

Aus der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Universitätsklinikum Düsseldorf

Zentrum für Kinderheilkunde

Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. U. Göbel

**Glycosylierter versus nicht-glycosylierter
Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF)
- Untersuchungen zur Dosisäquivalenz**

Ergebnisse einer prospektiven randomisierten Monocenterstudie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stephan Silbermann

2001

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez. Univ.-Prof. Dr. med. Häussinger, Dekan
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Nürnberger
Korreferent: Prof. Dr. med. Willnow

Inhalt

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung | 4 |
| 1.1 Endogenes G-CSF und Neutropenie | 5 |
| 1.2 Dosierung, Applikation und Nebenwirkungen der G-CSF Therapie | 5 |
| 1.3 Struktur des natürlichen und der rekombinanten G-CSF Moleküle | 6 |
| 1.4 Funktionelle Bedeutung der Glycosylierung unter besonderer Berücksichtigung des rhG-CSF Moleküls | 7 |
| 1.5 Studien zum Wirksamkeitsvergleich von Lenograstim und Filgrastim | 8 |
| 2. Fragestellung | 11 |
| 3. Patienten, Materialien und Methoden | 12 |
| 3.1 Studiendesign | 12 |
| 3.2 Meßparameter | 13 |
| 3.3 CRP- und Blutbildbestimmung | 14 |
| 3.4 Durchflußzytometrie | 15 |
| 3.5 Statistische Auswertung | 17 |
| 4. Ergebnisse | 18 |
| 4.1 Patienten | 18 |
| 4.2 Häufigkeit, Schwere und Dauer des Zelltiefs | 18 |
| 4.3 Dauer der Wachstumsfaktorentherapie | 19 |
| 4.4 Häufigkeit, Schwere und Dauer von neutropenischen Infektionen und infektionsassoziierten klinischen Ereignissen | 24 |
| 4.5 Stammzellmobilisation | 24 |
| 5. Diskussion | 29 |
| 5.1 Kritische Wertung der Ergebnisse | 29 |
| 5.2 Vergleich mit Vergleichsstudien anderer Arbeitsgruppen | 31 |
| 5.3 Bedeutung der Ergebnisse für die Behandlung der Neutropenie | 36 |
| 6. Liste der verwendeten Abkürzungen | 38 |
| 7. Literatur | 39 |
| 8. Lebenslauf | 50 |
| 9. Zusammenfassung | 51 |

1. Einleitung

Der menschliche Granulozytenkolonie-stimulierende Faktor (G-CSF) ist ein natürlich vorkommender Wachstumsfaktor, dessen Haupteffektorzellen die in Richtung der Granulozytenzellreihe differenzierten hämatopoetischen Blutstammzellen, die Kolonie-formende Einheit - Granulozyt (CFU-G) sind (1,2). Diese Zellen regt G-CSF zur Proliferation und Differenzierung zu Granulozyten an. Diese Effekte sind entscheidend für die in zahlreichen Studien belegte Fähigkeit exogenen G-CSFs, Länge und Schwere der chemotherapieinduzierten Neutropenie zu vermindern. Auf diese Weise kann G-CSF Häufigkeit und Schweregrad neutropenischer Infektionen reduzieren (3-5) und so sowohl die Morbidität senken, aber auch Behandlungskosten einsparen (6-10). Mit Erfolg wird G-CSF auch bei idiopathischen Störungen der Granulozytenreifung wie der zyklischen Neutropenie eingesetzt (11-14).

G-CSF reguliert des weiteren eine Reihe von Funktionen des reifen neutrophilen Granulozyten, unter anderem Chemotaxis, Migration und Superoxidproduktion (15-22). G-CSF wird zur Verbesserung der Granulozytenfunktion insbesondere bei primären oder sekundären Störungen der Superoxidproduktion eingesetzt, wie bei der septischen Granulomatose (chronic granulomatous disease; CGD-Syndrom) (23-26) oder bei der Glykogenose 1b (27-30).

Eine dritte, im klinischen Alltag sehr bedeutende Fähigkeit des G-CSF ist die Mobilisation hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark in das Blut, sowohl bei gesunden Freiwilligen (31,32) als auch bei mit Chemotherapie behandelten Patienten (33,34). Die mobilisierten Stammzellen können durch Apherese aus dem Blut angereichert werden zum Zweck der autologen oder allogenen Stammzelltransplantation. Der Mechanismus der G-CSF induzierten Stammzellmobilisation ist bisher nicht geklärt; wahrscheinlich spielt die Modulation von Adhäsionsmolekülen eine Rolle (35).

Diesen sehr wünschenswerten Effekten des G-CSF stehen in jüngster Zeit gewonnene Erkenntnisse entgegen, wonach das G-CSF durch Hemmung des

Interleukin 12 (36), des zentralen aktivierenden Botenstoffes der T-Zell-Aktivierung (37), suppressiv auf das Immunsystem wirken könnte. Es wird derzeit postuliert, G-CSF könnte die Reifung der Lymphozytenfunktion nach allogener Stammzelltransplantation verzögern und so das Risiko für oft gefährliche Viruserkrankungen erhöhen (36).

1.1 Endogenes G-CSF und Neutropenie

Mäuse, bei denen das G-CSF-Gen durch gezielte Zerstörung ausgeschaltet wird („G-CSF Knock-out Mäuse“), zeichnen sich durch eine chronische Neutropenie sowie durch eine gestörte Neutrophilenmobilisation aus (38). Diese Befunde zeigen, daß G-CSF notwendig ist für die normale quantitative Homöostase während der steady-state Granulozytopoese, aber auch für die Aktivierung der Notfallgranulozytopoese bei einer Infektion (38). Diese Thesen werden bestätigt durch Messungen an gesunden und neutropenischen Menschen mit und ohne Infektionen. Diese belegen, daß endogenes G-CSF während der Neutropenie und bei Infektionen in Abhängigkeit von der Stärke der Neutropenie oder Infektion vermehrt sezerniert wird (39-41). Eine maximale Stimulation der G-CSF Synthese wurde bei neutropenischen Patienten mit schweren Infektionen gefunden (39).

1.2 Dosierung, Applikation und Nebenwirkungen der G-CSF Therapie

Zur Behandlung der Neutropenie wird rhG-CSF in Dosen zwischen 5 und 10 µg/kgKG pro die, zur Stammzellmobilisation auch bis 20 µg/kgKG pro die gegeben (42-47). Niedrigdosiertes G-CSF findet Anwendung zur Verbesserung der Superoxidproduktion, üblich sind Dosen um 1 µg/kgKG*die (22). Der Wert dieser niedrigdosierten G-CSF Therapie ist allerdings nicht unumstritten, und G-CSF hat für diese Indikation keine Zulassung erlangt. G-CSF wird durch einmal tägliche subcutane Gabe oder als intravenöse Dauerinfusion appliziert (43-47).

Die Verträglichkeit von rhG-CSF ist im allgemeinen gut. Die häufigste Nebenwirkung, unter der nach Literaturangaben bis zu 80% der Behandelten leiden, sind Knochenschmerzen (48-53). Der zelluläre Hintergrund für diese Nebenwirkung ist nicht bekannt. Im Serum dieser Patienten waren das Osteocalcin erniedrigt und die

knochenspezifische alkalische Phosphatase erhöht meßbar (48). Dieses Muster entspricht dem von Patienten mit osteolytischen Knochenmetastasen, weshalb postuliert wurde, daß G-CSF eine Aktivierung von Osteoblasten induzieren könnte (48).

Für rekombinanten Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (rhGM-CSF), der ebenfalls eine Verkürzung des Zelltiefs nach Chemotherapie bewirkt (54), ist die Induktion von neutralisierenden und allergieauslösenden Antikörpern berichtet worden (55,56). Hiervon betroffen waren insbesondere Aminosäurepositionen, die bei dem natürlichen, nicht aber bei dem rekombinanten Molekül durch Glycosylierung geschützt waren (56). Dieser Befund könnte Implikationen für die relative Potenz und Verträglichkeit von glycosylierten und nicht-glycosylierten Wachstumsfaktoren haben, jedoch ist für rhG-CSF, auch für das nicht-glycosylierte Filgrastim, eine Antikörperinduktion nicht beschrieben (57,58).

Ursprüngliche Befürchtungen, G-CSF könne durch Proliferationsreize auf genetisch alterierte hämatopoetische Stamm- oder Vorläuferzellen zu deren klonaler Expansion und somit zur Manifestation einer Hämoblastose führen, ließen sich nicht bestätigen (59). Dies hatte zur Folge, daß G-CSF auch in Therapieprotokolle für die Behandlung der akuten nicht-lymphoblastischen Leukämie (AML) sowohl zur Verkürzung der Zelltiefdauer als auch für die autologe Stammzellmobilisation eingeführt werden konnte.

1.3 Struktur des natürlichen und der rekombinanten G-CSF Moleküle

Die Aufreinigung und molekulare Klonierung des G-CSF Proteins gelang unabhängig voneinander mehreren Arbeitsgruppen in der Mitte der achtziger Jahre (59,60). Das G-CSF Gen (60,61) liegt auf Chromosom 17 q11-22 (62,63). Es besteht aus 5 Exons, die über einen Locus von 2,3 kB verteilt sind. Das Gen kodiert für ein Protein von 174 Aminosäuren Länge (64).

Das natürliche G-CSF Molekül ist ein hydrophobes Glycoprotein, das in der Elektrophorese mit der 24-25 kDa-Fraktion (64) wandert. Es besteht aus vier

antiparallelen, mit Schleifen verbundenen Helices und enthält eine interne Disulfid-Brücke, die für seine Wirkung notwendig zu sein scheint (65). Der an der Position 133 gelegene Threoninrest ist O-glycosyliert (66,67).

Das erste rekombinante humane (rh)G-CSF, Filgrastim, wurde 1991 in den USA für die klinische Anwendung an mit Chemotherapie behandelten Patienten zugelassen (93). Filgrastim wird in *E. coli* Bakterien erzeugt. Anders als das natürliche G-CSF enthält Filgrastim keine Kohlenhydratkette. Ansonsten ist es dem natürlichen Molekül in Aminosäuresequenz und sterischer Konformation allerdings sehr ähnlich. Mit diesem Molekül liegen die größten klinischen Erfahrungen vor. Ein zweites rhG-CSF, Lenograstim, erlangte in Europa und Japan 1993 seine Zulassung (93). Dadurch, daß es in immortalisierten Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters erzeugt wird, konnte eine dem natürlichen G-CSF identische Kohlenhydratkette eingeführt werden (68).

1.4 Funktionelle Bedeutung der Glycosylierung unter besonderer Berücksichtigung des rhG-CSF Moleküls

Die Glycosylierung von Proteinen kann deren physikalische oder biochemische Stabilität verbessern, außerdem das Rezeptorbindungsverhalten beeinflussen (69). Eine Vorhersage, ob durch Glycosylierung die Aktivität eines Proteins positiv oder negativ beeinflusst werden wird, ist jedoch nicht möglich. So konnte für GM-CSF gezeigt werden, daß die nicht-glycosylierte Form trotz einer um die Hälfte reduzierten Serumhalbwertszeit (70) eine ebenso große (70) oder größere (71) biologische Aktivität besitzt als natürliches oder glycosyliertes rekombinantes GM-CSF. Umgekehrt ist für rekombinantes humanes Erythropoetin (rhEPO) die Glycosylierung für die in-vivo Wirkung essentiell, obwohl in vitro das nicht-glycosylierte rhEPO erheblich größere Kolonie-stimulierende Potenz besaß als das glycosylierte (72). Hier wird angenommen, daß die Glycosylierung das rhEPO vor vorzeitiger Proteinolyse schützt.

Wie oben beschrieben ist Lenograstim somit dem natürlichen G-CSF ähnlicher als Filgrastim. Die klinische Bedeutung dieses Umstandes kann jedoch bisher nicht eingeschätzt werden. Einige Beispiele belegen, daß „humanidentisch“ nicht

gleichbedeutend ist mit „besser wirksam“. Dies gilt sowohl für natürliche, xenogene Wachstumsfaktoren wie das Lachscalctonin (73,74) als auch für semisynthetische, wie das nicht-glycosylierte rhGM-CSF (71) oder ein mutiertes G-CSF (75). Daß die Glycosylierung für die biologische Aktivität von rhG-CSF nicht erforderlich ist, wird durch in-vitro-, aber auch in-vivo-Untersuchungen eindeutig belegt (49,76). Die Kohlenhydratgruppe scheint allerdings dem G-CSF Molekül bei ungünstigem pH-Wert größere Stabilität zu verleihen (67), indem sie die Sulfhydrylgruppe des Cystein an Position 17 abschirmt (77).

1.5 Studien zum Wirksamkeitsvergleich von Lenograstim und Filgrastim

Für beide Medikamente konnte unabhängig der Sicherheits- und Wirksamkeitsnachweis geführt werden (3-5,42,78,79). Vergleichende Studien gibt es jedoch wenige.

In in-vitro Untersuchungen wurde bei gleichen Dosen wiederholt eine mindestens 25% größere proliferationsinduzierende Aktivität des Lenograstim im Vergleich zum Filgrastim gezeigt (76,80-82). Hierbei wurde gewöhnlich die Wachstumskinetik von Kolonie-Assays gemessen. Ob dieser Unterschied allein eine Konsequenz der größeren in-vitro Stabilität des Lenograstim ist, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Auf diesen Daten zur in-vitro Potenz des G-CSF basiert das von Okabe und Mire-Sluis postulierte Konzept „bioäquivalenter“ G-CSF Dosen, wobei für Filgrastim eine Aktivität von 100.000 iE/ μ g, für Lenograstim eine Aktivität von 127.760 iE/ μ g angegeben wird (75,80,83).

Im Gegensatz zu der eindeutig erscheinenden in-vitro Situation haben Tierversuche widersprüchliche Ergebnisse gezeigt bezüglich der Frage, was äquivalente Dosen von Lenograstim und Filgrastim sein könnten (84,85).

Die bisherigen klinischen Untersuchungen haben lediglich die Effizienz der Stammzellmobilisation durch die beiden Medikamente verglichen. Watts et al. (51) haben in ihrer Phase I/II Studie Pharmakokinetik und Stammzellmobilisation bei gesunden Freiwilligen untersucht. Sehr ähnliche pharmakokinetische Daten wurden

beschrieben, woraus abgeleitet werden kann, daß sich die größere chemische Stabilität des Lenograstim in vitro nicht positiv auf die Bioverfügbarkeit in vivo auszuwirken scheint. Des weiteren konnte keine Korrelation zwischen Pharmakokinetik und Mobilisationserfolg gezeigt werden. Bezüglich der Stammzellmobilisation konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Medikamenten gefunden werden, obwohl die maximal erreichte Leukozytenzahl nach Lenograstimgabe geringfügig, allerdings statistisch signifikant, über der bei den Filgrastim-behandelten Probanden lag.

Eine ähnliche Studie (Phase I/II, randomisiert mit cross-over Design) wurde von Høglund et al. (86) durchgeführt. In dieser Untersuchung war bei gleicher Dosis die Stammzellausbeute bei Lenograstim-behandelten Patienten signifikant größer als bei Filgrastim.

