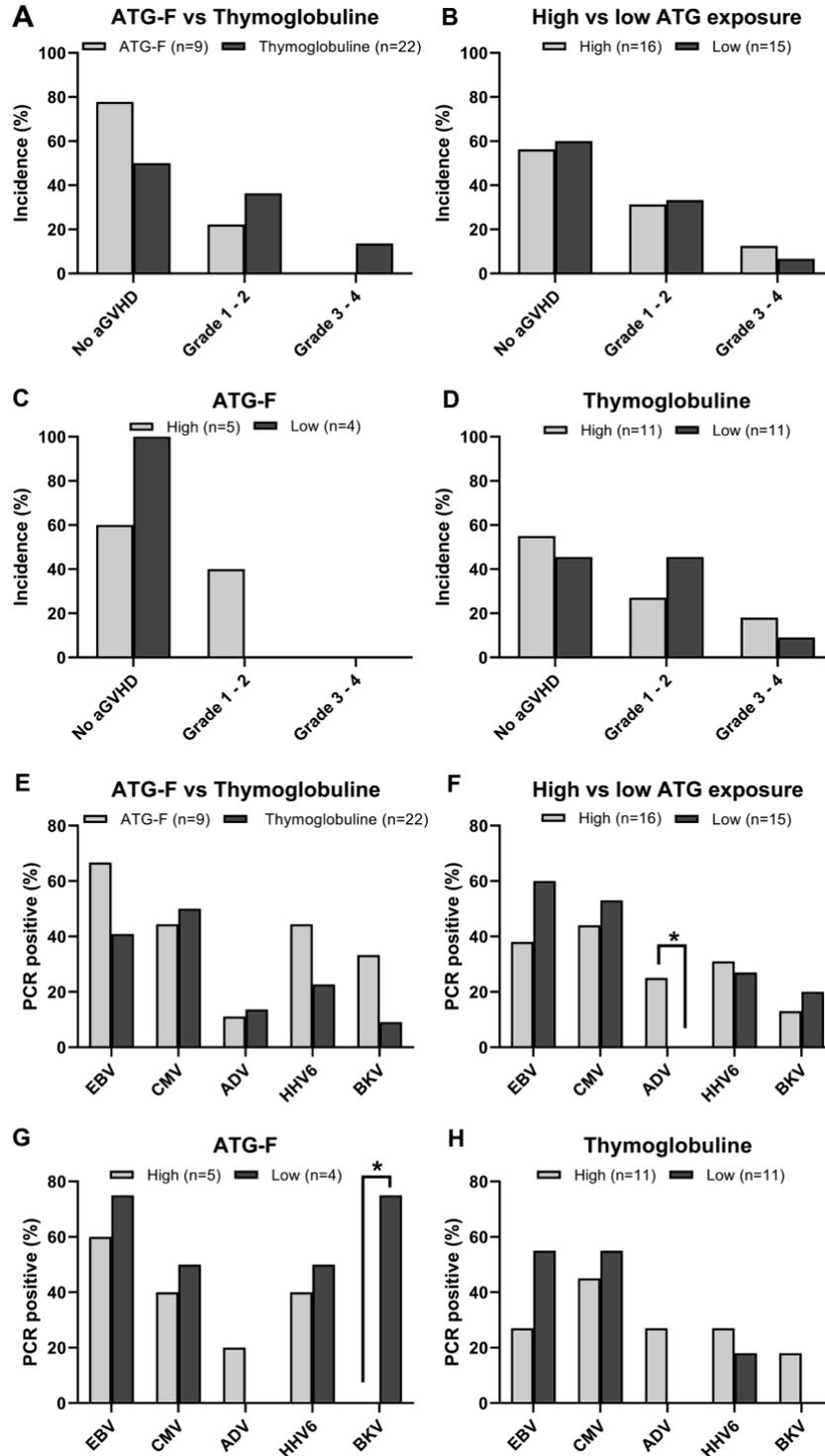


Fig. 2. aGVHD and viral reactivations. A-D Incidence of acute graft versus host disease during the first 100 days post-transplant. Overall grades of acute graft versus host disease are shown in this figure (Glucksberg grading). aGVHD, acute graft versus host disease. E-H Incidence of virus reactivations. The incidence of at least one positive PCR result during the first 100 days post-transplant is shown in this figure. Significant differences are marked with an asterisk ($p < 0.05$). P values were calculated using Pearson-Chi² test.

