

Adoptive Immuntherapie mit Spenderlymphozyten bei Chimären

Hans-Jochem Kolb, Christoph Schmid, Xiao Chen, Anja Woiciechowski, Marie Roskrow, Martin Weber, Wolfgang Guenther, Georg Ledderose, Michael Schleuning.

Klinische Kooperationsgruppe Hämatopoetische Zelltransplantation,
Abt. Medizinische Klinik III, Klinikum der Universität München – Grosshadern, und
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München, Deutschland.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Hans-Jochem Kolb

Hämatopoetische Zelltransplantation – José-Carreras-Transplantationseinheit

Klinikum der Universität München – Grosshadern

Marchioninstr. 15

81377 München, Deutschland

Tel. + 49 89 70954240/4241; Fax. + 49 89 7095 4242

e-mail: Kolb@med3.med.uni-muenchen.de

Schlüsselwörter: Stammzellentransplantation – Chimärismus – Transplantationstoleranz – adoptive Immuntherapie – Spenderlymphozytentransfusion

Zusammenfassung

Die allogene Stammzellentransplantation hat eine gut definierte Indikation bei der Behandlung hämatologischer Malignome. Die günstige Wirkung einer allogenen Knochenmarkstransplantation auf das Immunsystem ist seit langem bekannt, aber erst vor kurzem wurden Methoden zur Trennung des Graft-versus-Leukämie-(GVL)-Effekts von der Graft-versus-Host-Reaktion (GVHD) zu trennen. Tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass Lymphozyten aus dem Knochenmark des Spenders transfundiert werden können, ohne dass eine schwere GVHD auftritt, wenn vorher ein stabiler Chimärismus und eine Toleranz hergestellt wurden [1], [2]. Erste klinische Studien dazu wurden bei Patienten mit rezidivierender chronischer myeloischer Leukämie durchgeführt [3]. Bei diesen Patienten wurden molekulare Vollremissionen induziert, die ohne weitere Erhaltungstherapie bestehen bleiben. Diese Ergebnisse wurden auch in größeren multizentrischen Studien in Europa [4] und den USA [5] bestätigt. Die besten Ergebnisse wurden bei chronischer myeloischer Leukämie (CML) erzielt. Wiederholte Erfolge wurden auch bei rezidivierender akuter myeloischer Leukämie (AML), myelodysplastischen Syndromen (MDS) und multiplem Myelom (MMY) angegeben. Bei akuter lymphatischer Leukämie (ALL) wurde nur selten ein Ansprechen erreicht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen tierexperimenteller Untersuchungen wurde beim Menschen eine GVHD beobachtet, die jedoch schwächer war, als sie bei Transplantaten ohne Immunsuppression zu erwarten ist. Zweitens wurde bei Patienten mit rezidivierender CML eine Myelosuppression beobachtet. Bei CML konnte die Inzidenz einer GVHD gesenkt werden, indem CD8-positive T-Zellen aus dem Spenderlymphozytenkonzentrat entfernt wurden [6]. Eine andere Möglichkeit ist es, nur eine geringe Anzahl von T-Lymphozyten zu transfundieren und bei ausbleibendem Ansprechen die Zahl der Spenderlymphozyten zu erhöhen [7], [8]. Die Ergebnisse bei rezidivierender AML konnten verbessert werden, indem mit niedrig dosiertem Cytosinarabinosid, GM-CSF und G-CSF mobilisierte Blutzellen anstatt nur Lymphozyten verwendet wurden [9], [10]. Bei MMY ist die Ansprechrate höher als bei AML, aber die Remissionen sind bei den meisten Patienten von begrenzter Dauer [11], [12]. Es wurden verschiedene Protokolle zur Durchführung einer vorbeugenden Spenderlymphozytentransfusion (donor lymphocyte infusion, DLI) bei Patienten mit hohem Rezidivrisiko nach der Transplantation erstellt. Weiterhin bestehende Probleme sind die Vermeidung einer chronischen GVHD und das Umgehen von Immun-Escape-Mechanismen der Leukämie.

Der Erfolg mit Spenderlymphozyten bei der Behandlung der rezidivierenden Leukämie hat die Perspektiven der hämatopoetischen Stammzellentransplantation verändert [13]. Die antileukämischen Wirkungen einer myeloablativen Vorbehandlung wurden durch eine adoptive Immuntherapie mit Zellen des Knochenmarkspenders ersetzt (Abb. 1). Früher stand im Zentrum der Behandlung der Leukämie und anderer maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, mit der maximal tolerierten Dosis einer Strahlen- und Chemotherapie die Leukämie so weit wie möglich zu zerstören und den Patienten dann durch eine Knochenmarkstransplantation vor dem Versagen der Hämatopoese zu retten. Heute sind die Nachteile und Risiken einer hoch dosierten Chemotherapie und Radiotherapie gut bekannt und die vorbereitende Behandlung dient dazu, einen Chimärismus herzustellen und eine Transplantationstoleranz zu entwickeln, die als Plattform für die Immuntherapie dienen. In diesem Fall ist keine myeloablativ Vorbehandlung mehr notwendig. Bei der Knochenmarkstransplantation wegen maligner Erkrankungen besteht ein therapeutisches Dilemma. Die Hauptkomplikationen bei der allogenen Stammzellentransplantation sind akute Graft-versus-Host-Reaktion (GVHD) und ihre Folgeerscheinungen. Die effektivste Methode zur Vermeidung einer GVHD ist die Entfernung der T-Lymphozyten aus dem Transplantat [14], [15]. Jedoch führt die Entfernung der T-Zellen aus dem Transplantat auch dazu, dass der größte Teil der antileukämischen Wirkung einer allogenen Transplantation verloren geht [16]. Durch spätere Zugabe geringer Mengen an T-Zellen zu dem von diesen vorher entleerten Transplantat konnte das Rezidivrisiko nicht erfolgreich gesenkt werden, ohne eine GVHD zu induzieren. Jedoch führte die Transfusion von Spenderlymphozyten in stabile Hundechimären nicht zum Auftreten einer GVHD [17]. Daher untersuchten wir in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts Spenderlymphozytentransfusionen bei Hundechimären, um den Chimärismus und die Transferimmunität vom Spender zum Empfänger zu beeinflussen [1].

Die Tierexperimente ermutigten uns, Spenderlymphozyten zur Behandlung eines CML-Rezidivs bei drei Patienten zu verwenden [3]. Die Ergebnisse wurde durch mehrere einzelne Zentren bestätigt [18], [19], [20], [21], [22], [23], [24] und das Spektrum der Graft-versus-Leukämie-(GVL)-Aktivität wurde in multizentrischen Analysen bestimmt [4], [5]. Mit nativen Spenderlymphozyten und sensibilisierten T-Zellen, T-Zelllinien und Klonen gelang es, Virusinfektionen erfolgreich zu behandeln [25],[26], [27]. Ähnliche Strategien wurden untersucht, um Minor-Histokompatibilitätsantigene mit eingeschränkter Gewebeexpression zur Behandlung der Leukämie zu verwenden [28], [29], [30]. Im Folgenden besprechen wir den aktuellen Stand der adoptiven Immuntherapie mit Spenderzellen und versuchen einen Ausblick auf die Zukunft der Immuntherapie zu geben.

Aus tierexperimentellen Untersuchungen abgeleitete Prinzipien

Es liegen viele Studien zur Leukämie bei Mäusen vor, die sich jedoch in verschiedener Hinsicht von der Leukämie beim Menschen unterscheidet. Eine spontane AKR-Leukämie bei bakterienfreien Mäusen wurde mit einigem Erfolg mit Knochenmark und einer niedrigen Dosis von Lymphozyten von Spendern ohne kompatiblen Major Histokompatibilitätskomplex (MHC) behandelt [31].

Das Konzept, dass bei Leukämie Minor-Histokompatibilitätsantigene mit Expression auf hämatopoetischen Wirtszellen exprimiert werden, war der Ausgangspunkt für die Herstellung gemischter DLA-identischer Chimären bei Hunden. Die Umwandlung eines gemischten Chimärismus in einen vollständigen Chimärismus diente als Modell für eine Graft-versus-Leukämie-Reaktion. Gemischte Chimären wurden hergestellt, indem eine geringe Anzahl von Knochenmarkszellen transfundiert wurde, aus denen die T-Zellen durch Behandlung mit absorbiertem Antithymozytenglobulin (ATG) entfernt worden waren, um eine GVHD zu verhüten. Diese Tiere waren stabile gemischte Chimären. Die Transfusion von Spenderlymphozyten an Tag 1 und 2 oder an Tag 21 und 22 nach der

Knochenmarktransplantation induzierte eine letale GVHD. Dagegen führte eine Transfusion an Tag 61 und 62 nicht zum Auftreten einer GVHD und die Tiere überlebten. Diese Tiere waren vor der Transfusion gemischte lymphatische und myeloische Chimären und wurden danach zu vollständigen Chimären [1]. Die Spender wurden gegen Tetanustoxoid geimpft und die Empfänger entwickelten nach der DLI Antikörpertiter, die nach Auffrischinjektionen über 3 Jahre bestehen blieben. Transfundierte und nicht transfundierte Tiere wurden gegen Diphtherietoxoid als neuem Antigen geimpft. Bei den transfundierten Hunde entwickelten sich signifikant höhere Antikörpertiter als bei den nicht transfundierten Hunden.

Bei Mäusen reichte eine Verschiebung der Spenderlymphozytentransfusion um 3 Wochen aus, um eine GVHD zu verhindern [2].