In einer retrospektiven, nicht-randomisierten Studie verglichen Schiødt et al. (87) die Mobilisation CD34+ Zellen bei Cyclophosphamid-behandelten Patienten. Bei gleichen Dosen war die Ausbeute bei beiden Medikamenten nicht unterschiedlich. De Arriba et al. (88) führten eine ähnliche Studie (Phase III prospektiv) bei Frauen mit Mammakarzinom durch. In dieser Studie wurden allerdings nicht gleiche, sondern vermeintlich in etwa „bioäquivalente“ Dosen verwendet, d.h. es wurde 20% mehr Filgrastim als Lenograstim gegeben. Die (höher dosierten) Filgrastim-Patienten benötigten rhG-CSF geringfügig kürzer und brauchten weniger Apheresen, bis eine ausreichende Stammzellzahl asserviert werden konnte, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant. Eine Studie, die das Engraftment Lenograstim und Filgrastim mobilisierter Progenitorzellen vergliche, gibt es nicht.

Eine eindeutige Bestätigung der im in-vitro Experiment gefundenen, mindestens 25% größeren Potenz des Lenograstim konnte also weder im Tierversuch noch in der klinischen Prüfung gefunden werden.

Es liegt bis heute keine Studie vor, die die zweite klinisch relevante Wirkung des rhG-CSF vergleichend untersucht, nämlich das Potenzial zur Verkürzung der Neutropenie und der Morbidität an neutropenischen Infektionen, der

Krankenhaustage und der Antibiotikabehandlung. In einer prospektiven, randomisierten crossover-Studie haben wurden daher Blutbild, C-reaktives Protein (CRP) und infektionsbedingte klinische Ereignisse bei Patienten mit Wachstumsfaktorenbehandlung mit Lenograstim oder Filgrastim nach cytoreduktiver Chemo-/Radiochemotherapie verglichen. Aufgrund der bislang wenig überzeugenden Hinweise auf eine erhöhte in-vivo Potenz des Lenograstim wurden identische rhG-CSF Dosen verwendet.

2. Fragestellung

Diese Untersuchung sollte für Kinder mit soliden Tumoren folgende Fragen beantworten:

- 1) Besteht bei gleicher Dosis ein Unterschied zwischen glycosyliertem rhG-CSF (Lenograstim) und nicht-glycosyliertem rhG-CSF (Filgrastim) bezüglich der Häufigkeit, Schwere und Dauer der chemotherapieinduzierten Neutropenie?
- 2) Besteht ein Unterschied bezüglich der Häufigkeit, Schwere und Dauer von neutropenischen Infektionen beziehungsweise infektionsassoziierter klinischer Ereignisse?
- 3) Besteht ein Unterschied bezüglich der Mobilisation CD34/CD45 doppelpositiver Zellen (hämatopoetischer Stammzellen)?

3. Patienten, Materialien und Methoden

3.1 Studiendesign

3.1.1 Patienten

Zwischen 8/97 und 8/99 wurden 11 Patienten, 3 weibliche und 8 männliche, im Alter zwischen 3 und 29 Jahren (Median: 14 Jahre) in die Studie rekrutiert. Die Studie wurde als Monocenterstudie an der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Arbeit wurde gefördert von der Firma Rhône-Poulenc Rorer. Diese prospektive Studie stand allen Patienten offen, die nach klinischer Einschätzung ein Risiko von mindestens 50% hatten, im Anschluß an ihre Chemotherapie eine schwere Neutropenie zu entwickeln, oder die im Rahmen ihres Chemotherapieprotokolls routinemäßig G-CSF erhalten sollten. Angaben zu Grunddaten, Krankheit und Chemotherapie der einzelnen Patienten sind in Tabelle 1 dargestellt (Tab. 1). Ein schriftliches Einverständnis wurde von allen in die Studie eingeschlossenen Patienten beziehungsweise von deren Erziehungsberechtigten eingeholt. Die Durchführung der Studie entsprach den aktuellen Maßgaben der Erklärung von Helsinki. Sie war von der klinikinternen Ethikkommission genehmigt worden unter der Bedingung, daß keine zusätzlichen Blutabnahmen oder Ambulanzkontakte notwendig werden dürften. Dreiunddreißig Therapiezyklen mit rhG-CSF wurden im Rahmen der Studie ausgewertet.

3.1.2 Behandlung

Die Behandlung mit rhG-CSF wurde einen Tag nach Ende des Chemotherapieblocks begonnen. G-CSF wurde einmal täglich als subcutane Injektion appliziert in einer Dosis von $250 \mu\text{g}/\text{m}^2 \pm 5\%$. RhG-CSF wurde gegeben, bis nach Ende des erwarteten Leukozytennadir an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine Leukozytenzahl (WBC) von $>1500/\mu\text{l}$ gemessen worden war.

3.1.3 Studiendesign

Die Studie war geplant als prospektive, randomisierte, cross-over, Monocenter Phase-III Studie. Die Patienten wurden nach wiederholten Chemotherapiezyklen alternierend mit Lenograstim (Granocyte[®], Rhône-Poulenc Rorer, Köln) und Filgrastim (Neupogen[®], Amgen, München) behandelt. Die Randomisierung, welches Präparat als erstes gegeben werden sollte, wurde durch Losziehung durchgeführt. Zwei aufeinanderfolgende Zyklen der selben oder sehr ähnlichen Chemotherapie gefolgt von unterschiedlichen Wachstumsfaktorpräparaten sollten im Paarvergleich auf Unterschiede untersucht werden.

Bei jedem Besuch der Hämatologisch-Onkologischen Ambulanz der Universitätskinderklinik wurde bei allen Patienten ein kompletter körperlicher Untersuchungsbefund erhoben sowie eine Blutabnahme durchgeführt. Für die Auswertung wurden die folgenden Schwellenwerte definiert: Leukozytopenie ($WBC \leq 1000/\mu l$), schwere Leukozytopenie ($WBC \leq 500/\mu l$), Neutrozytopenie (Neutrophilenkonzentration ($ANC \leq 1000/\mu l$), schwere Neutrozytopenie ($ANC \leq 500/\mu l$), Infektion ($CRP > 5$ mg/dl), infektionsbedingter stationärer Aufenthalt (Krankenhausaufenthalt mit Antibiotikatherapie; Krankenhausaufenthalt aus anderen Gründen wurde nicht berücksichtigt), Antibiotikatherapie (Antibiotikabehandlung über die *Pneumocystis carinii* Prophylaxe mit Co-Trimoxazol hinaus). Zusätzlich wurde die Dauer der rhG-CSF Behandlung verglichen. Wenn an einzelnen Tagen keine Differentialblutbilder verfügbar waren, wurde der ANC nichtsdestoweniger als $< 500/\mu l$ oder $< 1000/\mu l$ gewertet, wenn der WBC $< 500/\mu l$ oder $< 1000/\mu l$ war.

3.2 Meßparameter

Bei jedem Ambulanzbesuch wurde ein Blutbild und Differentialblutbild, nach klinischer Notwendigkeit auch ein CRP angefordert. Gemessen wurden Häufigkeit und Dauer des Unterschreitens der definierten Schwellenwerte (ANC und $WBC < 500/\mu l/1000/\mu l$), Häufigkeit und Dauer von Infektionen ($CRP > 5$ mg/dl), Antibiotikabehandlungen und infektionsbedingten Krankenhausaufenthalten, Therapiedauer, sowie Mobilisation von Stammzellen in das Blut an Tag 10 nach Beginn der Chemotherapie.

Tabelle 1:

| | Alter (J), Geschl. | Dx | Chemotherapie pro Zyklus | Zyklen/ Paare |
|----|-----------------------|------|---|------------------|
| 1 | 28, m | EWS | VP16 1x2000, Melphalan 4x38 | 2/1 |
| 2 | 29, m | ARH | Ifo 3x2000, VP16 3x150, VCR 1.2 ± ActoD 3x0.5 | 3/2 |
| 3 | 20, m | OS | CarboPt 4x150, VP16 4x150 | 3/2 |
| 4 | 7, m | rERH | CisPt 2x40, Ifo 4x1500, VP16 4x100, HAT | 2/1 |
| 5 | 14, w | OS | CarboPt 4x150, VP16 4x150 | 2/1 |
| 6 | 12, w | EWS | Ifo 3x2000, VP16 3x150, VCR 1.2 ± (ActoD 3x0.5 OR Adr 3x20) | 5/4 |
| 7 | 3, m | ERH | Cyc 5x250, Topo 5x0.75 | 3/2 |
| 8 | 22, m | EWS | Cyc 3x2000, VP16 4x55, tumor boost | 3/2 |
| 9 | 18, w | EWS | Cyc 3x1800, VP16 4x100±tumor boost | 4/3 |
| 10 | 8, m | NBL | DTIC 5x200, VCR 2x1.5, Ifo 5x1500, Adr 2x30 | 2/1 |
| 11 | 10, m | PNET | CarboPt 4x200, VP16 4x100, (VP16 5x0.2 mg + AraC 1x30 mg i.th.) | 4/3 |

Tabelle 1 faßt Alter, Geschlecht, Diagnosen und Chemotherapien der 11 in dieser Studie eingeschlossenen Patienten zusammen. 33 Zyklen (22 cross-over Paare) von rhG-CSF Therapie wurden untersucht. Alle Dosierungen, soweit nicht anders angegeben, sind mg/m². Abkürzungen: Diagnosen: EWS = Ewingsarkom, ARH = alveoläres Rhabdomyosarkom, OS = Osteosarkom, (r)ERH = (rezidiertes) embryonales Rhabdomyosarkom, NBL = Neuroblastom, PNET = primitiver neuroektodermaler Tumor. Chemotherapeutika: VP16 = Etoposid, Ifo = Ifosfamid, VCR = Vincristin, ActoD = Actomycin D, Carbo/CisPt = Carbo/Cisplatin, HT = regionale Tiefenhyperthermie, Adr = Adriamycin, Cyc = Cyclophosphamid, Topo = Topotecan, AraC = Cytarabin

3.3 CRP- und Blutbildbestimmung

C-reaktives Protein wurde mittels Standard-Lasernephelometrie im klinisch-chemischen Labor der Universitäts-Kinderklinik (kommissarischer Leiter: Univ.-Prof. Dr. U. Göbel) routinemäßig gemessen. Die Leukozytenzahl wurde mittels Coulter Counter im hämatologischen Labor der Universitäts-Kinderklinik (Leiter: Univ.-Prof. Dr. U. Göbel) ermittelt.

Differentialblutbilder wurden ausgestrichen und nach Pappenheim gefärbt, anschließend vom Studienarzt lichtmikroskopisch beurteilt. Die absolute Neutrophilenzahl (ANC), die Neutrophilenkonzentration/ μl , wurde ermittelt durch Multiplikation des prozentualen Anteils aller granulozytären Zellen mit der Leukozytenzahl. Differentialblutbilder wurden ab einer Leukozytenzahl von 300/ μl bis zum Überschreiten eines ANC von 1000/ μl gezählt.

Wenn in zeitlicher Nähe zu einem der Schwellenwerte (ANC bzw. WBC >500/>1000/ μl) der Abstand zwischen zwei Leukozytenwerten bzw. zwei Differentialblutbildern 3 Tage überschritt, wurden die Daten von der Analyse ausgeschlossen.

3.4 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie erlaubt die Analyse von Einzelzellen bezüglich Größe, Granularität und - bei vorheriger Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern - Fluoreszenzverhalten (Shapiro).

Die Population der CD34+/CD45+ Zellen wird als die Population betrachtet, in der die hämatopoetischen Stammzellen enthalten sind. G-CSF kann auf bisher ungeklärte Weise hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut mobilisieren. Neben der Verkürzung des Zelltiefs ist dies die wichtigste Indikation für die Gabe von G-CSF in der Onkologie. Die mobilisierten Stammzellen können durch Apherese aus dem Blut angereichert werden für eine spätere autologe oder allogene Stammzelltransfusion. Die Zahl der CD34+/CD45+ Zellen im peripheren Blut ist hierbei ein guter Vorhersagewert für die Sammeleffizienz; in der Regel muß eine Progenitorzellkonzentration (CD34+) von mindestens 10/ μl für eine erfolgreiche Apherese gegeben sein.

An Tag 10 nach Beginn der Chemotherapie oder, wenn dieser auf ein Wochenende oder einen Feiertag fiel, am darauffolgenden Werktag, wurde einmalig die Zahl der CD34+/CD45+ Zellen im Blut der Probanden zum Vergleich des Potenzials zur Mobilisation peripherer Stammzellen bestimmt. Zur Quantifizierung der CD34+/CD45+ Zellzahl wurden in einer EDTA-Blutprobe die Erythrozyten lysiert,

anschließend FITC-markierter anti-CD45 Antikörper (Panleukozytenmarker) und PE-markierter anti-CD34 Antikörper (Stammzellmarker) dazugegeben (alle Antikörper Becton-Dickinson, Heidelberg). Die Zellen wurden 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, der Antikörperüberschuß wurde ausgewaschen und die Zellen im Durchflußzytometer (FACScan, Becton-Dickinson, Heidelberg) analysiert. Die CD45+ Zellen wurden gated, im zweiten Schritt wurde die Zahl der CD34+ Zellen in diesem Gate ermittelt. Der Prozentsatz der doppelpositiven Zellen an der Gesamtleukozytenzahl wurde mit der Software des FACScan errechnet, die Konzentration der CD34+ Zellen/µl wurde errechnet durch Multiplikation mit der Leukozytenzahl. Abbildung 1 zeigt eine repräsentative Analyse (Abb. 1).

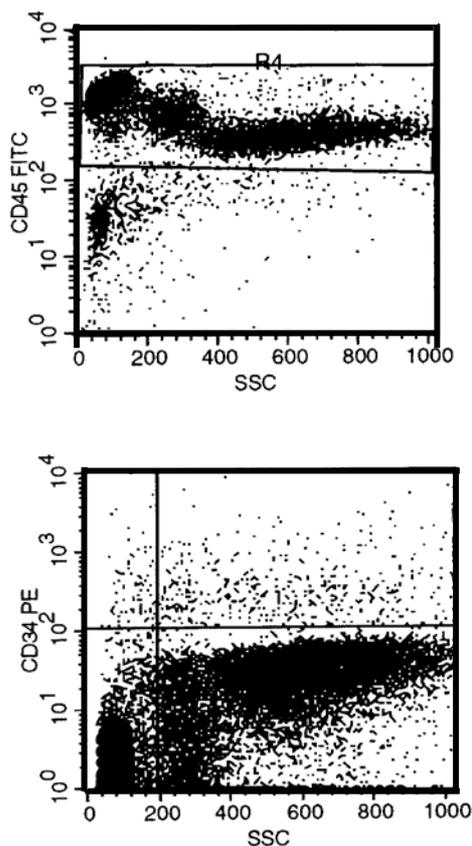


Abbildung 1

Abbildung 1 zeigt die FACS-Analyse aus dem Blut einer G-CSF-behandelten Patientin. Die obere Abbildung zeigt die Auftragung Grün-Kanal (CD45 FITC) auf der Y-Achse, Seitstreulicht auf der X-Achse. Die CD45-positiven Zellen sind mit einem Gate (R4) umgeben. Die untere Abbildung zeigt die Analyse der in diesem Gate R4 enthaltenen CD34-positiven Zellen. Dargestellt sind der Rot-Kanal (CD34 PE) auf der Y-Achse, Seitstreulicht auf der X-Achse. Der rechte obere Quadrant enthält die CD34+/CD45+ Population, in der die Stammzellen enthalten sind, hier sind das 1,09% der kernhaltigen Zellen.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Planung und Durchführung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. rer.nat. Dipl. math. Willers, Rechenzentrum der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

Eligibilität für die Crossover-Analyse war gegeben, wenn derselbe oder annähernd derselbe Chemotherapiekurs, aber die unterschiedlichen G-CSF Präparate im Anschluß daran in zwei unmittelbar aufeinanderfolgenden Zyklen gegeben worden waren. Zwei aufeinanderfolgende Chemotherapiezyklen wurden paarweise miteinander verglichen mit dem Wilcoxon signed-rank Test für paarige Stichproben. Die Differenzen wurden berechnet als (Zeit [Tage] mit Lenograstim minus Zeit [Tage] mit Filgrastim). Lediglich im Falle der CD34+ Zellmobilisation wurde die Differenz berechnet als (CD34+ Zellen/ μ l mit Lenograstim minus CD34+ Zellen/ μ l mit Filgrastim). Dementsprechend bedeuten negative Differenzen eine Überlegenheit von Lenograstim, positive eine Überlegenheit von Filgrastim (im Falle der CD34+ Zellmobilisation: negative Differenz = Überlegenheit von Filgrastim). Zur Überprüfung auf eventuelle Reihenfolgeeffekte (carry-over Effekte) wurden die Paare, die Lenograstim beziehungsweise Filgrastim zuerst erhalten hatten, mit dem Mann-Whitney U-Test für unpaarige Stichproben verglichen. In den Fällen, in denen mehr als ein Wertepaar von einem Patienten erhältlich war, wurden diese als unabhängige Ereignisse gewertet. So ergaben sich, wenn ein Patient in Zyklus 1 das Medikament A, in Zyklus 2 das Medikament B und in Zyklus 3 wieder das Medikament A erhalten hatte, zwei Wertepaare, nämlich Zyklen 1 vs. 2 und 2 vs. 3. Ein $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Eine Korrektur für multiple Testung wurde nicht durchgeführt.