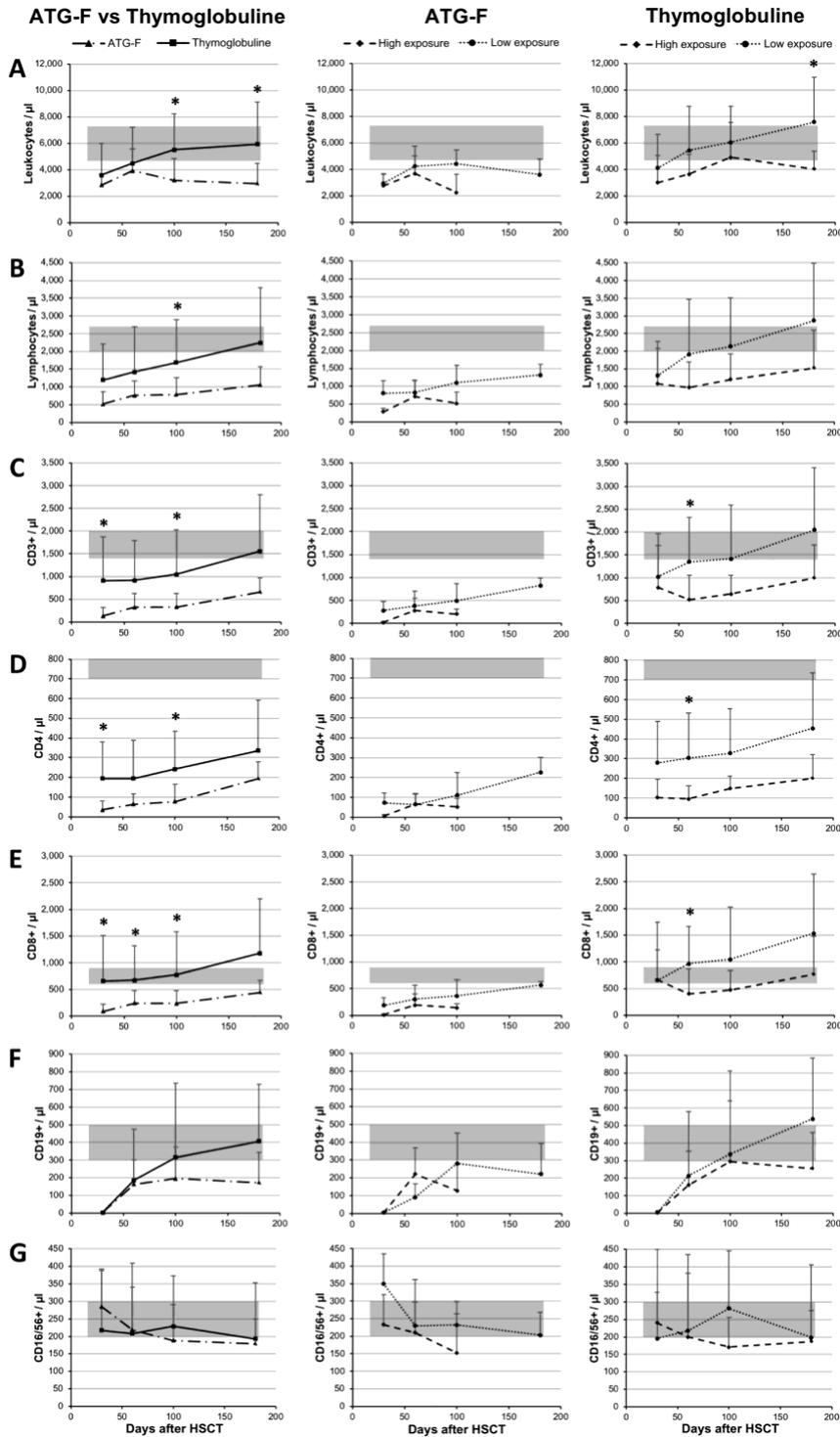


Fig. 3. Immune reconstitution. Reconstitution of leukocytes (A), lymphocytes (B), CD3 (C), CD4 (D), CD8 (E), CD19 (F) and CD16/56 (G) cells at day 30, 60, 100 and 180 post-transplant. The left column shows a comparison of patients receiving ATG-F and thymoglobuline. The center column shows a comparison of ATG-F and the right column of thymoglobuline patient groups with each high and low ATG exposure. The grey boxes indicate reference cell count values. Data points show average cell counts of patient groups. Error bars indicate the upper standard deviation of average. Asterisks mark significant differences in cell counts between the compared patient groups (p value < 0.05). Groups were compared using the Mann-Whitney- U test.

for a Dutch study cohort with allogeneic HSCT, with no correlation between lymphocyte count prior serotherapy and active ATG level at the day of transplantation [20]. Higher bodyweight and/or low baseline lymphocyte count were described to account for higher thymoglobuline exposure [15].

A low total ATG level at week four post HSCT was described as independent risk factor in the development of aGvHD grade II – IV [9], as well as low dosage of thymoglobuline vs. high dosage of thymoglobuline or ATG-F in the occurrence of aGvHD grade II – IV [20]. Yet, in our cohort, high active ATG plasma levels did not result in a protective

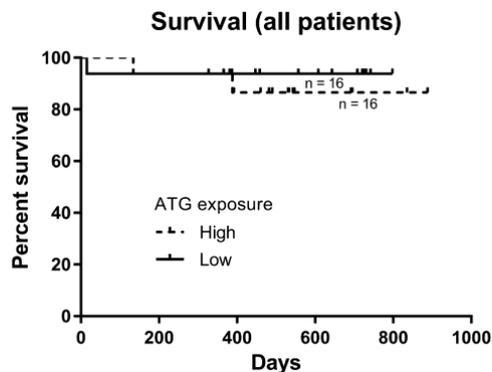


Fig. 4. Overall survival. Kaplan-Meier curve of overall survival of patients with high and low ATG exposure. All three deaths were categorized as non-relapse mortality. Censored objects are marked with vertical lines. Survival did not vary significantly between the two groups ($p = 0.61$) in log-rank test.

effect regarding acute or chronic GvHD. Acute GvHD had a cumulative incidence of 40%, with no significant difference between the high and low groups. The patient with severe chronic GvHD had a high active ATG exposure. High active ATG exposure did not prove to be beneficial in the prevention of GvHD in our cohort.

Immune reconstitution of leukocytes was hampered stronger after treatment with ATG-F compared to thymoglobuline. Reconstitution of T lymphocytes was most affected, and did not reach normal range values at six months after transplantation. Patients receiving ATG-F in our cohort all suffered from malignant diseases and immune reconstitution may also be delayed due to preceding chemotherapy or more frequent use of MTX. Especially reconstitution of $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD8^+$ cells is hampered in the high thymoglobuline group. These findings are consistent with other studies analyzing the immune reconstitution after thymoglobuline [12,13,25,20]. However, most other studies focused only on $CD4^+$ immune reconstitution in HSCT patients receiving cord blood units, while our patients received BM and PBSC grafts [12,13]. Despite discrepancies in underlying conditions and age between the two rATG groups, the significant differences in immune reconstitution of leukocytes, lymphocytes, $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD8^+$ cells suggest that children receiving ATG-F or experienced a high exposure of thymoglobuline may have a higher risk for viral infections and reactivations after HSCT. However, due to the different distribution of malignant and non-malignant disorders between the two ATG groups, a final conclusion cannot be drawn at this point. In patients with high rATG exposure, there was a trend to a higher incidence of ADV infection, once with fatal progression. Contrary to other studies we did not find an elevated risk of EBV reactivation associated with high ATG exposure [26].

Taken together, ATG-F and thymoglobuline in current dosing schedules showed distinct pharmacological and immunological differences in children, but at the same time high or low exposure to either ATG-F or thymoglobuline did not result in significant differences in outcome as survival, incidence of aGvHD, cGvHD, rejection, or mixed chimerism. Larger cohorts are needed to detect clinically significant differences and adjust dosing regimen individually. Active peak plasma level determination is feasible, and could be sufficient for prognostic assessment.

Funding

Funded by intramural resources of University Medical Center Hamburg-Eppendorf and by the Fördergemeinschaft Kinder-Krebszentrum Hamburg e. V.

CRedit authorship contribution statement

Valentina Vogelsang: Investigation, Data curation, Writing - original draft. **Anne Kruchen:** Methodology, Writing - original draft. **Katharina Wustrau:** Resources, Writing - review & editing. **Michael Spohn:** Data curation, Formal analysis. **Ingo Müller:** Conceptualization, Methodology, Supervision.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106371>.

