

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik A,
Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitäts-Professor Dr. med. Rainer Haas

**Erhaltungstherapie mit Rituximab nach
autologer peripherer Blutstammzelltransplantation
bei Patienten mit B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Stefani Harmsen

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Frank Neumann

Korreferent: Prof. Dr. med. Stephan Ernst Baldus

Danksagung

Danken möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Professor Haas für die Anregungen und die Möglichkeit an seiner Klinik zu promovieren. Herrn Dr. med. Neumann für die hilfreichen Beiträge und die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit, sowie Herrn PD Dr. med. Kobbe für die Überlassung des Themas, die Zusammenarbeit, Betreuung und Durchsicht dieser Arbeit.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und Großeltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und die mir, zusammen mit meinem Freund Daniel, während der ganzen Zeit in jeder Hinsicht zur Seite gestanden haben.

Für meine Eltern.

1. Inhalt sverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	4
2. Tabellenverzeichnis	5
3. Abbildungsverzeichnis	5
4. Einleitung	6
4.1 Non-Hodgkin-Lymphome	6
4.2 Geschichte und Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome	11
4.3. Non-Hodgkin-Lymphome: Untergruppen und ihre Therapien.....	14
4.3.1 Indolente B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome	14
4.3.2 Follikuläre Lymphome.....	14
4.3.3 Mantelzelllymphome.....	21
4.3.4 Lymphoplasmazytisches Immunozytom (Morbus Waldenström).....	22
4.3.5 Diffus großzellige, aggressive Lymphome.....	23
4.4 Stellenwert der autologen peripheren Blutstammzelltransplantation	25
4.5 Monoklonale Antikörper in der Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome.....	28
4.5.1 Hintergrund zu Rituximab (anti- CD20).....	28
4.5.2 Wirkungsmechanismen von Rituximab.....	29
4.5.3 Toxizitätsprofil von Rituximab und Rituximab-Dosis.....	33
4.5.4 Rituximab in der Primärtherapie	34
4.5.5 Rituximab in der Rezidivtherapie	35
4.5.6. Rituximab in der Erhaltungstherapie	35
5. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	38
6. Material und Methoden	39
6.1 Patientengruppe	39
6.2 Definitionen und Remissionskriterien	41
6.3 Einschlusskriterien	41
6.4 Ausschlusskriterien	41
6.5 Remissionsstadien	42
6.6 Vorthherapie	42
6.7 Konditionierungen	43
6.8 Erhaltungstherapie	43
6.9 Methoden	43
6.9.1 Molekulares Monitoring des Markers t(14;18) durch PCR	43
6.9.1.1 Allgemeines	44
6.9.1.2 Qualitative „nested“ PCR	45
6.9.1.3 Quantitative „real-time“ PCR (RQ- PCR)	46
6.9.2 Dokumentation der Ereignisse gemäß den CTC-Kriterien	47
6.10 Statistik	48
7. Ergebnisse	49
7.1 Unerwünschte Nebenwirkungen	49
7.2 PCR-Verlauf	49
7.3 Überleben	50

8. Diskussion	52
8.1 Rationale einer Erhaltungstherapie mit Rituximab.....	52
8.2 Schemata einer Erhaltungstherapie mit Rituximab	53
8.3 Düsseldorfer Konzept, Intervalle etc.....	53
8.4 Ergebnisse des Düsseldorfer Konzepts	54
8.5 Darlegung und Gegenüberstellung der anderen Konzepte	55
8.6 Fazit, neue Daten zur Pharmakokinetik	57
8.7 Alternative Therapien	57
9. Zusammenfassung.....	59
10. Abkürzungs- und Fremdwörterverzeichnis	60
11. Literaturverzeichnis	63
12. Lebenslauf	77

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Stadieneinteilung der Non-Hodgkin-Lymphome gemäß der Ann-Arbor-Klassifikation.....	7
Tabelle 2	Ätiologie der Non-Hodgkin-Lymphome.....	8
Tabelle 3	Kiel/WHO Konsensus Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome	
Tabelle 3a	B-Zell Lymphome.....	12
Tabelle 3b	T-Zell Lymphome.....	13
Tabelle 4	Therapieübersicht follikuläre Lymphome.....	18
Tabelle 5	Patientencharakteristik.....	40
Tabelle 6	National Cancer Institute of Canada common toxicity criteria (CTC-Kriterien)	47
Tabelle 7	CTC-Kriterien, Anzahl der beobachteten Ereignisse in Prozent.....	49
Tabelle 8	Schemata einer Erhaltungstherapie mit Rituximab.....	53

3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Der chimäre, monoklonale Mensch/Maus Antikörper Rituximab.....	29
Abbildung 2	Rituximab Wirkmechanismen.....	32
Abbildung 3	Schema zur Einteilung der Patienten in Erstlinien-, Zweitlinien- und Drittlinientherapie.....	42
Abbildung 4	Schema der Erhaltungstherapie mit Rituximab- Düsseldorfer Konzept.....	43
Abbildung 5	PCR-Zyklus.....	45
Abbildung 6	Light-Cycler®.....	46
Abbildung 7	PCR-Ergebnisse.....	50
Abbildung 8	Ereignisfreies Überleben unter Erhaltungstherapie mit Rituximab.....	51

4. Einleitung

4.1 Non-Hodgkin-Lymphome

Maligne Non-Hodgkin-Lymphome sind primäre Neoplasien des lymphatischen Gewebes. Sie gehen von entarteten B- oder T-Lymphozyten (80-85% vs. 15-20% der Fälle) des lymphatischen Systems aus. Etwa 30% der Non-Hodgkin-Lymphome manifestieren sich leukämisch, das heißt mit Ausschwemmung der entarteten Zellen in das periphere Blut. Nicht nur ausgereifte B- oder T-Zellen können entarten, sondern auch deren unreife Vorstufen. Je unreifer eine Zelle bei der Entartung ist, desto aggressiver ist das entstehende Non-Hodgkin-Lymphom.

Ist eine Zelle durch die Veränderung ihrer genetischen Information zu einer Krebszelle geworden, vermehrt sie sich unaufhörlich weiter. Die lymphatischen Zellen proliferieren klonal und reifen nicht weiter aus, da sie als Folge der Entartung einem sogenannten Reifungsarrest unterliegen.

Der Patient leidet zu Beginn der Erkrankung sowohl vermehrt unter einer Allgemeinen- (Müdigkeit, Leistungsabfall, Blässe, Infektneigung) als auch unter einer B- (=Begleit-) Symptomatik mit Fieber $>38,5^{\circ}\text{C}$, Nachtschweiß und Gewichtsverlust von mehr als 10% des Ausgangsgewichtes innerhalb von 6 Monaten. Im Verlauf der Erkrankung kommt es bei den meisten Patienten zu einer Organinfiltration durch die Lymphomzellen. Ein typischer Befund bei Non-Hodgkin-Lymphomen sind dauerhaft vergrößerte Lymphknoten, zunächst häufig in der Halsregion. Bei etwa 50% der Patienten ist initial das Knochenmark mitbefallen, es resultieren die typischen Symptome einer Anämie (Blässe, Müdigkeit), einer Thrombozytopenie (Blutungen, Petechien) und einer Granulozytopenie (Neigung zu Infektionen). Des Weiteren werden bevorzugt die Milz (Splenomegalie), die Haut (besonders durch T-Zell Lymphome induzierte Erytheme, Plaques, Pruritus), die Leber (Hepatomegalie, Funktionsstörung) und die Nieren (Funktionsstörung) infiltriert. Daraus entwickeln sich die organassoziierten Symptome wie Ileus, Husten, Pruritus oder Makrohämaturie (1).

Das Immunsystem von Patienten mit einem Non-Hodgkin-Lymphom ist weniger leistungsfähig als jenes von gesunden Patienten. Durch die Störung der Zellausreifung werden größtenteils funktionslose Abwehrzellen produziert. Dadurch kommt es zu einer Immundysregulation mit einem Mangel an funktionstüchtigen Antikörpern, die nur von gesunden und ausgereiften B-Lymphozyten produziert werden können. Dies ist der Grund für die erhöhte Infektionsanfälligkeit der Patienten. Einige der Lymphomzellen sind dennoch in der Lage Antikörper zu bilden. Diese sind jedoch in ihrer Funktion gestört und können zu Veränderungen der Blutviskosität und zum Auftreten von Autoimmunphänomenen führen.

Die Festlegung des Krankheitsstadiums ist das Resultat der initialen Diagnostik. Alle Non-Hodgkin-Lymphome werden anhand der Ann-Arbor-Klassifikation in Stadien eingeteilt, wonach die Behandlungsstrategie festgelegt wird. Aufgrund der vielfältigen Therapieoptionen ist bei Erstdiagnose ein vollständiges Ausgangs-Staging obligat, da eine zuverlässige Stadieneinteilung von hoher prognostischer und therapeutischer Relevanz ist.

Tabelle 1 Stadieneinteilung der Non-Hodgkin-Lymphome gemäß der Ann Arbor-Klassifikation

Stadium	Primär nodales Stadium	Primär extranodales Stadium
I	Befall einer Lymphknotenregion	Befall eines extralymphatischen Organs oder Gewebes (IE)
II 1	Befall von benachbarten Lymphknotenregionen über- oder unterhalb des Zwerchfells (II1) oder einer Lymphknotenregion mit lokalisertem Übergang auf ein benachbartes Organ oder Gewebe (II1E)	Befall eines extralymphatischen Organs einschließlich der regionalen Lymphknoten (II1) oder eines weiteren benachbarten extralymphatischen Organs (II1E) ober- oder unterhalb des Zwerchfells
II 2	Befall von nicht benachbarten oder mehr als zwei benachbarten Lymphknotenregionen ober- oder unterhalb des Zwerchfells (II2) einschließlich eines lokalisierten Befalls eines extralymphatischen Organs oder Gewebes (II2E)	Befall eines extralymphatischen Organs und Lymphknotenbefall, der über die regionalen Lymphknoten hinausgeht und auch einen weiteren lokalisierten Organbefall einschließen kann (II2E)
III	Befall von Lymphknotenregionen ober- und unterhalb des Zwerchfells (III) einschließlich eines lokalisierten Befalls eines extralymphatischen Organs oder Gewebes (IIIE) oder der Milz (IIIS) oder beides (IIISE)	Befall eines extralymphatischen Organs und Lymphknotenbefall ober- und unterhalb des Zwerchfells einschließlich eines weiteren lokalisierten extralymphatischen Organs oder Gewebes (IIIE) oder der Milz (IIIS) oder beides (IIISE)
IV	Lymphknotenbefall mit diffusem oder disseminiertem Befall extralymphatischer Organe und Gewebe	Diffuser oder disseminierter Organbefall mit oder ohne Lymphknotenbefall

Zusatz: A: Ohne Allgemeinerscheinungen
 B: Mit Fieber u./o. Nachtschweiß u./o. Gewichtsverlust (>10% in den letzten 6 Monaten)

Die Inzidenz steigt in Deutschland in den letzten Jahren kontinuierlich und beträgt etwa 10-12/100.000/Jahr. Im Jahr 2002 wurde nach Schätzungen der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) und des Robert Koch Instituts (RKI) bei 5850 Männern und 6250 Frauen ein Non-Hodgkin-Lymphom diagnostiziert. Dies entspricht 2,7% aller männlichen und 3% aller weiblichen Krebsneuerkrankungen. Die altersstandardisierten Inzidenzen betragen bei den Männern 12,6 (WS) und bei den Frauen 10,1 (WS). Damit ist das Non-Hodgkin-Lymphom bei den Männern die zehnthäufigste und bei den Frauen die zwölft-häufigste Tumorentität (120, 121). Ihr Anteil an den Krebssterbefällen in Deutschland beträgt bei den Frauen 2,7% (Platz 8) und bei den Männern 2,5% (Platz 11).

Die Ätiologie der Non-Hodgkin-Lymphome ist weitgehend unklar. Diskutiert werden immunologische und infektiöse Ursachen, sowie Umwelttoxene. Diese sollen über eine gestörte Funktion des Immunsystems bei gleichzeitiger Immunstimulation die Entwicklung eines Non-Hodgkin-Lymphoms begünstigen. Hinweise dafür gibt es bei Autoimmunerkrankungen [Sjögren-Syndrom (104), Rheumatoide Arthritis (105), Lupus erythematoses (106), Zöliakie (107), Dermatitis herpetiformis (108)], bei genetischen Immundefekterkrankungen [Wiskott-Aldrich-Syndrom, Common variable immunodeficiency, Ataxia teleangiectasia] (109), bei erworbenen Immundefekten [HIV] (110), sowie bei Patienten unter einer immunsuppressiven Therapie [Cyclosporin, Azathioprin, Prednison], insbesondere nach einer Organtransplantation (111). Eine infektiöse Genese gilt beim epidemischen Burkitt-Lymphom [EBV] (119), sowie dem humanen T-Zell Leukämie Virus [HTLV-1] (112) als gesichert. Ferner wird ein Zusammenhang von Non-Hodgkin-Lymphomen mit dem Hepatitis-C-Virus, sowie Borrelia-burgdorferi-Infektionen diskutiert (113, 114). In der Genese des MALT-Lymphoms des Magens ist eine Infektion mit Helicobacter pylori von kausaler Bedeutung (115). Unter den Umwelttoxinen wird die Exposition mit Herbiziden (116) bzw. organischen Lösungsmitteln (117) und UV-Licht (118) als krankheitsauslösend diskutiert. Letztlich können aber die vorbeschriebenen Faktoren (z.B. HIV) den seit Jahrzehnten weltweit kontinuierlichen Anstieg der Lymphomerkkrankungen nicht hinreichend erklären. Die vielfältigen ätiologischen Faktoren können detailliert der Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 2 Ätiologie der Non-Hodgkin-Lymphome

radioaktiv	• ionisierende Strahlung
chemisch	• Kontakt mit mutagenen Verbindungen, Schwermetallen, einigen organischen Lösungsmitteln, Herbiziden und Insektiziden (auf der Basis organischer Phosphorsäureester) sowie Pilzvernichtungsmitteln
viral	• Epstein-Barr-Virus (endemisches=afrikanisches Burkitt-Lymphom) und HI-Virus (=epidemisches Burkitt-Lymphom) • humanes T-Zell Leukämie Virus (T-lymphoblastische Leukämien in SüdJapan und Rumänien)
bakteriell	• Helicobacter pylori (MALT-Lymphom des Magens)
Immundefekte	• angeboren: Ataxia teleangiectasia, SCID -Syndrom, X-linked proliferative Syndrom, Wiskott-Aldrich-Syndrom • erworben: Organ- o. Knochenmarktransplantationen, vorausgegangen Zytostatikagabe, ISP, AIDS, Autoimmunerkrankungen wie das Sjögren Syndrom etc.

Trotz intensiver Forschungsmaßnahmen sind die Ursachen für die Entstehung der Non-Hodgkin-Lymphome bis heute nicht vollständig geklärt. Am Anfang steht immer die krankhafte Veränderung der genetischen Information einer Zelle, die betroffene Zelle „entartet“. Diese Veränderung geschieht nicht ohne Ursache, chronische Entzündungen, ein geschwächtes Immunsystem oder auch der regelmäßige Kontakt mit Schwermetallen, Lösungsmitteln oder radioaktiver Strahlung sollen über eine gestörte Funktion des Immunsystems, bei gleichzeitiger Immunstimulation, die

Entwicklung eines Non-Hodgkin-Lymphoms begünstigen und können die für die Entstehung der Lymphome verantwortliche genetische Veränderung fördern.

Als Folge der ätiologischen Einflüsse konnten, bei der Mehrzahl der Lymphome, Veränderungen in der molekulargenetischen Struktur nachgewiesen werden. Von denen wurden die meisten als chromosomale Aberrationen identifiziert. Es handelt sich dabei um Translokationen einzelner Gensequenzen von einem Chromosom zum anderen. Dies führt zur Bildung von Hybrid-Genen.

Das durch die Translokation entstehende Produkt der genetischen Veränderung ist in vielen Fällen ähnlich: bei den B-Zellen betrifft es die Immunglobulin-Schwerkette und bei den T-Zellen den T-Zell Rezeptor.

Die molekulargenetische Bestimmung dieses genetischen Rearrangements ist von großer praktischer Bedeutung, da es die Klonalität der lymphatischen Populationen ausdrückt und unabhängig vom Vorhandensein tumorspezifischer Veränderungen nachgewiesen werden kann. Als Marker der Klonalität werden die Lymphozyten-spezifischen somatischen Umlagerungen (Rearrangements) von T-Zell-Rezeptor- und Immunglobulingenen untersucht. Auf genomischer Ebene werden unter Vermittlung der VDJ-Rekombinase jeweils eine (variable) V-Sequenz, ein (Diversitäts-) D-Segment und eine (Joining=Verbindungs) J-Sequenz nach optionalem Einfügen von zusätzlichen Basen (N-Sequenzen) zusammengesetzt. Zusätzliche Basenveränderungen (Hypermutationen) finden in einem zeitlich begrenzten Entwicklungsschritt der B-Lymphozyten statt, der mit dem physiologischen Reifungsprozess der Zelle im Keimzentrum korreliert. Diese Rearrangements verlaufen bei den schweren und leichten Ketten der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Regionen in vergleichbarer Weise ab. Es verfügt jeder Lymphozyt über ein individuelles Immunglobulin und T-Zell-Rezeptor-Rearrangement (7, 8, 103). Somit sind die Lymphozyten einer reaktiven und gesunden Population durch unterschiedliche (polyklonale) Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Rearrangements gekennzeichnet. Alle Zellen eines malignen Lymphoms hingegen zeigen ein identisches Rezeptor-Rearrangement, das ihren monoklonalen Ursprung von einer maligne entarteten Ursprungszelle widerspiegelt. Daher ist der Nachweis einer klonalen B- oder T-Zell-Population beweisend für das Vorliegen einer malignen Lymphomproliferation.

Eine für das follikuläre Lymphom, mit dem sich die vorliegende Arbeit im Wesentlichen beschäftigt, charakteristische Veränderung der genetischen Information ist die chromosomale Translokation t(14;18). Die t(14;18) in humanen follikulären Lymphomen rekombiniert das BCL-2 Gen von Chromosom 18 mit dem Immunglobulin-Schwerkettenlocus auf Chromosom 14 [t(14;18)(q32;q21) IgH-BCL2]. Diese Translokation führt zu einer nicht regulierten Überexpression des BCL-2 Genproduktes (7, 8, 103), welches über die Aktivierung von Signalkaskaden unkontrollierte Wachstums- bzw. Differenzierungsprozesse auslöst. Somit gerät ein für die Proliferation bzw. das Überleben der lymphozytären Zelle zentrales Onkogen unter die funktionelle Kontrolle der Promotersequenzen der Immunglobulin- oder T-Zell-Rezeptor-Gene, die in B- und T-Lymphozyten konstitutionell aktiviert sind. Daraus resultiert eine dauerhafte Überexpression des Onkogenproduktes.

Für das Verständnis der daraus resultierenden Tumorentstehung ist von Bedeutung, dass viele dieser Onkogenprodukte Komponenten eines komplizierten Netzwerkes von Schaltelementen der intrazellulären Signalvermittlung darstellen. An dessen

Ende steht die mitotische Teilung, die nun unkontrolliert ablaufen kann und zu einer klonalen Vermehrung der entarteten Zelle führt. Bei einer normalen Zelle hingegen, kommt dieser Teilungsstimulus nur nach entsprechender Rezeptor-Liganden-Bindung zustande.

Die vorliegende Arbeit wird sich im Folgenden detaillierter mit den Untersuchungsmethoden und Anwendungsbereichen der Molekulargenetik (Klonalitätsnachweis, Subtypisierung von Lymphomen und Nachweis von minimaler Resterkrankung) und deren prognostischer Wertigkeit für das Ansprechen auf die Therapie und das spätere Therapieergebnis beschäftigen. Zusammenfassend stellt die Molekulargenetik eine wichtige Methode unter den diagnostischen Hilfsmitteln bei der Differentialdiagnose und der Beurteilung des klinischen Verlaufs maligner Lymphome dar. Insbesondere der Nachweis der Monoklonalität in nicht näher zu differenzierenden Lymphozytenpopulationen, sowie die Detektion charakteristischer Translokationen, die zur Überexpression der beteiligten Onkogene führen, können wichtige Hinweise in der klinischen Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle maligner Lymphome liefern. Die klinische Bewertung dieser molekulargenetischen Ergebnisse ist jedoch nur unter Berücksichtigung sämtlicher pathologischer und klinischer Befunde möglich.

Darüberhinaus untersuchen wir die Wirksamkeit, Verträglichkeit und Durchführbarkeit einer Erhaltungstherapie mit dem gegen das CD20 Antigen gerichteten Antikörper Rituximab nach autologer peripherer Blutstammzelltransplantation bei Patienten mit einem B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom.

4.2 Geschichte und Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome

Grundsätzlich unterschieden werden die verschiedenen Formen des Hodgkin-Lymphoms und der Non-Hodgkin-Lymphome, sowie nach der Lokalisation primär nodale und extranodale maligne Lymphome.

Die morphologische und biologische Vielfalt der malignen Lymphome führte in der Vergangenheit zu international uneinheitlichen Klassifikationen. Durch die im Jahr 2001 erfolgte Publikation der WHO-Klassifikation für Neoplasien hämatopoetischer und lymphatischer Gewebe (1), wurde die Grundlage für eine international einheitliche und universell anwendbare Klassifikation der Lymphome gelegt.

Die WHO-Klassifikation (Tabelle 3) beruft sich in Grundzügen auf das Konzept der Kiel-Klassifikation (1), indem sie die verschiedenen Lymphomtypen den unterschiedlichen Reifungsstufen normaler Lymphozyten der B- und T-Zell-Reihe zuordnet. Die WHO-Klassifikation geht aber über eine rein morphologisch-immunphänotypische Einteilung noch hinaus und versucht Krankheitsentitäten, unter Berücksichtigung klinischer, morphologischer, immunphänotypischer sowie zyto- und molekulargenetischer Befunde zu definieren. Gegenüber der Kiel-Klassifikation wurden das Hodgkin-Lymphom, die extranodalen Non-Hodgkin-Lymphome und das multiple Myelom einbezogen, um alle Neoplasien lymphozytärer Herkunft einzuschließen. Dagegen entfällt in der WHO-Klassifikation die schematische Unterscheidung der Kategorien „hochmalignes Non-Hodgkin-Lymphom“ versus „niedrigmalignes Non-Hodgkin-Lymphom“, da jede Entität in Abhängigkeit verschiedener Faktoren, wie z.B. Tumorstadium oder Therapieansprechen, ein unterschiedliches klinisches Verlaufsspektrum aufweisen kann.

Tabelle 3 Kiel/WHO Konsensus Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome**Tabelle 3a B-Zell Lymphome**

Kiel-Klassifikation	WHO-Klassifikation
<u>Niedrig maligne Lymphome</u>	<u>Indolente Lymphome</u>
Chron. Lymph. Leukämie (B-CLL) Prolymphozytenleukämie (B-PLL)	Chron. Lymph. Leukämie (B-CLL) Prolymphozytenleukämie (B-PLL)
Immunozytom -lymphoplasmozytoid (IC) -lymphoplasmozytisch	Immunozytom Lymphoplasmozytisches Lymphom
Niedrig malignes B-Zell Lymphom vom MALT-Typ (mucosa-associated-lymphatic-tissue)	Marginalzonenlymphom extranodal (MALT-Lymphom [mucosa-associated-lymphatic-tissue]) Marginalzonenlymphom Milz (SLVL)
Haarzellenleukämie (HCL)	Haarzellenleukämie (HCL)
Multiples Myelom	Plasmazell-Myelom - nicht sekretorisches Myelom - indolentes Myelom - „Smoldering“ Myelom - Plasmazell-Leukämie
Plasmozytom	Plasmozytom - solitäres Plasmozytom des Knochens - extramedulläres Plasmozytom
Zentroblastisch/Zentrozytisches Lymphom (CB/CC)	Follikuläres Lymphom - Grad 1: 0-5% Blasten - Grad 2: 6-15% Blasten
<u>Hoch maligne Lymphome</u>	<u>Aggressive Lymphome</u>
Zentroblastisch/Zentrozytisches Lymphom (CB/CC) mit blastenreichen Arealen	Follikuläre Lymphome - Grad 3a: >15% Blasten mit Zentrozyten - Grad 3b: reine Rasen von Blasten
Burkitt-Lymphom	Burkitt-Lymphom Burkitt-ähnliches Lymphom
Zentroblastisches Lymphom Immunoblastisches Lymphom Großzellig anaplastisches B-Zell Lymphom (sog. Ki1-Lymphom vom B-Typ)	Diffus großzellige B-Zell Lymphome - Zentroblastisch - Immunoblastisch - Großzellig anaplastisch (CD 30+)
Mediastinales B-Zell Lymphom	- T-Zell-reiches B-Zell Lymphom
Diffus großzellige B-Zell Lymphome	Mediastinales B-Zell Lymphom
Zentrozytisches Lymphom	Mantelzelllymphome - Klassische Variante (Mantelzelllymphom) - Pleomorphe Variante - Blastoide Variante
Hochmalignes Marginalzonenlymphom	
	<u>Precursor B-Zell Lymphome</u>
B-Lymphoblastisches Lymphom (B-ALL)	B-Lymphoblastisches Lymphom (B-ALL)

Tabelle 3b T-Zell Lymphome

Kiel-Klassifikation	WHO-Klassifikation
<u>Niedrig maligne Lymphome</u>	<u>Precursor T-Zell Lymphome</u>
T-lymphoblastisches Lymphom (T-ALL) (convoluted)	T-lymphoblastisches Lymphom
	<u>Reifzellige B-Zell und NK-Zell Lymphome</u>
Prolymphozytenleukämie (T-PLL)	Prolymphozytenleukämie (T-PLL)
LGL-Syndrom (large granular leukocyte)	T-CLL der großen granulierten Lymphozyten (LGL) NK-Zell Leukämie Adulte T-Zell Leukämie (HTLV1)
	<u>Haut-Lymphome</u>
Mucosis fungoides Sézary Syndrom	Mucosis fungoides Sézary Syndrom Primär kutanes, großzellig anaplastisches Lymphom (CD 30+) Lymphomatoide Papulose (CD 30+)
	<u>Andere extranodale Lymphome</u>
Midline Granulom	Extranodales NK-/T-Zell Lymphom vom nasalen Typ Enteropathie-assoziiertes T-Zell Lymphom Hepatosplenisches T-Zell Lymphom Subcutanes T-Zell Lymphom vom Pannikulitis Typ
	<u>Nodale Lymphome</u>
T-Zell Lymphom vom AILD-Typ (angioimmunoblastisches Lymphom mit Dysproteinämie)	Angioimmunoblastisches T-Zell Lymphom (AILD)
T-Zonen Lymphom	Peripheres T-Zell Lymphom, nicht weiter spezifiziert
Lymphoepitheloides Lymphom (Lennerts Lymphom)	Lennert-Lymphom
Großzellig anaplastisches T-Zell Lymphom, ALC-Lymphom (sog. Ki.1-Lymphom)	Anaplastisch großzelliges Lymphom (CD30+, ALK1+)
	<u>Neoplasmen unsicherer Linearität</u>
	Blastisches NK-Zell Lymphom

4.3. Non-Hodgkin-Lymphome: Untergruppen und Ihre Therapien

Das Verhältnis von indolenten zu aggressiven B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen beträgt etwa 7:3. Davon sind 26% follikuläre Lymphome, 5% Mantelzelllymphome, 23% chronisch lymphatische Leukämien, 27% großzellige Lymphome und 19% andere B- oder T-Zell Lymphome (1).