Die Berechnung der Teststatistik erfolgte mit der Software SPSS 9.0. Konfidenzintervalle und Poweranalyse wurden mit der nQuery Software berechnet. Das Signifikanzniveau α wurde mit 0.05, die Power mit 80% festgelegt. Grafiken wurden in SPSS und Excel erzeugt.

4. Ergebnisse

4.1 Patienten

Die 11 Patienten erhielten insgesamt 33 Zyklen Chemotherapie und Supportivtherapie mit rhG-CSF (2-5 Zyklen, im Median 3 Zyklen), davon 16 mit Lenograstim, 17 mit Filgrastim. Hieraus ergaben sich 22 crossover Paare, von denen 12 Lenograstim im ersten, Filgrastim im darauffolgenden Zyklus erhielten. 10 Patienten erhielten Filgrastim zuerst, Lenograstim im nächsten Zyklus. Zur Aufdeckung eventueller Reihenfolgeeffekte wurden die „Lenograstim zuerst“ und die „Filgrastim zuerst“ Gruppen mit dem Mann-Whitney U-Test für unpaarige Stichproben verglichen. Für keinen der definierten Schwellenwerte konnte eine Differenz zwischen den Gruppen gefunden werden. Demnach bestanden also anscheinend keine carry-over Effekte, so daß in den weiteren Analysen die Reihenfolge, in der die Wachstumsfaktoren gegeben worden waren, keine Berücksichtigung finden mußte.

G-CSF wurde gut vertragen; schwerwiegende Nebenwirkungen, die G-CSF zuzuordnen gewesen wären, wurden nicht beobachtet. Insbesondere traten keine Todesfälle, keine Fälle von beatmungspflichtiger Ateminsuffizienz, kein dialysepflichtiges Nierenversagen, keine Unverträglichkeitsreaktion im Sinne einer schweren allergischen oder anaphylaktischen Reaktion auf.

Bei den Paaranalysen wurden bei drei Patienten geringe Differenzen zwischen den Chemotherapien akzeptiert. Bei dem ersten Patienten wurde der erste von drei Zyklen mit Ifosfamid, Etoposid und Vincristin um Actinomycin D ergänzt. Ein weiterer Patient erhielt abwechselnd Adriamycin und Actinomycin D zu seinem Ifosfamid, Etoposid und Vincristin, und bei dem dritten Patienten wurden der dritte und der vierte Zyklus Hochdosis-Cyclophosphamid plus Etoposid um eine Strahlenbehandlung des Lokalereignisses ergänzt (Tabelle 1).

4.2 Häufigkeit, Schwere und Dauer des Zelltiefs

Bei 69% (11/16) der Lenograstim-behandelten und bei 76% (13/17) der Filgrastim-behandelten Patienten fiel die Leukozytenzahl auf $<1000/\mu\text{l}$. In beiden Gruppen

hatten an Tag 9 der Wachstumsfaktorenbehandlung erstmals mindestens 50% der Patienten (10/16 vs. 10/17) diesen Schwellenwert überschritten (Abb. 2). 42% / 41% (7/16 vs. 7/17) der Patienten aus der jeweiligen Behandlungsgruppe fielen mit ihrer Leukozytenzahl auf $<500/\mu\text{l}$ ab (Abb. 3).

Eine Neutropenie ($\text{ANC}<1000/\mu\text{l}$) trat bei allen Patienten ein ($n=30$ Zyklen, 3 missing cases). In beiden Gruppen hatten an Tag 11 erstmals $>50\%$ der Patienten diesen Schwellenwert überschritten (7/13 vs. 10/17) (Abb. 4). Eine sehr schwere Neutropenie ($\text{ANC}<500/\mu\text{l}$; $n=29$) wurde bei 77% (19/13) vs. 69% (11/16) der Patienten in den beiden Gruppen beobachtet. In beiden Gruppen hatten an Tag 9 erstmals $>50\%$ der Patienten wieder einen $\text{ANC}>500/\mu\text{l}$ erreicht (7/13 vs. 8/16) (Abb. 5).

Der Vergleich der Paardifferenzen ergab 0 [(-12) - 10] Tage (Median [Spannbreite]) für den Schwellenwert Leukozytenzahl $>500/\mu\text{l}$, 0 [(-7) - 11] Tage für Leukozytenzahl $>1000/\mu\text{l}$, 0 [(-4) - 9] Tage für den $\text{ANC} >1000/\mu\text{l}$ und 0 [(-11) - 11] Tage für den $\text{ANC} >500/\mu\text{l}$. Box plots sind in Abbildung 7 dargestellt (Abb. 7). Dementsprechend bestand bei der $250 \mu\text{g}/\text{m}^2$ Dosierung kein Unterschied zwischen Lenograstim und Filgrastim bezüglich der Dauer, Schwere und Häufigkeit der Leukozyto- bzw. Neutropenie. Die Stärke („Power“) der Studie wäre ausreichend gewesen, um eine etwaige Differenz von >2 Tagen zu entdecken. Dies gilt für alle Parameter mit Ausnahme des Meßpunkts $\text{ANC}<500/\mu\text{l}$, für letzteren Meßpunkt wäre eine Differenz von >3 Tagen notwendig gewesen, um einen statistisch signifikanten Unterschied zu entdecken.

4.3 Dauer der Wachstumsfaktorentherapie

Die Behandlungsdauer mit dem Wachstumsfaktor war dieselbe für beide Behandlungsgruppen. Lenograstim mußte für 12.5 [7 - 18] Tage (Median [Spannbreite]), Filgrastim für 12 [3 - 17] Tage gegeben werden. Die Paardifferenzen betragen 0 [(-4) - 7] Tage (Abb. 7). Ein Unterschied zwischen der Lenograstim-behandelten und der Filgrastim-behandelten Patientengruppe konnte nicht gefunden werden.

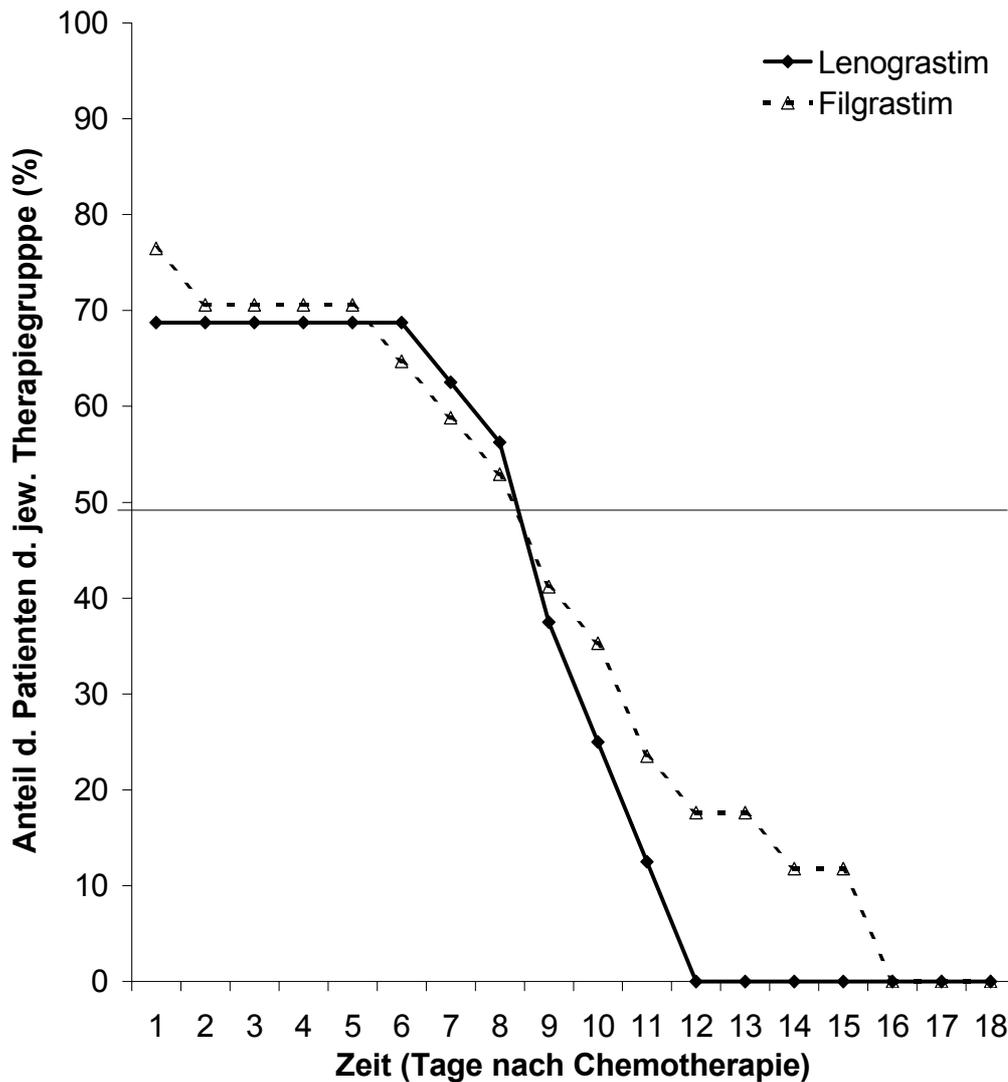


Abbildung 2

Abbildung 2 zeigt den prozentualen Anteil der Patienten der jeweiligen Therapiegruppe (Y-Achse), die zum Zeitpunkt X nach Chemotherapie den Schwellenwert „Leukozytopenie“ ($WBC < 1000/\mu l$) noch nicht überschritten hatten. Bei 69% (11/16) der Lenograstim-behandelten (schwarze Rhomben) und bei 76% (13/17) der Filgrastim-behandelten (weiße Dreiecke) Patienten fiel die Leukozytenzahl auf $< 1000/\mu l$. Bei beiden Gruppen hatten an Tag 9 nach Ende der Chemotherapie erstmals mindestens 50% der Patienten (10/16 vs. 10/17) diesen Schwellenwert überschritten. An Tag 12 hatte der letzte der Lenograstim-behandelten, an Tag 16 der letzte der Filgrastim-behandelten Patienten den Schwellenwert $WBC < 1000/\mu l$ überschritten.

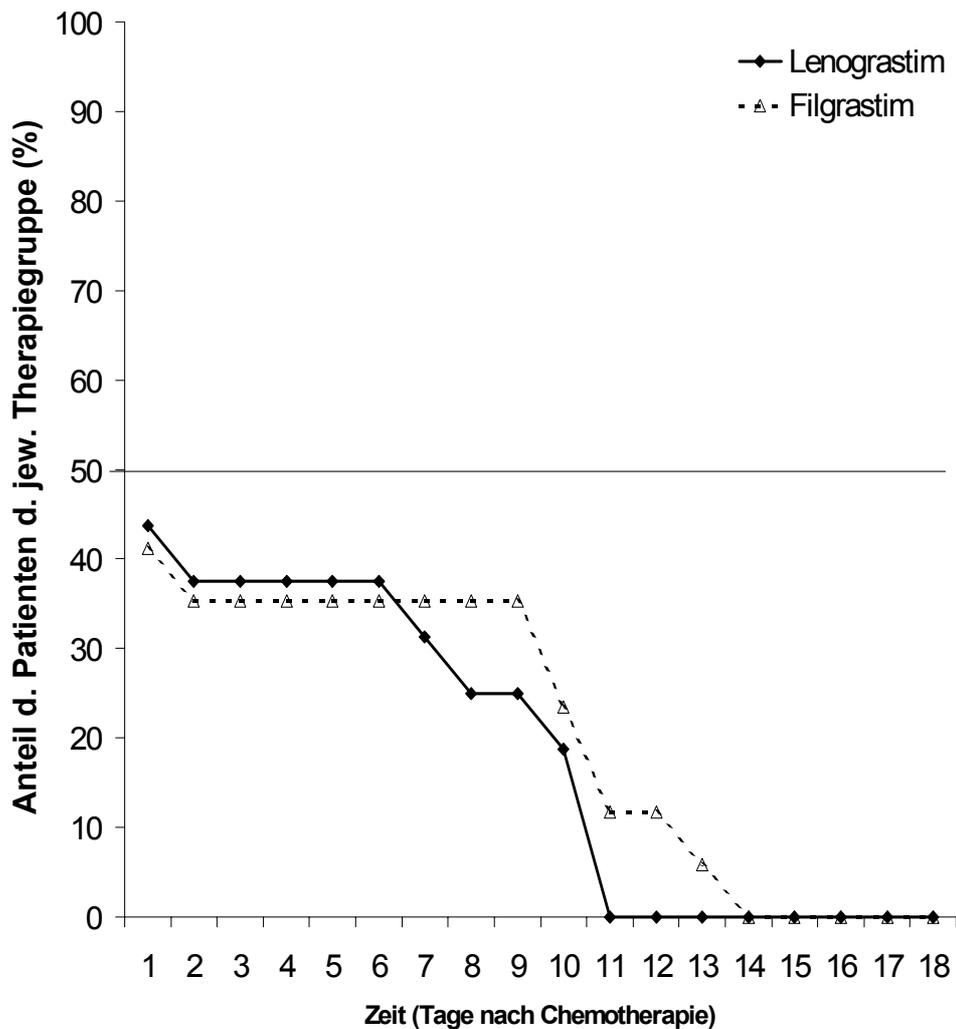


Abbildung 3

Abbildung 3 zeigt den prozentualen Anteil der Patienten der jeweiligen Therapiegruppe (Y-Achse), die zum Zeitpunkt X nach Chemotherapie den Schwellenwert „schwere Leukozytopenie“ ($WBC < 500/\mu l$) noch nicht überschritten hatten. 42%/41% (7/16 vs. 7/17) der Patienten der Lenograstim-Gruppe (schwarze Rhomben)/Filgrastim-Gruppe (weiße Dreiecke) fiel mit seiner Leukozytenzahl auf $< 500/\mu l$ ab. Die Kurven verlaufen nahezu parallel. An Tag 11 hatte der letzte der Lenograstim-behandelten, an Tag 14 der letzte der Filgrastim-behandelten Patienten den Schwellenwert $WBC < 500/\mu l$ überschritten.