Der hohe Stellenwert einer Verschiebung der Spenderlymphozytentransfusion ist deutlich, aber die Ursache der GVHD ist unklar. Ein möglicher Grund könnte der durch die Vorbehandlung mit Bestrahlung und Chemotherapie freigesetzte "Zytokinsturm" sein [32], der sich nach 3 Wochen beziehungsweise 2 Monaten möglicherweise gelegt hat. Eine andere Möglichkeit ist es, dass eine periphere Toleranz hergestellt wird, die von den Spender-T-Zellen in Zusammenarbeit mit dendritischen Zellen des Empfängers aufrecht erhalten wird. Für diesen zuletzt genannten Mechanismus spricht die Beobachtung, dass das Entfernen der Spenderlymphozyten in der Chimäre vor der Transfusion der Spenderlymphozyten den Empfänger für eine vehemente GVHD anfällig macht (Menzel, H 1996, unveröffentlicht) [33]. Wie lang die notwendige zeitliche Verschiebung beim Menschen ist, ist nicht bekannt. Sie könnte je nach Alter und vorausgegangener Chemo- und Radiotherapie unterschiedlich lang sein.

Ergebnisse mit Spenderlymphozytentransfusionen bei CML

Drei Patienten mit rezidivierender CML nach einer allogenen Knochenmarktransplantation wurden 1988 und 1989 mit einer DLI behandelt [34]; diese Patienten befinden sich immer noch in hämatologischer und molekularer Remission der CML. Bei zwei Patienten entwickelte sich eine akute GVHD, die immunsuppressiv behandelt werden musste, und bei einem Patienten trat eine chronische GVHD auf. Die immunsuppressive Behandlung konnte bei beiden Patienten wieder abgesetzt werden. Bei einem vierten Patienten, der 1991 behandelt wurde, wurde eine schwere Myelosuppression beobachtet. Zwei Monate nach den Spenderlymphozytentransfusionen trat eine Panzytopenie auf, die nicht auf eine Behandlung mit G-CSF ansprach, dagegen war eine Transfusion von Spenderknochenmark erfolgreich (Abb. 2).

Die Analyse der Ergebnisse der in der European Cooperative Group of Blood and Marrow Transplantation (EBMT) zusammengeschlossenen Zentren ergab, dass die besten Ergebnisse bei zytogenetischen und hämatologischen Rezidiven einer CML erzielt wurden, während mäßige Ergebnisse bei CML in der transformierten Phase, bei akuter myeloischer Leukämie (AML) und myelodysplastischen Syndromen (MDS) und schlechte Ergebnisse bei akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) beobachtet wurden [4]. Einzelne Patienten mit chronischen myeloproliferativen Erkrankungen wie Polycythaemia vera und Myelofibrose [35] sprachen ebenfalls auf eine DLI an. Sowohl das Fehlen eines Chimärismus [36] als auch das Vorliegen einer GVHD zum Zeitpunkt der DLI waren im Hinblick auf das Ansprechen ungünstige Faktoren. Bei CML korrelierte der Graft-versus-Leukämie-(GVL)-Effekt mit dem Schweregrad der GVHD, aber auch Patienten ohne GVHD sprachen auf die Behandlung an. Jedoch war der GVL-Effekt auf Patienten mit einem allogenen Spender beschränkt, während er bei Patienten mit einem eineiigen Zwilling als Spender ausblieb. Die Zeit bis zur molekularen Remission betrug nach einer einmaligen Transfusion bei den meisten Patienten 4 bis 6 Monate, bei einigen Patienten wurden noch nach über 1 Jahr molekulare Remissionen erzielt (Abb. 3). Die Antigenpräsentation ließ sich durch eine Behandlung mit Zytokinen

verbessern. Insbesondere die Kombination Interferon- α (IFN- α) und GM-CSF verbesserte die Expression von Antigenen der HLA-Klasse I und II, CD 40 und CD 80 [37]. Vorläufige Ergebnisse bestätigen die günstige Wirkung von GM-CSF und IFN- α bei Patienten mit rezidivierter CML, die nicht auf Spenderlymphozyten angesprochen hatten.

Komplikationen der Behandlung waren eine GVHD und eine Myelosuppression. Eine Myelosuppression war bei einem hämatologischen Rückfall häufiger als bei einem zytogenetischen Rückfall. Die Verwendung mobilisierter Blutzellen, die Stammzellen anstatt von Lymphozyten enthalten, konnte eine Myelosuppression nicht verhindern [38]. Eine Prävention der GVHD konnte mit zwei Methoden erreicht werden, ohne dass der GVL-Effekt nachließ: Entfernung CD8-positiver T-Zellen aus der Transfusion [6], [39] und Verwendung steigender Dosen bei der DLI [7], wobei mit einer Dosis von 2×10^6 Lymphozyten pro kg begonnen wurde. Das Dosissteigerungsschema senkte das GVHD-Risiko signifikant [8]. Die Patienten sollten mit einer quantitativen RT-PCR regelmäßig auf bcr/abl überwacht werden. Bei einem persistierenden oder wiederholt positiven Ergebnis wird empfohlen, mit einer Anfangsdosis von 2×10^6 Lymphozyten pro kg von nicht verwandten Spendern und mit 1×10^7 Lymphozyten pro kg von einem HLA-identischen Spender zu beginnen. Die Dosen werden gesteigert, wenn innerhalb von 30 Tagen keine GVHD auftritt oder innerhalb von 60 Tagen kein Ansprechen auf die Behandlung erkennbar ist.

Ergebnisse von Spenderlymphozytentransfusionen bei AML und MDS

Die Ergebnisse der EBMT zeigten, dass das Ansprechen bei Patienten mit rezidivierter AML nach einer DLI schlechter ist. Bei Patienten ohne Chemotherapie-induzierte Remission betrug die Ansprechrate 25% und nur sehr wenige Patienten überlebten länger als 4 Jahre. In einer zweiten Analyse von 120 Patienten mit AML und MDS, die an die EBMT berichtet wurde, konnten bei 45 (41,6%) von 108 evaluierbaren Patienten Vollremissionen erzielt werden, darunter auch bei Patienten, die mit einer Chemotherapie und DLI behandelt wurden [10]. Die mediane Remissionsdauer betrug 304 Tage. Bei 18 Patienten hielten die Remissionen über 1 Jahr lang an, bei einzelnen Patienten sogar über 5 Jahre lang. Die Gesamtüberlebenszeit war bei den Patienten, die auf die Therapie angesprochen hatten, länger. Es konnten drei Risikofaktoren identifiziert werden, die mit einem schlechten Ansprechen auf die DLI assoziiert sind: kurze Remission nach der allogenen Transplantation, die kürzer anhält als der Median von 194 Tagen ($p = 0,02$), keine Chemotherapie vor der DLI ($p = 0,001$) und das Fehlen einer akuten GVHD von Grad II oder höher nach der DLI ($p < 0,0001$). Von den Patienten ohne GVHD sprachen nur 18% an, während dies bei 66% der Patienten mit einer GVHD $>$ Grad I der Fall war. Patienten mit einem Spätrezidiv nach der Transplantation sprachen häufiger an (48%) als Patienten mit einem Frührezidiv (28%). Nach der DLI war die Vollremissionsrate unabhängig von Alter und Geschlecht der Patienten und der Spender, ihrem Verwandtschaftsverhältnis, der Anzahl der transfundierten Zellen und ob zur Prophylaxe einer GVHD nach der Transplantation eine Entfernung der T-Zellen erfolgt war. Das Überleben der Patienten ohne Vollremission war schlecht, aber sobald eine Vollremission erreicht wurde, unterschied sich ihre Überlebensdauer nicht danach, ob die Remission durch eine Chemotherapie induziert worden war oder nicht. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass eine DLI die Remission aufrecht erhält, und sprechen für die Verwendung einer Chemotherapie zur Remissionsinduktion.

Über den FAB-Subtyp und die zytogenetischen Analysen bei diesen Patienten liegen nur wenige Daten vor. Diesen wenigen Daten zufolge beeinflussten weder der FAB-Subtyp noch der Karyotyp das Ansprechen auf die Behandlung.

Schlechte Antigenpräsentation und schnelles Fortschreiten der Erkrankung wurden als Haupthindernisse für die adoptive Immuntherapie bei rezidivierender AML angesehen. Die Verbesserung der Antigenpräsentation und die Produktion zytotoxischer T-Zellen gegen

autologe Blasten wurden *in vitro* untersucht (Abb. 4). Die Kombination von GM-CSF, IL-4, TNF- α und FLT3-L erwies sich zur Induktion dendritischer Zellen aus AML-Blasten als besonders effektiv [40]. Die Kultur war bei 77% der Patienten wirksam, darunter auch bei Patienten mit ungünstigem Karyotyp. Bei über 60% dieser Patienten konnten spezifische zytotoxische T-Zellen gegen autologe Blasten gebildet werden.

In einer neueren Studie verwendeten wir niedrig dosiertes Cytosinarabinsid als schwach wirksame Chemotherapie zum Aufhalten der Krankheitsprogression und GM-CSF zur Verbesserung der Antigenpräsentation. Als Vorbereitung für die Transfusion von mit Stammzellen angereicherter Spenderlymphozyten wurde mobilisiertes Blut (MDBC) transfundiert und nach der Transfusion wurde über einen Zeitraum von 14-28 Tagen GM-CSF verabreicht. Auf diese Weise wurde die Antigenpräsentation durch Induktion dendritischer Zellen aus AML-Blasten und Substitution dendritischer Zellen, die aus CD34-positiven Zellen des Transplantats stammten, optimiert. Die Ansprechrate verbesserte sich damit von 25 auf 67% und die statistische Überlebenswahrscheinlichkeit beträgt 25% nach 4 Jahren [9]. Bei manchen Respondern wurde die Behandlung nach 4 bis 6 Monaten wiederholt und die Patienten blieben weiter in Remission.

Bei Patienten, bei denen es nach einer MDBC zu einer Krankheitsprogression kam, war eine Behandlung mit niedrig dosiertem Cytosinarabinsid und einer Transfusion von Spender-T-Zellen erfolgreich; allerdings trat in den meisten dieser Fälle eine schwere GVHD auf.

Eine GVHD und extramedulläre Rezidive sind weiterhin therapeutische Probleme. Bei den meisten Patienten mit einem extramedullären Rezidiv und bei manchen Patienten mit einem systemischen Rezidiv lässt sich die Krankheitsprogression mit niedrig dosiertem Cytosinarabinsid nicht effektiv aufhalten. Bei diesen Patienten ist eine intensivere Chemotherapie - auch mit Anthrazyklinen - notwendig, solitäre Infiltrate können vor der Transfusion von Spenderzellen bestrahlt werden [41]. Nach einer intensiveren Chemotherapie kann sich nach der Transfusion mobilisierter Blutzellen und der Behandlung mit GM-CSF eine schwere GVHD entwickeln. In diesen Fällen muss GM-CSF abgesetzt werden und eine immunsuppressive Behandlung mit Steroiden, Cyclosporin A und Azathioprin oder anderen Substanzen eingeleitet werden. GM-CSF sollte auch dann abgesetzt werden, wenn es zur Mobilisierung von Blasten aus dem Knochenmark in das Blut kommt. Leider kann eine Leukämie auch während einer immunsuppressiven Behandlung wieder auftreten und es stehen in einem solchen Fall nur noch wenige therapeutische Optionen zur Verfügung .

Ergebnisse mit Spenderlymphozytentransfusionen bei Myelom

Das zweitbeste Ansprechen nach dem Ansprechen bei CML wurde bei rezidiviertem multiplem Myelom festgestellt [42], [43], [12]. Der empfindlichste Marker für das Ansprechen auf die Behandlung ist das monoklonale Paraprotein, der zweitempfindlichste Plasmazellinfiltrate im Knochenmark und das Verschwinden von Knoten, während der am wenigsten empfindliche Marker osteolytische Läsionen sind. Die Zeit bis zum Ansprechen kann 4 – 6 Monate oder noch länger dauern und im Gegensatz zu CML sind die hämatologischen Remissionen seltener vollständig [44]. In den meisten Fällen sind die Remissionen nicht so dauerhaft wie bei CML, aber bei einzelnen Patienten wurden dauerhafte Teilremissionen beobachtet (Kolb, unveröffentlicht). Eine GVHD ist bei den meisten Respondern zu beobachten und kann sogar nach einer Chemotherapie wegen Myelom auftreten [45]. Durch Entfernen CD8-positiver T-Zellen aus der DLI war eine Prävention einer GVHD mit einigem Erfolg möglich [39], wiederholte niedrige Dosen einer unseparierten DLI waren ebenfalls effektiv [46].

Eine vorbeugende Behandlung mit einer DLI kann das Ergebnis in Kombination mit der Entfernung von T-Zellen verbessern, die optimale Strategie dafür wurde jedoch noch nicht

gefunden [47]. Es wurde über die Immunisierung eines Spenders gegen den Idiotyp des Myeloms und den Transfer einer zellproliferativen Reaktion berichtet [48], allerdings wurden die reaktiven Spender-T-Zellen bei dem Patienten mit persistierendem Paraprotein gefunden.

Ergebnisse mit Spenderlymphozytentransfusionen bei anderen Erkrankungen

Das Ansprechen einer rezidierten akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) auf eine DLI war in den meisten Fällen schlecht [4], [49]. Es gibt aber Ausnahmen mit lang anhaltenden Remissionen [50], [51]. Der erste Fall von Slavin et al. war ein Kind mit ALL, das 4 Wochen nach der Transplantation wegen einer residualen Leukämie Spenderzellen erhielt [23]. Remissionen wurden auch bei Patienten mit Morbus Hodgkins, Non-Hodgkin-Lymphom [52] und chronischer lymphozytischer Leukämie angegeben, aber das Ansprechen insgesamt ist kontrovers.

Andere Malignome außer hämatologischen wurden ebenfalls mit einigem Erfolg mit einer allogenen Transplantation und einer DLI behandelt. Bei metastasiertem Nierenzellkarzinom wurden einige anhaltende Erfolge beobachtet [53], auch bei Mammakarzinom [54] und Ovarialkarzinom (Kolb, unveröffentlicht) wurde über einigen Erfolg berichtet.

Bei Patienten mit nicht malignen Erkrankungen erwies sich eine DLI bei einer schlechten Transplantatfunktion nach einer nicht-myeloablativen Vorbehandlung als günstig [55]. Eine allogene Transplantation und eine DLI wurden auch zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten empfohlen [56], da bei Patienten mit Autoimmunkrankheiten, die wegen einer Leukämie eine Transplantation erhielten, die Autoimmunkrankheit in den meisten Fällen geheilt wurde. Jedoch kann als Komplikation nach einer allogenen Stammzellentransplantation mit nicht-myeloablativer Vorbehandlung eine chronische GVHD auftreten, deren Symptome denen von Autoimmunkrankheiten ähnlich sind.

Eine DLI wurde auch zur Behandlung von Virusinfektionen nach einer Transplantation eingesetzt, insbesondere bei EBV-induzierter lymphoproliferativer Erkrankung [26]. In diesen Fällen reichten winzige Mengen an T-Zellen aus und die Reaktionen gingen mit einer akuten Entzündungsreaktion einher. Präimmunisierte T-Zelllinien wurden besser vertragen und waren effektiver [27]. Die adoptive Immuntherapie bei Virusinfektionen hat vielversprechende Ergebnisse gezeigt, die zu einem besseren Verständnis des Graft-versus-Leukämie-Effekts führen könnten.

Mechanismus des Graft-versus-Leukämie-(Tumor-)-Effekts

Das Fehlen eines messbaren Graft-versus-Leukämie-(GVL)-Effekts bei Patienten mit syngenem Zwillingspendern belegt die Bedeutung einer Alloimmunreaktion [4]. Auf Leukämiezellen werden Antigene des Minor-Histokompatibilitätskomplexes exprimiert, die als Zielstrukturen für einen GVL-Effekt ohne GVHD dienen können, wenn ihre Expression auf das hämatopoetische Gewebe beschränkt bleibt [57] [30]. HA-1 und HA-2 sind solche Peptide mit auf das hämatopoetische System beschränkter Expression, geeignete Kandidaten sind aber auch Y-assoziierte Antigene des Minor-Histokompatibilitätskomplexes [58], [59]. Die auf das Gewebe beschränkte Expression von Minor-Histokompatibilitätsantigenen kann praktisch auf das hämatopoetische System beschränkt werden, indem HLA-Antigene der Klasse II präsentiert werden [60].

Die Effektorzellen der GVL-Reaktion sind nicht gut definiert. In Frage kommen könnten CD4-positive T-Zellen, da CD8-positive T-Zellen entfernt werden könnten, ohne dass der GVL-Effekt verloren ging [6]. Jedoch können CD4-positive T-Zellen *in vivo* CD8-positive T-Zellen und andere Zellen rekrutieren [61].

Es ist gut belegt, dass *ex vivo* gegen Minor-Histokompatibilitätsantigene immunisierte T-Zellen *in vitro* eine effektive Lyse von Leukämiezellen bewirken [29;62]. Dasselbe gilt *in vivo* bei immundefekten Mäusen [63]. Jedoch wurden *ex vivo* immunisierte T-Zellen bei menschlichen Patienten bisher nicht häufig verwendet. Das überzeugendste Beispiel für eine Leukämiebehandlung mit immunisierten Zellen ist die Studie von Falkenburg et al.[64]. Diese Autoren wählten zytotoxische T-Zellen auf der Basis ihrer Reaktivität gegenüber CML-Zellen aus und verabreichten diese einem Patienten mit CML in der akzelerierten Phase wiederholt als Infusion. Slavin et al. immunisierten Spenderzellen mit Zelllysaten der Eltern und stellten bei einem Patienten mit CML in der akzelerierten Phase, der nicht auf eine DLI angesprochen hatte, eine Vollremission fest [65].

Andere Antigene neben Minor-Histokompatibilitätsantigene, die für einen GVL-Effekt ein Frage kommen könnten, sind Fusionspeptide, Peptide von Proteinen, die von mutierten Genen kodiert werden, sowie Proteine überexprimierter Gene. Produkte von krankheitsspezifisch rearrangierten Genen wie BCR/ABL bei CML, PML/RAR α bei AML FAB M3 und AML1/ETO und andere enthalten hochspezifische Fusionspeptide. Proteine von Genen mit Punktmutationen wie in RAS-Genen sowie Peptide überexprimierter normaler Gene wie p53 und Proteinase 3 [66] wurden ebenfalls untersucht. Der Antikörper-Idiotyp eines Lymphoms und Myeloms könnte ebenfalls als überexprimiertes normales Protein angesehen werden, das den Tumor markiert. Für alle diese Substanzen wurde eine T-Zell-Reaktivität beschrieben, aber nur BCR/ABL-spezifische T-Zellen erkennen maligne Zellen bei Patienten und T-Zellen mit dieser Spezifität werden gelegentlich bei Patienten gefunden [67]. Bisher wurde keines dieser Antigene erfolgreich für die adoptive Immuntherapie bei chimärischen Patienten verwendet [68].

Unsere Hypothese, dass die myeloische Leukämie besser auf die DLI anspricht als die lymphatische Leukämie, weil sie dendritische Zellen leukämischer Herkunft produziert, wird durch die Beobachtung gestützt, dass die dendritischen Zellen bei CML die Translokation *bcr/abl* tragen [69], [70], [37] und in zu dendritischen Zellen differenzierten AML-Zellen in einer Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) der karyotypische Marker nachweisbar ist [71], [40]

Die Bildung dendritischer Zellen aus leukämischen Vorläuferzellen wurde *in vitro* untersucht, da die AML in den meisten Fällen – ebenso wie Lymphome und die lymphoblastische Leukämie - keine kostimulatorischen Moleküle wie CD80 und CD86 exprimiert. Eine unbehandelte CML wirkt in gemischten Lymphozytenreaktionen nur wenig stimulierend und ist in vielen Fällen nicht in der Lage zytotoxische T-Zellen zu induzieren [72]. Eine Kultur von AML-Blasten in Anwesenheit von GM-CSF, IL-4 mit oder ohne TNF- α und Flt-3 L induziert die Expression kostimulatorischer Moleküle [40] (Abb.). In ähnlicher Weise stimuliert eine Kultur von CML-Zellen in Anwesenheit von Interferon- α und GM-CSF die Expression ko-stimulierender Moleküle und die Bildung zytotoxischer T-Lymphozyten [73]. Die Kombination von GM-CSF und Interferon- α wurde bei Patienten mit rezidivierter CML, die nicht auf eine DLI allein und eine DLI plus Interferon- α ansprach, bereits erfolgreich eingesetzt (Kolb, unveröffentlicht). Andere Zytokine wie IL-2 wurden auf der Basis von tierexperimentellen Untersuchungen eingeführt [74]. IL-2 könnte die T-Zell-Reaktivität nach Immunisierung unterstützen. Bei Myelomen und Lymphomen ist die Stimulierung der Spender-T-Zellen schwach und es werden neue Wege erforscht, um die Stimulierung spezifischer T-Zellen zu verbessern. Eine Möglichkeit ist der Transfer des Gens, das für immunstimulatorische Moleküle und proinflammatorische Zytokine kodiert [75]. Andere Möglichkeiten sind die Transfusion dendritischer Zellen zusammen mit der DLI oder die Verwendung von MDBC zusammen mit der Behandlung mit GM-CSF.

Die Wiederherstellung des Immunsystems nach einer DLI wurde anhand der Typisierung von T-Zell-Rezeptor-V-beta-Familien [76] und T-Zell-Rezeptor-Exzisionszirkeln (TREC) untersucht [77]. Die DLI verstärkte die Erholung des Immunsystems und wandelte sich in

einen vollständigen Spenderchimärismus um. Bei einzelnen Patienten mit GVL-Reaktionen wurde eine Restitution klonaler T-Zellen beobachtet [76]. T-Zellen des Spenders bildeten nach Exposition gegenüber der Leukämie sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ähnliche Klone, aber die genetische Analyse ergab, dass sie unterschiedlich waren [78].

Interkurrente Infektionen mit Viren oder anderen intrazellulären Mikroorganismen können das Ergebnis einer DLI beeinträchtigen. Bei den meisten Patienten, bei denen in den ersten Wochen nach einer DLI Virusinfektionen auftreten, entwickelt sich eine GVHD. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei Patienten gemacht, die von T-Zellen befreite Transplantate und eine DLI erhielten. Der signifikanteste Risikofaktor für das Überleben war eine CMV-Seropositivität des Patienten [79]. Es wird diskutiert, ob Patienten nach einer DLI eine antiinfektiöse Prophylaxe erhalten sollten.

Es gibt zahlreiche Mechanismen, wie Tumoren und Leukämien einer gegen sie gerichteten Immunreaktion ausweichen können (Tabelle) [80]. Der wichtigste ist, dass sich die Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche verändern kann. Sogar der Verlust des Philadelphia-Chromosoms wurde angegeben [81]. In diesem Kontext ist die Verwendung von Minor-Histokompatibilitätsantigenen am vielversprechendsten, weil in der Chimäre die meisten hämatopoetischen Zellen durch die Spenderzellen ersetzt werden und nur noch Leukämiezellen dem Wirtstyp entsprechen (Abb. 6).

Über die Rolle natürlicher Killer-(NK)-Zellen bei der allogenen Stammzellentransplantation ist ebenfalls ständiger Gegenstand von Diskussionen. Während der Erholung nach einer Transplantation treten frühzeitig NK-Zellen auf. Versuche, diese Zellen frühzeitig nach einer Transplantation zu substituieren, waren nicht erfolgreich. In murinen Modellen waren allogene NK-Zellen effektiv [82], aber der Mangel an CD3-positiven T-Zellen hob die Wirkung auf [83]. Bei einer HLA-inkompatiblen Transplantation ist kein vollständiger T-Zell-Chimärismus notwendig, damit ein GVL-Effekt auftritt; so können gemischte Chimären von einem Lymphom geheilt werden [84]. Bei gemischten Chimären übt eine DLI einen starken Effekt gegen ein Lymphom aus, ohne dass eine GVHD verursacht wird [85]. Die Rolle der NK-Zellen wurde vor kurzem bei einer Transplantation ohne HLA-Kompatibilität untersucht und bei AML wurden ausgezeichnete Ergebnisse angegeben, wenn sich Spender und Patient im Hinblick auf die Killer-Inhibitor-Rezeptoren (KIR) unterschieden [86]. Die Zelltötung durch NK-Zellen wird gehemmt, wenn die Zielzellen bestimmte HLA-Antigene gemeinsam haben. Bei einer HLA-inkompatiblen Transplantation können NK-Zellen des Spenders Leukämiezellen abtöten und gleichzeitig die Transplantatabstossung unterdrücken. Wenn Spender und Patient zu einer unterschiedlichen alloreaktiven Gruppe gehörten, traten keine Rezidive der AML auf.

Ausblick für die adoptive Immuntherapie

Die Transplantation hämatopoetischer Zellen hat einen weiten Weg von der Knochenmarkstransplantation zur adoptiven Immuntherapie bei Chimären zurückgelegt. Allerdings ist das Verständnis über die Mechanismen der adoptiven Immuntherapie noch weit davon entfernt, vollständig zu sein. Die Immunbiologie der Leukämie, anderer Tumoren und von Virusinfektionen muss bei Patienten weiter untersucht werden. Die Mechanismen der Immuntoleranz, der Immunreaktivität gegen normale Zellen und des Transfers der Immunität können tierexperimentell untersucht werden.

Zur Zeit wird beim Hund die Immunisierung von Spender-T-Zellen gegen Minor-Histokompatibilitätsantigene des Empfängers untersucht. Sensibilisierte Zellen wandeln einen gemischten Chimärismus viel schneller in einen kompletten um als unbehandelte T-Zellen. Es wurden Tests entwickelt, um die zelluläre Immunität gegen hämatopoetische Vorläuferzellen *in vitro* nachzuweisen, Diese Tests ermöglichen es, Minor-Antigene bei Hunden zu definieren

[87]. Die Inzidenz einer schweren GVHD nach Transfusion sensibilisierter Spenderlymphozyten in stabile Chimären kann 30 bis 50 Prozent betragen [17]. Beim Menschen ist wahrscheinlich ein noch höherer Prozentsatz zu erwarten, da Patienten und ihre Spender im Laufe ihres Lebens einer Vielzahl von Histokompatibilitäts- und viralen Antigenen ausgesetzt sind. Daher sind präventive Maßnahmen gegen eine schwere GVHD notwendig. Die vielversprechendste Möglichkeit einer solchen Prävention ist die Modifizierung der Spenderlymphozyten mit einem Suizidgen. Dabei werden T-Zellen des Spenders mit einem Replikations-defizienten Retrovirus infiziert, welches das Herpes-simplex-Thymidinkinase-Gen (HSV-Tk) trägt, das Ganciclovir phosphorylieren kann. Das resultierende Nukleotid führt zum Abbruch der DNA-Polymerisation während der Zellteilung [88]. Derzeitige Probleme dieser Methode sind die veränderte Immunreaktivität transduzierter T-Zellen, die Immunreaktionen gegen das Virusprotein sowie die Abstossung der transduzierten Zellen und die veränderte Empfindlichkeit der transduzierten Zellen gegen Ganciclovir aufgrund von Splice-Varianten des Gens. Vor kurzem wurde über die Entwicklung einer Leukämie bei einer Maus berichtet, die mit Zellen behandelt wurde, die das Markergen (ein verstümmelter Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor) ohne das Suizidgen trugen. Wir untersuchten diese Methode beim Hund und fanden eine gute Immunreaktivität der transduzierten Hunde-T-Zellen *in vitro*. Die Transfusion transduzierter T-Zellen in eine Hundechimäre führte zu einem vollständigen Chimärismus und zum Transfer der Immunität gegen Tetanustoxoid [89].

Die adoptive Immuntherapie bei Chimären ist ein vielversprechender Weg zur Behandlung von Leukämien und möglicherweise auch von soliden Tumoren. Insbesondere die Immunreaktivität gegen Leukämien und Tumoren, die ansonsten gegen eine Chemotherapie refraktär sind, bietet der Hämatologie und Onkologie neue Perspektiven. Mehrere Leukämieforschungsgruppen haben die Vorbehandlung mit einer DLI als Prophylaxe bei einer Hochrisikoleukämie nach dem in Abb. 1 gezeigten Schema in ihre Strategie aufgenommen. Die Ergebnisse stehen noch aus.

Danksagungen

Diese Arbeit wurde finanziert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, Project Ko 81-1383-2, die Wilhelm-Sander-Stiftung Nr. 93.018.01-03 und die Deutsche José-Carreras-Leukämie-Stiftung e.V.

Legenden:

Abb. 1

Strategie der adoptiven Immuntherapie bei Chimären

Die adoptive Immuntherapie mit T-Zellen mit oder ohne dendritische Zellen ermöglicht eine Vorbehandlung ohne Myeloablation. Sobald ein stabiler Chimärismus hergestellt ist und die Immunsuppression beendet werden kann, wird ein Zustand einer immunologischen Toleranz hergestellt. Zu diesem Zeitpunkt können Spenderzellen transfundiert werden, ohne dass eine schwere GVHD auftritt.

Abb. 2

Verlauf bei einem Patienten mit Myelosuppression nach einer DLI: Nach der DLI nahm die Zahl der weißen Blutzellen zu und bei dem Patienten trat Fieber auf; danach nahm die Zahl der Blutzellen wieder ab und der Patient entwickelte eine schwere Panzytopenie. Die Transfusion von Knochenmark von seinem Spender ohne weitere Vorbereitung führte zu vollständiger Wiederherstellung der Hämatopoese und einem kompletten Chimärismus. Nach der Knochenmarktransfusion wurde eine molekulare Remission festgestellt, die bis heute anhält.

Abb. 3

Zeit bis zur molekularen Remission nach DLI: molekulare Remissionen wurden nach 4 Monaten erreicht, die mediane Zeit betrug 6 Monate und Spätremissionen traten noch nach über 1 Jahr auf.

Die Daten stammen aus dem Transplantationszentrum München-Grosshadern, evaluiert im März 2001.

Abb. 4

Pathophysiologie der GVHD:

Es besteht eine wechselseitige Aktivierung von CD4-positiven Spender-T-Zellen und dendritischen Wirtszellen, die durch die vorherige Aktivierung der dendritischen Zellen durch Bestrahlung, Chemotherapie, Endotoxin aus der Darmflora, Virusinfektionen oder durch Vorimmunisierung der T-Zellen gegen Minor-Histokompatibilitätsantigene, virale Antigene und andere beschleunigt werden kann.

Aktivierete dendritische Zellen aktivieren CD8-positive T-Zellen und präsentieren den CD8-Zellen auf HLA-Klasse I beschränkte Peptide. Diese CD8-T-Zellen werden dann aktiviert und reagieren gegen normale Wirtszellen.

Abb. 5

AML-Blasten besitzen keine ko-stimulatorischen Moleküle und können daher keine effektive Antigenpräsentation gegenüber Spenderzellen ausüben. Die Behandlung mit GM-CSF bringt die Blasten dazu, die für eine effiziente Antigenpräsentation notwendigen stimulatorischen Moleküle zu exprimieren. Diese T-Zellen reagieren gegen residuale Blasten.

Abb. 6

Mechanismus der Graft-versus-Leukämie-Reaktion.

Nach Herstellung eines Chimärismus werden dendritische Wirtszellen durch dendritische Zellen des Spenders ersetzt. Die potenziell verbleibenden hämatopoetischen Wirtszellen sind leukämische Blasten. Diese können stimulatorisch wirken und ein Angriffsziel für Spender-T-Zellen werden, wenn sie zu dendritischen Zellen umgewandelt werden. Die Reaktion ist spezifisch, weil daran Minor-Histokompatibilitätsantigene mit eingeschränkter Expression beteiligt sind und die dendritischen Spenderzellen die Toleranz in anderen Organen aufrecht erhalten.

Literaturverzeichnis

- (1) Kolb HJ, Günther W, Schumm M, Holler E, Wilmanns W, Thierfelder S. Adoptive immunotherapy in canine chimeras. *Transplantation* 1997; 63:430-436.
- (2) Johnson BD, Drobyski WR, Truitt RL. Delayed infusion of normal donor cells after MHC-matched bone marrow transplantation provides an antileukemia reaction without graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11:329-336.
- (3) Kolb HJ, Mittermueller J, Clemm C, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990; 76:2462-2465.
- (4) Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermüller J, De Witte T, Holler E, Ansari H. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995; 86:2041-2050.
- (5) Collins RH, Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL, Giral S, Champlin R, Goodman SA, Wolff SN, Hu W, Verfaillie C, List A, Dalton W, Ognoskie N, Chetrit A, Antin JH, Nemunaitis J. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1997; 15:433-444.
- (6) Giral S, Hester J, Huh Y, Hirsch-Ginsberg C, Rondon G, Seong D, Lee M, Gajewski J, Van Besien K, Khouri I, Mehra R, Przepiorka D, Körbling M, Talpaz M, Kantarjian H, Fischer H, Deisseroth A, Champlin R. CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1995; 86:4337-4343.
- (7) Mackinnon S, Papadopoulos EB, Carabasi MH, Reich L, Collins NH, Boulad F, Castro-Malaspina H, Childs BH, Gillio AP, Kernan NA, Small TM, Young JW, O'Reilly RJ. Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease. *Blood* 1995; 86:1261-1268.
- (8) Guglielmi C, Arcese W, Dazzi F, Brand R, Bunjes D, Verdonck LF, Schattenberg A, Kolb HJ, Ljungman P, Devergie A, Bacigalupo A, Gomez M, Michallet M, Elmaagacli A, Gratwohl A, Apperley J, Niederwieser D. Donor lymphocyte infusion for relapsed chronic myelogenous leukemia: prognostic relevance of the initial cell dose. *Blood* 2002; 100(2):397-405.
- (9) Schmid C, Lange C, Salat C, Stoetzer O, Ledderose G, Muth A, Schleuning M, Roskrow M, Kolb H-J. Treatment of recurrent acute leukemia after marrow transplantation with donor cells and GM-CSF. *Blood* 94[10 Suppl 1], 668a. 1999.
- (10) Schmid C, Alessandrino EP, Bunjes D, Ferrant A, Frassoni F, Gluckman E, Holler E, Jacobsen N, Ljungman P, Schattenberg A, Verdonck L, Kolb HJ. Treatment of relapsed AML and MDS after allogeneic stem cell transplantation with donor lymphocyte transfusion - A retrospective analysis of EBMT results. *Blood* 96[11], 477a. 2000.
- (11) Alyea EP, Soiffer RJ, Canning C, Neuberg D, Schlossman R, Pickett C, Collins H, Wang Y, Anderson KC, Ritz J. Toxicity and efficacy of defined doses of CD4(+) donor lymphocytes for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplant. *Blood* 1998; 91(10):3671-3680.
- (12) Lokhorst HM, Schattenberg A, Cornelissen JJ, Thomas LLM, Verdonck L. Donor leukocyte infusions are effective in relapsed multiple myeloma after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997; 90:4206-4211.
- (13) Antin JH. Graft-versus-leukemia: no longer an epiphenomenon. *Blood* 1993; 82:2273-2277.
- (14) Rodt H, Kolb HJ, Netzel B, Rieder I, Janka G, Belohradsky B, Haas RJ, Thierfelder S. GVHD suppression by incubation of bone marrow grafts with anti-T- cell globulin: effect in the canine model and application to clinical bone marrow transplantation. *Transplant Proc* 1979; 11:962-966.

- (15) Kolb HJ, Rieder I, Rodt H, Netzel B, Grosse Wilde H, Scholz S, Schaffer E, Kolb H, Thierfelder S. Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation. VI. Graft- versus-host tolerance in DLA-incompatible dogs after in vitro treatment of bone marrow with absorbed antithymocyte globulin. *Transplantation* 1979; 27:242-245.
- (16) Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75:555-562.
- (17) Weiden PL, Storb R, Tsoi M-S, Graham TC, Lerner KG, Thomas ED. Infusion of donor lymphocytes into stable canine radiation chimeras: Implications for mechanism of transplantation tolerance. *J Immunol* 1976; 116:1212-1219.
- (18) Bar BMAM, Schattenberg A, Mensink EJBM, Van Kessel AG, Smetsers TFCM, Knops GHJN, Linders EHP, De Witte T. Donor leukocyte infusions for chronic myeloid leukemia relapsed after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1993; 11:513-519.
- (19) van Rhee F, Lin F, Cullis JO, Spencer A, Cross NCP, Chase A, Garicochea B, Bungey J, Barrett AJ, Goldman JM. Relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: The case for giving donor leukocyte transfusions before the onset of hematological relapse. *Blood* 1994; 83:3377-3383.
- (20) Hertenstein B, Wiesneth M, Novotny J, Bunjes D, Stefanic M, Heinze B, Hübner G, Heimpel H, Arnold R. Interferon alpha and donor buffy coat transfusions for treatment of relapsed chronic myeloid leukemia after allogeneic marrow transplantation. *Transplantation* 56, 1114-1118. 1993.
- (21) Helg C, Roux E, Beris P, Cabrol C, Wacker P, Darbellay R, Wyss M, Jeannet M, Chapuis B, Roosnek E. Adoptive immunotherapy for recurrent CML after BMT. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12:125-129.
- (22) Porter DL, Roth MS, McGarigle C, Ferrara JLM, Antin JH. Induction of graft-versus-host disease as immunotherapy for relapsed chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med* 1994; 330:100-106.
- (23) Slavin S, Naparstek E, Nagler A, Ackerstein A, Samuel S, Kapelushnik J, Brautbar C, Or R. Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 87:2195-2204.
- (24) Bacigalupo A, Soracco M, Vassallo F, Abate M, van Lint MT, Gualandi F, Lamparelli T, Occhini D, Mordini N, Bregante S, Figari O, Benvenuto F, Sessarego M, Fugazza G, Carlier P, Valbonesi M. Donor lymphocyte infusions (DLI) in patients with chronic myeloid leukemia following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19(9):927-932.
- (25) Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by adoptive transfer of T-cell clones. *Science* 1992; 257:238-241.
- (26) Papadopoulos EB, Ladanyi M, Emanuel D, Mackinnon S, Boulad F, Carabasi MH, Castro-Malaspina H, Childs BH, Gillio AP, Small TN, Young JW, Kernan NA, O'Reilly RJ. Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Bar virus- associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994; 330:1185-1191.
- (27) Heslop HE, Brenner MK, Rooney CM. Donor T cells to treat EBV-associated lymphoma. *N Engl J Med* 1994; 331:679-680.
- (28) van der Harst D, Goulmy E, Falkenburg JHF, Kooji-Winkelaar YMC, van Luxemburg-Heijs SAP, Goselink HM, Brand A. Recognition of minor histocompatibility antigens on lymphocytic and myeloid leukemic cells by cytotoxic T-cell clones. *Blood* 1994; 83:1060-1066.
- (29) Mutis T, Verdijk R, Schrama E, Esendam B, Brand A, Goulmy E. Feasibility of immunotherapy of relapsed leukemia with ex vivo generated cytotoxic T lymphocytes specific for hematopoietic system-restricted minor histocompatibility antigens. *Blood* 1999; 93(7):2336-2341.

- (30) Warren EH, Greenberg PD, Riddell SR. Cytotoxic T-lymphocyte-defined human minor histocompatibility antigens with a restricted tissue distribution. *Blood* 1998; 91:2197-2207.
- (31) Truitt RL, Shih CC, LeFever AV. Manipulation of graft-versus-host disease for a graft-versus-leukemia effect after allogeneic bone marrow transplantation in AKR mice with spontaneous leukemia/lymphoma. *Transplantation* 1986; 41(3):301-310.
- (32) Ferrara JLM, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1991; 324:667-674.
- (33) Johnson BD, Becker EE, LaBelle JL, Truitt RL. Role of immunoregulatory donor T cells in suppression of graft-versus-host disease following donor leukocyte infusion therapy. *J Immunol* 1999; 163(12):6479-6487.
- (34) Kolb HJ, Mittermueller J, Holler E, Clemm C, Ledderose G, Brehm G, Wilmanns W. Treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia posttransplant with interferone alpha (INFa) and donor leukocyte transfusions. *Blut* 61, 122. 1990.
- (35) Cervantes F, Rovira M, Urbano-Ispizua A, Rozman M, Carreras E, Montserrat E. Complete remission of idiopathic myelofibrosis following donor lymphocyte infusion after failure of allogeneic transplantation: demonstration of a graft-versus-myelofibrosis effect. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26(6):697-699.
- (36) Schattenberg A, Schaap N, van de Wiel-van Kemenade E, Bar B, Preijers F, Van Der Maazen R, Roovers E, De Witte T. In relapsed patients after lymphocyte depleted bone marrow transplantation the percentage of donor T lymphocytes correlates well with the outcome of donor leukocyte infusion. *Leuk Lymphoma* 1999; 32(3-4):317-325.
- (37) Chen X, Regn S, Raffegerst S, Kolb HJ, Roskrow M. Interferon alpha in combination with GM-CSF induces the differentiation of leukaemic antigen-presenting cells that have the capacity to stimulate a specific anti-leukaemic cytotoxic T-cell response from patients with chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000; 111(2):596-607.
- (38) Flowers MED, Sullivan KM, Martin P, Buckner CD, Beach K, Higano T, Radich JP, Clift RA, Bensinger W, Deeg HJ, Chauncey TR, Rowley S, Storb R, Appelbaum FR. G-CSF stimulated donor peripheral blood infusions as immunotherapy in patients with hematologic malignancies relapsing after allogeneic transplantation. *Blood* 86[Suppl. 1], 564a. 1995.
- (39) Alyea EP, Soiffer RJ, Canning C, et al. Toxicity and efficacy of defined doses of CD4+ donor lymphocytes for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 91, 3671-3677. 1998.
- (40) Woiciechowsky A, Regn S, Kolb H-J, Roskrow M. Leukemic dendritic cells generated in the presence of FLT3 ligand have the capacity to stimulate an autologous leukaemia-specific cytotoxic T cell response from patients with acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 15, 246-255. 2001.
- (41) Fleming DR, Greenwood ME, Garrison J, Geil JD, Romond EH. Lymphocyte infusion for delayed extramedullary relapse of acute leukemia following bone marrow transplantation. *Leuk Lymphoma* 1996; 21(5-6):525-528.
- (42) Tricot G, Vesole DH, Jagannath S, Hilton J, Munshi N, Barlogie B. Graft-versus-myeloma effect: Proof of principle. *Blood* 1996; 87:1196-1198.
- (43) Verdonck LF, Lokhorst HM, Dekker AW, Nieuwenhuis HK, Petersen EF. Graft-versus-myeloma effect in two cases. *Lancet* 1996; 347:800-801.
- (44) Salama M, Nevill T, Marcellus D, Parker P, Johnson M, Kirk A, Porter D, Giralt S, Levine JE, Drobyski W, Barrett AJ, Horowitz M, Collins RH. Donor leukocyte infusions for multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26(11):1179-1184.
- (45) Fuchs EJ, Seber A, Altomonte V, Braine HG, Humphrey RL, Jones RJ, Noga SJ, Schepers K, Wright SK, Vogelsang GB. Chemotherapy does not nullify the ability of donor lymphocyte infusions to mediate graft-versus-host reactions. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22(3):303-305.

- (46) du TC, Novitzky N. Multiple myeloma: infusions of low doses of donor lymphocytes are also effective in reversing disease recurrence after bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1998; 103(4):1210-1211.
- (47) Alyea E, Weller E, Schlossman R, Canning C, Webb I, Doss D, Mauch P, Marcus K, Fisher D, Freeman A, Parikh B, Gribben J, Soiffer R, Ritz J, Anderson K. T-cell--depleted allogeneic bone marrow transplantation followed by donor lymphocyte infusion in patients with multiple myeloma: induction of graft-versus-myeloma effect. *Blood* 2001; 98(4):934-939.
- (48) Kwak LW, Taub DD, Duffey PL, Bensinger WI, Bryant EM, Reynolds CW, Longo DL. Transfer of myeloma idiotype-specific immunity from an actively immunised marrow donor. *Lancet* 1995; 345(8956):1016-1020.
- (49) Collins RH, Jr., Goldstein S, Giralt S, Levine J, Porter D, Drobyski W, Barrett J, Johnson M, Kirk A, Horowitz M, Parker P. Donor leukocyte infusions in acute lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26(5):511-516.
- (50) Matsue K, Tabayashi T, Yamada K, Takeuchi M. Eradication of residual bcr-abl-positive clones by inducing graft- versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation in patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29(1):63-66.
- (51) Lawson SE, Darbyshire PJ. Use of donor lymphocytes in extramedullary relapse of childhood acute lymphoblastic leukaemia following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22(8):829-830.
- (52) van Besien KW, de Lima M, Giralt SA, Moore DF, Jr., Khouri IF, Rondon G, Mehra R, Andersson BS, Dyer C, Cleary K, Przepiorka D, Gajewski JL, Champlin RE. Management of lymphoma recurrence after allogeneic transplantation: the relevance of graft-versus-lymphoma effect. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19(10):977-982.
- (53) Childs R, Chernoff A, Contentin N, Bahceci E, Schrupp D, Leitman S, Read EJ, Tisdale J, Dunbar C, Linehan WM, Young NS, Barrett AJ. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2000; 343(11):750-758.
- (54) Or R, Ackerstein A, Nagler A, Kapelushnik J, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Slavin S. Allogeneic cell-mediated immunotherapy for breast cancer after autologous stem cell transplantation: A clinical pilot study. *Cytokines Cell Mol Ther* 1998; 4:1-6.
- (55) Horwitz ME, Barrett AJ, Brown MR, Carter CS, Childs R, Gallin JI, Holland SM, Linton GF, Miller JA, Leitman SF, Read EJ, Malech HL. Treatment of chronic granulomatous disease with nonmyeloablative conditioning and a T-cell-depleted hematopoietic allograft. *N Engl J Med* 2001; 344(12):881-888.
- (56) Slavin S, Nagler A, Varadi G, Or R. Graft vs autoimmunity following allogeneic non-myeloablative blood stem cell transplantation in a patient with chronic myelogenous leukemia and severe systemic psoriasis and psoriatic polyarthritis. *Exp Hematol* 2000; 28(7):853-857.
- (57) de Bueger M, Bakker A, Van Rood JJ, Van der WF, Goulmy E. Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. Ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens. *J Immunol* 1992; 149(5):1788-1794.
- (58) Vogt MH, de Paus RA, Voogt PJ, Willemze R, Falkenburg JH. DFFRY codes for a new human male-specific minor transplantation antigen involved in bone marrow graft rejection. *Blood* 2000; 95(3):1100-1105.
- (59) Warren EH, Gavin MA, Simpson E, Chandler P, Page DC, Disteché C, Stankey KA, Greenberg PD, Riddell SR. The human UTY gene encodes a novel HLA-B8-restricted H-Y antigen. *J Immunol* 2000; 164(5):2807-2814.

- (60) Vogt MH, van den Muijsenberg JW, Goulmy E, Spierings E, Kluck P, Kester MG, van Soest RA, Drijfhout JW, Willemze R, Falkenburg JH. The DBY gene codes for an HLA-DQ5-restricted human male-specific minor histocompatibility antigen involved in graft-versus-host disease. *Blood* 2002; 99(8):3027-3032.
- (61) Zorn E, Wang KS, Hochberg EP, Canning C, Alyea EP, Soiffer RJ, Ritz J. Infusion of CD4+ Donor Lymphocytes Induces the Expansion of CD8+ Donor T Cells with Cytolytic Activity Directed against Recipient Hematopoietic Cells. *Clin Cancer Res* 2002; 8(7):2052-2060.
- (62) Bonnet D, Warren EH, Greenberg PD, Dick JE, Riddell SR. CD8+ minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones eliminate human acute myeloid leukemia stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:8639-8644.
- (63) Fontaine P, Roy-Proulx G, Knafo L, Baron C, Roy DC, Perreault C. Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat Med* 2001; 7(7):789-794.
- (64) Falkenburg JH, Wafelman AR, Joosten P, Smit WM, van Bergen CA, Bongaerts R, Lurvink E, van der HM, Kluck P, Landegent JE, Kluin-Nelemans HC, Fibbe WE, Willemze R. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 1999; 94(4):1201-1208.
- (65) Slavin S, Ackerstein A, Morecki S, Gelfand Y, Cividalli G. Immunotherapy of relapsed resistant chronic myelogenous leukemia post allogeneic bone marrow transplantation with alloantigen pulsed donor lymphocytes. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28(8):795-798.
- (66) Clave E, Molldrem J, Hensel N, Raptis A, Barrett AJ. Donor-recipient polymorphism of the proteinase 3 gene: a potential target for T-cell alloresponses to myeloid leukemia. *J Immunother* 1999; 22(1):1-6.
- (67) Bocchia M, Korontsvit T, Xu Q, Mackinnon S, Yang SY, Sette A, Scheinberg DA. Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood* 1996; 87(9):3587-3592.
- (68) Pinilla-Ibarz J, Cathcart K, Korontsvit T, Soignet S, Bocchia M, Caggiano J, Lai L, Jimenez J, Kolitz J, Scheinberg DA. Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses. *Blood* 2000; 95(5):1781-1787.
- (69) Eibl B, Ebner S, Duba Ch, Böck G, Romani N, Gächter A, Nachbaur D, Schuler G, Niederwieser D. Philadelphia-chromosome positive dendritic cells (DC) of chronic myelocytic leukemia (CML) patients induce primary cytotoxic T-cell responses to CML cells. *Bone Marrow Transplant* 19[Suppl 1], S33. 1997.
- (70) Smit WM, Rijnbeck M, van Bergen CAM, de Paus RA, Willemze R, Falkenburg JHF. Dendritic cells generated from FACS sorted chronic myeloid leukemia (CML) precursor cells express BCR/ABL, and are potent stimulators for allogeneic T cells. *Br J Haematol* 93[Suppl 2], 313-abstr.1186. 1996.
- (71) Choudhury BA, Liang J, Thomas EK, Flores-Romo L, Xie QS, Agusala K, Sutaria S, Sinha I, Champlin RE, Claxton D. Dendritic cells derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous anti-leukemic T-cell responses. *Blood* 1999; 93(3):780-786.
- (72) Schneider EM, Chen ZZ, Ellwart J, Wilmanns W, Kolb HJ. Immune phenotype of chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17(Suppl 1):S69-319.
- (73) Chen X, Regn S, Kolb H-J, Roskrow M. The generation of leukemic dendritic cells from patients with chronic myeloid leukemia (CML) using the combination of interferon- α and GM-CSF. *Blood* 94[10 Suppl 1], 529a. 1999.
- (74) Varadi G, Ackerstein A, Ben Neriah S, Nagler A. Adoptive cell-mediated immunotherapy with interleukin-2 (IL-2) for relapsing lymphoblastic crisis following mismatched unrelated bone marrow transplantation in a chronic myelogenous leukemia patient. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21(1):93-96.

- (75) Wen XY, Mandelbaum S, Li ZH, Hitt M, Graham FL, Hawley TS, Hawley RG, Stewart AK. Tricistronic viral vectors co-expressing interleukin-12 (IL-12) and CD80 (B7-1) for the immunotherapy of cancer: preclinical studies in myeloma. *Cancer Gene Ther* 2001; 8(5):361-370.
- (76) Claret EJ, Alyea EP, Orsini E, Pickett CC, Collins H, Wang Y, Neuberg D, Soiffer RJ, Ritz J. Characterization of T cell repertoire in patients with graft-versus-leukemia after donor lymphocyte infusion. *J Clin Invest* 1997; 100(4):855-866.
- (77) Bellucci R, Alyea EP, Weller E, Chillemi A, Hochberg E, Wu CJ, Canning C, Schlossman R, Soiffer RJ, Anderson KC, Ritz J. Immunologic effects of prophylactic donor lymphocyte infusion after allogeneic marrow transplantation for multiple myeloma. *Blood* 2002; 99(12):4610-4617.
- (78) Epperson DE, Margolis DA, McOlash L, Janczak T, Barrett AJ. In vitro T-cell receptor V beta repertoire analysis may identify which T-cell V beta families mediate graft-versus-leukemia and graft-versus-host responses after human leucocyte antigen-matched sibling stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2001; 114(1):57-62.
- (79) Craddock C, Szydlo RM, Dazzi F, Olavarria E, Cwynarski K, Yong A, Brookes P, de la FJ, Kanfer E, Apperley JF, Goldman JM. Cytomegalovirus seropositivity adversely influences outcome after T-depleted unrelated donor transplant in patients with chronic myeloid leukaemia: the case for tailored graft-versus-host disease prophylaxis. *Br J Haematol* 2001; 112(1):228-236.
- (80) Dermime S, Mavroudis D, Jiang YZ, Hensel N, Molldrem J, Barrett AJ. Immune escape from a graft-versus-leukemia effect may play a role in the relapse of myeloid leukemias following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19(10):989-999.
- (81) Au WY, Lie AK, Ma SK, Wan TS, Liang R, Leung YH, Kwong YL. Philadelphia (Ph) chromosome-positive chronic myeloid leukaemia relapsing as Ph-negative leukaemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 2001; 114(2):365-368.
- (82) Glass B, Uharek L, Gassmann W, Focks B, Bolouri H, Loeffler H, Mueller-Ruchholtz W. GRAFT-VERSUS-LEUKEMIA ACTIVITY AFTER BONE MARROW TRANSPLANTATION DOES NOT REQUIRE GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE. *Ann Hematol* 1992; 64:255-259.
- (83) Uharek L, Glass B, Zeis M, Dreger P, Steinmann J, Löffler H, Schmitz N. Abrogation of graft-vs.-leukemia activity after depletion of CD3+ T cells in a murine model of MHC-matched peripheral blood progenitor cell transplantation (PBPCT). *Exp Hematol* 1998; 26:93-99.
- (84) Sykes M, Preffer F, McAfee S, Saidman SL, Weymouth D, Andrews DM, Colby C, Sackstein R, Sachs DH, Spitzer TR. Mixed lymphohaemopoietic chimerism and graft-versus-lymphoma effects after non-myeloablative therapy and HLA-mismatched bone-marrow transplantation. *Lancet* 1999; 353(9166):1755-1759.
- (85) Mapara MY, Kim YM, Wang SP, Bronson R, Sachs DH, Sykes M. Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting cells. *Blood* 2002; 100(5):1903-1909.
- (86) Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295:2097-2100.
- (87) Weber M, Lange C, Kolb HJ, Kolb HJ. CFU-suppression by T-Cells primed with DLA-identical dendritic cells. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25(Suppl 1):S23-abstract.
- (88) Bonini C, Ferrari G, Verzelletti S, Servida P, Zappone E, Ruggieri L, Ponzoni M, Rossini S, Mavilio F, Traversari C, Bordignon C. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 1997; 276:1719-1724.
- (89) Weissinger EM, Franz M, Voss C, Kremmer E, Kolb H-J. Expression of HSV-TK suicide gene in primary T-lymphocytes: The dog as a preclinical model. *Cytokines, Cellular & Molecular Therapy* 2000; 6(1):25-33.

Tabelle 1

Mögliche Immune-Escape-Mechanismen:*Mechanismen bei der Antigenpräsentation:*

- Geringe Expression kostimulatorischer Moleküle: B7.1, B7.2, CD40, ICAM
- Downregulation von HLA-Antigenen der Klasse I, Klasse- II-Antigen oder relevanten Allelen
- Ineffiziente Peptidproduktion durch den Proteasom / TAP-Mechanismus
- Sekretion inhibitorischer Zytokine wie IL-10, TGF- β
- Geringe Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ
- Expression von FAS-L auf Tumor-/ Leukämiezellen, die eine Apoptose der T-Zellen induziert
- Expression von nicht funktionstüchtigem FAS auf leukämischen Blasten

Mechanismen auf den T-Zellen

- Downregulation der ζ -Kette (Lymphom und CML) und der ϵ -Kette (CML) des T-Zell-Rezeptors
- Downregulation von CD28 bei AML
- andere

Abb. 1

Nicht-myeloablative Vorbehandlung
Stammzellentransplantation



Chimärismus & Toleranz



Adoptive Immuntherapie mit
spezifischen T-Zellen ± dendritischen Zellen

Fig. 2

Myelosuppression nach DLI
MoK 39 yo, BMT 7.7.89

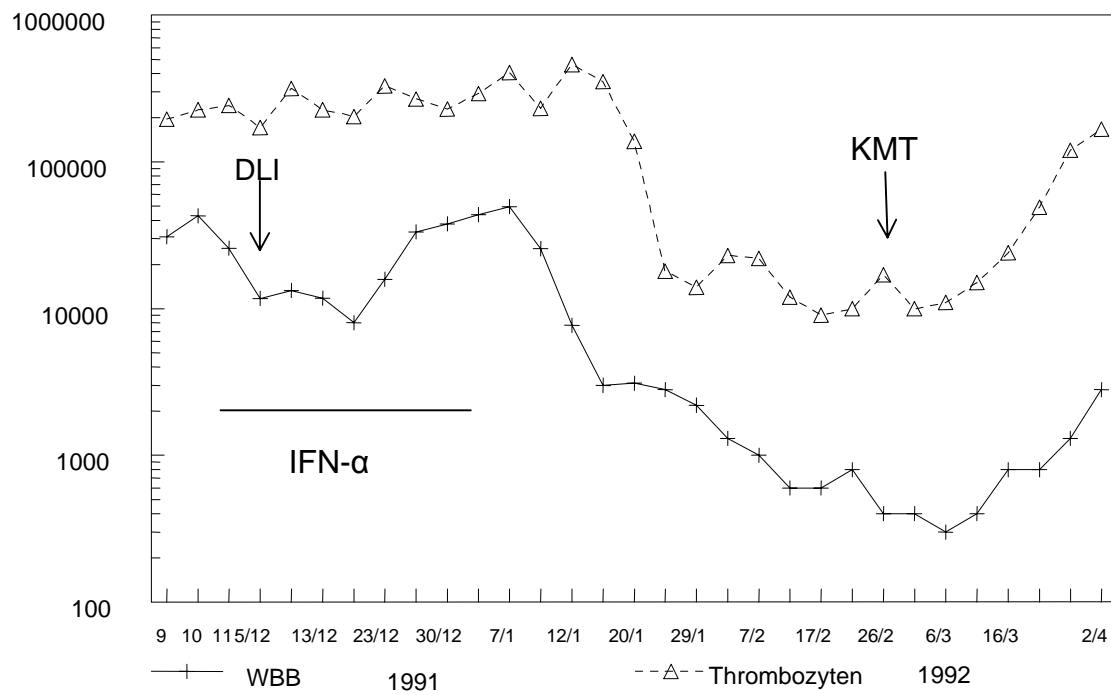


Abb. 3

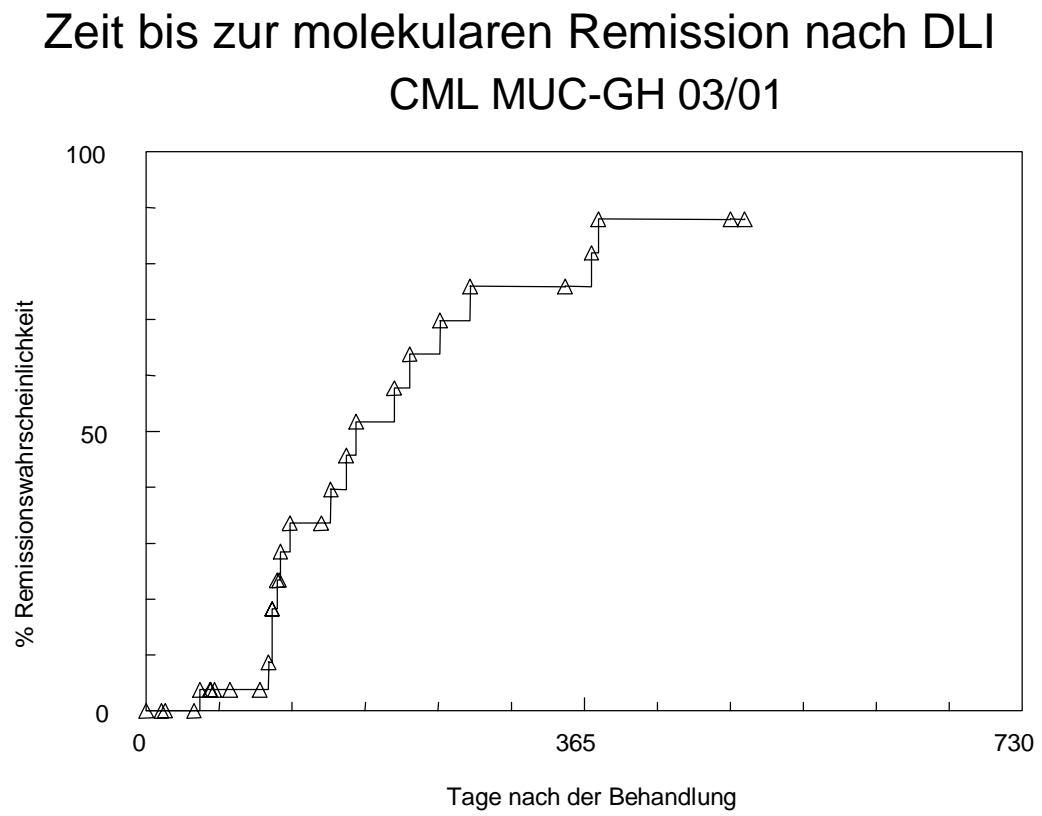


Abb. 4

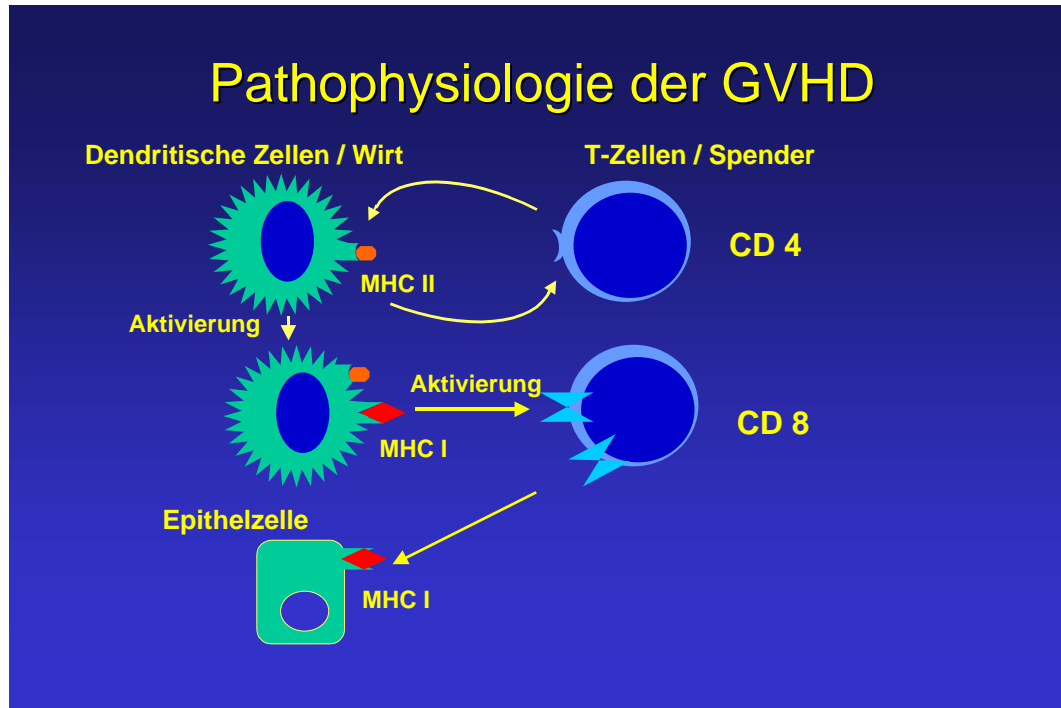


Abb.5

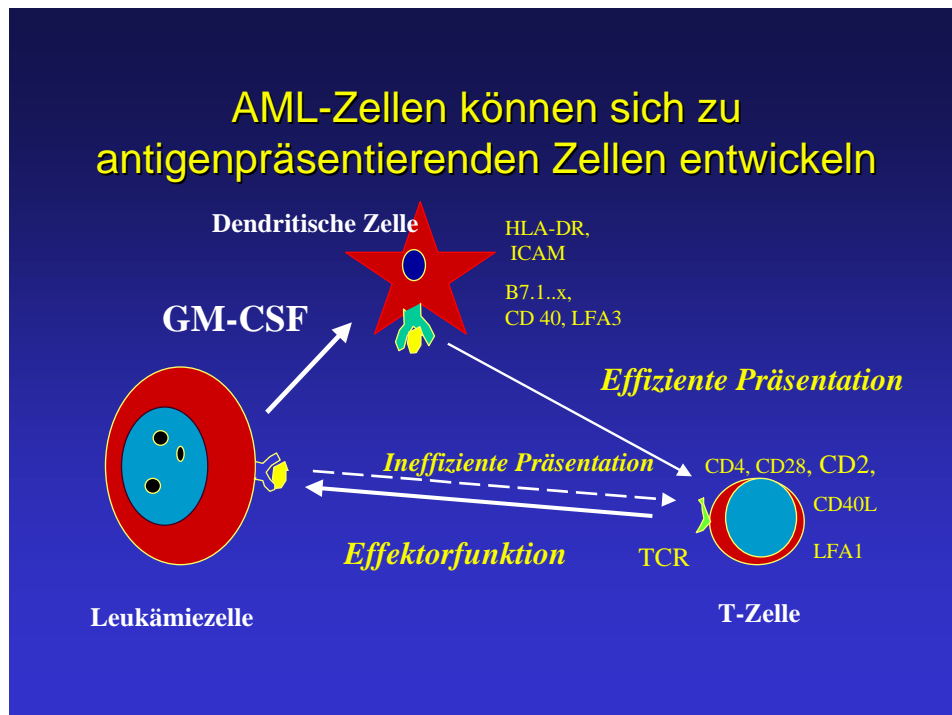
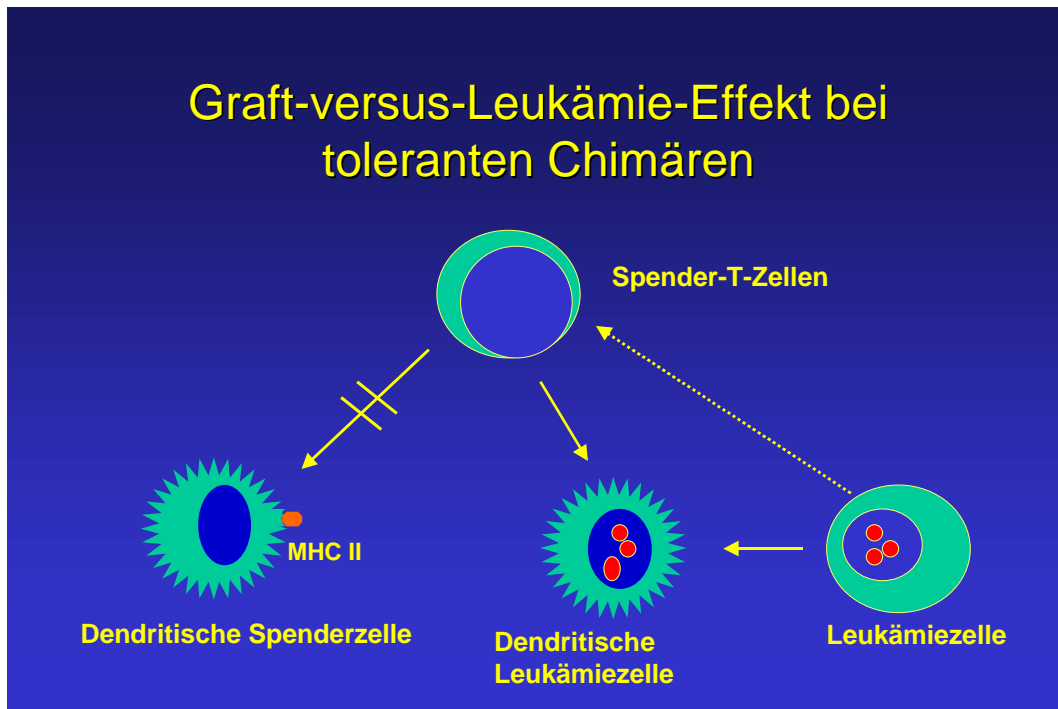


Abb. 6



Graft-versus-Leukämie-Effekt bei toleranten Chimären