4.3.1 Indolente B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome

Indolente B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome in den lokalisierten Stadien I und II sind durch eine Bestrahlung durchaus heilbar. Aufgrund ihres oft jahrelangen, nicht aggressiven Verlaufs werden sie aber überwiegend erst in den fortgeschrittenen Stadien III und IV diagnostiziert. Dann ist durch eine konventionelle Bestrahlung eine Heilung nicht mehr möglich. Das Ansprechen eines indolenten Lymphoms auf eine Chemotherapie ist unbefriedigend, da Zellen, die sich langsam teilen, weniger empfindlich auf Zytostatika reagieren. Aus diesem Grund hatte die Therapie des indolenten Non-Hodgkin-Lymphoms in den Stadien III oder IV, bis zur Einführung des monoklonalen CD20 Antikörpers Rituximab, mit dem sich die vorliegende Arbeit im Wesentlichen beschäftigt, bisher rein palliativen Charakter und wurde prinzipiell nur eingesetzt, um den Krankheitsverlauf zu verlangsamen, Symptome zu mildern und Komplikationen vorzubeugen.

Aufgrund dieser unbefriedigenden Situation wurde nach weiteren Therapieoptionen gesucht, um anhaltende Langzeitremissionen zu erzielen. In diesem Zusammenhang prüften mehrere Studien die dosisintensivierte Konsolidierung mittels Hochdosistherapie und autologer Blutstammzelltransplantation. So konnte in einer monozentrischen Studie (4) nach Durchführung einer hochdosierten Radiochemotherapie und autologen Blutstammzelltransplantation eine 10-Jahres-Überlebensrate von 86% erreicht werden.

Apostolidis et al. (5) konnten keine Verbesserung des Langzeitüberlebens, jedoch ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben nachweisen. Der Vergleich der GLSG Studiengruppe (6) von konsolidierender Hochdosistherapie nach CHOP-versus Interferon-alpha-Erhaltungstherapie zeigte ebenfalls eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Intervalls. Der Einfluss auf das Langzeitüberleben konnte aufgrund der eingeschränkten Beobachtungszeit bisher nicht beurteilt werden. Die Durchführung einer Hochdosistherapie bei indolenten Non-Hodgkin-Lymphomen ist bisher keine Standardbehandlung und bleibt weiterhin Gegenstand von Studien.

4.3.2 Follikuläre Lymphome

Die heterogene Gruppe der malignen Lymphome wird in der aktuellen WHO-Klassifikation nach ihrer Zugehörigkeit zur B- oder T-Zell Reihe und nach dem Differenzierungsgrad in unreife (blastäre) oder ausdifferenzierte (sogenannte periphere) Lymphome eingeteilt (1). In der klinischen Praxis machen die indolenten Lymphome etwa 70% aller Lymphome aus. Unter ihnen stellen die follikulären Lymphome, die nach ihrem knotigen Wachstumsmuster benannt sind, die Mehrheit der niedrigmalignen Krankheitsfälle.

Der klinische Verlauf des follikulären Lymphoms ist durch ein langsames Wachstum mit regelmäßigen Rezidiven und einer mittleren Überlebensdauer von etwa zehn

Jahren gekennzeichnet. Betroffen sind vor allem Patienten des mittleren Lebensalters (40.-60. Lebensjahr). Die Mehrzahl der Patienten wird in den fortgeschrittenen Ann-Arbor-Stadien III oder IV diagnostiziert, in denen nach aktueller Datenlage eine konventionelle Chemotherapie nur einen palliativen Therapieansatz darstellt (21). In den letzten Jahren stehen mit der autologen Blutstammzelltransplantation, den Lymphozyten-spezifischen Antikörpern, sowie der Radioimmuntherapie und weiteren molekularen Behandlungsansätzen eine Vielzahl neuer Therapieoptionen bei den indolenten Lymphomen zur Verfügung.

Erstmals kann auch in fortgeschrittenen Stadien follikulärer Lymphome mit der kombinierten Immunchemotherapie das Gesamtüberleben der Patienten deutlich verbessert werden. Umso wichtiger ist der optimale und differenzierte Einsatz der neuen Behandlungsmöglichkeiten.

Das follikuläre Lymphom entspricht dem zentroblastisch-zentrozytischen (cb-cc) Lymphom der Kiel-Klassifikation und besteht aus kleinen Keimzentrumzellen mit gekerbten Zellkernen (Zentrozyten) und großen Keimzentrumzellen mit ungekerbten Zellkernen (Zentroblasten), wobei typischerweise die Zentrozyten dominieren. Das Wachstumsmuster entspricht Pseudofollikeln, die eine physiologische Lymphknotenstruktur imitieren, teilweise findet man aber auch einen diffusen Tumorzellrasen (1). In der Immunphänotypisierung sind regelhaft die B-Zell Antigene CD19, CD20 und CD22 nachweisbar, dagegen sind CD10 und CD23 wechselnd exprimiert. CD5 und CD43 werden nicht exprimiert, was die Abgrenzung zu anderen Lymphomentitäten ermöglicht (Differentialdiagnostisch Chronisch lymphatische Leukämie, Mantelzell- oder Marginalzonen-Lymphom). Häufig werden auch Immunglobuline auf der Zelloberfläche exprimiert (IgM > 50 %, IgD > IgG > IgA) (1). Anhand der Anzahl der vorhandenen Zentroblasten pro Gesichtsfeld wird das follikuläre Non-Hodgkin-Lymphom in drei Grade unterteilt (1):

Grad I: 0–5 Zentroblasten pro Gesichtsfeld

Grad II: 6–15 Zentroblasten pro Gesichtsfeld

Grad III: >15 Zentroblasten pro Gesichtsfeld

Das follikuläre Lymphom Grad III, gemäß der WHO-Klassifikation, kann aufgrund morphologischer und molekulargenetischer Charakteristika in einen Typ IIIA und IIIB unterschieden werden. Der Typ IIIA ist durch ein buntes Zellbild (Zentrozyten, Zentroblasten, follikuläres und diffuses Wachstum) gekennzeichnet und ähnelt klinisch und zytogenetisch den indolent verlaufenden follikulären Lymphomen vom Grad I oder II. Der Typ IIIB ist ausschließlich durch Zentroblasten mit überwiegend diffusem Wachstum charakterisiert und sollte wie ein diffus großzelliges Lymphom behandelt werden (11).

Charakteristisch für das follikuläre Lymphom ist die chromosomale Translokation t(14;18) (q32;q21), die in 80–90% aller Fälle nachgewiesen werden kann (7). Hierbei führt die Kopplung des BCL-2-Onkogens von Chromosom 18 an den Immunglobulinpromoter auf Chromosom 14 zu einer konstitutionellen Überexpression des Anti-Apoptose-Gens BCL-2 [IgH-BCL2] (7, 8, 103). Die Zellapoptose wird gehemmt und langlebige Zentrozyten akkumulieren (98). Zur klinischen Manifestation des follikulären Lymphoms sind allerdings weitere „sekundäre“ genetische Alterationen notwendig. In 20–30% der Fälle können follikuläre Lymphome, in einem Zeitraum von etwa 10 Jahren, in aggressive Non-Hodgkin-Lymphome mit diffus großzelliger Histologie transformieren (9, 10). Sie gehen dann mit einer schlechteren Prognose einher und sollten wie großzellig-anaplastische Non-Hodgkin-Lymphome therapiert werden (11).

In verschiedenen Studien wurden folgende ungünstige Prognosefaktoren für das rezidivfreie und das Gesamtüberleben nachgewiesen: hohe Tumorlast (>1

extranodale Manifestation), Lymphknotenbefall $\geq 5\text{cm}$ (bulky disease), ausgeprägter Knochenmarkbefall, leukämische Ausschwemmung, Hepatosplenomegalie, Anämie, erhöhte Serum-LDH, B-Symptomatik, Alter >70 Jahre und männliches Geschlecht. Als Hoch-Risiko Patienten, gemäß des International Prognostic Index (IPI) (33), gelten Patienten mit mehr als 2 der folgenden Risikofaktoren: Stadium III oder IV, LDH-Erhöhung, extranodale Krankheitsmanifestation, schlechter Allgemeinzustand (Karnofsky Index $<70-80\%$) und Alter >60 Jahre.

Während der „Internationale Prognostische Index“ (IPI) (33) nur eine geringe Subpopulation mit mittlerem oder hohem Risiko identifiziert, ermöglicht ein spezifischer Index für das follikuläre Lymphom (Follicular Lymphoma International Prognostic Index, FLIPI) eine genauere Stratifizierung (20) in 3 Risikogruppen: 0-1= niedriges Risiko, 2-3= intermediäres Risiko, >3 = hohes Risiko. Man vergibt je einen Punkt für: Alter >60 Jahre, Ann-Arbor-Stadium $>II$, Hb $<12\text{g/dl}$, Befall von >4 LK Regionen, LDH-Erhöhung.

Für die 15-20% der follikulären Lymphome im Stadium I und II, sowie im limitierten Stadium III (<5 Lymphknotenregionen befallen, keine Bulk- Manifestation), zählen die Strahlentherapie und in Einzelfällen auch die Chirurgie zu den kurativen Therapieoptionen. Retrospektive Studien zeigen, dass durch eine alleinige Extended-Field Bestrahlung (mit insgesamt 30-40 Gy) 60-80% der Patienten über 5 Jahre und 45-60% über 10 Jahre rezidivfrei bleiben (13). Das optimale Zielvolumen ist zurzeit noch nicht gesichert und Gegenstand laufender Studien.

Aufgrund des diskontinuierlichen Ausbreitungsmusters der Erkrankung kommen Großfeldtechniken, wie die Extended-Field-Bestrahlung oder auch die total-lymphatische Bestrahlung, zum Einsatz. Das Risiko eines Lymphknotenrezidivs in nicht adjuvant bestrahlten Regionen liegt nach fünf Jahren bei 17–20% und kann nach zehn Jahren bis auf 40% ansteigen.

In fortgeschrittenen Stadien III und IV besteht weiterhin, trotz einer Vielzahl neuer Konzepte, mit den konventionellen Möglichkeiten kein kurativer Therapieansatz. Allerdings konnte durch die Einführung der kombinierten Immunchemotherapie erstmals eine Verlängerung des Gesamtüberlebens gezeigt werden (122). Der klinische Verlauf ist in der Regel durch eine, über Jahre unveränderte, Rezidivrate gekennzeichnet, die auch nach Erreichen einer kompletten Remission regelhaft beobachtet wird. Das mittlere Überleben beträgt durchschnittlich 5-8 Jahre, Remissionen halten 12-36 Monate an. Nach dem 1. Rezidiv leben nach 5 Jahren circa 25% der Patienten. Etwa 30-40% transformieren nach 10 Jahren in ein aggressives Lymphom mit schlechterer Prognose (9, 10).

Therapeutisch besteht eine breite Auswahl an palliativen Behandlungsoptionen: „watch and wait“, orale Alkylanzien, Purinanaloga, Polychemotherapien mit oder ohne Anthrazyklinen, Interferone, monoklonale Antikörper und experimentelle „molecular targeted“ Therapieansätze. Die Rollen der Radioimmuntherapie, sowie der autologen und allogenen Blutstammzelltransplantation, als potenziell kurative Therapieoptionen, werden derzeit in klinischen Studien getestet.

Bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium zeigt eine abwartende „watch and wait“-Strategie bis zum eindeutigen Progress oder deutlicher Symptomatik keinerlei negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben (14). Die international akzeptierten Stanford Kriterien (18) definieren die Indikationen für den Beginn einer systemischen Therapie wenn krankheitsassoziierte Symptome auftreten: B-Symptomatik, hämatopoetische Insuffizienz (bei Knochenmarkinfiltration), Vorhandensein großer verdrängender Lymphommassen (bulky disease) oder rasche Krankheitsprogredienz.

Die Alkylanzien Chlorambucil und Cyclophosphamid waren über Jahrzehnte die Standardoptionen in der Therapie der follikulären Lymphome. Durch eine kombinierte Polychemotherapie mit Cyclophosphamid, Vincristin und Prednison (COP) wurde eine 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 60% erreicht (9).

In einer prospektiven, randomisierten Studie der GLSG wies eine andere, gut verträgliche Polychemotherapie mit PmM (Prednimustin, Mitoxantron), im Vergleich zu COP, eine signifikant höhere Rate kompletter Remissionen (36 % nach PmM vs. 16% nach COP) bei vergleichbarem Gesamtansprechen auf (19).

Das Nachfolgeregime mit den Einzelsubstanzen Mitoxantron, Cyclophosphamid und Prednison (MCP) war dem klassischen CHOP-Schema (Cyclophosphamid, Adriamycin, Vincristin und Prednison) hinsichtlich der Gesamtremissionsrate zwar signifikant unterlegen (75% vs. 87%), das progressionsfreie und das Gesamtüberleben wurden aber auch durch anthrazyklinhaltige Therapieprotokolle nicht signifikant verbessert (123).

Bei jüngeren Patienten mit der Option auf eine spätere Hochdosistherapie stellt CHOP (19) derzeit die Standardtherapie dar. Nach diesem Regime konnten bei >90% der Patienten ausreichend Stammzellen gesammelt werden (124). Dagegen sollte bei älteren Patienten die Induktionstherapie individuell und unter Abwägung der Nebenwirkungen, ausgewählt werden. Eine sehr gut verträgliche Alternative stellen die bendamustinhaltigen Regime dar. Diese erzielten bei guter Verträglichkeit ebenfalls hohe Remissionsraten (54).

Die Purinanaloga Fludarabin und Chlorodesoxyadenosin (2-CdA) stellen eine weitere Behandlungsoption ohne Kreuzresistenz zu den Alkylanzien dar. Auf der Grundlage eines In-vitro-Synergismus wurden purinhaltige Konzepte in mehreren Studien in Kombination mit Mitoxantron und/oder Cyclophosphamid geprüft. Erstmals konnten mit einer konventionellen Chemotherapie molekulare Remissionen erreicht werden. Im Rahmen der GLSG-Rezidivstudie konnte die hohe Wirksamkeit einer Kombination von Fludarabin, Cyclophosphamid und Mitoxantron (FCM) bestätigt werden (22). Die aggressiven Lymphome vom Grad IIIB sind wie diffus großzellige Lymphome zu therapieren (11).

Eine genaue Empfehlung für die Therapie von Patienten mit einem follikulären Lymphom außerhalb von klinischen Studien ist in der modifizierten Übersicht von Dreyling et al. (21) dargestellt (Tabelle 4):

Tabelle 4: Therapieübersicht follikuläre Lymphome

Stadien I und II	Stadien III und IV (>60 Jahre)	Stadien III und IV (<60 Jahre)
Strahlentherapie (30 Gy + 10 Gy Boost) 18–75 Jahre: Extended Field >75 Jahre: Involved Field	Chemotherapie (z.B. CHOP, MCP + Rituximab) nur in Ausnahmefällen: Chlorambucil Rituximab-Monotherapie CR oder PR optional: IFN-Erhaltungstherapie	Chemotherapie (z.B. CHOP + Rituximab) nur in Ausnahmefällen: Chlorambucil Rituximab-Monotherapie CR oder PR In kontrollierten Studien: Hochdosistherapie mit Blutstammzelltransplantation
Rezidiv oder Progress evtl. erneute Bestrahlung Chemotherapie	Rezidiv oder Progress >12 Monate: z.B. Initialtherapie <12 Monate: Alternativregime, z.B.: Rit-FCM	Rezidiv oder Progress >12 Monate: z.B. Initialtherapie <12 Monate: Alternativregime, z.B.: Rit-FCM nur nach individueller Beratung: Hochdosistherapie mit Blutstammzelltransplantation
	Experimentell: Radioimmuntherapie allogene Transplantation	Experimentell: Radioimmuntherapie allogene Transplantation

Mit den neueren, potenziell kurativen Therapieoptionen, wie der monoklonalen Antikörpertherapie, der Radioimmuntherapie und der autologen Blutstammzelltransplantation, die noch in klinischen Studien getestet werden, wird sich die hier vorliegende Arbeit im folgenden detaillierter beschäftigen. Die Translokation t(14;18) und deren Bedeutung als prognostischer Marker, mit der sich die hier vorliegende Arbeit im Wesentlichen beschäftigt, eignet sich zum molekulargenetischen Nachweis einer minimalen Resterkrankung.

Im letzten Jahrzehnt konnte die Wirksamkeit des humanisierten Anti-CD20-Antikörpers Rituximab, der gegen das auf fast allen B-Zell Lymphomen exprimierte Antigen CD20 gerichtet ist, in zahlreichen klinischen Studien bestätigt werden. Der Antikörper wirkt, sowohl über eine Komplementaktivierung, als auch durch eine antikörpervermittelte, zelluläre Zytotoxizität und eine direkte Induktion von Apoptose. In der Monotherapie erzielte das Standardregime (375 mg/m²/Woche i.v. über 4 Wochen), bei 166 Patienten mit rezidierten indolenten Lymphomen, eine Ansprechrate von 48%. Die mittlere Remissionsdauer lag nach alleiniger Antikörpertherapie allerdings nur bei 13 Monaten (72). In der Primärtherapie erreichte der Antikörper ein Gesamtansprechen von über 70 % und eine mediane Remissionsdauer von 18 Monaten. In einer Gruppe von Patienten mit niedriger Tumorlast wurde in 28% der Fälle eine komplette Remission (CR) erreicht. Diese

Patienten wiesen im Median ein progressionsfreies Überleben von über vier Jahren auf (73). Neben allergischen Reaktionen (Schüttelfrost, Fieber, Urtikaria, Luftnot, selten Blutdruckabfall), die durch eine prophylaktische Gabe von Steroiden vor der ersten Verabreichung, und die Gabe von Antihistaminika und Antipyretika (z.B. Paracetamol) vor jeder Rituximab-Infusion vermieden werden können, weist die Rituximabgabe nur geringe Nebenwirkungen auf. Allerdings sollte Rituximab bei einer hohen Tumorlast nur unter strenger Indikationsstellung und mit Vorsicht appliziert werden, da in einer solchen Situation das Risiko eines schweren „cytokine release“-Syndroms erhöht ist.

In einer kleineren Phase-II-Studie (n=38) sprachen alle Patienten mit einem follikulären Lymphom auf eine Kombination mit R-CHOP an und in 63% konnte eine komplette Remission erreicht werden, die bei 50% noch nach 82 Monaten anhaltend war (130).

Nachdem In-vitro-Daten auf einen Synergismus des Antikörpers mit Chemotherapie hinwiesen, wurde in einer Reihe von Phase-III-Studien die Strategie der Immunchemotherapie getestet. In verschiedenen randomisierten Untersuchungen führte die kombinierte Gabe von Rituximab nicht nur zu einem verbesserten Ansprechen, sondern auch zu einem deutlich verlängerten ereignisfreien Überleben, sowie in ersten Studien auch zu einem verlängerten Gesamtüberleben. Die zusätzliche Gabe von Rituximab (R-CHOP) führt, gegenüber einer alleinigen Chemotherapie (CHOP), zu einer höheren Ansprechrate (96% vs. 90%), einer Verdoppelung der progressionsfreien Zeit ($p < 0,0001$) und zu einem signifikant verlängerten Gesamtüberleben nach vier Jahren (90% vs. 81%; $p = 0,039$) (52, 131). Dieser Vorteil zeigte sich sowohl in der Gruppe der jüngeren Patienten (<60 Jahre), als auch bei älteren Patienten sowie in allen untersuchten Risikokollektiven. Diese Kombinationsbehandlung wurde gut toleriert, die beobachteten Nebenwirkungen waren im Wesentlichen mit der Chemotherapie assoziiert. Ähnliche Ergebnisse wurden mit einem etwas milderen CVP- und dem vergleichbaren MCP-Regime erzielt (53, 132). In einer weiteren Studie waren sechs Zyklen einer Antikörper-Chemotherapie sogar zwölf Zyklen einer konventionellen Chemotherapie mit CHVP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Etoposid und Prednison) überlegen (133). Auch in der Rezidivsituation führte die kombinierte Immunchemotherapie mit R-FCM (Rituximab plus Fludarabin, Cyclophosphamid und Mitoxantron) zu einer signifikanten Erhöhung der Remissionsrate (94% vs. 75%) und einem verlängerten progressionsfreien Überleben (>36 Monate vs. 21 Monate) (22). Nach längerer Nachbeobachtung wurde sogar ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben nachgewiesen. Es profitierten auch diejenigen Patienten, die bereits im Rahmen der Erstlinientherapie Rituximab erhalten hatten. Aufgrund dieser Studienergebnisse stellt die kombinierte Immunchemotherapie zurzeit die Standardtherapie in der Behandlung der follikulären Lymphome dar.

Um die in lokalisierten Stadien kurative Strahlentherapie auch in fortgeschrittenen Stadien einsetzen zu können, wurden monoklonale Antikörper mit verschiedenen radioaktiven Tracern (^{131}I , ^{90}Y) markiert. Durch eine solche gezielte Antikörper-vermittelte Lymphombestrahlung werden nicht nur die markierten, sondern auch die benachbarten Lymphomzellen zerstört (Crossfire-Effekt). Zugelassen für diese Therapieform sind Tositumomab ^{131}I (Bexxar®) und Ibritumomab ^{90}Y (Zevalin®). ^{90}Y ist aufgrund der fehlenden Gammastrahlung für eine ambulante Behandlung geeignet. Als wesentliche Nebenwirkung wird etwa vier bis sechs Wochen nach Verabreichung eine vorübergehende Thrombo- und Leukozytopenie beobachtet. Daher wird bei Fällen mit erniedrigten Thrombozytenwerten eine Dosisreduktion

empfohlen. Patienten mit einer ausgeprägten Thrombozytopenie oder >25%iger Knochenmarkinfiltration durch das Lymphom qualifizieren sich nicht für diese Therapieoption. Beide radioaktiv markierten Antikörper weisen eine vergleichbare klinische Antilymphomaktivität auf. Die Ansprechrate bei rezidierten follikulären Lymphomen liegt zwischen 60-80%. In einer randomisierten Studie führte die Radioimmuntherapie mit ⁹⁰Y-Ibritumomab, bei insgesamt guter Tolerabilität, zu einem signifikant höheren Gesamtansprechen (80% vs. 56%) gegenüber einer alleinigen Therapie mit Rituximab. Das mittlere progressionsfreie Überleben war in beiden Studienarmen vergleichbar (138). Langzeitbeobachtungen wiesen jedoch auf eine Rate von 10-20% Remissionen nach Radioimmuntherapie bei fortgeschrittenen Stadien hin. In einer anderen Studie konnte mit der einmaligen Radioimmuntherapie, in der Erstbehandlung eines selektierten Patientenguts, eine hohe Ansprechrate, mit einer mittleren Remissionsdauer von über fünf Jahren beobachtet werden (134). Auffallend war, dass alle Patienten mit partieller Remission innerhalb eines Jahres rezidierten, während bei der Mehrheit der Patienten, die eine komplette Remission erreichten, diese anhaltend war. Die Studienergebnisse zeigen die Bedeutung einer kompletten Remission als prädiktiven Marker für eine anhaltende Wirksamkeit der Radioimmuntherapie. In aktuellen Empfehlungen und Studienkonzepten wird die Radioimmuntherapie daher als Konsolidierung nach initialem Debulking des Lymphoms durch eine Induktionstherapie eingesetzt (135). So waren in einer amerikanischen Phase-II-Studie das progressionsfreie (67% vs. 44%) und das Gesamtüberleben (87% vs. 64%) deutlicher verlängert, als in einer älteren Vergleichsstudie über eine alleinige Chemotherapie mit CHOP (138). Allerdings sind weitere kontrollierte Studien notwendig, um den optimalen Einsatz der Radioimmuntherapie im Rahmen von multimodalen Therapiekonzepten (auch Hochdosistherapien) zu bestimmen.

Die Antilymphomaktivität von Interferon-alpha (IFN- α), bei Patienten mit rezidierten oder therapierefraktären Non-Hodgkin-Lymphomen, ist in zahlreichen Studien belegt (17). Es werden schwere akute (grippeähnliche) und chronische Nebenwirkungen (Inappetenz, Depression, Granulozytopenie, Thrombozytopenie) beobachtet, so dass der Einsatz dieser Therapieoption nur individuell und unter Abwägung des Nebenwirkungsprofils erfolgen kann.