References

- [1] D.A. Jacobsohn, Acute graft-versus-host disease in children, *Bone Marrow Transplant.* 41 (2) (2008) 215–221.
- [2] K. Baird, K. Cooke, K.R. Schultz, Chronic graft-versus-host disease (GVHD) in children, *Pediatr. Clin. North Am.* 57 (1) (2010) 297–322.
- [3] M. Remberger, J. Mattsson, O. Ringdén, Polyclonal anti-T-cell globulin as part of the preparative regimen for pediatric allogeneic stem-cell transplantation, *Pediatr. Transplant.* 5 (4) (2001) 285–292.
- [4] M. Mohty, Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond, *Leukemia* 21 (7) (2007) 1387–1394.
- [5] J. Storek, M. Mohty, J.J. Boelens, Rabbit anti-T-cell globulin in allogeneic hematopoietic cell transplantation, *Biol Blood Marrow Transplant.* 21 (6) (2015) 959–970.
- [6] A. Bacigalupo, T. Lamparelli, P. Bruzzi, et al., Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO), *Blood* 98 (10) (2001) 2942–2947.
- [7] J. Finke, H. Bertz, C. Schmoor, et al., Allogeneic bone marrow transplantation from unrelated donors using in vivo anti-T-cell globulin, *Br. J. Haematol.* 111 (1) (2000) 303–313.
- [8] C. Wolschke, T. Zabelina, F. Ayuk, et al., Effective prevention of GVHD using in vivo T-cell depletion with anti-lymphocyte globulin in HLA-identical or -mismatched sibling peripheral blood stem cell transplantation, *Bone Marrow Transplant.* 49 (1) (2014) 126–130.
- [9] S. Elmahdi, H. Muramatsu, A. Narita, et al., Correlation of rabbit antithymocyte globulin serum levels and clinical outcomes in children who received hematopoietic stem cell transplantation from an alternative donor, *Pediatr. Transplant.* 20 (1) (2016) 105–113.
- [10] C.A. Lindemans, L.C. Te Boome, R. Admiraal, et al., Sufficient Immunosuppression with Thymoglobulin Is Essential for a Successful Haplo-Myeloid Bridge in Haploidentical-Cord Blood Transplantation, *Biol Blood Marrow Transplant.* 21 (10) (2015) 1839–1845.
- [11] M. Remberger, B. Sundberg, Low serum levels of total rabbit-IgG is associated with acute graft-versus-host disease after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation: results from a prospective study, *Biol Blood Marrow Transplant.* 15 (8) (2009) 996–999.
- [12] C.A. Lindemans, R. Chiesa, P.J. Amrolia, et al., Impact of thymoglobulin prior to pediatric unrelated umbilical cord blood transplantation on immune reconstitution and clinical outcome, *Blood* 123 (1) (2014) 126–132.
- [13] R. Admiraal, C.A. Lindemans, C. van Kesteren, et al., Excellent T-cell reconstitution and survival depend on low ATG exposure after pediatric cord blood transplantation, *Blood* 128 (23) (2016) 2734–2741.
- [14] M. Remberger, B. Sundberg, Rabbit-immunoglobulin G levels in patients receiving thymoglobulin as part of conditioning before unrelated donor stem cell transplantation, *Haematologica* 90 (7) (2005) 931–938.
- [15] R. Admiraal, C. van Kesteren, C.M. Jol-van der Zijde, et al., Population pharmacokinetic modeling of Thymoglobulin(R) in children receiving allogeneic-hematopoietic cell transplantation: towards improved survival through individualized dosing, *Clin. Pharmacokinet.* 54 (4) (2015) 435–446.
- [16] M.G. Seidel, G. Fritsch, S. Matthes-Martin, et al., Antithymocyte globulin pharmacokinetics in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation, *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 27 (10) (2005) 532–536.
- [17] S.K. Call, K.A. Kasow, R. Barfield, et al., Total and active rabbit antithymocyte globulin (rATG;Thymoglobulin) pharmacokinetics in pediatric patients undergoing unrelated donor bone marrow transplantation, *Biol Blood Marrow Transplant.* 15 (2) (2009) 274–278.
- [18] C. de Koning, R. Admiraal, S. Nierkens, J.J. Boelens, Immune reconstitution and outcomes after conditioning with anti-thymocyte-globulin in unrelated cord blood transplantation; the good, the bad, and the ugly, *Stem Cell Investig.* 4 (2017) 38.
- [19] M. Remberger, M. Persson, J. Mattsson, B. Gustafsson, M. Uhlin, Effects of different serum-levels of ATG after unrelated donor umbilical cord blood transplantation, *Transpl. Immunol.* 27 (1) (2012) 59–62.
- [20] L.V.E. Oostenbrink, C.M. Jol-van der Zijde, K. Kielsen, et al., Differential Elimination of Anti-Thymocyte Globulin of Fresenius and Genzyme Impacts T-Cell Reconstitution After Hematopoietic Stem Cell Transplantation, *Front. Immunol.* 10 (2019) 315.
- [21] C.M. Jol-van der Zijde, R.G. Bredius, A.M. Jansen-Hoogendijk, et al., IgG antibodies

- to ATG early after pediatric hematopoietic SCT increase the risk of acute GVHD, *Bone Marrow Transplant*. 47 (3) (2012) 360–368.
- [22] P. Rebello, G. Hale, Pharmacokinetics of CAMPATH-1H: assay development and validation, *J. Immunol. Meth.* 260 (1–2) (2002) 285–302.
- [23] H.M. Schoemans, S.J. Lee, J.L. Ferrara, et al., EBMT-NIH-CIBMTR Task Force position statement on standardized terminology & guidance for graft-versus-host disease assessment, *Bone Marrow Transplant*. 53 (11) (2018) 1401–1415.
- [24] M.H. Jagasia, H.T. Greinix, M. Arora, et al., National institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. the 2014 diagnosis and staging working group report, *Biol Blood Marrow Transplant* 21 (3) (2015) 389–401 e381.
- [25] R. Admiraal, C. van Kesteren, C.M. Jol-van der Zijde, et al., Association between anti-thymocyte globulin exposure and CD4+ immune reconstitution in paediatric haemopoietic cell transplantation: a multicentre, retrospective pharmacodynamic cohort analysis, *Lancet Haematol.* 2 (5) (2015) e194–203.
- [26] J. Cohen, M. Gandhi, P. Naik, et al., Increased incidence of EBV-related disease following paediatric stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning, *Br. J. Haematol.* 129 (2) (2005) 229–239.

2 Darstellung der Publikation

2.1 Einleitung

Die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen stellt eine Therapieoption für eine Vielzahl pädiatrischer Erkrankungen dar. Neben der Behandlung von malignen (u. a. akute lymphatische Leukämie, akute myeloische Leukämie und myelodysplastisches Syndrom) ist die steigende Anzahl der nicht-malignen Erkrankungen, welche im Kindesalter mittels hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) behandelt werden können, zu erwähnen. Hierunter zählen eine vielfältige Reihe von Krankheitsbildern, wie u. a. erblich bedingte Hämoglobinopathien, primäre Immundefekte (z. B. schwerer kombinierter Immundefekt und familiäre Hämophagozytische Lymphohistiozytose), neurodegenerative Erkrankungen (z. B. Morbus Krabbe) und Speichererkrankungen (z. B. Mukopolysaccharidose Typ I). Seit der initialen Etablierung von Stammzelltransplantationen bei pädiatrischen Patienten in den 1970er Jahren hat sich die Effektivität und Sicherheit wesentlich verbessert¹. Dieser Erfolg konnte u. a. durch eine verbesserte Spenderauswahl und präzisere Konditionierungsbehandlungen sowie durch Verbesserungen in der supportiven Therapie und damit einhergehender Reduktion von Komplikationen, erreicht werden².

Ein relevantes Risiko einer Stammzelltransplantation ist das Auftreten einer Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion, auch Graft-versus-Host-Disease (GvHD). Diese Komplikation kann sowohl akut, als auch chronisch auftreten und ist für einen erheblichen Anteil der Morbidität und Mortalität bei stammzelltransplantierten Kindern verantwortlich^{3,4}. Die akute GvHD entsteht, nach heutigem Verständnis, auf dem Boden einer Zellschädigung durch die Konditionierungsbehandlung. Durch

Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen, vor allem im Gastrointestinaltrakt des Empfängers, wird eine Proliferation der Spender-T-Zellen und deren Aktivierung bewirkt. Anschließend kommt es zur Gewebszerstörung in mehreren Organen (vor allem Haut, Gastrointestinaltrakt und Leber) durch zytotoxische T-Zellen und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen⁵. Insbesondere die chronische GvHD geht mit einer beeinträchtigenden oder lebensbegrenzenden Langzeitschädigung mehrerer Organsysteme einher und führt durch die Behandlung mit z. B. Steroiden und einer verlangsamten Immunrekonstitution zu einer verlängerten Immunsuppression⁶. Die Inzidenz der schweren chronischen GvHD bei pädiatrischen HSCT-Patienten wird mit etwa 6-14% angegeben^{7,8}.