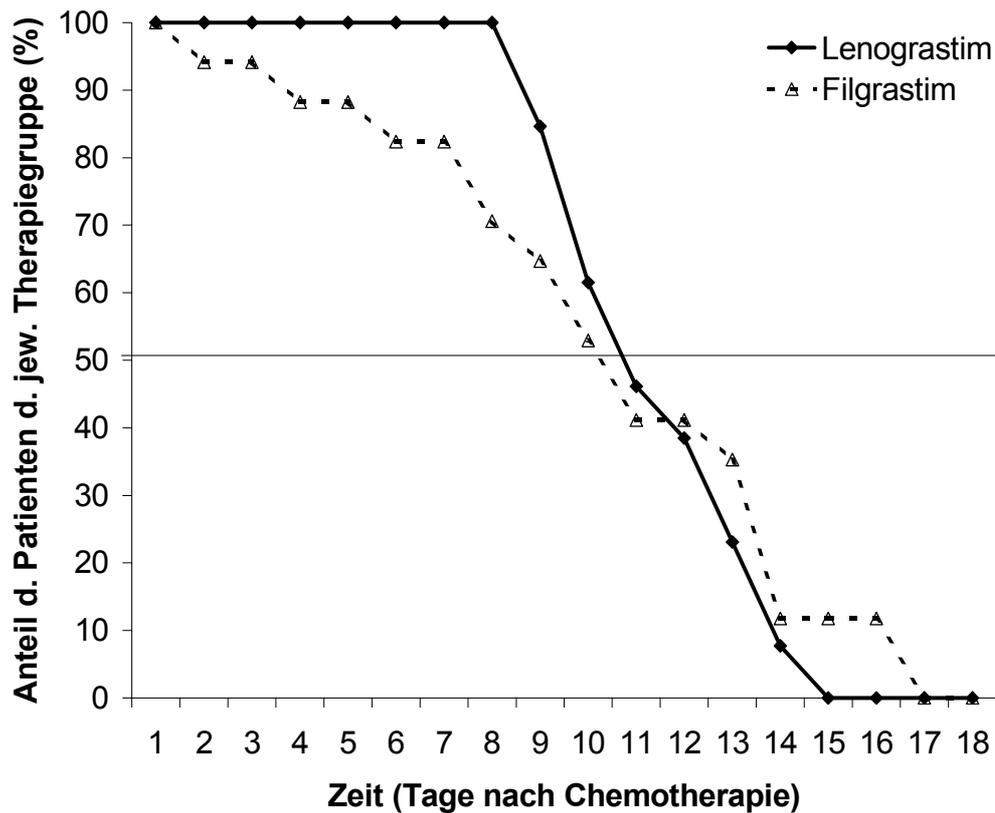


Abbildung 4

Abbildung 4 zeigt den prozentualen Anteil der Patienten der jeweiligen Therapiegruppe (Y-Achse), die zum Zeitpunkt X nach Chemotherapie den Schwellenwert „Neutropenie“ ($ANC < 1000/\mu l$) noch nicht überschritten hatten. Die Daten der Lenograstim-Patienten sind als schwarze Rhomben, die der Filgrastim-Patienten als weiße Dreiecke dargestellt. Eine Neutropenie trat bei 100% der Patienten ein ($n=30$ Zyklen, 3 missing cases). In beiden Gruppen hatten an Tag 11 erstmals $>50\%$ der Patienten diesen Schwellenwert überschritten (7/13 vs. 10/17). An Tag 15 hatte der letzte der Lenograstim-behandelten, an Tag 17 der letzte der Filgrastim-behandelten Patienten den Schwellenwert $ANC < 1000/\mu l$ überschritten.

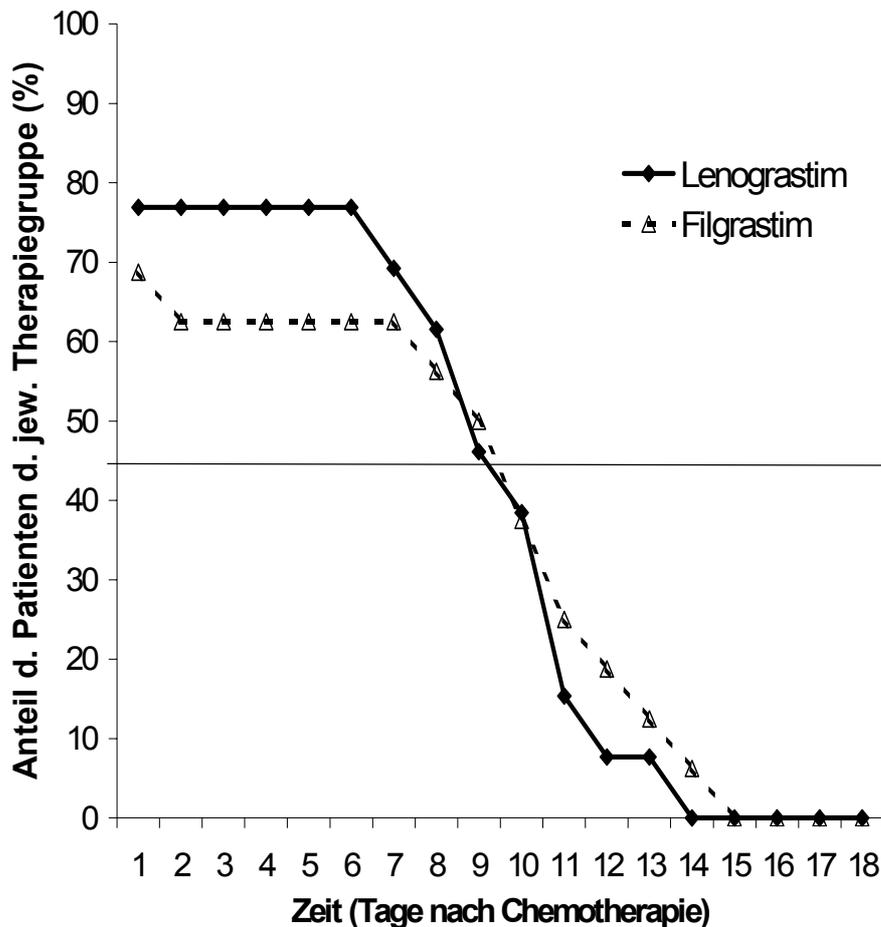


Abbildung 5

Abbildung 5 zeigt den prozentualen Anteil der Patienten der jeweiligen Therapiegruppe (Y-Achse), die zum Zeitpunkt X nach Chemotherapie den Schwellenwert „sehr schwere Neutropenie“ ($ANC < 500/\mu l$) noch nicht überschritten hatten. Die Daten der Lenograstim-Patienten sind als schwarze Rhomben, die der Filgrastim-Patienten als weiße Dreiecke dargestellt. Eine sehr schwere Neutropenie ($ANC < 500/\mu l$; $n=29$) wurde bei 77% (19/13) vs. 69% (11/16) der Patienten in den beiden Gruppen beobachtet. In beiden Gruppen hatten an Tag 9 erstmals >50% der Patienten wieder einen $ANC > 500/\mu l$ erreicht (7/13 vs. 8/16). An Tag 14 hatte der letzte der Lenograstim-behandelten, an Tag 15 der letzte der Filgrastim-behandelten Patienten den Schwellenwert $ANC < 500/\mu l$ überschritten.

4.4 Häufigkeit, Schwere und Dauer von neutropenischen Infektionen und infektionsassoziierten klinischen Ereignissen

Klinische Ereignisse, die per Definitionem als infektbezogen gewertet wurden, wurden lediglich bei einer Minderheit der Patienten beobachtet, waren jedoch in beiden Behandlungsgruppen gleich häufig. So wurde eine Infektion (CRP>5 mg/dl) bei 33% (5/15) vs. 35% (6/17) der Patienten beobachtet, sie dauerte 5 [4 - 9] (Median [Spannbreite]) vs. 5.5 [3 - 12] Tage bei den Lenograstim bzw. Filgrastim behandelten Patienten (Abb. 6).

Die mediane Paardifferenz zwischen der Länge der Infektionen war 0 Tage mit einer Spannbreite von (-8) - 7 Tagen (Abb. 7). 58% (7/12) vs. 60% (9/15) der Patienten erhielten Antibiotika für im Durchschnitt 9 [1 - 12] vs. 9 [2-17] Tage (Median [Spannbreite]). Die mittlere Differenz betrug 0 Tage, mit einer Spannbreite von (-2) - 6 Tagen (Abb. 7). 25% (3/12) vs. 50% (7/14) der Patienten wurden erneut stationär eingewiesen bzw. primär nicht entlassen wegen Infektionen; bei diesen Patienten dauerte die durchschnittliche Behandlung 11 [6 - 12] vs. 9 [3-14] Tage (Abb. 6). Median [Spannbreite] der Paardifferenz bezüglich des infektionsbedingten Krankenhausaufenthaltes betrug 0 [(-5) - 6] Tage (Abb. 7). Eine signifikante Differenz zwischen den Gruppen gab es nicht.

4.5 Stammzellmobilisation

Daten zur Mobilisation peripherer Blutstammzellen konnten bei 20 der 33 Zyklen gewonnen werden, hieraus ergaben sich 12 Paare. Die Lenograstim-behandelten Patienten hatten im Median 3 CD34/CD45 ++ Zellen/ μ l mit einer Spannbreite von 0 - 47 Zellen/ μ l. Filgrastim-behandelte Patienten hatten im Median 9,5 CD34/CD45 ++ Zellen/ μ l (Spannbreite 0-59 Zellen/ μ l) (Abb. 8). Im Paarvergleich war Lenograstim dreimal überlegen, achtmal unterlegen, sowie einmal gleich dem Filgrastim. Die mittlere Paardifferenz betrug 2,5 Zellen zugunsten von Filgrastim (Abb. 9). Diese Differenz war bei enormer Streubreite der Einzelwerte nicht signifikant.

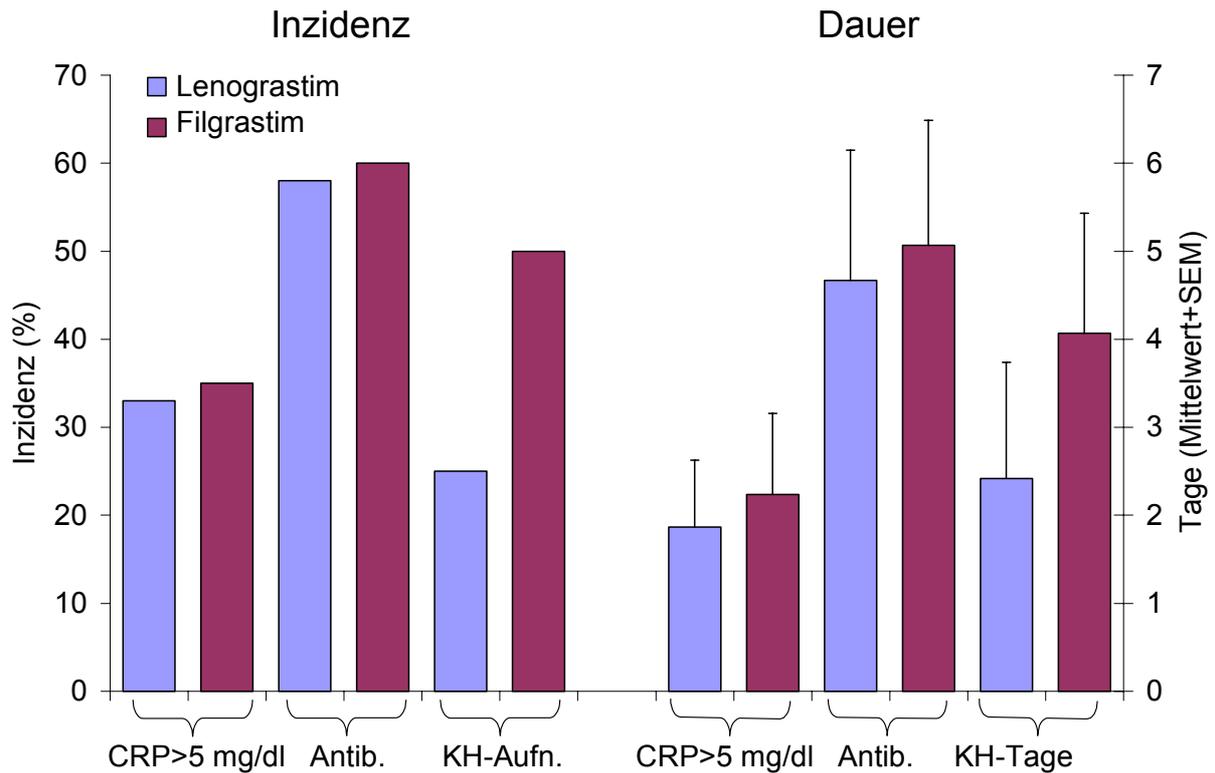


Abbildung 6

Dargestellt sind Häufigkeit (links) und Dauer (rechts) der klinischen Ereignisse „Infektion (CRP > 5 mg/dl)“, „Antibiotikatherapie (Antib.)“ und „infektionsbedingter Krankenhausaufenthalt (KH-Aufn./-Tage)“. Auf der linken Y-Achse ist die Inzidenz (%), auf der rechten die Dauer (Tage) des Ereignisses dargestellt. Lenograstim-Patienten sind durch helle, Filgrastim-Patienten durch dunkle Säulen repräsentiert. Die durchschnittliche Dauer eines Ereignisses wurde hier für die Gesamtgruppe errechnet, d.h. auch für die Patienten, die negativ waren für das Ereignis. Zwischen den Lenograstim- und den Filgrastim-behandelten Patienten bestand kein Unterschied bezüglich der Schwellenwerte CRP (Inzidenz ca. 35%, Dauer ca. 2 Tage) und Antibiotikatherapie (ca. 60% / 5 Tage). Infektionsbedingte Krankenhausaufenthalte waren bei 25% der Lenograstim-, aber 50% der Filgrastim-behandelten Patienten notwendig. Dementsprechend war für das Gesamtkollektiv der Filgrastim-behandelten Patienten die Dauer des stationären Aufenthalts mit durchschnittlich 4 vs. 2 Tagen länger als für die Lenograstim-behandelten Patienten. Bei Betrachtung der Krankenhausliegedauer allein der einmal stationär aufgenommenen Patienten war der durchschnittliche Aufenthalt für die Filgrastim-behandelten Patienten mit 9 Tagen jedoch kürzer als der der Lenograstim-behandelten Patienten (11 Tage). Die Unterschiede waren nicht signifikant.

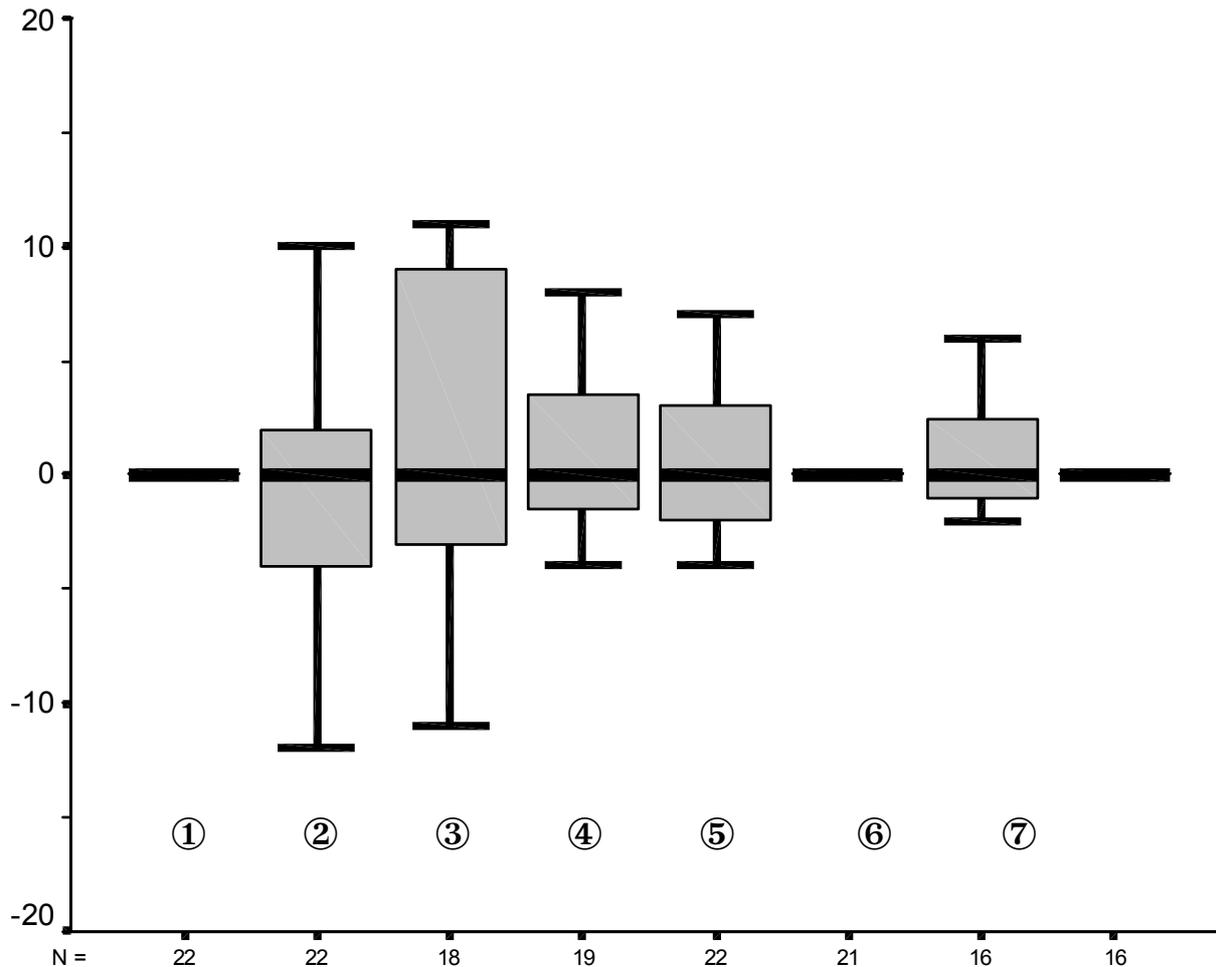


Abbildung 7

Analyse der Paardifferenzen: Aufeinanderfolgende Chemotherapieblöcke mit unterschiedlichen G-CSF Präparaten wurden als Wertepaare miteinander verglichen ($n=22$). Die Differenzen wurden berechnet nach der Formel

$$\Delta [\text{Tage}] = (\text{Dauer mit Lenograstim} [\text{Tage}] - \text{Dauer mit Filgrastim} [\text{Tage}]).$$

Ein positives Δ zeigt dementsprechend einen Vorteil des Filgrastim an und umgekehrt. Abbildung 3 zeigt die Box Plots für die statistische Verteilung des Δ . Die Differenzen sind auf der Y-Achse aufgetragen, die Variablen auf der X-Achse (①=WBC>1000/ μl , ②=WBC>500/ μl , ③=ANC>1000/ μl , ④=ANC>500/ μl , ⑤=Dauer der Behandlung mit rhG-CSF, ⑥=CRP>5 mg/dl, ⑦=Dauer der Antibiotikabehandlung, ⑧=infektionsbedingter Krankenhausaufenthalt). Das mediane Δ zwischen Lenograstim- und Filgrastim-behandelten Patienten war 0 Tage für alle definierten Schwellenwerte. Lenograstim-behandelte Patienten unterschieden sich von den Filgrastim-behandelten in keinem der Schwellenwerte. Die fett gedruckte Linie steht für den Schwerpunkt der Verteilung, der Kasten umhüllt das 25-75% Konfidenzintervall, die Whiskers bezeichnen das 3-97% Konfidenzintervall.

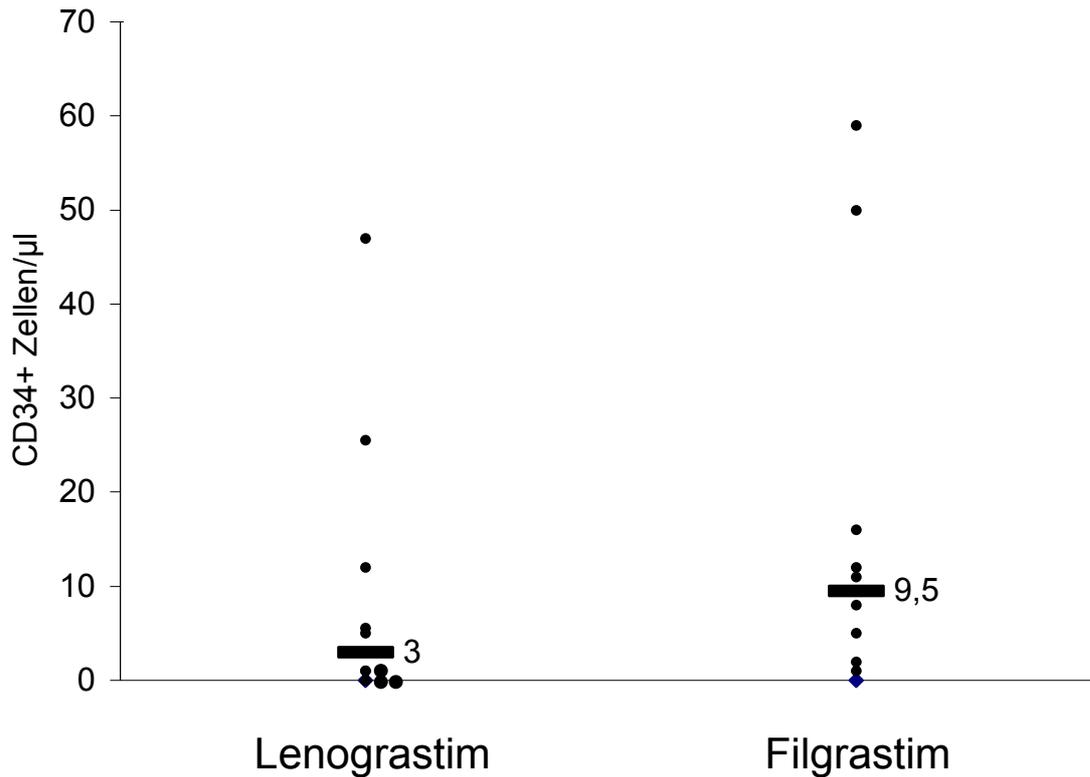


Abbildung 8

Einzelpatienten: Verteilung der in das periphere Blut mobilisierten hämatopoetischen Stammzellen (CD34+/CD45+ Zellen) an Tag 10 nach Ende des Chemotherapie-kurses. Auf der Y-Achse ist die Zellzahl/ μ l, auf der X-Achse das rhG-CSF Präparat dargestellt. Der Balken zeigt die mediane Stammzellzahl für das jeweilige Präparat an. Lenograstim mobilisierte 0-47 Stammzellen/ μ l (Median: 3 Zellen), Filgrastim 0-59 Stammzellen (Median 9,5 Zellen). Bei der extremen Streubreite der Meßwerte war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant.

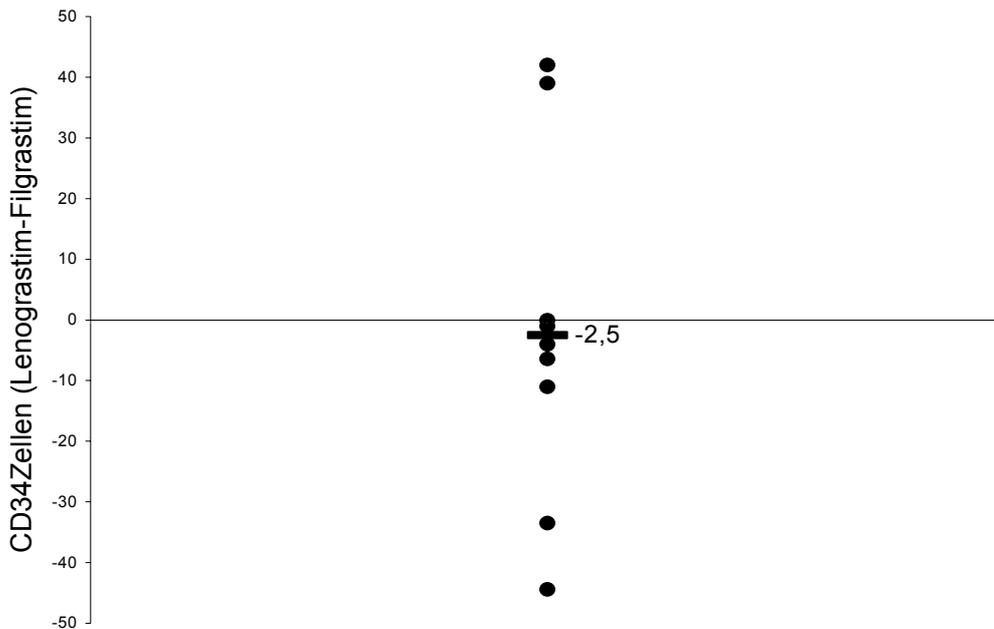


Abbildung 9

Analyse der Paardifferenzen: *Aufeinanderfolgende Chemotherapieblöcke mit unterschiedlichen G-CSF Präparaten wurden als Wertepaare miteinander verglichen (n=12). Die Differenzen wurden berechnet nach der Formel*

Δ [CD34-Zellen] = (Anzahl/ μ l mit Lenograstim [CD34-Zellen] - Anzahl/ μ l mit Filgrastim [CD34-Zellen]).

Ein negatives Δ zeigt dementsprechend einen Vorteil des Filgrastim an und umgekehrt. Abbildung 9 zeigt den Dot Plot für die Verteilung des Δ . Die Differenz (CD34-Zellen/ μ l) ist auf der Y-Achse aufgetragen. Das mediane Δ zwischen Lenograstim- und Filgrastim-behandelten Patienten war -2,5 CD34-Zellen/ μ l. Der Unterschied war bei großer Streuung der Differenzen nicht signifikant. Die Linie gibt den Median der Verteilung an.

5. Diskussion

5.1 Kritische Wertung der Ergebnisse

In-vitro Studien hatten dem Lenograstim eine Überlegenheit von mindestens 25% bescheinigt (76,80-82). Entgegen diesen Voraussagen hat diese Studie bezüglich der untersuchten Parameter bei einer Dosis von 250 µg/m² keinen Unterschied in der Potenz zwischen Lenograstim und Filgrastim gezeigt. Um klinische Relevanz zu besitzen, hätte für eines der beiden Präparate einer der Schwellenwerte regelmäßig mehrere Tage früher erreicht oder überschritten werden müssen. Dies war aber nicht der Fall, die mittlere Differenz war für alle Schwellenwerte mit Ausnahme der Stammzellzahl genau 0. Diese Aussage ist besonders stark für die Schwellenwerte WBC>1000/µl, ANC>500/µl, ANC>1000/µl, Behandlungsdauer und Dauer der Antibiotikatherapie, da alle beziehungsweise eine große Mehrheit der Patienten dieses Kriterium erfüllen. Bei Kriterien wie ANC<500/µl, Krankenhausaufenthalt und Antibiotikatherapie, die von der Mehrzahl der Patienten nicht erfüllt wird, entsteht eine große Zahl von automatischen Bindungen (0 vs, 0 Tage), was zur Negierung eventueller Unterschiede führen könnte.

Die Objektivität der erhobenen Daten ist sehr hoch, ebenso war mit Ausnahme des Merkmals „Antibiotikatherapie“ das Erfüllen der einzelnen Merkmale nicht von einer subjektiven Einschätzung des Therapeuten abhängig. Nicht unproblematisch ist das Kriterium „CRP>5 mg/dl“. Da die Indikationsstellung für eine Antibiotikatherapie „subjektiv“, d.h. nach klinischer Einschätzung durch den jeweiligen Behandler, nicht vom Erreichen eines objektiven Schwellenwertes (etwa CRP>5 mg/dl) abhängig war, konnte möglicherweise der frühzeitige Einsatz eines Antibiotikums das Erreichen dieses Schwellenwertes verhindern. Bei der grundsätzlichen Maßgabe, die Antibiotikagabe bei Zelltiefe (WBC<1000/µl) und Fieber (T>38,5 °C einmalig oder T>38,0 °C über mehr als 12 Stunden) ist ein systematischer Fehler aber sehr unwahrscheinlich.

Da stationäre Aufenthalte in dieser Studie insgesamt eher seltene Ereignisse waren, war die Zahl der Patienten, die stationär aufgenommen wurde, zu klein, um eine zuverlässige Aussage darüber zuzulassen, ob diesbezüglich ein Unterschied zwischen den beiden Präparaten vorliegen könnte. In anderen Studien wird die Häufigkeit stationärer Aufenthalte wegen neutropenischer Infektionen mit einer erheblichen Streubreite von 13 bis 91% - je nach Krankengut und Untersucher - angegeben (90-94). Bei einer ähnlichen Patientengruppe wie der hier betrachteten lag die Inzidenz neutropenischer Infektionen bei 39%, also in einer ähnlichen Größenordnung wie hier, wobei allerdings nicht nach stationären versus ambulanten Therapien aufgeschlüsselt wurde (93). In diesem Punkt ist die vorliegende Studie nicht optimal geplant, da weder für die Indikation zur stationären Aufnahme noch für die Dauer der stationären Therapie eindeutige Definitionen bestanden. Zusätzlich zu der subjektiven klinischen Einschätzung des behandelnden Arztes spielten regelmäßig soziale und logistische Erwägungen eine Rolle bei der Überlegung, ob eine intravenöse Antibiotikagabe ambulant oder stationär erfolgen sollte, beziehungsweise ob eine orale Antibiotikatherapie versucht werden konnte oder eine primäre stationäre Aufnahme zur intravenösen Therapie notwendig war.

Die mittlere Differenz zwischen Lenograstim- und Filgrastim-behandelten Patienten beim Vergleich der Stammzellzahl 2,5 Zellen/ μ l zugunsten von Filgrastim, während sie bei allen anderen hier untersuchten Kriterien Null gewesen war. Dies könnte einen kleinen Vorteil von Filgrastim gegenüber Lenograstim bei der Stammzellmobilisation suggerieren. Die einmalige Bestimmung an Tag 10 wird jedoch der Fragestellung nicht gerecht und läßt somit diese Aussage nicht zu. Wiederholt konnte gezeigt werden, daß die Stammzellmobilisation eine ausgeprägte Dynamik besitzt. Dieser Umstand wird durch die erhebliche Streuung der Stammzellzahl in dieser Untersuchung reflektiert. Innerhalb der Tage, an denen der Patient wieder mit den Leukozyten ansteigt, kann sich die Stammzellausbeute innerhalb eines Tages vervielfachen (41,95,96). Da am Wochenende Stammzellzählungen nicht durchgeführt werden konnten, verzögerte sich der Abnahmezeitpunkt außerdem um -1 Tage vor bis +2 Tage nach Tag 10. Es zeigt sich also, daß die Stammzellausbeute vom Zelltieferlauf einerseits, vom Abnahmezeitpunkt andererseits abhängig ist. Verlaufsdaten aufgrund mindestens

einmal täglicher Messungen wären demnach notwendig gewesen, um die Frage nach der Mobilisation peripherer Stammzellen suffizient zu beantworten. Ein derartiges Vorgehen wurde jedoch verhindert durch das Votum der Ethikkommission, das zusätzliche, nicht unmittelbar der Therapiesicherheit dienende ambulante Vorstellungstermine oder Blutabnahmen untersagt hatte. Die Kraft der Aussage über die Mobilisation peripherer Stammzellen durch Lenograstim und Filgrastim ist demnach als relativ gering einzuschätzen. Ein Vorteil von Filgrastim läßt sich aus den vorliegenden Daten keinesfalls ableiten.

5.2 Vergleich mit Vergleichsstudien anderer Arbeitsgruppen

5.2.1 In-vitro Studien

Eine in-vitro-Studie, die glycosyliertes und nicht-glycosyliertes G-CSF direkt vergleicht, wurde 1994 von Nissen vorgelegt (76). In einem in-vitro Assay wurden drei gesunde Knochenmarkaspirate bezüglich der Erythrozyten- und Granulozytenkoloniebildung bei verschiedenen G-CSF Konzentrationen verglichen. Für beide Präparate zeigte sich eine ausgeprägte, zu sättigende Dosis-Wirkungskinetik. Das Plateau der maximalen Wirkung war für beide Präparate gleich, wurde jedoch mit Filgrastim bei einer doppelt so hohen Dosis erreicht wie mit Lenograstim; für eine halbmaximale Wirkung war sogar eine 20-fach höhere Konzentration Filgrastim notwendig. Dieser Unterschied war signifikant. Auch die Größe der Kolonien war bei Lenograstim günstiger. Pharmakokinetische Untersuchungen wurden in dieser Studie nicht durchgeführt, so daß über die Ursachen dieser erheblichen Potenzunterschiede nur spekuliert werden kann. Der Autor diskutiert insbesondere eine möglicherweise verbesserte Resistenz gegen ungünstige pH-Werte und Temperaturen sowie Protease-Degradation (76).

Ein Jahr später folgte die Untersuchung von Mire-Sluis et al. (80). In insgesamt 29 Labors wurden verschiedene G-CSF Präparationen, darunter Filgrastim und Lenograstim, einer Vielzahl von unterschiedlichen Bio- und Immunoassays unterzogen. Übereinstimmend ergab sich für Lenograstim eine größere Potenz bei der Proliferationsstimulation. Die Größe des Unterschiedes variierte erheblich, im

Mittel wurde eine 25% größere Potenz von Lenograstim gezeigt. Ähnliche Ergebnisse konnten auch von Pedrazzoli et al. (81) gezeigt werden.

Decleva et al. (97) verglichen die Wirkung von Lenograstim und Filgrastim auf die Superoxid-Produktion von Neutrophilen in vitro. G-CSF alleine konnte keine vermehrte Superoxid-Produktion auslösen, jedoch potenzierte es die Neutrophilen aktivierende Wirkung der etablierten Neutrophilen-Stimulatoren Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP). Hierbei verstärkte eine Präinkubation mit Lenograstim die Wirkung von fMLP und TNF- α geringfügig stärker als mit Filgrastim (+7% und +15%, $p < 0.05$).

Übereinstimmend fanden die zitierten Arbeitsgruppen im in-vitro System eine größere Potenz, d.h. Aktivität pro Gewicht, des Lenograstim. Eine ursächliche Begründung dieses Umstandes konnte jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht geliefert werden. Bereits 1990 hatten Oh-Eda et al. (67) eine physikalische Konsequenz der O-Glycosylierung von G-CSF beschrieben, die mögliche Auswirkungen auf dessen Potenz haben könnten. So schien die Glycosylierung die Bildung von Homodimeren und Homopolymeren zu reduzieren, was die Verfügbarkeit an funktionellem G-CSF verbessern könnte.

Ono et al. beschrieben 1994 (98) eine Stabilisierung von G-CSF durch die Glycosylierung gegen alkalische pH-Werte und hohe Temperaturen. Hier wurden Lenograstim und deglycosyliertes Lenograstim miteinander verglichen. Als Mechanismus wurde entsprechend den oben zitierten Vorarbeiten von Oh-Eda (67) die Verminderung der Homodimerisierung von glycosyliertem G-CSF im Vergleich zu nicht-glycosyliertem G-CSF unter diesen Bedingungen identifiziert. In dieser Studie konnten erstmals auch pH- und temperaturabhängig verminderte Aktivitäten von nicht-glycosyliertem G-CSF im Vergleich zu glycosyliertem G-CSF gezeigt werden. So war nach 2 Tagen bei 37 °C noch rund 70% der Aktivität des glycosylierten, aber weniger als 40% der Aktivität des nicht-glycosylierten G-CSF nachweisbar; die Aktivität verringerte sich weiter bei zunehmenden Temperaturen. Nach zweitägiger Inkubation bei 37 °C und pH-Werten von 7 bzw. 8 war die Aktivität des intakten

Lenograstim nur geringfügig vermindert, während die Aktivität des deglycosylierten Lenograstim auf 50% bzw. 10% reduziert war.

Die Bedeutung des Verlusts von G-CSF durch Proteinolyse konnte von Querol et al. (82) *in vitro* geführt werden. Die Konzentration von nicht-glycosyliertem G-CSF fiel erheblich schneller ab als die von glycosyliertem. Durch tägliches Nachimpfen der Kulturmedien mit G-CSF konnte die ungünstigere Proliferationsrate bei nicht-glycosyliertem G-CSF fast vollständig ausgeglichen werden.

Für die *in-vitro* Unterschiede in der Wirkung zwischen glycosyliertem und nicht-glycosyliertem G-CSF ist somit insbesondere die verbesserte Halbwertszeit des glycosylierten Moleküls im Kulturmedium verantwortlich. Da durch die langsame Freisetzung des G-CSF nach subcutaner Injektion beziehungsweise durch die kontinuierliche intravenöse Infusion eine gleichmäßige Abgabe von G-CSF ins Blut gewährleistet ist, außerdem *in vivo* Temperatur und pH-Wert in sehr engen Grenzen konstant gehalten werden, könnte möglicherweise die geringere biochemische Stabilität von nicht-glycosyliertem G-CSF *in vivo* nur eine geringe Rolle spielen. Pharmakokinetische Daten sowie *in-vivo* Vergleichsstudien könnten diese Frage beantworten.

5.2.2 Tierversuche

Nohynek et al. (84) von Rhône-Poulenc Rorer verglichen die Stimulation der Granulozytopoese mit glycosyliertem und nicht-glycosyliertem G-CSF bei Cyclophosphamid-behandelten und bei unbehandelten Ratten. Durch die Behandlung mit Cyclophosphamid wurde eine Reduktion der Leukozytenzahl, jedoch keine Leukozytopenie ($WBC < 1000/\mu l$) gemäß der WHO-Definition erzielt. Die Ratten erhielten an 4 aufeinanderfolgenden Tagen glycosyliertes oder nicht-glycosyliertes G-CSF. In beiden Gruppen wurde der Leukozytennadir an Tag 4 erreicht, an Tag 12 wurden in beiden Gruppen Leukozytenzahlen wie vor Therapiebeginn erzielt. Unter sehr hohen Dosen von G-CSF (100 $\mu g/kg$), nicht aber unter der niedrigeren Dosis (30 $\mu g/kg$) wurden mit Lenograstim an Tag 6 signifikant höhere Gesamtleukozytenzahlen erreicht, dies bewerten die Autoren als einen Vorteil

zugunsten des Lenograstim. Bezüglich der Zelltiefdauer, der Kinetik des Wiederanstiegs der Leukozyten und des Erreichens der Ausgangsleukozytenzahl bestand jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen, weder bei einer Dosierung von 30 µg/kg noch bei einer Dosierung von 100 µg/kg, und beide Gruppen zeigten ein Wiederansteigen der Leukozytenzahl einen Tag vor den unbehandelten Kontrollen.

Tanaka et al. (85) verglichen pharmakokinetische Daten sowie Gesamtleukozytenzahlen bei gesunden Cynomolgus-Äffchen, die mit 1000, 1500, 3000 oder 5000 ng/kg Filgrastim, Lenograstim oder Nartograstim (ein mutiertes, nicht-glycosyliertes G-CSF) subcutan oder intravenös behandelt worden waren. Bei i.v.-Injektion war bei gleicher Dosis bei Lenograstim die Clearance signifikant größer, die AUC und die Plasmahalbwertszeit entsprechend signifikant geringer als bei Filgrastim. Die intravenöse Injektion stellt in der Klinik allerdings kein übliches Verfahren dar. Bei subcutaner Gabe war die AUC von Filgrastim nur geringfügig, aber nicht signifikant größer als bei Lenograstim, die Bioverfügbarkeit war mit rund 40% identisch. Bezüglich des untersuchten klinischen Parameters für die relative biologische Aktivität zeigte sich für alle Substanzen eine erhebliche Dosisabhängigkeit. Die Kinetik des Leukozytenanstiegs wie auch die maximale Leukozytenzahl waren bei gleichen Dosen jedoch gleich. In dieser tierexperimentellen Studie fand sich also für die drei G-CSF Präparate eine dosisäquivalente biologische Aktivität.

5.2.3 Klinische Studien

Zur Mobilisation von peripheren Blutstammzellen durch G-CSF liegen fünf Vergleichsstudien vor. Vergleichsstudien bezüglich anderer biologischer Parameter der G-CSF Wirkung gibt es nicht.

Høglund et al. untersuchten 1996 (86) in einer cross-over Studie an 32 gesunden Männern die Wirkung von 10 µg/kg Lenograstim vs. Filgrastim für eine Dauer von 5 Tagen. Es fand sich ein Vorteil zugunsten von Lenograstim bezüglich der Progenitorzellzahl im Blut von rund 25%, dieser Unterschied war signifikant.

Eine ähnliche Studie wurde von Watts et al. (51) durchgeführt; 20 männliche Freiwillige wurden für 6 Tage mit subcutanen Gaben von 5 µg/kg Lenograstim oder Filgrastim behandelt. Untersucht wurden die maximale Leukozytenzahl, die Zahl der CD34+ Zellen, die Anzahl an GM-CFC sowie G-CSF Plasmaspiegel. Die Lenograstim-behandelten Probanden erreichten geringfügig höhere maximale Leukozytenzahlen und im Mittel rund 20% höhere maximale GM-CFC. Die CD34-Zellzahl war im Gegensatz zu der o.g. Studie von Høglund, die 25% höhere Progenitorzellzahlen gefunden hatte, nicht signifikant unterschiedlich. Nach der ersten G-CSF Dosis wurden die G-CSF Plasmaspiegel verglichen. Hier zeigte sich ein 20% höherer Spitzenspiegel und eine 18% größere AUC bei den Filgrastim-behandelten Probanden; dieser Unterschied war signifikant. Als Erklärung spekulieren die Autoren, daß die Rezeptoraffinität von Lenograstim höher sein könnte. Wichtig ist in diesem Zusammenhang allerdings, daß die Plasmaspiegel von G-CSF erheblich von der Zahl der Neutrophilen abhängt (99). Dies spielt insbesondere bei nicht-neutropenischen Patienten eine große Rolle und führt dazu, daß die G-CSF Plasmakonzentration von Tag zu Tag abnimmt (100,101). Serielle Messungen wären daher gerade bei diesem Kollektiv von gesunden, ausgeprägt neutrophilen Patienten vonnöten gewesen, um zu zeigen, ob tatsächlich mit Filgrastim konstant höhere Plasmaspiegel erzielt werden.

Schiødt et al. (87) untersuchten an einer nicht-randomisierten Gruppe von autologen Stammzellspendern mit malignen lymphozytären Erkrankungen die Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen in das Blut. Sie fanden keinen Unterschied in der Zahl der mobilisierten Stammzellen im Blut, in der Zahl der durch Apherese entnommenen Zellen, noch in der Kinetik der Mobilisation. Zum selben Ergebnis, d.h. kein Unterschied in der Potenz der beiden Präparate, gelangte die Arbeitsgruppe von Saccardi (102), die eine ähnliche Vergleichsstudie an einer Gruppe von Brustkrebspatientinnen durchgeführt hatte.

De Arriba et al. (88) untersuchten an einer Gruppe von Brustkrebspatientinnen Dosen von 0,84 ME unter Berücksichtigung der aus in-vitro Experimenten gewonnen Umrechnungsfaktoren für bioäquivalente Dosen. Dementsprechend wurden

8,4 µg/kg Filgrastim und 6,4 µg/kg Lenograstim verwendet und die Mobilisationseffizienz verglichen. Die mittlere CD34+ Zellkonzentration war bei den Filgrastim-behandelten Patientinnen höher, es waren bei den Lenograstim-behandelten Patientinnen mehr Apheresen und eine längere G-CSF Behandlung notwendig, bis eine ausreichende Zahl von Stammzellen gesammelt worden war. Diese Unterschiede zugunsten von Filgrastim waren alle nicht signifikant; eine Poweranalyse wurde nicht durchgeführt.

Diese Ergebnisse ziehen die Gültigkeit der Umrechnung von bioäquivalenten Dosen im Verhältnis 1:1,25 (Lenograstim : Filgrastim) zumindest für neutropenische Patienten in Zweifel. Der Faktor Neutropenie spielt bei diesem Problem sicher eine nicht zu unterschätzende Rolle, da die Bindung des G-CSF durch die Neutrophilen der wesentliche negative Rückkopplungsmechanismus auf die Plasmakonzentration des G-CSF ist (99). Dementsprechend sind bei neutropenischen Patienten die Plasmaspiegel regelhaft signifikant höher als bei Patienten mit normalen oder hohen Neutrophilenkonzentrationen (101).

5.3 Bedeutung der Ergebnisse für die Behandlung der Neutropenie

Nach den Untersuchungen an gesunden Probanden beziehungsweise am Affenmodell ist eine größere Potenz von Lenograstim gegenüber Filgrastim bei der Stammzellmobilisation beim Gesunden möglich, wenn auch nicht bewiesen. Bezüglich der Mobilisation von Stammzellen bei Krebspatienten hingegen bestehen keine Hinweise auf eine Überlegenheit von Lenograstim. Untersuchungen zur vergleichenden Wirkung auf die Dauer und Schwere der chemotherapieinduzierten Neutropenie liegen mit Ausnahme der oben diskutierten Studie an Ratten keine vor.

Die vorliegenden Ergebnisse der in-vitro Studien würden eine größere Potenz von Lenograstim suggerieren, allerdings können die in-vivo Untersuchungen diese Erwartung nur sehr bedingt bestätigen. In der hier vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, daß zwischen Lenograstim und Filgrastim kein klinisch relevanter Unterschied bezüglich der Verkürzung oder Abmilderung der chemotherapieinduzierten Neutropenie und ihrer infektiologischen Folgen besteht.

Diese Ergebnisse sind kompatibel mit den anderen Untersuchungen an Krebspatienten, bei denen ebenfalls kein Unterschied durch die Glycosylierung hatte gezeigt werden können. Die Diskrepanz zu den in-vitro Studien läßt sich möglicherweise durch die geringere Stabilität von Filgrastim im Zellkulturmedium erklären. Eine Ursache für die Diskrepanz zu in-vivo Untersuchungen an Gesunden, so diese denn besteht - immerhin sind die Ergebnisse der in-vivo Studien nicht eindeutig, könnte an der erheblich durch die Neutrophilenzahl beeinflussten Pharmakokinetik (99,101) zugunsten höherer Wirkspiegel bei der Krebspatienten liegen. Würde glycosyliertes rhG-CSF weniger effektiv von den Neutrophilen neutralisiert, könnte dies eine etwas bessere CD34+ Ernte und höhere maximale Leukozytenzahlen gerade bei Probanden mit sehr hohen Leukozytenzahlen erklären. Dieser Unterschied käme in der Neutropenie nicht zum Tragen.

In der vorliegenden randomisierten cross-over Studie zwischen Lenograstim und Filgrastim konnte bei gleicher Dosis kein Unterschied in der Wirkung auf die Verkürzung des Zelltiefs festgestellt werden. Ebenso waren klinische Ereignisse mit Bezug zu neutropenischen Infektionen nicht signifikant unterschiedlich häufig oder langwierig. Unsere Daten legen nahe, daß die in-vitro Bioäquivalenz von 1 µg Lenograstim und 1,25 µg Filgrastim sich nicht auf neutropenische Patienten übertragen läßt. Im Gegenteil bestehen in einer Dosierung von 250 µg/m² Lenograstim und Filgrastim keine oder zumindest keine klinisch relevanten Unterschiede in der Dosis-Wirkungs-Beziehung bezüglich der Kriterien Neutrophilenengraftment und neutropenische Infektion. Aus den Daten kann abgeleitet werden, daß Lenograstim und Filgrastim bei dieser Indikation gleich dosiert werden dürfen. Die Auswahl des Präparates könnte nach der Ampullengröße in Relation zu Körperoberfläche oder -gewicht des Patienten ausgewählt werden, sowie nach individueller Verträglichkeit und Behandlungskosten.

6. Liste der verwendeten Abkürzungen

| | |
|-------------|--|
| ANC | absolute neutrophil count, absolute Neutrophilenzahl (Zellen/ μ l) |
| CD- | cluster of differentiation |
| CFU-G | colony-forming unit granulocyte, kolonieformende Einheit Granulozyt |
| CGD-Syndrom | chronic granulomatous disease, septische Granulomatose |
| CRP | C-reaktives Protein |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat, Chelatbildner |
| FACS | fluorescence assisted cell sorting, Durchflußzytometrie |
| G-CSF | Granulocyte colony-stimulating factor, Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor |
| WBC | white blood count, Leukozytenzahl (Zellen/ μ l) |

7. Literatur

1. Bronchud MH, Potter MR, Morgenstern G, Blasco MJ, Scarffe JH, Thatcher N, Crowther D, Souza LM, Alton NK, Testa NG. In vitro and in vivo analysis of the effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients. *British Journal of Cancer*. 1988;58:64-69
2. Lord BI, Bronchud MH, Owens S, Chang J, Howell A, Souza L, Dexter TM. The kinetics of human granulopoiesis following treatment with granulocyte colony-stimulating factor in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 1989;86:9499-9503
3. Crawford J, Ozer H, Stoller R, Johnson D, Lyman G, Tabbara I, Kris M, Picozzi V, Rausch G. Reduction by granulocyte colony-stimulating factor of fever and neutropenia induced by chemotherapy in patients with small cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 1991;325:164-170
4. Trillet-Lenoir V, Green J, Manegold C, von Pawel J, Gatzemeier U, Lebeau B, Depierre A, Johnson P, Decoster G, Tomita D. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor reduces the infectious complications of cytotoxic chemotherapy. *European Journal of Cancer*. 1993;29:319-324
5. Welte K, Reiter A, Mempel K, Pfetsch M, Schwab G, Schrappe M, Riehm H. A randomized phase-III study of the efficacy of Granulocyte-Colony Stimulating Factor in children with high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1996a;87:3143-50
6. Ayan I, Kebudi R, Dogan S, Tokuc G, Gorgun O. Granulocyte colony-stimulating factor in neutropenic, pediatric solid tumor patients following chemotherapy. *Pediatric Hematology and Oncology*. 1996;13:417-424
7. Engles-Horton LL, Skowronski C, Mostashari F, Altice FL. Clinical guidelines and pharmacist intervention program for HIV-infected patients requiring granulocyte colony-stimulating factor therapy. *Pharmacotherapy*. 1999;19:356-362
8. Lee SJ, Weller E, Alyea EP, Ritz J, Soiffer RJ. Efficacy and costs of granulocyte colony-stimulating factor in allogeneic T-cell depleted bone marrow transplantation. *Blood*. 1998;92:2725-2729
9. Souetre E, Qing W, Penelaud PF. Economic analysis of the use of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in autologous bone marrow transplantation. *European Journal of Cancer*. 1996;32:1162-1165

10. Tarella C, Castellino C, Locatelli F, Caracciolo D, Corradini P, Falda M, Novarino A, Tassi V, Pileri A. G-CSF administration following peripheral blood progenitor cell (PBPC) autograft in lymphoid malignancies: evidence for clinical benefits and reduction of treatment costs. *Bone Marrow Transplantation*. 1998;21:401-407
11. Fata F, Myers P, Addeo J, Grinberg M, Nawabi I, Cappell MS. Cyclic neutropenia in Crohn's ileocolitis: efficacy of granulocyte colony-stimulating factor. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 1997;24:253-256
12. Freedman MH, Bonilla MA, Fier C, Bolyard AA, Scarlata D, Boxer LA, Brown S, Cham B, Kannourakis G, Kinsey SE, Mori PG, Cottle T, Welte K, Dale DC. Myelodysplasia syndrome and acute myeloid leukemia in patients with congenital neutropenia receiving G-CSF therapy. *Blood*. 2000;96:429-436
13. Heussner P, Haase D, Kanz L, Fonatsch C, Welte K, Freund M. G-CSF in the long-term treatment of cyclic neutropenia and chronic idiopathic neutropenia in adult patients. *International Journal of Hematology*. 1995;62:225-234
14. Marcolongo R, Zambello R, Trentin L, Cassatella M, Gasparotto G, Agostini C. Childhood onset cyclic neutropenia: G-CSF therapy restores neutrophil count but does not influence superoxide anion and cytokine release by neutrophils. *British Journal of Haematology*. 1995;89:277-281
15. Yamamoto Y, Klein TW, Friedman H, Kimura S, Yamaguchi H. Granulocyte colony-stimulating factor potentiates anti-Candida albicans growth inhibitory activity of polymorphonuclear cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 1993;7:15-22
16. Pitrak DL. Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the bactericidal functions of neutrophils. *Current Opinion in Hematology*. 1997;4:183-190
17. Murea S, Fruehauf S, Zeller WJ, Haas R. Granulocytes harvested following G-CSF-enhanced leukocyte recovery retain their functional capacity during in vitro culture for 72 hours. *Journal of Hematotherapy*. 1996;5:351-357
18. Høglund M, Hakansson L, Venge P. Effects of in vivo administration of G-CSF on neutrophil functions in healthy volunteers. *European Journal of Haematology*. 1997;58:195-202

19. Spiekermann K, Roesler J, Emmendoerffer A, Elsner J, Welte K. Functional features of neutrophils induced by G-CSF and GM-CSF treatment: differential effects and clinical implications. *Leukemia*. 1997;11:466-478
20. Leavey PJ, Thurman G., Ambruso DR. Functional characteristics of neutrophils collected and stored after administration of G-CSF. *Transfusion* 2000;40:414-419
21. Hino M, Suzuki K, Yamane T, Sakai N, Kubota H, Koh KR, Ohta K, Hato F, Kitagawa S, Tatsumi N. Ex vivo expansion of mature human neutrophils with normal functions from purified peripheral blood CD 34+ haematopoietic progenitor cells. *British Journal of Haematology*. 2000;109:314-321
22. Weiss M, Gross-Weege W, Schneider M, Neidhardt H, Liebert S, Mirow N, Wernet P. Enhancement of neutrophil function by in vivo filgrastim treatment for prophylaxis of sepsis in surgical intensive care patients. *Journal of Critical Care*. 1995;10:21-26
23. Ozsahin H, von Planta M, Muller I, Steinert HC, Nadal D, Lauener R, Tuchs Schmid P, Willi UV, Ozsahin M, Crompton NE, Seger RA. Successful treatment of invasive aspergillosis in chronic granulomatous disease by bone marrow transplantation, granulocyte colony-stimulating factor-mobilized granulocytes, and liposomal amphotericin-B. *Blood*. 1998;92:2719-2724.
24. Myrup B, Valerius NH, Mortensen PB. Treatment of enteritis in chronic granulomatous disease with granulocyte colony stimulating factor. *Gut*. 1998;42:127-130.
25. Isotani H, Fukumoto Y, Kawamura H, Sasada M, Hattori K, Fujiwara T, Kobayashi Y. Treatment with rhG-CSF for osteomyelitis in a patient with p47-phox-deficient chronic granulomatous disease. *Annals of Hematology*. 1997;75:243-246.
26. Kaposzta R, Marodi L. Chronic neutropenia and defect in superoxide generation of granulocytes in two patients: enhancement of bactericidal capacity and respiratory burst activity by treatment with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Pediatric Research*. 1995;37:50-55.
27. Høglund M, Smedmyr B, Simonsson B, Töttermann T, Bengtsson M. Dose-dependent mobilization of haematopoietic progenitor cells in healthy volunteers receiving glycosylated rHuG-CSF. *Bone Marrow Transplantation*. 1996;18:19-27

28. McCawley LJ, Korchak HM, Douglas SD, Campbell DE, Thornton PS, Stanley CA, Baker L, Kilpatrick L. In vitro and in vivo effects of granulocyte colony-stimulating factor on neutrophils in glycogen storage disease type 1B: granulocyte colony-stimulating factor therapy corrects the neutropenia and the defects in respiratory burst activity and Ca²⁺ mobilization. *Pediatric Research* 1994;35:84-90
29. Wendel U, Schroten H, Burdach S, Wahn V. Glycogen storage disease type 1b: infectious complications and measures for prevention. *European Journal of Pediatrics* 1993;152:S49-51
30. Schroten H, Roesler J, Breidenbach T, Wendel U, Elsner J, Schweitzer S, Zeidler C, Burdach S, Lohmann-Matthes ML, Wahn V. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors for treatment of neutropenia in glycogen storage disease type 1b. *Journal of Pediatrics* 1991;119:748-754
31. Schwinger W, Mache C, Urban C, Beaufort F, Toghhofer W. Single dose of filgrastim (rhG-CSF) increases the number of hemopoietic progenitors in the peripheral blood of adult volunteers. *Bone Marrow Transplantation*. 1993;22:489-492
32. Sato N, Sawada K, Takahashi TA, Magi Y, Asano S, Koike T, Sekiguchi S. A time course study for optimal harvest of peripheral blood progenitor cells by granulocyte colony-stimulating factor in healthy volunteers. *Experimental Hematology*. 1994;22:973-978
33. Duhrsen U, Villeval JL, Boyd J, Kannourakis O, Morstyn G, Metcalf D. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood*. 1988;72:2074-2081
34. De Luca, Sheridan WP, Watson D, Szer J, Begley CG. Prior chemotherapy does not prevent effective mobilisation by G-CSF of peripheral blood progenitor cells. *British Journal of Cancer*. 1992;66: 893-899
35. Papayannopoulou T, Craddock C, Nakamoto B, Priestley GV, Wolf NS The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 1995;92:9647-9651
36. Volpi I, Perruccio K, Ruggeri L, Tosti A, Capanni M, Aversa F, Tabilio A, Martell MF, Velardi A. G-CSF blocks IL-12 production by antigen presenting cells: implications for improved immune reconstitution after haploidentical hematopoietic transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2000;25:S3

37. Armant M, Armitage T, Boiani N, Delespesse G, Sarfati M. Functional CD40 ligand expression on T-lymphocytes in the absence of T cell receptor engagement: involvement in interleukin-2 induced interleukin-12 and interferon-gamma production. *European Journal of Immunology* 1996;26:1430-1439
38. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, Fowler KJ, Basu S, Zhan YF, Dunn AR. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*. 1994;84:1737-1746
39. Bönig H, Hannen M, Lex C, Wölfel S, Banning U, Nürnberger W, Körholz D, Göbel U. Additive effects of infection and neutropenia on the induction of granulocytopoietic activity in vivo. *Cancer* 1999;86:340-348
40. Cebon J, Layton JE, Maher D, Morstyn G. Endogenous haemopoietic growth factors in neutropenia and infection. *British Journal of Haematology*. 1994;86:265-274
41. Mempel K, Pietsch T, Menzel T, Zeidler C, Welte K. Increased serum levels of granulocyte colony-stimulating factor in patients with severe congenital neutropenia. *Blood*. 1991;77:1919-1922
42. Roberts AW, DeLuca E, Begley CG, Basser R, Grigg AP, Metcalf D: Broad inter-individual variations in circulating progenitor cell numbers induced by granulocyte colony-stimulating factor therapy. *Stem Cells*. 1995;13:512-516
43. Sawada H, Wake A, Yamasaki Y, Izumi Y. CD34+ cell dose and hematologic recovery in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Rinsho Ketsueki*. 2000;41:500-506
44. Siena S, Bregni M, Gianni AM Mobilization of peripheral blood progenitor cells for autografting: chemotherapy and G-CSF or GM-CSF. *Baillieres Best Practice Research in Clinical Haematology*. 1999;12:27-39
45. Holowiecki J, Wojciechowska M, Giebel S, Krawczyk-Kulis M, Wojnar J, Kachel L, Kata D, Markiewicz M. Ifosfamide, etoposide, epirubicin, and G-CSF: an effective mobilization regimen for PBSCT in heavily pretreated patients. *Transplant Proceedings*. 2000;32:1412-1415
46. Di Persio JF, Schuster MW, Abboud CN, Winter JN, Santos VR, Collins DM, Sherman JW, Baum CM. Mobilization of peripheral-blood stem cells by concurrent

administration of daniplestim and granulocyte colony-stimulating factor in patients with breast cancer or lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2000;18:2762-2771

47. Katakami N, Takakura S, Fujii H, Nishimura T, Umeda B. Peripheral blood stem cell harvest in patients with limited stage small-cell lung cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2000;27:865-671

48. Froberg MK, Garg UC, Stroncek DF, Geis M, McCullough J, Brown DM. Changes in serum osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase are associated with bone pain in donors receiving granulocyte-colony-stimulating factor for peripheral blood stem and progenitor cell collection. *Transfusion*. 1999;39:410-414

49. Welte K, Gabrilove J, Bronchud MH, Platzer E, Morstyn G. Filgrastim (r-metHuG-CSF): The first 10 years. *Blood*. 1996b;88:1907-1929

50. Stroncek DF, Clay ME, Petzoldt ML, Smith J, Jaszcz W, Oldham FB, McCullough J. Treatment of normal individuals with granulocyte-colony-stimulating factor: Donor experiences and the effects of peripheral blood CD34+ cell counts on the collection of peripheral blood stem cells. *Transfusion*. 1996;36:601.

51. Watts MJ, Addison I, Long SG, Hartley S, Warrington S, Boyce M, Lynch DC. Crossver study of the haematological effects and pharmacokinetics of glycosylated and non-glycosylated G-CSF in healthy volunteers. *British Journal of Haematology*. 1997;98:474-479

52. Martinez C, Urbano-Ispizua A, Marin P, Merino A, Rovira M, Carreras E, Montserrat E. Efficacy and toxicity of a high-dose G-CSF schedule for peripheral blood progenitor cell mobilization in healthy donors. *Bone Marrow Transplantation*. 1999;24:1273-1278

53. Aladdin H, Ullum H, Katzenstein T, Gerstoff J, Skinhoj P, Klarlund-Pedersen B. Immunological and virological changes in antiretroviral naive human immunodeficiency virus infected patients randomized to G-CSF or placebo simultaneously with initiation of HAART. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2000;51:520-525

54. Burdach SEG, Müschenich M, Josephs W, Frisch H, Schulz G, Jürgens H, Göbel U. Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor for prevention of neutropenia and infection in children and adolescents with solid tumors. *Cancer* 1995;76:510–516

55. Ragnhammar P, Friesen HJ, Frodin JE, Lefvert AK, Hassan M, Osterborg A, Mellstedt H. Induction of anti-recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (*Escherichia coli*-derived) antibodies and clinical effects in nonimmunocompromised patients. *Blood*. 1994;84:4078-4087
56. Gribben JG, Devereux S, Thomas NS, Keim M, Jones HM, Goldstone AH, Linch DC. Development of antibodies to unprotected glycosylation sites on recombinant human GM-CSF. *Lancet*. 1990;335:434-437
57. Bonilla MA, Dale D, Zeidler C, Last L, Reiter A, Rugeiro M, Davis M, Koci B, Hammond W, Gillio A. Long-term safety of treatment with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (r-metHuG-CSF) in patients with severe congenital neutropenias. *British Journal of Haematology*. 1994;88:723-730
58. Donadieu J, Boutard P, Bernatowska E, Tchernia G, Couillaud G, Philippe N, LeGall E. A European phase II study of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim) in the treatment of severe chronic neutropenia in children. *European Journal of Pediatrics*. 1997;156:693-700
59. Souza LM, Boone TC, Grabilove J, Lai PH, Zsebo KM, Murdock DC, Chazin VR, Bruszewski J, Lu H, Chen KK, Barendt J, Platzer E, Moore MAS, Mertelsmann R, Welte K. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: Effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*. 1986;232:61-65
60. Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Yamazaki Yamamoto O, Hirata Y, Kubota N, Oheda M, Nomura H, Ono M. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature*. 1986;319:415-416
61. Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Yamamoto O, Hirata Y, Kubota N, Oh-Eda M, Nomura H, Yamazaki T. The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony-stimulating factor. *EMBO Journal*. 1986;5:575-581
62. Nicola NA, Begley CG, Metcalf D, Matsumoto M, Johnson GR. Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukaemic cells. *Nature*. 1985;314:625-628
63. Simmers RN, Webber LM, Shannon MF, Garson OM, Wong G, Vadas MA, Sutherland GR. Localization of the G-CSF gene on chromosome 17 proximal to the breakpoint in the t(15;17) in acute promyelocytic leukaemia. *Blood*. 1987;70:330-339
64. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 1991;78:2791-2808

65. Osslund T, Boone TC. Biochemistry and structure of Filgrastim (r-metHuG-CSF), in Morstyn G, Dexter TM (Hrsg.): Filgrastim (r-metHuG-CSF) in Clinical Practice. New York, NY, Marcel Dekker, New York 1992, p 23.
66. Oh-Eda M, Hase S, Ono M, Ikenaka T: Structures of the sugar chains of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor produced by chinese hamster ovary cells. *Journal of Biochemistry*. 1988;103:544-546
67. Oh-Eda M, Hasegawa M, Hattori K, Kuboniwa H, kojima T, Orita T, Tomonou K, Yamazaki T, Ochi N. O-linked sugar chain of human granulocyte colony-stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its biological activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265:11432-11435
68. Kubota N, Orita T, Hattori K, Oh-eda M, Ochi N, Yamazaki T. Structural characterization of natural and recombinant human granulocyte colony-stimulating factors. *Journal of Biochemistry*. 1990;107: 486-492
69. Wang C, Eufemi M, Turano C, Giartosio A. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry*. 1996;35:7299-7307
70. Hovgaard D, Mortensen BT, Schifter S, Nissen NI. Comparative pharmacokinetics of single-dose administration of mammalian and bacterially-derived recombinant human granulocyte-makrophage colony-stimulating factor. *European Journal of Haematology*. 1993;50:32-36
71. Moonen P, Mermod JJ, Ernst JF, Hirschi M, DeLamarter JF. Increased biological activity of deglycosylated recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor produced by yeast or animal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1987;84:4428-4431
72. Fukuda MN, Saski H, Lopz L, Fukuda M. Survival of recombinant erythropoietin in the circulation : The role of carbohydrates. *Blood*. 1989;73:84-89
73. Lee YH, Sinko PJ. Oral delivery of salmon calcitonin. *Adverse Drug Delivery Reviews*. 2000;42:225-238
74. Chen P, Lai JM, Deng JF, Lu SB, Ku H. Relative bioavailability of salmon calcitonin given intramuscularly. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih Taipei*. 2000;63:619-627
75. Okabe M, Asano M, Kuga T, Komatsu Y, Yamasaki M, Yokoo Y, Itoh S, Morimoto M, Oka T. In vitro and in vivo hematopoietic effect of mutant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 1990;75:1788-1793

76. Nissen C. Glycosylation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: Implications for stability and potency. *European Journal of Cancer*. 1994;30A,S3:12-14
77. Arakawa T, Prestrelski SJ, Narhi LO, Boone TC, Kenney WC. Cysteine 17 of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor is partially solvent-exposed. *Journal of Protein Chemistry*. 1993;12:525-531
78. Gisselbrecht G, Prentice HG, Bacigalupo A, Biron P, Milpied N, Rubie H, Cunningham D, Legros M, Pico JL, Linch DC. Placebo-controlled phase III trial of lenograstim in bone marrow transplantation. *Lancet*. 1994;343:696-700
79. Stoppa AM, Blaise D, Viens P, Bauma D, Mannoni P, Novakovitch G, David FA, Yver A, Maraninchi D. Phase I study of in vivo lenograstim (rHuG-CSF) for stem cell collection demonstrates improved neutrophil recovery after autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 1994;13:541-547
80. Mire-Sluis AR, Das RG, Thorpe R, Participants of the collaborative study. The international standard for granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). Evaluation in an international collaborative study. *Journal of Immunological Methods*. 1995;179:117-126
81. Pedrazzoli P, Gibelli N, Pavesi L, Preti P, Piolini M, Bertolini F, Robustelli della Cuna G. Effects of glycosylated and non-glycosylated G-CSFs, alone and in combination with other cytokines, on the growth of human progenitor cells. *Anticancer Research*. 1996;16:1781-1785
82. Querol S, Cancelas JA, Amat L, Capmany G, Garcia J. Effect of glycosylation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on expansion cultures of umbilical cord blood CD34+ cells. *Haematologica*. 1999;84:493-498
83. Høglund M. Glycosylated and non-glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) - what is the difference? *Medical Oncology*. 1998;15:229-233
84. Nohynek GJ, Plard JP, Wells MY, Zerial A. Comparison of the potency of glycosylated and nonglycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factors in neutropenic and nonneutropenic CD rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1997;39:259-266

85. Tanaka H, Tanaka Y, Shinagawa K, Yamagisji Y, Ohtaki K, Asano K. Three types of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor have equivalent biological activities in monkeys. *Cytokine*. 1997;9:360-369
86. Høglund M, Smedmyr B, Bengtsson M, Totterman TH, Cour-Chabernaud V, Yver A, Simonsson B. Mobilisation of CD34+ cells by glycosylated and nonglycosylated G-CSF in healthy volunteers - a comparative study. *European Journal of Haematology*. 1997;59:177-183
87. Schiødt I, Knudsen LM, Jensen L, Nikolajsen K, Gaarsdal E, Johnsen HE: Flow cytometry comparison of CD34+ subsets in bone marrow and peripheral blood after priming with glycosylated or non-glycosylated rhG-CSF. *Bone Marrow Transplantation*. 1998;21:1167-1170
88. De Arriba F, Lozano ML, Ortuno F, Heras I, Moraleda JM, Vicente V. Prospective randomized study comparing the efficacy of bioequivalent doses of glycosylated and non-glycosylated rhG-CSF for mobilizing peripheral blood progenitor cells. *British Journal of Haematology*. 1997;96:418-420
89. Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*. New York, Liss Inc, New York 1988.
90. Funada H, Matsuda T. Changes in the incidence and etiological patterns of bacteremia associated with acute leukemia over a 25-year period. *Internal Medicine* 1998;37:1014-1018
91. Chen SH, Liang DC, Liu HC. High-dose cytarabine-containing chemotherapy with or without granulocyte colony-stimulating factor for children with acute leukemia. *American Journal of Hematology* 1998;58:20-23
92. Offidani M, Corvatta L, Olivieri A, Rupoli S, Frayfer J, Mele A, Manso E, Montanari M, Centurioni R, Leoni P. Infectious complications after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation followed by G-CSF. *Bone Marrow Transplantation* 1999;24:1079-1087
93. Nielsen OS, Judson I, van Hoesel Q, le Cesne A, Keizer HJ, Blay JY, van Oosterom A, Radford JA, Svancarova L, Krzemienlecki K, Hermans C, van Glabbeke M, Oosterhuis JW, Verweij J. Effect of high-dose ifosfamide in advanced soft tissue sarcomas. A multicentre phase II study of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *European Journal of Cancer* 2000;36:61-67
94. Takeshita A, Saito H, Toyama K, Horiuchi A, Kuriya S, Furusawa S, Tsuruoka N, Takiguchi T, Matsuda T, Utsumi M, Shiku H, Matsui T, Egami K, Tamura K, Ohno

- R. Efficacy of a new formulation of lenograstim (recombinant glycosylated human granulocyte colony-stimulating factor) containing gelatin for the treatment of neutropenia after consolidation chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia. *International Journal of Hematology* 2000;71:136-143
95. Lee S, Im SA, Yoo ES, Nam EM, Lee MA, Ahn JY, Huh JW, Kim DY, Lee SN, Kim MJ, Lee SJ, Chung WS, Seong CM. Mobilization kinetics of CD34(+) cells in association with modulation of CD44 and CD31 expression during continuous intravenous administration of G-CSF in normal donors. *Stem Cells*. 2000;18:281-286
96. Horsfall MJ, Hui CH, To LB, Begley CG, Basser RL, Simmons PJ. Combination of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor mobilizes the highest number of primitive haemopoietic progenitors as shown by pre-colony-forming unit (pre-CFU) assay. *British Journal of Haematology*. 2000;109:751-758
97. Decleva E, Cramer R, Zabucchi G. Glycosylation improves the priming effect exerted by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim) on human neutrophil superoxide production. *International Journal of Tissue Reaction*. 1995;XVII:191-198
98. Ono M. Physicochemical and biochemical characteristics of glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim). *European Journal of Cancer*. 1994;30A,S3:7-11
99. Terashi K, Oka M, Ohdo S, Furikubo T, Ikeda C, Fukuda M, Soda H, Higuchi S, Kohno S. Close association between clearance of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and G-CSF receptor on neutrophils in cancer patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999;43:21-24
100. Stute N, Santana VM, Rodman JH, Schell MJ, Ihle JN, Evans WE. Pharmacokinetics of subcutaneous recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in children. *Blood*. 1992;79:2849-54
101. Morstyn G, Foote M, Perkins D, Vincent M. The clinical utility of granulocyte colony-stimulating factor: Early achievements and future promise. *Stem Cells*. 1994;12S1:213-228
102. Saccardi R, Ananci G, Bezzini R. Mobilization of PBSC for hematological rescue: comparison between glycosylated and non-glycosylated G-CSF. *Bone Marrow Transplantation*. 1997;19:S11

8. Lebenslauf

| | |
|----------------------------|---|
| Name | Stephan Silbermann. |
| Anschrift | Römerstraße 55 64291 Darmstadt |
| geboren | 16.09.1965 in Schwelm, Westfalen. |
| Familienstand | ledig |
| Schullaufbahn | Märkisches Gymnasium, Schwelm; Abitur 5/1985 |
| Berufsausbildung | 1985-1987 zum Bankkaufmann , Dresdner Bank AG Wuppertal |
| Zivildienst | 1987-1989 Rettungssanitäter, Johanniter-Unfall-Hilfe, Wuppertal |
| Universitätsstudium | 1989-1996 Humanmedizin an der HHU Düsseldorf und der Universidad de Cantabria, Santander, Spanien Dritter Teil der ärztlichen Prüfung 06/1996 |
| Berufstätigkeit | 12/1996 - 05/1998 AiP im Evangelischen Krankenhaus Mettmann, Abt. für Innere Medizin, Chefarzt Dr. med. Sporrer. 06/1998 - 09/1998 Notarzt, Deutsches Rotes Kreuz, Düsseldorf. 10/1998 – 10/1999 Assistenzarzt im St. Martinus - Krankenhaus Düsseldorf, Abt. für Innere Medizin, Chefarzt Dr. med. Haas. 11/1999 - 03/2000 Praxisvertretungen im Raum Köln und Mettmann Seit 04/2000 Medical Manager für den Produktbereich Diabetes bei der Firma Merck KGaA |
| Stipendien | 1989-1996 Hans-Bilstein-Stiftung 1991-1994 Fritz-Ter-Meer-Stiftung 1992-1993 Deutscher Akademischer Austauschdienst |

9. Zusammenfassung

Glycosylierter versus nicht-glycosylierter Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) - Untersuchungen zur Dosisäquivalenz

Ergebnisse einer prospektiven randomisierten Moncenterstudie

Stephan Silbermann

Die Verfügbarkeit des hämatopoetischen Wachstumsfaktors Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) hat durch die Verkürzung der Chemotherapie-induzierten Neutropenie die infektionsbedingte Morbidität von onkologischen Patienten reduziert. Zwei rekombinante G-CSFs, eines glycosyliert, das andere nicht, stehen für die klinische Anwendung zur Verfügung. In vitro besitzt das glycosylierte G-CSF, Lenograstim, eine 25% größere Bioaktivität, während klinische Studien bezüglich der differenziellen Potenz bei der Stammzellmobilisation uneindeutige Ergebnisse lieferten. Eine klinische Studie, die die Beeinflussung von Neutropenie und neutropenischer Infektion vergleichend mißt, gab es bisher nicht. Aus diesem Grunde wurde eine prospektive, randomisierte crossover Studie an Kindern mit Chemotherapie-induzierter Neutropenie durchgeführt. G-CSF (250 µg/m²) wurde nach Ende des Chemotherapiezyklus begonnen und so lange gegeben, bis an drei aufeinanderfolgenden Tage ein WBC > 1500/µl erreicht wurde. 33 G-CSF Zyklen von 11 Patienten (16 Lenograstim, 17 Filgrastim) wurden analysiert. Sie wurden ausgewertet bezüglich der Dauer der sehr schweren (ANC < 500/µl, 9 vs. 9.5 Tage, Lenograstim vs. Filgrastim, median) und schweren Neutropenie (ANC < 1000/µl, 11 vs. 11 Tage), Infektionen (CRP > 5 mg/dl, 5 vs. 5.5 Tage), infektionsbedingter Krankenhausaufenthalt (11 vs. 9 Tage) und Antibiotikabehandlung (9 vs. 9 Tage). Die statistische Auswertung durch Paarvergleich konnte zwischen den beiden Behandlungsgruppen keinen Unterschied zeigen, die mediane Differenz bezüglich aller Endpunkte war Null. Zumindest bei einer Dosis von 250 µg/m² scheinen die beiden G-CSF Präparate die gleiche pro-µg Aktivität und den gleichen klinischen Effekt zu haben.

Düsseldorf, im Februar 2001

P.D. Dr. W. Nürnberger