Eine Erhaltungstherapie mit Rituximab, mit der sich die hier vorliegende Arbeit im Wesentlichen beschäftigt, stellt einen weiteren, gut verträglichen Therapieansatz dar. In mehreren randomisierten Studien wurde die Wirksamkeit einer Erhaltungstherapie mit Rituximab bei rezidierten follikulären Lymphomen belegt. In einer großen Phase-III-Studie erhielten Patienten zunächst eine Monotherapie mit Rituximab. Patienten ohne Krankheitsprogress wurden anschließend entweder weiter beobachtet oder erhielten vier weitere Gaben Rituximab (nach zwei, vier, sechs und acht Monaten) (61). Das ereignisfreie Überleben im Erhaltungsarm war signifikant verlängert (23 Monate vs. 12 Monate, $p=0,02$). Der Unterschied bei Patienten in der Erstlinientherapie war noch deutlicher. Ähnliche Ergebnisse wurden unter einem anderen Erhaltungsschema beobachtet (wöchentliche Gaben von Rituximab über 4 Wochen alle sechs Monate) (64). Aufgrund der Erfahrungen einer Erhaltungstherapie mit Interferon- α , evaluierten zwei weitere Studien eine Erhaltungstherapie mit Rituximab nach einer wirksamen Induktionstherapie. In der GLSG-Studie führten acht weitere Gaben Rituximab (wöchentlich über 4 Wochen nach drei und neun Monaten) zu einer bemerkenswerten Verbesserung des ereignisfreien Überlebens (70 % vs. 40 % nach drei Jahren) und sogar zu einem grenzwertig verlängerten

Gesamtüberleben ($p=0,056$) (137). Darüber hinaus wurden keine klinisch relevanten Nebenwirkungen unter der Erhaltungstherapie beobachtet. Die Rate schwerer Infektionen war in beiden Studienarmen vergleichbar gering. In einer ähnlichen Studie der EORTC erhielten Patienten mit rezidierten follikulären Lymphomen ebenfalls eine Erhaltungstherapie mit acht Gaben Rituximab (Einzelgabe alle drei Monate) (65). Das progressionsfreie Überleben war ebenfalls deutlich verlängert (52 Monate vs. 23 Monate; $p<0,001$). Darüberhinaus wurde auch bei den Patienten, die mit Rituximab (R-CHOP) vorbehandelt waren, ein verbessertes Gesamtüberleben beobachtet ($p=0,059$). Basierend auf diesen beiden multizentrischen Studien stellt eine Erhaltungstherapie mit Rituximab, nach einer kombinierten Immunchemotherapie, den aktuellen Goldstandard in der Behandlung des rezidierten follikulären Lymphoms dar. Aktuelle Studien prüfen dieses Konzept in der Primärtherapie.

Trotz der Entwicklung zahlreicher innovativer Therapiestrategien besteht bei den follikulären Lymphomen in fortgeschrittenen Stadien weiterhin kein kurativer Therapieansatz. Neuere Therapieverfahren, wie die konsolidierende Hochdosistherapie mit anschließender autologer Blutstammzelltransplantation oder Radioimmuntherapie, weisen vielversprechende Ergebnisse auf. Diese multimodalen Therapieansätze lassen erstmals die Möglichkeit eines kurativen Therapieansatzes auch in fortgeschrittenen Stadien erhoffen. Ihr Einfluss auf das Gesamtüberleben kann jedoch nur im Rahmen prospektiver Studien belegt werden.

4.3.3 Mantelzelllymphome

Mantelzelllymphome machen 3-5% aller Non-Hodgkin-Lymphome aus. Betroffen sind vor allem ältere Patienten im 60.-70. Lebensjahr. Männer erkranken 2,5 bis 4 Mal häufiger als Frauen. Mantelzelllymphome sind charakterisiert durch die Translokation $t(11;14)$. Dabei transloziert das BCL-1 Gen von Chromosom 11 auf 14 und fällt dort unter die Kontrolle des Immunglobulinlokus. Dies bedingt eine gesteigerte Synthese von Cyclin D1, welches zu einem Verlust der Zellkontrolle und zu einer gesteigerten Proliferationsrate führt. Die Zellen stammen von Prä-Keimzentrumszellen ab. In der Immunphänotypisierung sind diese Zellen positiv für CD5, CD19, CD20, CD22 und negativ für CD10 und CD23. Die histologische Diagnose erfolgt über den Nachweis der Cyclin D1 Expression, welche auch von prognostischer Relevanz ist.

Mantelzelllymphome bilden schnell Resistenzen gegenüber dem eingesetzten Chemotherapeutikum aus. Sie sind sehr aggressiv und haben eine schlechte Prognose. Das mediane Überleben beträgt 3 bis 4 Jahre (22). Initial zeigen sich mehr extranodale Manifestationen, in über 80% der Fälle befindet sich der Patient zum Diagnosezeitpunkt im Ann-Arbor-Stadium IV, wobei häufig das Knochenmark infiltriert ist.

In den Stadien I und II ist, wie auch bei den anderen Lymphomen, eine Strahlentherapie die Behandlungsoption der Wahl. In den Stadien III und IV kommen intensivisierte Chemotherapieprotokolle zum Einsatz. Im Gegensatz zu den follikulären Lymphomen wird bei den Mantelzelllymphomen sofort nach Diagnosestellung mit der Therapie begonnen. Da eine alleinige Chemotherapie eine schlechte Prognose birgt, sind heute Kombinationen mit Rituximab und eine primäre Blutstammzelltransplantation die Therapieverfahren der Wahl.

4.3.4 Lymphoplasmozytisches Immunozytom (Morbus Waldenström)

Der Morbus Waldenström ist gekennzeichnet durch eine IgM-Makroglobulinämie mit monoklonalen Proteingradienten, sowie einer Knochenmarkinfiltration ohne größere Lymphknotenmassen. Bei einer Lymphknoteninfiltration im Rahmen eines lymphoplasmozytischen Immunozytoms ist, auch nach Einsatz der Immunhistochemie, die Abgrenzung gegenüber anderen indolenten Subtypen (z.B. follikuläres Lymphom mit lymphoplasmozytoider Differenzierung, nodales Marginalzonen-Lymphom) nicht immer eindeutig. Hier kommt dem Nachweis eines IgM-Paraproteins eine wesentliche differentialdiagnostische Bedeutung zu. Molekularbiologisch (Genexpressions-Analyse), morphologisch und klinisch ist der Morbus Waldenström zwischen der chronisch lymphatischen Leukämie und anderen indolenten Lymphomen einzuordnen. Entsprechend geht die Erkrankung fast immer mit einem ausgeprägten Knochenmarkbefall, mit oder ohne Lymphknotenbefall, einher. Der Beginn einer Therapie ist bei Auftreten einer Polyneuropathie, einem Hyperviskositäts-Syndrom, einer hämatopoetischen Insuffizienz oder bei zunehmender Infektneigung indiziert.

Alkylanzien (z.B. Chlorambucil) und Purinanaloga (Fludarabin, Cladribin) stellen die therapeutischen Standardoptionen bei dieser Erkrankung dar, eine initiale Plasmapherese ist nur in seltenen Fällen notwendig. Nicht randomisierte Studien suggerieren auch in der Primärtherapie des Morbus Waldenström einen Vorteil der Purinanaloga in Kombination mit Rituximab, die Raten einer kompletten Remission liegen mit diesen Therapieoptionen allerdings nur bei 10 % (125, 126). Der klinische Verlauf wird im Wesentlichen durch das Risikoprofil der Patienten bestimmt. Die alleinige Rituximabgabe kann, in Fällen mit geringer Tumorlast, eine Remission erzielen (127). In einer randomisierten Studie wurde bei 72 Patienten mit lymphoplasmozytischem oder -zytoidem Lymphom der Vorteil einer kombinierten Immunchemotherapie nachgewiesen. Das Gesamtansprechen nach R-CHOP lag bei 94% gegenüber 69% nach alleiniger Chemotherapie. Mit dieser Kombination konnte die nach alleiniger Gabe von CHOP erreichte Remissionsdauer von 22 Monaten nahezu verdoppelt werden (128). Nach Empfehlung der internationalen Waldenström-Arbeitsgruppe sollen bevorzugt folgende Kombinationen eingesetzt werden: i) Fludarabin und Cyclophosphamid, ii) Rituximab und Fludarabin, iii) Rituximab, Fludarabin und Cyclophosphamid (129).

Die optimale Wahl des Behandlungsregimes ist schwierig und richtet sich nach dem Allgemeinzustand und den Begleiterkrankungen des Patienten. Außerhalb von klinischen Studien ist die Anwendung der autologen Blutstammzelltransplantation, zumindest in der Primärtherapie, eingeschränkt. Zukünftige, vielversprechende Optionen umfassen die Gabe von Proteasom-Inhibitoren, Lenalidomid und andere molekulare Ansätze.

4.3.5 Diffus großzellige aggressive Lymphome

Die Inzidenz der diffus großzelligen Non-Hodgkin-Lymphome beträgt etwa 10/100.000 Einwohner pro Jahr. Männer sind häufiger betroffen als Frauen. Die aggressiven Non-Hodgkin-Lymphome zeichnen sich durch einen schnellen Krankheitsverlauf aus und führen unbehandelt rasch zum Tode des Patienten. Eine Heilung ist nur durch eine frühzeitig begonnene Chemotherapie erreichbar. Die aggressiven Lymphome sprechen besser als die indolenten Lymphome auf eine Chemotherapie an. Dadurch können sie auch noch in fortgeschrittenen Stadien kurativ behandelt werden. Oftmals sind initial neben den Lymphknoten auch extranodale Organe befallen. Gemäß des International Prognostic Index für Maligne Lymphome (IPI) (23) teilt man diese nach Alter, Tumorstadium, Serum LDH, Karnofsky Status und Anzahl der befallen extranodalen Organe in 4 Risikogruppen ein. Für diese Gruppen liegen die vorbeschriebenen Überlebensraten bei 73%, 51%, 43% und 26%. Berechnet man das 5-Jahres-Überleben altersadaptiert für alle Patienten, die jünger als 60 Jahre sind, so ergibt sich für jüngere Patienten eine bessere Prognose = altersangepasster IPI.

Bei aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen kann durch eine konventionelle Polychemotherapie in etwa der Hälfte der Fälle (24) eine Langzeitremission erreicht werden.

Um die Heilungschancen aggressiver Lymphome mit hohem Risiko (gemäß IPI) zu verbessern, wurden in den vergangenen 20 Jahren unterschiedliche Therapieschemata entwickelt und angewendet. In randomisierten Studien (24) war jedoch keines davon dem Standardregime mit CHOP eindeutig überlegen. Die meisten dieser Schemata waren jedoch vor dem Einsatz von G-CSF oder der Hochdosistherapie mit autologer Blutstammzelltransplantation entwickelt worden. Die Möglichkeit einer Hochdosistherapie schien bei diesen Lymphomen aufgrund der hohen Chemosensitivität und gleichzeitig aber auch hohen Rezidivrate und Mortalität, etwa 70% der Patienten versterben innerhalb von 10 Jahren (25), ein viel versprechender Ansatz für bessere Langzeitergebnisse zu sein.

Erste retrospektive und prospektive nicht kontrollierte Studien (26, 27, 28) in der Therapie der aggressiven Lymphome ließen vermuten, dass Patienten mit einem Rezidiv (=Zweitlinien Patienten) oder verzögertem Ansprechen auf die Initialtherapie von einer Hochdosistherapie mit autologer Blutstammzelltransplantation profitieren könnten. Für chemosensible, erste Rezidive aggressiver Lymphome konnte dies in der multizentrischen und randomisierten Parma-Studie (29) gezeigt werden. Im Vergleich einer konventionellen Rezidivtherapie nach dem DHAP-Schema mit einer BEAC-Hochdosistherapie (Carmustin, Etoposid, Cytarabin und Cyclophosphamid) und anschließender autologer Blutstammzelltransplantation war die Hochdosistherapie der Salvagetherapie mit einer krankheitsfreien 5-Jahres-Überlebensrate von 46% vs. 12% und einer 5-Jahres-Gesamt-Überlebensrate von 53% vs. 32% deutlich überlegen.

In Anbetracht dieser Ergebnisse untersuchten mehrere Phase-II-Studien (3, 26, 28, 30, 31, 32) den Einsatz der Hochdosistherapie und autologen Blutstammzelltransplantation auch in der Primärtherapie (=Erstlinien Patienten) aggressiver Lymphome und ließen einen Vorteil für die Hochdosistherapie mit autologer Blutstammzelltransplantation bei Patienten mit erhöhtem Risiko (gemäß IPI) vermuten. Die mit einer CHOP-Monotherapie erreichten Resultate sind bei diesen Patienten schlecht (33). Daher wurde die Dosisescalation der Initialtherapie als eine Möglichkeit gesehen, das Therapieergebnis bei Patienten mit aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen und Risikofaktoren gemäß IPI (23) zu verbessern.

Die weiteren in der Primärtherapie erzielten Resultate sind jedoch nicht einheitlich. In randomisierten Phase-III-Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine Hochdosistherapie mit autologer Blutstammzelltransplantation, als Konsolidierungs- (34, 35) oder Initialtherapie (36), das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben bei Hochrisiko-Patienten (gemäß IPI) unter 60 Jahren verbessern konnte.

Für Patienten mit hohem bis intermediärem Risiko (gemäß IPI) konnten Milpied et al. (37) in einer randomisierten Studie den Vorteil einer Hochdosistherapie mit autologer Blutstammzelltransplantation gegenüber der konventionellen Therapie mit CHOP ebenfalls nachweisen. Die krankheitsfreie Überlebensrate lag nach 5 Jahren in der CHOP-Gruppe bei 28% vs. 56% in der Hochdosisgruppe. Dementsprechend verlängert war die 5-Jahres Gesamtüberlebensrate mit 74% für die hochdosistherapierten vs. 44% für die mit CHOP-therapierten Patienten.

Im Gegensatz dazu konnten Verdonck et al. (38), bei Patienten mit einer partiellen Remission nach 3 Zyklen CHOP, keinen signifikanten Nutzen einer Hochdosistherapie gegenüber 5 weiteren Zyklen CHOP nachweisen. Vier Jahre nach der Hochdosistherapie betrug die Gesamtüberlebensrate 56% und die krankheitsfreie Überlebensrate 41%. Für die Patienten der CHOP-Gruppe lagen diese Zahlen zum gleichen Zeitpunkt bei 85% und 53%.

Ebenso randomisierte eine italienische Gruppe (38) 51 Patienten in partieller Remission nach zwei Dritteln einer konventionellen Chemotherapie zwischen einer BEAC-Hochdosistherapie und einer konventionellen Chemotherapie nach dem DHAP-Schema. Auch hier wiesen die Raten des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens nach fast 5 Jahren (55 Monate) keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf.

Angesichts der bisherigen Studienergebnisse ist die Hochdosistherapie nur in der Behandlung rezidivierter aggressiver Non-Hodgkin-Lymphome fest etabliert. Sie sollte nach den Kriterien der European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) und der Konsensusgruppe bei Patienten durchgeführt werden, die jünger als 60 Jahre sind und das erste Rezidiv eines aggressiven Lymphoms erlitten haben (29, 39, 40).

4.4 Stellenwert der autologen peripheren Blutstammzelltransplantation

Bereits bei zahlreichen bösartigen Erkrankungen konnte, sowohl in vitro als auch im Tiermodell, eine direkte Beziehung zwischen der Dosierung des Chemotherapeutikums (insbesondere bei Vertretern der alkylierenden Substanzen) und dessen Wirkung gezeigt werden. Der Nachteil konventioneller Chemotherapien ist immer die Dosierungsbegrenzung, die durch die Myelotoxizität der angewendeten Substanzen bedingt ist. Eine über diese Grenze hinausgehende Dosierung führt unwiderruflich zu lang anhaltenden Panzytopenien, bis hin zu einer irreversiblen Zerstörung des hämatopoetischen Systems.

Das Prinzip der Hochdosistherapie ist es hingegen, den Patienten eine möglichst hohe Dosis des Chemotherapeutikums ohne Rücksicht auf die Myelotoxizität zu verabreichen. Der darauf unweigerlich folgenden, irreversiblen Zerstörung des hämatopoetischen Systems wird durch die anschließende Gabe körpereigener (autologer) Blutstammzellen begegnet.

Vor Beginn der Hochdosistherapie wird eine remissionsinduzierende bzw. zyto reduktive Chemotherapie durchgeführt. In der sich anschließenden Regenerationsphase des Knochenmarks kann durch die Gabe von Wachstumsfaktoren (z.B. G-CSF, Granulozyten- Kolonie Stimulierender Faktor, Neupogen®) die Ausschwemmung hämatopoetischer Stammzellen in das periphere Blut verstärkt werden, wo sie mittels Leukapherese gewonnen und anschließend bis zur späteren Verwendung eingefroren werden können. In sehr seltenen Fällen gelingt die Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen in das periphere Blut nicht. Dann ist die operative Entnahme von autologem Knochenmark erforderlich.

Die periphere Blutstammzelltransplantation ist der Knochenmarktransplantation in einigen Punkten überlegen, da i) die hämatopoetische Regenerationszeit kürzer ist, ii) weniger Antibiotika verabreicht und supportivtherapeutische Maßnahmen durchgeführt werden müssen, iii) die Verweildauer im Krankenhaus kürzer ist und iii) insgesamt weniger Kosten verursacht werden (41, 42).

Die Hochdosischemotherapie selbst besteht aus der alternierenden Gabe weniger, nicht kreuzresistenter Zytostatika, deren Dosierung lediglich durch die Organtoxizität begrenzt ist und die zu der gewünschten, irreversiblen Zerstörung des myelopoetischen Systems führt.

In der Lymphombehandlung kommen verschiedene Hochdosis-Protokolle zum Einsatz, die sich durch die verwendeten Substanzen bzw. die Durchführung einer Ganzkörperbestrahlung unterscheiden. Das zurzeit am häufigsten verwendete Schema ist BEAM und besteht aus i) Carmustin $300\text{mg}/\text{m}^2$ an Tag -7, ii) 2x Cytosin-Arabinosid $200\text{mg}/\text{m}^2$ an Tag -6 bis -3, iii) 2x Etoposid $100\text{mg}/\text{m}^2$ an Tag -6 bis -3 und iii) Melphalan $140\text{mg}/\text{m}^2$ an Tag -2. Im Anschluss an die Hochdosistherapie werden die zuvor gewonnenen, autologen Stammzellen infundiert. Deren Wachstum wird durch die Gabe von G-CSF beschleunigt, was die Zeit der Leukozytopenie verkürzen soll. Der Zeitpunkt der Stammzellreinfusion liegt möglichst kurz nach Verabreichung der Hochdosistherapie. Sobald die direkte zytotoxische Wirkung der Hochdosistherapie abgeklungen ist, werden die Stammzellen reinfundiert, damit die den Patienten gefährdende Phase der Panzytopenie/Agranulozytose möglichst rasch überwunden wird. Dies verringert die Rate an Komplikationen (Infektion, Blutung, Herz-Kreislaufversagen).

Philip et al. fanden 1995 in einer ersten vergleichenden Studie zwischen konventionell und hochdosistherapierten Patienten mit einem Non-Hodgkin-Lymphom, sowohl eine verbesserte Ansprechrate (44% vs. 84%), als auch eine nach 5 Jahren signifikant erhöhte Gesamtüberlebensrate (29). In einer vergleichenden

Studie von 8 Zyklen CHOP vs. Hochdosistherapie (BEAM) mit autologer Blutstammzelltransplantation bei Patienten mit einem aggressiven Non-Hodgkin-Lymphom, zeigte sich mit einem 5-Jahres-Überleben von 71% vs. 56% ein signifikanter Vorteil für die Hochdosis-Gruppe (37).

Follikuläre Lymphome

In verschiedenen Phase-II-Studien erzielte die myeloablative Hochdosistherapie, mit anschließender autologer peripherer Blutstammzelltransplantation, ein längeres krankheitsfreies Intervall und führte, in einer kürzlich publizierten Metaanalyse, auch zu einem verlängerten Gesamtüberleben (139). In einer kleinen randomisierten Studie wurden diese signifikant verbesserten Überlebensraten nach myeloablativer Konsolidierung bestätigt, allerdings hatte keiner der Patienten zuvor den Antikörper Rituximab erhalten (140). In drei großen Studien wurde die Rolle der autologen Blutstammzelltransplantation in der Primärtherapie des follikulären Lymphoms untersucht: i.) In der GLSG-Studie wurde nach zytoreduktiver Chemotherapie mit CHOP eine dosisintensivierte Konsolidierung (Cyclophosphamid mit Ganzkörperbestrahlung und autologer Blutstammzelltransplantation) mit einer konventionellen IFN- α -Erhaltungstherapie verglichen. Bereits frühzeitig zeigte sich eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Intervalls nach Hochdosistherapie (64,7% vs. 33,3% nach fünf Jahren). Das Gesamtüberleben ist noch nicht beurteilbar (6). ii) In einer ähnlichen französischen Studie führte die myeloablative Konsolidierung ebenfalls zu einem signifikant verlängerten progressionsfreien Überleben (60% vs. 48%). Aufgrund einer Alkylanzien beinhaltenden Induktionstherapie (CHVP: Cyclophosphamid, Doxorubicin, Etoposid, Prednison) wurde allerdings eine deutlich höhere Rate von sekundären Neoplasien nach der Hochdosis beobachtet, so dass das Gesamtüberleben in beiden Studienarmen vergleichbar war (141). iii) Dagegen führte in der Studie der GELA-Gruppe die Dosisintensivierung zu keiner verbesserten Überlebensrate (142). Die Ursache dieser unterschiedlichen Ergebnisse ist bisher unklar.

Zusammenfassend weisen die bisher durchgeführten Studien auf eine höhere Rate kompletter Remissionen und ein verlängertes progressionsfreies Überleben nach der Hochdosistherapie. Bezüglich des Gesamtüberlebens ergibt sich allerdings bisher kein eindeutiges Bild. Die Gefahr ein sekundäres Myelodysplastisches Syndrom zu induzieren liegt nach CHOP bei 1,3% nach fünf Jahren. Daher sollte die konsolidierende Hochdosistherapie im Rahmen der Erstlinientherapie nur in kontrollierten Studien durchgeführt werden. Aktuelle Studien prüfen, ob eine vorangehende Immunchemotherapie (in vivo-Purging) und eine anschließende Erhaltungstherapie mit Rituximab erstmals, auch in fortgeschrittenen Stadien follikulärer Lymphome, ein kuratives Therapiekonzept ermöglichen.

Bei Patienten mit einem follikulären Non-Hodgkin-Lymphom bleibt somit ein chemosensibles Rezidiv die einzige bisher gesicherte Indikation für eine Hochdosistherapie mit autologer Blutstammzelltransplantation.

Großzellige Lymphome

Je nach Risikokonstellation erleiden 25 bis 40% der Patienten ein Rezidiv, obwohl sie nach der Primärtherapie eine komplette Remission erreicht hatten. Innerhalb der ersten zwei Jahre nach Abschluss der Primärtherapie treten über 90% dieser Rezidive auf. Auch bei Patienten mit einem Rezidiv hängt die Prognose von den Prognosekriterien nach dem International Prognostic Index ab (23). Ebenso wie die Dauer der vorausgegangenen Remission ist auch das Ansprechen auf eine konventionelle Salvage-Therapie von prognostischer Bedeutung. Grundsätzlich sollte

bei allen Patienten mit Rezidiv eines großzelligen Lymphoms eine Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation angestrebt werden. Die Vorteile einer Hochdosistherapie wurden unter anderem in der internationalen Parma-Studie gezeigt (29). Dort lagen die Response-Raten bei 84% nach Hochdosistherapie vs. 45% nach konventioneller Salvage-Therapie. Bei einer Nachbeobachtungszeit von fünf Jahren lag das Gesamtüberleben im Hochdosis-Arm bei 53% vs. 32% im konventionellen Arm (29). Der Einsatz einer Hochdosistherapie ist in Einzelfällen auch bei Patienten möglich, die älter als 60 Jahre sind (23). Jedoch ist zu berücksichtigen, dass in zunehmendem Alter erhöhte therapieassoziierte Toxizitäten und Mortalitäten auftreten. Auch wenn eine Hochdosistherapie geplant ist, sollte zunächst eine intensive konventionelle Chemotherapie über zwei bis vier Zyklen verabreicht werden, um die Tumorlast zu reduzieren und das Ansprechen auf die Chemotherapie beurteilen zu können. Dafür geeignete Schemata sind DHAP, Dexamethason-BEAM, ESHAP und ICE. Bei CD20-positiven Lymphomen sollte eine Kombination mit Rituximab erfolgen. Eine platinhaltige Chemotherapie (ICE vs. DHAP) mit autologer Blutstammzelltransplantation wird in der internationalen CORAL-Studie geprüft. In einer Zwischenauswertung von 100 randomisierten Patienten zeigte sich ein Gesamtansprechen von 61% (143). Geeignete Schemata für eine Konditionierung sind BEAM oder CVP. Die Kombination aus hochdosiertem Cyclophosphamid und Ganzkörperbestrahlung, wie sie bei den indolenten Lymphomen eingesetzt wird, erwies sich in einer retrospektiven Studie der spanischen GELTAMO-Gruppe einer reinen Chemotherapie-konditionierung mit BEAM, BEAC oder CVP als unterlegen (144). Etwa 50% aller Patienten mit einem Rezidiv erreichen mit einem der beschriebenen Therapieansätze eine lang anhaltende Remission.

4.4 Monoklonale Antikörper in der Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome

Monoklonale Antikörper sind spezifische, in der Regel gentechnisch hergestellte Immunglobuline mit einer spezifischen Affinität gegen eine definierte Zielstruktur (Antigen). Als erstes binden die Antikörper an die zellständigen Antigene (Opsonierung). Dann erfolgt der Abbau der Zielzellen, sowohl durch Prozesse, die direkt über die Antikörperwirkung vermittelt werden, als auch über Prozesse, die eine Aktivierung von Effektorzellen bewirken. Die Effektorzellen induzieren an der Zielzelle eine komplementabhängige Zytolyse.

Die Vorteile der Antikörpertherapie gegenüber den anderen Therapieformen liegen in der Spezifität der Therapie, sowie deren zellzyklusunabhängigen Wirkung. Das bedeutet, dass sich die Lymphomzellen nicht in der Proliferationsphase befinden müssen.

Einer der bekanntesten monoklonalen Antikörper ist der anti-CD20 Antikörper Rituximab (MabThera®, Rituxan®). Rituximab hat die Therapieoptionen, Remissionsraten und Überlebenszeiten bei den Non-Hodgkin-Lymphomen maßgeblich positiv beeinflusst. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Verabreichung, Wirksamkeit und Toxizität von Rituximab als Erhaltungstherapie nach Hochdosischemotherapie und anschließender autologer peripherer Blutstammzelltransplantation bei Patienten mit einem B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom.

4.4.1 Hintergrund zu Rituximab (anti-CD20)

Rituximab ist ein gentechnisch hergestellter, monoklonaler chimärer Antikörper, „ein glykosyliertes Immunglobulin“ der Sorte IgG1, welcher zu 70% aus menschlichen und zu 30% aus Mausanteilen besteht. Er ist gegen das phosphorylierte Transmembran-Protein CD20 gerichtet, das auf reifen und späten Vorstufen der B-Zellen exprimiert wird. CD20 wird nicht von Stammzellen, prä-prä-B-Zellen und nicht mehr von ausdifferenzierten Plasmazellen exprimiert. Es gibt Hinweise darauf, dass CD20 als Komponente eines Signalvermittlungskomplexes bei der Regulation der B-Zell Aktivierung und des B-Zell Wachstums, sowie des transmembranären Calcium-Flusses eine Rolle spielt (145, 146). Da nach einer Antikörper-Bindung an das CD20-Epitop dieses weder in die Zelle eingeschleust, noch ins Blut abgegeben oder anderweitig moduliert wird, scheint CD20 besonders gut als Epitop für eine Immuntherapie geeignet (43).