Maßnahmen zur Verhinderung des Auftretens der GvHD umfassen neben einer Optimierung der HLA-Typisierung, dem Einsatz medikamentöser Immunsuppressiva (z. B. Methotrexat, Cyclosporin A und Mycophenolat-Mofetil) auch eine *ex vivo* (Negativselektion) und *in vivo* T-Zell-Depletion im Rahmen einer Serotherapie. Die ersten Versuche, die Inzidenz von GvHD durch die Anwendung von prophylaktischem polyklonalem Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) beim Menschen zu reduzieren, wurden Ende der 1970er Jahre durchgeführt⁹. Seit ca. 20 Jahren kommt die Antikörpertherapie mit ATG in der pädiatrischen Stammzelltransplantation zum Einsatz, um die GvHD zu mindern. 1983 veröffentlichten Hale et al. ihre Arbeit über einen neuen monoklonalen Rattenantikörper gegen humane Lymphozyten, CAMPATH-1G¹⁰. Im Einsatz zur *in vivo* T-Zell Depletion beim Menschen verursachte CAMPATH-1G allerdings Probleme durch eine starke immunologische Reaktion auf Rattenproteine. Aus diesem Grund wurde CAMPATH-1G als erster Antikörper weltweit humanisiert und lieferte so, als CAMPATH-1H, die CD52-spezifische Basis für Alemtuzumab, das neben dem polyklonalen ATG verwendet wird¹¹. In den 1990er Jahren wurde zudem

der Anti-CD3-Antikörper OKT3 zur *in vivo* GvHD-Prophylaxe eingesetzt. Die Behandlung mit OKT3 hat sich jedoch, aufgrund einer erhöhten Freisetzung von Zytokinen, einer schlechteren prophylaktischen Wirkung bei der GvHD und einer reduzierten Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zu den polyklonalen Antikörpern ATG-Fresenius (ATG-F) und Thymoglobulin nicht durchgesetzt¹². Heutzutage ist ATG ein fest etablierter Bestandteil der GvHD-Prophylaxe, dessen positive Wirkung auf das Outcome von stammzelltransplantierten Patienten vielfach belegt ist^{13,14}.

In dieser Arbeit wird näher auf den Einsatz von ATG-Fresenius und Thymoglobulin bei pädiatrischen Patienten eingegangen. Der Wirkmechanismus der beiden polyklonalen Antikörper beruht auf zell- und komplementvermittelter Zytotoxizität, welche sich hauptsächlich gegen T-Lymphozyten richtet¹⁵. Aufgrund der Polyklonalität des therapeutischen IgG Antikörpers ist die immunmodulatorische Wirkung sehr facettenreich und hat Effekte auf weitere Zellreihen, wie B-Zellen, NK Zellen und dendritische Zellen¹⁵. Somit kann sowohl durch eine Reduktion der empfängereigenen T-Zellen vor der Transplantation die optimale Konditionierung unterstützt werden, als auch die GvHD durch die Elimination von Spenderlymphozyten nach erfolgter Transplantation abgemildert werden. Der Einsatz von ATG ist allerdings nicht unkritisch zu betrachten, da neben den häufig auftretenden akuten unerwünschten Arzneimittelwirkungen in vielen Studien gezeigt werden konnte, dass die Immunrekonstitution nach HSCT unter ATG langfristig verlangsamt abläuft¹⁶. Dies ist zum Teil der gewünschten T-Zelldepletion geschuldet, kann sowohl im adulten als auch im pädiatrischen Setting beobachtet werden und bezieht sich vor allem auf eine hohe ATG-Exposition¹⁷⁻¹⁹. Wie sich in der Vergangenheit zeigte, kann die gestörte Immunrekonstitution auch in einer gesteigerten Rate an Virusreaktivierungen resultieren¹⁸. Der für den Therapieerfolg von malignen Grunderkrankungen wichtige Graft-versus-Leukemia-Effekt, kann

zudem durch den Einsatz von ATG abgeschwächt werden. Eine medikamentöse Prophylaxe der GvHD sollte deshalb wohlbalanciert durchgeführt werden.

Aktuell werden unter Therapie mit ATG Medikamentenspiegelmessungen nicht regelhaft durchgeführt, sondern eine Standarddosierung von 15-60 mg/kg für ATG-F und 4,5-10 mg/kg für Thymoglobulin appliziert²⁰⁻²³. Für einige Medikamente, welche im Rahmen der pädiatrischen HSCT eingesetzt werden, ist ein Therapeutisches Drug Monitoring standardisiert und fest etablierter Bestandteil der Patientenversorgung. Hier zu nennen sind besonders die regelhaft durchgeführten Spiegelmessungen der beiden Small Molecule Medikamente Busulfan und Cyclosporin A^{24,25}. Auch für ATG gibt es Studien, die gezeigt haben, dass das Therapeutische Drug Monitoring und individualisierte Dosierungsregime das Outcome im pädiatrischen HSCT Setting verbessern können²⁶.

Therapeutische Antikörper weisen aufgrund ihres großen Molekulargewichts und der ausgeprägten Hydrophilie einige Besonderheiten in ihrer Pharmakokinetik auf. Die Elimination erfolgt vorrangig über zielantigen-vermittelte Elimination und nur zum geringen Teil durch renale Elimination nach Proteolyse der Antikörper im retikuloendothelialen System und in verschiedenen Organen²⁷. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein Teil der Patienten neutralisierende Antikörper gegen ATG zu bilden scheint²⁸. Es existieren einige Studien, die zeigen, dass die Pharmakokinetik von ATG in pädiatrischen Patienten komplex zu sein scheint, zudem variieren die angegebenen Halbwertszeiten stark^{17,18,29,30}. Eine Vorhersagbarkeit über die Höhe der Medikamentenspiegel sowie potentielle Auswirkungen auf das Outcome nach pädiatrischer HSCT ist somit nicht in zufriedenstellendem Maße gegeben. Aus diesem Grund ist die ideale Dosierung des prophylaktisch gegebenen Antikörpers Gegenstand aktueller Forschung, zu welcher wir mit unserer Studie beitragen möchten.

2.2 Methoden

Um den Einfluss von ATG-Spiegeln bei pädiatrischen Patienten auf das Outcome nach Stammzelltransplantation zu untersuchen, wurden sowohl ATG-Spiegel gemessen als auch klinische Daten gesammelt. In die Studie eingeschlossen wurden 32 Patienten, die zwischen dem 26.04.2016 und dem 29.08.2017 in der Sektion für Pädiatrische Stammzelltransplantation und Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf eine allogene Stammzelltransplantation und im Rahmen der Konditionierungsbehandlung ATG erhalten haben.

Die Probengewinnung erfolgte im Rahmen von Routineblutentnahmen und wurde vom Stationspersonal der Transplantationsstationen (Station C6B und K1c) und der pädiatrischen hämato- und onkologischen Station (Station Kinder 1) durchgeführt. Die Proben wurden bis zum Einfrieren maximal drei Tage im Kühlschrank der Stationen gelagert. Sofern möglich wurden die Proben ab der stationären Aufnahme (meistens Tag -7 vor der Transplantation) bis eine Woche nach der Transplantation täglich und anschließend bis ungefähr Tag +30 zwei- bis dreimal wöchentlich abgenommen. Ab dem Zeitpunkt der Entlassung wurden keine Proben mehr gesammelt. Bei einem Teil der Patienten führten wir vor der ersten Gabe von ATG, sowie am Tag der Transplantation eine durchflusszytometrische Bestimmung der Lymphozytenzahl mithilfe von Mikropartikelbeads im Patientenblut durch.

