

**Gemeinsame Stellungnahme der Fachgesellschaften  
DGTI, DGHO und GPOH  
zu Genehmigungsverfahren von Stammzellzubereitungen**

**„Präklinischer und Klinischer Überblick zum Nachweis  
der Funktionalität und Risiken der Stammzellzubereitungen“**

**Ergänzung zu den Common Technical Documents  
einschließlich Modul 2  
zur zentralen Hinterlegung beim Paul-Ehrlich-Institut**

**Endversion vom 08. Mai 2009**

**Nur für Mitglieder der o. g. Fachgesellschaften bestimmt**

**Beteiligte Fachgesellschaften und Arbeitsgemeinschaften**

DGTI  
Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie

DGHO  
Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie

GPOH  
Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie

DAG-KBT  
Deutsche Arbeitsgemeinschaft Knochenmark- / Blutstammzelltransplantation

Päd-AG KBT  
Pädiatrische Arbeitsgemeinschaft Knochenmark- / Blutstammzelltransplantation

**Federführung und Koordination**

**Arbeitsgemeinschaft Genehmigungsverfahren für Stammzellzubereitungen  
der DGTI-Sektion „Transplantation und Zelltherapie“**

**Arbeitsgemeinschaft Genehmigungsverfahren für Stammzellzubereitungen  
der Sektion „Transplantation und Zelltherapie“  
der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie**

**Vorsitzender**

PD Dr. med. Peter Schlenke  
Institut für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie  
Universität Münster, Vertreter der DGTI

**Mitglieder**

Prof. Dr. med. Peter Bader  
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie  
Universität Frankfurt, Vertreter der Päd-AG KBT

Prof. Dr. med. Dietrich Beelen  
Klinik für Knochenmarktransplantation  
Universität Essen, Vertreter der DAG-KBT

Frau PD Dr. med. Dilloo  
Klinik für Kinderonkologie, -hämatologie und Klinische Immunologie  
Universität Düsseldorf, Vertreterin der GPOH

Prof. Dr. med. Hermann Eichler  
Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin  
Universität des Saarlandes, Vertreter der DGTI

Dr. med. Johannes Fischer  
Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika  
Universität Düsseldorf, Vertreter der DGTI

Frau Dr. med. Kristina Hölig  
Medizinische Klinik und Poliklinik I, Transfusionsmedizin  
Universität Dresden, Vertreterin der DGHO

Prof. Dr. med. Rainer Moog  
Münchener Blutbank GmbH, Vertreter der DGTI

PD Dr. med. Michael Müller-Steinhardt  
DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg Hessen  
Universität Heidelberg Fakultät Mannheim, Vertreter der DGTI

PD Dr. med. Torsten Tonn  
DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg Hessen  
Universität Frankfurt, Vertreter der DGTI

Dr. med. Markus Wiesneth  
DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg Hessen  
Universität Ulm, Vertreter der DGTI

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einführung in die Thematik</b>	<b>5</b>
1.1. Einleitung und historischer Überblick	5
1.2. Gesetzliche Grundlagen und Definitionen	8
1.3. Stammzellbiologie	9
<b>2. Produkt</b>	<b>13</b>
2.1. Gewinnung	13
2.2. Prozessierung	16
2.3. Zusammensetzung des Transplantates	17
2.4. Prüfverfahren	21
<b>3. Präklinischer Überblick (entspricht Modul 2.4)</b>	<b>23</b>
3.1. Übersicht der präklinischen Prüfstrategie	23
3.2. Pharmakodynamik	23
3.3. Pharmakokinetik	25
3.4. Toxikologie	27
3.5. Zusätzliche Angaben	27
3.6. Gesamtübersicht und Schlussfolgerungen	28
3.7. Literatur und Referenzen	28
<b>4. Klinischer Überblick (entspricht Modul 2.5)</b>	<b>29</b>
4.1. Klinische Entwicklungsstrategie und Programm	29
4.2. Übersicht zur klinischen Pharmakologie	29
4.3. Übersicht zur Wirksamkeit/Funktionalität	29
4.4. Übersicht zur Sicherheit	32
4.5. Nutzen-Risiko-Bewertung	37
4.6. Zusätzliche Angaben	37
4.7. Literatur und Referenzen	38

## 5. Anlagen

5.1. Anlage 1	47
Zusammenfassung und Bewertung der toxiko-pharmakologischen Daten und Informationen zu Dimethylsulfoxid (DMSO) im Hinblick auf seine Verwendung in Stammzellzubereitungen (36 Seiten)	
Dr. Peter Günzel, Berlin und Prof. Dr. Hermann Eichler, Homburg	
5.2. Anlage 2	48
Muster einer Behältnisbeschriftung (deutsch / englisch) (1 Seite)	
Dr. Markus Wiesneth, Ulm und Frau Dr. Kristina Hölig, Dresden	
5.3. Anlage 3	49
Muster einer Produktinformation (Modul 1.3) (7 Seiten)	
Dr. Markus Wiesneth, Ulm und Frau Dr, Kristina Hölig, Dresden	
5.4. Anlage 4	50
Musterliste Qualitätsbestimmender Parameter Stand 02.02.2009 (3 Seiten) der Arbeitsgemeinschaft „Genehmigungsverfahren für Stammzellzubereitungen“	
5.5. Anlage 5	51
Lebensläufe der Sachverständigen zu der Gemeinsamen Stellungnahme	

## **1. Einführung in die Thematik**

### **1.1. Einleitung und historischer Überblick**

Die gemeinsam erstellte und beim Paul-Ehrlich-Institut hinterlegte Stellungnahme der Fachgesellschaften DGTI, DGHO und GPOH dient insbesondere als Äquivalent zur Beantwortung der Module 2.4 und 2.5 Präklinischer und Klinischer Überblick („common technical documents“) durch die Antragsteller, kann jedoch auch an anderer Stelle der Genehmigungsanträge zitiert werden. Der Klinische Überblick stellt eine kontinuierliche Weiterentwicklung der „vorläufigen“ DGHO-Stellungnahme (Prof. Ehninger, Dresden) vom Januar 2008 dar. Liegen keine eigenen präklinischen Daten vor, so entfällt für den Antragsteller die Beantwortung des Moduls 2.6. Für das Modul 2.7 wird eine sehr kurze Zusammenfassung der eigenen, retrospektiv erhobenen Qualitätsdaten (Modul 3) empfohlen; ein Querverweis auf diese Stellungnahme ist sicherlich hilfreich. Die Vergleichbarkeit des eigenen Stammzellproduktes mit den in dieser Stellungnahme behandelten Stammzellzubereitungen sollte gegeben sein und an mehreren Stellen des Antrages festgestellt werden. Es sei darauf hingewiesen, dass diese gemeinsame Stellungnahme auch eine Produktinformation und eine Behältnisbeschriftung als Muster enthält.

Die Stellungnahme versucht den gegenwärtigen Stand von Wissenschaft und Technik widerzuspiegeln. Alle Fachgesellschaften legen Wert auf die Feststellung, dass genehmigungspflichtige Stammzellzubereitungen als Arzneimittel einerseits einem hohen Qualitätsanspruch genügen müssen, jedoch andererseits als „Einzelchargen“ patientenindividuell hergestellt, geprüft und zu Transplantationszwecken freigegeben werden, um lebensbedrohlich erkrankten Patienten als kurative Therapie zu dienen. Somit sind autologe und insbesondere gerichtet hergestellte allogene Stammzellzubereitungen maßgeschneiderte Unikate des oder für den Einzelpatienten. Diese ärztlich-therapeutische Sichtweise fließt in die gegenwärtige Nutzen-Risiko-Bewertung von Stammzellzubereitungen unweigerlich mit ein und war historisch gesehen der Antrieb für Donall Thomas und seine Kollegen, die allogene Stammzelltransplantation als vernunftsbasiertes Therapiekonzept – trotz aller anfänglichen Enttäuschungen – weiterzuentwickeln (Thomas et al. 1957).

Für die 50er und 60er Jahre berichtete Bortin (1970), dass kein Patient von insgesamt 200 Patienten überlebte; diese katastrophalen Ergebnisse wurden erst durch eine der wichtigsten Erkenntnisse dieser Zeit überwunden. Von Dausset (1958) und van Rood (1958) konnten zeigen, dass genetische Faktoren für das Auftreten der Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) im Humanleukozytenantigen-System (HLA-System) liegen. Hierbei handelt es sich um eine überschießende Immunreaktion immunkompetenter Zellen, insbesondere von T-Lymphozyten im Knochenmark des Spenders, die gegen das Empfängergewebe gerichtet ist (Thomas and Fefer 1979).

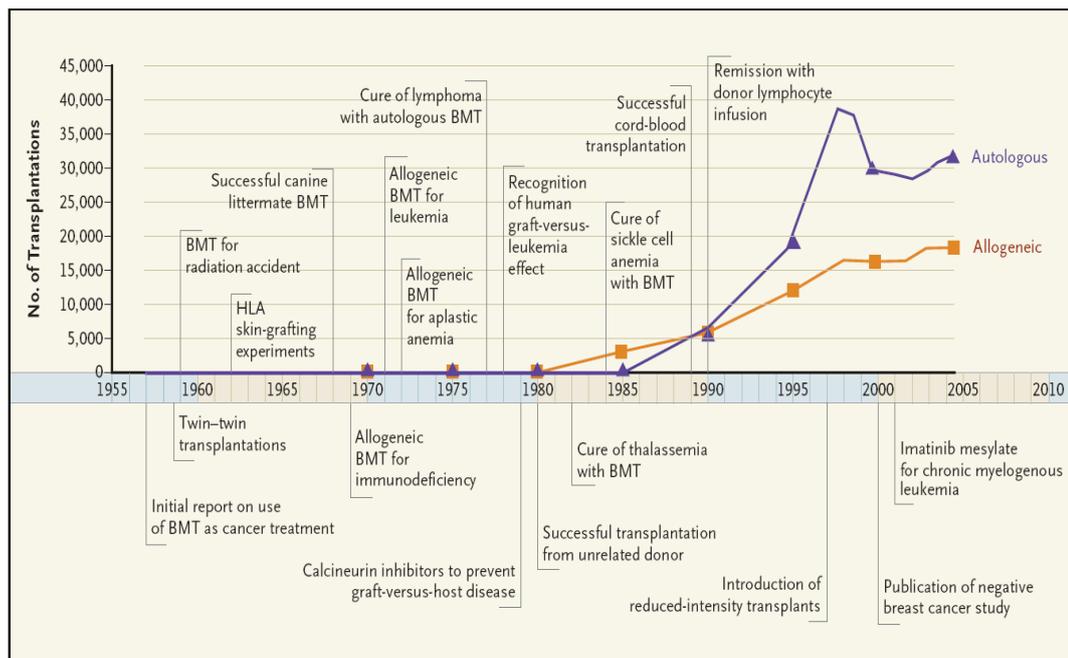
Nach den ersten erfolgreichen Transplantationen bei Kindern mit angeborenen Immundefekten, einem Patienten mit schwerer aplastischer Anämie und der allgemein verbesserten Supportivtherapie folgte dann die rasche Zunahme der Transplantationen in zahlreichen, sich etablierenden Transplantationszentren. 1979 wurde der erste Bericht über Transplantationen bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie in erster Remission vorgelegt (Thomas et al. 1979). Seit den 80er Jahren wurde die Stammzelltransplantation

zunehmend ein akzeptiertes Verfahren für die Behandlung vieler maligner und genetischer Erkrankungen. Einen großen Beitrag leisteten hierbei Fortschritte der Immungenetik mit der Entwicklung von molekulargenetischen Analysemethoden zur hochauflösenden Gewebetypisierung, die in den Aufbau eines weltweiten Netzwerks von freiwilligen unverwandten Stammzellspendern mündeten.

Anlässlich des „50. Geburtstages“ der ersten Publikation von Thomas et al. 1957 schrieb der jetzige Direktor des Fred Hutchinson Cancer Research Center (Clinical Research Division) Professor Frederick Appelbaum im *New England Journal of Medicine*:

„Yet Thomas’s persistence in the face of criticism and clinical failure ultimately paid off in a new form of therapy that was used to treat approximately 50,000 people worldwide in 2006.“

In dieser Publikation fasst Appelbaum die Meilensteine in der Weiterentwicklung der Knochenmark- und Stammzelltransplantation in einer Abbildung sehr anschaulich zusammen:



Thomas’ Idee, dass das Knochenmark eines Gesunden das Knochenmark eines Leukämiepatienten ersetzen könne, ging auf Versuche von Jacobson et al. (1949) zurück, bei denen Mäuse unter Aussparung der Milz letal bestrahlt wurden und überlebten. Die gleiche Protektion konnten Lorenz et al. (1951) nachfolgend für lange Röhrenknochen im Maus- und Meerschweinchen-Modell zeigen. Die Historie der Knochenmarktransplantation und ihre Entwicklung zu einer anerkannten Standardtherapie ist auch Gegenstand einer Übersichtartikels in *Nature Reviews 2002* von Marie-Terese Little und Rainer Storb.

Die gegenwärtigen Indikationen zur Stammzelltransplantation in Deutschland finden sich auf der Internetseite der DAG-KBT (<http://www.dag-kbt.de/inkat/Indikationskatalog>), die Behandlungsergebnisse werden in jährliche Berichten (Deutsches Register für Stammzelltransplantationen (DRST)) unter <http://www.drst.de> veröffentlicht.

## 1.2. Gesetzliche Grundlagen und Definitionen

Zum 1. August 2007 trat das „Gesetz über die Qualität und Sicherheit von menschlichen Geweben“ (Gewebegesetz) in Kraft. Zweck dieses Gesetzes ist die nationale Umsetzung der sogenannten Geweberichtlinie (Directive 2004/23/EG) der Europäischen Kommission. Das Gewebegesetz ist kein eigenständiges Gesetz sondern ein Artikelgesetz, das im Wesentlichen Paragraphen anderer Gesetze ändert, im nämlich Transplantationsgesetz, Arzneimittelgesetz und Transfusionsgesetz.

Der Paragraph 21 des Arzneimittelgesetzes regelt die Zulassungspflicht von Arzneimitteln, insbesondere von sogenannten Fertigarzneimitteln, die im Voraus hergestellt und nachfolgend in den Verkehr gebracht werden. Hierunter fallen die mittels Vollblutspende oder Apherese gewonnenen Blutkomponenten (Erythrozytenkonzentrat, Thrombozytenkonzentrat und Gefrorenes Frischplasma), die zur Hämotherapie nach Maß dienen. Die Zulassung ist vom pharmazeutischen Unternehmer zu beantragen und durch die zuständige Bundesoberbehörde - im Falle von Blutkomponenten dem Paul-Ehrlich-Institut in Langen – zu genehmigen bzw. zu versagen. Expressis verbis sind jedoch Gewebezubereitungen (§21 Absatz 2 Satz 1d) mit Verweis auf den neuen §21a von dieser Zulassungspflicht ausgeschlossen.

### Paragraph 21a

*„Gewebezubereitungen, die nicht mit industriellen Verfahren be- oder verarbeitet werden und deren wesentliche Be- oder Verarbeitungsverfahren in der Europäischen Union hinreichend bekannt und deren Wirkungen und Nebenwirkungen aus dem wissenschaftlichen Erkenntnismaterial ersichtlich sind, dürfen im Geltungsbereich dieses Gesetzes nur in den Verkehr gebracht werden, wenn sie abweichend von der Zulassungspflicht nach §21 Abs. 1 von der zuständigen Bundesoberbehörde genehmigt worden sind...“*

*Satz 1 gilt entsprechend für Blutstammzellzubereitungen, die zur autologen oder gerichteten, für eine bestimmte Person vorgesehenen Anwendung bestimmt sind.*

*Die Genehmigung umfasst die Verfahren für die Gewinnung, Verarbeitung und Prüfung, die Spenderauswahl und die Dokumentation für jeden Verfahrensschritt sowie die quantitativen und qualitativen Kriterien für Gewebezubereitungen. Insbesondere sind die kritischen Verarbeitungsverfahren daraufhin zu bewerten, dass die Verfahren die Gewebe nicht klinisch unwirksam oder schädlich für den Patienten machen.“*

Quasi im „Nebensatz“ wird die Genehmigungspflicht von Blutstammzellzubereitungen festgelegt. Es stehen grundsätzlich unterschiedliche Quellen für hämatopoetischen Stammzellzubereitungen zur Verfügung: Peripheres Blut (PB) nach Stimulation, Knochenmark (KM) und Nabelschnurblut (NSB).

Hämatopoetische Stammzellen des peripheren Blutes sind kein Gewebe sondern Blutzubereitungen und als „Blutstammzellzubereitungen“ expressis verbis genannt, wohingegen hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks keine Blutzubereitungen sind sondern Gewebe, jedoch auch unter die Genehmigungspflicht fallen.

Für die Transplantation können patienteneigene (autologe) oder von einer fremden Person gewonnene (allogene) hämatopoetische Stammzellen genommen werden. Hierbei verfolgen diese zwei Möglichkeiten der hämatopoetischen Stammzelltransplantation grundsätzlich unterschiedliche therapeutische Ziele:

**Autologe Transplantation ⇒ Überbrückung der Knochenmark-Aplasie**

**Allogene Transplantation ⇒ Primärer Ersatz des kranken Knochenmarks**

Bei der allogenen Transplantation wird neben der sehr seltenen syngenen Transplantation (eineiige Zwillinge) zwischen Verwandten- bzw. Fremdspende einerseits und HLA-identer bzw. HLA-nichtidentischer Transplantation unterschieden.

Zusammenfassend sind nachfolgend genannte „Stammzellzubereitungen“ genehmigungspflichtig und Gegenstand dieser Stellungnahme:

- 1. und 2.) Hämatopoetische Stammzellen des Peripheren Blutes (PB)  
Autolog und Allogen (gerichtet)**
- 3. und 4.) Hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarkes (KM)  
Autolog und Allogen (gerichtet)**
- 5.) Hämatopoetische Stammzellen des Nabelschnurblutes (NSB)  
Allogen (gerichtet)**

Allogene Stammzellen aus PB und KM werden nicht im Voraus ungerichtet hergestellt. Stammzellen aus NSB werden dagegen in Nabelschnurbanken im Voraus ungerichtet hergestellt und unterliegen somit als Blutzubereitung der Zulassungspflicht nach §21.

### **1.3. Stammzellbiologie**

Die Hämatopoese beschreibt den physiologischen Prozess der Blutzellbildung, insbesondere der nachfolgend genannten ausgereiften, zellulären Elemente: Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten der T- und B-Zellreihe und Natürliche Killerzellen. Die Basis dieser Hämatopoese bilden hämatopoetische Stammzellen, die – dank Ihrer „Pluripotenz“ – in der Lage sind, in liniendeterminierte Vorläuferzellen und hochspezialisierte reife Blutzellen zu proliferieren und differenzieren. Nach der Geburt findet die Blutbildung ausschließlich im Knochenmark statt. Historisch gesehen wurden üblicherweise diese Stammzellen im Knochenmarkblut durch Punktion des Beckenkamms gewonnen und nachfolgend transplantiert. Die hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen aller Reifestadien nisten in durch Knochenmarkstroma ausgekleideten Spongiosabälkchen; hierbei wird eine osteoblastäre von einer vaskulären Nische unterschieden (Moore und Lemischka 2006, Wilson und Trumpp 2006, Kiel und Morrison 2008). Zelluläre Elemente des Knochenmarkstromas sind typischerweise Fibroblasten, Makrophagen, Osteoblasten, Endothelzellen und Adipozyten. Unter normalen physiologi-

schen Bedingungen sind die pluripotenten Stammzellen in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus (Ladd et al. 1997, Gothot et al. 1998, Arai und Suda 2007). Die geringe replikative Aktivität erlaubt die effiziente Nutzung von DNA-Reparationsmechanismen und trägt wesentlich zum Schutz der genetischen Integrität bei (Cairns 1975, Jordan und Lemischka 1990, Liu et al. 2009, Viale et al. 2009). Pluripotente Stammzellen verfügen darüber hinaus über die Eigenschaft einer (un-)begrenzten Selbsterneuerungskapazität, die zumindest die lebenslange Aufrechterhaltung der Hämatopoese im menschlichen Körper gewährleistet. Diese beiden Stammzeleigenschaften – Selbsterneuerungs- und „pluripotente“ Differenzierungskapazität – wurden durch zahlreiche tierexperimentelle als auch zellbiologische Studien belegt (siehe Kapitel 3 Präklinischer Überblick). Auf diesen Erkenntnissen basiert die Rationale der Transplantationsmedizin, Stammzellen des Knochenmarks eines fremden, gesunden Individuums als Ersatz für erkranktes oder zerstörtes Knochenmark eines Patienten zu verwenden. Die Expression von Adhäsionsmolekülen erleichtert die hämatopoetische Rekonstitution nach myeloablativer Therapie. Das Anwachsen der Stammzellen erfordert neben der richtigen Dosis und Qualität der Stammzellen eine adäquate Mikroumgebung, um das Einnisten („homing“) der transplantierten Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark zu ermöglichen.

Analog zu den im Knochenmark vorhandenen pluripotenten Stammzellen konnten ebensolche Stammzellen im peripheren Blut nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden zahlreiche Wachstumsfaktoren mit koloniestimulierender Wirkung in den achtziger Jahren entdeckt und klinisch erprobt, so zum Beispiel das G-CSF und GM-CSF (Welte et al. 1985, Socinski et al. 1988, Dühsen et al. 1988, Haas et al. 1990). Insbesondere Chemotherapeutika und/oder Wachstumsfaktoren tragen dazu bei, dass vermehrt Stammzellen vom Knochenmarkkompartiment in die Blutzirkulation übertreten (Morrison et al. 1997). Der heutzutage rekombinant hergestellte Wachstumsfaktor G-CSF ist in der Lage, beim Patienten aus dem „steady state“ oder nach Chemotherapie CD34+ Stammzellen effektiv (in der Regel bis Faktor 100) aus dem Knochenmark in das periphere Blut zu mobilisieren (Haas et al. 1990). Zusätzlich wurde G-CSF auch bei gesunden allogenen Familien- oder Fremdspendern erfolgreich eingesetzt und die Indikation zur Gabe von G-CSF diesbezüglich erweitert (Dreger et al. 1994). G-CSF ist in zwei verschiedenen Formen (nicht-glykolisiert/glykolisiert) zugelassen. Die Handelsnamen sind Filgastrim, Neupogen, Lenograstim, Granocyte. Die Standarddosierung beträgt 5-10µg G-CSF, in begründeten Ausnahmefällen 16µg G-CSF s.c./kgKG pro Tag (ggf. verteilt auf 2 Tagesdosen) über eine variable Zeitspanne nach Chemotherapie im autologen Setting und über 5 Tage (4-6 Tage) bei gesunden allogenen Spendern, hier mit einer Dosisbegrenzung auf 10µg/kgKG/d (Weaver et al. 1998). Der Mobilisationserfolg ist sehr variabel. Wichtigste Einflussgrößen sind neben der Grunderkrankung (Knochenmarkbefall) die Art der vorangegangenen Therapie (Chemotherapie bzw. Radiatio) und das Lebensalter (Desikan et al. 2001).

Weitere Faktoren sind gegenwärtig zur noch effektiveren Mobilisierung derselben hämatopoetischen, CD34 exprimierenden Stammzellen in klinischer Erprobung (zum Beispiel Stemgen als rekombinant hergestellter Stammzellefaktor und Mozobil (Plerixafor) als CXCR4 Antagonist. Ihr zukünftiger Stellenwert in der klinischen Routine bleibt abzuwarten.

Als dritte und alternative Stammzellquelle kommen Stammzellen aus Nabelschnurblut in Betracht (Gluckman et al. (2005), Hofmeister et al. (2007)). Diese werden sowohl bei Kindern als auch mit Einschränkung bei Erwachsenen zu Transplantationszwecken eingesetzt. Das Nabelschnurblut ist relativ reich an CD34+ Stammzellen (ca. 0,1% aller kernhaltigen Zellen), die zur vollständigen hämatopoetischen Rekonstitution befähigt und in dieser Eigenschaft den anderen Stammzellquellen gleichwertig sind.

Zur Charakterisierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (unabhängig von den o.g. Quellen) dienen unter anderem spezielle Kultivierungsverfahren. Sehr unreife Vorläuferzellen, die der pluripotenten Stammzelle hierarchisch nachfolgen, können in sogenannten Langzeitkulturen auf Stromabasis als *long term culture-initiating cells* (LTC-IC) und als *cobble stone area forming cells* (CAFC) bestimmt werden (Sutherland et al. 1989, Ploemacher et al. 1989). Andere Vorläuferzellen differenzieren in Kurzzeitkulturen in semisoliden Medien und unter geeigneter Zytokinstimulation zu unterschiedlichen Kolonien (CFU-GM, CFU-E/BFU-E und CFU-Meg). Alle Kultursysteme sind sehr zeitaufwendig, stör anfällig und nur gering standardisiert. Differenzierte Aussagen zur „Pluripotenz“ der eingesetzten Stammzellen lassen sich ebenso wenig ableiten wie verlässliche Vorhersagen der hämatopoetischen Kurzzeit- oder Langzeit-Rekonstitution im Patienten (Jansen et al. 2007). In Ergänzung zur „Vitalitätsbestimmung“ von Zellen (Anfärbbarkeit der Zellwand bzw. des Zellkerns) haben die Kurzzeitkulturen mit Koloniebildung zumindest zu Validierungszwecken von Teilprozessen in der Herstellung und mit den o.g. Einschränkungen auch als intern verwendeter Qualitätsparameter (Stichprobe) ihre Berechtigung (Sheikhzadeh et al. 2001). Als allgemein verbindlicher und immer durchzuführender Prüfparameter konnte sich der Nachweis von Kolonien, insbesondere ein zu fordernder Mindestgehalt an CFU-GM nicht durchsetzen.

Zum immunphänotypischen Nachweis von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen steht seit Mitte der 80er Jahre das CD34 Oberflächenantigen zur Verfügung, dessen Funktion bis heute nicht eindeutig geklärt ist und das auch auf Endothelzellen und einigen maligne entarteten Zellen exprimiert wird (Civin et al. 1984). Üblicherweise werden CD34+ Stammzellen heutzutage durchflußzytometrisch unter Hinzugabe der Streulichteigenschaften ( $FSC_{low-med}$ ,  $SCC_{low}$ ) und CD45 Koexpression ( $CD45_{low}$ ) gemäß ISHAGE Protokoll charakterisiert und quantifiziert (Keeney et al. 1998). Eine kleine Subpopulation an CD34-positiven Stammzellen tragen keine weiteren liniendeterminierenden Merkmale auf ihrer Oberfläche (negativ für CD33, CD38 und HLA-DR) und/oder exprimieren den Rezeptor für den Stammzellfaktor (CD117, c-kit); dieser Subpopulation werden sehr unreife, pluripotente Eigenschaften zugeschrieben (Sutherland et al 1990, Rusten et al. 1994). Die Fraktion der CD34-positiven Zellen enthält auch Zellen, die zur Koloniebildung befähigt sind. Je nach Differenzierungsgrad und -richtung werden weitgehend linienspezifische Antigene auf ihrer Zelloberfläche koexprimiert, so z. B. CD33 und HLA-DR für die myeloische Zellreihe. Heute sind mehr als 250 Oberflächenantigene in der CD-Klassifikation zusammengefasst. Mit voranschreitender Differenzierung geht das CD34 Merkmal verloren. Die Entwicklung monoklonaler Antikörper und Weiterentwicklung moderner Durchflußzytometer erlauben heute die schnelle und simultane Charakterisierung und Quantifizierung von solchen Stammzellpopulationen in Suspensionslösung.

Die Existenz von hämatopoetischen Stammzellen, die nicht das CD34 Antigen tragen und eventuell hierarchisch sehr unreife, frühe Stammzellen darstellen könnten, ist von mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesen worden (Osawa et al. (1996), Goodell et al. (1997)); eine klinische Bedeutung im Rahmen der Transplantationsmedizin haben sie bis heute jedoch nicht erlangt und finden in dieser Stellungnahme keine weitere Berücksichtigung.

## 2. Produkt

### 2.1. Gewinnung

Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen können – wie oben bereits erwähnt – grundsätzlich aus dem peripheren Blut, Knochenmark und Nabelschnurblut gewonnen werden. Sowohl bei der autologen als auch bei allogenen Transplantation werden heutzutage sehr viel seltener als früher Stammzellen aus dem Knochenmark entnommen.

Die Knochenmarkentnahme erfolgt gewöhnlich im Operationssaal unter Vollnarkose und Bauchlagerung des Patienten bzw. Spenders. Die hinteren Beckenkämme (seltener die vorderen Beckenkämme oder das Sternum) werden mehrfach (bis zu 150mal) punktiert (gewöhnlich erfolgen mehrere Hautschnitte mit sternförmigen Punktionen), unter sterilen Bedingungen Knochenmarkaspirate mit Heparinzusatz in 2 bis 10ml Aliquots entnommen und in ein geschlossenes Beutelsystem überführt. Unmittelbar nach der Gewinnung wird das gesammelte Knochenmarkblut über ein Filtersystem gegeben, um Knochensplitter, Fibringerinnsel, Zellaggregate und Fettpartikel zu entfernen. Das Knochenmarkblut wird (noch im Operationssaal) in einem Zwischenlagerungsbeutel aufgefangen und zur weiteren Prozessierung in das weiterverarbeitende GMP-Labor verbracht. Das Volumen beträgt zu diesem Zeitpunkt in Abhängigkeit zum Körpergewicht des Empfängers 500 bis 1500ml Knochenmarkblut (10-15ml pro kg KG des Empfängers). Der Blutverlust des Knochenmarkspenders wird über kolloidale Lösungen oder über autologe Erythrozyten, die zuvor entnommen wurden, ausgeglichen. Die postoperative Überwachung erfolgt mit Blutdruck- und Pulskontrolle und einer ausreichenden Analgesie. Üblicherweise können Spender spätestens nach 24 Stunden nach Knochenmarkentnahme entlassen werden.

Häufig sind nach der primären Gewinnung von Knochenmark weitere „Manipulationen“ zur Teilung oder Volumeneinengung erforderlich. Eine Plasmaentfernung durch Zentrifugation wird in der Regel bei pädiatrischen Empfängern (mit geringem Körpergewicht) oder bei ABO Minor-Inkompatibilität angewendet (Spenderplasma enthält Antikörper gegen Antigene des Empfängers), um unmittelbare Hämolysen nach Transplantation zu vermeiden. Trotzdem können auch immunkompetente Spenderlymphozyten gegen die Blutgruppenantigene des Empfängers Antikörper primär bilden und nachfolgende Hämolysen verursachen. Volumeneinengungen bzw. Buffycoat-Präparationen erfolgen zur Entfernung des Erythrozytensediments vor anschließender Kryokonservierung und darüber hinaus bei Major-Inkompatibilität im ABO- oder anderen Blutgruppensystemen (Empfängerplasma enthält Antikörper gegen Erythrozytenmerkmale des Spenders). Auch hier besteht die Möglichkeit einer verzögerten Hämolyse durch nicht eliminierte, Antikörperproduzierende Lymphozyten, die Antigene auf Erythrozyten, die aus dem Stammzelltransplantat hervorgegangen sind, erkennen. Stammzellsuspensionen, die aus Knochenmark gewonnen werden, werden – soweit erforderlich - analog zu Blutstammzellen kryokonserviert, so dass hierauf verwiesen wird.

Die Entnahme von Stammzellen aus der Blutzirkulation ist nur unter bestimmten Voraussetzungen möglich, die nachfolgend beschrieben werden. Im peripheren Blut von Patienten und gesunden Individuen zirkulieren nur sehr wenige Stammzellen (~0,01% aller Leukozyten). Für die Gewinnung von autologen Blutstammzellen machte man sich die

Beobachtung zunutze, dass nach Abklingen der zytostatischen Therapie sich das Knochenmark „synchronisiert“ zu teilen beginnt und entsprechend eines „Rebound“-Effektes vermehrt hämatopoetische Stammzellen in das periphere Blut übertreten. Richman et al. (1976) konnten bei Patienten mit hochdosierter Cyclophosphamid-Monotherapie im peripheren Blut nach Durchschreiten des Leukozytennadirs vermehrt koloniebildende Zellen nachweisen. Ende der 70er Jahre führten Körbling et al. (1981) die Stammzellapheresen mit einem kontinuierlichen Durchflusszellseparator bei Patienten und freiwilligen Spendern ein und zeigten eine hohe Ausbeute an hämatopoetischen Vorläuferzellen in der mononukleären Zellschicht, die befähigt waren, ebenfalls Kolonien („*colony-forming cells*“) auszubilden. Zu diesem Zeitpunkt war weder das „Stammzell“-Antigen CD34 beschrieben noch die Wirkung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren bekannt.

Mitte der 80er Jahre beschrieben – unabhängig voneinander - mehrere Gruppen, die autologe Transplantation solcher „unprimed“ Blutstammzellen mit vollständiger oder inkompletter hämatopoetischer Rekonstitution des Patienten (Juttner et al. (1985), Kessinger et al. (1986), Körbling et al. (1986)). Die allogene Transplantation von nicht-mobilisierten Blutstammzellen beschränkt sich auf Fallberichte einzelner Patienten (Kessinger et al. (1989)). Insgesamt bleibt heute jedoch festzuhalten, dass die alleinige Chemotherapie-vermittelte Mobilisation von PBSZ aufgrund zu geringer Effizienz nicht in den klinischen Alltag einzog.

Die Mobilisation größerer Mengen hämatopoetischer Stammzellen aus peripherem Blut gelang erst Ende der 80er Jahre mit der Erkenntnis, dass bestimmte Wachstumsfaktoren (Zytokine) in der Lage sind, Stamm- und Vorläuferzellen der Hämatopoese aus dem Knochenmark in das periphere Blut auszuschleusen. Hierbei steigt der Gehalt an Stammzellen im peripheren Blut durchschnittlich um Faktor 100 (Bandbreite: 20 – 200). Der bekannteste und bestverträglichste Vertreter dieser Wachstumsfaktoren ist das G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), dessen Einführung die autologe Stammzelltransplantation Mitte der 90er Jahre sprunghaft ansteigen ließ. Subkutan appliziertes G-CSF kam hierbei allein („*steady-state*“ Mobilisation) oder in Kombination mit Chemotherapeutika (z.B. Cyclophosphamid) zum Einsatz.

Erst später wurde das stammzellmobilisierende Potential von G-CSF auch im Rahmen der allogenen Stammzellspende von gesunden Freiwilligen ausgenutzt. Die akuten und langfristigen Nebenwirkungen von G-CSF im gesunden Spenderorganismus sind nicht Gegenstand dieser Stellungnahme. Es wird hier auf die Dokumentation der pharmazeutischen Industrie, Stellungnahmen nationaler/internationaler Knochenmark-Spenderegister (ZKRD, WMDA) und internationale Literatur verwiesen (Pamphilon et al. (2006), Goldman et al. (2006)). Am 4. oder 5. Tag wird mit der peripheren Blutstammzellsammlung begonnen. Das Aphereseprodukt kann bis zu 72 Stunden bei  $4 \pm 2$  °C aufbewahrt werden. Wird die angestrebte Zieldosis nicht erreicht und bestehen keine weiteren Kontraindikationen hinsichtlich der Spendertauglichkeit kann unter Fortführung der G-CSF Applikation eine zweite Apherese durchgeführt werden. Bei einer einrichtungsinternen oder durch Transport bedingten Zwischenlagerungszeit von mehr als 24 Stunden sollte zum besseren Erhalt der Zellvitalität angestrebt werden, eine Konzentration der kernhaltigen Zellen von  $300 \times 10^6$  / ml nicht zu überschreiten. Dies kann z. B. durch Zugabe von autologem Plasma oder Plasmaersatzlösung (Humanalbumin: 2-10% Endkonzentration) erfolgen.

Stammzellapheresen werden unter unmittelbarer ärztlichen Aufsicht und Anleitung durch besonders geschultes und qualifiziertes Personal durchgeführt. Das extrakorporale Volumen wird zur Gewährleistung einer guten Verträglichkeit gering gehalten, liegt in der Regel bei 150-300ml und sollte 15% des individuellen Körperblutvolumens nicht überschreiten. Das prozessierte Vollblut sollte in Anbetracht der derzeit noch gültigen Richtlinien von 1997 in der Regel das Vier- bis Fünffache des Körperblutvolumens nicht überschreiten. In begründeten Ausnahmefällen erscheint heute die Prozessierung des sechsfachen Blutvolumens ärztlich vertretbar zu sein und zum Stand von Wissenschaft und Technik zu werden. Der venöse Zugang erfolgt über periphere Venen; gegebenenfalls ist die Anlage eines zentralvenösen Katheters erforderlich. Die Antikoagulation erfolgt mit gebrauchsfertigen Zitratlösungen (ACD-A) gemäß den Angaben des Medizinprodukteherstellers. Zusätzlich kann Heparin appliziert werden.

Das Aphereseprinzip basiert - vergleichbar zur Gewinnung von Thrombozyten – auf einer kontinuierlichen Zentrifugation mit Hilfe eines Zellseparators. Das technische Prinzip dieser Zellseparatoren ist seit Jahrzehnten bekannt und Bestandteil zahlreicher Herstellungsverfahren von zugelassenen Arzneimitteln insbesondere Thrombozytenkonzentrat in Deutschland. Infolge der variablen Zellgröße und Zelldichte einzelner Blutbestandteile und den daraus resultierenden unterschiedlichen Sedimentationseigenschaften von Zellpopulationen, werden diese aufgetrennt und angereichert. Die gewünschten Zielzellen, also die zirkulierenden Blutstamm- und Vorläuferzellen haben ein ähnliches Sedimentationsverhalten wie mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten), so dass die Stammzellpopulation immer eine kleine Fraktion (Richtwert: 0,1% – 5%) der gesammelten mononukleären Zellen darstellt. Eine ausschließliche Sammlung von Stammzellen mittels physikalischer Zelleigenschaften ist nicht möglich. Darüber hinaus ist regelhaft eine „Verunreinigung“ durch andere kernhaltige Leukozyten (Granulozyten) und kernlose Zellen (Erythrozyten und Thrombozyten) vorhanden. Der Grad der Verunreinigung ist von vielen Faktoren abhängig, unter anderem vom „Ausgangsmaterial“ des Patienten bzw. Spenders (Differentialblutbild), der Stammzellkonzentration im peripheren Blut, dem technischen Aufbau und der Feinjustierung des verwendeten Zellseparators. Die pharmakologisch-toxikologische Bewertung der sonstigen zellulären Bestandteile und ihrer Abbauprodukte (Erythrozyten, Thrombozyten, Zelldebris) findet sich in Kapitel 4.4.

Ende der achtziger Jahre wurde Nabelschnurblut als alternative Stammzellquelle in-vitro evaluiert (Broxmeyer et al. 1989). In einem im Vergleich zu Knochenmark und Blutstammzellen sehr viel geringeren Ausmaß werden auch Stammzellen aus Nabelschnurblut eines gesunden Geschwisterkindes gewonnen, prozessiert und nachfolgend gerichtet transplantiert. Diese Konstellation ist von der zulassungspflichtigen Herstellung von Nabelschnurblut als Fertigarzneimittel zur ungerichteten Anwendung zu unterscheiden. Für die Gebärende und für das Neugeborene darf durch die Nabelschnurblutentnahme kein zusätzliches Risiko entstehen. Die Kriterien zur Spendefähigkeit sind in Richtlinien weitgehend geregelt. Die Entnahme und Weiterverarbeitung wird im Detail unterschiedlich gehandhabt; jedoch basiert sie in der Regel auf der sterilen Gewinnung von 50 – 200ml Nabelschnurblut in einem speziellen Blutbeutelssystem nach Punktion der Nabelschnurgefäße (Eichler et al. 2003). Diese Prozedur erfolgt nach der Abnabelung des Neugeborenen und der Geburt der Plazenta. In der Regel erfolgt eine Volumenreduktion und gegebenenfalls eine standardisierte Kryokonservierung.

Die Konzentration an kernhaltigen Zellen Stammzellen ist sehr heterogen und liegt im Mittel zwischen  $5 - 20 \times 10^8$  pro Einheit. Gemäß den Richtlinien von 1999 wird eine Mindesttransplantationsdosis von  $3 \times 10^7$  pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers angestrebt; eine Unterschreitung bis zu  $2 \times 10^7$  /kg KG erscheint in begründeten Ausnahmefällen, insbesondere in der gerichteten Konstellation gerechtfertigt zu sein und international zum anerkannten Stand von Wissenschaft und Technik zu werden (EBMT Handbook). Im Gegensatz zu Stammzellzubereitungen aus Knochenmark und peripherem Blut ist die Angabe einer CD34 Mindestkonzentration im Sinne einer Transplantationsdosis nicht Standard, obwohl eine durchflusszytometrische Analyse der CD34+ Zellen in der Regel durchgeführt wird und somit der CD34+ Gesamtgehalt angegeben werden kann. Aufgrund kernhaltiger Erythroblasten müssen geeignete Methoden zur Bestimmung der kernhaltigen Zellen bzw. der CD34+ CD45+ Zellen selbstverständlich Berücksichtigung finden. Bezüglich der Infektionsdiagnostik und zum Ausschluss einer potentiellen bakteriellen Kontamination werden dieselben Untersuchungen mit einer 100% Prüffrequenz wie bei allen anderen gerichteten allogenen Stammzellzubereitungen durchgeführt und bewertet.

## 2.2. Prozessierung

Autologe und allogene Stammzellzubereitungen können weiteren Prozessierungsschritten unterzogen werden. Insbesondere sind hier Positiv- und Negativselektionsverfahren vor Anreicherung von Zielzellen bzw. zur Entfernung unerwünschter Zellen zu nennen. Die Systeme und Reagenzien zu diesen Verfahren unterliegen dem Medizinproduktegesetz. Die Prozessierung von Stammzellzubereitungen mittels solcher Verfahren erfolgt in hierfür geeigneten Räumen, in der Regel in behördlich abgenommenen Reinräumen gemäß dem GMP-Leitfaden (Annex 1). Im autologen Therapieansatz basieren diese Prozessierungsschritte auf der Rationalen, potentielle Tumorzellen des Patienten im Transplantat zu entfernen. Da es sehr viele verschiedene Tumorerkrankungen gibt und die Tumorzellen zum größten Teil keine spezifischen Tumormerkmale auf ihrer Oberfläche tragen, wird eine immunmagnetische CD34-Positivselektion der Stammzellen durchgeführt. Hier ist also auszuschließen, dass die Tumorzellen bzw. Leukämieblasten das Merkmal CD34 selbst auf ihrer Oberfläche tragen. Im Rahmen der allogenen Transplantation ist die Rationale eine gänzlich andere. Die großen Mengen an kontaminierenden T-Lymphozyten können im konditionierten Empfängerorganismus anwachsen und neben einer gewollten Antitumorwirkung auch eine gefürchtete Komplikation, die Spendergegen-Wirt-Erkrankung (*graft versus host disease*) auslösen. Hier steht nicht die Aufreinigung der CD34+ bzw. CD133+ Stammzellen, sondern - zur Vermeidung oder Reduktion dieser überschießenden Immunreaktion und zur Vermeidung einer EBV induzierten lymphoproliferativen Erkrankung nach allogener Stammzelltransplantation - vielmehr die Entfernung der T-Lymphozyten bzw. B-Lymphozyten mittels monoklonaler Antikörper (immunmagnetische CD3-/CD19-Depletion) im Vordergrund.

Aus klinischer Sicht konnte mit diesem Therapieansatz eine Verminderung der Graft-versus-Host-Erkrankung erreicht werden. Das Gesamtüberleben wurde aber nicht signifikant beeinflusst, da die T-Zelldepletionsverfahren eine verlängerte Immuninkompetenz

mit Häufung von Infektionen und teilweise auch ein erhöhtes Risiko von Transplantatversagen oder Rezidiven der Grunderkrankung beobachtet wurde. Eine effektive T-Zelldepletion ist für die erfolgreiche Transplantation von Zellen mit einem Mismatch in mehreren HLA-Loci bis hin zu einer Identität in nur einem Haplotypen (haploidente Transplantation) zwingend erforderlich. Die Ergebnisse mit einer alleinigen intensivierten Pharmakoprophylaxe der GvHD waren mit einer hohen transplantationsbezogenen Letalität belastet und werden daher nur noch selten durchgeführt.

Heutzutage finden insbesondere immunmagnetische Verfahren zur selektiven Aufreinigung von Zellsubpopulationen Anwendung, bei denen - durch Eisen markierte Antikörper vermittelt - entweder die Zielzellen (z.B. CD34+ oder CD133+ Stammzellen) zu Transplantationszwecken mittels Magnet gesammelt werden oder die unerwünschte Zellfraktion, ebenfalls durch Markierung mittels solcher Antikörper (z.B. CD3/CD19 Depletion von T- und B-Lymphozyten) entfernt wird. Es sei in diesem Zusammenhang erwähnt, dass auch die oben erwähnte Stammzell-Positivselektion mit einer weitgehenden Entfernung der T- und B-Zellen einhergeht; jedoch werden darüber hinaus auch andere akzessorischen Zellen, wie zum Beispiel Natürlichen Killerzellen entfernt, die bei der CD3/CD19 Depletion dem Transplantat erhalten bleiben. Die zuletzt genannten selektiveren Depletionsverfahren mittels anti-CD3 und anti-CD19 erhalten die NK-Zellpopulation und sind eventuell in der Lage die Komplikationsrate während der langen Immunsuppression in der sogenannten haploidenten Stammzelltransplantation zu reduzieren.

Aus dem Transplantat entfernte Lymphozyten können für Spenderlymphozyten-Transfusionen in Frage kommen und sollten dann kryokonserviert werden. Darüber hinaus werden sie auch vom allogenen Stammzellspender bei Bedarf (z.B. Rezidiv des Patienten) erneut mittels Zytapherese gewonnen. Diese Spenderlymphozyten-Transfusionen werden bei allogenen Transplantationen als zusätzliche „Immuntherapie“ im Sinne eines gegen den Tumor bzw. die Leukämie gerichteten Effektes (sog. GvL-Effekt) dosisabhängig eingesetzt. Sie unterliegen keiner Genehmigungspflicht und sind im Weiteren nicht Gegenstand dieser Stellungnahme. Allen immunmagnetischen Selektionsverfahren ist gemein, dass sie in einem weitestgehend geschlossenen „Prozessierungssystem“ mit zugelassenen Reagenzien erfolgen und heutzutage unter Reinraumbedingungen durchgeführt werden. Wichtigste Kenngrößen für eine erfolgreiche immunmagnetische Selektion sind die Wiederfindungsrate der Zielzellen (*recovery*) und die Reinheit der Zellen (*purity*). Eine Sterilitätsprüfung erfolgt nach Beendigung der zelltherapeutischen Manipulation am Endprodukt. Die pharmakologisch-toxikologische Bewertung residueller Bestandteile der immunmagnetischen Aufreinigung findet sich in Kapitel 4.4.

### 2.3 Zusammensetzung des Transplantats

Wie bereits ausgeführt stehen grundsätzlich verschiedene Stammzellquellen zu Transplantationszwecken zur Verfügung (peripheres Blut, Knochenmarkblut und Nabelschnurblut), deren zelluläre Zusammensetzung im Detail quantitativ und qualitativ unterschiedlich ist. Jedoch verfügen alle genannten Quellen über einen Anteil an CD34+ Stammzellen, die - im Prinzip morphologisch und funktionell vergleichbar – zur hämatopoetischen und immunologischen Rekonstitution im Empfängerorganismus befähigt sind. Diese

CD34+ Stammzellen stellen die arzneilich wirksame Substanz dar. Ihre Funktionalität und Wirksamkeit ist - unabhängig von der Quelle - nahezu identisch; lediglich die Konzentration im Ausgangsmaterial und der Grad ihrer Unreife variieren. Dies führt zu einer unterschiedlichen Kinetik der hämatopoetischen und immunologischen Rekonstitution im Empfängerorganismus nach autologer bzw. allogener Transplantation.

Die CD34+ Zellzahl ist heute das wichtigste, international akzeptierte Qualitätskriterium für Stammzellzubereitungen aus peripherem Blut. Nach den nationalen Standards und im Einklang mit der internationalen Literatur werden in der Regel folgende Transplantationsdosen angestrebt:

**$2-4 \times 10^6$  CD34+ Zellen pro kg Körpergewicht (autolog)**  
 **$4-8 \times 10^6$  CD34+ Zellen pro kg Körpergewicht (allogen)**

Für die Knochenmarktransplantation sind historisch keine belastbaren Daten publiziert worden, die eine eindeutige Korrelation zwischen dem CD34+ Zellgehalt und der Kinetik der hämatopoetischen und immunologischen Rekonstitution nachweisen konnten. Zu dieser Zeit wurde in Ermangelung des CD34 Markers empirisch auf die Konzentration kernhaltiger Zellen („*nucleated cells*“) referenziert. Es wurde und wird im internationalen Brauchtum zum Teil heute noch die nachfolgend genannte Transplantationsdosis angestrebt:

**$2-8 \times 10^8$  kernhaltige Zellen pro kg Körpergewicht (autolog und allogen)**

Später und nach der routinemässigen Etablierung von CD34 Messungen lösten G-CSF mobilisierte Blutstammzellen zumindest die autologe Transplantation von Knochenmark weitestgehend ab und nur ein kleineren Anteil der allogenen Stammzellzubereitungen erfolgt heute unter Verwendung von Knochenmarkblut. Die Sammlung und Transplantation von mindestens  $2 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kgKG kann bei Knochenmarkblut nicht immer realisiert werden. Dies hängt insbesondere auch von der Gewichts- und Alterskonstellation zwischen Spender und Empfänger ab, so dass unter sorgfältiger Risiko-Nutzen-Abwägung auch niedrigere Transplantationsdosen akzeptiert werden können. Eine Unterschreitung von  $1,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kgKG ist zu vermeiden.

Für die angegebenen Dosisbereiche gilt grundsätzlich, dass sich Regenerationszeit für die Myelo-, Erythro- und Megakaryopoese signifikant verkürzen kann, je stammzellreicher das Transplantat ist. Darüber hinaus verkürzt sich zumeist auch die Dauer der Transfusionsabhängigkeit.

Es können vielschichtige Gründe vorliegen, von diesen Regelgrößen abzuweichen. Als Beispiel für Unterschreitungen dieser Regelgrößen ist hier insbesondere die Konstellation einer schlechten Stammzellmobilisation bzw. -gewinnung und einer sehr dringlichen Transplantationsindikation bei einer fortgeschrittenen, lebensbedrohlichen Grunderkrankung bzw. eine bereits erfolgte Konditionierung zu nennen. Der mögliche Nutzen sollte mit dem Risiko einer verzögerten bzw. unvollständigen hämatopoetischen Rekonstitution bzw. einer irreversiblen Schädigung des Knochenmarks abgewogen werden. Das Fehlen von alternativen Therapieoptionen ist hierbei zu berücksichtigen. Auch Überschreitungen

der angegebenen Regelgrößen können durchaus begründet sein; insbesondere liegen keine verlässlichen Daten vor, die den Erlass einer definitiven Maximalkonzentration rechtfertigen würden. Als Beispiel für neue Therapieformen mit höherer Stammzellkonzentration seien hier die bereits erwähnten haploidenten Transplantationen erneut aufgeführt.

Die o.g. Stammzellzubereitungen (ohne weiteres Selektionsverfahren) enthalten unabhängig von ihrer Quelle alle löslichen und zellulären Bestandteile des Vollblutes bzw. Knochenmarkblutes als sogenannte „sonstige“ Bestandteile. Die zellulären Bestandteile können aufgrund des Ausgangsmaterials und des Gewinnungsverfahrens in ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung sehr variabel sein. Alle Stammzellprodukte enthalten in unterschiedlichem Ausmaß humanes Restplasma des Stammzellspenders. Die verwendeten Einfrierlösungen enthalten entweder spender- bzw. patienteneigenes Plasma oder alternativ zugelassenes humanes AB-Plasma bzw. als Arzneimittel zugelassene Human-Albuminlösungen (z.B. 5% oder 20%). Bezüglich des Kryoprotektivums Dimethylsulfoxid wird das Gutachten von Prof. Dr. Eichler, Homburg (Universität des Saarlandes) und Dr. Günzel, Berlin verwiesen. (siehe Anlage).

Die Stammzellprodukte enthalten darüber hinaus kontaminierende Erythrozyten, die sich bei der Gewinnung nicht gänzlich vermeiden und sich in Abhängigkeit zu der weiteren Verarbeitung nicht entfernen lassen. Der Erythrozytenausgangswert (Hämatokrit) des Stammzellspenders und das Verfahren zur Gewinnung sind hierbei wichtige Einflussgrößen. Das Erythrozytensediment liegt bei Stammzellzubereitungen aus peripherem Blut mittels Zytapherese und bei eingengtem Knochenmarkblut in der Regel unter  $\leq 10\%$  (Volumenprozent) mit einer mittleren Erythrozytenkonzentration von  $0,1 - 5 \times 10^6$  pro Produkt, währenddessen Knochenmarkblut nach Gewinnung auch einen Hämatokrit von mehr als 30% aufweisen kann. Stammzellzubereitungen, insbesondere aus Knochenmarkblut werden nur zu einem geringfügigen Anteil kryokonserviert; hierbei bleibt die Erythrozytenintegrität nicht erhalten; es entstehen Zelldebris und freies Hämoglobin.

Die Stammzellprodukte enthalten darüber hinaus kontaminierende Thrombozyten, die sich bei der Gewinnung nicht gänzlich vermeiden und bei der weiteren Verarbeitung nicht vollständig entfernen lassen. Der Thrombozytenausgangswert des Stammzellspenders und das Verfahren zur Gewinnung sind wichtige Einflussgrößen. Die Thrombozytenkonzentration in Stammzellzubereitungen ist hochvariabel und liegt in der Regel bei Produkten aus peripherem Blut bei  $0,1 - 5 \times 10^6$ . Eine Konzentration für Knochenmarkblut kann nicht angegeben werden. Stammzellzubereitungen werden zum Teil auch kryokonserviert; hierbei bleibt die Thrombozytenintegrität nicht erhalten. Es entsteht Zelldebris.

Stammzellzubereitungen ohne weitere Selektionsverfahren enthalten darüber hinaus regelhaft mononukleäre Zellen d.h. insbesondere Lymphozyten, Monozyten und deren Vorläuferzellen, denen gemeinsam ist, dass sie im Vergleich zu Stammzellen ähnliche Sedimentationseigenschaften haben. Darüber hinaus enthalten sie auch kontaminierende Granulozyten und deren Vorläuferzellen, die sich bei der Gewinnung nicht gänzlich vermeiden und bei der weiteren Verarbeitung nicht entfernen lassen. Es ist in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, dass die zelluläre Komposition der Stammzellprodukte ein Spiegelbild des jeweiligen Ausgangsmaterials ist. So finden sich in einem Stamm-

zellapheresat grundsätzlich die kernhaltigen Zellen mit unterschiedlichem Ausreifungsgrad wieder, die unter G-CSF Mobilisierung aus dem Knochenmark in das periphere Blut übergetreten sind. Analog gilt diese Feststellung auch für die zelluläre Komposition des Knochenmarks (Vorläuferzellen aller hämatopoetischen Zellreihen) und des Nabelschnurblutes (v.a. kernhaltige Erythroblasten). Aufgrund der heterogenen Zusammensetzung der Zellsuspension aus unterschiedlichen Zellsubpopulationen hatte sich historisch, insbesondere für die Knochenmarktransplantation die Gesamtheit aller kernhaltigen Zellen als Qualitätsparameter eingebürgert. Die absolute Gesamtmenge kernhaltiger Zellen war äußerst heterogen; sie variierte in der Regel zwischen  $10 \times 10^6$  und  $10 \times 10^7$  pro Stammzellprodukt eines Erwachsenen. Die „historische Richtschnur“ von mindestens 2 bis  $8 \times 10^6$  kernhaltiger Zellen (klassischerweise auf Knochenmarkblut bezogen) pro kg Körpergewicht ist heute in Deutschland weitgehend durch die CD34+ Zellkonzentration als qualitätsbestimmenden Parameter ersetzt oder ergänzt worden. Kernhaltige Zellen werden dagegen häufig nur noch bestimmt und deklariert ohne die Wertigkeit eines Akzeptanzkriteriums zu haben. Dies gilt nicht uneingeschränkt für importierte Stammzellzubereitungen aus dem europäischen Ausland oder den USA.

Stammzellzubereitungen mit weiteren Selektionsverfahren führen generell zu einer relativen Anreicherung der Zielzellen einerseits (bei gleichzeitigem Verlust der Absolutzellzahl) und zu einem Verlust aller sonstigen kontaminierender Zellpopulationen (mononukleäre Zellen einschließlich T- und B-Lymphozyten und NK-Zellen, ). Im Vordergrund steht bei diesen Verfahren die Positivselektion von CD34+ Zellen mittels Antikörper. Es wird eine möglichst hohe Reinheit an CD34+ Zellen angestrebt (> 90%); aufgrund des sehr unterschiedlichen CD34+ Zellgehaltes im Ausgangsproduktes (z.B. 0,1 bis 5%) variiert der relative CD34+ Anteil im Sinne der erzielbaren Reinheit im Endprodukt zwischen 50 und nahezu 100%. Die CD34+ Transplantationsdosis entspricht in der Regel der der nicht aufgereinigten Stammzellzubereitungen. Im Umkehrschluss ist der Anteil an verbleibenden mononukleären Zellen proportional geringer. Durch die gängigen immunmagnetischen Verfahren zur Positivselektion werden Erythrozyten und Thrombozyten weitgehend entfernt.

Analog zum Prinzip der CD34 Positivselektion hat sich ein weiteres Selektionsverfahren unter Verwendung von Antikörpern gegen das CD133 Antigen etabliert. CD133 wird nicht von allen CD34+ Zellen wohl aber insbesondere von der sogenannten CD34 bright Stammzellpopulation koexprimiert (Anteil von ca. 75%). Im Schaf- und Mausmodell konnten sie erfolgreich als Knochenmark repopulierende Zellen, anteilig auch in serieller Transplantationssequenz eingesetzt werden (Yin et al. (1997), Gordon et al. (2003)). Die bereits publizierten Daten lassen auch für den Menschen die Gleichwertigkeit in Bezug auf das hämatopoetische Rekonstitutionspotential dieser CD133 exprimierender Stammzellpopulation vermuten (Lang et al. (2005), Isidori et al. (2007)).

In Rahmen dieser fachlichen Stellungnahme sei darauf hin gewiesen, dass sowohl die Packungsgrösse als auch die Produktanzahl stark variieren kann; dies ist insbesondere von der Stammzellquelle und dem Transplantationszeitpunkt (frisch versus kryokonserviert) abhängig. So können bei Zwischenlagerung von Stammzellaphereseprodukten

Volumina von 400ml erreicht und bei Gewinnung von Knochenmark auch Volumina von 1000 ml überschritten werden. Für kryokonservierte Stammzellzubereitungen ohne weitere Selektion sind Packungsgrößen zwischen 40 -190mL üblich. Je nach Mobilisationserfolg, verwendeter Einfriertechnik und geplanter Transplantationsstrategie fallen im Regelfall 1-6 Produkte pro Transplantation an. Für kryokonservierte Stammzellzubereitungen mit weiteren Selektionsverfahren kommen üblicherweise Packungsgrößen zwischen 10 - 190mL zur Anwendung, die Produktanzahl liegt regelhaft bei 1-2 Produkten und nur in begründeten Ausnahmefällen darüber. Grundsätzlich sind die jeweiligen Volumina der Stammzellzubereitungen zu bestimmen und zu deklarieren oder sogar auf behördliche Anordnung hin als sogenannte Packungsgrößen vom pharmazeutischen Unternehmen näher zu spezifizieren. Transplantationsdosen sind vom transplantierenden Zentrum unter Berücksichtigung der individuellen Patientencharakteristika (Erkrankungsprogression, Therapieansprechen, Grad der Histokompatibilität, Begleitinfektionen etc.) festzulegen; derzeit übliche Transplantationsdosen sind in diese fachliche Stellungnahme zur vereinfachten Orientierung eingegangen. Bezüglich der zu erwartenden DMSO-Toxizität in Abhängigkeit zum Gesamtvolumen und der relativen DMSO-Endkonzentration im Transplantat wird hier auf die weiteren Ausführungen in dieser Stellungnahme verwiesen.

#### **2.4. Prüfverfahren**

Stammzellen aus peripheren Blut, Knochenmark und ggf. Nabelschnurblut werden mittels des „Surrogatmarkers“ CD34 durchflußzytometrisch analysiert und quantifiziert. Mithilfe dieser Methode erfolgt die Konzentrationsbestimmung der CD34+ Stammzellen als sogenannter qualitätsbestimmender Prüfparameter im jeweiligen Transplantat. Zur Anwendung kommt hierbei in der Regel ein international festgelegter Analysestandard, das sogenannte ISHAGE-Protokoll (Mc Keeney). Die Analyse ist schnell und einfach durchzuführen. Interne Maßnahmen zur Qualitätssicherung als auch die regelmäßige und erfolgreiche Teilnahme an externen Ringversuchen gewährleisten eine hohe Qualität des Prüfverfahrens und des Produktes. Abweichungen vom ISHAGE Standard sind ausreichend zu begründen.

Üblicherweise finden validierte Prüfverfahren zur Kontrolle der Ausgangsstoffe (Blutgruppenserologie, HLA-Typisierung und Infektionsmarker-Untersuchungen mittels serologischer und NAT Methoden) Anwendung. Hierbei sind sowohl die jeweils aktuellen Richtlinien der Hämotherapie und Stammzelltransplantation als auch die Standards der jeweiligen Labor-Akkreditierungen (z.B. EFI / JACIE) zu berücksichtigen.

Darüber hinaus finden zahlreiche weitere Prüfverfahren, die die qualitätsbestimmenden Produkteigenschaften vor und unter Umständen nach Kryokonservierung analysieren, Anwendung. Hierunter sind insbesondere die Volumenbestimmung mittels Wägung, die Messung kernhaltiger Zellen (Leukozyten) mittels automatischem Zellzähler oder durch simultane Bestimmung aller CD45+ Zellen mittels Durchflußzytometrie, die Bestimmung der „Vitalität“ mittels Trypanblaufärbung oder 7AAD-Kernfärbung und ggf. die Bestimmung kontaminierender Zellen mit automatischen Zellzählern zu subsumieren. Die eingangs erwähnten semisoliden Kurzeitkulturen zum Nachweis von CFU-GM bzw. CFU-

E/BFU-E bestimmen nicht die Qualität der Einzelcharge von Stammzellzubereitungen, können jedoch zur Prozeßvalidierung und zu Revalidierungszwecken hilfreich sein. repräsentative Sterilitätstestung des Endproduktes erfolgen. Üblicherweise werden hier eine aerobe und anerobe Kulturflasche mit geeigneten Volumina gemäß der Europäischen Pharmacopeia (Inokulum in Abhängigkeit zum Produktvolumen) beimpft.

Diese fachliche Stellungnahme erhebt nicht den Anspruch alle in der Bundesrepublik Deutschland eingesetzten Prüfverfahren systematisch zu erfassen und bewerten zu wollen. Die einzelnen Antragsteller sind aufgefordert, die Eignung ihrer Prüfverfahren durch Dokumente des Hersteller, Maßnahmen der internen Qualitätssicherung und (soweit erhältlich) durch Ringversuche zu belegen; dies gilt sicherlich in allererster Linie für die quantitative Messung der arzneilich wirksamen Substanz (CD34+ Stammzellen) als Grundlage für die Berechnung der Transplantationsdosis.

### **3. Präklinischer Überblick**

#### **3.1. Übersicht zur präklinischen Prüfstrategie**

Mit den hier zur Genehmigung beantragten Stammzellzubereitungen wurden bis dato keine eigenen präklinischen Untersuchungen durchgeführt und sind auch nicht vorgesehen. Im Folgenden werden publizierte Daten verschiedener präklinischen Untersuchungen dargelegt.

Die Würdigung zum Teil als historisch zu betrachtenden Daten erfolgt aufgrund des besonderen Umstandes, dass der Gesetzgeber in Deutschland eine nachträgliche Genehmigungspflicht für Stammzellzubereitungen, die seit mehr als 20 Jahre klinisch erfolgreich eingesetzt werden, mit dem Erlass des Gewebegesetzes eingeführt hat. Folgerichtig beinhaltet dieser präklinische und der nachfolgende klinische Überblick eine retrospektive Bewertung und Würdigung historischer Daten und nicht die Festlegung und Begründung einer prospektiv ausgerichteten Prüfstrategie wie dieses für ein neuwertiges Arzneimittel oder Zelltherapeutikum angezeigt wäre.

Neben der Prüfung zahlreicher in-vitro Zellkultursysteme, inwieweit diese als Surrogatmarker für die „Pluripotenz“ und Repopulationskapazität der initial eingebrachten Stammzellen dienen könnten, waren historisch insbesondere Tiermodelle (z.B. Maus, Hund, Paviane) im Rahmen der präklinischen Erprobung der Knochenmarkstransplantation von besonderer Bedeutung. Diese Tierversuche wurden durchgeführt, um nicht akzeptable Risiken für Patienten abzuwenden. Auch in der nachfolgenden Zeit wurden Modifikationen der Knochenmarkstransplantation (z.B. die Einführung von CD34+ und CD133+ Blutstammzellen), die bezüglich der klinischen Unbedenklichkeit nur schwer abzuwägen waren und die Pathogenese von Transplantationskomplikationen (z.B. GvHD), zunächst im Tiermodell erprobt und validiert. Auch heute sind für grundlegende Fragen der humanen Stammzellbiologie immundefiziente Mausmodelle von großer Bedeutung (Ando et al. 2008.)

#### **3.2. Pharmakodynamik**

Bereits im Jahr 1966 publizierten Epstein et al. die hämatopoetische Rekonstitution nach allogener Transplantation durch „cross circulation“ in letal bestrahlten Hunden. Anfang der achtziger Jahre publizierten Abrams et al. (1981) ihre Ergebnisse bezüglich eines autologen Transplantationsmodells im Hund. Nach Durchschreiten des durch Cyclophosphamidtherapie verursachten Leukozytennadirs wurden mononukleäre Zellen gesammelt und nachfolgend transplantiert. Diese Zellen (MNZ-Dosis:  $0.5 \times 10^6$  /kg Körpergewicht) waren in der Lage, die Hunde vor den Folgen einer letalen Ganzkörperbestrahlung (9Gy) zu schützen. Zu ähnlichen Ergebnissen sind auch andere Arbeitsgruppen gekommen. Appelbaum et al. (1986) gewannen ebenfalls MNZ mittels Leukapherese nach chemotherapeutischer Induktion in Hunden mit Lymphomerkrankungen und transfundierten die autolog gewonnenen Zellen erfolgreich. Die hämatopoetische Rekonstitution erfolgte schneller als nach Transplantation von Knochenmark; hierfür wurde eine höherer Anteil an liniendeterminierten Vorläuferzellen verantwortlich gemacht, die im Vergleich zu „plu-

ripotenten“ Stammzellen mit weniger Zellteilungen im Empfängerorganismus ausreifen können.

Das autologe Transplantationsmodell wird immer mit dem Risiko der Rezidiventstehung durch kontaminierende Tumorzellen in Verbindung gebracht. In vergleichenden Studien wurde der Vorteil einer immunmagnetischen Positivselektion von CD34+ Stammzellen, die mit einer Abreicherung an Tumorzellen einhergeht, evaluiert. Für viele Tumorentitäten konnte ein signifikanter Überlebensvorteil nicht gefunden werden, so dass heute die Indikation zur CD34 Positivselektion bei autologen Transplantationen selten gestellt wird. Im Vordergrund stehen hier pädiatrische Patienten mit Neuroblastomen oder mit Einschränkung bei Patienten mit Ewing Sarkomen. Die Pharmakodynamik der hämatopoetischen Rekonstitution ist nach autologer Transplantation von aufgereinigten CD34+ Stammzellen vergleichbar mit der von „mononukleären“ Stammzellzubereitungen (Berenson et al. (1991), Shpall et al. (1994), Gorin et al. (1995)). Dasselbe gilt wahrscheinlich auch für die kürzlich erst eingeführte Selektion von CD133+ Stammzellen, die in erster Linie eine Teilmenge der CD34+ Stammzellen darstellen und dessen Repopulationskapazität zunächst im Tiermodell erprobt wurde (Yin et al. (1997), Gordon et al. (2003)).

Zahlreiche tierexperimentelle Modelle waren für die Entwicklung von Strategien zur effektiven Stammzellmobilisation mittels Wachstumsfaktoren von Nutzen. Neben den Fragen der Mobilisationskinetik und Verträglichkeit des jeweiligen Wachstumsfaktors wurde insbesondere die Verlässlichkeit der hämatopoetischen Rekonstitution der durch Wachstumsfaktor induzierten „mononukleären“ Zellen tierexperimentell untersucht. Ende der achtziger Jahre wurden die ersten Daten (Phase I) zur stammzellmobilisierenden Wirkung im menschlichen Organismus nach Gabe von G-CSF oder GM-CSF publiziert (Welte et al. (1985), Dührsen et al. (1998), Socinski et al. (1998)). Auch hier erfolgte zunächst die weitere Erprobung im Tiermodell (Maus) zum Beispiel mittels G-CSF behandelte männlicher Mäuse (250µg/kg/d für 4 Tage) (Molineux et al. (1990)). Lediglich  $2,5 \times 10^6$  Zellen wurden in letal bestrahlte weibliche Mäuse (syngenes Modell) transplantiert und führten zur kompletten hämatopoetischen Rekonstitution ohne signifikanten Unterschied zur mitgeführten Kontrollgruppe (Knochenmark). Ein kompletter Spenderchimärismus konnte über 10 Monate nachgewiesen werden. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Neben et al. (1993), ebenfalls in einem Mausmodell. Cyclophosphamid und G-CSF mobilisierte mononukleäre Zellen zeigten eine ähnliche Frequenz an „colony-forming units-spleen“ und „competitive repopulating cells“ wie normales Knochenmark und führten zu einem vergleichbaren Transplantationserfolg. Zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten beschäftigten sich darüber hinaus mit der stammzellmobilisierenden Wirkung weiterer Wachstumsfaktoren und Botenstoffe (SCF, IL6, IL7, IL8, MIP1α) und der synergistischen Wirkung von Zytokinkombinationen, auf deren näheren Beschreibung an dieser Stelle jedoch verzichtet wird, da sie zumeist keine klinische Relevanz erlangten

Die dauerhafte Rekonstitution der Hämatopoese („long-term engraftment“) wird bevorzugt im Grosstiermodell evaluiert; insbesondere Fragen zur Dosisfindung und zur lebenslangen Nachbildung von Blutzellen aus transplantierten Stammzellen lassen sich im Grosstiermodell besser - in Annäherung an das zu erwartende „outcome“ beim Menschen - beantworten. Darüber hinaus sind auch transplantationsimmunologische Aspekte wie z.B. die Entstehung der GvHD im Grosstiermodell adäquat zu untersuchen, wohingegen

MHC (H2) Barrieren in der Maus nicht regelhaft GvHD initiieren und diese Versuche klinischen Vorhersagen nicht zulassen.

Wegweisend war der Nachweis, dass autologe CD34 exprimierende Knochenmarkszellen letal bestrahlte Paviane (n=5) rekonstituieren konnten. (Berenson et al. 1988). Ebenfalls im Fred Hutchinson Center in Seattle wurden Hunde erfolgreich mit autologen Bluttammzellen transplantiert, die zuvor mittels G-CSF, SCF oder einer Kombination von beiden Wachstumsfaktoren gewonnen wurden (de Revel et al. (1994)). Zielgröße war hierbei nicht eine festgelegte CD34+ Stammzellendosis, sondern die Retransfusion von  $1 \times 10^8$  MNZ pro kg Körpergewicht nach Ganzkörperbestrahlung (9,2 Gy). Alle Kontrolltiere verstarben, während die anderen Hunde mit zwei Ausnahmen hämatopoetisch rekonstituierten (6-monatige Nachbeobachtungszeit). Die neutrophilen Granulozyten ( $>500/\mu\text{l}$ ) erholten sich durchschnittlich innerhalb von 14 bis 19 Tagen, die Thrombozyten ( $>20.000/\mu\text{l}$ ) innerhalb von 37 bis 46 Tagen; jedoch verstarben 2 von 10 Hunden an einer ausgeprägten und verlängerten Thrombozytopenie. Das Studiendesign war nicht auf den primären Nachweis einer lebenslangen hämatopoetischen Rekonstitution ausgelegt. Dieser Nachweis ist im autologen Transplantationsmodell nicht mit letzter Sicherheit zu erbringen, da die beobachtete Langzeithämatopoese auch aus bestrahlungsresistenten, ortsständigen Stammzellen hervorgegangen sein könnte. Der synergistische Effekt von G-CSF und SCF wurde auch im Primatenmodell (Paviane) bestätigt. Andrews et al. (1995) publizierten ein signifikant schnelleres „*tri-lineage engraftment*“ in Tieren, die das kryokonservierte autologe Leukapheresat nach kombinierter G-CSF/SCF Therapie im Vergleich zu nur G-CSF erhielten. Auch in dieser Studie war die CD34+ Stammzellendosis nicht bekannt und es wurde auf die Anzahl koloniebildender Zellen (CFU-GM) abgehoben. Die Rekonstitutionsgrenzen für neutrophile Granulozyten und Thrombozyten ( $500/\mu\text{l}$  und  $20.000/\mu\text{l}$ ) wurden im G-CSF/SCF Arm nach 12 bzw. 8 Tagen erreicht, wohingegen im G-CSF Arm diese Schwellenwerte erst nach 24 bzw. 42 Tagen erreicht wurden. In einem neuen Primatenmodell konnte gezeigt werden, dass die pegG-CSF-Gabe in Kombination mit anderen Zytokinen zu einer signifikant besseren Mobilisation CD34+ Zellen, der koloniebildenden Zellen und der SCID-Mäuse-repopulierenden Zellen führt (Larsen et al. (2008)).

Die zusätzliche klinische Anwendung von SCF (Stemgen) ist seit kurzem für schlecht mobilisierende Patienten in Kombination mit G-CSF unter Prämedikation möglich. Darüber hinaus werden monoklonale Antikörper (anti-VLA4, Natalizumab) und SDF1/CXCR4-Antagonisten (AMD3100) bezüglich ihrer Mobilisierungseffizienz und Verträglichkeit klinisch erprobt (Zohren et al. (2008), Broxmeyer et al. (2005)). Es ist davon auszugehen, dass die unter den neuen Mobilisierungstherapien gewonnenen Stammzellen, die auch das CD34 bzw. CD133 Antigen tragen, ein weitgehend identisches Potential zur hämatopoetischen Rekonstitution aufweisen.

### 3.3. Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik im engen Sinn der biochemischen Pharmakologie beschreibt alle Prozesse eines Arzneimittels im Körper, insbesondere die Aufnahme (Absorption), ggf. Freisetzung (Liberation), Verteilung (Distribution) und der biochemische Umbau bzw.

Abbau (Metabolisierung) und Ausscheidung (Exkretion). Verschiedene der genannten Teilprozesse sind für ein „untypisches“, zelluläres Arzneimittel wie „Stammzellzubereitungen“ nicht zutreffend; dies gilt insbesondere für die Freisetzung, Metabolisierung und Ausscheidung.

Hämatopoetische Stammzellen unterschiedlicher Stammzellquellen werden entweder als Anteil in einer mehr oder weniger „reinen“ mononukleären Zellfraktion oder als aufgereinigte Zellpopulation intravenös appliziert. Diese Transfusion erfolgt entweder im frischen, nicht kryokonservierten Zustand innerhalb von 3 Tagen nach Gewinnung oder mit wieder aufgetauten Zellen unmittelbar nach Verflüssigung. Über die Blutzirkulation erfolgt im menschlichen Organismus eine rasche Verteilung. Zu diesem frühen Zeitpunkt ist es besonders wichtig, dass unter Berücksichtigung der Pharmakokinetik der zuvor applizierten Chemotherapeutika eine signifikante Stammzelltoxizität für das Transplantat ausgeschlossen werden kann. Durch Einhaltung eines ausreichenden Zeitabstandes werden optimale Bedingungen zur Einnistung der Stammzellen und Regeneration des Blut- und Immunsystems geschaffen.

Transfundierte humane Stammzellen werden im Gesamtblutvolumen eines Patienten rasch verdünnt und sind 24 – 48 Stunden nach Transplantation in der Blutzirkulation kaum noch nachweisbar. Die Verteilung von hämatopoetischen Stammzellen erfolgt durch transendotheliale Migration in viele verschiedene Organe, vorwiegend jedoch in Lunge, Leber, Milz und Knochenmark. Dieser Prozeß wird als „homing“, „seeding“ und „early engraftment“ bezeichnet. Verschiedene molekulare Mechanismen, insbesondere die Expression von Adhäsionsmolekülen im Sinne von Rezeptor-Liganden-Paaren auf transplantierten Stammzellen und ortsständigen Stromazellen, sind bereits in den letzten 20 Jahren identifiziert worden und Gegenstand zahlreicher Übersichtsartikel (Papayanopoulou und Craddock (1997), Williams und Nisson (2009)), zumal das Stammzelein-nistung die Kehrseite der eingehend untersuchten Stammzellmobilisierung darstellt. In diesem Zusammenhang wird hier auch auf das Kapitel 1.3 Stammzellbiologie verwiesen.

Die Standarduntersuchung zur Beurteilung eines „short term or long-term engraftment“ durch hämatopoetische Stammzellen erfolgt in der Regel in experimentellen Tiermodellen, in denen Spenderzellen in Empfängerorganen bzw. im Knochenmark nachgewiesen werden. Dieses Vorgehen macht die Tötung des Versuchstieres erforderlich und erlaubt nur die Beurteilung der Stammzellverteilung zum Zeitpunkt der Untersuchung. So konnten Hendriks et al. (1996) bereits zeigen, dass  $1 \times 10^4$  PKH-26 positive Zellen (CFU-Spleen Zellen) nach intravenöser Applikation besser in die Milz als in das Knochenmark von tödlich bestrahlten Mäusen einnisteten. Zur Zeit werden neue Technologien erprobt, die eine mehr dynamische Verfolgung („tracking“) hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen mittels „in-vivo imaging“, also in einem lebenden, xenogenen Organismus erlauben. Hier sind zum Beispiel durch lentivirale Transfektion Luciferase-exprimierende Stammzellen (CD34) und deren Subpopulationen (CD34+ CD38-) zu nennen, die im Knochenmark von NOD/SCID Mäusen einnisten und anwachsen (Wang et al. (2003)). Diese vergleichenden Untersuchungen zeigten, dass die Sensitivität solcher Biolumineszenz-Verfahren bei ca. 1% Spenderzellanteil im Knochenmark liegt. Auch Eisenoxid als FDA zugelassenes Kontrastmittel kann mittels Lipofektion in hämatopoetische Stammzellen aufgenommen werden und die Organanreicherung mittels Magnetresonanztomogra-

phie nachgewiesen. Im Mausmodell waren 24 Stunden nach Injektion in die Schwanzvene die stärksten Signale in Leber, Milz und Knochenmark nachweisbar (Daldrup-Link et al. (2005))

Askenasy und Farkas (2002) beschrieben ein fluoreszenzoptisches Verfahren zum „in-vivo tracking“ und „in-situ assessment“ von murinen Knochenmarkzellen, die mit dem Membranfarbstoff PKH gekennzeichnet waren. Die Autoren konnten zunächst zeigen, dass die PKH Farbstoffe (1-4µM) weder die Vitalität noch die hämatopoetische Rekonstitution im Empfängertier beeinträchtigten. Darüber hinaus konnten „homing efficiencies“ von 1,8% bzw. 0,2% in Femuren 16 Stunden post transplantationem (syngen versus allogenen) nachgewiesen werden. Erst kürzlich publizierten die Arbeitsgruppe von Quesenberry Daten zu einem allogenen Mausmodell (C57BL/6J Lin-Sca+ CFSE-markiert in nicht-myeloablativ behandelte BALB/c Mäuse). Mittels Durchflußzytometrie wurde bereits 1 Stunde nach Injektion ein schnelles „homing“ in das Knochenmark nachgewiesen, das über die nachfolgenden Stunden (6h) nicht mehr gesteigert wurde.

### **3.4. Toxikologie**

Es liegen aus den vergangenen Jahrzehnten keine belastbaren bzw. evidenzbasierten Daten vor, die eine toxikologische Bedenklichkeit der arzneilich wirksamen Substanz, hier der hämatopoetischen Stammzelle aus Knochenmark, peripherem Blut bzw. Nabelschnurblut belegen würden. Somit wurde für therapeutische Anwendung sowohl bei der autologen als auch bei der allogenen Transplantation national und international keine aus toxikologischen Gründen vertretbare Dosisobergrenze für CD34+Zellen festgelegt.

Ein Risiko für eine krebserregende oder das Krebswachstum fördernde Wirkung ist für adulte Stammzellen humanen Ursprungs, die zu Transplantationszwecken eingesetzt werden, nicht bekannt. Von der „gesunden“ hämatopoetischen Stammzelle ist hierbei eine durch maligne Transformation (Aktivierung von Protoonkogenen, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen) entstandene „leukämische“ Stammzelle zu unterscheiden; dies gelingt in erster Linie durch molekulargenetische Analysen, währenddessen das phänotypische Erscheinungsbild (z.B. CD34+ CD38-) oder mit Einschränkung auch die Funktionalität (Selbsterneuerung, Differenzierung, Koloniebildung) eine schnelle Unterscheidung nicht erlaubt (Liu et al. 2009; Viale et al. 2009).

### **3.5 Zusätzliche Angaben**

--- keine ---

### **3.6 Gesamtübersicht und Schlußfolgerungen**

Es wurden die wichtigsten pharmakodynamischen, pharmakokinetischen und toxikologischen Aspekte von humanen Stammzellen unterschiedlicher Quelle (Knochenmark, peripheres Blut und Nabelschnurblut) genannt, mit Literaturstellen belegt und soweit erforderlich diskutiert. Die wissenschaftliche Bewertung der präklinisch erhobenen Daten erfolgt kontinuierlich bereits seit mehr als 50 Jahren und wird stetig dem neuesten Kenntnisstand angepasst.

### **3.7 Literatur und Referenzen**

Es wurde ein alphabetisches Gesamtverzeichnis unter Kapitel 4.7 erstellt.

#### **4. Klinischer Überblick**

##### **4.1. Klinische Entwicklungsstrategie und Programm**

Im folgenden wird der aktuelle Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse anhand von Veröffentlichungen dargelegt; hierbei finden auch Veröffentlichungen Berücksichtigung, in denen Antragssteller für die Genehmigung von Stammzellzubereitungen die Ergebnisse ihrer eigenen klinischen Studien darstellten oder diese im Rahmen grosser multizentrischer Studien ausgewertet wurden.

##### **4.2. Übersicht zur klinischen Pharmakologie**

Die allgemeine Pharmakologie untersucht die allgemeingültigen Gesetzmäßigkeiten der Wechselwirkung zwischen Arzneimittel und Organismus unabhängig vom Arzneimittel, während die klinische Pharmakologie sich der speziellen Wirkung des Arzneimittels bei Anwendung am Menschen beschäftigt (Pharmakotherapie). Neben den bereits im präklinischen Teil abgehandelten Bereichen der Pharmakodynamik und Pharmakokinetik wird hier insbesondere die klinische Wirksamkeit und Sicherheit von humanen Stammzellzubereitungen im Einzelnen dargestellt und eine kurze Risiko-Nutzen Bewertung vorgenommen.

##### **4.3. Übersicht zur Wirksamkeit/Funktionalität**

Die hämatopoetische Rekonstitution nach autologer bzw. allogener Transplantation ist Gegenstand zahlreicher Übersichtsarbeiten (Pettengell, Sitzler et al., Dreger et al.). Historisch gesehen wurden in den 70ziger Jahren eine unvollständige oder deutlich verzögerte hämatopoetische Rekonstitution und die damit verbundenen Komplikationen beschrieben (Appelbaum et al. 1978). Zu dieser Zeit wurden im autologen Transplantationsansatz vor allem Stammzellen aus dem Knochenmark transplantiert. Die Grunderkrankung einschließlich einer potentiellen Knochenmarkinfiltration und die Stammzelltoxizität der vorangegangenen Therapie waren die wichtigsten negativen Einflussgrößen auf die hämatopoetische Rekonstitution. Ebenso wurde zu jener Zeit keine minimale Stammzelltransplantationsdosis anhand des CD34+ Zellgehaltes festgelegt. Die mäßige, durch Chemotherapie induzierte Mobilisation peripherer Blutstammzellen erbrachte keinen nennenswerten klinischen Durchbruch (Körbling et al. (1986), Kessinger et al. (1986)). Jedoch wurde im Tiermodell die grundsätzliche Machbarkeit gezeigt.

Erst durch die dauerhafte Einführung von Wachstumsfaktoren mit einem stark stammzellmobilisierenden Effekt bei nachgewiesener guter Patientenverträglichkeit wurden Stammzellen aus dem peripheren Blut zu einer ernsthaft zu erwägenden Alternative. Periphere Blutstammzellen tragen zur Verkürzung der Dauer der hämatopoetischen Rekonstitution im Vergleich zu Knochenmarkstammzellen signifikant bei. Dies wird im Allgemeinen darauf zurückgeführt, dass ein Anteil peripherer Blutstammzellen bzw. der

mononukleären Zellfraktion nach G-CSF Stimulation die Eigenschaft von liniendeterminierten Vorläuferzellen innehat und diese im Vergleich zu unreiferen Stammzellen früher zur Blutzellbildung beitragen („short-term engraftment“). Die gerade erwähnten unreiferen Stammzellen siedeln sich ebenfalls in Knochenmarknischen an und tragen nach mehreren Zellteilungen zur permanenten Hämatopoese („long-term engraftment“) bei.

Anfängliche Bedenken bezüglich des Potentials von Blutstammzellprodukten im Empfängerorganismus eine persistierende und komplette Hämatopoese zu gewährleisten, wurden nicht bestätigt. Die offensichtlichen Vorteile der Blutstammzellen hinsichtlich der einfachen Gewinnung und schnellen hämatopoetischen Rekonstitution haben zusammen mit diversen anderen Verbesserungen in den supportiven Maßnahmen (Antibiotika, Antimykotika, Reinraumzimmer) die Toxizität und Letalität der autologen PBSZT im Vergleich zur klassischen autologen KMT deutlich gesenkt. Sowohl deskriptive Untersuchungen (Oberflächenantigene, Koloniebildung) als auch funktionelle Untersuchungen im Tiermodell zeigten kein offensichtliches Defizit der mobilisierten CD34+ Stammzellen bezüglich ihrer Befähigung zur Selbsterneuerung und „pluripotenten“ Differenzierung. Nach nahezu 20jähriger klinischer Erfahrung mit der Transplantation peripherer Blutstammzellen anstelle von Knochenmark steht heute bezüglich der hämatopoetischen Rekonstitution im Empfängerorganismus die prinzipielle Gleichwertigkeit im Regelfall außer Frage (Blaise et al. 2000, Bensinger et al. 2001, Schmitz et al. 2006). Hieraus folgt konsequenterweise, dass heutzutage bei der autologen Transplantation die PBSZT die KMT weitestgehend verdrängt hat.

Auch wenn die molekularen Mechanismen der Stammzellmobilisation und „homing“ im Einzelnen nicht vollständig verstanden sind, wird im Allgemeinen jedoch davon ausgegangen, dass insbesondere Zell-Zell-Kontakte zwischen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen einerseits und zellulären Elementen der Mikroumgebung namentlich Knochenmarkstromazellen andererseits von zentraler Bedeutung sind. Die Retention und Mobilisation von Stammzellen entsprechen wie „zwei Seiten einer Medaille“ unterschiedlichen Funktionszuständen in der Pharmakodynamik von hämatopoetischen Stammzellen. Diese zellulären Interaktionen werden mit einigen Adhäsionsmoleküle in enger Verbindung gebracht (Übersichtsartikel: Pelus und Fukuda 2008).

Die molekularen Mechanismen der G-CSF induzierten Stammzellmobilisation sind nicht vollständig geklärt. Aufgrund des späten Wirkungseintritts wird ein indirekter Mechanismus unter Beteiligung von proteolytischen Enzymen (Elastase, Cathepsin G, Metalloproteinasen) favorisiert. Unter den bekannten Adhäsionsmolekülen befinden sich Chemokine und Chemokin-Rezeptoren wie zum Beispiel die nachfolgend genannten Achsen: MIP1 $\alpha$ /CCR1, SDF1/CXCR4, IL8/CXCR2 bzw. GRO-Proteine/CXCR2. Grundsätzlich werden entweder Analoga der Liganden (z.B. von SDF1-Agonist) oder Rezeptorantagonisten (CXCR4-Antagonist) experimentell erprobt (Broxmeyer et al. 2005). Ihnen ist eine im Tierexperiment nachgewiesene sehr schnelle Rekrutierung (<1h) von Stammzellen in die Blutzirkulation gemeinsam. Darüber hinaus konnte unter anderem gezeigt werden, dass auch blockierende Antikörper, wie zum Beispiel anti-VLA-4 Antikörper einen stammzellmobilisierenden Effekt haben und die G-CSF Wirkung über einen unabhängigen Mechanismus verstärken (Papayannopoulou et. al. 2000). Das „very late antigen 4“ gehört zur Familie der  $\beta$ 1-Integrine und ist im Vergleich zu Knochenmarkstammzellen

geringer und funktionell eingeschränkt auf zirkulierenden Blutstammzellen exprimiert (Lichtenfeld et al. 2000). VLA-4 bindet an das Adhäsionsmolekül VCAM 1 (vascular cell adhesion molecule).

Ende der achtziger Jahre berichtete das Hopital Saint-Louis in Paris von der ersten Nabelschnurblut-Transplantation bei einem Patienten mit Fanconi Anämie (Gluckman et al. 1989). Neben den bereits ausführlich besprochenen Stammzellquellen Knochenmark und peripheres Blut gewinnt seitdem auch die Transplantation von Nabelschnurblut an Bedeutung, auch wenn im Vergleich zu den USA in Deutschland die Zahl der Transplantationen noch gering ist (Kögler et al. 1999, Gluckmann et al. 2005). Aufgrund ihrer größeren Unreife ist die Kinetik der hämatopoetischen Rekonstitution nach Transplantation von Nabelschnurblut jedoch verlangsamt (Hong und Deeg 1994, Kurtzberg et al. 1996, Urbano-Ispizua 2007). Die verzögerte Erholung der Granulozyten, Thrombozyten und der immunkompetenten Zellen führt vermehrt zu Infektionskomplikationen und bedingt eine höhere transplantationsassoziierte Mortalität (Kurtzberg et al. 1996, Laughlin et al. 2004, Rocha et al. 2004).

Allogene Transplantationen von Nabelschnurblut sind in erster Linie nur dann indiziert, soweit kein HLA Klasse I und Klasse II (10 auf 10 bzw. 8 auf 8) kompatibler, unverwandter adulter Spender zur Verfügung steht (Gluckman et al. 2005). Jedoch besteht die Einschränkung, dass nur wenige Nabelschnurtransplantate für normalgewichtige Erwachsene aufgrund des geringen Volumens und der daraus resultierenden geringen absoluten CD34+ Stammzelldosis geeignet sind (Gluckman et al. (2004), Migliaccio et al. (2000)). Richtlinienkonform wird im Regelfall eine Mindestdosis von  $3 \times 10^7$  kernhaltiger Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers gefordert nicht jedoch eine Mindestdosis von CD34+ Stammzellen. Nach den Angaben der EBMT im Handbook 2008 werden  $3 \times 10^7$  kernhaltiger Zellen / kg KG im Median erreicht (dieser Wert wird jedoch nicht als definierte Untergrenze angesehen), währenddessen die Konzentration an CD34+ Zellen mit  $0,2 \times 10^6$  /kg KG im Median sehr limitiert war. Hofmeister et al. (2007) haben kürzlich diese offensichtlichen Limitationen der Transplantierbarkeit zum Anlass genommen, über die ex-vivo Expansion von Nabelschnurstammzellen durch die Manipulation von Signaltransduktionswegen als möglichen Ausweg zu berichten.

#### 4.4. Übersicht zur Sicherheit

Die Bewertung der Sicherheit von Stammzellzubereitungen beinhaltet Faktoren bzw. Risiken, die aus der zellulären Zusammensetzung einschließlich der arzneilich wirksamen „Substanz“ (hier: Stammzellen), der sonstigen zellulären und nicht zellulären Bestandteilen und dem Zusatz eines Einfriermediums resultieren.

Bezüglich der Stammzellen selbst müssen hier laut Empfehlung der Bundesoberbehörde tumorigene und immunologische Aspekte erörtert werden. Die Möglichkeit bzw. das Risiko einer krebserregenden oder krebswachstumsfördernden Wirkung wird für adulte Stammzellen nur dann angenommen wenn sie z.B. zu lange kultiviert werden. Bei den hier beantragten Stammzellzubereitungen und in den meisten klinischen Studien werden die adulten Stammzellen unmittelbar, kurz nach der Entnahme oder nach Kryokonservie-

zung dem Patienten selbst (autolog) oder einem anderen Patienten (allogen) verabreicht, ohne daß die Stammzellen in einem Nährmedium vermehrt würden und darin proliferieren und altern könnten. Unter diesen Voraussetzungen wurden bis dato keine Hinweise für ein signifikantes krebserzeugendes Potenzial der adulten Stammzellen gefunden (Donner 2007).

Auch bei der Bewertung des generellen Nutzens dieser Therapie (Konditionierung und Transplantation) seitens des unabhängigen Institutes für Qualität und Wirtschaftlichkeit wurden keine Hinweise für eine Krebsbildung infolge der Stammzelltransplantation beschrieben (IQWiG, 2007). Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass von humanen hämatopoetischen Stammzellen per se keine Sicherheitsbedenken ausgehen und der Primärnutzen in ihrer Funktionalität zur hämatopoetischen Rekonstitution zu sehen ist. Der gesundheitsökonomische Gesamtnutzen der autologen bzw. allogenen Stammzelltransplantation ist nicht Gegenstand dieser Stellungnahme.

Für die autologe Stammzelltransplantation wird vom Patienten selbst das „Ausgangsmaterial“ gewonnen, das die zu transplantierenden Stammzellen enthält. Hierfür wird der Patient einer Apheresetauglichkeitsuntersuchung unterzogen. Darüber hinaus erhält der Spender eine infektionsserologische Standarduntersuchung, die zumindest den Anforderungen der autologen Blutspende genügt. Weder die Apheresetauglichkeitsuntersuchung noch die Infektionsserologie sind im Detail Gegenstand dieser fachlichen Stellungnahme. Die pharmazeutischen Unternehmer und Antragsteller von Genehmigungen für Stammzellzubereitungen haben ihre Festlegungen im Genehmigungsantrag benannt. Diese sollten in der Regel gesetzes- und richtlinienkonform sein. Abweichungen hiervon sind im „Gutachten“ nicht weiter zu begründen.

Für die allogene Stammzelltransplantation wird auf einen gesunden freiwilligen Spender zurückgegriffen. Dieser kann verwandt oder unverwandt sein. Die enorme Vielfalt der menschlichen Gewebemerkmale (HLA-Polymorphismen) macht die Suche nach einem nicht verwandten Spender extrem schwierig. Der nationale, gegebenenfalls internationale Suchprozess wird in der Regel durch nationale Register so zum Beispiel dem Zentralen Knochenmarkspender-Register Deutschland (ZKRD) oder durch die Deutsche Knochenmarkspendedatei (DKMS) gGmbH organisiert. Die Spenderauswahl sollte der Richtlinie 2006/17/EG der Kommission zur Durchführung der Richtlinie 2004/23/EG des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich technischer Vorschriften für die Spende, Beschaffung und Testung von menschlichen Geweben und Zellen (2006) und den Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ (Gesamtnovelle 2005) entsprechen. Näheres wird im Rahmen dieses „Gutachten“ zu der Spenderauswahl allogener Transplantation nicht festgestellt.

In den letzten 15 Jahren wurden national und international sehr große Anstrengungen unternommen, gesunde Mitbürger und -innen davon zu überzeugen, sich als Stammzellspender zur Verfügung zu stellen. Heute existiert ein international vernetztes System an sogenannten Spenderdateien. In Deutschland stehen mehr als 3 Millionen Menschen und weltweit mehr als 12 Millionen Menschen als potentielle Stammzellspender zur Verfügung. Von diesen Spendern ist eine Reihe an transplantationsrelevanten Gewebemerkmalen bekannt, die eine prinzipielle Verträglichkeit (Kompatibilität) zwischen Patient und

Spender anzeigen können. Das System an Gewebemerkmale (HLA) ist ein sehr komplexes und hoch polymorphes System. Gegenwärtig werden vier bis fünf Genorte (HLA-A, -B, -C, -DR und mit Einschränkung DQ) berücksichtigt; bei einer vollen Übereinstimmung aller Allele (2 Allele pro Genort) spricht man von einem „10/10-match“ bzw. „8/8-match“ (Mattsson 2008, Petersdorf 2007, Ottinger et al. 2001).

Der zweite deutsche Konsensus zur immungenetischen Spenderauswahl bei allogener Stammzelltransplantation wurde 2001 publiziert (Ottinger et al.); der dritte Konsensus dagegen nicht. Der zusätzliche Gewinn einer DP- und DQ-Typisierung wird als marginal gesehen, bei mehreren vorhandenen Spendern sollte diese Untersuchung aber zusätzlich durchgeführt und die Merkmalsausprägung berücksichtigt werden. Der Grad der erforderlichen Verträglichkeit wird durch das Transplantationszentrum unter Berücksichtigung der klinischen Dringlichkeit festgelegt. Bei malignen Erkrankungen oder fortgeschrittenen Erkrankungsstadien ist der Grad der HLA-Übereinstimmung weniger bedeutsam, da durch Verstärkung des Graft-versus-Leukämie-Effektes die zusätzlichen Risiken einer stärkeren GvH-Reaktion ausbalanciert werden können.

Seit längerem wird auch – bei fehlenden unverwandten Spendern mit hoher HLA-Übereinstimmung – auf die Eltern des Patienten zurückgegriffen und eine haploidente Stammzelltransplantation durchgeführt (siehe Übersichtsartikel: Bimalangshu et al. 2006, Aversa 2008). Die massiv erhöhte GVHD Rate muss aber durch eine effektive T-Zelldepletion wirksam vermieden werden. Verbesserungen der Konditionierungstherapie und der Immunsuppression post-transplantationem, einerseits und die Transplantation von Megadosen an CD34+ Stammzellen ( $> 10 \times 10^6 / \text{kg KG}$ ) mit nahezu vollständiger T-Zell-Depletion ( $2 \times 10^6 / \text{kg KG}$ ) andererseits haben das klinische Outcome signifikant verbessert (Aversa et al. 2005, Chen et al. 2006). Die Bedeutung von nicht HLA-Antigenen für die Spenderauswahl wird aktuell in wissenschaftlichen Studien untersucht. Eine Untersuchung dieser Gen-Loci wird aber noch nicht routinemäßig in der klinischen Spenderauswahl eingesetzt.

Diese und weitere zelltherapeutischen Manipulationen (sog. graft engineering) wie zum Beispiel durch regulatorische T-Zellen, immunmodulierende mesenchymale Stammzellen oder die kombinierte T- und B-Lymphozytendepletion unter Beibehaltung weiterer akzesorischer Zellen im Transplantat (u.a. NK-Zellen mit KIR-Status) werden zu neuen Formen der allogenen Stammzelltransplantation führen (Rezvani und Storb 2008, Mattsson 2008, Giebel et al. 2003). Hierbei steht die Trennung eines gewünschten GvL-Effektes von einem unerwünschten GvHD-Effekt im Vordergrund. Diese heute noch experimentellen zelltherapeutischen Ansätze und die ebenfalls komplexen Abwägungsprozesse zur Frage der „Noch-Akzeptanz“ von bestimmten HLA- Mismatch-Konstellationen in Abhängigkeit zu diversen weiteren klinischen Einflussgrößen (wie z.B. Grunderkrankung, Alter, Therapieversagen, Konditionierungstherapie, fehlende Therapiealternative) sind im weiteren nicht Gegenstand dieser Stellungnahme. Die jeweiligen Risiko-Nutzen-Analysen unterliegen gemäß dem neuesten Kenntnisstand durch die Ergebnisse zahlreicher klinischer Studien und dem kontinuierlichen wissenschaftlichen Diskurs mit international anerkannten Experten einem ständigen Anpassungsprozess. Gleiches gilt auch für die Bedeutung des HLA-Systems bei Nabelschnurbluttransplantation (Gluckman et al. 2005).

Für aufgereinigte autologe bzw. allogene Stammzellzubereitungen sind die Sicherheitsrisiken ausführlicher abzuwägen. Im Rahmen dieser immunmagnetischen Prozessierungsverfahren kommen murine Primärantikörper, paramagnetische Eisenpartikel und Pufferlösungen zum Einsatz, die nur zum Teil vor der Kryokonservierung bzw. vor intravenöser Transfusion entfernt werden. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle der gutachterlichen Stellungnahme auf die nach Stand von Wissenschaft und Technik vermutete Unbedenklichkeit immunmagnetischer Isolationsverfahren eingegangen und die Verwendung dieser Medizinprodukte bei der Herstellung von autologen und allogenen Stammzellzubereitungen nach Nutzen-Risiko-Abwägung als sinnvoll erachtet.

Im Regelfall werden zur Herstellung der CD34, CD133, CD3 und CD19 Antikörper Maus-Hybridomzellen in proteinfreien Medien in-vitro kultiviert und die sezernierten Primärantikörper anschließend aufgereinigt. Mittels Nanofiltration werden potentiell kontaminierende Viren abgetrennt und mittels einer Solvent-Detergent-Behandlung lipidumhüllte Viren effektiv inaktiviert. Auf Mycoplasmenfreiheit der Hybridomzellen wird durch Anwendung sensitiver Testverfahren (PCR, Direktkultivierung auf speziellem Agar) durch den Medizinproduktehersteller getestet. Eine bakterielle Verunreinigung des durch immunmagnetische Zellisolierung hergestellten Stammzellproduktes kann durch Verwendung steriler Einmalmaterialien, einer dem GMP-Standard entsprechenden aseptischen Prozessierung (Reinraum) und durch mikrobiologische Testung der Einzelcharge vor Transplantation weitestgehend ausgeschlossen werden.

Zum besseren Verständnis des Nachfolgenden sei darauf hingewiesen, dass die Definition von Medizinprodukten und deren Qualitätsanforderungen in der europäischen Richtlinie 93/42/EWG und durch das nationale Medizinproduktegesetz (MPG) zu finden sind. Medizinprodukte unterscheiden sich von Arzneimitteln dadurch, daß ihre bestimmungsgemäße Hauptwirkung überwiegend auf physikalischem Weg erreicht wird. Hierbei erfolgt eine Einteilung der Medizinprodukte in vier Risikoklassen (I, IIa, IIb und III), die auf den jeweilig erforderlichen Zulassungsprozess (Konformitätsbewertungsverfahren von Produkten des freien Warenverkehrs durch neutrale, unabhängige und kompetente Einrichtungen (sog. Benannte Stellen)) für das erstmalige Inverkehrbringen erheblichen Einfluß haben. Nach erfolgreicher Durchführung wird das Medizinprodukt mit einer CE-Kennzeichnung versehen.

Medizinprodukte mit einem hohen Gefahrenpotential (zum Beispiel durch Inhaltsstoffe tierischen Ursprungs) werden der Klasse III zugeordnet, so auch die o.g. Antikörperreaktionen murinen Ursprungs. Neben dem weitestgehenden Ausschluß infektiöser Übertragungsrisiken sind bei der therapeutischen Anwendung immunmagnetisch vorbehandelter Stammzellzubereitungen auch Immunisierungsreaktionen (Humane-Anti-Maus-Antikörper-Antwort, Humane-Anti-Schaf-Antikörper-Antwort) und die pharmakologisch-toxikologische Bewertung der paramagnetischen Mikropartikel zu berücksichtigen. In diesem Zusammenhang wird auf die umfangreichen Untersuchungen der jeweiligen Medizinproduktehersteller verwiesen.

Zusammenfassend liegen den Autoren dieser Stellungnahme jedoch keine Hinweise auf eine klinisch relevante und persistierende Immunantwort gegen Maus-Antikörper bzw. Schaf-Antikörper vor, die bei der weitgehenden Entfernung der in-vitro eingesetzten Anti-

körper (insbesondere bei den Depletionsverfahren) und der zumeist einmaligen Anwendung auch nicht zu erwarten ist. Ein Vergleich zu therapeutisch (in-vivo) eingesetzten Antikörpertherapien mit der Gefahr der Neutralisation der Maus-Antikörper bei zunehmender Therapiedauer ist hier sicherlich nicht zulässig.

Für die klinisch in Deutschland angewandten immunmagnetischen Positiv- oder Negativselektionsverfahren finden unterschiedliche paramagnetische Mikropartikel (magnetische Teilchen mit einem „polymeren Überzug“) Anwendung. Hier sind zum Beispiel die relativ grossen (~4,5µm Durchmesser), spherische Polystyren-„Beads“ (M-450) der Firma Dynal im Isolex300i System der Firma Baxter zu nennen, die mit einem Sekundärantikörper (Schaf-Anti-Maus-IgG) kovalent verbunden sind, der die anti-CD34 (Maus-Anti-Human) markierten Stammzellen erkennt. Nach CD34-Isolierung erfolgt die weitgehende Abtrennung des Antikörper-Beads-Komplexes von der Zelloberfläche mittels eines nicht näher definierten Oktapeptids. Die so aufgereinigten und behandelten Stammzellen scheinen sich regelhaft in die Markräume des Knochenmarks einzunisten, so dass die hämatopoetische Rekonstitution prinzipiell vergleichbar ist mit der nach Transplantation von nichtselektionierten Stammzellen. Eine leicht verzögerte Erholung der Thrombopoese (d14 versus d11) ist beschrieben worden; die geringe Fallzahl und niedrige CD34+ Transplantationsdosis erlauben jedoch hierzu keine evidenzbasierte Aussage, zumal in eine Risiko-Nutzen-Betrachtung die Möglichkeit einer risikoarmen prophylaktischen Thrombozyten-substitution einfließen würde.

Die Firma Miltenyi-Biotec verwendet dagegen sehr kleine paramagnetische Nanopartikel (~60nm) mit einer Eisen-Dextran-Matrix unter Verwendung eines magnetischen Hochintensitätsfeldes. Diese patentierte Technologie findet als geschlossenes, GMP-konformes CliniMACS System der Firma Miltenyi Biotec ihre klinische Anwendung. Die insbesondere bei der CD34+ bzw. CD133+ Positivselektion nicht entfernten, jedoch gebundenen Komplexe aus Antikörper und Eisen-Dextran-Partikel scheinen nach heutigem Kenntnisstand die Stammzellfunktion nicht zu beeinträchtigen und eine mit nichtselektionierten Stammzellzubereitungen vergleichbare, dauerhafte hämatopoetische Rekonstitution zu ermöglichen, soweit sie in derselben Konzentration transplantiert werden. Diese Komplexe werden im retikulohistiozytärem System (einem Teil des mononukleär-phagozytärem Systems, insbesondere durch Makrophagen der Milz und Leber phagozytiert und lysosomal abgebaut. Das Eisen steht nachfolgend dem Körper zur Verfügung. Eine Freisetzung von toxikologisch bedenklichen freien Eisenionen in die Blutzirkulation konnte nicht nachgewiesen werden. Es sei darauf hingewiesen, dass zum Beispiel EisenIIIhydroxid-Dextran zur intravenösen Gabe zugelassen ist und Eisen-Dextrane in der Magnetresonanztomographie als Kontrastmittel eingesetzt werden. In sehr seltenen Fällen könnte der Dextrananteil dieser Mikropartikel bei Patienten mit präformierten Antikörpern gegen Dextran zu anaphylaktischen Reaktionen führen. Im Vergleich zur intravenösen Applikation zu therapeutischen Zwecken ist der Eisendextrangehalt von solchen Stammzellzubereitungen sehr gering. Bis heute wurde eine anaphylaktische Schock bei stammzelltransplantierten Patienten nicht beschrieben. Zusammenfassend liegen den Autoren dieser Stellungnahme keine präklinischen oder klinischen Daten zu Stammzellzubereitungen, die mittels immunmagnetischer Trennungsvorgänge hergestellt wurden, vor, die den Nachweis einer toxikologischen Bedenklichkeit bezüglich der eingesetzten paramagnetischen Partikel erbracht hätten.

Im Gegensatz zu den Antikörperreagenzien werden Pufferlösungen der Klasse IIa und die Schlauchsysteme bzw. die verbundenen Instrumente der Klasse IIb zugeordnet. In den oben genannten Systemen finden phosphatgepufferte, isotone Salzlösungen Anwendung, die nicht-toxisch sind und steril und pyrogenfrei produziert werden. Diese Puffer können Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat enthalten, so zum Beispiel PBS/1mM Edta pH7.2 oder dem PBS wird – soweit notwendig Edta in Apothekenqualität (European Pharmacopeia). Edta ist als Tetraanion ein Chelatbildner und komplexiert zum Beispiel zweiwertige Kationen wie Calcium und Magnesium. Dies verhindert die Aktivierung von Monozyten zu Makrophagen, die die zugegebenen Komplexe aus Antikörper und paramagnetischen Mikropartikeln ansonsten rasch phagozytieren würden. Darüber hinaus wird in der Regel als Arzneimittel zugelassenes humanes Serumalbumin (zum Beispiel 1%) zugegeben. Nach erfolgreicher Positiv- bzw. Negativisolierung erfolgt in der Regel die Kryokonservierung in hierzu geeigneten, DMSO-haltigen Einfrierlösungen (autologes Plasma, Plasmaersatzlösung auf HSA-Basis) mit und ohne Waschschrift bzw. Volumeneinengung.

Die jeweiligen Medizinproduktehersteller der oben genannten immunmagnetischen Selektionsverfahren verfügen über umfangreiches, im Rahmen der Konformitätsbewertung geprüfetes Informationsmaterial. Diese Dokumentation enthält auch Daten bezüglich der pharmakologisch-toxikologischen Bewertung ihrer CE-zertifizierten immunmagnetischen Reagenzien und Separationssysteme und kann gegebenenfalls unter Bezugnahme auf diese gutachterliche Stellungnahme oder als sogenannter „Masterfile“ beim Paul-Ehrlich-Institut eingereicht bzw. hinterlegt werden.

Für kryokonservierte Stammzellzubereitungen sind auch zusätzliche Sicherheitsrisiken zu bedenken. Im Vordergrund der Begutachtung möglicher Risiken der nichtzellulären Bestandteile steht die Anwendung von Substanzen zur Kryokonservierung, wie z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO) und Hydr oxyethylsäure (HAES). Letzteres ist als Arzneimittel zugelassen und wird als Infusionslösung zum kolloidalen Volumenersatz gegeben. DMSO findet bei allen Stammzellquellen (Peripheres Blut, Knochenmark, Nabelschnurblut) prinzipiell Anwendung; dies gilt in erster Linie für patienteneigene Stammzellzubereitungen, die deutlich vor der Hochdosischemotherapie oder Ganzkörperbestrahlung gesammelt und zur späteren Transplantation tiefgefroren eingelagert werden. Währenddessen wird in der allogenen Situation vorrangig der Zeitpunkt der freiwilligen Stammzellspende mit dem der Transplantation synchronisiert.

Der Volumenanteil des Kryoprotektivums kann differieren, gewöhnlich liegt dieser bei 5-10% Endkonzentration. Eine genaue Analyse der Auswirkungen von DMSO im Transplantat wird in einem gesonderten DMSO-Gutachten durchgeführt (siehe Anlage, Zusammenfassung und Bewertung der toxiko-pharmakologischen Daten und Informationen zu Dimethylsulfoxid (DMSO) im Hinblick auf seine Verwendung in den oben genannten Arzneimitteln von Dr. Peter Günzel (Berlin) und Prof. Dr. Hermann Eichler (Homburg/Saar)).

#### **4.5 Nutzen-Risiko Bewertung**

Die Therapie mit adulten Blutstammzellen und adulten Stammzellen des Knochenmarks ist für bestimmte Blutkrankheiten wie Leukämien und Lymphome, aber auch bei Anämien und Immundefekten seit vier Jahrzehnten etabliert (Appelbaum 2007). Gemäß der Erfassung durch das Deutsche Register für Stammzelltransplantationen erhielten im Jahr 2007 2118 Patienten in Deutschland adulte Stammzellen von einem Fremdspender (allogene Ersttransplantationen) bzw. 2457 Patienten eine autologe Ersttransplantation (Jahresbericht 2007). Wie bereits in der Einleitung hingewiesen, sind die gegenwärtigen Indikationen zur autologen bzw. allogenen Stammzelltransplantation in Deutschland auf der Internetseite der DAG-KBT zu finden. (<http://www.dag-kbt.de/inkat/Indikationskatalog>); die Behandlungsergebnisse werden in jährliche Berichten des Deutschen Registers für Stammzelltransplantationen (DRST) unter <http://www.drst.de> veröffentlicht. Die durch die Berichterstattung des Instituts für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen initiierte und kontrovers geführte Diskussion über den therapeutischen Nutzen im Sinne einer evidenzbasierten Medizin ist nicht Gegenstand dieser Stellungnahme. Vonseiten der Sachverständigen und beteiligten Fachgesellschaften wird jedoch das Nutzen-Risiko-Verhältnis positiv im Hinblick darauf bewertet, dass die autologe bzw. allogene Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen aus Knochenmark, peripherem Blut oder Nabelschnurblut bei einem Teil der Patienten eine dauerhafte Heilung oder zumindest ein längeres krankheitsfreies Überleben ermöglicht.

#### **4.6. Zusätzliche Angaben**

entfällt

#### 4.7 Literatur und Referenzen

Abrams RA, McCormack K, Bowles C, Deisseroth AB. Cyclophosphamide treatment expands the circulating hematopoietic stem cell pool in dogs. *J Clin Invest* 1981;67:1392-1399.

Andrews RG, Briddell RA, Knitter GH et al. Rapid engraftment by peripheral blood progenitor cells mobilized by recombinant human stem cell factor and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in nonhuman primates. *Blood* 1995;85:15-20.

Ando K, Muguruma Y, Yahata T. Humanizing bone marrow in immune-deficient mice. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;324:77-86.

Appelbaum FR, Herzig GP, Ziegler JL et al. Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood* 1978;52:85-95.

Appelbaum FR, Deeg HJ, Storb R et al. Cure of malignant lymphoma in dogs with peripheral blood stem cell transplantation. *Transplantation* 1986;42:19-22.

Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N Engl J Med* 2007;357:1472-1475.

Arai F, Suda T. Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Ann NY Acad Sci* 2007;1106:41-53.

Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, et al. Full-haplotype mismatched hematopoietic stem cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk or relapse. *J Clin Oncol* 2005;23:3447-3454.

Aversa F. Haploidentical haematopoietic stem cell transplantation for acute leukaemia in adults: experience in Europe and the United States. *BMT* 2008;41:473-481.

Bach FH, Albertini RJ, Joo P, Anderson JL, Bortin MM. Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 1968;2:1364-1366.

Bathia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID repopulating activity. *Nat Med* 1998;4:1038-1045.

Bensinger WI, Martin PJ, Storer B et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral blood from HLA identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med* 2001;344:175-181.

Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI et al. Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest* 1988;81:951-955.

Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS et al. Engraftment after infusion of CD34+ marrow

cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood* 1991;77:1717-1722.

Bimalangshu RD, Spitzer TR. Current status of haploidentical stem cell transplantation. *Br J Hematol* 2006;135:423-437.

Blaise D, Kuentz M, Fournier C et al. Randomized trial of bone marrow versus lenogastim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early stage leukemia: A report from the Société Française de Greffe de Moelle. *J Clin Oncol* 2000;18:537-546.

Bortin MM. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation* 1970;9:571-587.

Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3828-3832.

Broxmeyer HE, Clapp DW, Orschell CM, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med* 2005;201:1307-1318.

Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 1975;255:187-200.

Chen X, Hale GA, Barfield R, et al. Rapid immune reconstitution after a reduced-intensity conditioning regimen and a CD3-depleted haploidentical stem cell graft for paediatric refractory haematological malignancies. *Br J Hematol* 2006;135:524-532.

Civin CL, Strauss LC, Brovall C et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 1984;133:157-165.

Dausset J :Iso-leuko-antibodies. *Acta Haematol.* 1958;20:156-166.

De KJ, van Bekkum DW, Dicke KA, Dooren LJ, Radl J, Van Rood JJ. Transplantation of bone-marrow cells and fetal thymus in an infant with lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1969;1:1223-1227.

De Revel T, Appelbaum FR, Storb R et al. Effects of granulocyte colony stimulating factor and stem cell factor, alone or in combination, on the mobilization of peripheral blood cells that engraft lethally irradiated dogs. *Blood* 1994;83:3795-3799.

Desikan KR, Tricot G, Munshi NC et al. Preceding chemotherapy, tumour load and age influence engraftment in multiple myeloma patients mobilized with granulocyte colony-stimulating factor alone. *Br J Hematol* 2001;112:242-247.

Donner S, Zusammenhang zwischen Krebsentstehung und adulten bzw. embryonalen Stammzellen, Ausarbeitung für den Deutschen Bundestag, 2007

Dreger P, Haferlach T, Eckstein V et al. G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: safety, kinetics of mobilization, and composition of the graft. *Br J Hematol* 1994; 87:609-613.

Dreger P, Schmitz N. Allogeneic blood stem cell transplantation. In: *Blood Stem Cell Transplantation*, Editors: J. Reiffers, J. Goldman, J. Armitage, Martin Dunitz Ltd London 1998 Page 217-230.

Dührsen U, Villeval J, Boyd J et al. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 1988;72: 2074-2081.

The EBMT Handbook, 5<sup>th</sup> Edition 2008 Haematopoietic Stem Cell Transplantation

Eichler H, Kern S, Beck C, Zieger W, Klüter H. Engraftment capacity of umbilical cord blood cells processed by either whole blood preparation or filtration. *Stem Cells* 2003;21:208-216.

Epstein RB, Graham TC, Buckner CD, Bryant J, Thomas ED. Allogeneic marrow engraftment by cross circulation in lethally irradiated dogs. *Blood* 1966;28:692-707.

Fliedner TM, Körbling M, Arnold R. et al. Collection and cryopreservation of mononuclear blood leukocytes and of CFU-C in man. *Exp Hematol* 1979;7(S):398-408.

Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968;2:1366-1369.

Gesetz über Qualität und Sicherheit von menschlichen Geweben und Zellen (Gewebe-gesetz) vom 20. Juli 2007 (BGBl. I S. 1574)

Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394), zuletzt geändert durch Gesetz vom 23. November 2007 (BGBl. I S. 2631)

Georges GE, Sandmaier BM, Storb R. Animal Models. In: *Blood Stem Cell Transplantation*, Editors: J. Reiffers, J. Goldman, J. Armitage, Martin Dunitz Ltd London 1998, Page 1-18.

Giebel S, Locatelli FW, Lamparelli T, Velardi A, Davies SM, Frumento G et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* 2003;102:814-819.

Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321:1174-1178.

Gluckman E, Rocha V, Arcese W et al. Factors associated with the outcomes of unre-

lated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol* 2004;32:397-407.

Gluckman E, Kogler G, Rocha V. Human leukocyte antigen matching in cord blood transplantation. *Semin Hematol* 2005;42:85-90.

Goldman JM, Madrigal JA, Pamphilon D. Possible harmful effects of short course granulocyte colony-stimulating factor in normal donors. *Br J Haematol* 2006;135:651-652.

Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 1997;3:1337-1345.

Gordon PR, Leimig T, Babarin-Dorner A et al. Large-scale isolation of CD133+ progenitor cells from G-CSF mobilized peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:17-22

Gorin NC, Lopez M, Laporte JP et al. Preparation and successful engraftment of purified CD34+ bone marrow progenitor cells in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1995;85:1647-1654.

Gothot A, van der Loo JC, Clapp DW, Srour EF. Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34+ cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. *Blood* 1998;92:2641-2649.

Haas R, Ho AD, Bredthauer U et al. Successful autologous transplantation of blood stem cells mobilized with recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Exp Hematol* 1990;18:94-98.

Hofmeister CC, Zhang J, Knight KL, Le P, Stiff PJ. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. *BMT* 2007;39:11-23.

Hong DS, Deeg HJ. Hemopoietic stem cells: sources and applications. *Med Oncol* 1994;11:63-68.

Horowitz MM, Confer DL. Evaluation of hematopoietic stem cell donors. *Am Soc Hematol Educ Prog* 2005;469-475.

IQWiG. Stammzelltransplantation bei den Indikationen Akute lymphatische Leukämie (ALL) und acute myeloische Leukämie (AML) bei Erwachsenen. Abschlußbericht N05-03A. Köln. Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen, März 2007.

Isidori A, Motta MR, Tani M et al. Positive selection and transplantation of autologous highly purified CD133(+) stem cells in resistant/relapsed chronic lymphocytic leukemia patients result in rapid hematopoietic reconstitution without an adequate leukemic cell purging. *Biol Bone Marrow Transplant* 2007;10:1224-1232

Jansen EM, Hanks SG, Terry C et al. Prediction of engraftment after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: CD34, colony-forming unit granulocyte-macrophage, or both? *Transfusion* 2007;47:817-823.

Jacobson LO, Marks EK, Robson MJ, Gaston EO, Zirkle RE. Effect of spleen protection on mortality following X-irradiation. *J Lab Clin Med* 1949;34:1538-1543.

Jordan CT, Lemischka IR. Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Develop* 1990;4:220-232.

Juttner C, To LB, Haylock DN, Branford A, Kimber RJ. Circulating autologous stem cells collected in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia produce prompt but incomplete haemopoietic reconstitution after high dose melphalan or supralethal chemoradiotherapy. *Br J Hematol* 1985;61:739-745.

Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Cytometry* 1998;34:61-70.

Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Weisenburger DD. Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryoconserved circulating stem cells. *Exp Hematol* 1986;14:192-196.

Kessinger A, Smith DM, Strandjord SE et al. Allogeneic transplantation of blood-derived, T cell-depleted hemopoietic stem cell after myeloablative treatment in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *BMT* 1989;4:643-646.

Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 2008;8:290-301.

Kögler G, Somville T, Göbel U et al. Haematopoietic transplant potential of unrelated and related cord blood: the first six years of the EUROCORD/NETCORD Bank Germany. *Klin Pädiatr* 1999;211:224-232.

Körbling M, Burke P, Braine HG, Eifenbein GJ, Santos GW, Kaizer H. Successful engraftment of blood derived normal hematopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 1981;9:684-690.

Körbling M, Dörken B, Ho AD, Pezzuto A, Hunstein W, Fliedner TM. Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood* 1986;67:529-532.

Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 1996;335:157-166.

Ladd AC, Pyatt R, Gothot A et al. Orderly process of sequential cytokine stimulation is required for activation and maximal proliferation of primitive human bone marrow CD34+

hematopoietic progenitor cells residing in G0. *Blood* 1997;90:658-668.

Lang P, Schumm M, Greif J et al. A comparison between three graft manipulation methods for haploidentical stem cell transplantation in pediatric patients: preliminary results of a pilot study. *Klin Pädiatr* 2005;217:334-338.

Larsen SR, Chang K, Battah F, Martiniello-Wilks R, Rasko JE. Improved G-CSF mobilization of hematopoietic progenitors using cytokine combinations in primates. *Stem Cells* 2008;11:2974-2980.

Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:2265-2275.

Mattsson J. Recent progress in allogeneic stem cell transplantation. *Curr Opin Mol Ther* 2008;10:343-349.

Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CD, Dobrila NL, Carrier CM, Rubinstein P. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood* 2000;96:2717-2722.

Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science* 2006;311:1880-1885.

Morrison SJ, Wright DE, Weissman IL. Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1908-1913.

Molineux G, Pojda Z, Hampson IN et al. Transplantation potential of peripheral blood stem cells induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1990;76:2153-2158.

Lichtenfeld M, Martin S, Burkly L, Haas R, Kronenwett R. Mobilization of CD34 hematopoietic stem cells is associated with a functional inactivation of the integrin very late antigen 4. *Br J Hematol* 2000;110:71-81.

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

Little MT, Storb R. History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature Reviews Cancer* 2002;2:231-238.

Liu Y, Elf SE, Miyata Y et al. P53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell* 2009;4:37-48.

Neben S, Marcus K, Mauch P. Mobilization of hematopoietic stem and progenitor cell subpopulations from the marrow to the blood of mice following cyclophosphamide and/or granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1993;81:1960-1967.

Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996;273:242-245.

Ottinger HD, Müller CR, Goldmann SF et al. Second German Consensus on immunogenetic donor search for allotransplantation of haematopoietic stem cells. *Ann Hematol* 2001;80:706-714.

Pamphilon D, Mackinnon S, Nacheva E et al. The use of granulocyte colony stimulating factor in volunteer blood and marrow registry donors. *BMT* 2006;38:699-700.

Papayannopoulou T. Mechanisms of stem-/progenitor-cell mobilization: the anti-VLA-4 paradigm. *Semin Hematol* 2000;37:11-18.

Pelus LM, Fukuda S. Chemokine-mobilized adult stem cells; defining a better hematopoietic graft. *Leukemia* 2008;22:466-473.

Pettengell R. Haematopoietic recovery following transplantation. In: *Blood Stem Cell Transplantation*, Editors: J. Reiffers, J. Goldman, J. Armitage, Martin Dunitz Ltd London 1998 Page 157-170.

Petersdorf EW. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: histocompatibility. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:155-170.

Ploemacher RE, van der Sluijs JP, Voerman JS, Brons NH. An in-vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* 1989;74:2755-2763.

Rezvani AR, Storb RF. Separation of graft-vs.-tumor effects from graft-vs.-host disease in allogeneic cell transplantation. *J Autoimmun* 2008;30:172-179.

Richman CM, Weiner RS, Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 1976;47:1031-1039

Richtlinien für die allogene Knochenmarktransplantation mit nichtverwandten Spendern. *Dtsch Arztebl* 1994, 91A: 761-766.

Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstammzellen. *Dtsch Arztebl* 1997, 94A: 1584-1592.

Richtlinien zur Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut (CB=Cord Blood). *Dtsch Arztebl* 1999, 96A:1297-1304.

Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). Gesamtnovelle 2005. Deutscher Ärzte-Verlag

Rocha V, Labopin M, Sanz G et al. Transplants of umbilical cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:2276-2285

Rusten LS, Jacobsen SE, Kaalhus O, Veiby OP, Funderud S, Smeland EB. Functional differences between CD38- and DR- subfractions of CD34+ bone marrow cells. *Blood* 1994;84:1473-1481.

Schmitz N, Eapen M, Horowitz MM et al. Long-term outcome of patients given transplants of mobilized blood or bone marrow : A report from the International Bone Marrow Transplant Registry and the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 2006;108:4288-4290.

Sheikhzadeh S, Hammers HJ, Hartwig D, Kirchner H, Schlenke P. Improvement of the precision in CFU-GM and BFU-E counting by flow cytometry-based standardization of short-term culture assays. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10:881-885.

Shpall EJ, Jones RB, Bearman SI et al. Transplantation of enriched CD34-positive autologous marrow into breast cancer patients following high-dose chemotherapy: influence of CD34-positive peripheral-blood progenitors and growth factors on engraftment. *J Clin Oncol* 1994;12:28-36.

Socinski MA, Cannistra SA, Elias A et al. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet* 1988;1:1194-1198.

Spitzer G, Adkins D. The impact of growth factors on hematopoietic recovery after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. In: *Blood Stem Cell Transplantation*, Editors: J. Reiffers, J. Goldman, j.Armitage, Martin Dunitz Ltd London 1998 Page 171-186.

Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 1989;74:1563-1570.

Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3584-3588.

Thomas ED, Lochte HLjr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957;257:491-496.

Thomas ED Storb R. Technique for marrow grafting. *Blood* 1970; 36:507-515.

Thomas ED, Storb R, Fefer A, Slichter SJ, Bryant JI, Buckner CD et al. Aplastic anemia treated by marrow transplantation. *Lancet* 1972;1:284-289.

Thomas ED, Storb R, Clift RA et al. Bone-marrow transplantation. *N Engl J Med*

1975;292:895-902

Thomas ED and Fefer A. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1979;301:556

Thomas ED, Bruckner CD, Clift R et al. *New Engl J Med* 1979;301:597-599.

Urbano-Ispizua A. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: stem cell source. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20:265-280.

Van Rood JJ, Eernisse JG, Van Leeuwen A. Leukocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* 1958;181:1735-1736.

Viale A, De Franco F, Orith A et al. Cell-cycle restriction limits DNA damage and maintains self-renewal of leukaemia stem cells. *Nature* 2009;457:51-56.

Weaver CH, Birch R, Greco FA et al. Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells: randomized evaluations of different doses of filgrastim. *Br J Hematol* 1998;100:338-347.

Welte K, Platzer E, Lu L, Gabilove JL, Levi E, Mertelsmann R, Moore MA. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:1526-1530.

Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 2006;6:93-106.

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED et. al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;90:5002-5012.

Zohren F, Toutzaris D, Klärner V, Hartung HP, Kieseier B, Haas R. The monoclonal anti-VLA-4 antibody natalizumab mobilizes CD34+ hematopoietic progenitor cells in humans. *Blood* 2008;111:3893-3895.

## **5. Anlagen**

### **5.1. Anlage 1**

**Zusammenfassung und Bewertung der toxiko-pharmakologischen Daten  
und Informationen zu Dimethylsulfoxid (DMSO) im Hinblick auf seine Ver-  
wendung in Stammzellzubereitungen**

**Dr. Peter Günzel, Berlin und Prof. Dr. Hermann Eichler, Homburg**

**Umfang: 36 Seiten**

**5.2. Anlage 2**

**Muster einer Behältnisbeschriftung (deutsch / englisch)**

**Dr. Markus Wiesneth, Ulm und Frau Dr. Kristina Hölig, Dresden**

**Umfang: 1 Seite**

**5.3.    Anlage 3**

**Muster einer Produktinformation (Modul 1.3)**

**Dr. Markus Wiesneth, Ulm und Frau Dr, Kristina Hölig, Dresden**

**Umfang: 7 Seiten**

**5.4. Anlage 4**

**Musterliste Qualitätsbestimmender Parameter Stand 02.02.2009**

**Arbeitsgemeinschaft Genehmigungsverfahren für Stammzellzubereitungen**

**Umfang: 3 Seiten**

**5.5. Anlage 5**

**Lebensläufe aller Sachverständigen der Arbeitsgemeinschaft  
„Genehmigungsverfahren für Stammzellzubereitungen“**

**Umfang: 11 Seiten**

**Zusammenfassung und Bewertung der toxiko-pharmakologischen  
Daten und Informationen zu Dimethylsulfoxid (DMSO) im Hinblick auf  
seine Verwendung in Stammzellzubereitungen**

**von**

**Dr. Peter Günzel und Prof. Dr. Hermann Eichler**

**als gutachterliche Ergänzung**

**der Gemeinsamen Stellungnahme der Fachgesellschaften DGTI, DGHO und GPOH  
zu Genehmigungsverfahren von Stammzellzubereitungen**

**Endversion: Berlin – Homburg/Saar am 03.12.2008**

## Inhaltsverzeichnis

Präambel	Seite 3
1. Eingesetztes Produkt	3
2. Chemisch-physikalische und allgemeine biologische Eigenschaften	3
3. Natürliches Vorkommen	4
4. Verwendung in der Medizin	4
5. Pharmakodynamik und Wirkungsmechanismus	4
6. Pharmakokinetik	6
7. Toxikologie	7
7.1. Akute Toxizität	7
7.2. Subchronische und chronische Toxizität	8
7.3. Reproduktionstoxizität	10
7.4. Genetische Toxizität	11
7.5. Tumorigenität	11
7.6. Lokale Verträglichkeit	11
7.7. Immuntoxizität	12
7.8. Umweltrisiken	13
8. Kryokonservierung	13
8.1. Kryobiologische Vorgänge und ihre Beeinflussung durch Kryoprotektiva	13
8.2. DMSO in der Kryokonservierung	14
9. Verträglichkeit beim Menschen	16
10. Zusammenfassung und Schlussfolgerung	17
11. Generalzusammenfassung, Risikobeurteilung und Unterschriften der Sachverständigen	19
12. Referenzen	22
13. Informationen über die Sachverständigen	30
Anhang: Arzneimittelspezifische Angaben des Herstellers	35

## Präambel

Die Informationen und Daten zu DMSO sind ausnahmslos der Literatur entnommen. Wegen der Vielzahl bereits vorhandener Übersichtsarbeiten und der ohnehin erforderlichen starken Informationsverdichtung werden vorwiegend diese berücksichtigt und nur in bestimmten Fällen die Originalarbeiten herangezogen. Da in der Regel aus den Übersichtsarbeiten mehrere Informationen zu unterschiedlichen Aspekten eines Abschnitts zitiert werden, sind die Referenzen jeweils direkt nach der Überschrift angeführt. Sie werden in einem Abschnitt nur dann wiederholt, wenn es sich um eine besondere, seltene Detailinformation handelt.

Die bisher am Menschen erhobenen Befunde werden weitgehend in die einzelnen Untersuchungsgebiete der experimentellen Toxikologie eingeordnet, da sie letztlich für die Beurteilung der Verträglichkeit und Risikoabschätzung für den Menschen von entscheidender Bedeutung sind. Dennoch wird die Verträglichkeit am Menschen in einem gesonderten Kapitel zusammengefasst (siehe 9.).

---

## 1. Eingesetztes Produkt

Für die Kryokonservierung von Knochenmark- und peripheren Blutstammzellen wird DMSO in Apothekenqualität eingesetzt. Das Produkt ist eine klare, farb- und geruchlose Flüssigkeit, auf Sterilität, Pyrogen- und Endotoxinfreiheit gemäß European und US Pharmacopeia und auf Mycoplasmenfreiheit gemäß DAB 10, V.2.1.3.6. geprüft.

Jede Lieferung ist mit einem gesonderten Analysenzertifikat versehen.

Die Endkonzentration im Präparat beträgt je nach Hersteller in der Regel ca. 5,5 – 10 %.

## 2. Chemisch-physikalische und biologische Eigenschaften (15; 53;58;61)

DMSO, das bereits 1867 durch Oxydation von Dimethylsulfid synthetisiert wurde (15), ist eine farb- und geruchlose Flüssigkeit mit schwach bitterem Geschmack und leicht süßem Nachgeschmack mit folgenden Kenndaten: Schmelzpunkt 18,45°C; Siedepunkt 189°C; Flammpunkt 95°C; relative Dichte  $d^{20}_{20}$  1,1; Viskosität bei 20°C 1,1 mPa • s; MW 78,14.

DMSO ist stark hygroskopisch, komplett mit Wasser, Alkohol, Chloroform und Methylenchlorid mischbar und kann den Gefrierpunkt von Wasser deutlich herabsetzen (40%ige wässrige Lösung - 40°C) (33).

DMSO gibt selbst keine Protonen bei chemischen Reaktionen ab, ist aber ein Protonenakzeptor bei der Wasserstoffbindung und bewirkt dadurch die Spaltung von Wasserstoffbindungen. DMSO bildet bei exothermer Reaktion einen Komplex mit Wasser im Verhältnis 2:1. Das DMSO-Hydrat enthält etwa 67 v/v % Wasser.

Seine einzigartige Fähigkeit, lebende Gewebe (Membranen) ohne Schädigung zu durchdringen, ist vermutlich auf seine Polarität und die o.g. Fähigkeit zur Wasserstoffbindung zurückzuführen. Dabei scheint DMSO eisähnliche Wassercluster (Assoziante) zu stabilisieren (60). In unterschiedlichen biologischen Systemen in vitro und/oder in vivo wirkt DMSO zell-differenzierend, als Hydroxylradikalfänger und intrazellulärer Elektronenentkoppler, mobilisiert intrazellulär LDL-Cholesterin, wirkt als Kryoprotektivum (siehe Kapitel 8), wird als Lösungsvermittler in der Elektronenmikroskopie und, allein oder in Kombination mit anderen Arzneimittelwirkstoffen, in der Arzneimitteltherapie in einer Vielzahl von Indikationen eingesetzt (siehe Kapitel 4) (53).

### 3. **Natürliches Vorkommen** (33; 34; 61)

DMSO kommt physiologisch im menschlichen Plasma in einer Konzentration von 20-40 ng/ml und in Spuren in einer Vielzahl von Nahrungsmitteln in Konzentrationen bis zu 16 µg/g vor.

### 4. **Verwendung in der Medizin** (33; 34; 58; 61)

DMSO wird aufgrund seiner physikalisch-chemischen (siehe Kapitel 2), pharmakologischen (siehe Kapitel 5) und pharmakokinetischen Eigenschaften (siehe Kapitel 6) vorwiegend bei dermalen Verabreichung in der Therapie bei muskulo-skelettalen Störungen (Zerrungen, Stauchungen, Bursitiden sowie bei Sklerodermie, postthrombotischem Syndrom und M. Raynaud) eingesetzt.

Neben seiner antiphlogistischen, hyperämisierenden und analgetischen Wirkung zeichnet es sich durch Penetrationsförderung topisch applizierter Wirkstoffe aus (penetration enhancer). Die durchschnittliche Dosis bei dermalen Verabreichung liegt bei 0,1-0,2 g/kgKG/Tag (27).

Zur Behandlung der interstitiellen Zystitis wird es als 25-50%ige Lösung in die Harnblase instilliert (33; 34; 56). Daneben sind Anwendungen bei Hirnödem, Amyloidose und Schizophrenie beschrieben (53). Darüber hinaus dient es bei biologischen Versuchen mit Zellsystemen in vitro als häufig eingesetzter Lösungsvermittler (61) und ist als Hilfsmittel bei der Kryokonservierung von Zellen und Geweben (53;58) unentbehrlich (siehe Kapitel 8).

Zu Verträglichkeit und unerwünschten Wirkungen beim Menschen siehe Kapitel 9.

### 5. **Pharmakodynamik und Wirkungsmechanismus** (11; 15; 26; 27; 28; 58; 61; 64)

DMSO hat einen (milden) **analgetischen Effekt**, der vermutlich auf eine Hemmung der Reizleitung in den sensiblen Nerven und auf die dortige lokale Konzentration zurückzuführen ist (61). Ein systemischer analgetischer Effekt war nicht eindeutig nachweisbar.

In verschiedenen tierexperimentellen Modellen (z.B. Dinitrochlorbenzol-induzierte Kontaktdermatitis, Drucknekrose der Haut, Granuloma-Pouch-Test u.a.) war DMSO in der Mehrzahl der Untersuchungen, aber keineswegs immer, **entzündungshemmend** wirksam (61; 64), vor allem bei topischer Applikation. Vermutlich ist die Wirkung auf das Abfangen reaktiver Sauerstoffmetaboliten, die von aktivierten phagozytierenden Zellen freigesetzt werden, durch den oxidativen Abbau von DMSO zurückzuführen (11). Zusätzlich konnte die (lokale) Prostaglandinsynthese gehemmt werden (61). Allerdings ergaben Untersuchungen von Enzymen der Prostaglandinsynthese (PGS) in vitro, dass die PGS durch DMSO nicht über die normale physiologische Konzentration hinaus verändert wird (11). Ferner wirkt DMSO der Bildung und Freisetzung weiterer Mediatoren entgegen (33).

Die **gefäßerweiternde** Wirkung von DMSO bei Auftragung auf die Haut wird auf eine **histaminfreisetzende** Wirkung zurückgeführt (15; 27). Allerdings liegen zur histaminfreisetzenden Wirkung unterschiedliche Ergebnisse aus in vitro Untersuchungen an Peritonealzellen von Ratten vor. Während DMSO einerseits in niedrigen Konzentrationen (0.62-10%) die durch andere Substanzen induzierte Histaminfreisetzung hemmt, stimuliert es seinerseits die Histaminfreisetzung in höheren Konzentrationen (10-40%) selbst (12).

Möglicherweise wird auch der **Kollagenabbau** beschleunigt (27; 64). Die Untersuchungsergebnisse sind allerdings nicht immer eindeutig.

Ein vermutlich osmotisch bedingter **diuretischer Effekt** ist bei Hunden, Rhesusaffen und Menschen nachgewiesen (61). Bei Ratten war zusätzlich zum angestiegenen Harnvolumen auch die Natrium- und Kaliumausscheidung erhöht (64).

Bestimmte in vitro Untersuchungen weisen auf eine mögliche **Cholinesterase-hemmende** Wirkung hin (15; 27; 64). In Anbetracht des Fehlens entsprechender systemischer Wirkungen nach sehr hohen Dosierungen scheint dieser Effekt jedoch in vivo ohne wesentliche) Bedeutung zu sein.

Die **Penetrationsförderung** durch Zellmembranen ist vermutlich auf eine reversible Konfigurationsänderung der Membranproteine durch Entzug oder Ersatz von Wasser zurückzuführen, durch die potentielle Poren (tubuläres System) geöffnet werden (52). Die natürliche Struktur der Proteine bleibt durch Wasserstoffbrücken, hydrophobe Interaktionen und andere stabilisierende Faktoren erhalten (61). Die Penetrationsförderung war nicht von irreversiblen Schäden der Hornschicht der Haut abhängig (27). Ausnahmen von der schnellen Penetrierbarkeit bilden Finger-, Zehennägel und Zahnschmelz (64). Zur Bedeutung der Penetrationsförderung für die Kryokonservierung siehe Kapitel 8.

In 20-25%iger Konzentration wirkt DMSO bakteriostatisch auf Staph. aureus, E. coli und Pseudomonas. Das Wachstum von B. tuberculosis wurde schon bei 1%iger Konzentration gehemmt (61). Den bereits beschriebenen Membraneffekten entsprechend (s.o.) scheint DMSO die Empfindlichkeit von Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) gegenüber antimikrobiellen Substanzen zu steigern (15; 27; 61; 64).

Hinweise auf **Interaktionen (Wechselwirkungen)** von DMSO mit anderen Wirkstoffen resultieren vorwiegend aus Untersuchungen im letalen Dosisbereich (15) und sind deshalb ohne Bedeutung für die Risikoabschätzung im vorliegenden Fall.

Ob die Förderung der tumorhemmenden Wirkung von Cyclophosphamid (58) ein direkt potenzierender Effekt oder nur eine Folge der Penetrationsförderung (Membraneffekt; siehe oben) ist, bleibt zu klären. Gleiches trifft auf die Verstärkung der neurotoxischen Wirkung der Substanz Sulindac zu (58) (dieser nichtsteroidale Entzündungshemmer befindet sich nicht mehr im Handel). DMSO ist in der Lage, die Wirkung von Stoffen zu verstärken (15). Die Wirkungsverstärkung scheint eher auf die Lösungsvermittlung durch DMSO sowie dessen Membraneffekte zurückzuführen zu sein und nicht auf einer Interaktion auf Rezeptorebene zu beruhen.

Im Hinblick auf den Einsatz in der Kryokonservierung von Blut und Blutzellen (siehe Kapitel 8) ist der **hämolytische Effekt** von DMSO von Interesse. Eine 5 v/v %ige DMSO-Lösung ist in vitro etwa so stark hämolysierend, wie eine 0.9 w/v %ige NaCl-Lösung. Eine nennenswerte Hämolyse (2%) tritt erst bei einer 25 v/v %igen DMSO-Konzentration auf. Die osmotische Resistenz von Erythrozyten ist ab 7 v/v % DMSO deutlich erniedrigt (21). Intravaskuläre Hämolyse und daraus resultierende Hämoglobinurie können durch Erniedrigung der Konzentration ( $\leq 20\%$ ) und Verlängerung der Infusionszeit vermieden werden (58).

Die in vitro durch endogene Mediatoren (ADP, Adrenalin, Arachidonsäure, Kollagen) auslösbare **Thrombozytenaggregation** wird durch DMSO (0.25-5 %) konzentrationsabhängig **gehemmt** (36).

Untersuchungen über spezifische pharmakodynamische Effekte der Metaboliten Dimethylsulfon ( $\text{DMSO}_2$ ) und Dimethylsulfid (DMS) sind spärlich. In experimentellen Modellen an Ratten und Mäusen (Taurinexkretion, Letalität von Benzol und Chlorbenzol, Cholinesterasehemmung von Paraoxon und Octamethylphosphoramid, Messung von Körpertemperatur und Motilität) war  $\text{DMSO} > \text{DMSO}_2 > \text{DMS}$  wirksam. Daraus ist zu schließen, dass die Metaboliten an den nach DMSO beobachteten pharmakodynamischen Wirkungen beteiligt sein könnten (31).

## 6. Pharmakokinetik (11; 27; 28; 32; 61)

### **Resorption und Plasmakonzentration**

Nach **dermaler** Verabreichung wurden maximale Plasmakonzentrationen ( $T_{max}$ ) bei Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen und Hunden nach 10 Minuten (niedrigste Angabe für Ratten) bis 2 Stunden erreicht. Nach dermaler Verabreichung an Menschen waren bereits nach 5 Minuten Plasmakonzentrationen nachweisbar,  $T_{max}$  wurde aber erst nach 4-8 Stunden erreicht.

Nach **p.o.** Gabe wurde  $T_{max}$  beim Menschen nach 4 Stunden, bei der Ratte nach 0,5 - 4 Stunden erreicht (34; 61).

Nach **i.v. Transfusion** von 180-585 ml Stammzelltransplantaten, die 10 v/v% DMSO entsprechend 254-824 mmol DMSO (= 18-58,5 ml oder 19,85-64,4 g) enthielten, über 20-120 Minuten, wurden  $C_{max}$  von  $19,1 \pm 6,3$  mmol/L (=  $1,5 \pm 0,5$  g/L oder  $1,5 \pm 0,5$  mg/ml) im Plasma gemessen. Die Plasma-DMSO<sub>2</sub>-Konzentrationen stiegen innerhalb von 24 h auf ein Plateau von  $4,4 \pm 1,2$  mmol/L an, das 48 h (letzte Probenahme) erhalten blieb.

DMSH<sub>2</sub> Konzentrationen im Plasma erreichten ein steady-state 5 Minuten nach Ende der Transfusion und blieben bei 3-5 mmol/L für 48 h (letzte Probenahme) (18).

### **Verteilung**

Nach dermaler Applikation war die DMSO Konzentration (Radioaktivität; siehe Biotransformation) in der Haut und der darunter liegenden Muskulatur deutlich erhöht (32).

Nach p.o. und i.p. Verabreichung an Kaninchen, Ratten und Meerschweinchen waren deutliche DMSO Konzentrationen in verschiedenen Organen nach 30 Minuten messbar und nach 24 Stunden auf minimale Konzentrationen abgesunken (15). Die Konzentration in Knochen war deutlich niedriger als in den Weichteilen (61).

Verteilungsstudien bei wiederholter Verabreichung gaben keine Hinweise auf eine Akkumulation (von Radioaktivität) (27).

### **Biotransformation**

DMSO wird schnell zu Dimethylsulfon (DMSO<sub>2</sub>) und Dimethylsulfid (DMS oder DMSH<sub>2</sub>) metabolisiert. Schon 24 Stunden nach Verabreichung ist kein DMSO mehr nachweisbar (21).

Der durch Oxidation entstehende Hauptmetabolit Dimethylsulfon (DMSO<sub>2</sub>) erreicht nach dermaler Verabreichung bei Mensch und Versuchstieren  $T_{max}$  im Serum nach 36-72 Stunden und ist bis zu ca. 13 Tagen nachweisbar (15; 34). Der durch Reduktion entstehende Nebenmetabolit Dimethylsulfid (DMS) wird vorwiegend in Leber, Niere und Lunge gebildet und schnell durch mischfunktionelle Oxidasen zu DMSO reoxidiert (57). Der ausgeschiedene Anteil ist für den knoblauchartigen Geruch verantwortlich (34; 61).

Beide Metaboliten sind noch 2 Wochen nach Einmalgabe im Plasma nachweisbar (33) und identisch mit natürlich vorkommenden Metaboliten (15).

Insgesamt wurden bei pharmakokinetischen Untersuchungen nur etwa 80% der applizierten Dosis wieder gefunden. Es wird deshalb vermutet, dass sowohl der oxidative (zu Dimethylsulfon) als auch der

reduktive (zu Dimethylsulfid) Stoffwechsel letztlich bis zum Sulfat als Endprodukt führen (15), obwohl andererseits der Abbau bis zum Sulfat in vivo ernsthaft in Zweifel gezogen wird (21).

### **Ausscheidung**

Die Ausscheidung erfolgt überwiegend über die Niere.

Die Eliminationshalbwertszeiten ( $T_{1/2}$ ) sind von Spezies und Verabreichungsart abhängig (siehe Tab. 1).

**Tab. 1 Eliminationshalbwertszeiten von  $^{35}\text{S}$  (32), verabreicht als DMSO**

Applikationsart	Spezies	$T_{1/2}$
i.v.	Ratte	6 h
	Hund	1.5-2 d
	Mensch	8 d
dermal	Ratte	8 h
	Hund	14 d
	Mensch	14 d
p.o.	Hund	1.5-2 d
	Mensch	< 5 d (61)

Da DMSO jedoch schnell (innerhalb von 24 Stunden) zu Dimethylsulfon ( $\text{DMSO}_2$ ) metabolisiert wird (21), sind die in Tab. 1 angegebenen Zeiten sicher für Radioaktivität, vermutlich aber nicht für unverändertes DMSO zutreffend, für das eine  $T_{1/2}$  von 11-14 h beim Menschen angegeben wird (58).

Die unveränderte Substanz, Dimethylsulfon und Dimethylsulfid werden renal und über die Faeces, letzteres auch über Haut und Lunge eliminiert (33). Das über die Lunge ausgeschiedene DMS beträgt etwa 3% der dermal verabreichten DMSO-Dosis (61).

$\text{DMSO}_2$  erscheint nach dermalen Gabe von 18%, nach p.o. Verabreichung zu 22% der gegebenen DMSO-Dosis im Harn. Es hat eine  $T_{1/2}$  von 60-70 h (57), wird jedoch bis zu 20 Tagen nach dermalen Verabreichung ausgeschieden (15).

Das nach i.v. Stammzelltransfusion verabreichte DMSO (19,8-64,4 g/Patient; bei 50 kg KG = 0,4-1,3 g/kg) wurde bei Messung über 24 Stunden zu  $44 \pm 4\%$  als DMSO und  $4 \pm 1\%$  als  $\text{DMSO}_2$  über die Niere eliminiert (18).

Die Substanz geht in die Muttermilch über (13).

## **7. Toxikologie (15; 27; 51)**

### **7.1. Akute Toxizität**

Ergebnisse aus systemischen Verträglichkeitsprüfungen bei einmaliger Verabreichung (akute Toxizität) sind in Tab. 2 zusammengefasst.

**Tab. 2 Akute Toxizität von DMSO (15; 23; 38; 51;72)**

Spezies	LD <sub>50</sub> in g/kg nach den Verabreichungsarten				
	p.o.	i.v.	i.p.	s.c.	dermal
Maus	16,5-28,6	3,8-9,2	14,7-17,7	13,9-20,5	> 50
Ratte	17,4-28,3	5,2-8,1	> 5-13	12,0-20,5	> 40
Meerschweinchen	11	4	5,5	--	--
Kaninchen	14,0	--	--	--	--
Katze	--	4	> 4	--	--
Hund	> 10	2,4-2,5	--	--	> 11
Affe	> 4	4-> 11	--	--	> 11

Mit DL<sub>50</sub>-Werten im g/kg-Bereich, selbst nach i.v. Verabreichung, ist DMSO als relativ ungiftig bei Einmalapplikation einzustufen.

## 7.2. Subchronische und chronische Toxizität (15; 23; 51; 62)

Subchronische und chronische Toxizitätsstudien wurden an Nacktmäusen, Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen, Hunden und Affen bei dermalen, p.o., i.v. und intraperitonealer Verabreichung mit Dauern von einigen Tagen bis zu 18 Monaten ausgeführt. Dabei wurden  $\geq 50$ -80%ige DMSO Lösungen verabreicht.

Mit Ausnahme von Veränderungen am Applikationsort (siehe Kapitel 7.6) und an den Augenlinsen (siehe unten) wurde DMSO systemisch außerordentlich gut vertragen.

Bei Ratten traten ab 5 g/kg p.o. Leberschäden, bei Hunden ab 0.4 g/kg i.v. zentrolobuläre Leberverfettungen auf. Todesfälle wurden bei Ratten ab 11 g/kg/Tag p.o., d.h. in einem Bereich nahe der bei einmaliger Verabreichung letalen Dosis, beobachtet.

Nach derart hohen Dosierungen traten Verminderung der Gewichtszunahme, Schädigungen des weißen Blutbildes (Abnahme der Leukozyten-, insbesondere der Lymphozytenzahl), Follikelatrophie in der Milz, Erosionen der Magenschleimhaut und Entzündungen im Dünndarm auf (23).

Bei Affen traten nach  $\leq 9$  ml/kg/Tag DMSO als 90 v/v %ige Lösung dermal oder  $\leq 3$  ml/kg/Tag p.o. über 18 Monate keine pathologischen Veränderungen auf. 9 ml/kg/Tag p.o. wirkten nach 15-53 Wochen tödlich (62).

Die Inhalation von DMSO in den Konzentrationen 2,9 g/m<sup>3</sup> für 24 Stunden, 2,0 g/m<sup>3</sup> für 40 Stunden und 0,2 g/m<sup>3</sup> für 7 Stunden/Tag über 20 Tage verursachte bei Ratten keine wesentlichen Unverträglichkeitserscheinungen.

Nach wiederholter i.v. Verabreichung an Hunde (0,2 g/kg/Tag über 24 Tage) und Affen (3 g/kg/Tag über 9 Tage) traten vorübergehend (für einige Stunden) hämolytische Anämien mit Hämoglobinurie auf (27; 61).

Insgesamt waren auch keine kumulativen toxischen Effekte zu beobachten, wenn die täglich verabreichte Dosis nicht die maximal tolerierte Einzeldosis überschritt und die Konzentration der verabreichten Formulierung unter 50% blieb (15).

### **Spezielle Effekte am Auge**

Von besonderem Interesse sind Veränderungen an der Augenlinse, die bisher nur bei Versuchstieren beschrieben wurden und dort dosisabhängig auftraten (27; 61). Behandlungsregimes und Grenzdosierungen, nach denen die Veränderungen (nicht) auftraten, sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Bei den Veränderungen handelt es sich um eine starke bilaterale Zunahme der Myopie (-20 Dioptrien) des Linsenkerns, während die periphere (corticale) Linsenzonzone unverändert ist (15) oder hyperop erscheint (27).

Während beim Schwein 2 Monate nach Absetzen der Behandlung (2,7-4,5 g/kg/Tag dermal für 27 Wochen) eine Rückbildung der Veränderung beobachtet wurde, war beim Hund auch 8 Monate nach Behandlungsende (5 g/kg/Tag p.o.) die Veränderung präsent (27).

In Linsen mit veränderter Brechkraft war die Konzentration von Harnstoff, Glutathion, Harnsäure und Aminosäuren erniedrigt und diejenige von Albuminoid angestiegen. Die Linsenveränderung scheint nicht eine einfache Folge der Veränderung des Wassergehalts zu sein (27; 51).

Ein Vergleich der Grenzdosierungen, die zu Effekten an der Linse führten (siehe Tab. 3), zeigt, dass die einzelnen Spezies möglicher Weise unterschiedlich empfindlich reagieren (Pferd, Kaninchen > Schwein > Hund > Ratte > Affe). Insgesamt scheint die wirksame Grenzdosis, unabhängig von der Verabreichungsart, etwa in der Größenordnung von 1g/kg/Tag zu liegen.

Beim Menschen wurden derartige Veränderungen auch nach 2 1/2jähriger Therapie bisher nicht beobachtet (15; 27; 48; 61).

**Tab. 3 Behandlungsregimes und Grenzdosierungen, nach denen Linsenveränderungen aufgetreten/nicht aufgetreten sind (5; 15; 27; 51)**

Applikationsart	-dauer (Wochen)	Spezies	Grenzdosis (g/kg/Tag), mit dem Befund	
			positiv	negativ
Dermal	12	Kaninchen	1,0	0,1-0,5
	4 (30 Tage)	Kaninchen	--	0,5
	78	Affe	--	9,0
	26	Affe	--	11,0
	9	Hund	2,5	--
	16	Schwein	1,5	--
	26	Schwein	--	1,5
	27	Schwein	< 2,7-4,5	--
	2	Pferd	--	0,4
	8	Pferd	0,6	--
	12 (90 Tage)	Mensch	--	1,0
	132 (2,5 Jahre)	Mensch	--	(≈ 0,1-0,2)

p.o.	52	Hund	--	1,0
	5	Hund	3,8	--
(p.o. ?)	104	Ratte	9,0	--
	26	Affe	3,3	--
	78	Affe	--	9,0
	52	Ratte	--	1,0

### 7.3. Reproduktionstoxizität

#### ***Fertilität***

Fertilitätsstudien mit DMSO in dem heute üblichen Versuchsmodell an Ratten liegen nicht vor. Hoden, Prostata, Ovar und Uterus wurden jedoch nach langfristiger systemischer Verabreichung von DMSO [Ratten  $\leq 11$  g/kg/Tag, Hunde  $\leq 8,25$  g/kg/Tag p.o. über 16 Wochen (23); Affen  $\leq 9,9$  g/kg/Tag p.o. oder dermal über 18 Monate (61)] makroskopisch und mikroskopisch untersucht. Die Befunde ergaben keinerlei Hinweise auf eine Schädigung von Struktur und Funktion der Fortpflanzungsorgane. Aus dieser Befundlage können keine Hinweise auf eine mögliche Beeinträchtigung der männlichen und weiblichen Fertilität abgeleitet werden.

#### ***Embryonale Entwicklung***

Die wiederholt berichteten Befunde am bebrüteten Hühnerei wurden wegen der zu vernachlässigenden Bedeutung des Modells für die Risikoabschätzung für den Menschen nicht berücksichtigt.

Nach i.p. Verabreichung von 5-12 g DMSO/kg an Mäuse und Ratten in 50%iger Lösung vom 6.-12. Tag der Gravidität traten vereinzelt Missbildungen auf. Bei Hamstern wurden nach ip. Gabe von 2,5-15 g/kg DMSO (100%) nach der höchsten Dosis gehäuft Missbildungen gesehen (54).

Wegen der Höhe der Dosierungen (nahe bei dem oder im letalen Dosisbereich bei Einmalgabe), der Höhe der Konzentration ( $\geq 50\%$ ) und der Verabreichungsart (i.p.) sind diese Untersuchungen für die Risikoabschätzung unbrauchbar, da physikalisch-chemische nicht von toxikodynamischen Effekten unterschieden werden können.

Auch nach täglicher p.o. Verabreichung des Hauptmetaboliten von DMSO, Dimethylsulfon (DMSO<sub>2</sub>), an Ratten vom 6.-20. Tag der Gravidität in Dosierungen bis 1.0 g/kg wurden keine unerwünschten Effekte auf Lebensfähigkeit der Feten, Wurfgröße, fetales Körpergewicht, Anomalie- und Mißbildungsrate gefunden (73).

In Kaninchenversuchen (5 g/kg p.o., 4 g/kg s.c. vom 6.-14. Tag der Gravidität) wurde eine Missbildung bei 83 Feten gefunden (15). Unabhängig davon, dass die Inzidenz im Bereich der Spontanmissbildungsrate [1,4 % (45)] liegt, ist auch hier die Dosishöhe zu kritisieren. Die gleiche Kritik trifft für die Gabe von 10 g/kg/Tag an Kaninchen zu, auch wenn keine Störungen der Fertilität und embryonalen Entwicklung beobachtet wurden.

#### ***Peri- und postnatale Entwicklung***

Peri- und Postnatalstudien mit DMSO in dem heute üblichen Rattenmodell liegen nicht vor. Deshalb können aus tierexperimentellen Versuchsergebnissen keine Aussagen zur postnatalen Entwicklung der Neugeborenen während der Laktationsphase der Mutter gemacht werden.

In einer Studie an Ratten wurde jedoch DMSO in Dosierungen  $\leq 11$  g/kg/Tag p.o. über 16 Wochen an Tiere verabreicht, die sich mit einem Körpergewicht von etwa 100-150 g bei Behandlungsbeginn noch in juvenilem Alter in der frühen Wachstumsphase befanden (23). Mit Ausnahme einer Verminderung der Gewichtszunahme bei männlichen Tieren nach Dosierungen  $> 2,75$  g/kg/Tag waren keinerlei schädigende Wirkungen bis zu dieser Dosis zu diagnostizieren. Dementsprechend sind aus den tierexperimentellen Befunden bis zu diesem Dosisbereich auch keine Bedenken für den kindlichen und juvenilen Organismus abzuleiten.

Insgesamt lassen die Ergebnisse der tierexperimentellen in vivo Studien nicht vermuten, dass bei den in der Therapie und Kryokonservierung eingesetzten Dosierungen, Konzentrationen und Behandlungsdauern (in der Regel Einmalgaben oder wiederholte Einzelapplikationen in Abständen von mehreren Tagen oder Wochen) reproduktionstoxikologische Effekte auftreten könnten.

#### **7.4. Genetische Toxizität**

Hinweise auf eine genotoxische Wirkung an Systemen, die routinemäßig zur Prüfung von Chemikalien eingesetzt werden, liegen nicht vor (13).

Die wiederholte (1x täglich an 5 aufeinander folgenden Tagen) i.p. Verabreichung an Ratten verursachte ab 550 mg/kg/Tag einen Anstieg von Chromatidbrüchen in Knochenmarkzellen, die 24 Stunden nach der letzten Applikation untersucht wurden. Das Phänomen wird als Schädigung der Integrität der Chromosomenstruktur in vivo interpretiert (29), scheint jedoch für die therapeutische Anwendung und Sicherheit von DMSO ohne Bedeutung zu sein.

In vitro war die Thymidinaufnahme, Phythämagglutinin-stimulierter leukämischer Lymphozyten unter DMSO-Einfluss (0,1-1,0% DMSO Zugabe) etwa doppelt so hoch wie bei normalen Lymphozyten. Generell wird der fördernde Einfluss von DMSO in diesen Konzentrationen ( $< 2\%$ ) auf den Thymidineinbau auf eine Modulation der Membranfunktion der Zellen (siehe Kapitel 5) zurückgeführt (17).

#### **7.5. Tumorigenität**

In experimentellen Studien verzögerte DMSO den tumorigenen (karzinogenen) Effekt von 8,10-Dimethyl-1,2-benzanthrazen (64).

Hinweise auf eine tumorigene Wirkung von DMSO liegen nicht vor (13).

Die signifikante Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate von Menschen bei Magen- und Kolonkarzinomen wird auf die Inaktivierung von Hydroxylradikalen (siehe Kapitel 5) zurückgeführt (33; 34).

#### **7.6. Lokale Verträglichkeit**

##### ***Haut***

Nach (einmaliger) Verabreichung von relativ hohen Konzentrationen (70-100%) auf die Haut des Menschen verursacht DMSO umgehend Stechen und Brennen, gefolgt von mildem Erythem und Juckreiz. Die Symptome sind vermutlich auf Histaminfreisetzung (siehe Kapitel 5) und die exotherme Reaktion (siehe Kapitel 2) zurückzuführen (15) und klingen in der Regel nach 1-2 Stunden ab (15; 31). Die meisten Patienten scheinen 70-80%ige Lösungen auf der Haut zu tolerieren. Nur bei wenigen, besonders empfindlichen Individuen treten unerwünschte lokale Effekte schon nach 15%iger Lösung auf (58).

Die langfristige dermale Behandlung kann zu Austrocknung der Haut und Schorfbildung führen und eine entsprechende kosmetische Behandlung erforderlich machen (58).

Ödembildung und entzündliche Reaktionen wurden auch tierexperimentell nachgewiesen (11).

### **Konjunktiva**

Die (einmalige) Verabreichung auf die Konjunktiva führt zu gering- bis mittelgradiger Konjunktivitis und Lidödem für etwa 24 Stunden. Die Irritationen klingen ab, ohne bleibende Schäden zu hinterlassen (51). Konzentrationen von  $\leq 50\%$  wurden ohne Reizerscheinungen vertragen (11).

Bei in vitro Versuchen kam es in der Cornea zu einem Austausch von Wasser gegen DMSO, anscheinend in einer Mengen von Mol pro Mol (51).

### **Harnblase**

Auf der Blasenschleimhaut des Hundes wurde die einmalige Instillation von 25 ml 25%iger oder 50%iger DMSO-Lösung für 30 Minuten symptomlos vertragen. Nach 100%iger Lösung traten bei gleichem Applikationsmodus Ödem und oberflächliche Hämorrhagien auf. Die chronische Behandlung mit 2 x wöchentlich 25 ml 25 oder 50%iger DMSO Lösung für jeweils 30 Minuten über bis zu 6 Monaten ergab keinen pathologischen Befund.

Beim Menschen wurden zur Behandlung von chronischer interstitieller Cystitis intravesikal 50 ml 50%iger DMSO Lösung für 15 Minuten alle 14 Tage, mit fortschreitendem Therapieerfolg in Abständen von etwa 1 bis 3 Monaten, bis zu  $\geq 2$  Jahre lang instilliert. Weder lokal noch systemisch (einschließlich Auge; siehe Kapitel 7.2) wurden unerwünschte Effekte beobachtet (56).

### **Blutgefäße**

Bei der iv. Verabreichung wurden 10 und 25%ige DMSO Lösungen (von Hunden) auch bei wiederholter Gabe vertragen, während ab 50%iger Konzentration Gefäßverschlüsse (intravasale Thromben), bei höheren Konzentrationen bei Ratten auch Nekrosen auftraten (15).

Bei in vitro Versuchen wurde eine Endothelschädigung der Aorta der Ratte ab 30% DMSO beobachtet (27).

## **7.7. Immuntoxizität**

Die Senkung von Schilddrüsenantikörpern bei experimenteller Autoimmun-Thyreoiditis der Ratte weist auf einen spezifischen immunosuppressiven Effekt von DMSO hin; dabei stieg das Verhältnis von IgM- zu IgG- plaque-bildenden Zellen an. DMSO könnte die Reifung von B-Zellen (IgM- zu IgG- produzierenden Zellen) verzögert haben (61).

In das gleiche Bild passt die schnelle und lang anhaltende Senkung von humoralen Antikörpern gegen Acetylcholinrezeptoren durch DMSO-Behandlung bei experimentell erzeugter Myasthenia gravis an Ratten (48).

Auch bei Mäusen führten sehr hohe Dosierungen (4,4 g/kg/Tag ip. für 7 Tage) zu einer Senkung von IgG und IgA, aber nicht von IgM.

Bei Tieren, die gegen Schafserthrozyten sensibilisiert waren, war nach p.o. Gabe von DMSO mit dem

Trinkwasser (27-52 g DMSO/kg/Tag) eine Senkung von Plaque-bildenden Zellen, Hämagglutinationstiter und IgG<sub>1</sub>-Konzentration im Serum zu beobachten (41).

In einem in vitro System für den Nachweis einer verzögerten Immunantwort konnte gezeigt werden, dass DMSO in der Lage war, die Bildung von macrophage imigration inhibiting factor (MIIF) von Ovalbumin-sensitiven Lymphozyten zu steigern. Der Effekt ist vermutlich, wie viele andere (siehe Kapitel 5., 7.4., 8), auf eine Modulation der Funktion der Zellmembran zurückzuführen. Dimethylsulfon war in diesem Modell unwirksam (6).

Obwohl die o.g. Effekte (Senkung der humoralen Immunantwort) im Hinblick auf den Einsatz von DMSO zur Kryokonservierung von allogenen Blutstammzellen eher positiv bewertet werden könnten, ist ihre Bedeutung unter Berücksichtigung der in den Modellen wirksamen Dosierungen/Konzentrationen wohl eher zu vernachlässigen.

Bei der Kryokonservierung von Thrombozyten mit 5% DMSO wurde eine deutliche Komplement-aktivierung nach dem Auftauen auf die Substanz zurückgeführt (7).

## 7.8. Umweltrisiken

An Lachs und Forelle wurde die DL<sub>50</sub> nach ip. Injektion mit 12-17 g/kg ermittelt. Im Wasser tolerierten beide Fischarten eine Konzentration von 2% DMSO über 100 Tage. Bei Exposition gegenüber einer 4%igen Konzentration kam es zu Erosionen an den Kiemen. 4.6% führten innerhalb von 86 Stunden zum Tode (15).

An Zebra-Fisch Embryos hatten Konzentrationen bis zu 2.0 v/v% (höchste geprüfte Konzentration) keinen negativen Effekt auf die Überlebensrate. 0.1 v/v% waren ohne Einfluss auf die embryonale Entwicklung. Höhere Konzentrationen ( $\geq 1.0$  v/v%) führten zu deutlichen Entwicklungsstörungen ((schwache Pigmentierung, Ödeme, Körperkrümmung, Augen- und Schwanzdefekte, reduzierte Herzfrequenz, abnorme Streifung), die jedoch nach DMSO geringer ausgeprägt waren als nach gleichen Konzentrationen von Äthanol. DMSO erwies sich als stärkster Induktor von Hitzeschock-(Stress-) Proteinen. Konzentrationen von  $\leq 1$  v/v% sind als unbedenklich für diese Spezies anzusehen und werden als Lösemittel für Testsubstanzen, die in diesem Testsystem geprüft werden sollen, empfohlen (77). Froschembryonen und -larven reagierten empfindlicher. In diesem Testsystem sollten DMSO-Konzentrationen von 0.01 v/v% nicht überschritten werden (78).

DMSO ist als schwach wassergefährdender Stoff in die Wassergefährdungsklasse 1 eingestuft. Es wird im Wasser nicht hydrolytisch gespalten und ist daher [in reiner Form (Günzel)] umweltgefährlich, d.h. es darf in reiner Form nicht in die Kanalisation oder Oberflächengewässer gelangen, sondern muss als Sonderabfall entsorgt werden. Allerdings ist [wegen seiner guten Mischbarkeit mit Wasser und seiner biologischen Abbaubarkeit (Günzel)] eine Bioakkumulation nicht zu erwarten (13).

## 8. Kryokonservierung

### 8.1. Kryobiologische Vorgänge und ihre Beeinflussung durch Kryoprotektiva (25; 65)

Bei dem **unbeeinflussten Gefriervorgang** entzieht die Eisbildung dem extrazellulären Raum Wasser und führt zu einer Erhöhung der Konzentration gelöster Stoffe in der nicht gefrorenen Extrazellulärlüssigkeit.

Die Zellen reagieren auf die erhöhte extrazelluläre Konzentration mit der Abgabe von Wasser in den Extrazellularraum, um das Equilibrium zwischen dem Intra- und Extrazellularraum wieder herzustellen. Bei sehr schneller Abkühlung kann der Konzentrationsprozess im Extrazellularraum schneller ablaufen, als Wasser aus den Zellen hinaus diffundiert. Folge dieser Imbalance der Konzentration ist die intrazelluläre Eiskristallbildung, die für die Zellen tödlich ist. Als weiterer schädigender Faktor wird die Änderung der Zusammensetzung (Konzentrationsänderung) der Zellflüssigkeit selbst diskutiert (74).

Durch den Einsatz von **Kryoprotektiva**, die in die Zelle eindringen und die Membranpermeabilität erhöhen, wie z.B. DMSO, kann der intrazellulären Eisbildung und damit der Zellzerstörung vorgebeugt werden. Dabei wird durch den Einstrom von DMSO und dessen Wasserbindung ein Verdünnungseffekt für das Cytoplasma erzielt. Dagegen führen Kryoprotektiva, die nur im extrazellulären Raum bleiben, wie z.B. Dextran, auch nur zu einem kolligativen Effekt im Extrazellularraum.

Bei der Kryokonservierung spielen natürliche Permeabilitätsunterschiede der Membranen verschiedener Zelltypen für die zu beobachtenden Effekte eine große Rolle. Die Durchlässigkeit der Zellmembranen für Wasser von Blutzellen ist bei

Erythrozyten >> Granulozyten > Lymphozyten > Monozyten > Stammzellen.

Daraus resultiert, dass bei gleichen Kryokonservierungsbedingungen die einzelnen Zelltypen unterschiedliche Überlebenschancen und -raten haben. Dementsprechend werden bei Bedingungen, die für Stammzellen eine hohe Überlebensrate sichern, die anderen Zellen, insbesondere Erythrozyten (siehe o.g. Permeabilitätsrangfolge), lysiert. Darüber hinaus scheint die Zelldichte (höherer Prozentsatz hämolysierter Zellen bei höherer Zelldichte) für den Hämolysegrad von Bedeutung zu sein.

Zusätzlich zu den Einflüssen auf Membranpermeabilität und Wassergehalt der Zellen werden Effekte von Kryoprotektiva auf die Stabilisierung von Membranen bei tiefen Temperaturen, das Kristallisationsverhalten und weitere Mechanismen diskutiert.

## 8.2. DMSO in der Kryokonservierung

Der erste Bericht über die kryoprotektiven Eigenschaften von DMSO wurde 1959 publiziert und befasste sich mit dem Schutz von **Erythrozyten** und **Spermien** gegen Schädigung beim Einfrieren (37). DMSO allein hat bei Konzentrationen von 5-10% einen ausgezeichneten Schutzeffekt auf eine Reihe unterschiedlicher Zellsysteme vor der schädigenden Wirkung des Einfrier- und Auftauprozesses.

Das graduierte Hinzufügen von DMSO bis zu einer Konzentration von 5% beim Einfrieren (-1°C/min.) einer **Thrombozytensuspension** in Plasma zur Kryokonservierung (Lagerung bei -79°C) ist seit 1972 beschrieben. Nach schnellem Auftauen und Verdünnung des DMSO-haltigen Mediums, seiner Entfernung durch Zentrifugation und Resuspendierung der (auf diese Weise „gewaschenen“) Thrombozyten stand ein Transfusionspräparat mit optimaler hämostatischer Funktion zur Verfügung. Das auf diese Weise aus 500 ml Blut hergestellte Präparat enthält zum Zeitpunkt der Transfusion noch 30-60 mg DMSO (pro Dosis) (4).

Besondere Beachtung ist bei der Kryokonservierung den Unterschieden von Membranen zu schenken: Erythrozytenmembranen sind in vielerlei Hinsicht atypisch und unterscheiden sich von den Membranen von anderen Geweben, Spermien und Bakterien in chemischer Zusammensetzung und biologischer Ultrastruktur (3).

Die beste kryoprotektive Wirkung auf Säugerzellen (mit Ausnahme von Erythrozyten) wird mit DMSO in Konzentrationen von 5-10% während des Gefrier- und Auftauprozesses erreicht, wobei gewöhnlich die Abkühlungsgeschwindigkeit bei -1 bis -20°C/min und die Auftaurate bei 100°C/min liegen. Auf diese Weise behandelte Zellen haben eine Überlebensrate von 50-95% (3).

Dennoch wird bei hohen Konzentrationen von DMSO (>10%) und langen (> 2 Stunden) Zeiten für die Präparation von (Knochenmark-) Transplantaten (pre-freeze plus post-freeze thaw) ein zytotoxischer Effekt (Verlust an vitalen Zellen) beobachtet. Als mögliche biochemische Mechanismen für diesen zytotoxischen Effekt werden u.a. Veränderungen im Zellskelett, epigenetische Ereignisse und Cross-linking von nukleären Proteinen diskutiert (25).

Die im Rahmen der Kryokonservierung von Blutstammzellen unterschiedlicher Quellen üblicherweise genutzten DMSO-Endkonzentrationen von bis zu 10% sowie die üblichen Expositionszeiten der Zellen mit DMSO vor dem Beginn des Einfriervorganges von 1-2 Stunden sind für die Proliferationsfähigkeit der Blutstammzellen jedoch nachweislich unbedenklich (66; 70).

Die Kombination von 0.25% DMSO und 9.75% Dextran 70 führte zu nahezu gleichen Überlebensraten wie 10% DMSO allein. Mit einer Kombination von 1% DMSO und 9% Dextran 70 wurde eine Überlebensrate von nahezu 100% erreicht (3).

Bei der Kryokonservierung menschlicher hämatopoetischer Stammzellen waren bei einer Lagerung bis zu 6 Monaten 5% und 10% DMSO vergleichbar wirksam (20). Inzwischen liegen positive Erfahrungen über 12 Jahre vor. Dabei erwies sich für die Erfolgsrate weniger die DMSO-Konzentration (5 oder 10%) als vielmehr die Zahl der CD34+-Zellen als bedeutsam (75).

Bei einem umfangreichen Vergleich der Erfolgsraten nach Transfusion mittels DMSO kryokonservierter (105 Fälle) oder ohne DMSO frisch präparierter (106 Fälle) Transplantate von verwandten allogenen Spendern wurden mit Ausnahme einer erhöhten Kryosensitivität Megakaryozyten-bildender Kolonien keine signifikanten Unterschiede bei Neutrophilen, Lymphozyten, Thrombozyten und Gesamtüberlebensraten gefunden (76).

Obwohl umfangreiche Erfahrungen mit der Kryokonservierung hämatopoetischer Stammzellen aus Plazentarestblut bei 10%iger DMSO-Konzentration vorliegen (22; 39; 55), wird der Einsatz der 5% igen DMSO Konzentration für optimal (80) oder ausreichend gehalten (40) oder es werden 7,5% DMSO empfohlen (9).

Auch die Kombination von 5% DMSO mit 6% Hydroxyethylstärke hat sich bewährt (9; 55). Bei einer Konzentration von 10 v/v% DMSO im Kryokonservat von Plazentarestblut ergab die Untersuchung nach dem Auftauen bei einer Lagerung über 2-8 Wochen für die kernhaltigen mononukleären Zellen eine Wiederfindungsrate von 90% bei >90% Viabilität. Die Lagerung über 15 Jahre resultierte in einer Wiederfindung von 80% bei >95% Viabilität (30).

Wegen des gelegentlichen Auftretens von unerwünschten Arzneimittelwirkungen bei der Transfusion aufgetauter Stammzellpräparate (z.B. Hautrötung, Atemnot, Übelkeit, abdominale Krämpfe, Erbrechen, Diarrhoe, lokale Vasospasmen, Hypo- und Hypertension, kardiale oder anaphylaktoide Reaktionen), die überwiegend auf die histaminfreisetzende Wirkung von DMSO zurückgeführt werden (55) (siehe Kapitel 5), sollte die Menge des mit dem Transplantat verabreichten DMSO soweit wie möglich reduziert werden bzw. die Applikation langsam unter ärztlicher Beobachtung fraktioniert erfolgen (67; 68; 69). Unter Beachtung dieser Vorsichtsmaßnahmen treten klinisch schwerwiegende Nebenwirkungen, wie etwa ausgeprägte Hypotensionen oder kardiale Arrhythmien, kaum auf bzw. sind aufgrund der intensiv-

medizinischen Überwachung der Patienten im Rahmen der Transplantation sofort behandelbar. Unter Berücksichtigung klinischer Erfahrungen werden sogar Applikationsdosen von 1g DMSO/kg Körpergewicht als für den Patienten akzeptabel eingestuft (72). Hinsichtlich des Transplantationserfolges hat der DMSO-Gehalt im Transplantat offensichtlich keinen Einfluss. Die Rate an erfolgreichem Engraftment war bei gewaschenen und ungewaschenen aufgetauten Präparaten gleich groß, ist jedoch abhängig von der Dosis koloniebildender (CFC's) und CD34<sup>+</sup>-Zellen (40).

## 9. Verträglichkeit beim Menschen (15; 27; 61)

Aufgrund seiner pharmakodynamischen Eigenschaften (siehe Kapitel 5), insbesondere seiner entzündungshemmenden und analgetischen Wirkung wurde und wird DMSO vor allem bei topischer dermaler Verabreichung zur Behandlung akuter muskuloskeletaler Verletzungen und Entzündungen (z.B. Bursitis, Tendinitis, Zerrungen, Osteoarthritis, progressive systemische Sklerose, Verstauchungen, post-traumatische Weichteilverletzungen) in Konzentrationen von 50-95% erfolgreich eingesetzt (61).

Auch bei systemischer Amyloidose gibt es eine Reihe positiver Behandlungsergebnisse nach täglicher p.o. Gabe von 4-15 g DMSO/Patient über 7-20 Monate, wobei der Wirkungsmechanismus ungeklärt ist (61).

Als unerwünschte Effekte stehen, neben dem knoblauchartigen Geruch der Atemluft nach allen Verabreichungsarten, nach dermaler Applikation Brennen und Rötungen auf der Haut im Vordergrund. Vereinzelt kam es zu Blasenbildung auf der Haut und Urticaria (8; 33; 34; 61) (siehe auch 7.6.).

Als unerwünschte systemische Effekte werden, geringgradig ausgeprägt und vorübergehend, nach massiven Dosierungen (1 g DMSO/kg/Tag dermal als 80%iges Gel) auftretend, Sedierung, Kopfschmerzen und Übelkeit berichtet. Ernsthafte Nebenwirkungen traten nicht auf (8; 33; 61).

Nach Transfusion einer Blut-Stammzell-Präparation, die 38 g DMSO (0,7 g/kg) und 45,5 g Hydroxyethylstärke (HES) (0,84 g/kg) enthielt, kam es nach 1,5 Stunden zu pulmonalem Ödem und Atemstillstand, die eine intensivmedizinische Intervention erforderlich machten. Für die Symptomatik werden die für die Kryokonservierung eingesetzten Hilfsstoffe DMSO und HES verantwortlich gemacht (42). Sofern diese Vermutung zutrifft, ist im Hinblick auf die Risikoabschätzung zu beachten, dass es sich bei dem hier geschilderten Fall um die gleichzeitige Verabreichung von DMSO **und** Hydroxyethylstärke in relativ hoher Dosierung gehandelt hat (vergleiche Kapitel 11).

Bei Erwachsenen und Kindern war im Vergleich zur Transplantation von nicht kryokonservierten Knochenmarkpräparaten ein gesicherter Anstieg unerwünschter Reaktionen wie Übelkeit, Schüttelfrost, Dyspnoe, erniedrigte Herzfrequenz, Hypo- und Hypertonie, abdominale Krämpfe, Diarrhoe, Kopfschmerzen, Fieber, Haemolyse vorübergehend zu beobachten, wenn bei der Transplantation die gesamte, zur Kryoprotektion eingesetzte DMSO-Menge mit dem Transplantat infundiert wurde (57; 59). Allerdings konnte nur für die Häufigkeit von Erbrechen nach > 200 mg DMSO/kg eine positive Korrelation zur DMSO-Dosis gefunden werden (57). Bei 30 pädiatrischen Patienten (2-18 Jahre alt), die Knochenmark- oder periphere Blutzellpräparationen erhalten hatten, wurden nach Transfusion von 0,2-0,8 ml DMSO/kg KG (entspricht 0,22-0,88 g DMSO /kg KG) mit den genannten Produkten keine schweren Nebenwirkungen und keine lebensbedrohlichen Zustände beobachtet. Die meisten Nebenwirkungen (Häufigkeit insgesamt 47%) traten nach Knochenmarktransplantaten auf, während periphere Blutprodukte nur zu minimalen Beschwerden führten (47). Auch nach 0,17-2,38 g/kg DMSO (als 10 %iger Zusatz zu peripheren Blutstammzell-Suspensionen) wurde bei Kindern Erbrechen als einzige DMSO-verursachte unerwünschte Reaktion beschrieben. Die bei 8 von 31 Patienten (36 Transfusionen) beobachteten, mit

und ohne Behandlung vorübergehenden Schock-Symptome, die sowohl mit als auch ohne unterstützende Therapie schnell abklingen, werden offensichtlich nicht auf DMSO zurückgeführt. (43; 44). Zumindest einige der beobachteten o.g. Symptome sind vermutlich auf die DMSO-induzierte Histaminfreisetzung zurückzuführen (siehe Kapitel 5). Generell wird es für möglich gehalten, die Nebenwirkungsrate, die sich lt. einer neueren Umfrage in der Größenordnung von einer bei 70 Transplantationen bewegt und vorwiegend das Herz-Kreislauf-System und die Atmung betraf (63), durch Senkung der transfundierten DMSO-Menge zu reduzieren (1; 10; 14; 53; 57; 59; 63).

Die o.g. unerwünschten Arzneimittelwirkungen scheinen jedoch nicht nur auf DMSO zurückzuführen zu sein (s.o.), das mit großer Wahrscheinlichkeit vor allem für das Auftreten von Sedierung, Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen verantwortlich zu machen ist. An der weiteren Symptomatik dürften Zytolyseprodukte zumindest mitbeteiligt sein. An der positiven Korrelation zwischen Bradycardie und Erythrozyten(produkten) scheint kein Zweifel zu bestehen (1).

Die prospektive Auswertung transfusionsbedingter Unverträglichkeitserscheinungen nach Gabe von kryokonservierten autologen peripheren Blutstammzellen an 215 Patienten mit bösartigen hämatologischen Erkrankungen oder soliden Tumoren ergab, dass das weibliche Geschlecht, die Diagnose multipler Myelome und die Zahl der pro kg Körpergewicht transfundierten Granulozyten von deutlicher Vorhersagekraft für das Auftreten von Unverträglichkeitserscheinungen bei insgesamt ca. 57% der Fälle waren. Diese Verhältnisse zeigen, dass neben der transfundierten DMSO-Dosis die Zusammensetzung des Transplantats und die Grunderkrankung der Patienten wichtige Einflussfaktoren für das Auftreten transfusionsbedingter unerwünschter Effekte sind (79).

Die Bedeutung anderer Faktoren als DMSO für das Auftreten unerwünschter Effekte wird durch Befunde unterstrichen, die zeigen, dass auch nach seiner Entfernung solche (am häufigsten allergische Reaktionen, gefolgt von gastrointestinalen und respiratorischen Symptomen) auftreten. Als Risikofaktoren wurden die Zahl der Granulozyten und (Zell- ?) Verklumpungen identifiziert (81).

Eine **Reduktion von Zytolyseprodukten** durch einen vor der Kryokonservierung stattfindenden Aufreinigungsschritt des Transplantats sowie von **DMSO** im Transplantat durch einen **Waschprozess** erscheint deshalb unter toxikologischem Gesichtspunkt **wünschenswert** (16). Allerdings sind mit Waschprozessen nach dem Auftauen stets auch Verluste an Stammzellen verbunden, die den therapeutischen Effekt der Präparate erheblich reduzieren können. Daher wird im klinischen Betrieb in aller Regel auf das Waschen von aufgetauten Blutstammzell-Präparaten zur Reduzierung der DMSO-Belastung verzichtet. Ggf. auftretende leichtere Nebenwirkungen werden in Kauf genommen.

Die in Tierexperimenten beobachteten Veränderungen an der Augenlinse (siehe Kapitel 7.2) konnten beim Menschen nach täglicher dermaler Verabreichung von 1 g DMSO (80%ig)/kg/Tag über 90 Tage nicht nachgewiesen werden (8). Auch die Langzeitüberwachung dauertherapierter Patienten ( $\leq$  21 Monate) erbrachte keine Hinweise auf derartige Veränderungen (27)

## 10. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

DMSO ist eine stark hygroskopische, komplett mit Wasser mischbare und deutlich Gefrierpunkt-herabsetzende Flüssigkeit, die in biologischen Systemen die einzigartige Fähigkeit hat, bei Einhaltung bestimmter Konzentrationen Membranen ohne Schädigung zu durchdringen.

Es kommt zu  $\leq$  40 ng/ml physiologisch im menschlichen Plasma vor und wird in Spuren auch über Nahrungsmittel aufgenommen.

Aus pharmakodynamischen Untersuchungen sind im wesentlichen entzündungshemmende, gefäßerweiternde (Histamin-freisetzende), diuretische, Thrombozytenaggregation-hemmende und hämolytische Effekte bekannt. Daneben werden Förderung des Kollagenabbaus, Cholinesterase-hemmende und antimikrobielle Wirkungen beschrieben.

Die Penetrationsförderung durch Zellmembranen spielt bei den o.g. Effekten z.T. eine bedeutsame Rolle und wird pharmazeutisch für die dermale Verabreichung von anderen Wirkstoffen genutzt.

Interaktionen mit anderen Wirkstoffen auf Rezeptorebene sind nicht bekannt.

Die Metaboliten Dimethylsulfon ( $\text{DMSO}_2$ ) und Dimethylsulfid (DMS;  $\text{DMSH}$ ) sind pharmakodynamisch wenig untersucht und, wenn überhaupt, weniger wirksam als DMSO.

DMSO wird bei Versuchstieren und Menschen schnell resorbiert und offensichtlich vorzugsweise im Körperwasser verteilt. Es wird schnell zu Dimethylsulfon ( $\text{DMSO}_2$ ) oxidiert. In geringer Menge entsteht durch Reduktion Dimethylsulfid (DMS;  $\text{DMSH}_2$ ), das für den knoblauchartigen Geruch verantwortlich ist.

Die Ausscheidung der unveränderten Substanz und der Metabolite erfolgt vorwiegend über die Nieren, daneben über die Faeces und, in Form von Dimethylsulfid, auch über Haut und Lunge.

Die für die Risikoabschätzung für kryokonservierte Präparate aus autologen oder allogenen humanen Blutstammzellen wichtigsten Informationen zur Pharmakokinetik wurden durch Stammzelltransfusionen beim Menschen mit DMSO-Dosierungen von ca. 0,4-1,3 g/kg Körpergewicht gewonnen:

$C_{\max} \approx 1,5 \pm 0,5 \text{ mg/ml}$ ; Elimination bis 24 h zu 44% als DMSO und zu 4% als  $\text{DMSO}_2$  über die Nieren.

Akute Toxizitätsprüfungen wurden an Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Katze, Hund und Affe durchgeführt. Mit  $\text{DL}_{50}$ -Werten im g/kg-Bereich, selbst nach iv. Verabreichung, ist DMSO als relativ ungiftig bei Einmalapplikation einzustufen.

Subchronische und chronische Toxizitätsstudien an Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Hund und Affe bei unterschiedlichen Verabreichungsarten und -dauern bis zu 18 Monaten erbrachten keine Hinweise auf spezifische systemische toxische Effekte. Dabei wurden  $\leq 50\text{-}80\%$ ige DMSO-Lösungen verabreicht. Systemische Unverträglichkeitserscheinungen traten erst bei Dosierungen auf, die nahe bei oder im letalen Dosisbereich bei Einmalapplikation lagen.

Bestimmte Veränderungen am Auge (Myopie des Linsenkerns) traten bei verschiedenen Versuchstierspezies nach wiederholter längerfristiger Applikation ( $\geq 5$  Wochen) von Dosierungen  $\geq \approx 1,0 \text{ g/kg}$  auf. Beim Menschen wurden solche Veränderungen nach  $\geq 0,1 \text{ g/kg}$  über 2,5 Jahre oder  $1,0 \text{ g/kg}$  über 12 Wochen nicht beobachtet.

Reproduktionstoxikologische Untersuchungen wurden nur in begrenztem Umfang ausgeführt. Hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung der Fertilität ergaben morphologische Untersuchungen von Gonaden, Prostata und Uterus keine Hinweise auf schädigende Wirkungen.

Untersuchungen des möglichen Einflusses auf die Embryonalentwicklung sind aufgrund methodischer Mängel für die Risikoabschätzung weitgehend unbrauchbar, da die Dosierungen vorwiegend in der Nähe des letalen Dosisbereichs lagen. Soweit niedrigere Dosierungen verabreicht wurden, lassen diese nicht vermuten, dass bei den in der Therapie eingesetzten DMSO-Dosierungen und -Konzentrationen reproduktionstoxische Effekte zu erwarten sind.

Die Untersuchung des möglichen Einflusses auf die postnatale Entwicklung erfolgte erst nach Ende der Säugeperiode an juvenilen Tieren. Unerwünschte Wirkungen (u.a. Wachstumshemmung) traten erst bei langfristiger Verabreichung von Dosierungen > 2,75 g/kg/Tag auf.

Hinweise auf eine genotoxische Wirkung an Systemen, die routinemäßig zur Prüfung von Chemikalien eingesetzt werden, liegen nicht vor.

Beobachtungen über tumorigene Wirkungen wurden bisher nicht mitgeteilt. Eine Hemmung der Tumorigenese durch Sauerstoff- oder Hydroxylradikalfang von DMSO wird diskutiert.

Bei Konzentrationen von > 50% DMSO sind Unverträglichkeitserscheinungen auf der Haut (Stechen, Brennen, Erythem, Juckreiz, seltene Ödembildung und stärkere Entzündungen) und Schleimhaut (Konjunktiva: Irritationen, Ödeme, Harnblase: Ödeme, Hämorrhagien) zu erwarten. Nach i.v. Verabreichung können von dieser Konzentration an intravasale Thromben auftreten.

Zu nennenswerten Hämolysen bei intravasaler Gabe scheint es ab 25 v/v% zu kommen.

Effekte auf das Immunsystem waren nur nach extrem hohen Dosierungen und Konzentrationen in vivo und in vitro nachweisbar. Sie sind deshalb für die Risikoabschätzung zu vernachlässigen.

Reines DMSO ist als schwach wassergefährdender Stoff in die Wassergefährdungsklasse 1 eingestuft und muss als Sonderabfall entsorgt werden.

Beim Menschen werden, abgesehen von dem durch Dimethylsulfid verursachten knoblauchartigen Geruch, bei **dermalen** Applikation Tagesdosen von 0,1-0,2 g/kg auch über lange Zeiträume ohne unerwünschte systemische Effekte vertragen. Solche (Sedierung, Kopfschmerzen, Übelkeit) traten, wenig ausgeprägt vorübergehend, erst nach 1 g/kg/Tag auf.

Die i.v. Verabreichung von  $\geq 100$  bis > 200 mg DMSO/kg als Bestandteil von Blutstammzelltransplantaten führte zu relativ hohen Raten unerwünschter Reaktionen, wie vorübergehender Sedierung, Kopfschmerzen, Übelkeit, Schüttelfrost, Dyspnoe, Bradykardie und Hypertonie, bei > 200 mg/kg auch zu einem deutlichen Anstieg von Erbrechen.

Die o.g. unerwünschten Wirkungen sind vermutlich sowohl auf DMSO als auch auf den Granulozytengehalt und Zytolyse-Produkte zurückzuführen. Die Reduktion beider Komponenten durch einen Waschprozess ist deshalb wünschenswert, obwohl dieser Schritt für etwa die Hälfte des Verlustes kernhaltiger Zellen nach dem Auftauen und Waschen verantwortlich ist (35). Zum Erhalt der Wirksamkeit von Blutstammzell-Präparaten wird daher eine generelle Waschung im klinischen Betrieb kaum durchgeführt.

## **11. Generalzusammenfassung, Bewertung der Daten und Informationen und Unterschriften der Sachverständigen**

DMSO wird in der Regel in einer Endkonzentration von maximal 5-10% zur Kryokonservierung von Blutstammzell-Präparaten aus den Quellen Knochenmark, peripheres Blut und Nabelschnurblut / Plazentarestblut eingesetzt.

Die Praxis (Transplantation autologer Stammzellen, kryokonserviert mit 10 v/v % DMSO) (18) zeigt, dass bei iv. Verabreichung von

0,4-1,3 g DMSO/kg Körpergewicht im Plasma ein  $C_{max}$  von  $1,5 \pm 0,5$  mg/ml

erreicht wird. Diese Dosierung und die daraus resultierende Plasmakonzentration sind als repräsentativ für die gegenwärtig praktizierte Therapie bei Erwachsenen anzusehen, die akzeptiert und toleriert wird.

Die im Transplantat maximal mögliche Endkonzentration von 10 v/v% DMSO ist hinsichtlich der lokalen Verträglichkeit in Blutgefäßen noch als unbedenklich einzustufen.

Unter Berücksichtigung der für DMSO vorliegenden Daten zur Verträglichkeit im Tierexperiment und am Menschen können für die Verabreichung von Dosierungen und Konzentrationen in dem o.g. Bereich unter Berücksichtigung der Indikation keine absolut unvermeidbaren Risiken für den Empfänger abgeleitet werden.

Allerdings muss bei beabsichtigter Verabreichung von DMSO-haltigen Präparaten an Säuglinge und Kleinkinder auf einige Probleme besonders hingewiesen werden.

Auf Grund des Fehlens entsprechender pharmakokinetischer Untersuchungsergebnisse an Kleinkindern ist für die o.g. Aussagen die Extrapolation vom Erwachsenen auf den Säugling erforderlich. Die mit dieser Extrapolation verbundenen Unsicherheiten, relativ hohe Dosierungen und die dadurch möglicherweise verursachten Unverträglichkeitserscheinungen (z.B. vorübergehende Sedierung, Kopfschmerzen, Übelkeit, Schüttelfrost, Dyspnoe, Bradycardie, Hypo- oder Hypertonie, anaphylaktoide Reaktionen, bei Belastungen > 200 mg/kg auch ein deutlicher Anstieg von Erbrechen) lassen eine Absenkung der DMSO-Konzentration im Transplantat aus toxikologischer Sicht als wünschenswert erscheinen. Das kann unter anderem durch einen zusätzlichen Waschprozess geschehen, zumal dadurch zusätzlich Zytolyseprodukte reduziert werden, die neben der Granulozytenzahl (79) zumindest für einen Teil der beobachteten Symptomatik verantwortlich sein dürften (1; 10). Durch einen solchen Waschprozess kann bei sorgfältiger Ausführung unter aseptischen Bedingungen der therapeutische Effekt in der Regel, aber nicht in jedem Fall, erhalten bleiben (40). Es ist jedoch mit einer Abnahme zumindest der Intensität der unerwünschten Effekte, insbesondere der Herzfrequenz- und Blutdruckveränderungen (16), zu rechnen, wenn auch eine komplette Beseitigung der transfusionsbedingten unerwünschten Effekte nicht gelingt (50).

Allerdings können bei nicht absolut sachgerechter Durchführung dieses Waschprozesses das Ausmaß osmotisch bedingter Zellschäden und das Infektionsrisiko erheblich ansteigen. Außerdem entsteht ein zusätzlicher Zeitaufwand von 15 min (46) bis zu ca. 3-4 Stunden (59). Schließlich ist auch die Qualität des zur Verfügung stehenden Transplantats von erheblicher Bedeutung für die Vorschaltung eines Waschprozesses. Bei nahe den unteren Grenzwerten für kernhaltige und CD34<sup>+</sup>-Zellen liegenden Zellzahlen sollte auf einen Waschvorgang eher verzichtet werden, um einen manipulationsbedingten weiteren Zellverlust zu vermeiden (2; 24).

Deshalb sind der Mehraufwand und die Risiken im einzelnen Anwendungsfall durch den behandelnden Arzt vor Ort gegen die Risiken einer höheren DMSO- und Zytolyseprodukt-Belastung des Patienten abzuwägen. Dabei sind besonders die örtlichen Gegebenheiten (z.B. Verfügbarkeit von Reinraumtechnik, Clean Benches, geschlossenen Systemen für die Durchführung des Waschprozesses) zu berücksichtigen. Alternativ kann durch eine fraktionierte Gabe von DMSO-haltigen Präparaten die Nebenwirkungsrate deutlich gesenkt werden (68).

Zum anderen ist hervorzuheben, dass die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen bei Kleinkindern und Erwachsenen auf Grund einer vitalen Indikation erfolgt. Bei dieser Art der Indikation sind die o.g., z.T. nur theoretisch ableitbaren Bedenken zweifellos aus medizinisch-ethischer Sicht zurückzustellen. Sie werden vom therapeutischen Nutzen der Medikation eindeutig dominiert, insbesondere wenn man berücksichtigt, dass für Patienten, für die bisher auf Grund seltener Gewebe-

merkmale kein geeigneter Familien- oder Fremdspender gefunden werden konnte (ca. 20%), durch die gezielte Sammlung besonders gesuchter Gewebetypen nunmehr eine Heilungschance besteht.

Berlin – Homburg/Saar, 03. Dezember 2008

---

Dr. Peter Günzel

---

Prof. Dr. Hermann Eichler

Sachverständige

## 12. Referenzen

1. Alessandrino EP, Bernasconi P, Caldera D et al.  
Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases.  
Bone Marrow Transplant (1999) 23: 533-537
2. Antoneas V, Shaw PI, Bradstock KF  
Inclusion of unwashed umbilical cord blood stem cells after thawing for allogenic transplantation.  
Bone Marrow Transplantation (2004) 34:379
3. Ashwood-Smith MJ  
Current concepts concerning radioprotective and cryoprotective properties of dimethyl sulfoxide in cellular systems. In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.  
Ann NY Acad Sci (1975): 246-256
4. Baldini MG  
Discussion paper: dimethyl sulfoxide as a cryoprotective agent for platelet preservation by freezing.  
In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.  
Ann NY Acad Sci (1975): 306-307
5. Barnett KC, Noel PRB  
Dimethyl sulphoxide and lens changes in primates  
Nature (1967) 214: 1115-1116
6. Bartfeld H, Goldstein A  
Cell-mediated immunity: Its modulation by dimethyl sulfoxide. In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.  
Ann NY Acad Sci (1975): 81-90
7. Bock M, Schleuning M, Heim MU, Mempel W  
Cryopreservation of human platelets with dimethyl sulfoxide: changes in biochemistry and cell function.  
Transfusion (1995) 35: 921
8. Brobyn RD  
The human toxicology of dimethyl sulfoxide. In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.  
Ann NY Acad Sci (1975): 497-506
9. Bruno A, Ballatare B, Adorno G, Caravita T et al.  
Red blood cell depletion and cryopreservation of umbilical cord blood (UCB).  
Bone Marrow Transplantation (1997) 20: 89-93
10. Calmels B, Houzé P, Hengesse J-C, T et al.  
Preclinical evaluation of an automated closed fluid management device :Cytomate, for washing out DMSO from hematopoietic stem cell grafts after thawing.  
Bone Marrow Transplant (2003) 31: 823-828

11. Calesnick B, Dinan A  
Pharmakologie und Toxikologie von Dimethylsulfoxid (DMSO). In: Jacob SW, Herschler RJ, Schmellenkamp H. DMSO – Die Anwendung in der Medizin.  
Springer; Berlin et al (1985): 26-3
12. Candussio L, Klugmann FB, Decorti G, Bevilacqua S, Baldini L  
Dimethyl sulfoxide inhibits histamine release induced by various chemicals.  
Agents and Actions (1987) 20: 17-21
13. Chemikalien-Lexikon 1999  
Dimethylsulfoxid  
<http://www.omikron-online.de/cyberchem/cheminfo/0177-lex.htm>
14. Curcoy AI, Alcorta I, Estella J et al.  
Cryopreservation of HPCs with high cell concentration in 5-percent DMSO for transplantation in children.  
Transfusion (2002) 42: 962
15. David NA  
The pharmacology of dimethyl sulfoxide.  
Annu Rev Pharmacol (1972) 12: 353-374  
Davis JM, Rowley SD, Braine HG, Piantadosi S, Santos GW,  
Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion.  
Blood (1990) 75: 781-786
16. Davis JM, Rowley SD, Braine HG, Piantadosi S, Santos GW  
Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion  
Blood (1990) 75: 781-786
17. Dennis AJ  
Altered mitogenic responsiveness of chronic leukemic lymphocytes and normal human lymphocytes treated with dimethyl sulfoxide. In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.  
Ann NY Acad Sci (1975): 73-80
18. Egorin MJ, Rosen DM, Sridhara R, Sensenbrenner L, Cottler-Fox M  
Plasma concentrations and pharmacokinetics of dimethyl sulfoxide and its metabolites in patients undergoing peripheral-blood stem-cell transplants.  
J Clin Onc (1998) 16 (2): 610-615
19. Fiedler HP  
Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete.  
Editio Cantor, Aulendorf, 4. Aufl. (1996) pp 478-482
20. Galmés A, Besalduch J, Bargay J, Novo A, Morrey M, Guerra JM, Duran MA  
Long-term storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant.  
Transfusion (1999) 39: 70-73
21. Gerhards E, Gibian H  
The metabolism of dimethyl sulfoxide and its metabolic effects in man and animals.

- Ann NY Acad Sci (1967) 141: 65-76
22. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R et al.  
Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors.  
New Engl J Med (1997) 337 (6): 373-381
  23. Günzel P, Richter KD  
Verträglichkeit von DOLICUR (Dimethylsulfoxyd) bei langdauernder Anwendung im Tierversuch.  
In Laudahn/Schloßhauer: Dimethyl-Sulfoxyd DMSO, Symposium 2.7.1965  
Berlin (1965) pp: 23-27; Literatur pp 115-119
  24. Hahn T, Bunrowasate U, George MC, Bir AS et al.  
Use of nonvolume-reduced (unmanipulated after thawing) umbilical cord blood stem cells for  
allogenic transplantation results in safe engraftment.  
Bone Marrow Transplantation (2003) 32: 145-150
  25. Hubel A  
Parameters of cell freezing: Implications for the cryopreservation of stem cells.  
Transfusion Medicine Reviews (1997) 11 (3): 224-233
  26. Jacob SW, Herschler R  
Pharmacology of DMSO.  
Cryobiology (1986) 23: 14-27
  27. Jacob SW, Wood DC  
Dimethyl Sulfoxide (DMSO). Toxicology, pharmacology, and clinical experience.  
Am J Surg (1967) 114: 414-26
  28. Jacob SW, Wood DC, Brown JH  
Therapeutic potential of dimethyl sulfoxide (DMSO) in aerospace medicine.  
Aerospace Med (1969) 40 (1): 75-84
  29. Kapp RW, Eventoff BE  
Mutagenicity of dimethylsulfoxide (DMSO): In vivo cytogenetics study in the rat.  
Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis (1980) 1: 141-145
  30. Kobyłka P, Ivanyi P, Breuer-Briesendorf BS  
Preservation of immunological and colony-forming capacities of long-term (15 years) cryopreserved  
cord blood cells.  
Transplantation (1998) 65: 1275-1278
  31. Kocsis JJ, Harkaway S, Snyder R  
Biological effects of the metabolites of dimethyl sulfoxide. In: Jacob W, Herschler R. Biological  
actions of dimethyl sulfoxide.  
Ann NY Acad Sci (1975): 104-109
  32. Kolb KH, Jänicke G, Kramer M, Schulze PE, Raspé  
Das Verhalten von <sup>35</sup>S markiertem Dimethylsulfoxid im menschlichen und tierischen Organismus.  
Arzneim Forsch (Drug Res) (1965) 15: 1292-1295

33. Kommentar zum DAB 10  
Dimethylsulfoxid – Dimethylis sulfoxidum.  
Grundlfg. 1991, 4. Lfg. (1994): 1-3
34. Kommentar zur PH EUR. 1997  
Dimethylsulfoxid – Dimethylis sulfoxidum.  
9. Lfg. (1998): 1-3
35. Laroche V, McKenna DH, Moroff G et al.  
Cell loss and recovery in umbilical cord blood processing: a comparison of postthaw and postwash samples.  
Transfusion (1999) 45: 1909-1916
36. Lehuu B, Curtis-Prior PB  
Effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on aggregation of human blood platelets.  
J Pharm Pharmacol (1987) 39: 62-63
37. Lovelock JE, Bishop MW  
Prevention of freezing damage to living cells by DMSO.  
Nature (1959) 183: 1394-1395
38. Montaguti P, Melloni E, Cavalletti E  
Acute intravenous toxicity of dimethyl sulfoxide, polyethylene glycol 400, dimethylformamide, absolute ethanol, and benzyl alcohol in inbred mouse strains.  
Arzneimittelf (1994) 44 (4): 566-570
39. Mugishima H, Harada K, Chin M, Suzuki T, Takagi K, Hayakawa S et al.  
Effects of long-term cryopreservation on hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood.  
Bone Marrow Transplantation (1999) 23: 395-396
40. Nagamura-Inoue T, Shioya M, Sugo M, Cui Y et al.  
Wash-out of DMSO does not improve the speed of engraftment of cord blood transplantation: follow-up of 46 adult patients treated with units shipped from a single cord blood bank.  
Transfusion (2003) 43: 1285-1294
41. Nash DR, Steingrube VA, Warrington RJ  
Primary immune responsiveness and other observations in mice given oral dimethyl sulfoxide.  
Immunopharmacol (1983) 6: 191-201
42. Nishihara G, Sakemi T, Ikeda Y, Baba N, Shimamoto Y  
Multiple organ failure associated with dimethyl sulfoxide and hydroxyethyl starch in autologous blood stem cell transplantation.  
Nephron (1996) 72: 356-357
43. Okamoto Y, Takaue Y, Yasutomo K, Saito S et al.  
Clinical toxicity at the infusion of cryopreserved and thawed peripheral blood stem cell grafts in children.  
Rinsho Ketsueki (1992) 33(3): 317-321

44. Okamoto Y, Takaue Y, Saito S et al.  
Toxicities associated with cryopreserved and thawed peripheral blood stem cell autografts in children with active cancer.  
Transfusion (1993) 33: 578
45. Palmer AK  
Reproductive toxicity risk assessment – some questions. In: Neubert D, Kavelock RJ, Merker HJ, Klein J. Risk Assessment of prenatally-induced adverse health effects.  
Springer, Heidelberg (1992) pp 45-61
46. Perotti CG, Del Fante C, Viarengo G, Papa P et al.  
A new automated cell washer device for thawed cord blood units.  
Transfusion (2004) 44: 900-906
47. Perseghin P, Balduzzi A, Bonamoni S, Dassi M et al.  
Infusion-related side-effects in children undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia.  
Bone marrow transplantation (2000) 26(1): 116-118
48. Pestronk A, Drachman DB  
Dimethyl sulphoxide reduces anti-receptor antibody titres in experimental myasthenia gravis.  
Nature (1980) 228: 733-734
49. Richter E, Eichler H, Raske D, Leveringhaus A, Zieger W, Kerowgan M et al.  
5% Me<sub>2</sub>SO is sufficient to preserve stem cells derived from cord blood.  
Bone Marrow Transplantation (1998) 22 (1): 16
50. Rowley SD, Feng Z, Yadock D, Holmberg L et al.  
Post-thaw removal of DMSO does not completely abrogate infusional toxicity or the need for pre-infusion histamine blockade.  
in  
Taylor & Francis (Edit.), Cytotherapy (1999)pp 439-446
51. Rubin LF  
Toxicity of dimethyl sulfoxide, alone and in combination. . In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.  
Ann NY Acad Sci (1975): 88-103
52. Sandborn EB, Stephens H, Bendayan M  
The influence of dimethyl sulfoxide on cellular ultrastructure and cytochemistry. In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.  
Ann NY Acad Sci (1975): 122-137
53. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J et al.  
Multidisciplinary utilisation of dimethyl sulfoxide : pharmacological, cellular, and molecular aspects.  
Biochem Pharmacol (2003) 65: 1035-1041
54. Shephard TH  
Catalogue of teratogenic agents.

The John Hopkins University Press 9. Ed (1998) pp 928-929

55. Sputtek A, Gutensohn K, Hummel K, Löliger C, Kühnl P  
Zur Kryokonservierung von Blutstammzellen.  
J Lab Med (1996) 20 (2): 70-77
56. Stewart BH, Brannson AC, Hewitt CB, Kiser WS, Straffon RA  
The treatment of patients with interstitial cystitis, with special reference to intravesical DMSO  
J Urol (1972) 107: 377-380
57. Stroncek DF, Fautsch SK, Lasky LC, Hurd DD, Ramsay NKC, Mc. Cullough J  
Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow.  
Transfusion (1991) 31: 521-526
58. Swanson BN  
Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO).  
Rev Clin Basic Pharmacol (1985) 5: 1-33
59. Syme R, Bewick M, Stewart D, Porter K et al.  
The role of depletion of dimethyl sulfoxide before autografting: On hematologic recovery, side effects, and toxicity.  
Biology of Blood and Marrow Transplantation (2004) 10: 135-141
60. Szmant HH  
Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems. . In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.  
Ann NY Acad Sci (1975): 20-23
61. Trice JM, Pinals RS  
Dimethyl sulfoxide: A review of its use in the rheumatic disorders.  
Sem Arthr Rheum (1985) 15 (1): 45-60
62. Vogin EE, Carson S, Cannon G, Linegar CR, Rubin LF  
Chronic toxicity of DMSO in primates.  
Toxicol Appl Pharmacol (1970) 16: 606-612
63. Windrum P, Morris TCM, Drake MB et al.  
Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres.  
Bone Marrow Transplantation (2005) 36: 601-603
64. Wood DC, Wood J  
Pharmacologic and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide. In: Jacob W, Herschler R. Biological actions of dimethyl sulfoxide.  
Ann NY Acad Sci (1975): 7-19
65. Rowley SD  
Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques. J Hematother (1992) 1: 233-250

66. Rowley SD, Anderson GL  
Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* (1993) 11: 389-393
67. Keung YK, Lau S, Elkayam U, Chen SC, Douer D  
Cardiac arrhythmia after infusion of cryopreserved stem cells. *Bone Marrow Transplant* (1994) 14: 363-367
68. López-Jiménez J, Cerveró C, Muñoz A, Hernández-Madrid A, Fernández Pineda J, García Laraña J, Moro C, Maldonado M, Pérez Oteyza J, Otheo E, et al.  
Cardiovascular toxicities related to the infusion of cryopreserved grafts: results of a controlled study. *Bone Marrow Transplant* (1994) 13: 789-793
69. Martino M, Morabito F, Messina G, Irrera G, Pucci G, Iacopino P  
Fractionated infusions of cryopreserved stem cells may prevent DMSO-induced major cardiac complications in graft recipients. *Haematologica* (1996) 81: 59-61
70. Branch DR, Calderwood S, Cecutti MA, Herst R, Solh H  
Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulfoxide toxicity. *Transfusion* (1994) 34: 887-890
71. Willhite CC, Katz PI.  
Toxicology updates. Dimethyl sulfoxide. *J Appl Toxicol* 1984;4:155-60.
72. Rowley SD, Bensinger WI, Gooley TA, Buckner CD.  
Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. *Blood* 1994;83:2731-2736
73. Magnuson BA, Appleton J, Ryan B, Matulka RA  
Oral developmental toxicity study of methylsulfonylmethane in rats. *Food Chem Toxicol* (2007) 45(6):977-984
74. Pegg DE  
Principles of cryoconservation. *Methods Mol Biol* (2007) 368: 39-57
75. Galmes A Gutierrez A, Sampol A, et al.  
Long-term hematological reconstitution and clinical evaluation of autologous peripheral blood stem cell transplantation after cryopreservation of cells with 5% and 10% dimethylsulfoxide at -80 degrees C in a mechanical freezer. *Haematologica* (2007) 92(7): 986-989
76. Kim DH, Jamal N, Saragosa R, et al.  
Similar outcomes of cryopreserved allogeneic peripheral stem cell transplants (PBSCT) compared to fresh allografts. *Biol Blood Marrow Transplant* (2007) 13(10): 1233-1243

77. Hallare A, Nagel K, Köhler HR, Triebkorn R  
Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos.  
*Ecotoxicol Environ Saf* (2006) 63(3): 378-388
78. Marquis O, Millery A, Guittonneaud S, Miaud C  
Solvent toxicity to amphibian embryos and larvae.  
*Chemosphere* (2006) 63(5): 889-892
79. Bojanic I, Cepulic BG, Mazic S, et al.  
Toxicity related to autologous peripheral blood haematopoietic progenitor cell infusion is associated with number of granulocytes in graft, gender and diagnosis of multiple myelomas.  
*Vox Sang* (April 16, 2008) (elektronische Publikation vor Druck)
80. Bakken AM  
Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells.  
*Curr Stem Cell Res Ther* (2006) 1(1): 47-54
81. Cordoba R, Arrieta R, Kerquelen A, Hernandez-Navarro F  
The occurrence of adverse events during the infusion of autologous peripheral blood stem cells is related to the number of granulocytes in the leukapheresis product.  
*Bone Marrow Transplant* (2007) 40(11): 1063-1067

### **13. Informationen über die Sachverständigen**

## Curriculum

**Name** Dr. med. vet. Peter K.H. **Günzel**

**Anschrift** Hubertusstr. 19; 135 89 Berlin-Spandau  
Tel. 0049-30-375 94 979 Fax 0049-30-375 94 980  
E-mail [p.guenzel@t-online.de](mailto:p.guenzel@t-online.de)

**Geburt** in Breslau/Schlesien, Deutschland (jetzt Polen)  
am 22.04.1937

### Studium und universitäre Ausbildung

**1955-1957** Studium der Veterinärmedizin; Humboldt-Universität, Berlin

**1957-1961** Studium der Veterinärmedizin; Freie Universität Berlin

**1961** Assistent; Klinik für Klauentierkrankheiten, Freie Universität, Berlin

**1962** Promotion zum Dr. med. vet. an der Freien Universität, Berlin. Titel der Dissertation: „Untersuchungen über Veränderungen von Nieren, Mund- und Magenschleimhaut bei der Urämie des Hundes“; Pathologie und Histopathologie

### Berufliche Weiterbildung und Tätigkeit

**1961-1964** Schering AG, Abt. für Pharmakologie; Weiterbildung in Versuchstierzucht und -haltung, lokaler und systemischer Verträglichkeitsprüfung, Hämatologie, Klinischer Chemie, Sektion und Histopathologie von Labortieren, Reproduktionstoxikologie. Tumorigenitätsprüfung

**1964** Schering AG, Werk Bergkamen; Gründung der Abt. für Experimentelle Toxikologie

**1964-1974** Schering AG, Werk Bergkamen; Leiter des Instituts für Experimentelle Toxikologie

**1974-1997** Schering AG; Werk Berlin; Leiter des Instituts für Experimentelle Toxikologie

**1997** Pensionierung; Tätigkeit als freier Berater (Consultant)

### Qualifikationen

- 1971** Fachtierarzt für Pharmakologie und Toxikologie;  
Tierärztekammer Nordrhein-Westfalen, Deutschland
- 1998** Eurotox Registered Toxicologist;  
EUROTOX Generalsekretariat, Basel, Schweiz

#### **Mitgliedschaft in wissenschaftlichen Gesellschaften**

- seit 1964** European Society of Toxicology (EUROTOX)  
(1975-1981 Vorstandsmitglied)
- 1964-1998** Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS)
- seit 1966** Deutsche Pharmakologische Gesellschaft, jetzt  
Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und  
Klinische Pharmakologie und Toxikologie
- 1990-1997** Drug Information Association (DIA)

#### **Weitere Aktivitäten**

- 1994-1997** International Safety Evaluation Advisory Board  
Center for Medicines Research, Carshalton, Surrey,  
UK
- 1983-1997** Mitglied des wissenschaftlichen Beirats der  
Zeitschrift ALTEX- Alternatives to Animal Experiments

#### **Publikationen**

Artikel in wissenschaftlichen Zeitschriften	61
Artikel in Symposiums-Berichten	28
Lehrbuchbeiträge	15

---

#### **Erklärung zu möglichen Interessenkonflikten**

Ich arbeite als Berater für pharmazeutische Unternehmen und wissenschaftliche Einrichtungen auf Honorarbasis.

Ich bin prinzipiell nicht an Patentgebühren und Verkaufserlösen von Produkten beteiligt, an deren Entwicklung ich mitarbeite.

Berlin, 03. Dezember 2008

---

Dr. Peter Günzel

## Curriculum

Univ.-Prof. Dr. med. Hermann Eichler  
Direktor des Instituts für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin  
Universitätsklinikum des Saarlandes  
66421 Homburg/Saar

Telefon: 06841-16-22530, Fax.: 06841-16-22555  
email: hermann.eichler@uks.eu

### Persönliche Daten

geboren am 29. März 1962 in Hof / Saale, deutsche Staatsangehörigkeit

### Ausbildung

- 05 / 1982 – 06 / 1989 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 06 / 1989 Ärztliche Prüfung (Gesamtnote ‚sehr gut‘)
- 01 / 1988 – 06 / 1990 Promotionsarbeit an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Abteilung für Transfusionsmedizin der Chirurgischen Universitätsklinik unter der Leitung von Prof. Dr. D. Wiebecke. „Untersuchung eines neuartigen Plasmapherese-Systems unter besonderer Berücksichtigung der Thrombozytenfunktion“ („magna cum laude“)
- 04 / 1991 Ärztliche Approbation

### Beruflicher und wissenschaftlicher Werdegang

- 10 / 1989 – 11 / 1990 Arzt im Praktikum in der Kinderklinik am Mönchberg, Würzburg
- 12 / 1990 – 08 / 1991 Assistenzarzt im Institut Würzburg, Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes (Leiter: Dr. R. Leimbach)
- 10 / 1991 – 12 / 1992 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Transfusionsmedizin und Gerinnungsphysiologie, Universitätsklinikum der Philipps-Universität Marburg (Leiter: Prof. Dr. V. Kretschmer)
- 01 / 1993 – 06 / 1994 Assistenzarzt im Institut Mannheim, DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg gGmbH (Leiter: Prof. Dr. S.F. Goldmann)
- 07 / 1994 – 12 / 1995 Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesie und Schmerztherapie, Nordwest-Krankenhaus, Frankfurt am Main (Leiter: Prof. Dr. R. Dennhardt)
- 01 / 1996 – 06 / 2005 Tätigkeit am Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie Mannheim, DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH  
Leiter bis 06 / 1999: Prof. Dr. S.F. Goldmann  
Leiter ab 07 / 1999: Prof. Dr. H. Klüter
- 04 / 1996 Anerkennung zum Facharzt für Transfusionsmedizin

- 02 / 1997 Fachkundenachweis Rettungsdienst
- 07 / 1999 Ernennung zum Oberarzt am Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Fakultät für Klinische Medizin Mannheim, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Abteilungsleiter des Spende- und Produktionsbereichs im Institut Mannheim des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen
- 01 / 2001 Ernennung zum leitenden Oberarzt
- 10 / 2002 Habilitation für Transfusionsmedizin und Immunologie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg mit dem Thema „Plazentarestblut als Quelle hämatopoetischer Stammzellen und autologer Erythrozyten“
- 07 / 2005 – 09 / 2006 Ärztlicher Institutsdirektor am Institut für Transfusionsmedizin Ratingen-Breitscheid, DRK-Blutspendedienst West gGmbH
- ab 10 / 2006 Universitätsprofessor für Transfusionsmedizin und Klinische Hämostaseologie, Medizinische Fakultät des Saarlandes; Direktor am Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
- 10 / 2007 Zusatz-Weiterbildung Hämostaseologie

#### **Mitgliedschaft in wissenschaftlichen Fachgesellschaften**

- Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI)
- International Society of Blood Transfusion (ISBT)
- International Society of Thrombosis and Hemostasis (ISTH)
- Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative
- International Society of Cellular Therapy (ISCT)
- European Bone Marrow Transplantation Group (EBMT)
- Deutsche Gesellschaft für Immunogenetik (DGI)
- Arbeitsgemeinschaft der Knochenmarkspende-Dateien Deutscher Blutspendedienste

#### **Weitere wissenschaftliche Aktivitäten und Ämter**

- seit 01 / 2002 Ressort-Herausgeber für das Ressort ‚Blutprodukte‘ der Zeitschrift ‚Transfusion Medicine and Hemotherapy‘, Offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
- seit 06 / 2007 Section Editor für das Ressort ‚Cellular Therapy‘ der Zeitschrift ‚Vox Sanguinis‘, Offizielles Organ der International Society of Blood Transfusion
- 06 / 2003 – 10 / 2007 Chair der Gruppe ‚Cellular Therapy‘, Biomedical Excellence for Safer Transfusion Collaborative

07 / 2003 – 12 / 2005

Obmann der Sektion „Transplantation und Zelltherapie“ der DGTI

11 / 2007

Berufung in den Arbeitskreis Blut des Bundesministeriums für Gesundheit

Homburg, 03. Dezember 2008

---

Univ.-Prof. Dr. med. Hermann Eichler

## Anhang Arzneimittelspezifische Angaben des Herstellers

### 1 Art des Antrages

Das Arzneimittel XY ist eine Präparation menschlicher hämatopoetischer Stammzellen für Transplantationszwecke. Als Stammquelle dient XY. Es enthält unreife blutbildende Zellen. Jedes Transplantat wird aus einer Einzelspende hergestellt und entspricht einer Transplantationsdosis, die individuell deklariert wird, aber mindestens

- ≥ XY ml XY und
- ≥ XY x 10<sup>x</sup> Zellen/Transplantat

enthält. Neben den hämatopoetischen Stammzellen ist ein geringer Anteil an Erythrozyten und Thrombozyten vorhanden.

### 2. Beschreibung der Konservierung

Um das Transplantat haltbar zu machen, wird es in folgenden Schritten und Mengen kryokonserviert:

XY vom Spender inklusive Vorlage von CPD-Stabilisator nach Abzug der Untersuchungsproben	XY	ml		
+ Kryokonservierungsmedium ( <b>Beispiel</b> ) <sup>1)</sup>	X	-	Y	ml
<sup>1)</sup> DMSO	XY			v/v %
Humanalbuminlösung (20 w/v%)	XY			v/v %
NaCl (0.9 w/v %)	XY			v/v %
Endvolumen ohne Abzug von Kryo-Rückstellproben	X	-	Y	ml

Dieses Präparat wird in sterilen Kunststoffbeuteln bei -135°C in der Gasphase von Flüssigstickstoff aufbewahrt und ist so mindestens XY Monate haltbar. Auf Grund der Herstellung hat das Präparat immer spenderindividuelle Merkmale.

Infektionsdiagnostische Untersuchungen: HIV 1/2-AK; HB<sub>s</sub>-AG; HCV-AK; HCV-RNA (PCR); HTLV I/II-AK; HB<sub>c</sub>-AK; CMV-AK; Treponema pallidum-AK; und irreguläre erythrozytäre Antikörper, Zellzahlbestimmung, HLA-A-, B- und DRB1-(Gewebe-) Typisierung sowie Blutgruppenbestimmung.

Für die Transplantation wird das Präparat in folgender Weise vorbereitet:

### 3. Chemische und pharmakokinetische Eigenschaften

Wirksamer Bestandteil im Sinne der Arzneimitteldefinition sind die hämatopoetischen Stammzellen. Sie siedeln sich nach i.v.-Infusion primär im Knochenmark an und bilden den Ausgangspunkt für eine Rekonstitution der Hämatopoese.

### 4. Indikationen, Dosierung, pharmakologisch-therapeutische Klassifikation und Wirkmechanismus

### *Indikation*

Das Arzneimittel XY wird zur Rekonstitution des Knochenmarks als blutbildendes Organ bei Knochenmarkinsuffizienz durch

- lebensbedrohliche maligne und nichtmaligne Erkrankungen des blutbildenden Systems, insbesondere nach Hochdosis-Chemo- und Radiotherapie
- Stoffwechselerkrankungen
- angeborene oder erworbene Immundefekte

eingesetzt. Für die Transplantation wird das jeweilige Präparat bezüglich Blutgruppe und Histokompatibilität empfangerspezifisch ausgesucht.

### *Dosierung*

Jeder Empfänger erhält ein auf Basis von Blutgruppe und Histokompatibilität individuell ausgewähltes Transplantat. Die für eine erfolgreiche Transplantation empfohlene Mindestdosis beträgt  $XY \times 10^x$  Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers.

### *Pharmakologisch-therapeutische Klassifikation*

Die wirksamen Bestandteile des Transplantats sind morphologisch und funktionell intakte Stammzellen zur Rekonstruktion der Hämatopoese. Dabei wird der Fraktion der Stammzellen, die das CD-34-Oberflächenantigen als Surrogatmarker exprimiert, die größte hämatopoetische Potenz zugeschrieben. Da der Kryokonservierungsprozess für eine maximale Vitalität der weißen Zellen optimiert wurde, werden Erythrozyten und Thrombozyten weitgehend lysiert und verlieren ihre Funktionsfähigkeit.

### *Wirkungsmechanismus*

Nach Infusion der aufgetauten Zellen finden die blutbildenden Stammzellen in das Knochenmark des Empfängers. Durch den zellschonenden Kryokonservierungs- und Auftauprozess des Transplantates ist eine hohe Bioverfügbarkeit der infundierten Zellen zu erwarten. Innerhalb von 4 Wochen differenzieren sich aus den pluripotenten Stammzellen Leukozyten, die in das periphere Blut einströmen.

## **5. Vorsichtsmaßnahmen**

Bei der Anwendung von XY muss HLA- und sollte AB0-Blutgruppenverträglichkeit vorliegen. Absolute Kontraindikationen sind nicht bekannt.

Bei Anwendung während der Gravidität, Stillzeit und bei bekannter Überempfindlichkeit gegen die Inhaltsstoffe sind die Risiken gegenüber der Strenge der Indikation zu bewerten.

Wegen der Gefahr der hypotonen Lyse dürfen keine hypotonen Lösungen ,wegen der Gefahr der Gerinnselbildung keine kalziumhaltigen Lösungen gleichzeitig in dasselbe Schlauchsystem gegeben werden.

Die Beimischung von Medikamenten zum Arzneimittel XY ist nicht zulässig.

## **6. Inverkehrbringen und Zeitraum danach**

Präparate ID-Nummer <b>702 08 543 678</b>	Spender ID-Nummer <b>DE-ULM-12345678</b>
Entnommen am / Uhr <b>29 JAN 2008 / 13:15 CET</b>	Verwendbar bis / Uhr <b>01 FEB 2008 / 13:15 CET</b>
Blutgruppe <b>0 Rh D positiv</b>	<b>Nur zur Anwendung bei genanntem Empfänger.</b>
Art.-Nr. P400208 Gen.-Nr. PEI.G03859.01.1  <b>HUMANE PERIPHERE BLUTSTAMMZELLEN</b>  APHERESE ALLOGEN DRK-BLUTSPENDEDIENST Beutel Nr. 1 of 1	Menschliche Zellen für die Transplantation. <b>Nicht bestrahlen.</b> Unverzüglich weitergeben.  <b>Achtung:</b> Der Empfänger ist über potentiell übertragbare Erkrankungen aufzuklären.
Volumen ml <b>229,1</b> inklusive ACD ml <b>13,9</b> Erythrozyten ml <b>4,0</b> NC x 10E8 <b>408,5</b> CD34 x 10E6 <b>603,6</b>	Suspension zur i.v. Infusion mittels geeignetem Transfusionssystem. Begleitschreiben beachten.
Lagerung bei +2 bis +6 °C Transport bei +1 bis +10 °C	Empfänger <b>Hans Mustermann</b> <b>ID: 87659321</b> Geburtsdatum 31 JAN 1981
Nicht verwendete Präparate melden an den <b>Hersteller</b> IKT Ulm Helmholtzstraße 10 D-89081 Ulm / Germany Tel. (0049)731-1500	<b>Transplantationszentrum</b> Klinik für Innere Medizin III Universitätsklinikum Ulm Robert-Koch-Straße 8 D-89081 Ulm / Germany Tel. (0049)731-50045656

Product ID-Number <b>702 08 543 678</b>	Donor ID-Number <b>DE-ULM-12345678</b>
Collection Date / Time <b>29 JAN 2008 / 13:15 CET</b>	Expiration Date / Time <b>01 FEB 2008 / 13:15 CET</b>
Blood Group <b>0 Rh D positive</b>	<b>For Use by Intended Recipient Only</b>
Product Code No. P400208 Gen. No. PEI.G03859.01.1  <b>HPC-A</b> <b>Hematopoietic Progenitor Cells</b> APHERESIS DIRECTED DRK-BLUTSPENDEDIENST Bag No. 1 of 1	Properly Identify Intended Recipient and Product. Do Not Use Leukoreduction Filter. <b>Do Not Irradiate.</b>  <b>Warning:</b> This Product may Transmit Infectious Agents. Advise Patient of Communi- cable Disease Risks.
Volume ml <b>229,1</b> including ACD ml <b>13,9</b> Erythrocytes ml <b>4,0</b> NC x 10E8 <b>408,5</b> CD34 x 10E6 <b>603,6</b>	Suspension for i.v. Infusion. For Additional Information and Laboratory Testing See Accompanying Letter.
Store at +2 to +6 °C Transport at +1 to +10 °C	Recipient <b>Hans Mustermann</b> <b>ID: 87659321</b> Date of Birth 31 JAN 1981
Unused Products Have to be Reported to the <b>Collection Center</b> IKT Ulm Helmholtzstraße 10 D-89081 Ulm / Germany Phone (0049)731-1500	<b>Transplant Center</b> Clinic for Internal Medicine III University Hospital Ulm Robert-Koch-Straße 8 D-89081 Ulm / Germany Phone (0049)731-50045656

## **Modul 1.3 PRODUKTINFORMATION**

### **1.3.1 ZUSAMMENFASSUNG DER WESENTLICHEN MERKMALE DES ARZNEIMITTELS**

#### **1.3.1.1 Bezeichnung der Stammzellzubereitung**

Humane Blutstammzellen / allogene / gerichtet /

aus Knochenmark, peripherem Blut oder Placenta-Restblut

#### **1.3.1.2 Darreichungsform**

Suspension zur intravenösen Infusion oder Weiterverarbeitung nur für eine bestimmte Person

#### **1.3.1.3 Klinische Angaben**

##### **1.3.1.3.1 Art der Anwendung**

Zur intravenösen Infusion

##### **1.3.1.3.2 Anwendungsgebiete**

Humane Blutstammzellen sind indiziert zur hämatologischen und immunologischen Rekonstitution eines bestimmten Patienten im Rahmen der Transplantation zur Therapie verschiedener maligner und nicht-maligner Erkrankungen.

##### **1.3.1.3.3 Gegenanzeigen**

Außer Schwangerschaft und Stillzeit gibt es keine absolute Kontraindikation für gerichtete, für eine bestimmte Person zur Anwendung vorgesehene Blutstammzellen, die nach immunogenetischen Kriterien ausgewählt und ordnungsgemäß hergestellt wurden. Relative Kontraindikationen stellen Abweichungen bei den Auswahlkriterien des Spenders oder Mängel der Produktqualität dar.

##### **1.3.1.3.4 Besondere Vorsichtsmaßnahmen für die Anwendung**

- Die Gabe von allogenen Blutstammzellen darf nur nach adäquater Vorbehandlung des Empfängers zur Vermeidung einer Abstoßung oder einer allergischen Reaktionen erfolgen.
- Die korrekte Zuordnung der für eine bestimmte Person hergestellten Stammzellzubereitung muss gewährleistet sein.
- Blutstammzellzubereitungen dürfen keinesfalls bestrahlt werden !
- Unmittelbar vor Anwendung hat eine visuelle Kontrolle auf Unversehrtheit und Aggregate zu erfolgen.
- Zur Infusion ist ein Transfusionsgerät mit Standardfilter der Porengröße 170-230 µm ohne Leukozytenfilter zu verwenden.
- Die Infusion sollte so rasch als möglich erfolgen, wobei auf akute Reaktionen zu achten ist und die Infusionsgeschwindigkeit dem klinischen Zustand angepasst werden muss.
- Eine angemessene Überwachung des Patienten und der Vitalparameter ist während und nach der Stammzellgabe zu gewährleisten.
- Insbesondere bei ABO-inkompatibler Stammzellzubereitung ist auf eine hämolytische Reaktion zu achten.

- Stammzellzubereitungen sind vor und während der Infusion gut zu durchmischen.
- Nach der Gabe von CMV-seropositiven Stammzellzubereitungen sind Empfänger regelmäßig auf eine CMV-Virämie zu untersuchen.

#### 1.3.1.3.5 Wechselwirkung mit anderen Arzneimitteln und andere Inkompatibilitäten

- Die Anwendung potentiell stammzell-toxischer Medikamente und Maßnahmen muss ausreichend lange zurück liegen, um eine Beeinträchtigung der transfundierten Stammzellzubereitung auszuschließen.
- Mit Ausnahme von physiologischer Kochsalzlösung sollten keine anderen Lösungen oder Medikamente in demselben Schlauchsystem mit der Stammzellzubereitung verabreicht werden. Dies gilt insbesondere für Calcium-haltige Lösungen wegen der Gefahr von Gerinnselbildung.
- Die Beimischung von Medikamenten zu dem Blutstammzellpräparat ist zu vermeiden.
- Blutprodukte, Antibiotika und liposomale Antimykotika dürfen nur in ausreichendem zeitlichem Abstand zur Blutstammzellgabe infundiert werden.

#### 1.3.1.3.6 Verwendung für besondere Personengruppen (z.B. Frauen in der Schwangerschaft und Stillzeit, Säuglinge, Kleinkinder)

- Frauen im gebärfähigen Alter  
Vor Behandlungsbeginn zur Transplantation ist eine Schwangerschaft auszuschließen und falls erforderlich eine Empfängnisverhütung durchzuführen.
- Schwangerschaft und Stillzeit  
Während der Schwangerschaft und der Stillzeit ist eine Transplantation mit allogenen Blutstammzellen kontraindiziert.
- Säuglinge und Kleinkinder  
Bei Säuglingen und Kleinkindern ist der besonderen klinischen Situation Rechnung zu tragen, insbesondere auf eine Volumenüberladung oder Citratintoxikation zu achten und gegebenenfalls eine Weiterverarbeitung der Stammzellzubereitung durchzuführen.

#### 1.3.1.3.7 Besondere Hinweise zur Anwendung (Dosierung, Überdosierung, Behandlungsdauer, Häufigkeit der Verabreichung, Notfallmaßnahmen)

##### 1.3.1.3.7.1 Dosierung

Die Dosierung der Blutstammzellen ist abhängig vom Spender, von der Grunderkrankung des Empfängers und der Weiterverarbeitung. Die übliche Standarddosis für die initiale Behandlung liegt bei  $4 - 8 \times 10^6$  CD34-positive Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers. Ein deutliches Übergewicht des Empfängers ist bei der Dosisberechnung zu berücksichtigen.

#### 1.3.1.3.7.2 Überdosierung und Unterdosierung

Bei einer Dosierung von über  $8 \times 10^6$  CD34-positive Zellen pro kgKG besteht ein höheres Risiko für eine akute und chronische Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion.

Bei einem deutlichen Unterschreiten der Standarddosis besteht ein erhöhtes Risiko eines verzögerten oder fehlenden Anwachsens der Stammzellen mit ausbleibender, verzögerter oder nur partieller Regeneration der Hämatopoese bzw. ein erhöhtes Risiko einer Transplantatabstoßung.

#### 1.3.1.3.7.3 Häufigkeit der Verabreichung

In der Regel erfolgt die Gabe von Stammzellzubereitungen als einmalige intravenöse Infusion. In besonderen klinischen Situationen wie z. B. bei Patienten mit Osteopetrose oder nach nicht-myeloablativer Vorbehandlung kann eine mehrfache Gabe zur Verbesserung des Behandlungserfolges indiziert sein.

#### 1.3.1.3.7.4 Notfallmaßnahmen

Bei akuten, schweren Unverträglichkeitsreaktionen ist die Gabe der Stammzellzubereitung zu unterbrechen, der Venenzugang offen zu halten und eine der Schwere der Symptome angemessene notfallmedizinische Behandlung und Überwachung durchzuführen.

#### 1.3.1.3.8 Unerwünschte Reaktionen

##### 1.3.1.3.8.1 Infektiöse Komplikationen

Bei der Anwendung von aus menschlichem Blut oder Knochenmark hergestellten Arzneimitteln ist die Übertragung von Infektionserregern, auch bislang unbekannter Natur, nicht völlig auszuschließen. Dies gilt z. B. für Hepatitiden, seltener für das erworbene Immundefekt-Syndrom (AIDS). Das Risiko einer bakteriellen Kontamination bzw. einer Toxinbildung lässt sich ebenfalls nicht mit letzter Sicherheit ausschließen.

Im Europäischen Ausland wurden Einzelfälle berichtet, in denen bei Empfängern von Blutprodukten, deren Spender später an der varianten Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJK) erkrankten, ebenfalls der „Erreger“ (sogenannte Prionen) nachgewiesen wurde. Das Risiko einer Übertragung dieser Erkrankung durch Blutprodukte wird derzeit als extrem gering eingestuft. Eine Testung auf den Erreger übertragbarer spongiformer Enzephalopathien (TSE) und verschiedener anderer Erreger ist derzeit nicht möglich.

Durch Auswahl CMV-seronegativer Stammzellpräparate kann das Risiko einer CMV-Übertragung reduziert werden.

##### 1.3.1.3.8.2 Immunologische Komplikationen

Die **akute und chronische Spender-gegen-Wirt-Reaktion** oder Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) bei Empfängern von Stammzellpräparaten wird durch viable T-Lymphozyten des Spenders verursacht. Inzidenz und Schweregrad der Erkrankung hängen insbesondere von der HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger sowie dem T-Zellgehalt des Präparates ab, werden jedoch von zahlreichen weiteren Faktoren des Spenders und Empfängers beeinflusst.

Eine **akute Empfänger-gegen-Spender-Reaktion** (Abstoßung) oder ein verzögertes bzw. nur partielles Anwachsen der Blutstammzellen ist eine sehr seltene Komplikation und kann infolge Qualitätsmängel des Stammzellpräparats oder durch Spender-Empfänger-Unverträglichkeiten entstehen.

Eine **Transfusionsbedingte Akute Lungeninsuffizienz** (TRALI) ist in vielen Fällen assoziiert mit anti-leukozytären Antikörpern der Spender plasmahaltiger Blutkomponenten oder der Empfänger leukozytenhaltiger Blutpräparate. Auf Grund der HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger allogener Blutstammzellpräparate ist das Auftreten von TRALI sehr unwahrscheinlich, aber nicht völlig auszuschließen.

**Akute und verzögerte hämolytische Transfusionsreaktionen** können grundsätzlich bei der Anwendung von ABO-major- und / oder ABO-minor inkompatiblen Blutstammzellpräparaten vorkommen. Hämolytische Reaktionen können sowohl durch anti-erythrozytäre Antikörper des Empfängers gegen Antigene des Spenders als auch in den meist schwereren Fällen durch anti-erythrozytäre Antikörper des Spenders gegen Antigene des Empfängers mit deutlicher Verzögerung noch 1 bis 3 Wochen nach Stammzellgabe auftreten. Diese verzögerte Immunreaktion, auch "Passenger-Lymphocyte-Syndrom" genannt, kann plötzlich, schwerwiegend und lebensbedrohlich sein, weshalb bei Risikoempfängern immunhämatologische Kontrollen angezeigt sind.

**Weitere mögliche immunologische Reaktionen:**

- Febrile, nicht-hämolytische Transfusionsreaktionen durch z. B. anti-leukozytäre Antikörper oder Zytokine
- Allergische und anaphylaktoide Unverträglichkeitsreaktionen gegen Bestandteile, Antikoagulanzen oder Hilfsstoffe der Stammzellzubereitung (z. B. urtikarielle Hautreaktionen, Lid- oder Glottisödem) oder anaphylaktische Reaktionen bei Empfängern mit angeborenem IgA-Mangel
- Posttransfusionelle Purpura
- Alloimmunisierung gegen erythrozytäre, thrombozytäre, leukozytäre Antigene oder Plasmaproteine des Spenders

**Sonstige mögliche Komplikationen:**

- Reaktionen auf Antikoagulanzen (Citrat, Heparin) sowie Additiva wie DMSO oder HAES insbesondere bei Neugeborenen und Kleinkindern
- Blutungskomplikationen insbesondere bei großvolumigen Stammzellzubereitungen mit hohen Heparindosen
- Mikrozirkulationsstörungen durch Thrombozyten, Zellaggregate oder Fett
- Volumenüberlastung infolge großvolumigen Stammzellzubereitungen oder zu rascher Applikation, besonders in engem zeitlichem Zusammenhang mit anderen zirkulatorisch wirksamen Infusionen und Transfusionen
- Hypothermie bei großvolumigen oder zu rascher Applikation der gekühlten Stammzellzubereitungen. (Die Anwendung von Blutwärmegeräten für Stammzellzubereitungen ist nicht indiziert.)
- Hämolytische Stammzellzubereitungen infolge unsachgemäßer Lagerung, osmotischer oder mechanischer Schädigung der Erythrozyten oder anderer Ursachen

#### 1.3.1.3.9 Meldepflicht

Unerwünschte Ereignisse und jeder Verdacht auf eine schwerwiegende Reaktion infolge der Anwendung von Stammzellzubereitungen sind gemäß den gesetzlichen Vorgaben und Verordnungen im Rahmen des Qualitätssicherungssystems den zuständigen Stellen anzuzeigen, wenn sie in möglichem ursächlichem Zusammenhang stehen, die Qualität und Sicherheit beeinflussen oder auf sie zurückgeführt werden können..

### 1.3.1.4 Wirkungsweise, pharmakologische und toxikologische Eigenschaften

#### 1.3.1.4.1 Wirkungsweise

Wirksame Bestandteile der Stammzellzubereitungen sind morphologisch und funktionell intakte hämatopoetische Vorläuferzellen, die bei dem Empfänger eine komplette hämatopoetische und immunologische Rekonstitution gewährleisten. Durch die Fähigkeit zur Selbstreplikation und Ausdifferenzierung der Stammzellen kommt es zu einem dauerhaften Anwachsen der Spenderzellen im Empfängerorganismus.

#### 1.3.1.4.2 Pharmakologische Eigenschaften

Nach intravenöser Infusion der Blutstammzellen kommt es zu einer raschen Ansiedlung im Knochenmark, Leber, Milz und Lymphknoten. Innerhalb von Wochen finden sich beim Empfänger ausgereifte und differenzierte Spenderzellen wie Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten im peripheren Blut. Bis zur Etablierung des Spender-Immunsystems können mehrere Wochen bis Monate vergehen.

#### 1.3.1.4.3 Toxikologische Eigenschaften

T-Lymphozyten der Stammzellzubereitung können zu einer schweren immunologischen Reaktion gegen den Empfänger führen. Diese Spender-gegen-Wirt-Erkrankung hat eine akute oder chronische Schädigung von Empfängerorganen und Geweben zur Folge und betrifft insbesondere Haut, Schleimhäute, Darm, Leber und Lunge. Allogene Stammzellzubereitungen induzieren aber auf Grund dieser immunologischen Reaktion auch einen "Spender-gegen-Tumor-Effekt", der ein wichtiges Therapieprinzip bei der Behandlung maligner Erkrankungen darstellt.

### 1.3.1.5 Pharmazeutische Angaben

#### 1.3.1.5.1 Qualitative und quantitative Zusammensetzung

Arzneilich wirksamer Bestandteil der Stammzellzubereitungen sind hämatopoetische Vorläuferzellen, die zur Selbstreplikation und Ausdifferenzierung fähig sind. Stammzellzubereitungen können aus peripherem Blut nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren, aus Knochenmark durch multiple Aspiration oder aus Plazenta-Restblut gewonnen werden.

Weitere wirksame Bestandteile der Stammzellzubereitungen sind neben den Vorläuferzellen reife Zellen wie Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten und Plasma vom selben Spender sowie Stabilisatorlösung (ACD-A) und Antikoagulantien (Heparin) im geeigneten Mischungsverhältnis. Zur Kryokonservierung von

Stammzellen werden Additiva wie DMSO und HAES in angemessener Dosierung zugesetzt.

Die quantitative Zusammensetzung der Stammzellzubereitungen unterliegt auf Grund der individuellen Herstellung von einem bestimmten Spender zur Anwendung bei einem bestimmten Patienten und zur Therapie einer bestimmten Erkrankung naturgemäß großen Schwankungen. Die Produktspezifikationen werden gemäß der individuellen Anforderung vom Anwender festgelegt und mit geeigneten Qualitätskontrollen vom Hersteller nachgewiesen. Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Stammzellzubereitung ist der Präparatebeschriftung und dem Begleitschreiben zu entnehmen.

#### 1.3.1.5.2 Angaben zur Haltbarkeit

Stammzellzubereitungen sind im nicht-kryokonservierten Zustand bis zu 72 Stunden nach Herstellung bei  $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ohne Agitation haltbar. Die Haltbarkeit kann in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren bzw. der Weiterverarbeitung mit Selektion und Depletion und dem verwendeten Primärbehälter reduziert sein. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten. Nach Ablauf des Verfalldatums darf das Stammzellpräparat nur bei vitaler Indikation verwendet werden, um das Leben des vorgesehenen Empfängers nicht zu gefährden.

#### 1.3.1.5.3 Lager- und Transportbedingungen

##### 1.3.1.5.3.1 Lagerbedingungen

Stammzellzubereitungen können bei geeigneter Antikoagulation und Zellkonzentration ohne weitere Zusätze bei  $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  bis maximal 72 Stunden nach Herstellung gelagert werden. Für eine längere Lagerung ist die Kryokonservierung in gasförmigem Stickstoff bei  $-140^{\circ}\text{C}$  nach Zugabe einer geeigneten Gefrierschutzlösung möglich. Die Temperaturkontrolle und Überwachung der Lagerung ist regelmäßig zu dokumentieren. Die Lagerungszeit von nicht-kryokonservierten Präparaten sollte möglichst kurz sein.

##### 1.3.1.5.3.2 Transportbedingungen

Der Transport der Stammzellzubereitungen erfolgt in einem geeigneten, entsprechend beschrifteten Behälter durch einen über das Transplantat und die Transportbedingungen instruierten Kurier, der von der Transplantationseinrichtung zu beauftragen und einzuweisen ist. Die Transport-Temperatur sollte  $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  betragen, jedoch zumindest zwischen  $+1^{\circ}\text{C}$  und  $+10^{\circ}\text{C}$  liegen. Der Transport hat unter kontrollierten Bedingungen zu erfolgen und ist durch eine schriftliche Anweisung zu regeln. Während des Transports ist dafür Sorge zu tragen, dass die Qualität der Stammzellzubereitung nicht beeinträchtigt, das Präparat keinesfalls bestrahlt wird und kein Unbefugter Zugriff hat.

Der Kurier ist zu verpflichten, einen sicheren und überwachten Transport ohne vermeidbare Verzögerungen zu gewährleisten, um transportbedingte Mängel der Stammzellpräparate auszuschließen.

#### 1.3.1.5.4 Primärbehältnis

##### 1.3.1.5.4.1 Beschriftung und Handhabung

Stammzellzubereitungen werden in sterilen, pyrogen-freien und geschlossenen bzw. verschlossenen Behältnissen hergestellt. Die Anwendung von Blutstammzellzubereitungen darf nur auf ärztliche Anordnung erfolgen. Geöffnete oder angestochene Stammzellpräparate sind unverzüglich zu infundieren. Die Entnahme von Proben aus den verschlossenen Behältnissen zu Untersuchungszwecken ist zu vermeiden.

Die Behältnisbeschriftung erfolgt gemäß den gesetzlichen Vorgaben und weist die Spender- und Empfängeridentifikation auf, die zwingend einzuhalten ist. Stammzellzubereitungen dürfen nur für den auf der Behältnisbeschriftung genannten Empfänger angewendet werden. Die i. v. Infusion erfolgt möglichst rasch mittels geeignetem Transfusionssystem ohne Leukozytenfilter nach allgemein anerkannten Standards der Fachgesellschaften. Während und nach der Stammzellgabe ist eine geeignete Überwachung des Patienten zu gewährleisten. Bei nachgewiesener Infektiosität oder fehlendem Testergebnis der Stammzellzubereitung sind die Präparate entsprechend gekennzeichnet.

##### 1.3.1.5.4.2. Entsorgung

Nach Anwendung sind die leeren Primärbehältnisse der Stammzellzubereitungen steril zu verschließen und bei  $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  für 24 Stunden für eventuell erforderliche Nachuntersuchungen aufzubewahren. Nicht verwendete Präparate müssen dem Hersteller gemeldet werden und sind ordnungsgemäß zu entsorgen. Sie dürfen nicht für andere als den bei Herstellung bestimmten Empfänger verwendet werden. Eine Nutzung für wissenschaftliche Zwecke mit Einverständnis des Spenders ist möglich. Die Anwendung und der Verbleib aller Blutstammzellzubereitungen sind im Rahmen eines Qualitätssicherungssystems zu dokumentieren.

#### **1.3.1.6 Inhaber der Genehmigung**

Angabe des pharmazeutischen Unternehmers und Herstellers

#### **1.3.1.7 Genehmigungsnummer**

Datum der Genehmigung

Datum der Verlängerung

Datum Stand der Produktinformation

Qualitätsbestimmende Produkteigenschaften von gerichteten allogenen Stammzellzubereitungen aus peripherem Blut, Nabelschnurblut und Knochenmark

Prüfparameter	Spezifikation	Prüfhäufigkeit	Prüfzeitpunkt
AB0	bestimmt / deklariert	100 %	am Spenderblut bis max. 30 Tage vor Spende <sup>1</sup>
Rh-(D)	bestimmt / deklariert	100 %	am Spenderblut bis max. 30 Tage vor Spende <sup>1</sup>
irreguläre Antikörper	bestimmt / deklariert	100 %	am Spenderblut bis max. 30 Tage vor Spende <sup>2</sup>
HBs-Antigen	negativ	100 %	am Spenderblut bis max. 30 Tage vor Spende und anlässlich der Spende <sup>2,5</sup>
Anti-HBc-Antikörper <sup>3</sup>	negativ <sup>3</sup>	100 %	am Spenderblut bis max. 30 Tage vor Spende und anlässlich der Spende <sup>2,5</sup>
Anti-HCV-Antikörper	negativ	100 %	am Spenderblut bis max. 30 Tage vor Spende und anlässlich der Spende <sup>2,5</sup>
HCV-Genom (NAT)	negativ	100 %	am Spenderblut bis max. 30 Tage vor Spende und anlässlich der Spende <sup>1,5</sup>
Anti-HIV-1/2-Antikörper	negativ	100 %	am Spenderblut bis max. 30 Tage vor Spende und anlässlich der Spende <sup>2,5</sup>
HIV-1-Genom (NAT)	negativ	100 %	am Spenderblut bis max. 30 Tage vor Spende und anlässlich der Spende <sup>1,5</sup>
Anti-Treponema pallidum-Antikörper	negativ	100 %	am Spenderblut bis max. 30 Tage vor Spende und anlässlich der Spende <sup>2,5</sup>
Anti-CMV-IgG	bestimmt / deklariert	100 %	am Spenderblut bis max. 30 Tage vor Spende, ggf. anlässlich der Spende <sup>2,5</sup>
Anti-CMV-IgM	bestimmt / deklariert	100 %	am Spenderblut bis max. 30 Tage vor Spende, ggf. anlässlich der Spende <sup>2,5</sup>
ggf. HBV-Genom (NAT)	negativ	100 %	am Spenderblut bis max. 30 Tage vor Spende und anlässlich der Spende <sup>1,5</sup>
ggf. Anti-HTLV-I/II-Antikörper	bestimmt / deklariert	100 %	am Spenderblut bis max. 30 Tage vor Spende und anlässlich der Spende <sup>2,5</sup>
ggf. CMV-Genom	bestimmt / deklariert	100 %	am Spenderblut bis max. 30 Tage vor Spende und anlässlich der Spende <sup>1,5</sup>
ggf. Parvovirus-B19-Genom	bestimmt / deklariert	100 %	am Spenderblut bis max. 30 Tage vor Spende und anlässlich der Spende <sup>1,5</sup>
ggf. weitere Prüfungen	...	...	...

Prüfparameter	Spezifikation	Prüfhäufigkeit	Prüfzeitpunkt
Volumen	bestimmt / deklariert	100 %	nach Herstellung
ggf. kernhaltige Zellen	Maximale Zellzahl $\leq 300 \times 10^8$ pro ml	100 %	nur bei Lagerung oder Transport > 24 h
Kernhaltige Zellen pro Transplantation  (obligat nur bei NSB, KM, wenn keine D34+CD45+ Zellen /kgKG angegeben werden)	KM 90 % der Präparate: $\geq 2 \times 10^8$ pro kgKG NSB 90% der Präparate $\geq 2 \times 10^7$ pro kgKG	100 %	nach Herstellung
ggf. Erythroblasten (nur bei NSB, wenn die CD34+ Analyse mittels „dual-platform“ erfolgt)	bestimmt / deklariert	100 %	nach Herstellung
Vitalität der kernhaltigen Zellen (oder der CD34+CD45+ Zellen)	90 % der Präparate: $\geq 90$ %	100 %	nach Herstellung <sup>#</sup>
	90 % der Präparate: $\geq 70$ %	Mtl. Stichprobe	nach Kryokonservierung
CD34+/CD45+ Zellen pro Transplantation	PB 90 % der Präparate: $\geq 4 \times 10^6$ pro kgKG KM 90 % der Präparate: $\geq 1,5 \times 10^6$ pro kgKG NSB bestimmt / deklariert oder keine Festlegung Dosis nach den heutigen Kenn- nisstand nicht festlegbar	100 %	nach Herstellung
Vitalität CD34+/CD45+ Zellen (oder der kernhaltigen Zellen)	90 % der Präparate: $\geq 95$ %	100 %	nach Herstellung <sup>#</sup>
	90 % der Präparate: $\geq 85$ %	Mtl. Stichprobe	nach Kryokonservierung
Erythrozyten	bestimmt / deklariert (in ml) zusätzlich für allogenes KM: (nur majorinkompatibel) 90% < .....ml pro kgKG	100 %	nach Herstellung
Sterilität	steril bzw. Antibiotogramm	100 %	aus jedem Endprodukt- beutel, Ausnahme kryo- konservierte Präparate: siehe Fußnote <sup>4,5</sup>
Visuelle Kontrolle	Unversehrtheit, keine Aggregate	100%	vor Kryokonservierung, vor Abgabe
Zusätzliche Prüfparameter nach Selektions- / Depletionsverfahren bei allogenen Stammzellzubereitungen			
T-Zellen (CD3+)	bestimmt / deklariert Dosis nach dem heutigen Kenn- nisstand nicht festlegbar	100 %	nach Herstellung
ggf. NK-Zellen (CD56+)	bestimmt / deklariert	100 %	nach Herstellung
ggf. B-Zellen (CD19+)	bestimmt / deklariert	100 %	nach Herstellung
ggf. weitere Prüfungen			

- # bis zu einer maximalen Lagerungszeit von 72 Stunden
- 1 Besonderheit von NSB-SC: Blutgruppen und CMV-Genom aus Nabelschnurvollblut, Parvovirus B19-NAT aus Nabelschnurplasma, andere NAT-Tests aus Nabelschnurplasma bzw. aus mütterlichem Blut, Bestimmung vor Freigabe zur Einlagerung
- 2 Besonderheit für NSB-SC: aus mütterlichem Blut, entnommen bei Entbindung  $\pm$  2 Tage, Bestimmung vor Freigabe zur Einlagerung
- 3 Das Transplantat kann trotz wiederholt reaktiver Anti-HBc-Ergebnisse des Spenders freigegeben werden, wenn eine zusätzliche Testung auf Antikörper gegen Hepatitis-Surface-Antigen (Anti-HBs-Antikörper) eine Konzentration von  $\geq$  100 IU / L ergibt und eine Testung auf HBV-Genome mittels NAT (Mindestsensitivität 12 IU / ml) ein negatives Ergebnis erbringt.
- 4 Bei Portionierung nach DMSO-Zugabe im geschlossenen System genügt die Entnahme nur einer Probe für die Testung auf Sterilität.
- 5 Ergebnisse bei nicht-kryokonservierten Präparaten, die erst nach Freigabe des Präparats vorliegen, werden dem Anwender unverzüglich nachgereicht

### Monographien der Europäischen Pharmakopiea 6.0 zu Prüfungen von Stammzellpräparaten

- EP 01/2008: 2323 „**Human Haematopoietic Stem Cells**“ (Gewinnung, Qualität, Tests: NC, Vitalität, CFU, CD34/CD45+, Sterilität)
- EP 01/2008: 20723 „**2.7.23 Numeration of CD34/CD45+ Cells in Haematopoietic Products**“ (Zellgehalt und Vitalität mittels Single-Platform Methode; Ak-Auswahl, Technik, Berechnung) Dual-Platform-Methode wird akzeptiert, sofern an Single Platform-Methode validiert.
- EP 01/2008: 20724 „**2.7.24 Flow Cytometry**“ (Technik, Einstellungen, Kontrollen)
- EP 01/2008: 20627 „**2.6.27 Microbiological control of cellular products**“ (Medien, Bakterienstämme, Validierung, Probengröße, Inkubation)
- EP 01/2008: 20728 „**2.7.28 Colony-Forming Cell Assay for Human Haematopoietic Progenitor Cells**“ (Methode, Qualitätssicherung, Medien, Auswertung)
- EP 01/2008: 20729 „**2.7.29 Nucleated Cell Count and Viability**“ (Methoden manuell, cell counter, flow cytometry)

## Curriculum vitae

**Name:** PD Dr. med. Peter Schlenke

**Einrichtung:** Institut für Transfusionsmedizin  
und Transplantationsimmunologie  
Universitätsklinikum Münster

**Abitur:** 1984 Gymnasium Grossburgwedel

**Hochschulstudium:** Humanmedizin Georg August Universität Göttingen

**Abschluss des Hochschulstudiums:** 1992

**Promotion:** 1993 „magna cum laude“, Universität Göttingen

**Facharztwerb:** 1998 Transfusionsmedizin

**Habilitation:** 2002 Immunologie und Transfusionsmedizin

**Jetzige Position:** Leitender Oberarzt

**Wichtige Mitgliedschaften:** DGTI, DGHO, DGI, DGfI, ISBT, ISEH, EBMT

**Besondere Interessensgebiete:** Stammzelltransplantation, Qualität und Sicherheit

**Geschätzte Anzahl an Publikationen  
(Originalarbeiten)** zirka 70

Münster 05.05.2009

Ort, Datum



Unterschrift

## Curriculum vitae

**Name:** Prof. Dr. med. Peter Bader

**Einrichtung:** Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik III  
Schwerpunkt Stammzelltransplantation  
Universitätsklinikum Frankfurt

**Abitur:** 1985 Gymnasium Rottweil

**Hochschulstudium:** Humanmedizin Eberhard-Karls Universität Tübingen

**Abschluss des Hochschulstudiums:** 1993

**Promotion:** 1993 „magna cum laude“, Universität Tübingen

**Facharztwerb:** 2000 Facharzt für Kinderheilkunde

**Habilitation:** 2001 für das Fach Kinderheilkunde

**Jetzige Position:** Leiter des Schwerpunktes Stammzelltransplantation

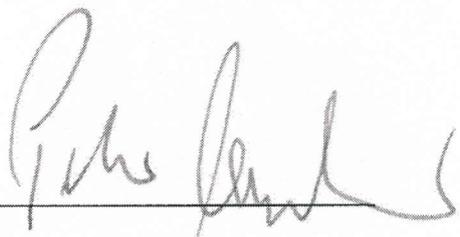
**Wichtige Mitgliedschaften:** Päd-AG-KBT, GPOH, DGKJ, EBMT

**Besondere Interessensgebiete:** Stammzelltransplantation, Immuntherapie

**Geschätzte Anzahl an Publikationen  
(Originalarbeiten)** zirka 117

Frankfurt, 6. März 2008

Ort, Datum



Unterschrift

## Curriculum vitae

**Name:** Prof. Dr. med. Dietrich W. Beelen

**Einrichtung:** Klinik für Knochenmarktransplantation  
Zentrum für Konservative Onkologie  
Westdeutsches Tumorzentrum  
  
Universitätsklinikum Essen  
der Universität Duisburg-Essen

**Abitur:** 1974 Städt. Gymnasium Steinmetzstrasse Essen

**Hochschulstudium:** Humanmedizin Julius-Maximilians Universität Würzburg

**Abschluss des Hochschulstudiums:** 1981

**Promotion:** 1981 „magna cum laude“, Universität Würzburg

**Facharztwerb:** 1990 Innere Medizin  
2000 Hämatologie und Internistische Onkologie

**Habilitation:** 1997 Innere Medizin

**Professur:** 2004 Innere Medizin

**Jetzige Position:** Direktor der Klinik für Knochenmarktransplantation

**Wichtige Mitgliedschaften:** DGHO, DGI, DAG-KBT (stellv. Vorsitzender),  
DRST (stellv. Vorsitzender), EBMT, ASH

**Besondere Interessensgebiete:** Allogene und autologe Stammzelltransplantation

**Geschätzte Anzahl an Publikationen  
(peer- review Originalarbeiten)** zirka 165

Essen, 06.05.2009



---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## Curriculum vitae

**Name:** PD Dr. med. Dagmar Dilloo

**Einrichtung:**

Klinik für Kinder- Onkologie, -Hämatologie und -Immunologie  
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin  
Universitätsklinikum Düsseldorf

Abitur: 1979  
Internationale Hochschulreife (International Baccalaureat, Genf)

Hochschulstudium: Humanmedizin  
Philipps-Universität, Marburg & Middlesex Hospital & University College, London, GB

Abschluss des Hochschulstudiums: 1988

Promotion: 1989  
„magna cum laude“, Philipps-Universität, Marburg

Facharztwerb: 1997 Kinderheilkunde  
Schwerpunktbezeichnung: 2007 Pädiatrische Hämatologie/Onkologie

Habilitation: 1998

Jetzige Position: Stellvertreterin des Direktors

Wichtige Mitgliedschaften: GPOH, DGHJ; PÄDAG-KBT; ASH

Besondere Interessensgebiete: Stammzelltransplantation, Immuntherapie

Geschätzte Anzahl an Publikationen zirka 70 (Originalarbeiten)

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **Curriculum vitae**

**Name:**

**Prof. Dr. med. Hermann Eichler**

**Einrichtung:**

**Institut für Klinische Hämostaseologie  
und Transfusionsmedizin**

**Universität des Saarlandes, Homburg**

(siehe Lebenslauf im DMSO-Gutachten (Anlage 1))

## Dr. med. Johannes C Fischer

03.07.1964 in Freiburg i. Brsg.

### Ausbildung und wissenschaftlicher Werdegang

seit	2007	Kommissarischer Direktor des Institutes für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) des Universitätsklinikums Düsseldorf; Medizinischer Direktor NMDP (National Marrow Donor Program USA), Donor Center 114, Apheresis Center 9925, Collection Center 2331
seit	2006	Sachkundige Person nach AMG und Leiter der Herstellung am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums Düsseldorf (ITZ)
seit	2003	NETCORD-FACT Cord Blood Bank Inspektor
seit	2002	Herstellungsleiter nach AMG für Zelltherapeutika am ITZ
2000		Promotion über die "Zelluläre Charakterisierung von Nabelschnurtransplantaten"
1995 -	2002	Kontrolleiter nach AMG für Zelltherapeutika am ITZ
seit	1999	Stellvertretender Direktor des ITZ
seit	1995	Leiter der Aphereseabteilung am ITZ
1994		Mitgründer d. Arbeitskreises für den deutschen Standard zur Stammzell (CD34)- Bestimmung
1993		Aufbau der Stammzellapherese- und Verarbeitungseinheit am Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Bonn (IHT)
1993-	1995	Assistenzarzt am IHT
1991 -	1993	AIP mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie/ Intensivmedizin an der Medizinischen Klinik der Universität Bonn
1984 -	1991	Studium der Human-Medizin an den Universitäten Freiburg, Tübingen und Bonn

### Richtlinien / Arbeitsgemeinschaften

seit	1996	NETCORD FACT Advisory Board
	1996	BEST Working Party: Arbeitsgruppe zur internationalen Standardisierung der CD34 Messung
Seit	1997	Mitglied der DAKBT
1995-	1996	Teilnahme an der Arbeitsgemeinschaft der BÄK zur Entwicklung der Richtlinien für Blutstammzelltransplantation sowie der Richtlinien zur Nabelschnurbluttransplantation.
sowie seit		
2008	1994	ILGD (DGHO/DGTI) Arbeitsgemeinschaft zur Erstellung eines deutschen Standards zur CD34 Zellzahlbestimmung

### Mitgliedschaften/ Gremien/ Reviewertätigkeit:

- IGLD, DAG-KBT, DGTI.
- Reviewertätigkeit für British Journal of Hematology; Stemcells and Development, Bone Marrow Transplantation
- Physician Advisory Board NMDP (National Marrow Donor Program, USA)

### Derzeitige Forschungsschwerpunkte

Transplantationsimmunologie, Endotheliale- und Hämatopoetische Vorläuferzellen, Stammzellmobilisierung, Durchflusssyctometrie

Anzahl an Originalpublikationen inkl. Patenten: 37

Düsseldorf, den 5.5.2009

Unterschrift

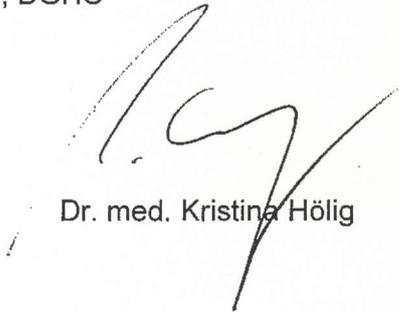


# Curriculum Vitae

- Name:** Dr. med. Kristina Hölig
- Einrichtung:** Medizinische Klinik und Poliklinik I,  
Bereich Transfusionsmedizin  
Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der Technischen  
Universität Dresden
- Geburtsdatum und -ort:** 12.05.62 in Plauen, Deutschland
- Familienstand:** verheiratet mit Dr. med. Olaf Hölig, eine Tochter
- Ausbildung:**
- Abitur Erweiterte Oberschule „Erich Weinert“ Plauen 1980
  - Medizinstudium 1981-1987 (Humboldt-Universität Berlin, Medizinische Akademie „Carl Gustav Carus“ Dresden)
  - 1989 Promotion zum Dr. med.
  - Facharztweiterbildung zum Facharzt für Transfusionsmedizin Universitätsklinikum Dresden 1988-1994
- Berufstätigkeit:**
- Wissenschaftliche Mitarbeiterin Abteilung Transfusionsmedizin Universitätsklinikum Dresden 1988-1994
  - Leiterin der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Dresden seit 1.9.1994
  - Seit 2004 Bereichsleiterin Transfusionsmedizin in der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
  - Verantwortliche Funktionen nach AMG (Herstellungsleiter, Stufenplanbeauftragter, Informationsbeauftragter) seit 1991
  - Herstellungsleiterin für Blutstammzellpräparate und Nabelschnurblut, verantwortliche Tätigkeit im Bereich Stammzellmobilisierung/-apherese seit 1.01.1996
  - Durchführung von Klinischen Studien seit 1998
  - Lehrtätigkeit (fakultative Lehrveranstaltungen und –praktika Transfusionsmedizin seit 1995)
- Wissenschaftliche Schwerpunkte:**  
Therapeutische Hämapherese, insbesondere extracorporale Photoimmuntherapie  
Mobilisierung und Gewinnung von peripheren Blutstammzellen  
Spendersicherheit  
Gewinnung und Therapie mit Granulozytenkonzentraten

**Mitglied in wiss. Fachgesellschaften:** DGTI, ESFH, DGHO

Dresden, den 15.05.2009

  
Dr. med. Kristina Hölig

## Curriculum vitae

**Name:** Prof. Dr. med. Rainer Moog

**Einrichtung:** Münchener Blutbank GmbH

**Abitur:** 1978 Gymnasium Ratingen

**Hochschulstudium:** Humanmedizin Universität-Gesamthochschule Essen

**Abschluss des Hochschulstudiums:** 1986

**Promotion:** 1987 „magna cum laude“, Universität Essen

**Facharztwerb:** 1995 Transfusionsmedizin

**Zusatzbezeichnung:** 2007 Hämostaseologie

**Habilitation:** 2000 Transfusionsmedizin

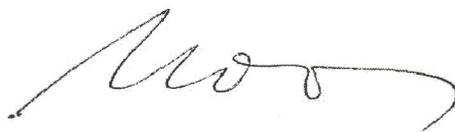
**Jetzige Position:** Ärztlicher Leiter

**Wichtige Mitgliedschaften:** DGTI, StKB, ISBT, ESFH, BBTS, ASFA

**Besondere Interessensgebiete:** Hämapherese (einschließlich Blutstammzellen)

**Publikationen (Originalarbeiten):** 38

München, den 05.05.09



## Curriculum vitae

**Name:** PD Dr. med. Michael Müller-Steinhardt

**Einrichtung:** Institut für Transfusionsmedizin  
und Immunologie Mannheim  
Medizinische Fakultät Mannheim, Universität  
Heidelberg, DRK-Blutspendedienst Baden-  
Württemberg – Hessen gGmbH

**Abitur:** 1985 Amos-Comenius-Gymnasium, Bad Godesberg

**Hochschulstudium:** Humanmedizin Universitäten Bonn und Lübeck

**Abschluss des Hochschulstudiums:** 1994

**Promotion:** 1994 „magna cum laude“, Universität Lübeck

**Facharztwerb:** 2000 Transfusionsmedizin

**Habilitation:** 2004 Immunologie und Transfusionsmedizin

**Jetzige Position:** Leitender Oberarzt

**Wichtige Mitgliedschaften:** DGTI, DGI, DGfI, EFI

**Besondere Interessensgebiete:** Nabelschnurblut, Immungenetik

**Geschätzte Anzahl an Publikationen  
(Originalarbeiten)** zirka 40

Mannheim, den 12. Mai 2009



Unterschrift

## Curriculum vitae

**Name:** PD Dr. med. Torsten Tonn

**Einrichtung:** Institut für Transfusionsmedizin  
und Immunhämatologie, DRK Blutspendedienst  
Baden-Württemberg-Hessen, JWG Universität  
Frankfurt am Main

**Abitur:** 1982 Gymnasium Hochdahl

**Hochschulstudium:** Humanmedizin Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**Abschluss des Hochschulstudiums:** 1991

**Promotion:** 1996 - „sehr gut“, Universität Düsseldorf

**Facharztwerb:** 2006 Transfusionsmedizin

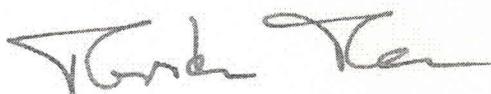
**Habilitation:** 2006 JWG Universitätsklinikum Frankfurt am Main

**Jetzige Position:** Abteilungsleiter und Oberarzt, Stationäre Blutspende,  
Apherese u. somatische Zelltherapie, Institut  
Frankfurt/Main

**Wichtige Mitgliedschaften:** DGTI, DGI, ISCT-Europe\*, IGLD\* (\*Board Member),  
Arbeitsausschuss medizinische Biotechnologie der  
DECHEMA, European Blood Alliance – Working Group  
Tissues & cells

**Besondere Interessensgebiete:** Gewinnung und Herstellung von (Stamm-) Zellpräparaten

**geschätzte Anzahl an Publikationen  
(Originalarbeiten)** zirka 46



---

Frankfurt am Main, den 13.05.2009

---

Unterschrift

## Curriculum vitae

---

**Name** WIESNETH Markus Maria Michael, Dr. med.

**Nationalität** Deutsch

**Einrichtung** Institut für Klinische Transfusionsmedizin und  
Immungenetik Ulm  
Universitätsklinikum Ulm

**Abitur** 1971 Descartes Gymnasium, Neuburg/Donau

**Hochschulstudium** 1972 – 1978 Humanmedizin, Universität Ulm,  
Deutschland

**Approbation** 1978 Arzt

**Promotion** 1980 Universität Ulm, Deutschland

**Facharztanerkennung** 1988 Innere Medizin  
1989 Hämatologie und Internistische Onkologie  
1991 Transfusionsmedizin

**Jetzige Position** Leiter der Blutspender- und Aphereseabteilung  
Leiter des Labors für Knochenmark- und  
Blutstammzell-Präparation  
Leiter der Produktionsabteilung des  
Instituts Ulm des DRK-Blutspendedienstes  
Baden-Württemberg – Hessen, des IKT Ulm und der  
Abteilung Transfusionsmedizin der Universität Ulm  
  
Stellvertretender Ärztlicher Direktor und Herstellungsleiter  
des Instituts für Klinische Transfusionsmedizin und  
Immungenetik Ulm, Universitätsklinikum Ulm

**AMG-Funktion** Herstellungsleiter gemäß § 15 AMG  
Sachkundige Person gemäß § 14 AMG

**Mitgliedschaften** DGTI, DGHO, DGI, ISBT, ISEH, EBMT

**Besondere Interessensgebiete** Stammzelltransplantation  
Qualität und Sicherheit von Blutprodukten

Ulm im April 2009

*M. Wiesneth*

---