Rituximab ist ein gentechnisch hergestelltes IgG1 κ Immunglobulin, das aus den variablen Regionen (Fv) eines murinen anti-CD20 Antikörpers und der konstanten Region des humanen IgG1 κ (Fc) hergestellt wird (siehe auch Abb. 1). Der Antikörper wird in einer Zellkultur aus Säugetierzellen (Ovarialzellen des chinesischen Hamsters) hergestellt und durch Affinitäts- und Ionenaustauscher-Chromatographie gereinigt.

Sensitivität der Zellen für die komplementabhängige Zytotoxizität und der Expression von CD20 im Verhältnis zum Produkt der Expression der komplement-regulierenden Proteine CD46, CD55 und CD59 ermittelt werden (152).

Im Gegensatz zu obigen Erkenntnissen konnte bei einer Studie an Lymphomzellen von 29 Patienten mit einem follikulären Non-Hodgkin-Lymphom kein Zusammenhang zwischen der Expression von CD46, CD55 und CD59, einer Kombination zweier oder aller drei Marker und dem klinischen Therapieerfolg der Patienten nachgewiesen werden (153).

Bei Manches et al. korrelierte das Ausmaß der komplementabhängigen Zytotoxizität der verschiedenen histologischen Subtypen mit dem unterschiedlichen Ansprechen auf Rituximab (152).

Welche Bedeutung der Expression von CD20, CD46, CD55 und CD59 bei der Sensitivität von Lymphomzellen für die komplementabhängige Zytotoxizität zukommt und ob die Expressionsdichte dieser Marker dazu beitragen kann, die Unterschiede im klinischen Ansprechen auf die Therapie, zumindest teilweise, zu erklären, ob die Marker somit einen prädiktiven Wert für den Erfolg der Therapie besitzen, ist bisher nicht vollständig geklärt.

4.5.2.2 Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität

Nach der Bindung von Rituximab an die CD20 Moleküle der Zielzellen, kann durch eine Wechselwirkung der humanen Fc-Region des Antikörpers und der Fc-Rezeptoren humaner Effektorzellen wie Makrophagen und NK-Zellen eine Lyse der markierten Zielzelle eingeleitet werden.

Mehrere Studien zeigten, dass die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität ein weiterer wichtiger Wirkungsmechanismus von Rituximab ist, die im Gegensatz zur komplementabhängigen Zytotoxizität, bei fast allen CD20 positiven Zellen in vergleichbarem Ausmaß nachweisbar war (150, 152, 159, 160).

4.5.2.3 Induktion von Apoptose

Nachdem die antikörperabhängige zelluläre und komplementabhängige Zytotoxizität ausgeschaltet wurden, inkubierten mehrere Studiengruppen CD20 positive Zellen mit Rituximab und konnten die Induktion von Apoptose beobachten (45, 46). Nach der Bindung des Antikörpers an die CD20 Epitope der Targetzellen kommt es zu einer Beeinträchtigung der regulären Funktion der CD20 Proteine. Dies führt an den Targetzellen zur Apoptose (151, 152, 161, 162, 163, 164, 165).

Im Vergleich zur antikörperabhängigen zellulären und komplementabhängigen Zytotoxizität war das Ausmaß der durch Rituximab induzierten Apoptose eher moderat, konnte jedoch durch Crosslinking der Zellmembranproteine verstärkt werden (152, 161, 162, 163, 164).

Flieger et al. konnten eine Korrelation zwischen der Expression von CD32 und dem Ausmaß der direkten Zytotoxizität durch Rituximab zeigen (151).

In weiteren Studien mit anderen Zelllinien konnte durch Rituximab keine Apoptose induziert werden (150, 167).

4.5.2.4 Antikörperabhängige Phagozytose

Im Vergleich zu nicht opsonierten Zellen werden Rituximab markierte Zellen verstärkt phagozytiert (152). Durch inhibierende anti-CD32 Antikörper konnte die antikörperabhängige Phagozytose reduziert werden, was die Bedeutung dieses Oberflächenmarkers für die antikörpervermittelte Phagozytose zeigte (152).

4.5.2.5 Hemmung der Proliferation von Zelllinien

Durch in vitro Untersuchungen von Zelllinien konnte die Hemmung der Proliferation der antikörpermarkierten Targetzellen als ein weiterer Wirkungsmechanismus von Rituximab beobachtet werden (167). Durch die Bindung von anti-CD20 kam es, vorwiegend in der G1-Phase (150), zu einem Stopp des Zellzyklus (162). Dieser Effekt war in der Studie zwar an B-Zelllinien, nicht jedoch an Lymphom-Zelllinien nachweisbar (150).

4.5.2.6 Sensibilisierung chemoresistenter, humaner B-Zell Lymphom-Zelllinien für zytotoxische Effekte bestimmter Chemotherapeutika in vitro

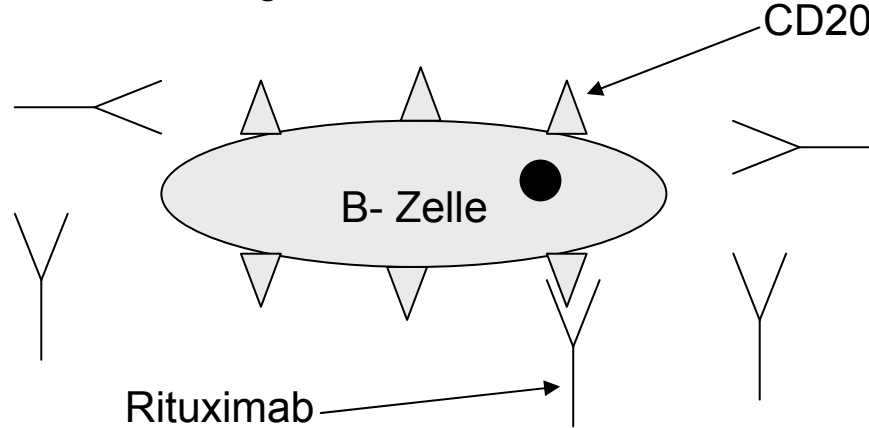
Durch vorherige Inkubation von Lymphomzellen mit Rituximab konnte in vitro die benötigte Dosis verschiedener Zytostatika, die benötigt wurde um bei einem definierten Anteil von Lymphomzellen Apoptose zu induzieren, signifikant reduziert werden (154, 167). In einer anderen Studie konnte nach Zugabe von Rituximab bei einer zuvor resistenten Zelllinie doch noch erfolgreich eine Apoptose induziert werden (168). Die durch Rituximab induzierte Inhibition von IL-10 führte zu einer Down Regulation von bcl-2 und als Folge dessen zu einer Sensibilisierung der Zellen für das eingesetzte Zytostatikum (167).

4.5.2.7. Klinische Studien zur Chem osensibilisierung von Lymphomzellen durch Rituximab

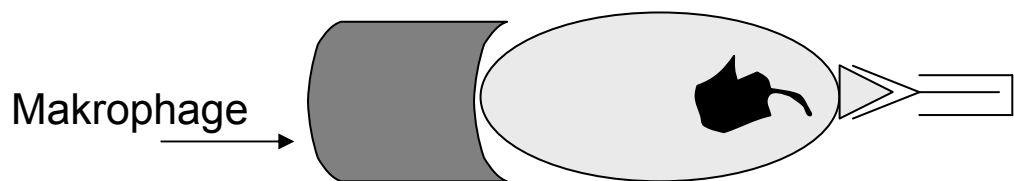
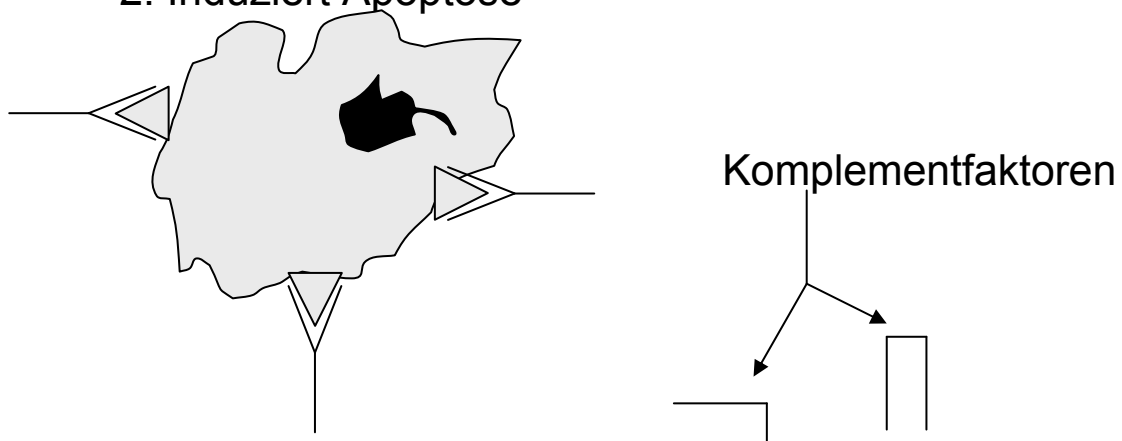
In einer randomisierten klinischen Studie an fast 400 älteren Patienten mit einem diffus großzelligen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom (DLBCL) konnte die Überlegenheit einer Kombination von Chemotherapie mit Rituximab (R-CHOP) gegenüber einer Chemotherapie ohne Rituximab (CHOP) gezeigt werden (57). Die detaillierte Auswertung zeigte, dass Rituximab bei bcl-2 positiven Patienten die Wahrscheinlichkeit eines BCL-2 assoziierten Therapieversagens verringern kann. Bei BCL-2 positiven Patienten wurde durch R-CHOP im Vergleich zu Patienten, die CHOP ohne Rituximab erhielten, eine signifikant bessere Gesamtansprechrate (77% vs. 65%), ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben (70% +/- 7% vs. 54% +/- 9%) und ereignisfreies Überleben (58% +/- 8% vs. 35% +/- 8%) erreicht. Der Benefit BCL-2 negativer Patienten von Rituximab bezüglich des Gesamtüberlebens war gering. Das ereignisfreie Überleben BCL-2 negativer Patienten stieg auf 40% +/- 14% nach CHOP und auf 60% +/- 12% nach R-CHOP, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (169).

Abbildung 2 Rituximab Wirkmechanismen

1. An das CD20 Antigen bindender monoklonaler AK



2. Induziert Apoptose



3. Induziert Komplement als auch Effektorzell vermittelte Lyse

4.5.3 Toxizitätsprofil von Rituximab und Rituximab-Dosis

Eine Phase-I-Studie prüfte an Gruppen von je 3 Patienten, die an einem rezidierten niedrig malignen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom erkrankt waren, die einmalige intravenöse Gabe von Rituximab als Monotherapie in einer Dosis von 10, 50, 100, 250 und 500mg/m² Körperoberfläche. Als Symptome traten auf: Fieber (n=5), Übelkeit (n=2), Rigor (n=1), orthostatische Hypotension (n=2), Bronchospasmus (n=1) und Thrombozytopenie (n=1). Auftretende therapieassoziierte Symptome korrelierten mit der Menge der zirkulierenden CD20 positiven Zellen im peripheren Blut. Während der dreimonatigen Nachfolge Untersuchungen wurden keine signifikanten Nebenwirkungen beobachtet. Die Analyse von Komplementfaktor C3, Immunglobulinen, Thrombozyten, Neutrophilen Granulozyten und T-Zellen zeigte keine signifikanten Veränderungen. CD20 positive B-Zellen wurden schnell (24-72h) und in den meisten Fällen für eine Dauer von mindestens zwei bis drei Monaten aus dem peripheren Blut depletiert. Eine Bindung des Antikörpers an die Tumorzellen konnte in Biopsien zwei Wochen nach der Rituximab Infusion nachgewiesen werden. Nach Gabe von 100, 250 und 500mg/m² Körperoberfläche betrug die Halbwertszeit des Antikörpers 4,4 Tage (Range 1,6 bis 10,5 Tage). Bei 6 von 9 Patienten waren nach mehr als 14 Tagen noch Rituximab Spiegel >10µg/ml messbar. Bei 6 der 15 Patienten war eine Tumorregression nachweisbar (148).

In einer anschließenden Studie wurden die Sicherheit, weitere pharmakokinetische Daten und die biologischen Effekte wiederholter Rituximab Gaben in unterschiedlichen Dosen evaluiert. Drei Patienten erhielten 4x125mg/m², 7 Patienten 4x250mg/m² und 10 Patienten 4x375mg/m² Körperoberfläche. Die aufgetretenen Nebenwirkungen bestanden aus Fieber, Asthenie, Schüttelfrost, Übelkeit, Hautausschlag und Urtikaria I. bis II. Grades. Die Halbwertszeit im Serum und die maximale Serumkonzentration nahmen nach mehrmaligen Rituximab Gaben von 375mg/m² zu (33,2 Stunden nach der ersten vs. 76,6 Stunden nach der vierten Gabe). Von 18 auswertbaren Patienten erreichten 6 eine partielle Remission. Fünf Patienten zeigten ein über 25%iges Ansprechen und 7 Patienten erlitten einen Progress (170).

In einer Dosisescalierungsstudie erhielten alle 50 Patienten mit einer chronisch lymphatischen Leukämie oder einer anderen reifen B-Zell Leukämie 375mg/m² Körperoberfläche als Erstdosis. Die folgenden drei Dosen wurden auf bis zu 2250mg/m² eskaliert. Das Ansprechen auf Rituximab korrelierte sowohl mit dem histologischen Subtyp als auch mit der verabreichten Dosis (171).

Die in den Studien beobachteten Nebenwirkungen von Rituximab, in einer Dosis von meist 375mg/m² bei Patienten mit niedrig malignen Lymphomen, waren in den allermeisten Fällen leicht bis mittelschwer und reversibel. Sie traten im Rahmen der ersten Infusion(en) mit Rituximab auf, nachfolgende Gaben wurden deutlich besser vertragen. Am häufigsten waren Fieber [51% der Patienten bei der Auswertung von sieben Studien mit insgesamt 354 Patienten (172) bzw. 43% bei der Zulassungsstudie (72)], Frösteln oder Schüttelfrost (33% bzw. 28%). Als weitere Nebenwirkungen traten Übelkeit, Urtikaria, Müdigkeit, Kopfschmerzen, Angioöedeme im Nasen- und Rachenbereich, Rhinitis, Erbrechen, Rötungen und Schmerzen an betroffenen Körperstellen auf. Die meisten Ereignisse sprachen auf eine Reduktion der Infusionsgeschwindigkeit bzw. kurze Unterbrechung der Infusion oder eine symptomatische Therapie gut an. Eine kleine Zahl von Patienten zeigte schwerwiegende Symptome wie Bronchospasmus oder Hypotension. Unter einer Therapie mit Rituximab ist das Auftreten eines Tumorlysesyndroms beschrieben.

Die Rate an Infektionen scheint unter einer Therapie mit Rituximab nicht erhöht. Der Therapiebeginn führt zu einer B-Zell Depletion, die Immunglobulinkonzentrationen im Serum sinken jedoch erst viel später, da die Plasmazellen auf ihrer Zelloberfläche kein CD-20 Antigen exprimieren. Etwa 6 bis 12 Monate nach Beendigung der Therapie normalisieren sich die B-Zellen wieder. Die absinkenden Immunglobulin-Spiegel scheinen ebenfalls nicht mit einer erhöhten Nebenwirkungsrate einherzugehen (48). Die auftretenden hämatologischen Toxizitäten waren meist leicht und reversibel (57, 173).

Nach kombinierter Gabe von Chemotherapie mit Rituximab waren die aufgetretenen Toxizitäten, neben Rituximab assoziiertem Fieber oder Schüttelfrost, weitgehend auf die bekannten Nebenwirkungen der jeweiligen Chemotherapeutika beschränkt.

Auch nach der wiederholten Gabe von Rituximab entsprachen die Nebenwirkungen denen, die bereits im Rahmen der Erstbehandlung mit dem Antikörper auftraten (71). Unter der Therapie kommt es nicht verstärkt zum Auftreten von Anti-Maus oder Anti-Mensch Antikörpern oder zur Proliferation CD20 negativer Zellklone (72).

Zusammenfassend standen die meisten der beschriebenen Nebenwirkungen in direktem Zusammenhang mit der ersten Infusion des Antikörpers und führten zu einer leichten Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems. In seltenen Fällen kann die Infusion von Rituximab allergische Reaktionen bis hin zu einem anaphylaktischen Schock auslösen.

Die zur Verfügung stehenden Studiendaten zeigen, ebenso wie die hier vorliegende Arbeit, die sehr gute Wirksamkeit und Verträglichkeit von Rituximab, sowohl als Zusatzpräparat einer Kombinationschemotherapie, als auch als alleinige Erhaltungstherapie. Die Gabe führt zur Vermeidung des Krankheitsprogresses ohne dadurch hohe Nebenwirkungen hervorzurufen oder die Lebensqualität der Patienten negativ zu beeinträchtigen.

4.5.4 Rituximab in der Primärtherapie

In der Primärtherapie von follikulären Lymphomen in einem fortgeschrittenen Stadium kann durch die Chemotherapie nach dem CHOP-Schema eine Rate an kompletten oder partiellen Remissionen von 87% erreicht werden. Die zusätzliche Gabe des anti-CD20 Antikörpers Rituximab führte in nahezu 100% zu einer kompletten oder zumindest partiellen Remission. Darüber hinaus konnte die Dauer der Remission zusätzlich noch deutlich verlängert werden.

Marcus et al. (53) demonstrierten, dass der Behandlungserfolg bei Patienten mit zuvor unbehandelten, fortgeschrittenen follikulären Lymphomen, durch die Addition von Rituximab zu CVP signifikant verbessert wird. Die Toxizität wird hierbei nicht gesteigert. Darüber hinaus wurde Rituximab in Kombination mit Bendamustin (54) und Fludarabin (55) als hocheffektiv und gut verträglich beschrieben.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch die Addition von Rituximab in der Behandlung von high grade Lymphomen das Therapieergebnis verbessert wird.

Die GELA Gruppe randomisierte 399 zuvor unbehandelte Patienten mit diffus großzelligen B-Zell Lymphomen, welche dann entweder CHOP oder CHOP in Kombination mit Rituximab (R-CHOP) erhielten. Es zeigte sich ein signifikanter Vorteil für die Rituximab Gruppe (57). Dort lag die Rate von kompletten Remissionen bei 76% vs. 63% in der Gruppe ohne Rituximab.

4.5.5 Rituximab in der Rezidivtherapie

Bei rezidierten indolenten Lymphomen konnte durch den Einsatz von Rituximab als Monotherapie eine 48%ige Ansprechrates erreicht werden. In einer Studie der Deutschen Studiengruppe niedrigmaligner Lymphome konnten Forstpointner et al. bei Patienten mit rezidierten und refraktären follikulären- und Mantelzelllymphomen zeigen, dass die Addition von Rituximab, zu einer Kombination von Fludarabin, Cyclophosphamid und Mitoxantron (FCM), eine signifikante Zunahme der Ansprechrates und Verlängerung des Überlebens bewirkt (22). So konnte eine alleinige Chemotherapie nach dem FCM-Schema in dieser Situation Ansprechrates von 58% und komplette Remissionen von 13% erreichen. Durch die zusätzliche Gabe von Rituximab konnte die Ansprechrates auf 83% und die Rate kompletter Remissionen auf 35% gesteigert werden (22, 56).

Angesichts der bisherigen Studienergebnisse ist die Durchführung einer Hochdosistherapie nur in der Behandlung rezidivierter aggressiver Non-Hodgkin-Lymphome fest etabliert und sollte nach den Kriterien der European Group of Blood and Marrow Transplant (EBMT) und der Konsensusgruppe bei Patienten unter 60 Jahren mit dem ersten Rezidiv eines aggressiven Lymphoms durchgeführt werden (29, 39, 40).

4.5.6. Rituximab in der Erhaltungstherapie

Erhaltungstherapie bedeutet, dass eine Substanz regelmäßig nach Erreichen einer kompletten bzw. partiellen Remission über einen längeren Zeitraum verabreicht wird. Das Ziel ist verbliebene vitale Tumorzellen, als Korrelat einer minimalen Resterkrankung, daran zu hindern erneut zu proliferieren und einen Rückfall zu verursachen. Sie sollte so nebenwirkungsarm wie möglich, leicht zu verabreichen, einfach zu monitoren und hoch wirksam sein. Da die Patienten, über die Zeit gesehen, eine hohe Dosis verabreicht bekommen, sollten keine kumulativen Toxizitäten auftreten.

Mit der Erhaltungstherapie soll sowohl die Zeit der Remission verlängert, als auch eine minimale Resterkrankung therapiert werden, wobei dem Patienten eine möglichst normale Lebensführung ermöglicht werden sollte. Im optimalen Fall wirkt die Erhaltungstherapie kurativ.

Von den insgesamt existierenden verschiedenen Rituximab Erhaltungstherapieschemata konnten alle das progressionsfreie Überleben verlängern. Für eine Aussage über das Gesamtüberleben sind die Zeiträume der Nachbeobachtungen bisher zu kurz, obwohl erste Zwischenauswertungen sehr viel versprechend sind.

In einer von Foran et al. durchgeführten multizentrischen Studie erhielten 70 zuvor behandelte Patienten mit einem follikulären Lymphom eine Erhaltungstherapie mit Rituximab gemäß dem Standardschema (375mg/m²/Woche über 4 Wochen). Nachfolgende Untersuchungen wurden nach einem und nach zwei Monaten durchgeführt. Dreizehn von 21 (62%) evaluierbaren „PCR-positiven“ Patienten wurden einen Monat nach Therapieende „PCR-negativ“ für den Nachweis der Translokation t(14;18) im peripheren Blut und/oder im Knochenmark. Allerdings korrelierte das Ergebnis der PCR nicht mit dem klinischen Ansprechen der Patienten (74).

In der Rituximab Zulassungsstudie (72), einer multizentrischen Phase-II-Studie, der so genannten „pivotal-Trial“, wurde Rituximab 166 Patienten mit rezidierten

indolenten Lymphomen in einer Dosis von 375mg/m^2 jede Woche über 4 Wochen verabreicht. Es wurde eine Ansprechrate von 48% mit 6% kompletten Remissionen erzielt, die mediane Zeit bis zu einem Progress betrug 13 Monate. Das Nebenwirkungsprofil erwies sich als sehr günstig und bestand bei 13% der Patienten aus infusionsbedingten III. bis IV. gradigen akuten Reaktionen (Schüttelfrost, Fieber, Urtikaria, Luftnot, Blutdruckabfall), die als pseudoallergisch eingestuft wurden.

Mehrere Studien verglichen bei Patienten mit rezidierten Lymphomen oder bei der Erhaltung der ersten Remission eine konventionelle Chemotherapie mit einer Hochdosistherapie und autologen Blutstammzelltransplantation (58, 37, 6). Obwohl in diesen Studien bereits ein signifikanter Vorteil für die transplantierten Patienten gezeigt werden konnte, war es nötig, das Therapieergebnis dieser Patienten weiter zu verbessern. Zu diesem Zeitpunkt war die Wertigkeit einer Erhaltungstherapie mit Rituximab unklar. Es existierten verschiedene Therapieansätze. Das Düsseldorfer Konzept, mit dem sich die hier vorliegende Arbeit im Weiteren befasst, beschränkte sich auf die Durchführung einer Hochdosistherapie mit autologer Blutstammzelltransplantation und anschließender Erhaltungstherapie mit Rituximab.

In diesem Kontext verglichen auch Brugger (59) und Horwitz (60), bei indolenten und aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen, den Nutzen von Rituximab als Erhaltungstherapie nach autologer Blutstammzelltransplantation in vierwöchentlichen Gaben, mit dem Nutzen von Rituximab in achtwöchentlichen Gaben nach vorheriger Gabe der Rituximab Standardtherapie (61). Besonders wurde die Effektivität von Rituximab in der Elimination einer minimalen Resterkrankung beachtet. Beide Studien zeigten neben der guten Verträglichkeit ein verlängertes ereignisfreies Überleben.

Hainsworth (62) et al. führten bei zuvor unbehandelten Patienten mit einem indolenten Non-Hodgkin-Lymphom eine Rituximab Monotherapie durch. Diese zeigte, dass sowohl das Gesamtüberleben, als auch die Rate erreichter kompletter Remissionen nach Addition von Rituximab stiegen, ohne größere therapieassoziierte Nebenwirkungen hervorzurufen.

Der Studienansatz von Gordan et al. (63), bei Patienten mit zuvor behandelten indolenten oder aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen hatte als Ziel, für jeden Patienten ein individuelles Behandlungskonzept zu finden. Der Serum Rituximab Spiegel sollte nicht unter $25\mu\text{g/ml}$ sinken. Dieser Wert war bereits zuvor als durchschnittliche Serumkonzentration 3 Monate nach der letzten Rituximab Infusion ermittelt worden. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass auch 5 Monate nach der letzten Gabe des Antikörpers, die Serumkonzentration über dieser Marke lag. Beide Studien erzielten gute Ansprech- und progressionsfreie Überlebensraten.

In allen bisher durchgeführten Phase-III-Studien war bei jenen Patienten, die in den Rituximab Erhaltungstherapiearm randomisiert wurden, das ereignisfreie Überleben verlängert. So konnten Hainsworth et al. (64) bei Patienten mit rekurrenten indolenten oder follikulären Lymphomen zeigen, dass die kontinuierliche Erhaltungstherapie mit Rituximab einer Weiterbehandlung erst nach Auftreten eines Progresses überlegen ist. Das progressionsfreie Überleben in dieser Studie betrug 31,1 vs. 7,4 Monate.

Ähnliche Ergebnisse fanden auch Ghielmini et al. (61). Jene randomisierten Patienten mit einem follikulären Lymphom, die Rituximab Gaben nach dem Standard Schema erhalten hatten, in zwei Gruppen: einen Beobachtungsarm und einen Erhaltungstherapiearm. Dieser bestand aus einem verlängerten Behandlungsschema mit $375\text{mg/m}^2/\text{Woche}$ über 4 Wochen in achtwöchentlichen Intervallen (Monat 3, 5, 7 und 9). Das ereignisfreie Überleben war sowohl bei den zuvor behandelten (23 Monate vs. 12 Monate) als auch bei den unbehandelten (36 Monate vs. 19 Monate)

follikulären Lymphomen signifikant verlängert. Bei den Mantelzelllymphomen konnte dieser Vorteil nicht nachgewiesen werden.