Zur quantitativen Bestimmung des Antithymozytenglobulins im Patientenplasma wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Der Sandwich-ELISA ist ein enzymatisches Immunadsorptionsverfahren und zum quantitativen Nachweis von löslichen Antigenen in Proben geeignet. Alle Proben eines Patienten wurden auf derselben Platte gemessen. Die Standardreihe wurde jeweils mit ATG-F oder Thymoglobulin hergestellt. Die Triplikate wurden zur Verbesserung der Ergebnisse durchgeführt und in der Auswertung gemittelt. Anschließend wurde anhand der

Absorptionswerte die Konzentration des ATG mithilfe der Standardreihe und der Verdünnung errechnet.

Um die ideale Zelllinie für die durchflusszytometrischen Messungen der aktiven ATG-Spiegel zu identifizieren wurden zwei humane T-Zell Leukämielinien hinsichtlich ihrer Oberflächenantigene verglichen. Als am besten geeignet zur Bestimmung der aktiven ATG-Spiegel zeigte sich die Jurkat-Zelllinie. Zur aktiven Spiegelbestimmung wurden die Jurkat-Zellen zunächst mit den Patientenplasmaproben und anschließend mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert. Mittels Durchflusszytometer wurde für jede Patientenprobe, sowie für eine Standardreihe, die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Jurkat-Population gemessen, anhand derer sich die ATG-Konzentration der einzelnen Proben errechnen ließ.

Die umfassende Erhebung klinischer Daten erfolgte aus den elektronischen Patientenakten der Studienkohorte. Es wurden neben den Basisdaten auch Daten zu u. a. Konditionierungsbehandlung, Dosierung und Timing der Serotherapie, GvHD-Prophylaxe, Art und Beschaffenheit des Transplantats, Auftreten von Virusreaktivierungen und GvHD, Immunrekonstitution, Fieber, Chimärismus, Retransplantation, Erkrankungsrückfall und Tod gesammelt.

2.3 Ergebnisse

Im Rahmen der Auswertung wurden die beiden ATG-Gruppen (ATG-F und Thymoglobulin) weitestgehend getrennt voneinander betrachtet. Zunächst wurde der mediane aktive Spitzenspiegel für beide Gruppen bestimmt und die Patienten in jeweils zwei Gruppen mit hoher und niedriger ATG-Exposition eingeteilt. Die Berechnung der AUC (area under the curve) zur Erfassung der totalen Exposition

gegenüber ATG erfolgte mittels einem log-linearen Modells. Die Einteilung der Patientengruppen mit hoher und niedriger Exposition war nach medianem Spitzenspiegel oder nach medianer AUC identisch.

Anschließend wurden die Gruppen hinsichtlich der Verteilung der Patientencharakteristika und Unterschieden in der Konditionierungsbehandlung untersucht. Das mediane Alter der Thymoglobulingruppe lag bei 5,3 Jahren, während die ATG-F Gruppe im Median 13,7 Jahre alt war. Dies ist durch die sich unterscheidenden Diagnosen der beiden Gruppen erklärbar. Alle Kinder mit nicht-malignen Erkrankungen erhielten Thymoglobulin, wohingegen ATG-F ausschließlich bei Patienten mit malignen Erkrankungen eingesetzt wurde. Hinsichtlich Konditionierungsbehandlung, Spendertyp, Stammzellquelle und Zytomegalievirus (CMV) Status unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant voneinander. Mit der Intention, Daten für ein besser steuerbares Dosierungsregime zu erheben, werteten wir mögliche Einflussfaktoren auf die aktiven ATG-Spiegel aus. In der Thymoglobulingruppe ließen sich keine relevanten Einflussfaktoren auf die Höhe des ATG-Spiegels finden, während die aktiven ATG-F-Spiegel signifikant mit der applizierten Dosis korrelierten. In der Studienkohorte wurde ein ATG-Dosierungsschema verwendet, das allein auf dem Körpergewicht der Patienten basierte. Nach Abzug einer hypothetischen Gesamtdosis, basierend auf der Körperoberfläche von der tatsächlich verabreichten Dosis, konnten wir das Ausmaß der „Überdosierung“ bei Kindern mit einem Körpergewicht >30 kg quantifizieren. Dieser Unterschied in der Dosierung war in der ATG-F-Gruppe mit hoher ATG-F-Exposition deutlich höher (504,0 mg im Vergleich zu -20,5 mg, p-Wert 0,177). Die auf Basis des Körpergewichts berechnete ATG-F-Dosis überstieg bei allen Kindern mit einem Körpergewicht >30 kg die hypothetische Dosis basierend auf der Körperoberfläche. Im Gegensatz dazu gab es keinen Unterschied in der

„Überdosierung“ zwischen den Thymoglobulingruppen mit hoher oder niedriger ATG-Exposition.

Hinsichtlich des Outcomes erfolgte eine detaillierte Auswertung der Daten zu Virusreaktivierungen, Immunrekonstitution, Auftreten von GvHD, Chimärismus an Tag 100, Erkrankungsrückfall und Tod. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Inzidenz von akuter und chronischer GvHD zwischen den Patienten mit hoher und niedriger Exposition. Im Auftreten von Virusreaktivierungen zeigte sich kein Unterschied bei der Betrachtung von Epstein-Barr-Virus (EBV), CMV, Humanem Herpesvirus 6 (HHV6) und BK-Virus (BKV). Im Vergleich der beiden Expositionsgruppen zeigte sich ein signifikant häufigeres Auftreten von Infektionen mit dem Adenovirus (ADV) in der Gruppe mit hoher ATG-Exposition (25% vs. 0%). Deutliche Unterschiede zeigten sich in Bezug auf die Immunrekonstitution, sowohl zwischen der hohen und niedrigen ATG-Gruppe, als auch zwischen Patienten, die ATG-F und Thymoglobulin erhalten haben. Die ATG-F Gruppe zeigte eine schlechtere Rekonstitution der Leukozyten, Lymphozyten, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ und CD19⁺ Zellen. Innerhalb der Thymoglobulingruppe war zudem eine verminderte Rekonstitution der Leukozyten, Lymphozyten, CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen bei Patienten mit höherer ATG-Exposition zu beobachten. Die NK Zellen erholten sich in allen Patientengruppen mit ähnlicher Dynamik. Hinsichtlich Erkrankungsrückfall, gemischtem Chimärismus, Retransplantation und Tod konnten wir keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen.

2.4 Diskussion

Wir analysierten die absoluten und aktiven Plasmaspiegel von 32 pädiatrischen Patienten, die entweder ATG-F oder Thymoglobulin erhielten. Ziel unserer

prospektiv angelegten Studie war es, anhand der regelmäßig durchgeführten Spiegelmessungen herauszufinden, wie sich unterschiedliche Dosierungen und Patientenfaktoren auf die Spitzenspiegel und die AUC auswirken, um den Umgang mit ATG sicherer zu machen. Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit ist der Vergleich des Outcomes von pädiatrischen Patienten mit hoher und niedriger ATG-Exposition.