Die ECOG Gruppe randomisierte 237 zuvor unbehandelte Patienten mit einem follikulären Lymphom nach Gabe von CVP-Chemotherapie in einen Beobachtungsarm und einen Erhaltungstherapiearm mit Rituximab. Auch hier war das progressionsfreie Überleben in der Rituximab Gruppe signifikant verlängert (56% vs. 33%).

Van Oers et al. (65) fanden ähnliche Daten in der Behandlung von Patienten mit rekurrenten follikulären Lymphomen. Nach der Gabe von CHOP oder R-CHOP (CHOP plus Rituximab 375 mg/m²/Woche über 4 Wochen) wurden alle Patienten, die ein Ansprechen auf die Therapie zeigten, in 2 Gruppen randomisiert. Einen Beobachtungsarm und einen Erhaltungstherapiearm, in dem Rituximab alle 3 Monate in einer Dosis von 375mg/m² verabreicht wurde. Es zeigte sich ebenfalls ein Vorteil für die mit Rituximab behandelten Patienten, das progressionsfreie Überleben lag in der Rituximab Gruppe bei 51,6 vs. 15 Monaten in der Beobachtungsgruppe.

Zusammenfassend konnte in allen diesen Studien die Wirkung von Rituximab als Therapie einer minimalen Resterkrankung und als kontinuierliche Rezidivprophylaxe belegt werden.

5. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Toxizität und Wirksamkeit einer Erhaltungstherapie mit dem anti-CD20 Antikörper Rituximab in vierwöchentlichen Abständen (Median 10, Rang 4-37), die einer autologen peripheren Blutstammzelltransplantation folgt, zu erfassen, sie zu analysieren, zu quantifizieren und den Ergebnissen anderer Studien gegenüberzustellen.

In einer retrospektiven monozentrischen Studie werteten wir dazu die Daten von 153 Patienten mit einem B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom der Stadien II bis IV aus, bei denen in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums in Düsseldorf zwischen Januar 1991 und Dezember 2004 eine Hochdosistherapie mit nachfolgender Transplantation autologer Stammzellen durchgeführt wurde.

Seit der Einführung des monoklonalen Antikörpers Rituximab im Jahre 1998 wurden 69 Patienten transplantiert.

29 Patienten dieser Gruppe erhielten im Anschluss an die Hochdosistherapie eine Erhaltungstherapie mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab.

6. Material und Methoden

6.1 Patientengruppe

Als Grundlage für diese Arbeit wurde retrospektiv der Krankheitsverlauf von insgesamt 153 Patienten erfasst, bei denen in der Zeit vom 01.01.1991 bis zum 31.12.2004 eine autologe Blutstammzelltransplantation auf Grund eines Non-Hodgkin-Lymphoms durchgeführt wurde. Alle Patienten erhielten in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie der Universitätsklinik Düsseldorf eine Hochdosistherapie mit anschließender Transplantation autologer oder allogener Stammzellen.

Ausgewertet wurden die Daten einer Gruppe von 29 Patienten mit einem B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom der Stadien II bis IV, denen nach der Hochdosisschemotherapie und autologen peripheren Blutstammzelltransplantation Rituximab als Erhaltungstherapie verabreicht wurde.

Gemäß der Klassifikation der World Health Organisation (WHO) für neoplastische Erkrankungen des hämatopoetischen oder lymphatischen Systems (siehe Tabelle 1) waren 16 Patienten an einem indolenten Non-Hodgkin-Lymphom (follikuläres Lymphom: n=13; Immunozytom: n=3) und 13 Patienten an einem aggressiv, reifzelligem Non-Hodgkin-Lymphom (diffus großzelliges B-Zell Lymphom: n=7; Burkitt-Lymphom: n=1; mediastinales B-Zell Lymphom n=1; Mantelzelllymphom n=4) erkrankt. Eine detaillierte Patientencharakteristik ist in Tabelle 5 dargestellt.

Alle Patienten wurden über das individuelle Behandlungsprotokoll aufgeklärt. Ihre Behandlung erfolgte gemäß etablierten Protokollen der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums in Düsseldorf.

Wir konnten zeigen, dass eine Erhaltungstherapie mit Rituximab nach Hochdosisschemotherapie und autologer Blutstammzelltransplantation nach dem Düsseldorfer Konzept sicher ist, gut vertragen wird und mit wenigen Nebenwirkungen assoziiert ist. Sie ist in der Lage eine minimale Resterkrankung zu therapieren, sowie das Ereignisfreie- und Gesamt-Überleben bei Patienten mit einem B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom zu verlängern.

Tabelle 5 Patientencharakteristik

Anzahl der Patienten	29
Mittleres Alter, Jahre (Spanne)	50 (22-65)
Männlich	20
Weiblich	9
Histologie und Ann-Arbor-Stadium bei der Erstdiagnose	
<i>Follikuläre Lymphome</i>	13
Stadium II/III	3/3
Stadium IV	7
<i>Immunozytome 3</i>	
Stadium II/III	0/0
Stadium IV	3
<i>Aggressiv, reifzellige Lymphome</i>	9
Stadium II/III	2/3
Stadium IV	4
<i>Mantelzelllymphome 4</i>	
Stadium II/III	0/1
Stadium IV	3
Zeitpunkt der Transplantation	
Erstlinienbehandlung (indolent/aggressiv)	7/3
Zweitlinienbehandlung (indolent/aggressiv)	13/6
Vorthherapie (Median, Spanne)	
Zyklen	8 (5-19)
Anzahl verschiedener Therapien	3 (1-6)
Rituximab in Vorthherapie	26
Rituximab als Erhaltungstherapie	29

6.2 Definitionen und Remissionskriterien

Für die Einteilung der Non-Hodgkin-Lymphome wurde auf die bereits durchgeführten, histologischen Untersuchungen zurückgegriffen und deren Entität übernommen, sofern bereits nach der WHO-Klassifikation eingeteilt, bzw. anhand der Tabelle 3 in die neue WHO-Klassifikation überführt. Zur Beurteilung des Krankheitsstadiums hatte jeder Patient bereits ein komplettes Staging erhalten, welches aus körperlicher Untersuchung, kompletter Blutuntersuchung, Röntgen Thorax, Abdomen Sonographie, CT-Hals, -Thorax und -Abdomen und einer Knochenmarkpunktion bestand. Die Einteilung der Stadien erfolgte nach der gängigen Ann-Arbor-Klassifikation (siehe Tabelle 1).

Das Ansprechen auf die Therapie wurde folgendermaßen definiert:

Partielle Remission (PR)	Tumorreduktion >50%, jedoch Nachweis vitalen Tumorgewebes
Komplette Remission (CR)	vollständige Tumorreduktion, kein Nachweis vitalen Tumorgewebes
Rezidiv (Rez)	Krankheitsprogress nach initial erreichter Remission
Primär refraktär	Tumorstadium wird von der Therapie nicht beeinflusst

Ereignisfreies Überleben (Event free survival=EFS) wurde definiert vom Tag der autologen Blutstammzelltransplantation bis zum Auftreten eines Endpunktes, wie Tod oder Rezidiv.

6.3 Einschlusskriterien

- Patienten mit der Diagnose eines B-Zell Non-Hodgkin-Lymphoms
- vorhergegangene Hochdosischemotherapie (HD) mit anschließender autologer peripherer Blutstammzelltransplantation (APBSZT)
- anhaltende komplette Remission (CR) oder zumindest partielle Remission (PR) nach der Transplantation
- Beginn der Rituximab Erhaltungstherapie spätestens 5 Monate nach der Transplantation
- Alter 18-65 Jahre
- Eastern Cooperative Oncology performance status (ECOG) von 0-1
- Adäquate hämatologische, hepatische und renale Organfunktionen
- Keine koexistierenden, schwerwiegenden Krankheiten oder Infektionen

6.4 Ausschlusskriterien

- eingeschränkter Allgemeinzustand zum Zeitpunkt der Transplantation (Karnofsky Performance Status <70%; Zubrod-/ECOG-/WHO-Skala >1)
- kein Erreichen einer CR/PR nach der autologen Blutstammzelltransplantation
- relevante Organdysfunktion
- vorherige Gabe von Rituximab als Erhaltungstherapie

6.5 Remissionsstadien

Zum Zeitpunkt der Transplantation waren 15 von 20 (75%) Patienten mit einem indolenten Lymphom und 5 von 9 Patienten (56%) mit einem aggressiven, reifzelligen Lymphom in kompletter Remission (CR).

Vor Start der Rituximab Erhaltungstherapie waren 27 Patienten in kompletter und 2 in partieller Remission (1 Immunozytom und 1 Mantelzelllymphom).

6.6 Vorthapien

In der Zeit vor der Transplantation erhielten die Patienten insgesamt 3 (Median) verschiedene Therapieregime (Spanne 1-6) mit 8 (Median) Zyklen (Spanne 5-19). Achtzehn der 20 (90%) Patienten mit einem indolenten Lymphom und 8 der 9 (89%) Patienten mit einem aggressiven Lymphom bekamen in mindestens einer der Vorthapien Rituximab in Kombination mit HAM, BEAM, CHOP oder FCM.

Eine Einteilung der Patienten nach Art der Vorthapie und der erreichten Remission in Erstlinien-, Zweitlinien- und Drittlinientherapie wurde anhand der Abbildung 3 durchgeführt.

Abbildung 3 Schema zur Einteilung der Patienten in Erstlinien-, Zweitlinien- und Drittlinientherapie

Erstlinientherapie:

I. Hochdosistherapie (HDT) gehört zur Primären Therapie:

Diagnose (Dx) → Chemotherapie → CR/PR → Hochdosistherapie

Zweitlinientherapie:

II. HDT als Salvage Therapie:

- a) Dx → Chemotherapie → CR/PR → Rückfall → Intensivierung → CR/PR → HDT
- b) Dx → Chemotherapie → refraktär → Intensivierung → CR/PR → HDT

Drittlinientherapie:

III. HDT als Therapie eines zweiten Rückfalls/Rezidivs:

Dx → Chemotherapie → CR/PR → Rückfall → Intensivierung → CR/PR → Rückfall → Chemotherapie → CR/PR → HDT

Es resultierten 10 Erstlinien- (1 indolentes und 9 aggressive Lymphome), 15 Zweitlinien- (4 indolente und 11 aggressive Lymphome) und 4 Drittlinienpatienten (1 indolentes und 3 aggressive). Eine genaue Übersicht der Lymphom-Entitäten in unserer Studie ist in Tabelle 5 dargestellt.

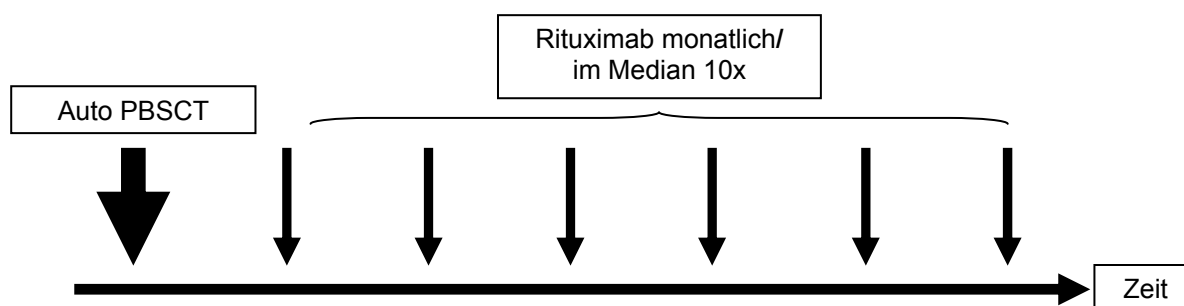
6.7 Konditionierungen

Die Konditionierungstherapie bestand bei 22 Patienten aus BEAM (Carmustin, Cytosin-Arabinosid, Etoposid und Melphalan), davon 6mal aus Rituximab plus BEAM und 7 individuellen Protokollen [Radiatio/Cyclophosphamid; TBI/Etoposid; Busulfan/Melphalan/Thiotepa; mCHOEP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Etoposid, Prednison); CBV (Cyclophosphamid, BCNU, VP16); Rituximab/CBV; Melphalan/Thiotepa].

6.8 Erhaltungstherapie

Im Median 2 Monate (Spanne 1-5) nach der Transplantation wurde der Antikörper Rituximab monatlich in einer Dosis von 375mg/m^2 in einem Median von 10 Infusionen (Spanne 4-37) als Erhaltungstherapie gegeben. Die Patienten erhielten während der Therapie mit Rituximab keine prophylaktische Antibiotikagabe. Das in Düsseldorf verwendete Therapieschema ist in Abbildung 4 dargestellt.

Abbildung 4 Schema der Erhaltungstherapie mit Rituximab, Düsseldorfer Konzept



6.9 Methoden

6.9.1 Molekulares Monitoring des Markers t(14;18) durch PCR

Chromosomale Translokationen mit Beteiligung der Immunglobulinschwerkettengene und des „B-cell-lymphoma-2“ (BCL-2) Proto-Onkogens sind wahrscheinlich die primären Ereignisse, die zusammen mit weiteren bisher nicht identifizierten genetischen Veränderungen zur Entstehung dieser Neoplasie führen (91). Bei etwa 80% der Patienten ist eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomensegmenten 14q32 und 18q21 nachweisbar (92). Dadurch kommt es zu einer Fusion des, auf Chromosom 18 lokalisierten, antiapoptotischen Gens BCL-2 mit dem, auf Chromosom 14 lokalisierten, Gen (JH-Segment) für die schwere Kette des Immunglobulins (IgH) (93).

Es sind zwei verschiedene Bruchpunktregionen innerhalb des BCL-2-Gens auf Chromosom 18 bekannt. Die erste sogenannte „Major breakpoint region“ (MBR) ist ein 150 Basenpaare großes Segment der 3' untranslatierten Region auf Exon 3 des BCL-2-Gens. Ungefähr 70% der Bruchpunkte auf Chromosom 18 sind in dieser Region anzutreffen. Der zweite Bruchpunkt ist die sogenannte „Minor cluster region“

(MCR) (94). Da beide Bruchpunkte außerhalb der kodierenden Region des BCL-2-Gens liegen, bleibt das Genprodukt trotz Vorliegen der Translokation unverändert. In seltenen Fällen können Bruchpunkte auch außerhalb von MBR und MCR nachgewiesen werden (95). Auf Chromosom 14 liegt der Bruchpunkt am 5' Ende einer der sechs JH Segmente des humanen IgH Lokus.

Diese Umstellung bringt den starken „E μ -Enhancer“ des IgH-Lokus in räumliche Nähe zum BCL-2-Promotor (96). Es wird vermutet, dass dadurch die BCL-2-Protein-Expression auf Transkriptionsebene hochreguliert wird (97). BCL-2 ist ein zellzyklusregulatorisches, Apoptose-hemmendes Protein, welches durch das Wechselspiel mit seinem Antagonisten BAX (BCL-2-assoziiertes X Protein) das Absterben und das Überleben von normalen Lymphozyten im Follikelzentrum reguliert (98). B-Zellen, die die Translokation t(14;18) tragen und somit BCL-2 überexprimieren, haben durch die Hemmung der Apoptose, einen Überlebensvorteil gegenüber normalen Zellen und akkumulieren klonal (99). Die Überexpression ist mit einer erhöhten Resistenz gegenüber einigen Zytostatika (Anthrazykline) und Kortikosteroiden verbunden (100). Noch ist nicht geklärt welche weiteren Faktoren zur Krankheitsentstehung beitragen, denn auch bei gesunden Probanden lässt sich in seltenen Fällen eine kleine Population t(14;18) positiver Zellen nachweisen (101).

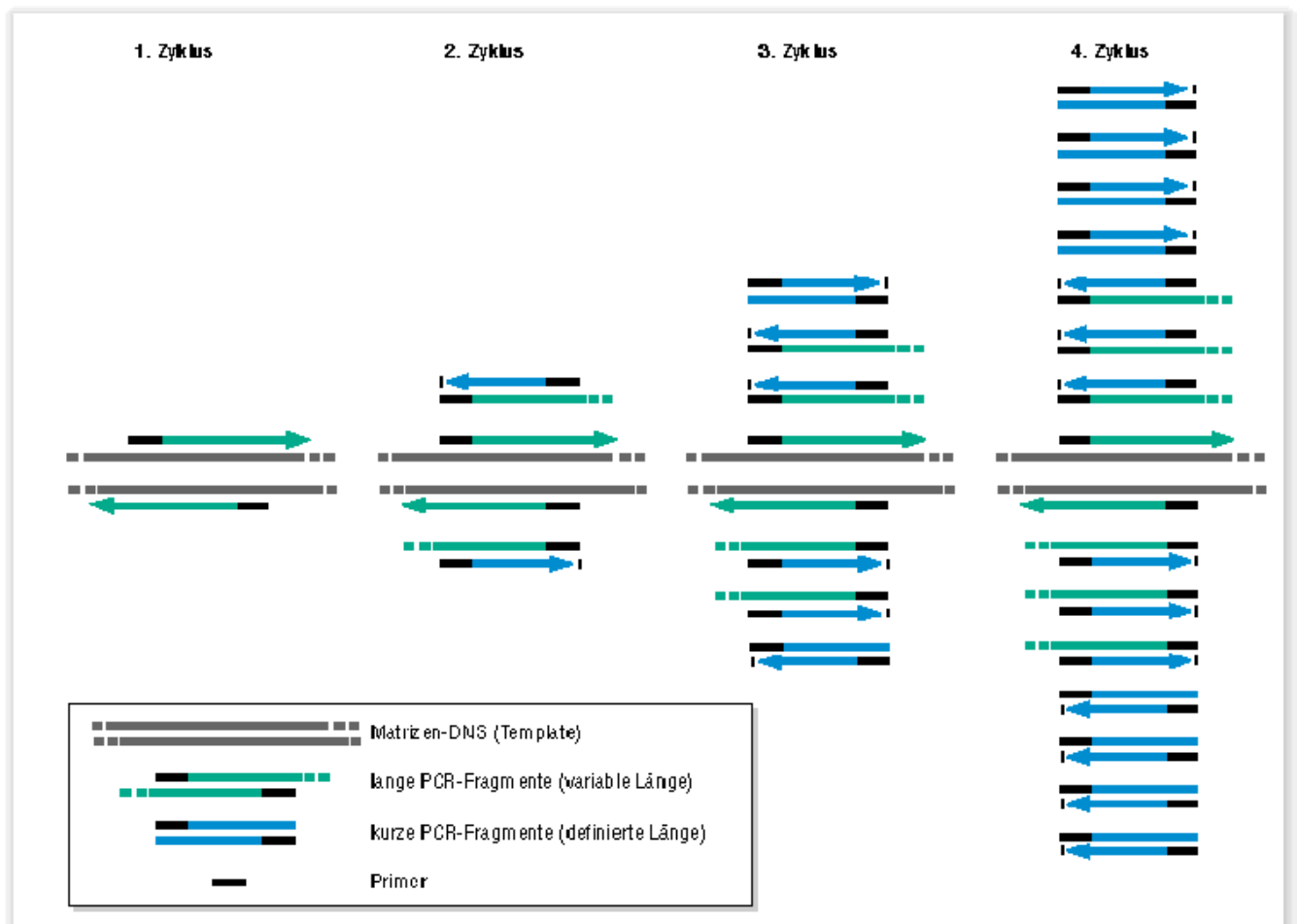
Bei den Patienten mit einem follikulären Lymphom, bei denen zu Therapiebeginn eine BCL-2-Expression als Ausdruck der t(14;18) gefunden wurde, führten wir ein molekulares Monitoring mithilfe dieses Markers in der PCR durch. Bei jedem Patienten wurden 14 (Median) (Spanne 4-25) Proben von peripherem Blut und Knochenmark untersucht. Die Analyse erfolgte durch eine quantitative real-time-PCR-Analyse (RT-PCR), mithilfe der Light-Cycler® Technologie, zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der autologen, peripheren Blutstammzelltransplantation sowie vor, während und nach der Rituximab Erhaltungstherapie, wie bereits zuvor von Martin et al. beschrieben (79). Negative Resultate wurden in der real-time-PCR (RT-PCR) an mindestens 4 Zeitpunkten bestätigt. Die mediane Nachbeobachtungszeit nach der autologen Blutstammzelltransplantation betrug 30 Monate (Spanne 8-67).

6.9.1.1 Allgemeines

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine zyklische in vitro Vermehrung spezifischer Nukleotidsequenzen. Jeder Zyklus besteht aus dem thermischen Auftrennen der doppelsträngigen DNA-Vorlagen („Denaturierung“), dem Anlagern der Primer („Annealing“) und der nachfolgenden DNA-Synthese („Extension“) durch eine temperaturstabile DNA-Polymerase, z.B. der Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium „*Thermophilus aquaticus*“. Aufgrund der exponentiellen Vermehrung der Ausgangs-DNA („Template“) verfügt diese rasch durchführbare Methode über eine hohe Sensitivität und ergänzt damit die klassischen Blot-Methoden. Besonders geeignet ist sie zum Nachweis tumorzellspezifischer Sequenzen wie Translokationen [zum Beispiel t(14;18) bei follikulären Lymphomen] und wird daher zunehmend, wie auch in unserer Klinik, für Verlaufsuntersuchungen eingesetzt.

Sowohl qualitativ als auch quantitativ gelingt dabei der Nachweis residualer Tumorzellen, die im Rahmen der Diagnostik einer minimalen Resterkrankung Rückschlüsse auf die Krankheitsaktivität sowie den Therapieverlauf zulassen. Diese Methode kann eine maligne, das bedeutet die t(14;18) tragende Tumorzelle, unter 10^4 bis 10^5 Millionen Zellen nachweisen. Eine Übersicht über einen PCR-Zyklus gibt die Abbildung 5.

Abbildung 5 PCR-Zyklus



6.9.1.2 Qualitative „nested“ PCR

Zum Nachweis einer minimalen Resterkrankung eignet sich die „nested“ PCR. Hierbei wird in zwei hintereinander geschalteten PCR's das amplifizierte Produkt der ersten Reaktion nochmals vervielfältigt und somit die Sensitivität der Methode erhöht. Sie verwendet ein zweites Paar „innerer Primer“, deren DNA-Zielsequenz innerhalb des Reaktionsprodukts der „äußeren Primer“ aus der ersten PCR liegt.

Da die inneren Primer nur amplifizieren können, wenn in der ersten Reaktion ein spezifisches Produkt entstanden ist, wird die Spezifität gleichsam gesteigert. Mit Hilfe der „nested“ PCR kann beispielsweise bei Patienten mit einem follikulärem Lymphom das periphere Blut oder das Knochenmark auf die Translokation t(14;18) untersucht werden. Die Primerpaare sind dabei so gewählt, dass sie auf beiden Seiten der Bruchpunkte an die DNA anlagern. Ein Konsensus-Primer bindet an die J-Region des Ig-Schwerkettenlokus, während der andere Primer innerhalb des BCL-2-Gens bindet. In früheren Untersuchungen waren die „nested“ Primer in der Lage, eine die t(14;18) tragende Lymphomzelle unter 10^5 bis 10^6 normalen Zellen nachzuweisen (87,88).

6.9.1.3 Quantitative „real-time“ PCR (RQ-PCR)

Die qualitative PCR gibt nur begrenzt Aufschluss über die Menge der Tumorzellen im peripheren Blut und Knochenmark. Sie wurde daher in den letzten Jahren durch neue, quantitative Verfahren ergänzt, die hinsichtlich der Diagnostik einer minimalen Resterkrankung die Anzahl residueller Tumorzellen messen. In der „real-time“ PCR werden amplifizierte DNA-Sequenzen bereits während der PCR mittels an Sonden angelagerter, fluoreszierender Farbstoffe sichtbar gemacht. Diese Fluoreszenzdetektion ermöglicht eine zügige Analyse der gebildeten PCR-Produkte, sowie eine Quantifizierung der amplifizierten DNA-Kopien in einer Blut- oder Knochenmarkprobe (89).

Derzeit kommen hauptsächlich zwei Systeme zum Einsatz, die Taq Man®- sowie die Light-Cycler®-Technologie. Im Gegensatz zur Taq Man®-Technologie, die eine mit zwei Farbstoffen beladene Hydrolysierungssonde verwendet, detektiert der Light-Cycler® (Roche Diagnostics, Mannheim) die PCR-Produkte mit einem Sondenformat, das auf zwei sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden beruht. Eine der Oligonukleotidsonden ist am 3'-Ende mit Fluoreszein markiert (Donor-Fluorophor). Die andere Sonde ist am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Light-Cycler®- Rot 640 (Akzeptor-Fluorophor) markiert und am 3'-Ende zur Verhinderung einer Kettenverlängerung phosphoryliert. Die Hybridisierungssonden binden in jeder Annealing-Phase zwischen den beiden Primern an nachbarschaftliche interne Sequenzen (1-5 Nukleotide Abstand) des amplifizierten DNA-Fragmentes. Nur nach Hybridisierung an die DNA-Matrize kommen die beiden Sonden in direkte Nachbarschaft (typischerweise 10-100 Å), die einen Fluoreszenz Energie Transfer (FRET) zwischen den beiden Farbstoffen ermöglicht. Während des FRETs transferiert der Spenderfarbstoff Fluoreszein, der von der Light-Cycler® LED-Lichtquelle angeregt wird, einen Teil seiner Exzitationsenergie auf den roten Empfängerfarbstoff LC-Rot 640. Dieser emittiert in der Folge langwelligere rote Fluoreszenz, die „online“ in spezifischen Kanälen des Light-Cyclers® gemessen wird und deren Intensität insgesamt direkt proportional zu der Menge an Ziel-DNA ist. Die Messung des Signals erfolgt einmal pro Zyklus nach dem Primer Annealing; zu diesem Zeitpunkt sind beide Sonden an die Zielsequenz gebunden und es erfolgt ein Energietransfer. So lange keine spezifische DNA vorhanden ist, diffundieren die Hybridisierungssonden frei in der Lösung und der signalgebende FRET findet nicht statt. Mit steigender Anzahl an PCR-Produkten nimmt auch die Menge an hybridisierten Sonden zu, so dass sich das Signal proportional zur Amplikonmenge verhält. Durch die Fluoreszenzdetektion erhöht sich, im Vergleich zur konventionellen Einschritt-PCR, die Sensitivität dieser Methode.

Ein Schema des Light-Cyclers® ist in Abbildung 6 dargestellt.

Abbildung 6 Light-Cycler®

6.9.2 Dokumentation der Ereignisse gemäß den CTC-Kriterien

Alle beobachteten unerwünschten Ereignisse der Erhaltungstherapie mit dem Antikörper Rituximab wurden als Komplikationen gewertet und gemäß den Common Toxicity Criteria (CTC) der Phase-I/II-Studiengruppe der Arbeitsgemeinschaft für Internistische Onkologie des National Cancer Institute of Canada dokumentiert. Eine genaue Auflistung der von uns untersuchten Kriterien ist in Tabelle 6 dargestellt. Alle 29 Patienten wurden in regelmäßigen Abständen von 2 Wochen in der Hämatologischen Ambulanz unserer Klinik auf Nebenwirkungen der Therapie untersucht.

Tabelle 6 National Cancer Institute of Canada common toxicity criteria (CTC)-Auswahl der für die Toxizität untersuchten Kriterien

Schweregrad	0	I.	II.	III.	IV.
Laborwerte					
Hämoglobin g/dl	>10,9	10,0-10,9	8,0-9,9	6,5-7,9	<6,5
Leukozyten ($\times 10^9/l$)	>3,9	3,0-3,9	2,0-2,9	1,0-1,9	<1,0
Granulozyten ($\times 10^9/l$)	>1,9	1,5-1,9	1,0-1,4	0,5-0,9	<0,5
Thrombozyten ($\times 10^9/l$)	>99,9	75,0-99,9	50,0-74,9	25,0-49,9	<25,0
Sonstige					
Hypotonie	keine	nicht therapiebedürftig	Flüssigkeits- oder andere Therapie erforderlich	stationäre Therapie erforderlich, jedoch Normalisierung innerhalb von 48h	wie III. jedoch länger als 48h anhaltend
Infektion	keine	geringe, nicht therapiebedürftig	mäßiggradige, Antibiotika p.o.	schwere, antibiotische oder antimykotische Therapie i.v.	lebensbedrohlich
weitere Ereignisse	keine	gering	mäßig	schwer	lebensbedrohlich

6.10 Statistik

Das Hauptzielkriterium dieser Arbeit bildet die Objektivierung der Durchführbarkeit und Wirksamkeit einer verlängerten Erhaltungstherapie mit Rituximab, die einer Hochdosistherapie und autologen peripheren Blutstammzelltransplantation in einem monatlichen Dosierungsintervall folgt und möglichst nebenwirkungsarm ist.

Als Nebenzielkriterium dieser Arbeit wurde die Überlebenszeit der untersuchten Patienten bestimmt. Gemessen wurde sie vom Zeitpunkt der Gabe der autologen Stammzellen (Ausgangszeitpunkt) bis zum Tod des Patienten (Endzeitpunkt Tod) bzw. bis zum letzten Patientenkontakt (Endzeitpunkt letztes Follow-Up bzw. Lost to Follow-Up). Als weiteres Nebenzielkriterium wurde die Dauer des krankheitsfreien Überlebens, d.h. der Zeitraum von dem Tag der Transplantation bis zum Auftreten eines Lymphomrezidivs (Endzeitpunkt Rezidiv), beobachtet.

Die Schätzung der Überlebenswahrscheinlichkeit und der Wahrscheinlichkeit des krankheitsfreien Überlebens, das heißt dass ein Patient vom Zeitpunkt der Transplantation ($t=0$) mindestens bis zum Zeitpunkt t überlebt bzw. kein Rezidiv erlitten hat, erfolgte durch die Methode nach Kaplan und Meier aus dem Jahr 1958 (86).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse basieren auf Berechnungen, die mit den Programmen Excel® und SPSS® durchgeführt wurden.

7. Ergebnisse

7.1 Unerwünschte Nebenwirkungen

Gemäß den Common Toxicity Criteria des National Cancer Institute of Canada (CTC) wurden bei unseren 29 Patienten insgesamt 78 unerwünschte Ereignisse beobachtet. Dreizehn davon waren vom Schweregrad III oder IV.

Nebenwirkungen, die gemäß den CTC-Kriterien größer als vom Schweregrad II waren, betrafen nur das hämatopoetische System.

- Bei 4 Patienten (14%) entwickelte sich eine **Anämie** vom Schweregrad II.
- Eine **Leukozytopenie** trat bei 14 Patienten (48%) auf. Von diesen wurde bei 9 Patienten eine zweitgradige und bei 5 Patienten eine drittgradige Leukozytopenie beobachtet.
- Bei 9 der Patienten (31%) entwickelte sich eine **Thrombozytopenie**, die bei 3 Patienten zweiten und bei 5 Patienten dritten Grades war. Ein Patient bekam eine viertgradige Thrombozytopenie.

Insgesamt traten bei 10 der Patienten (34%) unerwünschte Hämatotoxizitäten dritten oder vierten Grades auf.

Außer bei zwei Patienten, die an einer kutanen Varizella Zoster Virus Infektion erkrankten, wurden gemäß den CTC-Kriterien keine schweren infektiösen Komplikationen beobachtet (CTC größer dritten oder vierten Grades).

Insgesamt war die Anzahl der beobachteten milden Nebenwirkungen (CTC ersten oder zweiten Grades) gering, ein Patient erkrankte an einer Otitis media, welche jedoch bereits vor Beginn der Erhaltungstherapie mit Rituximab häufig und rezidivierend aufgetreten war.

Ein Patient reagierte während der Erstinfusion des Antikörpers Rituximab mit einer kurzen Episode von subfebrilen Temperaturen, die als eine akut allergische Reaktion eingestuft wurde.

Eine genaue Auflistung der beobachteten unerwünschten Ereignisse ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7 CTC-Kriterien, Anzahl der beobachteten unerwünschten Ereignisse in Prozent

	II. Grades	III. Grades	IV. Grades
Leukozytopenie	9 (31 %)	5 (17 %)	0
Anämie	4 (14 %)	0	0
Thrombozytopenie	3 (10 %)	5 (17 %)	1 (3 %)
Infektion	1 (3%)	2 (7 %)	0
B- Zell Depletion	0	0	0
Akute Reaktionen	1 (3%)	0	0
Hypotension	0	0	0
Asthenie	0	0	0
Andere	1 (3%)	0	0

7.2 PCR-Verlauf

Die Auswertung der molekularbiologischen Analysen der 13 Patienten mit einem folliculären Non-Hodgkin-Lymphom zeigte, dass bei 4 Patienten vor Beginn der Erhaltungstherapie mit Rituximab die Translokation t(14;18) im peripheren Blut (PB) und/oder im Knochenmark (KM) mit Hilfe der nested- oder real-time PCR nachgewiesen werden konnte. Im Verlauf war bei allen 4 Patienten nach im Median 12 Monaten (Spanne 9-14) der Erhaltungstherapie mit Rituximab die t(14/18) in der PCR-Analyse nicht mehr nachweisbar.

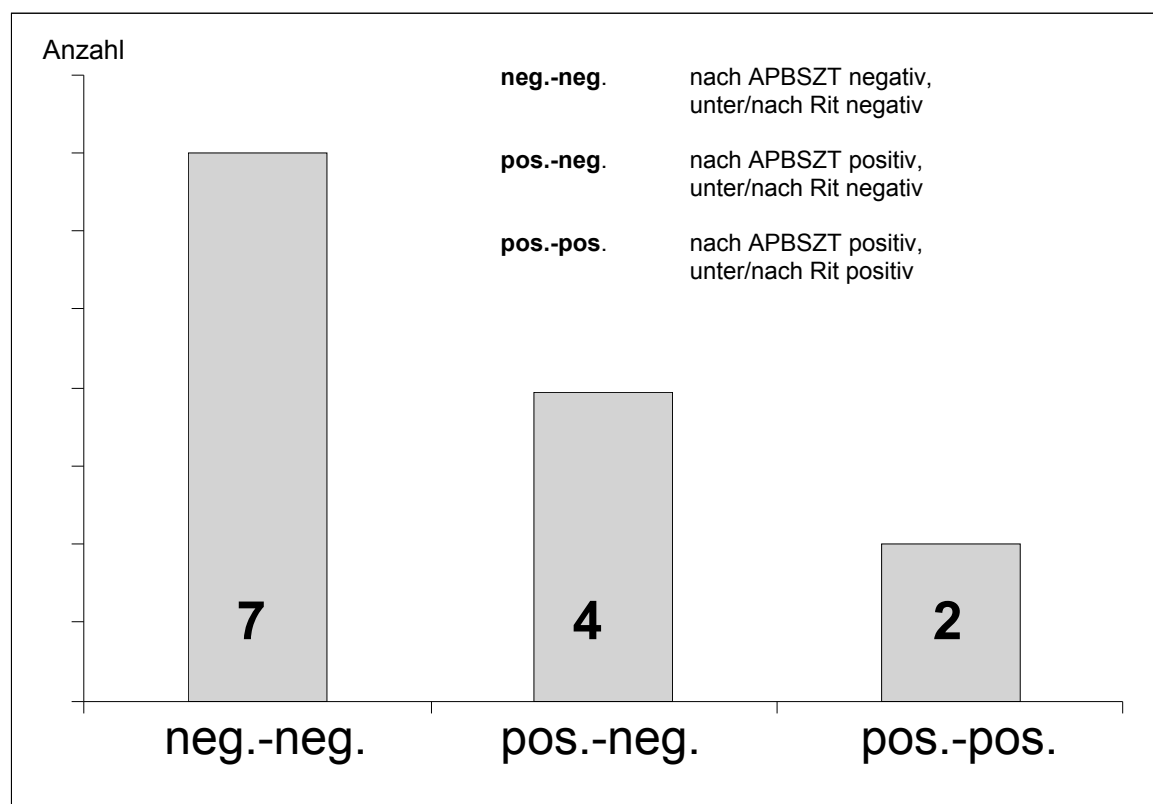
Bei 7 Patienten war die PCR-Analyse sowohl vor als auch nach der Erhaltungstherapie mit Rituximab unauffällig.

Bei 2 Patienten konnte die Translokation t(14;18) sowohl vor als auch nach der Erhaltungstherapie mit Rituximab in der PCR-Analyse des peripheren Bluts (PB) oder des Knochenmarks (KM) detektiert werden. Obwohl bei diesen beiden Patienten unter Rituximab keine Serokonversion beobachtet werden konnte, zeigten sie klinisch bis zuletzt keinen Hinweis auf ein Rezidiv.

Ein Patient wurde nach Beendigung der Therapie einmalig PCR-positiv, war aber in den 3 aufeinander folgenden Analysen sofort wieder negativ, ohne jegliche klinische Anzeichen für ein Rezidiv zu bieten. Ein anderer Patient erkrankte am Ende der Erhaltungstherapie an einem Rezidiv, ohne dafür zuvor einen molekularbiologischen Hinweis zu bieten.

Insgesamt konnte kein Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der PCR-Analyse und dem Auftreten eines Rezidivs gefunden werden.

Abbildung 7 PCR-Ergebnisse



7.3 Überleben

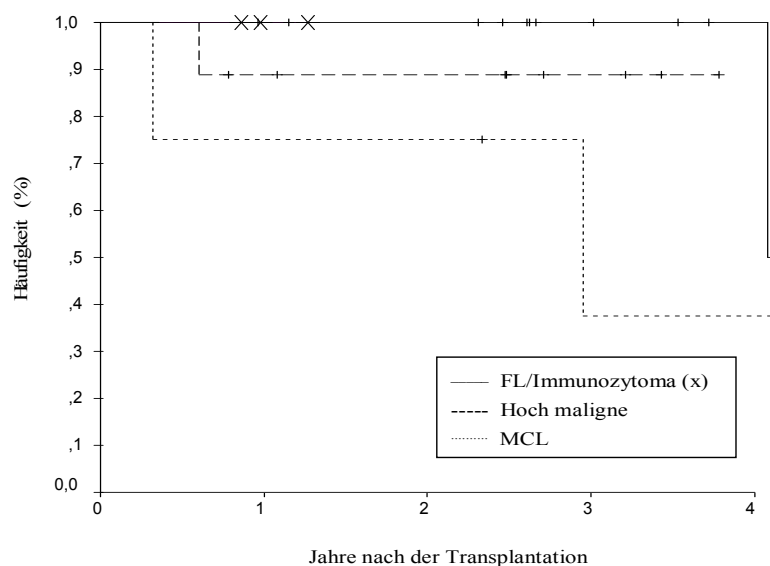
Alle Patienten, die an einem follikulären Lymphom oder Immunozytom erkrankt waren, lebten zum Zeitpunkt der letzten Beobachtung. Außer einem Patienten, der in ein hochmalignes Lymphom transformierte, erlitt keiner der Patienten einen Rückfall. Bei 2 der Patienten, die an einem Mantelzelllymphom erkrankt waren, trat nach 5 und 35 Monaten ein Rezidiv auf. Einer von ihnen verstarb krankheitsbedingt durch einen Progress der Grunderkrankung.

Acht der Patienten, die an einem hochmalignen Lymphom erkrankt waren, lebten ebenfalls zum Zeitpunkt der letzten Beobachtung und befanden sich in kompletter Remission. Ein Patient, der an einem hochmalignen Lymphom erkrankt war, verstarb durch einen Rückfall 7 Monate im Anschluss an die Transplantation.

Keiner der Patienten verstarb an Nebenwirkungen, die unter der Erhaltungstherapie mit dem Antikörper aufgetreten waren.

Das ereignisfreie Überleben der Patienten, die eine Erhaltungstherapie mit Rituximab gemäß des Düsseldorfer Konzepts erhielten, ist in Abbildung 8 dargestellt.

Abbildung 8 Ereignisfreies Überleben unter Erhaltungstherapie mit Rituximab von Patienten mit einem follikulären Lymphom (FL n=13), Immunozytom (n=3), hochmalignem Lymphom (n=9) und Mantelzelllymphom (MCL; n=4)



8. Diskussion

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Kausalität und Wirksamkeit einer Erhaltungstherapie mit Rituximab nach Hochdosismethotherapie und autologer peripherer Blutstammzelltransplantation bei Patienten mit einem B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom.

8.1 Rationale einer Erhaltungstherapie mit Rituximab

In zuvor durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass Rituximab als Therapie einer minimalen Resterkrankung und als kontinuierliche Rezidivprophylaxe wirksam ist.

In einer von Foran et al. (74) durchgeführten multizentrischen Studie erhielten 70 zuvor behandelte Patienten mit einem follikulären Lymphom eine Erhaltungstherapie mit Rituximab gemäß dem Standardschema (375mg/m²/Woche über 4 Wochen). Nachfolgende Untersuchungen wurden nach einem und nach zwei Monaten durchgeführt. Dreizehn von 21 (62%) evaluierbaren zuvor „PCR-positiven“ Patienten wurden einen Monat nach Therapieende im peripheren Blut und/oder im Knochenmark „PCR-negativ“, obwohl dieses nicht mit dem klinischen Ansprechen der Patienten korrelierte.

Bis zu der Einführung von Rituximab wurden in der Erhaltungstherapie der malignen Lymphome vor allem Interferone verwendet. Es gibt bisher drei bekannte Interferon-Arten (IFN- α , IFN- β , IFN- γ). Alle drei wirken antiproliferativ und antiviral. Mit der Gabe von Interferonen, insbesondere von IFN- α , erhofft man sich die Induktion einer wirksamen körpereigenen Immunantwort gegen die maligne entarteten Zellen des Lymphoms: i.) Veränderung der Oberflächenantigenexpression, ii.) an den T-Zellen: Steigerung der T-Supressorzell-Aktivität, Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, Aktivierung von Th1-Helferzellen, iii.) Veränderung der B-Zell Funktion und Aktivierung des Monozyten-Makrophagen-Systems (MMPS).

Die Wirksamkeit von IFN- α konnte in vielen Studien belegt werden. Die Gabe erfolgte entweder als Kombinationstherapie im Rahmen einer Chemotherapie (15, 16) oder als alleinige Erhaltungstherapie in der Therapie der minimalen Resterkrankung bei follikulären Lymphomen (17). Die beobachteten Nebenwirkungen waren jedoch zahlreich und betrafen neben der Hämatopoese viele andere Organe. Symptome einer Granulozytopenie, Thrombozytopenie, Grippe-symptomatik und depressive Reaktionen erforderten häufig ein Absetzen der Therapie. Ebenso trug das notwendige IFN-Dosierungsintervall mit drei Gaben pro Woche nicht dazu bei, die Lebensqualität der Patienten zu verbessern.

In der Zulassungsstudie (72) von Rituximab, einer multizentrischen Phase-II-Studie, der sogenannten „pivotal Trial“, wurde Rituximab 166 Patienten mit rezidierten indolenten Lymphomen in einer Dosis von 375mg/m²/Woche über 4 Wochen infundiert. Es wurde eine Ansprechrate von 48% mit 6% kompletten Remissionen erzielt, die mediane Zeit bis zum Progress betrug jedoch nur 13 Monate. Das Nebenwirkungsprofil erwies sich als sehr günstig und bestand bei lediglich 13% der Patienten aus infusionsbedingten III.-IV. gradigen akuten Reaktionen (Schüttelfrost, Fieber, Urtikaria, Luftnot, Blutdruckabfall), die als pseudoallergisch eingestuft wurden.

8.2 Mögliche Schemata

Es existieren viele Dosierungsintervalle den Antikörper Rituximab als Erhaltungstherapie zu verabreichen. Die Zulassungsstudie von Rituximab, die sogenannte „pivotal trial“, definierte das Standardschema. Dabei wurde Rituximab in einer Dosis von 375mg/m²/Woche über 4 Wochen nach Durchführung der autologen peripheren Blutstammzelltransplantation (APBSZT) verabreicht (72). Eine Übersicht über die bisher verwendeten Protokolle ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8 Schemata einer Erhaltungstherapie mit Rituximab

Referenz		Dosierung und Intervall	Bemerkung
(72)	Standardschema	375mg/m ² /Woche über 4 Wochen	nach APBSZT
(60)	Horwitz	375mg/m ² /Woche über 4 Wochen	nach APBSZT
(59)	Brugger	375mg/m ² /Woche über 4 Wochen	nach APBSZT
(62)	Hainsworth	375mg/m ² /Woche über 4 Wochen	zuvor unbehandelt
(74)	Foran	375mg/m ² /Woche über 4 Wochen	zuvor behandelt
(84)	Düsseldorfer Konzept	375mg/m ² /Monat jeden Monat	nach APBSZT
(63)	Gordan	375mg/m ² /Woche über 4 Wochen, weitere Einzelgabe bei Serum-Spiegeln <25µg/ml	zuvor unbehandelt
(61,75)	Ghielmini	375mg/m ² /Woche über 4 Wochen	zuvor behandelt und unbehandelt
(65)	Van Oers	375mg/m ² alle 2 Monate (Monat 3,5,7, 9)	zuvor behandelt und unbehandelt
(64)	Hainsworth	375mg/m ² /Woche über 4 Wochen, dann Randomisierung in 2 Arme: Arm A: weitere 4 Gaben nach ½ Jahr Arm B: weitere Gabe bei Progress	zuvor behandelt

8.3 Düsseldorfer Konzept, Intervalle etc.

In der vorhandenen Literatur (63, 68) wird verstärkt die Forderung nach rationalen Studienansätzen einer Erhaltungstherapie mit Rituximab bei Patienten mit einem Non-Hodgkin-Lymphom geäußert.

Zum Zeitpunkt unserer Initiierung der Erhaltungstherapie mit Rituximab lagen nur wenige pharmakokinetische Daten vor. Es ist bekannt, dass die Halbwertszeit von humanen, intravenös verabreichten, Immunglobulinen etwa einen Monat beträgt (69). Aus diesem Grund wurde das in unserer Studie verwendete Intervall von einem Monat gewählt. Mittlerweile liegen Studien vor die zeigen, dass das Intervall nach einer Rituximab Infusion bis zum Verschwinden wirksamer Rituximab Spiegel etwa 2

Monate beträgt (102). Im Hinblick auf diese Daten ist zu erwarten, dass bei den hier betrachteten Patienten wirksame Rituximab Spiegel für einen Zeitraum von mehreren Monaten aufrechterhalten wurden. Andere Studien zeigten, dass sogar 3 bis 6 Monate nach Beendigung der Therapie mit Rituximab noch Antikörper im Serum nachweisbar sind, deren Konzentration jedoch inter- und intraindividuell verschieden ist (69, 70). Als Dosierung wählten wir in der Studie $375\text{mg}/\text{m}^2$, welche jener Dosis entspricht, die bereits in der Zulassungsstudie, als wirksam beschrieben wurde (72). Darüber hinaus kann das Düsseldorfer Konzept (siehe Abbildung 4) in die routinemäßige Nachfolge-Untersuchung eines Lymphompatienten integriert werden und führt somit nur zu einem sehr geringen zeitlichen Mehraufwand für die Patienten.

8.4 Ergebnisse des Düsseldorfer Konzepts

Vor Beginn der Erhaltungstherapie mit Rituximab konnten bei 6 von 13 evaluierbaren Patienten mit einem follikulären Lymphom residuale, die $t(14;18)$ tragende, Tumorzellen mittels PCR nachgewiesen werden. Vier (66%) davon hatten nach Beendigung der Rituximab Therapie einen negativen PCR-Status, die anderen beiden Patienten blieben positiv, ohne jedoch klinisch einen Hinweis auf ein nahendes Rezidiv zu bieten. Somit konnten wir bestätigen, dass die Gabe von Rituximab eine minimale Resterkrankung therapiert und als eine kontinuierliche Rezidivprophylaxe wirkt.

Es ist bereits bekannt, dass eine molekulare Remission kein universeller Vorhersagewert für die Dauer des progressionsfreien Überlebens ist. In einer Studie von Howard et al. war das progressionsfreie Überleben von Patienten, bei denen unter Rituximab im peripheren Blut oder Knochenmark keine residuellen Tumorzellen gefunden wurden, nicht signifikant verlängert (16,5 vs. 18,8 Monate) (67).

Darüber hinaus ist die Kausalität zwischen der molekularen Konversion in einen negativen PCR-Status und einer Erhaltungstherapie mit Rituximab bisher nicht bewiesen. Dieses Phänomen konnte ebenfalls schon nach peripheren Blutstammzelltransplantationen ohne eine nachfolgende Erhaltungstherapie beobachtet werden (79).

Unter dem Düsseldorfer Konzept beobachteten wir eine geringe Rate an dritt- oder viertgradigen Leukozytopenien von 17%. Horwitz et al. beobachteten unter wöchentlichen Rituximab Gaben von $375\text{mg}/\text{m}^2$ bei 54% der Patienten mit einem diffus großzelligen Lymphom eine Neutropenie dritten bis vierten Grades. Infektiöse Komplikationen traten bei 51% der Patienten auf, was eine fünfmal höhere Infektionsrate bedeutet, als sie in unserer Studie beobachtet wurde. Diese Unterschiede können durch das abweichende Dosierungsschema bedingt sein.

Bei der Betrachtung des ereignisfreien Überlebens der Mantelzelllymphome, können wir das gute Ergebnis, welches bei Brugger et. al (59) beschrieben wurde, nicht bestätigen. Jene fanden bei Patienten mit follikulären und Mantelzelllymphomen nach einer Erhaltungstherapie mit Rituximab keinen Unterschied in den klinischen und molekularen Remissionsraten. Dies könnte mit der niedrigen Anzahl an Mantelzelllymphomen in unserer Studie zusammenhängen.

Die Ergebnisse unseres Konzepts sind ermutigend, wenngleich wir keine Kontrollgruppe hinzuziehen können. Ausgenommen jene Patienten, die an einem Mantelzelllymphom erkrankt sind, zeigten sowohl die hoch- als auch die niedrigmalignen follikulären Lymphome, sehr gute Ergebnisse, mit besonderer Betrachtung des ereignisfreien Überlebens nach mehr als 3 Jahren mit 100% beziehungsweise 89%.

8.5 Darlegung und Gegenüberstellung der anderen Konzepte

Die ersten Ergebnisse mit dem Antikörper stammen aus Studien in denen Rituximab als Monoinduktionstherapie verabreicht wurde (61, 64, 62). Dort wurde beobachtet, dass Rituximab die gleichen Ansprechraten wie Chemotherapeutika erzielte, die Zeit bis zur Krankheitsprogredienz jedoch kurz war. Eine wiederholte Gabe des Antikörpers optimierte diese Therapieoption wesentlich.

Die Beobachtungen, dass eine Wiederbehandlung mit Rituximab nach einem Rezidiv längere Ansprechraten induzieren kann, als die erste Behandlung (71) und dass besonders jene Patienten von Rituximab profitieren, bei denen über einen längeren Zeitraum erhöhte Serumkonzentrationen nachweisbar waren (72), führten zu der Entwicklung verlängerter Protokolle.

Hainsworth et al. (62) gaben unbehandelten Patienten, die sich nach 4x 375mg/m²/Woche in einem stabilen Stadium befanden, alle 6 Monate einen weiteren Rituximab Zyklus nach dem Standard Protokoll (375mg/m²/Woche über 4 Wochen). Dieses Schema erzielte ein medianes progressionsfreies Überleben von 34 Monaten.

Randomisierte Studien, die eine Erhaltungstherapie mit Rituximab gegen die alleinige Beobachtung verglichen (61, 64, 65), konnten mit dem Antikörper ein progressionsfreies Überleben von über 3 Jahren erreichen.

Da es sich bei den indolenten Lymphomen um langsam progrediente Erkrankungen handelt, sind die meisten dieser prospektiven Studien noch nicht abgeschlossen. Erste Zwischenauswertungen zeigten jedoch deutliche Vorteile für eine Erhaltungstherapie mit Rituximab.

Gordan et al. (63) gestalteten für jeden Patienten ein individuelles Erhaltungstherapieschema, bei dem der Abstand zwischen den einzelnen Rituximab Gaben optimalerweise 3 bis 4 Monate betragen sollte. Sie verabreichten CD20 positiven Non-Hodgkin-Lymphom Patienten zunächst 375mg/m²/Woche über 4 Wochen. Alle Patienten, bei denen die Krankheit nicht progredient war, wurden für ein Jahr engmaschig im Verlauf kontrolliert und erhielten bei Absinken des Serum-Rituximab Spiegels unter 25µg/ml eine Einzeldosis à 375mg/m². Dieses Schema war wirksam, gut verträglich und verlängerte das progressionsfreie Überleben.

Auch Ghielmini et al. (61) und van Oers et al. (65) verabreichten Rituximab in Abständen von 2 bis 3 Monaten und erzielten gute Ansprechraten bei geringen Nebenwirkungsraten.

Brugger et al. zeigten in einer einarmigen Phase-II-Studie an Patienten, die zuvor kein Rituximab erhalten hatten, die hohe Wirksamkeit einer Erhaltungstherapie mit Rituximab in der Therapie der minimalen Resterkrankung (59). Rituximab wurde 8 Wochen nach der autologen Blutstammzelltransplantation in einer Dosis von 375mg/m²/Woche über 4 Wochen gegeben. Im Gegensatz zu unseren Daten beschreiben Brugger et al. durch die wöchentlichen Gaben eine höhere Rate an infektiösen Komplikationen, die am ehesten durch eine stärkere B-Zell Depletion bedingt sind. Auch die Rate von Patienten, bei denen eine Leukozytopenie beobachtet wurde, ist in unserer Studie signifikant geringer.

Horwitz et al. beschrieben bei Patienten mit einem diffus großzelligen B-Zell Lymphom ein Erhaltungstherapieschema mit Infusionen von 375mg/m²/Woche über 4 Wochen nach Hochdosistherapie und autologer Blutstammzelltransplantation (60). Sowohl in dieser, als auch in unserer Studie, betrafen die meisten Nebenwirkungen das hämatopoetische System. Die beobachtete Rate von Patienten, bei denen eine Neutropenie dritten oder vierten Grades beobachtet wurde, betrug in dieser Studie 54%.

Bei Patienten mit einem follikulären Lymphom, bei denen nach der Blutstammzelltransplantation keine Erhaltungstherapie durchgeführt wurde, beschrieben Lenz et al. das progressionsfreie Überleben nach 2 Jahren mit 79,1% (6). Bei Patienten mit einem aggressiven Non-Hodgkin-Lymphom lag das ereignisfreie Überleben bei 65% (37). Im Gegensatz zu den meisten Patienten aus unserer Studie, handelte es sich um Patienten, die zuvor keine Chemotherapie erhalten hatten, die mit Rituximab kombiniert war.

In einer von Foran et al. durchgeführten, multizentrischen Studie erhielten 70 zuvor behandelte Patienten mit einem follikulären Lymphom eine Erhaltungstherapie mit Rituximab gemäß dem Standardschema (375mg/m²/Woche über 4 Wochen). Auch hier wurde die Therapie gut vertragen und zeigte wenige Nebenwirkungen, lediglich ein Patient erkrankte an einem Stevens-Johnson Syndrom (74).

Ghielmini et al. untersuchten die Wirksamkeit von Rituximab als Monotherapie. Dabei wurde Rituximab entweder nach dem Standardschema oder nach einem modifizierten „verlängerten“ Standardschema bei Patienten mit neu diagnostiziertem, refraktärem oder rezidiertem Mantelzell- (75) oder follikulärem Lymphom (61) verabreicht. In diesen beiden Studien bestand das Dosierungsintervall aus einer Wiederholung gemäß des Standardschemas in achtwöchentlichen Intervallen (Monat 3, 5, 7 und 9). Das ereignisfreie Überleben bei den follikulären Lymphomen (23 Monate vs. 12 Monate) wurde signifikant verbessert. Bei Patienten mit einem Mantelzelllymphom kam es jedoch nicht zu einer Steigerung der Ansprechrate und Verlängerung des ereignisfreien Überlebens. Die Rituximab Therapie führte bei den Mantelzelllymphomen nicht zu einer gesteigerten Hämatotoxizität. Erstaunlicherweise traten hämatopoetische Nebenwirkungen dritten oder vierten Grades im Nicht-Erhaltungsarm häufiger als im Erhaltungsarm auf (13% vs. 9%). Bei den follikulären Lymphomen waren die Zeiträume der B-Zell Depletion und der Abnahme der Konzentration von IgM im Serum zwar verlängert, jedoch wurde keine Erhöhung von unerwünschten Ereignissen beobachtet.

Andere Studiengruppen untersuchten neben einer verlängerten Erhaltungstherapie mit Rituximab auch dosisintensivierte Protokolle, bei denen höhere Einzeldosen pro m² Körperoberfläche verabreicht wurden. Andere erhöhten die Anzahl der wöchentlichen Infusionen oder die Anzahl der aufeinander folgenden Wochen, in denen Rituximab gegeben wurde, bis zu acht Wochen in Folge. Weitere Studien wiederholten das Standardschema alle sechs Monate, bis zu einer Gesamtdauer von zwei Jahren. Die Resultate dieser Studien zeigen, dass eine vermehrte Exposition mit dem Antikörper Rituximab, zu einer Verbesserung der Wirksamkeit führt (76, 77, 78, 62).

Die Wirksamkeit, die das Düsseldorfer Konzepts erzielte, stimmt mit einer randomisierten Studie überein, in der zuvor behandelte Patienten, deren Krankheit nach 375mg/m²/Woche über 4 Wochen nicht fortschreitend war, in zwei Gruppen randomisiert wurden. Die eine Gruppe erhielt wiederholte Gaben von Rituximab nach einem festen Schema, die andere erst bei Krankheitsprogress. Obwohl bei diesen Patienten zuvor keine autologe periphere Blutstammzelltransplantation durchgeführt wurde, war das progressionsfreie Überleben im Erhaltungstherapiearm im Gegensatz zum Arm mit unterbrochener oder ohne Erhaltung wie in unserer Studie signifikant verlängert (64). Der Erhaltungstherapiearm bestand in dieser Studie aus der Gabe von Rituximab 375mg/m² alle 6 Monate. Das progressionsfreie Überleben war während der Erhaltungstherapie signifikant verlängert (31,3 vs. 7,4 Monate).

Es gilt nun in der Zukunft durch randomisierte, kontrollierte Studien das wirksamste Rituximab Erhaltungstherapieschema zu definieren.

8.6 Fazit, neue Daten zur Pharmakokinetik

Zusammenfassend schließen wir aus unserer monozentrischen Studie, dass eine Erhaltungstherapie mit Rituximab nach dem Düsseldorfer Konzept sicher ist, gut vertragen wird und sowohl mit weniger infektiologischen als auch hämatologischen Nebenwirkungen assoziiert ist, als vier Gaben in wöchentlichen Abständen. Schwere Nebenwirkungen traten kaum auf. Die aufgetretenen Toxizitäten betrafen vor allem das hämatopoetische System.

Eine Erhaltungstherapie nach dem Düsseldorfer Konzept wirkt als Therapie einer minimalen Resterkrankung und als kontinuierliche Rezidivprophylaxe. Sie verlängert das ereignisfreie Überleben bei Patienten mit einem B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom. Sicherlich sind dennoch weitere Studien nötig, die verschiedene Erhaltungstherapieschemata gegenüberstellen.

Neuere Daten zur Pharmakokinetik zeigen, dass die Halbwertszeit von intravenös verabreichtem Rituximab etwa 2 Monate beträgt (102). In der Hoffnung die Toxizität und Nebenwirkungsrate der wöchentlichen Gabe zu reduzieren, führten wir das monatliche Dosierungsschema ein. Durch die monatliche Gabe reduzierten wir die Höchstkonzentrationen (=peak level), ohne die Konzentrationen im Dauerzustand (=steady state) bedeutend zu verändern und erzielten eine bessere Verträglichkeit der Erhaltungstherapie mit Rituximab. Die Einzelgabe von 375mg/m² Rituximab führt zu Serum Konzentrationen von durchschnittlich 200µg/ml. Bei monatlichen Dosierungsintervallen beträgt der steady state vor der Gabe etwa 200µg/ml und nach der Gabe etwa 400µg/ml. Wöchentliche Dosierungsschema erreichen lediglich höhere peak level, bei gleichen steady state Konzentrationen (70). Die im infusionsfreien Intervall gemessene Serumkonzentration von Rituximab entsprach einer aus anderen Studien bekannten Konzentration (70), die durch höhere peak level erreicht wurde und ebenfalls Remissionen erzielte.

Folglich erlangt unser Konzept sowohl die gleichen pharmakodynamischen Wirkungen bei niedrigeren Höchstspiegeln, als auch durchschnittlich ähnliche Konzentrationen im infusionsfreien Intervall und vermeidet somit Nebenwirkungen, die alleine auf die Toxizität des Antikörpers zurückzuführen sind.

8.7 Alternative Therapien

Dem Prinzip der Radioimmuntherapie liegt die Kopplung eines radioaktiven Isotops an einen monoklonalen Antikörper mit dem Ziel der Lymphomzelldestruktion zu Grunde. Diese radioaktiv markierten Antikörper bieten gegenüber den „nackten“ Antikörpern einige Vorteile.

B-Zell Lymphome sind bekannt für ihre Sensitivität gegenüber Strahlen, so dass sie sich für eine Radioimmuntherapie hervorragend eignen. Durch die Radioimmuntherapie werden nicht nur diejenigen Tumorzellen abgetötet, die das entsprechende Antigen auf ihrer Oberfläche tragen, sondern auch die angrenzenden Tumorzellen, welche das Antigen nicht tragen, oder es im Rahmen einer Resistenzbildung bereits verloren haben. Dies wird als „bystander effect“ bezeichnet. Auf diese Weise kann eine gezielte, Antikörper vermittelte, Lymphombestrahlung durchgeführt werden.

Bisher stehen zwei Radioimmunkonjugate mit β -Strahlern für den CD20 Antikörper Rituximab zur Verfügung: ¹³¹Jod-Tositumomab (Bexxar®) und ⁹⁰Yttrium-Ibritumomab (Zevalin®).

Die durchschnittliche Reichweite eines β -Strahlers liegt im Rahmen von mehreren Zelldurchmessern. Diese Therapieform findet sich jedoch bisher nicht standardmäßig in den Therapieprotokollen und unterliegt noch der Prüfung.

Eine weitere Therapie ist die Kopplung von α -Strahlern an CD20 Antikörper, z.B. 213-Bismuth. Der Vorteil der α -Strahler gegenüber den β -Strahlern liegt i) in dem auf wenige Zelldurchmesser begrenzten Strahlungsbereich, wodurch die ungewollte Bestrahlung gesunden Gewebes vermindert wird, sowie ii) in dem höheren linearen Energietransfer und iii) der Wirkung der α -Strahlung bereits ohne Kopplung die Apoptose einleiten zu können (80).

Ein weiterer Schritt in eine effektivere Therapie der follikulären Lymphome könnte das BCL-2-Antisense-Prinzip sein. Bei 80-90% der follikulären Lymphome lässt sich die Translokation t(14;18) nachweisen. Sie führt zu einer Überexpression des BCL-2-Proteins wodurch die physiologische Zellapoptose nicht mehr eingeleitet werden kann (8). Dieser Mechanismus kann durch kleinste DNS-Moleküle, z.B. durch das Oligonukleotid Oblimersen® spezifisch gehemmt werden. Dabei zeigte sich in ersten Studien eine geringe Nebenwirkungsrate bei gutem Ansprechen auf diese Therapieform. Die mögliche Kombination mit Rituximab ist zur Zeit Gegenstand laufender Studien (81).

Eine weitere Therapiemöglichkeit könnte in Zukunft die Anwendung des reversiblen Proteasomen Inhibitors Bortezomib sein. Dieser greift hemmend in den Ubiquitin-Proteasom Signalweg ein, welcher für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Proteinspiegel notwendig ist. Dadurch kommt es zur intrazellulären Anhäufung von verschiedenen Onkogenen und Proteinen, die den Zellzyklus und die Apoptose regulieren. In ersten Studien zeigten sich Remissionsraten von bis zu 40% (82), die mögliche Kombination mit Rituximab wird in aktuellen Konzepten überprüft.

Auch erste Ansätze einer Lymphom-spezifischen (Anti-Idiotyp-) Vakzinierung erscheinen viel versprechend, werden jedoch zurzeit noch durch die teure und sehr aufwendige Herstellung des Impfstoffs limitiert. Eine erste retrospektive Studie bei Patienten mit einem follikulären Lymphom zeigte bei 47% der geimpften Patienten eine immunologische Reaktion. In dieser Subgruppe war das progressionsfreie Überleben signifikant verlängert (8,2 Jahre vs. 3,4 Jahre) (83).

Der Angiogenesehemmer Avastin® (Bevacizumab) ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler IgG-Antikörper, der mit hoher Affinität an den Wachstumsfaktor „vascular endothelial growth factor (VEGF)“ bindet und verhindert, dass dieser an den Rezeptor der Endothelzellen andocken kann. Damit erhalten die Endothelzellen kein Wachstumssignal und die Gefäßaussprossung in Richtung Tumor unterbleibt. In Untersuchungen zeigten sich drei Hauptwirkungen: i) Rückbildung der unreifen Blutgefäße, ii) Normalisierung der Blutgefäße und iii) Hemmung der Blutgefäßneubildung.

Es konnte gezeigt werden, dass Non-Hodgkin-Lymphom Patienten mit einer hohen VEGF-Serumkonzentration ein kürzeres Gesamtüberleben aufwiesen, als solche mit einer geringen VEGF Serumkonzentration (174). Erste Studienergebnisse der Kombination von Avastin® (Bevacizumab) mit R-CHOP (RA-CHOP) bei Patienten mit neu diagnostizierten großzelligen Non-Hodgkin-Lymphomen, zeigten die gute Verträglichkeit und Sicherheit dieser Immunchemotherapie. Es konnten Gesamtansprechraten von 85% und 38% komplette Remissionen erreicht werden. Die Auswertung der Überlebensraten steht zum jetzigen Zeitpunkt noch aus.

9. Zusammenfassung

Rituximab ist ein monoklonaler Antikörper, welcher an das CD20 Antigen bindet und an der Zielzelle sowohl Apoptose als auch Komplement Aktivierung und in dessen Folge Effektorzell vermittelte Lyse auslöst. Das CD20 Antigen wird von der Mehrzahl der B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome exprimiert. Die Kombination von Rituximab mit konventioneller Chemotherapie zeigte synergistische Therapieeffekte, ohne die Toxizität zu erhöhen. Über den Einsatz von Rituximab als Erhaltungstherapie nach einer Hochdosistherapie und autologer peripherer Blutstammzelltransplantation liegen nur sehr limitierte Daten vor.

In dieser Arbeit wird eine Gruppe von 29 Patienten mit einem B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom untersucht, die nach Hochdosischemotherapie und autologer Blutstammzelltransplantation eine Erhaltungstherapie mit Rituximab erhalten haben. Rituximab wurde im Median 10x (Spanne 4-37) durchschnittlich 1x/Monat in einer Dosis von 375mg/m² infundiert. Die mediane Zeit der Nachverfolgung nach der Transplantation betrug 30 Monate (Rang 8-67).

Bei Patienten mit positivem Nachweis der Translokation t(14;18) wurde ein molekulares Monitoring mit Hilfe der nested- oder der real-time PCR durchgeführt. Alle beobachteten, unerwünschten Ereignisse wurden gemäß den CTC-Kriterien dokumentiert und ausgewertet.

Ein Patient reagierte auf die Erstinfusion von Rituximab mit einer kurzen Episode von subfebrilen Temperaturen, zwei Patienten erkrankten an einer kutanen Varizella Zoster Infektion. Nebenwirkungen die größer als zweiten Grades waren, betrafen hauptsächlich das hämatopoetische System. Bei 4 Patienten (14%) entwickelte sich im Verlauf eine Anämie zweiten Grades, bei 14 Patienten kam es zu einer Leukopenie (48%), davon bei 9 Patienten zweiten und bei 5 Patienten dritten Grades. Bei 9 Patienten entwickelte sich während der Therapie eine Thrombozytopenie (31%), die bei einem Patienten ersten, bei 3 Patienten zweiten und bei 5 Patienten dritten Grades war. Kein Patient verstarb an therapiebedingten Nebenwirkungen. Bei 4 Patienten trat ein Progress der Grunderkrankung nach im Median 20 Monaten (Rang 4-49 Monate) ein. Von diesen Patienten sind 2 bisher verstorben.

Sechs der Patienten mit einem follikulären Lymphom hatten vor Beginn der Rituximab Erhaltungstherapie in der PCR-Analyse des peripheren Bluts oder des Knochenmarks einen positiven Nachweis für die Translokation t(14;18). Nach im Median 12 Infusionen (Rang 9- 14) der Erhaltungstherapie mit Rituximab war bei 4 von ihnen die Translokation t(14;18) nicht mehr nachweisbar, wodurch die Wirksamkeit in der Elimination einer minimalen Resterkrankung angenommen werden kann.

Wir konnten zeigen, dass eine Erhaltungstherapie mit Rituximab nach Hochdosischemotherapie und autologer peripherer Blutstammzelltransplantation nach dem Düsseldorfer Konzept sicher ist, gut vertragen wird und sowohl mit weniger infektiologischen als auch hämatologischen Nebenwirkungen assoziiert ist, als vier Gaben in einwöchentlichen Abständen. Schwere Nebenwirkungen traten kaum auf. Die aufgetretenen, reversiblen Toxizitäten betrafen vor allem das hämatopoetische System. Bei 34% der Patienten wurden reversible hämatologische Nebenwirkungen beobachtet, die größer als zweiten Grades waren.

Eine Erhaltungstherapie nach dem Düsseldorfer Konzept wirkt als Therapie einer minimalen Resterkrankung und als kontinuierliche Rezidivprophylaxe. Sie verlängert das Ereignisfreie- und das Gesamt-Überleben bei Patienten mit einem B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom.

10. Abkürzungs- und Fremdwörterverzeichnis

aIPI	altersadaptierter Internationaler Prognostischer Index
ACVB-Schema	Chemotherapie mit Adriamycin, Endoxan, Vindesin, Bleomycin
AraC	Cytarabin (Zytostatikum)
BCNU	Carmustin (Zytostatikum)
BEAC-Schema	Chemotherapie mit BCNU, Etoposid, AraC, Cyclophosphamid
BEAM-Schema	Chemotherapie mit BCNU, Etoposid, AraC, Melphalan
B-Zellen	Lymphozyten, vom Bursa-Äquivalent abhängig
CHOP-Schema	Chemotherapie mit Cyclophosphamid, Adriamycin, Vincristin, Prednison
CHOP-like Regime	engl. für: CHOP-ähnliche Therapie
CR	engl.: complete remission = komplette Remission
CT	Computertomographie, Röntgenuntersuchung in Schnittbildtechnik
CVB-Schema	Chemotherapie mit Carmustin, Etoposid, BCNU
Cyc	Cyclophosphamid = Endoxan (Zytostatikum)
d	engl.: day = Tag
DexaBEAM- Schema	Chemotherapie mit Dexamethason, BCNU, Etoposid, AraC, Melphalan
DHAP-Schema	Chemotherapie mit Cisplatin, AraC, Dexamethason
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation
EBV	Epstein- Barr- Virus
EFS	engl.: Event-free Survival, ereignisfreies Überleben
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCM	Chemotherapie mit Fludarabin, Cyclophosphamid, Mitoxantron
First-line Therapie	engl.: Erstlinientherapie
FISH	Fluoreszenz In Situ Hybridisierung
G-CSF	Granulozyten Kolonie Stimulierender Faktor
GLSG	German Low Grade Lymphoma Study Group
Gy	engl.: Gray = angewendete Strahlungs-dosis bei der Bestrahlung
HCV	Hepatitis C Virus
HDT	Hochdosistherapie
High risk	engl.: hohes Risiko
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
HTLV	humane T-Zell-lymphotrope Viren
IFN- α	Interferon-alpha
Intermediate risk	engl.: mittleres Risiko
IPI	Internationaler Prognostischer Index
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
LDH	Laktat-Dehydrogenase
Low risk	engl.: niedriges Risiko
MALT-Lymphom	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue-Lymphom
MHD	Morbus Hodgkin
MRD	engl.: minimal residual disease = minimale Resterkrankung
n	Anzahl
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom

NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OS	engl.: Overall Survival = Gesamtüberlebensrate
Overall Survival	engl.: Gesamtüberlebensrate
PBSZT	periphere Blutstammzellen, periphere Blutstammzelltransplantation
PCR	engl.: Polymerase chain reaction, Polymerase-Ketten-Reaktion
PFS	engl.: Progression-free Survival = progressionsfreie Überlebensrate
PR	partielle Remission
REAL-Klassifikation	engl.: Revised European and American Lymphoma Klassifikation
Rit	Rituximab, Anti-CD20, monoklonaler B-Zell Antikörper
Salvage-Therapie	engl.: bei einem Rückfall der Erkrankung eingesetztes Therapieschema
Staging	engl.: Untersuchung zur Festlegung des Stadiums (bei Tumoren)
TBI	engl.: total body irradiation = Ganzkörperbestrahlung
Translokation	Verlagerung eines Chromosomenteils in ein anderes Chromosom
T- Zellen	Leukozyten, vom Thymus abhängig
U/l	engl.: units per liter = Einheiten pro Liter
VP 16	Etoposid (Zytostatikum)
watch and wait	engl.: abwartendes Verhalten
WHO	World Health Organisation
ZNS	zentrales Nervensystem

11. Literaturverzeichnis

1. **Harris NL , Jaffe ES, Diebold J et al.** The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann.Oncol.* 1999; 10: 1419-32.
2. **Smithers DW.** Summary of papers delivered at the Conference on Staging in Hodgkin's Disease (Ann Arbor). *Cancer Res.* 1971; 31: 1869-70.
3. **Cortelazzo S, Rossi A, Bellavita P et al.** Clinical outcome after autologous transplantation in non-Hodgkin's lymphoma patients with high international prognostic index (IPI). *Ann.Oncol.* 1999; 10: 427-32.
4. **Horning SJ, Negrin RS, Hoppe RT et al.** High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma in first complete or partial remission: results of a phase II clinical trial. *Blood* 2001; 97: 404-9.
5. **Apostolidis J, Foran JM, Johnson PW et al.** Patterns of outcome following recurrence after myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 1999; 17: 216-21.
6. **Lenz G, Drey ling M, Schiegnitz E et al.** Myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission prolongs progression-free survival in follicular lymphoma: results of a prospective, randomized trial of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2004; 104: 2667-74.
7. **Liu Y, Hernandez AM, Shibata D et al.** BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994; 91: 8910-4.
8. **Korsmeyer SJ.** BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res.* 1999; 59: 1693s-700s.
9. **Brittinger G, Bartels H, Common H et al.** Clinical and prognostic relevance of the Kiel classification of non-Hodgkin lymphomas results of a prospective multicenter study by the Kiel Lymphoma Study Group. *Hematol.Oncol.* 1984; 2: 269-306.
10. **Dana BW, Dahlberg S, Nathwani BN et al.** Long-term follow-up of patients with low-grade malignant lymphomas treated with doxorubicin-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *J.Clin.Oncol.* 1993; 11: 644-51.
11. **Ott G, Katzenberger T, Lohr A et al.** Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood* 2002; 99: 3806-12.
12. **Horning S J, Rosenberg SA.** The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *N.Engl.J.Med.* 1984; 311: 1471-5.

13. **Ott OJ, Rodel C, Gr amatzki M et al.** Radiotherapy for stage I-III nodal low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Strahlenther.Onkol.* 2003; 179: 694-701.
14. **Hiddemann W, Unterhalt M, B uske C et al.** Treatment of follicular follicle centre lymphomas: current status and future perspectives. *J.Intern.Med.Suppl* 1997; 740: 55-62.
15. **Smalley RV, Andersen JW, Haw kins MJ et al.** Interferon alfa combined with cytotoxic chemotherapy for patients with non-Hodgkin's lymphoma. *N.Engl.J.Med.* 1992; 327: 1336-41.
16. **Solal-Celigny P, Lepage E, Brousse N et al.** Doxorubicin-containing regimen with or without interferon alfa-2b for advanced follicular lymphomas: final analysis of survival and toxicity in the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires 86 Trial. *J.Clin.Oncol.* 1998; 16: 2332-8.
17. **Rohatiner AZ, Gregory WM, Peterson B et al.** Meta-analysis to evaluate the role of interferon in follicular lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2005; 23: 2215-23.
18. **Portlock CS, Rosenb erg SA.** Combination chemotherapy with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone in advanced non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer* 1976; 37: 1275-82.
19. **Unterhalt M, Herrma nn R, Tiemann M et al.** Prednimustine, mitoxantrone (PmM) vs cyclophosphamide, vincristine, prednisone (COP) for the treatment of advanced low-grade non-Hodgkin's lymphoma. German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Leukemia* 1996; 10: 836-43.
20. **Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P et al.** Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004; 104: 1258-65.
21. **Dreyling M, Buske C, Hidde mann W.** [Up-to-date treatment of follicular lymphomas]. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 2005; 130: 2149-54.
22. **Forstpointner R, Drey ling M, Repp R et al.** The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2004; 104: 3064-71.
23. **A predictive model for aggressive n on-Hodgkin's l ymphoma.** The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N.Engl.J.Med.* 1993; 329: 987-94.
24. **Fisher RI, Gaynor ER, Dahlberg S et al.** Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N.Engl.J.Med.* 1993; 328: 1002-6.
25. **Fisher RI.** Treatment of aggressive non-Hodgkin' lymphomas. Lessons from the past 10 years. *Cancer* 1994; 74: 2657-61.

26. **Freedman AS, Takvorian T, Anderson KC et al.** Autologous bone marrow transplantation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma: very low treatment-related mortality in 100 patients in sensitive relapse. *J.Clin.Oncol.* 1990; 8: 784-91.
27. **Philip T, Armitage JO, Spitzer G et al.** High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation after failure of conventional chemotherapy in adults with intermediate-grade or high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N.Engl.J.Med.* 1987; 316: 1493-8.
28. **Gulati SC, Shank B, Black P et al.** Autologous bone marrow transplantation for patients with poor-prognosis lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 1988; 6: 1303-13.
29. **Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A et al.** Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N.Engl.J.Med.* 1995; 333: 1540-5.
30. **Nademanee A, Sniecinski I, Schmidt GM et al.** High-dose therapy followed by autologous peripheral-blood stem-cell transplantation for patients with Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma using unprimed and granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral-blood stem cells. *J.Clin.Oncol.* 1994; 12: 2176-86.
31. **Pettengell R, Radford JA, Morgenstern GR et al.** Survival benefit from high-dose therapy with autologous blood progenitor-cell transplantation in poor-prognosis non-Hodgkin's lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 1996; 14: 586-92.
32. **Sierra J, Conde E, Montserrat E.** Autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma in first remission. *Blood* 1993; 81: 1968-9.
33. **Shipp MA.** A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N.Engl.J.Med.* 1993 Sep 30;329(14):987-94 2006; 14: 987-94.
34. **Haïoun C, Lepage E, Gisselbrecht C et al.** Benefit of autologous bone marrow transplantation over sequential chemotherapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: updated results of the prospective study LNH87-2. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J.Clin.Oncol.* 1997; 15: 1131-7.
35. **Santini G, Salvagno L, Leoni P et al.** VACOP-B versus VACOP-B plus autologous bone marrow transplantation for advanced diffuse non-Hodgkin's lymphoma: results of a prospective randomized trial by the non-Hodgkin's Lymphoma Cooperative Study Group. *J.Clin.Oncol.* 1998; 16: 2796-802.
36. **Gianni AM, Bregni M, Siena S et al.** High-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation compared with MACOP-B in aggressive B-cell lymphoma. *N.Engl.J.Med.* 1997; 336: 1290-7.