Zunächst beobachteten wir Unterschiede in der Vorhersagbarkeit der Spitzenspiegel von ATG-F und Thymoglobulin. Während sich für ATG-F eine Korrelation zwischen applizierter Dosis und Plasmaspiegeln zeigte, präsentierte sich die Streubreite der Thymoglobulinspiegel deutlich höher. Insbesondere konnten wir keinen Zusammenhang zwischen der Lymphozytenzahl vor Konditionierung und dem Spitzenspiegel feststellen. Diese Beobachtung ist vereinbar mit den Ergebnissen einer Studie von Oostenbrink et al., welche eine Kohorte von 58 pädiatrischen HSCT Patienten untersucht hat, die eine ähnlich große Variabilität der Thymoglobulinspiegel zeigte³⁰. Eine andere Studie beschrieb wiederum, dass ein höheres Körpergewicht und/oder eine niedrige Baseline-Lymphozytenzahl für eine höhere Thymoglobulin-Exposition verantwortlich sein können³¹. In unserer ATG-F Gruppe hatten die Patienten mit hoher ATG-Exposition ein signifikant höheres Körpergewicht als die Patienten mit niedriger Exposition, was uns zu der Überlegung führte, ob das Körpergewicht alleine eine ausreichende Berechnungsgrundlage für die Dosis darstellt. Unsere Bestimmung des Grades der „Überdosierung“ mit ATG liefert Hinweise darauf, dass Kinder mit >30 kg Körpergewicht eine Population darstellen, die bei der Anwendung von ATG-F ein Überdosierungsrisiko hat. Interessanterweise konnte für die Studienkohorte gezeigt werden, dass sich Patienten mit hoher ATG-Exposition sowohl mittels Bestimmung der AUC, als auch mittels Bestimmung des Spitzenspiegels identifizieren lassen.

Diese Erkenntnis bietet den Vorteil, dass Risikogruppen möglicherweise schon vor der letzten Gabe von ATG bestimmt werden können und eine Anpassung der verbleibenden Dosen somit möglich wäre.

ATG wird seit vielen Jahren erfolgreich zur GvHD Prophylaxe bei Kindern eingesetzt, wobei die protektiven Effekte von vielen Studien belegt wurden^{20,22,32}. Einige kürzlich veröffentlichte Studien liefern Hinweise darauf, dass die prophylaktische Wirkung von ATG-F und Thymoglobulin auch bei niedrigeren Dosen erzielt werden kann^{30,33,34}. In unserer limitierten Studienkohorte zeigte sich eine Inzidenz der akuten GvHD von 44% in der Gruppe mit hoher Exposition vs. 40% in der Gruppe mit niedriger Exposition. Auch für die chronische GvHD zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Ein Patient verstarb an einer schweren chronischen GvHD, hatte aber eine vergleichsweise hohe ATG-Exposition. Unsere Studienergebnisse deuten somit darauf hin, dass besonders hohe ATG-Spiegel keinen zusätzlichen Benefit in der Prophylaxe der GvHD bringen. Bei der Untersuchung der Immunrestitution der Patienten zeigten sich für die Thymoglobulingruppe drastische Unterschiede in der Reconstitution von CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, welche statistisch signifikant waren. Die Zellzahlen der Patienten mit hoher ATG-Exposition waren deutlich geringer als die der anderen Gruppe. Auch die Erholung der Leukozyten- und Lymphozyten-Population zeigte sich im Laufe der Beobachtungszeitpunkte (Tag 30, 60, 100 und 180 nach HSCT) zunehmend divergierend. Zwar ist dieser Effekt konsistent mit vielen bereits publizierten Studien^{16,29,30,35}, jedoch liefert diese Arbeit wichtige Daten, da sich die meisten existierenden pädiatrischen Veröffentlichungen überwiegend auf die Untersuchung von Patienten beschränken, die Nabelschnurblut erhalten haben^{29,35}. Unter den Patienten, die ATG-F erhielten, zeigte sich eine geringfügig verhaltenere Immunrestitution bei den Patienten mit hoher Exposition. Da diese

Patientengruppe allerdings sehr klein ist (n=11), können daraus keine zuverlässigen Schlüsse gezogen werden. In der Gesamtheit der untersuchten Fälle zeigte sich eine erheblich kompromittierte Immunrekonstitution der Leukozyten, Lymphozyten, CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen der ATG-F-Gruppe im Vergleich zur Thymoglobulingruppe. Wohlwissend, dass die beiden Patientengruppen stark voneinander abweichende Grundvoraussetzungen (Alter und Grunderkrankung) für die Immunrekonstitution haben, stellt sich die Frage, ob Patienten, die ATG-F erhalten, ein schlechteres Outcome hinsichtlich Infektionen und viralen Reaktivierungen haben. ADV Infektionen traten in der Patientenkohorte signifikant häufiger bei Patienten mit hoher ATG-Exposition auf. Ein Patient verstarb an einer schweren ADV Infektion. In Bezug auf EBV und CMV Reaktivierungen konnten wir weder Unterschiede zwischen ATG-F und Thymoglobulin, noch hoher und niedriger ATG-Exposition feststellen. Dies steht im Kontrast zu anderen Studien, die ein erhöhtes EBV Risiko bei Patienten mit hohen ATG Spiegeln beobachtet haben^{18,36}. Unter Berücksichtigung unserer Studienergebnisse kann die Sicherheit der ATG-F- und Thymoglobulindosierung noch verbessert werden. Die unzureichende Vorhersagbarkeit der Plasmaspiegel, insbesondere bei Thymoglobulin-Patienten, verbunden mit den sich klinisch manifestierenden Einschränkungen in der Immunrekonstitution durch hohe ATG-Exposition, rufen nach einer Präzisierung der Dosierung von ATG. Betrachtet man die negativen Auswirkungen einer hohen ATG-Exposition im Outcome (z. B. verzögerte Immunrekonstitution) und bedenkt, dass wir keine geringere Inzidenz von akuter und chronischer GvHD bei den Patienten mit hohen ATG-Plasmaspiegeln gefunden haben, sollten die ATG-Dosierungsschemata überdacht werden. Die Studienergebnisse legen die Einführung eines individuellen Dosierungsschemas nahe, das nicht nur auf dem Körpergewicht, sondern auch auf der Anzahl der Lymphozyten, dem Alter und der

Körperoberfläche basiert, um die Patienten vor einer Überexposition zu schützen. Ebenso könnten die bereits etablierten aktiven Plasmaspiegelmessungen ein sinnvoller fester Bestandteil der Patientenversorgung im pädiatrischen HSCT Setting werden. Weitere Untersuchungen von ATG-Spiegeln in größeren Patientenkohorten, sowie die Erarbeitung eines robusten pharmakokinetischen Modells für ATG-F und Thymoglobulin können den Weg für eine individualisierte Patientenversorgung in Zukunft weiter ebnen und zur Sicherheit im Umgang mit ATG beitragen.

3 Abkürzungsverzeichnis

ADV	Adenovirus
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
ATG-F	ATG-Fresenius
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
BKV	BK-Virus
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Zytomegalievirus
EBV	Epstein-Barr-Virus
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
HHV6	Humanes Herpesvirus 6
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation

4 Literaturverzeichnis

1. Miano M, Labopin M, Hartmann O, et al. Haematopoietic stem cell transplantation trends in children over the last three decades: a survey by the paediatric diseases working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2007;39(2):89-99.
2. Storb R. HSCT: Historical Perspective. In: th, Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kroger N, eds. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham (CH)2019:3-9.
3. Jacobsohn DA. Acute graft-versus-host disease in children. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41(2):215-221.
4. Baird K, Cooke K, Schultz KR. Chronic graft-versus-host disease (GVHD) in children. *Pediatr Clin North Am*. 2010;57(1):297-322.
5. Teshima T, Reddy P, Zeiser R. Acute Graft-versus-Host Disease: Novel Biological Insights. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(1):11-16.
6. Weitz M, Strahm B, Meerpohl JJ, Schmidt M, Bassler D. Extracorporeal photopheresis versus alternative treatment for chronic graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation in paediatric patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015(12):CD009898.
7. Gassas A, Sung L, Saunders EF, Doyle J. Graft-versus-leukemia effect in hematopoietic stem cell transplantation for pediatric acute lymphoblastic leukemia: significantly lower relapse rate in unrelated transplantations. *Bone Marrow Transplantation*. 2007;40(10):951-955.
8. Peters C, Schrappe M, Stackelberg Av, et al. Stem-Cell Transplantation in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: A Prospective International Multicenter Trial Comparing Sibling Donors With Matched Unrelated Donors—The ALL-SCT-BFM-2003 Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(11):1265-1274.
9. Weiden PL, Doney K, Storb R, Thomas ED. Antihuman thymocyte globulin for prophylaxis of graft-versus-host disease. A randomized trial in patients with leukemia treated with HLA-identical sibling marrow grafts. *Transplantation*. 1979;27(4):227-230.
10. Hale G, Bright S, Chumbley G, et al. Removal of T cells from bone marrow for transplantation: a monoclonal antilymphocyte antibody that fixes human complement. *Blood*. 1983;62(4):873-882.
11. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*. 1988;332(6162):323-327.
12. Remberger M, Svahn BM, Hentschke P, Lofgren C, Ringden O. Effect on cytokine release and graft-versus-host disease of different anti-T cell antibodies during conditioning for unrelated haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1999;24(8):823-830.

13. Kröger N, Solano C, Wolschke C, et al. Antilymphocyte Globulin for Prevention of Chronic Graft-versus-Host Disease. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(1):43-53.
14. Ayuk F, Diyachenko G, Zabelina T, et al. Anti-thymocyte globulin overcomes the negative impact of HLA mismatching in transplantation from unrelated donors. *Exp Hematol*. 2008;36(8):1047-1054.
15. Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia*. 2007;21(7):1387-1394.
16. Admiraal R, van Kesteren C, Jol-van der Zijde CM, et al. Association between anti-thymocyte globulin exposure and CD4+ immune reconstitution in paediatric haemopoietic cell transplantation: a multicentre, retrospective pharmacodynamic cohort analysis. *Lancet Haematol*. 2015;2(5):e194-203.
17. Remberger M, Sundberg B. Rabbit-immunoglobulin G levels in patients receiving thymoglobulin as part of conditioning before unrelated donor stem cell transplantation. *Haematologica*. 2005;90(7):931-938.
18. Seidel MG, Fritsch G, Matthes-Martin S, et al. Antithymocyte globulin pharmacokinetics in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2005;27(10):532-536.
19. Call SK, Kasow KA, Barfield R, et al. Total and active rabbit antithymocyte globulin (rATG;Thymoglobulin) pharmacokinetics in pediatric patients undergoing unrelated donor bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(2):274-278.
20. Storek J, Mohty M, Boelens JJ. Rabbit anti-T cell globulin in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(6):959-970.
21. Bacigalupo A, Lamparelli T, Bruzzi P, et al. Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). *Blood*. 2001;98(10):2942-2947.
22. Finke J, Bertz H, Schmoor C, et al. Allogeneic bone marrow transplantation from unrelated donors using in vivo anti-T-cell globulin. *Br J Haematol*. 2000;111(1):303-313.
23. Gagelmann N, Ayuk F, Wolschke C, Kroger N. Comparison of Different Rabbit Anti-Thymocyte Globulin Formulations in Allogeneic Stem Cell Transplantation: Systematic Literature Review and Network Meta-Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(12):2184-2191.
24. Tesfaye H, Branova R, Klapkova E, et al. The importance of therapeutic drug monitoring (TDM) for parenteral busulfan dosing in conditioning regimen for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children. *Annals of transplantation*. 2014;19:214-224.

25. Punnett A, Sung L, Price V, et al. Achievement of target cyclosporine concentrations as a predictor of severe acute graft versus host disease in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation and receiving cyclosporine and methotrexate prophylaxis. *Ther Drug Monit.* 2007;29(6):750-757.
26. Admiraal R, Boelens JJ. Individualized conditioning regimes in cord blood transplantation: Towards improved and predictable safety and efficacy. *Expert Opin Biol Ther.* 2016;16(6):801-813.
27. Wohlrab J. Pharmakokinetische Besonderheiten von therapeutischen Antikörpern. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft.* 2015;13(6):530-534.
28. Jol-van der Zijde CM, Bredius RG, Jansen-Hoogendijk AM, et al. IgG antibodies to ATG early after pediatric hematopoietic SCT increase the risk of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47(3):360-368.
29. Admiraal R, Lindemans CA, van Kesteren C, et al. Excellent T-cell reconstitution and survival depend on low ATG exposure after pediatric cord blood transplantation. *Blood.* 2016;128(23):2734-2741.
30. Oostenbrink LVE, Jol-van der Zijde CM, Kielsen K, et al. Differential Elimination of Anti-Thymocyte Globulin of Fresenius and Genzyme Impacts T-Cell Reconstitution After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol.* 2019;10:315.
31. Admiraal R, van Kesteren C, Jol-van der Zijde CM, et al. Population pharmacokinetic modeling of Thymoglobulin((R)) in children receiving allogeneic-hematopoietic cell transplantation: towards improved survival through individualized dosing. *Clin Pharmacokinet.* 2015;54(4):435-446.
32. Remberger M, Mattsson J, Ringdén O. Polyclonal anti-T-cell globulin as part of the preparative regimen for pediatric allogeneic stem-cell transplantation. *Pediatr Transplant.* 2001;5(4):285-292.
33. Locatelli F, Bernardo ME, Bertaina A, et al. Efficacy of two different doses of rabbit anti-T-lymphocyte globulin to prevent graft-versus-host disease in children with haematological malignancies transplanted from an unrelated donor: a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(8):1126-1136.
34. Binkert L, Medinger M, Halter JP, et al. Lower dose anti-thymocyte globulin for GvHD prophylaxis results in improved survival after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50(10):1331-1336.
35. Lindemans CA, Chiesa R, Amrolia PJ, et al. Impact of thymoglobulin prior to pediatric unrelated umbilical cord blood transplantation on immune reconstitution and clinical outcome. *Blood.* 2014;123(1):126-132.
36. Willemsen L, Jol-van der Zijde CM, Admiraal R, et al. Impact of serotherapy on immune reconstitution and survival outcomes after stem cell

transplantations in children: thymoglobulin versus alemtuzumab. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(3):473-482.