37. **Milpied N, Deconinck E, Gaillard F et al.** Initial treatment of aggressive lymphoma with high-dose chemotherapy and autologous stem-cell support. *N.Engl.J.Med.* 2004; 350: 1287-95.
38. **Verdonck LF, van Putten WL, Hagenbeek A et al.** Comparison of CHOP chemotherapy with autologous bone marrow transplantation for slowly responding patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N.Engl.J.Med.* 1995; 332: 1045-51.
39. **Sweetenham JW, Pearce R, Philip T et al.** High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation for intermediate and high grade non-Hodgkin's lymphoma in patients aged 55 years and over: results from the European Group for Bone Marrow Transplantation. The EBMT Lymphoma Working Party. *Bone Marrow Transplant.* 1994; 14: 981-7.
40. **Cheson BD, Hornin g SJ, Coiffier B et al.** Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J.Clin.Oncol.* 1999; 17: 1244.
41. **Haas R, Moos M, Karcher A et al.** Sequential high-dose therapy with peripheral-blood progenitor-cell support in low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 1994; 12: 1685-92.
42. **Haas R, Witt B, Mohle R et al.** Sustained long-term hematopoiesis after myeloablative therapy with peripheral blood progenitor cell support. *Blood* 1995; 85: 3754-61.
43. **Maloney DG.** Mechanism of action of rituximab. *Anticancer Drugs* 2001; 12 Suppl 2: S1-S4.
44. **Boye J, Elter T, Engert A.** An overview of the current clinical use of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Ann.Oncol.* 2003; 14: 520-35.
45. **Byrd JC, Kitada S, Flinn IW et al.** The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood* 2002; 99: 1038-43.
46. **Pedersen IM, Buhl AM, Klausen P et al.** The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *Blood* 2002; 99: 1314-9.
47. **Cartron G, Watier H, Golay J et al.** From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 2004; 104: 2635-42.
48. **Ghielmini M, Rufibach K, Salles G et al.** Single agent rituximab in patients with follicular or mantle cell lymphoma: clinical and biological factors that are predictive of response and event-free survival as well as the effect of rituximab on the immune system: a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Ann.Oncol.* 2005; 16: 1675-82.

49. **Alas S, Bonavida B.** Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs. *Cancer Res.* 2001; 61: 5137-44.
50. **Alas S, Emmanouilides C, Bonavida B.** Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin.Cancer Res.* 2001; 7: 709-23.
51. **Jazirehi AR, Huerta-Yepez S, Cheng G et al.** Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor- κ B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2005; 65: 264-76.
52. **Hiddemann W, Kneba M, Dreiling M et al.** Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2005; 106: 3725-32.
53. **Marcus R, Imrie K, Belch A et al.** CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood* 2005; 105: 1417-23.
54. **Rummel MJ, Al Batran SE, Kim SZ et al.** Bendamustine plus rituximab is effective and has a favorable toxicity profile in the treatment of mantle cell and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2005; 23: 3383-9.
55. **Czuczman MS, Korczyn A, Mohr A et al.** Rituximab in combination with fludarabine chemotherapy in low-grade or follicular lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2005; 23: 694-704.
56. **Forstpointner R, Hanel A, Repp R et al.** [Increased response rate with rituximab in relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas - results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group]. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 2002; 127: 2253-8.
57. **Coiffier B, Lepage E, Briere J et al.** CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N.Engl.J.Med.* 2002; 346: 235-42.
58. **Freedman AS, Neuberg D, Mauch P et al.** Long-term follow-up of autologous bone marrow transplantation in patients with relapsed follicular lymphoma. *Blood* 1999; 94: 3325-33.
59. **Brugger W, Hirsch J, Grunebach F et al.** Rituximab consolidation after high-dose chemotherapy and autologous blood stem cell transplantation in follicular and mantle cell lymphoma: a prospective, multicenter phase II study. *Ann.Oncol.* 2004; 15: 1691-8.

60. **Horwitz SM, Negrin RS, Blume KG et al.** Rituximab as adjuvant to high-dose therapy and autologous hematopoietic cell transplantation for aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004; 103: 777-83.
61. **Ghielmini M, Schmitz SF, Cogliatti SB et al.** Prolonged treatment with rituximab in patients with follicular lymphoma significantly increases event-free survival and response duration compared with the standard weekly x 4 schedule. *Blood* 2004; 103: 4416-23.
62. **Hainsworth JD, Litchy S, Burris HA, III et al.** Rituximab as first-line and maintenance therapy for patients with indolent non-hodgkin's lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2002; 20: 4261-7.
63. **Gordan LN, Gro w WB, Pusateri A et al.** Phase II trial of individualized rituximab dosing for patients with CD20-positive lymphoproliferative disorders. *J.Clin.Oncol.* 2005; 23: 1096-102.
64. **Hainsworth JD, Litc hy S, Shaffer DW et al.** Maximizing therapeutic benefit of rituximab: maintenance therapy versus re-treatment at progression in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma - a randomized phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *J.Clin.Oncol.* 2005; 23: 1088-95.
65. **Van Oers MH, Hagenbeek A, Van Glabbeke M et al.** Chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (Mabthera) in remission induction and maintenance treatment of relapsed follicular non-Hodgkin's lymphoma: a phase III randomized clinical trial - Intergroup Collaborative Study. *Ann.Hematol.* 2002; 81: 553-7.
66. **Cohen Y, Solal-Celign y P, Polliack A.** Rituximab therapy for follicular lymphoma: a comprehensive review of its efficacy as primary treatment, treatment for relapsed disease, re-treatment and maintenance. *Haematologica* 2003; 88: 811-23.
67. **Howard OM, Gribben JG, Neuberg DS et al.** Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *J.Clin.Oncol.* 2002; 20: 1288-94.
68. **Berinstein NL.** Principles of maintenance therapy. *Leukemia Research* 2006; 30: 3-10.
69. **Berger M, Pinciario PJ.** Safety, efficacy, and pharmacokinetics of Flebogamma 5% [immune globulin intravenous (human)] for replacement therapy in primary immunodeficiency diseases. *J.Clin.Immunol.* 2004; 24: 389-96.
70. **Mangel J, Buckstein R, Imrie K et al.** Pharmacokinetic study of patients with follicular or mantle cell lymphoma treated with rituximab as 'in vivo purge' and consolidative immunotherapy following autologous stem cell transplantation. *Ann.Oncol.* 2003; 14: 758-65.

71. **Davis TA, Grillo-Lopez AJ, White CA et al.** Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *J.Clin.Oncol.* 2000; 18: 3135-43.
72. **McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK et al.** Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J.Clin.Oncol.* 1998; 16: 2825-33.
73. **Colombat P, Salles G, Brousse N et al.** Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation. *Blood* 2001; 97: 101-6.
74. **Foran JM, Gupta RK, Cunningham D et al.** A UK multicentre phase II study of rituximab (chimaeric anti-CD20 monoclonal antibody) in patients with follicular lymphoma, with PCR monitoring of molecular response. *Br.J.Haematol.* 2000; 109: 81-8.
75. **Ghielmini M, Schmitz SF, Cogliatti S et al.** Effect of single-agent rituximab given at the standard schedule or as prolonged treatment in patients with mantle cell lymphoma: a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *J.Clin.Oncol.* 2005; 23: 705-11.
76. **O'Brien SM, Kantarjian H, Thomas DA et al.** Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J.Clin.Oncol.* 2001; 19: 2165-70.
77. **Byrd JC, Murphy T, Howard RS et al.** Rituximab using a thrice weekly dosing schedule in B-cell chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma demonstrates clinical activity and acceptable toxicity. *J.Clin.Oncol.* 2001; 19: 2153-64.
78. **Piro LD, White CA, Grillo -Lopez AJ et al.** Extended Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) therapy for relapsed or refractory low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann.Oncol.* 1999; 10: 655-61.
79. **Martin S, Fischer C, Free M et al.** LightCycler-based quantitative real-time PCR monitoring of patients with follicular lymphoma receiving rituximab in combination with conventional or high-dose cytotoxic chemotherapy. *Eur.J.Haematol.* 2005; 74: 282-92.
80. **Macklis RM, Lin JY, Beresford B et al.** Cellular kinetics, dosimetry, and radiobiology of alpha-particle radioimmunotherapy: induction of apoptosis. *Radiat.Res.* 1992; 130: 220-6.
81. **Ramanarayanan J, Hernandez -Ilizaliturri FJ, Chanan-Khan A et al.** Pro-apoptotic therapy with the oligonucleotide Genasense (oblimersen sodium) targeting Bcl-2 protein expression enhances the biological anti-tumour activity of rituximab. *Br.J.Haematol.* 2004; 127: 519-30.

82. **O'Connor OA, Wright J, Moskowitz C et al.** Phase II clinical experience with the novel proteasome inhibitor bortezomib in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2005; 23: 676-84.
83. **Weng WK, Czerwinski D, Timmerman J et al.** Clinical outcome of lymphoma patients after idiotype vaccination is correlated with humoral immune response and immunoglobulin G Fc receptor genotype. *J.Clin.Oncol.* 2004; 22: 4717-24.
84. **Neumann F, Harmsen S, Martin S et al.** Rituximab long-term maintenance therapy after autologous stem cell transplantation in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ann.Hematol.* 2006.
85. **Golay J, Xiao YM, Di Gaetano N, et al.** Fludarabine synergises with anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in complement mediated cell lysis. *Blood.* 2001;96:339a. Abstract 1463.
86. **Kaplan EL, Meier P et al.** Nonparametric estimation from incomplete observation. *J.Am.Stat.Assoc.* 1958; 53: 457-481.
87. **Gribben JG, Neuberg D, Freedman AS et al.** Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *Blood.* 1993;81:3449-3457.
88. **Kneba M, Eick S, Herbst H et al.** Frequency and structure of t(14;18) major breakpoint regions in non-Hodgkin's lymphomas typed according to the Kiel classification: analysis by direct DNA sequencing. *Cancer Res.* 1991;51:3243-3250.
89. **Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV et al.** The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques.* 1997;22:176-181.
90. **Moos M, Schulz R, Martin S et al.** The remission status before and the PCR status after high-dose therapy with peripheral blood stem cell support are prognostic factors for relapse-free survival in patients with follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia.* 1998;12:1971-1976.
91. **Yunis JJ, Frizzera G, Oken MM et al.** Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N.Engl.J.Med.* 1987;316:79-84.
92. **Cleary ML, Sklar J.** Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 1985;82:7439-7443.
93. **Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P et al.** Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell.* 1985;41:899-906.

94. **Weiss LM, Warnke RA, Sklar J et al.** Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N.Engl.J.Med.* 1987;317:1185-1189.
95. **Albinger-Hegy A, Hochreutener B, Abdou MT et al.** High frequency of t(14;18)-translocation breakpoints outside of major breakpoint and minor cluster regions in follicular lymphomas: improved polymerase chain reaction protocols for their detection. *Am.J.Pathol.* 2002;160:823-832.
96. **Kronenwett R, Martin S, Niederste-Hollenberg A et al.** Molekulare Diagnostik bei Patienten mit follikulärem Non-Hodgkin-Lymphom. *Klinische Onkologie 2000/01*, 2000:106-111.
97. **Cleary ML, Smith SD, Sklar J.** Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell.* 1986;47:19-28.
98. **Yang E, Korsmeyer SJ.** Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood.* 1996;88:386-401.
99. **Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E et al.** Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.* 1985;228:1440-1443.
100. **Reed JC.** Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J.Cell.Biol.* 1994;124:1-6.
101. **Limpens J, Stad R, Vos C et al.** Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood.* 1995;85:2528-2536.
102. **Regazzi MB, Iacono I, Avanzini MA et al.** Pharmacokinetic behavior of rituximab: a study of different schedules of administration for heterogeneous clinical settings. *Ther.Drug.Monitor.* 2005 Dec;27(6):785-92.
103. **Weiss LM, Warnke RA, Sklar J et al.** Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N.Engl.J.Med.* 1987 Nov; 317 (19): 1185-1189.
104. **Kauppi M, Pukkala E.** Elevated incidence of hematologic malignancies in patients with rheumatoid arthritis (Finland). *Cancer Causes Control* , 1997, 8: 201–204.
105. **Mellemkjaer L, Linet MS.** Rheumatoid arthritis and cancer risk. *Eur.J.Cancer*, 1996, 32A, 10: 1753–1757.
106. **Mellemkjaer L, Andersen V.** Non-Hodgkin's lymphoma and other cancers among a cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 1997, 40, 4: 761–768.
107. **Green P, Fleischauer A.** Risk of malignancy in patients with celiac disease. *Am.J.Med.* 2003, 115: 191– 195.

108. **Sigurgeirsson B, Agnarsson B.** Risk of lymphoma in patients with dermatitis herpetiformis. *BMJ*, 1994, 308: 13–15.
109. **Filipovich AH, Mathur A.** Primary immunodeficiencies: genetic risk factors for lymphoma. *Cancer. Res.* 1992, 52: 5465s–5467s.
110. **Dal Maso L, Franceschi S.** Risk of cancer in persons with AIDS in Italy, 1985–1998. *Br.J.Cancer*, 2003, 89: 94–100.
111. **Birkeland SA, Storm HH.** Cancer risk after renal transplantation in the nordic countries, 1964– 1986. *Int.J.Cancer*, 1995, 60: 183–189.
112. **Cleghorn FR, Manns A.** Effect of human Tlymphotropic virus type I infection on non- Hodgkin´s lymphoma incidence. *J.Natl.Cancer Inst.* 1995, 87: 1009–1014.
113. **Weng W-K, Levy S.** Hepatitis C virus and lymphomagenesis. *Leuk.Lymphoma*, 2003, 44(7): 1113– 1120.
114. **Goodlad JR, Davidson MM.** Primary cutaneous B-cell lymphoma and *Borrelia burgdorferi* infection in patients from the highlands of Scotland. *Am.J.Surg.Patho.* 2000, 1 24(9): 1279–1285.
115. **Eck M, Schmausser B.** Malt-type lymphoma of the stomach is associated with *Helicobacter pylori* strains expressing the Cag A protein. *Gastroenterology*, 1997, 112: 1482–1486.
116. **Hardell L, Eriksson M.** A case control study of NHL and exposure to pesticides. *Cancer*, 1999, 85: 1353–1360.
117. **Hardell L, Eriksson M.** Exposure to phenoxyacetic acids, chlorophenols, or organic solvents in relation to histopathology, stage and anatomical localisation of NHL. *Cancer.Res.* 1994, 54: 2386–2389.
118. **Mc Michael AJ, Giles GG.** Have increases in solar ultraviolet exposure contributed to the rise in incidence of non-Hodgkin´s lymphoma? *Br.J.Cancer*, 1996, 73: 945–950.
119. **Young LS, Murray PG.** Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumors. *Oncogene*, 2003, 22: 5108–5121.
120. **Robert-Koch-Institut (RKI):** Gesundheitsberichterstattung und Epidemiologie: Dachdokumentation Krebs (2007) Interaktive Datenbankabfragen.
121. **Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut (RKI)** (2006) Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends (5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe).

122. **Schulz H, Bohlius JF, Trelle S et al.** Immunochemotherapy with rituximab and overall survival in patients with indolent or mantle cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *J.Natl.Cancer.Inst.* 2007, May 2; 99(9): 706–714122.
123. **Nickenig C, Drey ling M, Hoster E et al.** CHOP improves Response Rates but not Survival and has a lower Hematologic Toxicity as compared to MCP in follicular and Mantle Cell Lymphomas – Results of a Prospective Randomized Trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Cancer*, 2006, 107(5):1014–1022.
124. **Nickenig C, Drey ling M, H oster E et al.** Initial chemotherapy with mitoxantrone, chlorambucil, prednisone impairs the collection of stem cells in patients with indolent lymphomas – results of a randomized comparison by the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Ann. Oncol.* 2007, 18: 136–142.
125. **Leblond V, Levy V, Maloisel F et al.** French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia and acroglobulinemia. Multicenter, randomized comparative trial of fludarabine and the combination of cyclophosphamide-doxorubicin-prednisone in 92 patients with Waldenstrom macroglobulinemia in first relapse or with primary refractory disease. *Blood*, 2001, Nov 1; 98(9): 2640–2644.
126. **Tamburini J, Levy V, Chaleteix C et al.** Fludarabine plus cyclophosphamide in Waldenstrom's macroglobulinemia: results in 49 patients. *Leukemia*, 2005, Oct; 19(10): 1831–1834.
127. **Noronha V, Fy nan TM, Duff y T.** Flare in neuropathy following rituximab therapy for Waldenstrom's macroglobulinemia. *J.Clin.Oncol.* 2006, 24(1): e3.
128. **Buske Ch, Drey ling M, Eimermacher H et al.** Combined Immuno-Chemotherapy (R-CHOP) Results in Significantly Superior Response Rates and Time to Treatment Failure in First Line Treatment of Patients with Lymphoplasmacytoid/ic Immunocytoma (LP-IC) – Results of a Prospective Randomized Trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego. *Blood*, 2004, 104 (11) Abstract 162.
129. **Treon SP, Gertz MA, Dimopoulos M et al.** Update on treatment recommendations from the 3. international workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Blood*, 2006, 107: 3442–3446.
130. **Czuczman MS, Weaver R, Alkuzw eny B et al.** Prolonged clinical and molecular remission in patients with low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma treated with rituximab plus CHOP: 9-year follow-up. *J.Clin.Oncol.* 2004, Dec 1; 22(23): 4711–4716.

131. **Buske C, Kneba M, Lengfelder E et al.** Front-Line combined immuno-chemotherapy (R-CHOP) significantly improves the time to treatment failure and overall survival in elderly patients with advanced stage follicular lymphoma – results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Blood*, 2006, 108 (suppl 11) 482: 146a.
132. **Herold M, Haas A, Srock S et al.** Rituximab added to first-line mitoxantrone, chlorambucil, and prednisolone chemotherapy followed by interferon maintenance prolongs survival in patients with advanced follicular lymphoma: an East German Study Group Hematology and Oncology Study. *J.Clin.Oncol.* 2007, 25: 1986–1992.
133. **Foussard C, Mou nier N, Van Ho of A et al.** Update of the FL2000 randomized trial combining rituximab to CHVP-Interferon in follicular lymphoma (FL) patients. *J.Clin.Oncol.* 2006, 24: 7508a.
134. **Kaminski MS et al.** 131I-Tositumomab Therapy as Initial Treatment for Follicular Lymphoma. *N.Engl.J.Med.* 2005, 352: 441–449.
135. **Yang E, Korsmey er SJ.** Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*, 1996, 88: 386–401.
136. **Press O, Unger JM, Braziel RM et al.** Phase II trial of CHOP chemotherapy followed by tositumomab/ iodine I-131 tositumomab for previously untreated follicular non-Hodgkin's lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2006, 24: 4143–4149.
137. **Forstpointner R, Unt erhalt M, Drey ling M et al.** Maintenance therapy with rituximab leads to a significant prolongation of response duration after salvage therapy with a combination of rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) in patients with recurring and refractory follicular and mantle cell lymphomas: Results of a prospective randomized study of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Blood*, 2006, 108: 4003–4008.
138. **Witzig TE, White CA, Flinn IW et al.** Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus Rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed Bcell non-Hodgkin's lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2002, 20: 2453–2463.
139. **Rohatiner AZ, Nadler L, Davies AJ et al.** Myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma at the time of second or subsequent remission: long-term follow-up. *J.Clin.Oncol.* 2007, Jun 20; 25(18): 2554–2559.
140. **Schouten HC, Qian W, Kvaloy S et al.** Highdose therapy improves progression-free survival and survival in relapsed follicular non-Hodgkin's lymphoma: results from the randomized European CUP trial. *J.Clin.Oncol.* 2003, 21(21): 3918–3927.

141. **Deconinck E, Foussard C, Milpied N et al.** High dose therapy followed by autologous purged stem cell transplantation and doxorubicin based chemotherapy in patients with advanced follicular lymphoma: a randomized multicenter study by the GOELAMS. *Blood*, 2005, 105: 3817–3823.
142. **Sebban C, Mounier N, Brousse N et al.** Standard chemotherapy with interferon compared with CHOP followed by high-dose therapy with autologous stem cell transplantation in untreated patients with advanced follicular lymphoma: the GELF-94 randomized study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood*, 2006, Oct 15; 108(8): 2540–2544.
143. **Hagberg H, Gisselbrecht C.** Randomised phase III study of R-ICE versus R-DHAP in relapsed patients with CD20 diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) followed by high-dose therapy and a second randomisation to maintenance treatment C. Schmidt, F. Schneller, C. Nickenig et al. 138 with rituximab or not: an update of the CORAL study. *Ann.Oncol.* 2006, 17 (suppl 4): 31–32.
144. **Caballero MD, Perez-Simon JA et al.** Highdose therapy in diffuse large cell lymphoma: results and prognostic factors in 452 patients from the GEL-TAMO Spanish Cooperative Group. *Ann.Oncol.*, 2003, 14(1): 140–151.
145. **Tedder TF, Engel P.** CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol.Today.* 1994;15: 450-454.
146. **Riley JK, Sliw kowski MX.** CD20: a gene in search of a function. *Semin.Oncol.* 2000;27:17-24.
147. **Perkins S.** B-cell non-hodgkin lymphoma (NHL) in children and adolescents. *Annals of Oncology.* 2002.
148. **Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK et al.** Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent Bcell lymphoma. *Blood.* 1994;84:2457-2466.
149. **Johnson P, Glennie M.** The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells. *Semin.Oncol.* 2003; 30: 3-8.
150. **Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T et al.** Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood.* 2000;95:3900-3908.
151. **Flieger D, Renoth S, Beier I et al.** Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse human monoclonal antibody IDEC-C2B8 in CD20-expressing lymphoma cell lines. *Cell.Immunol.* 2000; 204: 55-63.
152. **Manches O, Lui G, Chaperot L et al.** In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non- Hodgkin lymphomas. *Blood.* 2003;101:949-954.

153. **Weng WK, Levy R.** Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2001;98:1352-1357.
154. **Chow KU, Sommerlad WD, Boehrer S et al.** Anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8, rituximab) enhances efficacy of cytotoxic drugs on neoplastic lymphocytes in vitro: role of cytokines, complement, and caspases. *Haematologica*. 2002;87:33-43.
155. **Harjunpaa A, Junnikkala S, Meri S.** Rituximab (anti-CD20) therapy of B-cell lymphomas: direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms. *Scand.J.Immunol*. 2000; 51: 634- 641.
156. **Golay J, Lazzari M, Facchinetti V et al.** CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood*. 2001;98:3383-3389.
157. **Bellosillo B, Villamo r N, Lopez-Guillermo A et al.** Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood*. 2001;98:2771-2777.
158. **Bohen SP, Troy anskaya OG, Alter O et al.** Variation in gene expression patterns in follicular lymphoma and the response to rituximab. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 2003;100:1926-1930.
159. **Clynes RA, Towers TL, Presta LG et al.** Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat.Med*. 2000;6:443-446.
160. **Reff ME, Carner K, Chambers KS et al.** Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994;83:435-445.
161. **Shan D, Ledbetter JA, Press OW.** Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer.Immunol Immunother*. 2000;48:673-683.
162. **Shan D, Ledbetter JA, Press OW.** Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood*. 1998;91:1644-1652.
163. **Cragg MS, French RR, Glennie MJ.** Signaling antibodies in cancer therapy. *Curr.Opin.Immunol*. 1999;11:541-547.
164. **Hofmeister JK, Cooney D, Coggeshall KM.** Clustered CD20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3- dependent apoptosis. *Blood.Cells.Mol.Dis*. 2000;26:133-143.
165. **Taji H, Kagami Y, Okada Y et al.** Growth inhibition of CD20-positive B lymphoma cell lines by IDEC-C2B8 anti-CD20 monoclonal antibody. *Jpn.J.Cancer.Res*. 1998;89:748-756.

166. **Ghetie MA, Bright H, Vitetta ES.** Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti- CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood*. 2001;97:1392-1398.
167. **Alas S, Emmanouilides C, Bonavida B.** Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in downregulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin.Cancer.Res*. 2001;7:709-723.
168. **Demidem A, Lam T, Alas S et al.** Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer.Biother.Radiopharm*. 1997;12:177-186.
169. **Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C et al.** Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2- associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood*. 2003.
170. **Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, Bodkin DJ et al.** IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *J.Clin.Oncol*. 1997;15:3266-3274.
171. **O'Brien SM, Kantarjian H, Thomas DA et al.** Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J.Clin.Oncol*. 2001;19:2165-2170.
172. **Hoffmann- La Roche AG.** Mabthera Produktmonographie. 2001. (Book, Monograph).
173. **Vose JM, Link BK, Grossbard ML et al.** Phase II study of rituximab in combination with chop chemotherapy in patients with previously untreated, aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J.Clin Oncol*. 2001;19:389-397.
174. **Ganjoo KN, An CS, Robertson MJ et al.** Rituximab, bevacizumab and CHOP (RA-CHOP) in untreated diffuse large B-cell lymphoma: safety, biomarker and pharmacokinetic analysis. *Leuk.Lymphoma*. 2006 Jun;47(6):961-2.

12. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Harmsen, Stefani
Geburtsdatum/-ort	10.05.1981 in Düsseldorf
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Religion	katholisch

Schulische Ausbildung

1987-1991	Ferdinand Heye Grundschule, Düsseldorf
1991-2000	Marie–Curie Gymnasium, Düsseldorf
2000	Abitur

Studium

Oktober 2000	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich Heine Universität in Düsseldorf
Herbst 2002	Ärztliche Vorprüfung
Herbst 2003	1. Staatsexamen
Herbst 2005	2. Staatsexamen
Oktober 2005– September 2006	Praktisches Jahr: - 1. Tertial: Pädiatrie, UKD Düsseldorf - 2. Tertial: Innere Medizin, UKD Düsseldorf - 3. Tertial: Chirurgie, UKD Düsseldorf
November 2006	3. Staatsexamen
Dezember 2006	Approbation als Ärztin
Seit Januar 2007	Assistenzärztin in der Klinik für Allgemeine Pädiatrie des Universitätsklinikums in Düsseldorf

Promotionsarbeit

Herbst 2005	Beginn der Promotionsarbeit in der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Immunologie unter der Leitung von Univ. Prof. Dr. med. R. Haas zum Thema: „Erhaltungstherapie mit Rituximab nach autologer peripherer Blutstammzelltransplantation bei Patienten mit B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen“
-------------	--

Düsseldorf, im Mai 2010