5 Zusammenfassung

Eine prognoselimitierende Komplikation der HSCT ist das Auftreten einer akuten oder chronischen GvHD. Die Dosierung von ATG-F und Thymoglobulin zur GvHD-Prophylaxe im Rahmen der pädiatrischen HSCT ist Gegenstand aktueller Forschung. Eine hohe ATG-Exposition wird als unabhängiger Risikofaktor für virale Reaktivierungen und eine verzögerte Immunrekonstitution beschrieben. Ziel dieser Arbeit ist es, mögliche Einflussfaktoren auf ATG-Plasmaspiegel zu analysieren und diese mit verschiedenen Outcome-Parametern zu korrelieren.

In Rahmen dieser Arbeit wurden die totalen und aktiven ATG-Plasmaspiegel von 32 pädiatrischen HSCT-Patienten analysiert. Die Thymoglobulinspiegel korrelierten, im Gegensatz zu den ATG-F Spiegel, nicht mit der verabreichten Dosis. Patienten mit einem Körpergewicht >30 kg hatten ein Risiko für eine besonders hohe ATG-F-Exposition. Zwischen den Patienten mit hoher oder niedriger ATG-Exposition war kein Unterschied im Auftreten einer akuten oder chronischen GvHD nachweisbar. Hinsichtlich Virusinfektionen und Reaktivierungen gab es einen Trend zu mehr Adenovirus-Infektionen bei Patienten mit hoher ATG-Exposition. In dieser Studienkohorte ließ sich kein Effekt der ATG-Exposition auf das Auftreten von CMV- und EBV-Reaktivierungen beobachten. Die Immunrekonstitution wurde bei Patienten, die ATG-F erhielten, stärker gehemmt als bei Patienten, die Thymoglobulin erhielten. Außerdem hatte eine hohe ATG-Exposition einen darstellbaren negativen Effekt auf die Rekonstitution verschiedener Zelllinien.

Trotz der relativ kleinen Studienkohorte liefert diese Arbeit wichtige Daten zur Pharmakokinetik von ATG bei Kindern und über mögliche Auswirkungen einer vergleichsweise hohen ATG-Exposition auf das Outcome. Die Untersuchung größerer Studienkohorten ist erforderlich, um den Weg für einen effizienteren Umgang mit ATG und verbesserte Dosierungsschemata zu ebnen.

6 Summary

One of the major problems in HSCT is the occurrence of acute and chronic GvHD. The precise dosing of ATG-F and Thymoglobuline for GvHD prophylaxis in the pediatric HSCT setting has been subject of current research. High exposure to ATG is described to be an independent risk factor for viral reactivations and delayed immune reconstitution. The aim of this work was to analyze influencing factors on ATG plasma levels and to correlate these with several outcome parameters.

In this study, total and active ATG plasma levels of 32 pediatric HSCT patients were analyzed. Thymoglobuline levels presented in an unpredictable manner and did not correlate with the dose applied. ATG-F levels correlated with the applied dose. Patients with a body weight >30 kg were at risk for high ATG-exposure, particularly for ATG-F. There was no difference of occurrence of acute or chronic GvHD detectable between the patients with high or low ATG-exposure. Regarding viral infections and reactivation there was a trend towards more adenovirus infections in patients with high ATG-exposure. There was no effect of ATG-exposure on CMV and EBV reactivation in this study cohort. Immune reconstitution was hampered stronger in patients receiving ATG-F compared to thymoglobuline. Additionally, high ATG-exposure had a noticeable negative effect on reconstitution of several cell-lines.

Despite the relatively small study cohort, this study presents important data on pharmacokinetics of ATG in children and possible effects on outcome in patients with comparatively high ATG-exposure. Larger study cohorts are needed to pave the way for a safer use of ATG and improved dosing regimens.

7 Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Die Idee zur Durchführung und Konzeption der Studie erfolgte durch den Doktorvater, Prof. Dr. Ingo Müller. Die Methoden zur Durchführung der absoluten und aktiven ATG-Spiegelmessungen wurden von der Doktorandin in enger Zusammenarbeit mit Dr. Anne Kruchen, der naturwissenschaftlichen Betreuerin, etabliert. Sämtliche Blutentnahmen wurden vom Stationspersonal der Transplantationsstationen (C6B und K1c) und der weiterbetreuenden Stationen durchgeführt. Die Doktorandin war zuständig für die regelmäßige Einsammlung, Lagerung und Verarbeitung der Proben. Sämtliche absoluten und aktiven Spiegelmessungen wurden von der Doktorandin durchgeführt, dies beinhaltete zudem die Pflege der dazu benötigten Zelllinien. Nach Bereitstellung der klinischen Daten durch Katharina Wustrau, der medizinischen Betreuerin, trug die Doktorandin die Daten selbstständig zusammen. Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte weitestgehend durch die Doktorandin. Zur Durchführung einer Multivariatanalyse wurde Michael Spohn aus dem Bereich der Bioinformatik hinzugezogen.

Alle Abbildungen und Tabellen wurden von der Doktorandin erstellt. Der erste Entwurf für das Manuskript wurde von der Doktorandin vorgelegt und anschließend von Prof. Dr. Ingo Müller, Dr. Anne Kruchen und Katharina Wustrau korrigiert und überarbeitet. Im Reviewverfahren trugen alle Autoren zur Überarbeitung des Manuskripts bei.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mir die Durchführung meiner Promotion ermöglichten und mich auf meinem Weg unterstützt haben:

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Ingo Müller für die Bereitstellung der interessanten Promotions-Thematik und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe forschen zu dürfen.

Frau Dr. Anne Kruchen danke ich sehr für die geduldige Einarbeitung im Labor, stets engagierte Betreuung und großzügige Hilfsbereitschaft auf praktischer und theoretischer Ebene.

Katharina Wustrau danke ich herzlich für die freundschaftliche Unterstützung und Beratung in allen klinischen Fragen und der Bereitstellung der Patientendaten.

Für die Bereitstellung von Material und Räumlichkeiten im Rahmen der Laborarbeiten möchte ich dem Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum Hamburg und der Fördergemeinschaft Kinderkrebs-Zentrum Hamburg e. V. in besonderem Maße danken.

Der gesamten AG Müller, in unterschiedlicher personeller Zusammensetzung, danke ich für die durchweg angenehme Arbeitsatmosphäre und die freundschaftliche Aufnahme, welche ich zu Beginn meiner Arbeit erfahren habe.

Für die Durchführung aller erforderlichen Blutentnahmen danke ich den Stationsschwestern und medizinischen Fachangestellten aller beteiligten Stationen.

Privatdozentin Dr. Claudia Langebrake danke ich für interessante Erläuterungen zur Pharmakokinetik von Antikörpern und fachliche Anleitung zur Berechnung der Medikamentenexposition.

Michael Spohn danke ich für die Unterstützung, in Form von Erstellung weitergehender statistischer Analysen, im Rahmen des Review-Verfahrens.

Außerdem möchte ich Privatdozent Dr. Kai Lehmborg und Dr. Matthias Bleeke für anregende Gespräche, die Beantwortung vieler klinischer Fragen und ihre Hilfsbereitschaft danken.

Große Dankbarkeit empfinde ich gegenüber meiner Familie, die mich mein ganzes Studium lang vollumfänglich unterstützt hat, sowie einigen guten Freunden, die mich auf dem Weg zur Fertigstellung meiner Promotion durch fachlichen und außerfachlichen Austausch stets begleitet und ermutigt haben.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe 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.

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 einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: