

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Sascha Dietrich

**Antikörper-Seroprävalenz und humorale Immunantworten gegen
eine SARS-CoV-2-Impfung bei Patienten nach allogener
Blutstammzelltransplantation**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Stefanie Munder
2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Guido Kobbe

Zweitgutachterin: PD Dr. rer. nat. Nadine Lübke

Zusammenfassung

Immungeschwächte Patienten haben ein besonders hohes Risiko für eine schwer oder letal verlaufende SARS-CoV-2-Infektion. Wir analysierten daher die humorale Immunantwort von 88 Patienten, die nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (alloHSZT) zwei Impfdosen des BioNTech/Pfizer mRNA-Impfstoffs BNT162b2 erhielten. Das Durchschnittsalter lag bei 60 Jahren (Spannweite 23-79) und 40 % der Patienten waren weiblich. Die Diagnosen vor der alloHSZT waren AML (50 %), MDS (16 %), MPN (11 %), ALL (8 %), NHL (8 %) und andere (7 %). An einer chronischen *Graft versus Host Disease* (GvHD) litten 31 Patienten (35 %), 28 (32 %) nahmen Immunsuppressiva ein, 5 % hatten eine aktive Grunderkrankung und 2 % erhielten eine Chemotherapie aufgrund eines Rezidivs. Insgesamt 24 Patienten (27 %) wurden innerhalb des ersten Jahres nach alloHSZT geimpft. Das mediane Intervall von der alloHSZT zur ersten Impfung betrug 707 Tage (Spannweite 103-7673), zwischen erster und zweiter Impfung lagen im Median 28 Tage (Spannweite 12-57) und zwischen zweiter Impfung und erster Blutabnahme im Median 41 Tage (Spannweite 13-76). Eine zweite Probe wurde drei Monate später mit insgesamt 66 Patienten (75 % der initialen Kohorte) analysiert.

Aus den Serumproben wurde der Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer (Euroimmun Anti-SARS-CoV-2-QuantiVac-Enzymimmunoassay) und der Neutralisationstiter mittels hausinternem seriellen Neutralisationstest durch Inkubation mit infektiösem SARS-CoV-2-Isolat NRW-42 (EPI_ISL_425126) in einem S3-Labor bestimmt. Patienten, die zuvor mit SARS-CoV-2 infiziert waren, wurden durch die Bestimmung des Antikörpers gegen das Nukleokapsid (Abbott) aus der Studie ausgeschlossen. Wir untersuchten die Titerhöhe in Abhängigkeit von Patienten-, Krankheits-, und Transplantationsvariablen (Spearman rho, Mann-Whitney-U, Kruskal-Wallis, Chi-Quadrat). Zuletzt erfolgte ein Vergleich der Impfantworten mit einem gesunden Kontrollkollektiv (n = 112). Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS (Version 27).

Wir beobachteten eine signifikant positive Korrelation zwischen der Bildung von Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG und dem Neutralisationstiter ($r = 0,908$, $p < 0,001$). Des Weiteren wirkten sich die Anzahl der T-Helfer-Zellen ($r = 0,61$, $p < 0,001$), das Intervall zwischen alloHSZT und erster Impfung ($r = 0,51$, $p < 0,001$), die Anzahl der B-Zellen ($r = 0,44$, $p < 0,001$), die Anzahl der NK-Zellen ($r = 0,35$, $p < 0,001$) sowie das Gesamt-IgG ($r = 0,33$, $p = 0,001$) und IgA ($r = 0,23$, $p = 0,035$) signifikant positiv auf die Titerhöhe aus. Eine aktive Grunderkrankung ($p = 0,018$) und eine Immunsuppression mit Ruxolitinib ($p = 0,043$) zeigten einen negativen Effekt auf die humorale Immunantwort. Niedrige Antikörpertiter (< 200 BAU/ml) hatten 63 % der Patienten, die frühzeitig (< 365 Tage) nach alloHSZT geimpft worden waren. Hingegen wiesen nur 14 % der Patienten, die ein Jahr oder später nach alloHSZT eine Impfung erhielten, Titer unter 200 BAU/ml auf ($p < 0,001$). Der Titerabfall von im Median 892 BAU/ml auf 335 BAU/ml war drei Monate nach der ersten Messung hoch (Median 73 %, Spannweite -95 % bis +40 %), dies galt auch für Patienten, die initial ein gutes Impfansprechen zeigten. Die humorale Immunantwort unterschied sich stark zwischen den transplantierten Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe mit Probanden jünger 60 Jahre ($p < 0,001$). Hingegen gab es keinen Unterschied in der Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titerhöhe zwischen Patienten nach alloHSZT und einem älteren (≥ 80 Jahre) Kontrollkollektiv ($p = 0,41$). Ein reduziertes Impfansprechen zeigten insbesondere Patienten, die innerhalb des ersten Jahres nach der Transplantation eine Impfung erhielten und jene, die niedrige T-, B-, und NK-Zellzahlen aufwiesen. Die erhobenen Daten bestärken die Empfehlung zur serologischen Kontrolle des Impferfolges sowie zur *Boosterung* aller Patienten und das Anwenden passiver Immunisierungsstrategien früh nach der alloHSZT sowie bei *low-* oder *non-respondern* allgemein.

Summary

Immunocompromised patients are at particular risk for a severe course or even fatal outcome of SARS-CoV-2 infection. We analysed humoral immune responses in 88 patients who received two doses of the BioNTech/Pfizer vaccine BNT162b2 after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT). Median age was 60 years (range 23-79) and 40 % were female. Diagnoses prior to alloHSCT were AML (50 %), MDS (16 %), MPN (11 %), ALL (8 %), NHL (8 %) and others (7 %). Thirty-one patients (35 %) had chronic Graft versus Host Disease (cGvHD), 28 (32 %) were on immunosuppressants, 5 % had active disease and 2 % received chemotherapy for relapse. Twenty-four patients (27 %) received the vaccine within the first year after alloHSCT.

Median interval from alloHSCT to first vaccination was 707 days (range 103-7673), median interval from first to second vaccination was 28 days (range 12-57) and median interval from second vaccination to first blood sample was 41 days (range 13-76). A second sample was analysed 3 months later from 66 patients (75 % of the initial cohort). Samples were tested for antibody (AB) titers against SARS-CoV-2-S1-antigen and an “in-house” serial dilution endpoint neutralization test with the infectious SARS-CoV-2-isolate NRW-42 (EPI_ISL_425126) was performed in a biosafety level 3 facility to determine neutralization capacity. Previous infection was ruled out by measuring the anti-nucleocapsid AB titer. AB titers were correlated with neutralization and various patient, disease, and transplant variables (Spearman-rho, Mann-Whitney-U, Kruskal Wallis, Chi-Quadrat). Finally, a comparison was made with a healthy control group (n = 112). Statistical analysis was performed with SPSS (version 27).

We observed a highly significant and positive correlation between anti-SARS-CoV-2-S1-IgG formation and neutralizing capacity ($r = 0,908$, $p < 0,001$). Median Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG after two vaccinations was 892 BAU/ml (range 1,5-12934). Variables correlating positively with AB titer height included CD3+CD4+ cell count ($r = 0,61$, $p < 0,001$), interval between alloHSCT and first vaccination ($r = 0,51$, $p < 0,001$), number of CD19+ cells ($r = 0,44$, $p < 0,001$), number of CD16+CD56+ cells ($r = 0,35$, $p < 0,001$) and levels of IgG ($r = 0,33$, $p = 0,001$) as well as IgA ($r = 0,23$, $p = 0,035$). Active disease ($p = 0,018$) and immunosuppression with Ruxolitinib ($p = 0,043$) negatively influenced AB response. In 63 % of patients vaccinated in the first year after alloHSCT AB response was considered insufficient (< 200 BAU/ml) compared to 14 % in patients vaccinated at later time points ($p < 0,001$).

In the second analysis, we observed that median AB titers had dropped by 73 % (median, range -95 % to +40 %) from 892 BAU/ml to 335 BAU/ml which also included patients who had extraordinarily good primary immune responses. Antibody responses differed strongly between patients after alloHSCT and the healthy control group with individuals younger than 60 years ($p < 0,001$). In contrast, there was no significant difference in titer levels between patients after alloHSCT and an older (≥ 80 years old) population ($p = 0,41$).

Humoral vaccine responses were highly variable in patients after alloHSCT, with particularly poor titers achieved by patients vaccinated within the first year after alloHSCT and those with low T-, B- and NK-cell numbers. Even those patients who had high primary AB titers showed a dramatic decline over a period of 3 months after the second vaccination. These data support the general recommendation for titer measurement after vaccination as well as vaccine booster for all patients after alloHSCT and argue for passive immunization strategies early after transplantation and in low- or non-responders.

Abkürzungsverzeichnis

AB	<i>antibody</i>
ACE2	<i>angiotensin-converting enzyme 2</i>
alloHSCT	<i>allogeneic hematopoietic stem cell transplantation</i>
alloHSZT	allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
An	3'-PolyA-Sequenz der <i>mRNA</i> (engl. <i>3' polyA sequence</i>)
ANG2	Angiopoietin 2
APC	<i>Antigen presenting cells</i>
AU/ml	antibody units/ml
BAU/ml	binding antibody units/ml (WHO-Standard Einheit)
BNT162b2	monovalenter <i>mRNA</i> -Impfstoff von BioNTech/Pfizer
CapL	5'-Ende der <i>mRNA</i> mit Leitsequenz (engl. <i>5' cap structure, L= leader sequence</i>)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CMs	Gefaltete Membranen (engl. <i>convoluted membranes</i>)
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus (engl. <i>Cytomegalovirus</i>)
Covid-19	<i>Coronavirus-Disease 2019</i>
COVRIIN	Fachgruppe Intensivmedizin, Infektiologie und Notfallmedizin
CXCL9/ MIG	CXC-Ligand 9/ <i>monokine induced by gamma</i>
CXCL10	<i>CXC motif chemokine ligand 10</i>
DMSs	Sphären mit doppelter Membran (engl. <i>double-membrane spherules</i>)
DMVs	Doppelmembran-Vesikel (engl. <i>double-membrane vesicles</i>)

dsRNA	Doppelsträngige RNA (engl. <i>double-stranded RNA</i>)
EBMT	<i>European Society for Blood and Marrow Transplantation</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
E-Protein	<i>Envelope</i> -Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum (engl. <i>endoplasmic reticulum</i>)
ERGIC	Zwischenkompartiment ER-zu-Golgi (engl. <i>ER-to-Golgi intermediate compartment</i>)
EU	Europäische Union
Fas-/ Fas-L	Oberflächenrezeptor und Ligand, deren Interaktion die Apoptose über Kaspaseaktivierung induziert
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (engl. <i>granulocyte-colony-stimulating factor</i>)
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit (engl. <i>Graft versus Host Disease</i>)
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6
HLA	Humanes Leukozytenantigen (engl. <i>human leucocyte antigen</i>)
HL	Hodgkin Lymphom
IFN(g)	Interferon(gamma)
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
JAK1	Januskinase 1
KG	Körpergewicht
KMT	Knochenmarktransplantation
MAK	Monoklonale Antikörper

MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
M-Protein	Matrix-Protein
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRD	HLA-identische Familienspende (engl. <i>Matched Related Donor</i>)
MUD	HLA-identische Fremdspende (engl. <i>Matched Unrelated Donor</i>)
MMRD	Familienspende, die nicht HLA-identisch ist (engl. <i>Mismatched Related Donor</i>)
MMUD	Fremdspende, die nicht HLA-identisch ist (engl. <i>Mismatched Unrelated Donor</i>)
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
N-Protein	Nukleokapsid-Protein
nsps	Nicht-strukturgebende Proteine (engl. <i>non-structural proteins</i>)
OMF	Osteomyelofibrose
ORF1a/b	Offener Leserahmen (proteinogene Sequenz in der <i>DNA</i>) (engl. <i>open reading frames 1a/b</i>)
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PRR	Mustererkennungsrezeptoren (engl. <i>pattern recognition receptors</i>)
PV	Polycythaemia vera
RBD	Rezeptor-bindende-Domäne
RNA	<i>ribonucleic acid</i>

RdRP	<i>RNA-abhängige RNA-Polymerase</i> (engl. <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>)
sg mRNA	Subgenomische <i>mRNA</i> (engl. <i>subgenomic mRNA</i>)
STIKO	Ständige Impfkommission
S3-Labor	Labor der Biosicherheitsstufe 3
+ssRNA	Positive Einzelstrang- <i>RNA</i> (engl. <i>positive-sense single-stranded RNA</i>)
TH1/2-Zellen	Subgruppen der T-Helferzellen
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TMPRSS2	<i>transmembrane protease serine subtype 2</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2</i>
SARS-CoV-2-S1	S1 = Subuntereinheit 1 des <i>Spike</i> -Proteins, gegen die sich die Immunantwort nach der Impfung richtet
S-Protein	<i>Spike</i> -Protein
VIC	<i>variants of interest</i>
VOC	<i>variants of concern</i>
VUM	<i>variants under monitoring</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
SI-Einheiten	
mg	Milligramm
ml	Milliliter
l	Liter
dl	Deziliter
μ g	Mikrogramm
kg	Kilogramm
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Patienten nach alloHSZT als vulnerable Risikogruppe in der SARS-CoV-2-Pandemie	1
1.2	Verzögerte Immunrekonstitution nach allogener Blutstammzelltransplantation	2
1.3	Infektionen von Patienten nach alloHSZT	5
1.4	Impfempfehlungen für Patienten nach alloHSZT	6
1.5	Aufbau und virale Replikation des neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2.....	6
1.6	Natürliche Immunantwort auf eine SARS-CoV-2-Infektion.....	11
1.7	Immunantwort auf den mRNA-Impfstoff BioNTech/Pfizer (BNT162b2)	12
1.8	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Patientenkohorte.....	15
2.2	Projektübersicht/ Zeitplan.....	18
2.3	Messparameter.....	18
2.4	Gesundes Vergleichskollektiv.....	19
2.5	Ethikvotum und Einverständniserklärung.....	19
2.6	Messmethoden	20
2.7	Studienart, Datenverarbeitung und Statistische Analyse	22
3	Ergebnisse.....	24
3.1	Resultate der ersten Blutabnahme – 3 Monate nach der zweiten Impfung	24
3.2	Resultate der zweiten Blutabnahme – 5 Monate nach der zweiten Impfung und Titerabfall im Zeitverlauf	31
3.3	Insuffiziente Immunantwort der innerhalb eines Jahres nach alloHSZT geimpften Patienten	33
3.4	<i>Low-/non-responder</i> $\geq$ 365 Tage nach alloHSZT	34
3.5	Gesunde Kontrollgruppe	37
3.6	Vergleich der Subpopulationen mit den Patienten nach alloHSZT	38
4	Diskussion und Schlussfolgerung.....	40
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	40
4.2	Einflussfaktoren auf die humorale Immunantwort	41
4.2.1	Lymphopenie und Intervall zwischen Impfung und alloHSZT	41
4.2.2	Impfung während immunsuppressiver Behandlung	44
4.2.3	Einfluss einer GvHD oder aktiven Grunderkrankung auf den Impferfolg	46
4.2.4	Einfluss des Alters, des Geschlechtes und der Impfreaktionen auf den Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer	48
4.3	Vergleich der Titerantwort von Patienten nach alloHSZT und gesunden Kontrollprobanden.....	50

4.4	Abfall der Antikörpertiter im Zeitintervall	52
4.5	<i>Boostern</i>	55
4.6	Aktuelle Einordnung im Hinblick auf die Virusevolution.....	56
4.7	Konsequenzen aus unseren Daten und Konklusion	59
5	Literaturverzeichnis	63
6	Anhang.....	69

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Der virale Replikationszyklus von SARS-CoV-2.....	9
Abb. 2:	Verteilung der Immunsuppressiva innerhalb der Patientenkohorte	17
Abb. 3:	Zeitintervalle, angegeben in Median und (Spannweite)	18
Abb. 4:	Übersicht über die Verteilung der Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG- und der Neutralisationstiter im Rahmen der ersten Analyse	24
Abb. 5:	Die <i>Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG</i> -Titerhöhe in Abhängigkeit von der Grunderkrankung	27
Abb. 6:	Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titerabfall über im Median 91 Tage (Spannweite 84-95)	32
Abb. 7:	Abfall des Neutralisationstiter über im Median 91 Tage (84-95).....	32
Abb. 8:	Vergleich der <i>Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG</i> -Titer zwischen Patienten mit frühzeitiger Impfung nach alloHSZT (< 365 Tage) und Patienten, die ≥ 365 Tage nach alloHSZT die Impfung erhielten.....	34
Abb. 9:	Die Effektstärke der statistisch signifikanten Variablen.....	36
Abb. 10:	Patienten ≥ 365 Tage nach alloHSZT mit insuffizienter Immunantwort	36
Abb. 11:	Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer der Kontrollgruppe und der Patienten nach alloHSZT im Vergleich	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Patientencharakteristika	16
Tabelle 2: Korrelationen zwischen dem Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer und metrischen Variablen.....	26
Tabelle 3: Peripherer Zellstatus und Quantität der Immunglobuline	28
Tabelle 4: Übersicht der Zusammenhänge zwischen dem Anti-SARS-CoV 2-S1- IgG-Titer und den nominal skalierten Variablen.....	29
Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung der angegebenen Symptome von insgesamt 49 symptomatischen Patienten nach der ersten Impfung	30
Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung der angegebenen Symptome von insgesamt 46 symptomatischen Patienten nach der zweiten Impfung	31
Tabelle 7: Übersicht der signifikanten Unterschiede zwischen <i>low-/non-</i> <i>respondern</i> und <i>high respondern</i>	35
Tabelle 8: Übersicht Vergleichskollektiv (n = 112)	38

1 Einleitung

1.1 Patienten nach alloHSZT als vulnerable Risikogruppe in der SARS-CoV-2-Pandemie

Im Dezember 2019 begann in Wuhan/China die pandemische Ausbreitung des neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2, die die internationale Gesellschaft vor große Herausforderungen stellte [1]. In bestimmten Risikogruppen, darunter insbesondere onkologische Patienten, führte die Infektion regelmäßig zu schweren Verläufen mit Spätschäden oder gar tödlichem Verlauf [2]. Impfungen und hygienische Sicherheitsmaßnahmen sind dabei nach wie vor das wirksamste Mittel zur Vorbeugung einer Infektion, zur Vermeidung eines gefährlichen Krankheitsverlaufs mit infektiösen Komplikationen und zur Reduktion des Transmissionsrisikos [3, 4].

Die vorliegende Arbeit und die umschriebenen Zustände beziehen sich dabei auf besorgniserregende Virusvarianten wie Alpha (B.1.17; 501Y.V1), Delta (B.1.617.2) oder Omikron (B.1.1.529), welche bis zum Ende des Jahres 2021 bzw. Anfang des Jahres 2022 vorherrschten und mit höheren Mortalitätsraten assoziiert waren. Mittlerweile haben sich das Ausmaß und die Folgen einer SARS-CoV-2-Infektion unter Berücksichtigung der Virusevolution sowie der präventiven und therapeutischen Möglichkeiten deutlich verändert. Auf die Virusevolution gehe ich in der Diskussion näher ein.

Patienten, die eine allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (alloHSZT) erhalten haben, sind einem höheren Risiko ausgesetzt, an Covid-19 zu sterben, insbesondere, wenn sie früh nach der Transplantation erkranken [5, 6]. Die Vulnerabilität in dieser Patientengruppe liegt vor allem in dem neuen Immunsystem, welches sich durch die Spenderzellen erst einmal etablieren muss. Die Zeit bis zum Aufbau des neuen Immunsystems ist u.a. abhängig von der HLA-Kompatibilität des Spenders und dem Ausmaß der Immunsuppression. In den ersten Monaten nach der alloHSZT besteht die spezifische Immunität lediglich aus den mit dem Transplantat transfundierten Lymphozyten [7, 8]. Ein weiteres Problem ist, dass Patienten mit einem schwachen Immunsystem eine eingeschränkte Immunantwort haben [9]. Multizentrische Daten des *Center of International Blood and Marrow Transplantation* berichteten über ein Gesamtüberleben von 68 % der Patienten nach einer alloHSZT und 67 % bei Empfängern einer autologen HSZT 30 Tage nach der Infektion mit

SARS-CoV-2 [5]. Im Jahr 2021 wurden die Mortalitätsraten infizierter Patienten nach alloHSZT im Bereich von 25-61 % geschätzt [10]. Es wurde außerdem beschrieben, dass die Einnahme von Immunsuppressiva einen aggravierenden Effekt auf die SARS-CoV-2-Infektion hat, da die Virusreplikation begünstigt wird [10]. Bei Krebspatienten, insbesondere bei Patienten mit hämatoonkologischer Grunderkrankung, ist die Antikörperantwort tendenziell geringer. So wurden in einer Metaanalyse serologische Impfantworten nach zweifacher Impfung von 63,7 % bei Patienten mit hämatoonkologischer Grunderkrankung vs. 94,9 % bei Patienten mit solider Tumorerkrankung beschrieben [11]. Auch im Vergleich zu Patienten nach autologer Blutstammzelltransplantation, die zuvor nicht mit B-Zell-depletierenden Antikörpern wie Rituximab behandelt worden waren, und im Vergleich zu gesunden Kontrollen, haben Patienten nach alloHSZT ein reduziertes serologisches Impfansprechen [12] [13]. Dies bestärkt die Vulnerabilität und somit auch die Notwendigkeit der Analyse einer Impfantwort in diesem Patientenkollektiv.

1.2 Verzögerte Immunrekonstitution nach allogener Blutstammzelltransplantation

Das Aufstellen eines geeigneten Impfschemas ist bei hämatoonkologischen Patienten besonders schwierig, da ein hohes Risiko für schwere Infektionen besteht und die Immunisierung aufgrund des geschwächten Immunsystems und durch immunmodulatorische Behandlungen nach alloHSZT sowie verzögerter Immunrekonstitution eingeschränkt ist. Die Immunrekonstitution ist u.a. abhängig vom verwendeten Konditionierungsschema vor alloHSZT, vom Alter des Patienten bzw. der Patientin, von der Zelldosis und Transplantatzusammensetzung, der HLA-Kompatibilität, und vom Ausmaß der Immunsuppression [7]. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (*MHC, major histocompatibility complex*) stellt eine Gruppe von Genen dar, die für Proteine kodieren und eine selektive interindividuelle Erkennung von Antigenen ermöglichen. Die HLA-Gene (*human leucocyte antigen*) liegen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6. Das HLA-System besteht aus zwei Hauptklassen, wobei der HLA-Klasse-I-Komplex aus den Hauptgenen HLA-A, HLA-B, HLA-C und der HLA-Klasse-II-Komplex aus den Hauptgenen HLA-DP, HLA-DM, HLA-DQ und HLA-DR gebildet wird. Die für eine alloHSZT relevanten HLA-Antigene sind HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR und HLA-DQ. Basierend darauf, dass je ein Allel mütterlicherseits und väterlicherseits vererbt wird, müssen für die Spenderauswahl 10

verschiedene HLA-Merkmale berücksichtigt werden. Haploidentische Spender stimmen nur in einem MHC-Haplotyp überein. Die nicht-übereinstimmenden Merkmale können von alloreaktiven T-Zellen als fremd erkannt werden, was mit einem größeren Risiko für eine *GvHD* (*Graft versus Host Disease*) einhergeht [7, 14].

Eine schnellere Lymphozytenrekonstitution geht mit einem besseren *overall survival* und *progression free survival* einher [15]. In einer Analyse von 1109 erwachsenen Patienten nach alloHSZT wurde gezeigt, dass ein HLA-*Mismatch* zwischen Spender und Empfänger, niedrige CD34+-Stammzellzahlen im Transplantat und Antithymozytenglobulin (ATG) im Konditionierungsschemotherapieprotokoll negative Auswirkungen auf die absolute Lymphozytenzahl nach alloHSZT haben. Dabei wurden Lymphozytenzahlen $< 0,2 \times 10^9$ Zellen/l als niedrig und $> 0,2 \times 10^9$ Zellen/l als hoch eingestuft [16]. In der Arbeit von Thoma et al. wird ebenso ein schlechteres Gesamtüberleben in der Patientenkohorte beschrieben, die 60 Tage nach alloHSZT niedrige Lymphozyten- und Monozytenzahlen aufwiesen [15].

Das angeborene Immunsystem, dazu zählen Monozyten, Granulozyten, Antigenpräsentierende Zellen (APC) und NK-Zellen, regeneriert bereits innerhalb der ersten Wochen nach alloHSZT. Durch Stimulation mit humanem *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) sind die Granulozyten an Tag +10 bis +28 die erste Zellpopulation, die regeneriert. Hingegen regeneriert das zelluläre adaptive (T-Zellen) und humorale adaptive (B-Zellen) Immunsystem langsamer, innerhalb von Wochen bis Monate. Auch die Anzahl der T-Zellen und der B-Zellen steigt zügig innerhalb der ersten Monate nach alloHSZT an, jedoch ist die Funktionalität der vorhandenen Zellen, insbesondere der antransfundierte Zellen, noch nicht ausreichend, da diese auf antigenspezifische Immunantworten des Spenders ausgerichtet sind und die thymische T-Zellreifung aufgrund der Altersinvolution in adulten Patienten eingeschränkt und somit langsamer ist. Organschäden durch eine zuvor durchgeführte Bestrahlung und Chemotherapie oder durch eine mögliche Alloreaktivität, basierend auf der Pathophysiologie der *GvHD*, beeinflussen ebenfalls die Immunrekonstitution [8, 17].

T- und B-Zellen exprimieren auf ihren Oberflächen antigenspezifische Rezeptoren. Naive B-Zellen wandern aus dem Knochenmark in sekundär lymphatische Organe aus und tragen IgD und IgM auf ihrer Zelloberfläche. Nach einem Antigenkontakt differenzieren sie zu IgM sezernierenden Plasmazellen. Im Keimzentrum des Lymphknotens findet nach Antigenkontakt ein Immunglobulin-Klassenwechsel statt,

der zu einer höheren Antigen-Bindungsstärke führt. Am Ende der B-Zellreifung entsteht eine ausdifferenzierte Plasmazelle, die einen Antikörper-Isotyp für ein spezifisches Antigen produziert [14].

Etwa drei Monate nach der alloHSZT normalisiert sich die Anzahl der B-Zellen, wobei darunter v.a. reife naive B-Zellen und transitionale unreife B-Zellen zu finden sind. IgG taucht erstmals zwischen dem dritten und sechsten Monat nach alloHSZT im Labor auf. Die IgG1- und IgG3-Level normalisieren recht zügig innerhalb des ersten Jahres nach der Transplantation, IgG2 und IgG4 sind längere Zeit nur in kleiner Konzentration vorhanden [18]. Die zeitverzögerte IgG2- und IgG4-Produktion führt zu einer beeinträchtigten T-Zell-unabhängigen Reaktion auf Polysaccharid-Antigene wie Pneumokokken [19]. IgA ist das letzte Immunglobulin, das im Rahmen der Regeneration produziert wird. Daher stellen Infektionen an Schleimhautbarrieren des respiratorischen oder gastrointestinalen Traktes auch noch zu einem späteren Zeitpunkt nach der Transplantation eine Gefahr dar [18].

Prekursor-T-Zellen sind Zellen, die aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervorgehen und weder T-Lymphozyten-spezifische-Antigene wie CD3, CD4 oder CD8 noch antigenspezifische Rezeptoren (T-Zellrezeptoren) exprimieren. Sie migrieren in den Thymus, wo sie mithilfe kortikaler und medullärer Thymusepithelzellen eine positive oder negative Selektion erfahren. Positivselektion bedeutet, dass die T-Zellen über ihre Rezeptoren körpereigene *MHC*-Moleküle binden und erkennen. Wohingegen jene T-Zellen, die dazu nicht fähig sind, durch Apoptose beseitigt werden. Negativselektion bedeutet, dass T-Zellen beseitigt werden, die Antigene des Thymus erfassen und führt zu der Eliminierung dieser autoreaktiven T-Zellen. Dies dient zum Erwerb der Fähigkeit, körpereigene von körperfremden Strukturen zu unterscheiden. Naive T-Helferzellen haben anschließend den ersten Antigenkontakt in sekundär lymphatischen Organen. Dort differenzieren sie je nach Zytokinmilieu in TH1-, TH2-, TH17-, oder regulatorische T-Zellen [14].

Die erste Phase nach der Transplantation ist durch die transfundierten T-Zellen charakterisiert. Sie ist unabhängig vom Thymus. Diese T-Zellen expandieren peripher und haben nur ein begrenztes T-Zellrezeptorrepertoire. Es handelt sich hierbei um naive T-Zellen des Empfängers, die die Konditionierungstherapie überlebten oder Gedächtnis-T-Zellen im Transplantat des Spenders. Die Expansion ist demnach abhängig von der Anzahl der T-Zellen im Transplantat und der Intensität der Konditionierungstherapie. Die T-Zellen könnten prinzipiell auch die humorale

Immunantwort früh nach der Transplantation begünstigen, jedoch ist der Effekt scheinbar beschränkt, da z.B. das Ausmaß der Antikörperbildung gegen das Zytomegalievirus (CMV) gering ist. Aufgrund der replikativen Seneszenz kann das T-Zellkompartiment der konditionierungsresistenten Wirts- und transfundierten Spenderzellen keine breite Antigenspezifität abdecken und aufrechterhalten [20]. Die spätere Phase, der aus den gespendeten Stammzellen hervorgehenden T-Zellen, ist Thymus-abhängig und enthält zuletzt nach multiplen Antigenkontakten ein umfangreiches T-Zellrezeptorrepertoire. Diese werden spezifisch nach Antigenkontakt durch somatische Genkombinationen gebildet [18, 20].

In Anwesenheit einer *GvHD* oder basierend auf einer immunmodulatorischen Behandlung der *GvHD* ist sowohl die zelluläre als auch die humorale adaptive Immunantwort zeitverzögert [8]. Der anfängliche Mangel an CD4-positiven- und CD8-positiven T-Zellen sowie der langfristige Mangel an CD4-positiven T-Zellen ist besonders ausgeprägt, wenn das Transplantat T-Zell-depletiert ist oder Anti-T-Zell-Antikörper zur *GvHD*-Prophylaxe eingesetzt werden [21].

1.3 Infektionen von Patienten nach alloHSZT

Infektionen sind eine wichtige Ursache der Mortalität bei Patienten nach alloHSZT [22]. In der frühen Phase nach der Transplantation (bis Tag +30) sind es aufgrund der Neutropenie und der durch Chemotherapie induzierten Mukosiden, die den Keimeintritt an Barrieren wie den Schleimhäuten erleichtern, v.a. bakterielle Infektionen (z.B. durch koagulasenegative Staphylokokken, Enterokokken, gramnegative Enterobakterien, *Clostridium difficile*), aber auch Pilzinfektionen (z.B. *Candida*) oder virale Infektionen (z.B. Reaktivierung einer Herpes-simplex-Virus Infektion, HHV-6 Infektion). Ab dem Zeitpunkt des Leukozyten-*Engraftment* bis Tag +100 oder später nach alloHSZT sind die Patienten auch durch Infektionen mit CMV, EBV (Epstein-Barr-Virus) oder *Pneumocystis jirovecii* gefährdet. Varizella-Zoster-Virus-Reaktivierungen und Infektionen durch bekapselte Bakterien (Pneumokokken, Meningokokken, *Haemophilus influenzae*) treten oft erst ab Tag +100 nach alloHSZT auf. Dies ist auf die verzögerte Rekonstitution der B- und T-Zellen zurückzuführen. Ein höheres Risiko für Infektionen haben ältere Patienten, Patienten mit einer myeloablativen Konditionierungschemotherapie im Vergleich zu Patienten mit einer Konditionierung reduzierter Intensität, aber auch Patienten mit einer *GvHD* oder HLA-

Inkompatibilität bei der Spende, die zu einer verzögerten Immunrekonstitution führen können. Die akute *GvHD* tritt innerhalb von 100 Tagen nach alloHSZT auf, die *late onset GvHD* nach 100 Tagen [23]. Infektionen mit respiratorischen Viren, darunter auch saisonale Coronaviren, treten sehr häufig nach alloHSZT auf und gehen oft mit einer milden Symptomatik einher, wenn sie nicht bereits vor der Konditionierungsschemotherapie auftreten [7, 22].

1.4 Impfeempfehlungen für Patienten nach alloHSZT

Im Jahr 2020 erschien eine ausführliche Arbeit zu Impfregimen nach alloHSZT, da durch eine vorgeschaltete Konditionierung mit Chemo- und/oder Strahlentherapie das Immunsystem des Empfängers und die damit bestehende Immunität durch Impfungen oder durchgemachte Infektionen verloren geht. Darin werden Empfehlungen ausgesprochen, dass Totimpfstoffe sechs Monate nach alloHSZT bei Patienten mit stabilem Leukozyten-*Engraftment* und einer Thrombozytenzahl von über 50.000/ μ l verwendet werden können, unabhängig von der HLA-Kompatibilität, dem Vorliegen einer *GvHD* oder einer immunsuppressiven Behandlung. Lebendimpfstoffe sollten erst 24 Monate nach einer alloHSZT verabreicht werden, wobei ein Abstand von drei Monaten zur letzten immunsuppressiven Therapie oder aktiven *GvHD* eingehalten werden sollte [24]. Zudem wird die Erhebung eines zellulären Immunstatus zur Detektion einer verzögerten Immunrekonstitution empfohlen, um eine mögliche Immunogenität durch die Impfung zu validieren und eine unzureichende Immunrekonstitution vor einer Impfung mit Lebendimpfstoffen zu erkennen [24]. Dies unterscheidet Patienten mit hämatoonkologischer Erkrankung von Patienten mit solider Tumorerkrankung, die oft präemptiv vor den Immun- und Chemotherapien geimpft werden [7]. Wie der Umgang mit den neu etablierten *mRNA*- und Vektorimpfstoffen erfolgen sollte, war zu diesem Zeitpunkt noch unbekannt.

1.5 Aufbau und virale Replikation des neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2

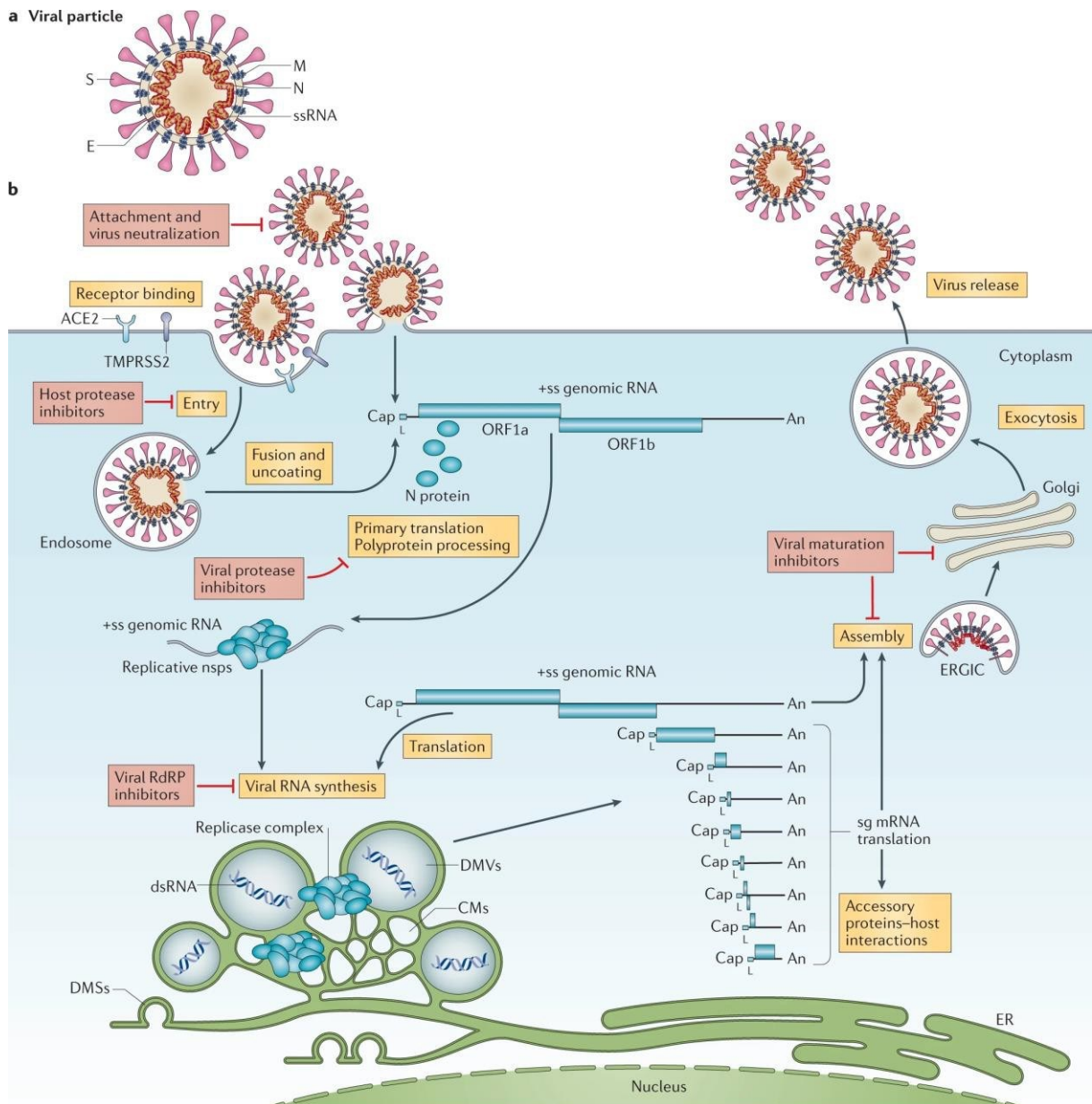
SARS-CoV-2 ist ein behülltes, einzelsträngiges *RNA*-Virus positiver Polarität und gehört zu der Subfamilie der Orthocoronavirinae. Diese Familie der Coronaviren wird wiederum in vier Gattungen unterteilt: Alpha-, Beta-, Gamma-, und Deltacoronaviren. Auf der Oberfläche trägt das Virus membranständige Strukturproteine. Die S1-Untereinheit des *Spike*-Protein (S-Protein) bindet mit der *Receptor binding domain*

(RBD) an das Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (ACE2) der Wirtszelle. Die Fusion der Virushülle mit der Wirtsmembran wird anschließend durch die S2-Untereinheit des Spike-Protein vermittelt. Das Matrix-Protein (M-Protein) dient der Strukturgebung und ist wichtig für den Zusammenbau viraler Partikel. Auch das *Envelope*-Protein (E-Protein) ist notwendig für den Zusammenbau viraler Partikel [25].

Gemeinsam mit dem Genom bildet das Nukleokapsid-Protein (N-Protein) das Nukleokapsid. Menschliche Wirtszellen tragen das ACE2 sowie TMPRSS2 (*transmembrane protease serine subtype 2*), an welche SARS-CoV-2 mittels S1 des Spike-Protein bindet und somit Eintritt in die Zelle gelangt, in der es sich anschließend vermehrt. Die menschlichen Zellen, die ACE2 und TMPRSS2 tragen, sind vor allem im respiratorischen Epithel, insbesondere im Alveolarepithel, Gefäßendothel sowie im Epithel der Nieren, Enterozyten, Hepatozyten, Myokardzellen und Zellen des zentralen Nervensystems vorhanden, wodurch der Organotropismus des Virus erklärbar ist. Daraus resultieren das führende Krankheitsbild der Pneumonie bis hin zum *Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)*, thrombembolische Komplikationen sowie Myokarditiden. Die *World Health Organization (WHO)* teilt die Mutanten von SARS-CoV-2 in *variants of concern (VOC)* und *variants of interest (VOI)* ein. Dabei sind die VOC jene Virusvarianten, die mit einem höheren Transmissionsrisiko sowie schweren bis hin zu letalen Verläufen durch eine Infektion einhergehen. Zu den VOC zählen Alpha B.1.1.7;501Y.V1, Beta B.1.351;501Y.V2, Gamma P.1; 501Y.V3, Delta B.1.617.2 und Omikron B.1.1.529 mit der aktuell in Deutschland vorherrschenden Sublinie BA.5 [25, 26]. Seit März 2023 gibt es laut WHO auch *Variants under monitoring (VUM)*, welche Varianten umfassen, die einen Wachstumsvorteil aufweisen, deren phänotypische und epidemiologische Auswirkungen allerdings noch unbekannt sind. VOI hingegen sind Varianten, die mit einem höheren Transmissionsrisiko einhergehen und eine epidemiologische Konsequenz haben. Zudem sollen laut WHO zukünftig nur noch VOC mit den griechischen Buchstaben versehen werden, während VOI nach Nomenklatorsystemen wie „Nextstrain“ oder „Pango“ benannt werden [25, 27].

Die Invasion des Virus geschieht durch Adsorption und Penetration (**Abb. 1**). Dabei bindet das S-Protein direkt an ACE2, TMPRSS2 vermittelt das *S-Protein-Priming*, d.h. die zelluläre Protease aktiviert das virale Spike-Protein durch proteolytische Spaltung in eine S1- und eine S2-Untereinheit. Der virale Vermehrungszyklus hat folgenden, grob skizzierten, Ablauf: Auf das *Uncoating*, d.h. die Freisetzung der Nukleinsäure aus dem Endosom in das Zytoplasma folgt die Translation, die virale Genexpression. Dazu

wird die virale *mRNA* an den freien Ribosomen und dem rauen endoplasmatischen Retikulum in virale Proteine übersetzt. Es folgt die Replikation und Transkription, wodurch sich die Nukleinsäure und Virusproteine vermehren. Nachdem die einzelnen Viruskomponenten zusammengebaut wurden (*Assembly*), erfolgt die Freisetzung neu gebildeter Viren (Exozytose) [28, 29].



S-Protein = Spike-Protein, M-Protein = Matrix-Protein, E-Protein = Envelope-Protein, N-Protein = Nukleokapsid-Protein; ACE 2 = angiotensin-converting enzyme 2, TMPRSS2 = transmembrane protease serine subtype 2, +ssRNA = positive-sense, single-stranded RNA, nsps = non-structural proteins, RdRP = RNA-dependent RNA polymerase, dsRNA = double-stranded RNA, DMVs = double-membrane vesicles, CMs = convoluted membranes, DMSs = double-membrane spherules, sg mRNA = subgenomic mRNA, An = 3' polyA sequence, CapL = 5' cap structure, L = leader sequence, ER = endoplasmic reticulum, ORF1a/1b = open reading frames, ERGIC = ER-to-Golgi intermediate compartment

Abb. 1: Der virale Replikationszyklus von SARS-CoV-2

(Quelle: V'kovsiki et al., *Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2*, nature reviews microbiology, 2020 [29])

Dargestellt ist die Invasion von SARS-CoV-2 in die Wirtszelle. Die S1-Untereinheit des *Spike*-Proteins, welche die Rezeptorbindende Domäne enthält (RBD), bindet an ACE2, das sich auf der Wirtszelloberfläche befindet. Durch die Bindung findet eine Konformationsänderung im *Spike*-Protein statt. Die Serinprotease TMPRSS2 spaltet das *Spike*-Protein an der S1/2-Schnittstelle und die S2'-site der S2-Untereinheit wird freigelegt. Dies ist die Voraussetzung für die nachfolgende Fusion zwischen Virus und Zelle. Anschließend wird die virale RNA in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt

(*Uncoating*). Der Viruseintritt kann alternativ durch Clathrin-vermittelte Endozytose in die Endolysosomen erfolgen, wo die S2'-Spaltung durch Cathepsine erfolgt [28, 30].

Nach der Freisetzung der viralen RNA werden zwei große Leserster (ORF = *open reading frames 1a/1b*) umgehend translatiert. Daraus resultieren Polyproteine wie pp1a und pp1ab, die in nicht-strukturgebende Proteine (*nsps* = *non-structural proteins*) prozessiert werden, um anschließend den viralen Replikations- und Transkriptionskomplex zu bilden.

Die Translation der viralen RNA erfolgt an den freien Ribosomen, dort wird u.a. auch die RNA-abhängige RNA-Polymerase gebildet, die die virale RNA in einen Minusstrang repliziert. Dieser wird anschließend als Matrize genutzt, um neue genomische Plus-RNAs herzustellen, welche gemeinsam mit dem N-Protein Nukleoproteinkomplexe bilden. Die anderen Strukturproteine (S, E, M) gelangen zum rauen endoplasmatischen Retikulum. Von dort aus erfolgt über das *ERGIC* (*Endoplasmic reticulum-to-Golgi intermediate compartment*) ein *Assembly*, d.h. die Zusammensetzung der viralen Bestandteile. Die neu gebildeten Viren werden per Exozytose ausgeschleust und die Invasion beginnt erneut [28, 29].

Der virale Vermehrungszyklus unterliegt, neben der vollständigen genomischen Replikation, einem diskontinuierlichen Transkriptionsprozess, weshalb die Negativstrang-RNA-Synthese zu sog. subgenomischen Negativstrang-RNAs führt, die als Vorlage für Positivstrang-*sg-mRNAs* dienen. Deren Translation resultiert in der Etablierung von strukturgebenden und akzessorischen Proteinen [28-30].

In **Abb. 1** sind auch zugleich die Zielstrukturen der medikamentösen Therapien von einer SARS-CoV-2-Infektion dargestellt. Medikamentöse Therapien werden bevorzugt in Risikogruppen, darunter auch immunsupprimierte Patienten, angewandt, um schwere Verläufe von *Covid-19* abzuwenden. Die Kombination aus Nirmatrelvir (Proteaseinhibitor) und Ritonavir (RNA-Polymeraseinhibitor) kann innerhalb der ersten fünf Tage nach Symptombeginn eingesetzt werden. Remdesivir (RNA-Polymeraseinhibitor) kann innerhalb der ersten sieben Tage nach Symptombeginn eingesetzt werden. Diese Medikamente verhindern die Virusreplikation. Dexamethason sollte bei Patienten mit *low-flow*-Sauerstoffbedarf verabreicht werden. Patienten mit Sauerstoffbedarf können additiv mit dem JAK1-Antagonisten Baricitinib behandelt werden. Bei rasch progredientem Krankheitsverlauf ist der Einsatz von Tocilizumab als IL-6-Rezeptor-Antagonist möglich. Die Kombination aus Baricitinib und Tocilizumab sollte nicht erfolgen [31]. Monoklonale Antikörper (MAK), die das *Spike*-Protein von SARS-CoV-2 neutralisieren und somit den Viruseintritt unterbinden (passive Immunisierung) konnten anfänglich zur Abwendung eines schweren Krankheitsverlaufs oder zur Prävention einer Infektion eingesetzt werden. SARS-CoV-2-Virusvarianten entstehen jedoch hauptsächlich durch Mutation im *Spike*-Protein, sodass die Neutralisationskapazität der MAK begrenzt ist und diese oftmals nicht wirksam sind [25, 32]. Evusheld enthält die MAK Tixagevimab und Cilgavimab. Die Indikation für eine passive Immunisierung mit Evusheld ist aufgrund der Subvarianten sehr eingeschränkt, konnte 2022 aber laut STIKO in Einzelfällen, wie z.B. bei Patienten

nach alloHSZT vor der Immunrekonstitution, als Präexpositionsprophylaxe eingesetzt werden [32].

1.6 Natürliche Immunantwort auf eine SARS-CoV-2-Infektion

Der erste Kontakt mit dem Virus findet im oberen Respirationstrakt statt, v.a. in dem Nasopharynx-assoziierten lymphatischen Gewebe. Über Mustererkennungsrezeptoren (*PRR* = *pattern recognition receptors*) erkennen die Zellen der angeborenen Immunität pathogenassoziierte molekulare Muster (*PAMPS*) des Virus. Dabei wird durch angeborene antivirale Membranrezeptoren (*TLR 7*, *TLR 8*, *TLR 9*) oder zytosolische Rezeptoren die Typ-I-Interferon-Reaktion ausgelöst, dessen Produktion v.a. in dendritischen Zellen erfolgt. Typ-I-IFN ist folglich wichtig für die Initiierung der adaptiven Immunantwort. Die viralen Antigene werden in den *APC* phagozytiert und in kleinere Peptide zerlegt, sodass diese anschließend über den Oberflächenrezeptor *MHC II* präsentiert werden können. Das führt zur Aktivierung von T-Helferzellen und B-Zellen. Aktivierte T-Helferzellen differenzieren in Subtypen aus, wobei TH2-Zellen durch IL-4-Sekretion und CD40/CD40L-Interaktion zur Reifung der humoralen Immunantwort beitragen. Einige T-Helferzellen differenzieren auch zu follikulären T-Zellen, die die Reifung von keimzentrumsabhängigen Gedächtnis-B-Zellen und hochaffinen, langlebigen Antikörper-produzierenden Plasmazellen steuern. Eine Untergruppe differenziert zu Gedächtnis-T-Zellen aus. TH1-Zellen produzieren IL-2, IFN γ und TNF- α und sind bedeutend in der zellulären Immunreaktion. *MHC-I* wird auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Virusinfizierte Zellen präsentieren die viralen Peptide über *MHC-I*, dadurch erfolgt die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen. Zytotoxische T-Zellen leiten die Apoptose der infizierten Wirtszelle durch Fas-/Fas-Ligand-Interaktion ein. Es gibt Hinweise darauf, dass das T-Zell-Gedächtnis bei rekonvaleszenten und/ oder geimpften Patienten verantwortlich für die Kreuzreaktivität gegen VOC ist. Der *MHC* ist nicht immer auf den virusinfizierten Zellen vorhanden, da eine Herabregulierung einen *immune escape*-Mechanismus des Virus darstellt. NK-Zellen sind fähig, infizierte Zellen direkt zu erkennen, ohne dass Antigene über *MHC* exprimiert werden und enthalten Granula mit IFN γ und TNF- α , um die virusinfizierte Zelle direkt abzutöten [33].

1.7 Immunantwort auf den *mRNA*-Impfstoff BioNTech/Pfizer (BNT162b2)

Alle Patienten erhielten im Rahmen unserer Studie den *mRNA*-Impfstoff von BioNTech/Pfizer 162b2 (BNT162b2) in einer Wirkstoffdosis von 30 µg. Dies ist ein monovalenter Impfstoff, der ab einem Alter von 12 Jahren seit dem 21.12.2020 zugelassen ist. Die *mRNA* ist in Lipidnanopartikeln verpackt und nukleosidmodifiziert. Sie kodiert für das *Spike*-Protein, welches somit im Wirt exprimiert wird und sowohl eine zelluläre als auch humorale Immunantwort induziert [34]. Laut Untersuchungen in einer gesunden, immunkompetenten Kohorte führte eine Zweifach-Impfung mit BNT162b2 zu einem 95 %igen Schutz gegen *Covid-19*. In einem Mausmodell nahmen die Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG 14 Tage nach der ersten Impfung signifikant zu und hielten bis zum Tag 21 an, wohingegen eine zehnfache Erhöhung der Antikörperreaktion nach der zweiten Impfung zu verzeichnen war. Des Weiteren führte die Immunisierung mit BNT162b2 zu einer hohen Anzahl an Keimzentrum-B-Zellen, follikulären T-Helferzellen und Plasmazellen. Die Reaktionen der CD4-positiven Zellen ging v.a. von TH1-Zellen aus, es wird ein Anstieg der CD8-positiven Zellen insbesondere nach der sekundären Immunisierung beschrieben [35].

Die Lipid-Nanopartikel enthalten ionisierbare Lipide, die eine effiziente Übertragung der *mRNA* in das Zytoplasma der Wirtszellen ermöglichen. Die Moleküle haben eine neutrale Oberflächenladung bei physiologischem pH-Wert, die positiv im sauren Endosom wird, was die Auflösung der Membran und die Freisetzung der *mRNA* begünstigt. Der *mRNA*-Impfstoff induziert effektive *spike*-spezifische adaptive Immunantworten und T-Zell-Reaktionen, die die humorale Immunität fördern und zu einer Verhinderung einer schweren SARS-CoV-2-Infektion beitragen können. An der Injektionsstelle und in den drainierenden Lymphknoten erfolgt die Aufnahme des Impfstoffs und die Produktion des kodierten Antigens. Zudem erfolgte der Nachweis der *mRNA* in anderen Geweben wie z.B. der Leber, Lunge, Milz und nicht drainierenden Lymphknoten. Durch die lokale Entzündungsreaktion erfolgt die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und verschiedenen dendritischen Zellen aus dem Blut zur Injektionsstelle (angeborene Immunantwort). Dendritische Zellen und Monozyten/ Makrophagen präsentieren das Antigen und unterstützen das *Priming* von T-Zellen. Die Keimzentrumsreaktion der B-Zellen im Lymphknoten wird durch die follikulären T-Helferzellen begünstigt [36].

Im Rahmen einer Studie von Arunchalam et al. wurde die Immunantwort auf das BNT162b2-Vakzin in einer gesunden Kohorte von 56 Freiwilligen getestet. Die Messung der neutralisierenden Antikörper ergab einen hohen Titer gegen den Wildtyp des Virus und, in geringerem Ausmaß, gegen die Variante B.1.351. Nach der zweiten Impfung konnte ein signifikanter Anstieg polyfunktionaler CD4-positiver und CD8-positiver Zellen beobachtet werden. Die zweite Impfung stimulierte verstärkt die angeborene Immunantwort, was durch die Messung größerer CD14CD16-positiver entzündlicher Monozytenzahlen und durch eine höhere Konzentration von Plasma-IFN γ und CXCL10 validiert wurde. Nach 90-120 Tagen verringerte sich die neutralisierende Antikörperreaktion um das Zweifache [37]. Wenn die angeborene Immunantwort zeitverzögert auftritt, z.B. aufgrund von *escape*-Mechanismen des Virus oder einer defekten angeborenen Immunität, begünstigt dies die Virusreplikation im oberen Respirationstrakt und in der Lunge und geht folglich mit einer verzögerten adaptiven Immunantwort und schweren Verläufen einher. Analog dazu wird beschrieben, dass höhere Konzentrationen von IFN Typ I und III nach einer Infektion mit einem milderem Verlauf und einer geringeren Mortalität assoziiert sind [38].

Ältere Menschen haben physiologisch reduzierte naive T-Zellzahlen und bilden zeitverzögert eine T-Zellreaktion, wodurch auch die Antikörperbildung, die zum großen Teil T-Zell-abhängig ist, verzögert eintritt. Es ist bekannt, dass ältere gesunde Menschen ein altersbedingt schwächeres Immunsystem aufgrund der Immunseneszenz haben und in reduziertem Ausmaß auf Impfungen gegen z.B. Hepatitis B, Pneumokokken und Influenza ansprechen [39-41].

Inwiefern eine effektive Immunisierung bei Patienten nach alloHSZT möglich ist, war zu Beginn der Arbeit unklar. Immundefiziente Patienten wurden von den ersten Studien zur Wirksamkeit des *SARS-CoV-2-mRNA*-Impfstoffs ausgeschlossen, sodass die Analyse in diesem Patientenkollektiv essenziell war.

Zu Beginn unserer prospektiven Studie gab es nur wenige homogene Daten, die sich ausschließlich auf allogene transplantierte Patienten konzentrierten, oft waren es gemischte Patientenkollektive nach autologer und allogener Blutstammzelltransplantation. Mit dem Ziel, die humorale Immunantwort in dieser hochgefährdeten Untergruppe zu untersuchen, haben wir Daten von 88 Patienten nach alloHSZT gesammelt. Es wurden alle Patienten mit dem *mRNA*-Impfstoff BNT162b2 geimpft, da es bei anderen Impfstoffen zu thrombotischen Ereignissen gekommen war und besondere Empfehlungen zur Impfstoffsicherheit ausgesprochen

wurden [42, 43]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass BNT162b2 mit der höchsten Effektivität einer symptomatischen SARS-CoV-2-Infektion vorbeugt [44].

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Analyse prädiktiver Faktoren für eine erfolgreiche humorale Immunantwort nach zweifacher Impfung mit dem mRNA-Impfstoff BNT162b2, gemessen an der Höhe des Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titers und des Neutralisationstiters. Im Rahmen des Pandemiegeschehens war unklar, inwiefern eine effektive Immunisierung in dieser vulnerablen Patientengruppe überhaupt möglich ist, da zum einen eine verzögerte Immunrekonstitution nach alloHSZT und zum anderen ein schlechteres Impfansprechen Herausforderungen in diesem Patientenkollektiv darstellten. Daher intendierten wir, Patienten- und Transplantationsfaktoren herauszufiltern, die einen günstigen Impfzeitpunkt von Patienten nach alloHSZT vorhersagen und zu formulieren, wovon ein Impferfolg in dieser vulnerablen Gruppe abhängig ist. Der Fokus wurde dabei auch auf Patienten gerichtet, die früh (< 365 Tage) nach alloHSZT geimpft wurden, da insbesondere diese Subpopulation hochgefährdet ist.

Auch war es wichtig zu differenzieren, in welchen Faktoren sich *high-responder* von *non-/low-respondern* unterscheiden. Die Identifikation der *non-/low-responder* war zudem essenziell, um präemptiv passive Immunisierungsstrategien in Betracht zu ziehen.

Durch zweimalige Messung der Antikörpertiter war es möglich, Aussagen über die Antikörperpersistenz zu machen und zugleich die Notwendigkeit einer *Boosterung* zu diskutieren, da weder zum Impferfolg von Patienten nach alloHSZT noch zur Notwendigkeit der Auffrischimpfung Daten existierten. Dies war auch wichtig, um den Patienten unseres Zentrums faktenbasierte Aussagen und Empfehlungen entgegenbringen zu können.

Zuletzt erfolgte ein Vergleich des Patientenkollektivs mit einem gesunden Kollektiv, um die Titerhöhe anhand einer Referenz besser einordnen zu können sowie Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu analysieren.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkohorte

Insgesamt wurden 88 Patienten nach alloHSZT mit einem medianen Patientenalter von 60 Jahren (Spannweite 23-79) in die Studie eingeschlossen (Tabelle 1). Alle Patienten hatten zuvor im März und April des Jahres 2021 zwei BNT162b2 *mRNA*-Impfstoffdosen erhalten. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden mehrere Blutproben von Patienten entnommen, die zuvor gegen das SARS-CoV-2-Virus geimpft worden waren. Die Impfung selbst erfolgte außerhalb der Studie. Die ersten Blutproben wurden am 07.06.2021, 08.06.2021 und 10.06.2021 entnommen. Die zweite Blutabnahme erfolgte hauptsächlich am 02.09.2021 und am 03.09.2021 sowie vom 06.09.2021 bis einschließlich 08.09.2021. Unter den Patienten waren 35 weiblich (40 %), der größere Anteil war männlich. Gut ein Viertel der Patienten (27 %) erhielt die Grundimmunisierung gegen SARS-CoV-2 innerhalb des ersten Jahres nach der Transplantation. Das mediane Zeitintervall zwischen alloHSZT und erster Impfung betrug 707 Tage (Spannweite 103-7673). Der Abstand zwischen beiden Impfungen lag im Median bei 28 Tagen (Spannweite 12-57), der Abstand zwischen zweiter Impfung und erster Blutabnahme bei im Median 41 Tagen (Spannweite 13-76) und zwischen zweiter Impfung und zweiter Blutabnahme bei im Median 133 Tagen (Spannweite 106-157). Zwischen beiden Blutabnahmen lagen im Median 91 Tage (Spannweite 84-95) (**Abb. 3**).

Die häufigste, der alloHSZT zugrundeliegende Erkrankung, war die akute myeloische Leukämie (50 %), gefolgt vom Myelodysplastischen Syndrom (16 %) und den Myeloproliferativen Neoplasien (11 %). Jeweils 8 % der Patienten litten zuvor an einer akuten lymphatischen Leukämie oder einem Non-Hodgkin-Lymphom/ Hodgkin-Lymphom und 7 % hatten andere, nicht näher bezeichnete, hämatologische Grunderkrankungen.

Ein *Mismatch* in der HLA-Kompatibilität lag bei 12 Patienten (14 %) vor, die detaillierte Verteilung der Spendertypen lautet wie folgt: 67 % der Patienten hatten einen *Matched Unrelated Donor* (MUD = HLA-identische Fremdspende), 21 % hatten einen *Matched Related Donor* (MRD = HLA-identische Familienspende), 7 % hatten einen *Mismatched Unrelated Donor* (MMUD = Fremdspende, die nicht HLA-identisch ist) und 6 % hatten einen *Mismatched Related Donor* (MMRD = Familienspende, die nicht HLA-identisch ist).

Insgesamt hatten 31 Patienten (35 %) aus dem Patientenkollektiv eine chronische GvHD. Immunsuppressiva nahmen 32 % der Patienten ein (**Abb. 2**). Während der Impfung hatten 5 % der Patienten nachweislich eine Aktivität ihrer Grunderkrankung und befanden sich somit nicht in Remission und 2 % der Patienten erhielten dafür eine chemotherapeutische Behandlung.

Ausscheidungsgründe zum zweiten Messzeitpunkt innerhalb der Studie waren eine zwischenzeitliche Infektion mit SARS-CoV-2, die Verhinderung durch Urlaub oder einen zu langen Anfahrtsweg, ein Krankenhausaufenthalt durch andere infektiologische Komplikationen oder ein Zweitmalignom sowie der zwischenzeitlich eingetretene Tod durch ein Rezidiv der Grunderkrankung.

Tabelle 1: Übersicht der Patientencharakteristika

Patientencharakteristika	n (%)
Alter	60 (Median, Spannweite 23-79)
Geschlecht	35 (40 %) weiblich, 53 (60 %) männlich
Grunderkrankung	44 (50 %) AML, 14 (16 %) MDS, 10 (11 %) MPN, 7 (8 %) ALL, 7 (8 %) NHL/HL, 6 (7 %) Andere
Spendertyp	59 (67 %) MUD, 18 (21 %) MRD, 6 (7 %) MMUD, 5 (6 %) MMRD
Aktive Grunderkrankung	4 (5 %)
Chemotherapie	2 (2 %)
Immunsuppressiva	28 (32 %)
Chronische GvHD	31 (35 %)

n: absolute Patientenzahlen; %: Prozentualer Anteil der Patienten; AML = Akute myeloische Leukämie, ALL = Akute lymphatische Leukämie, MDS = Myelodysplastisches Syndrom, MPN = Myeloproliferative Neoplasien, NHL/HL = Non-Hodgkin-Lymphom/Hodgkin-Lymphom; MUD = *Matched Unrelated Donor*, MRD = *Matched Related Donor*, MMUD = *Mismatched Unrelated Donor*, MMRD = *Mismatched Related Donor*; GvHD = *Graft versus Host disease*

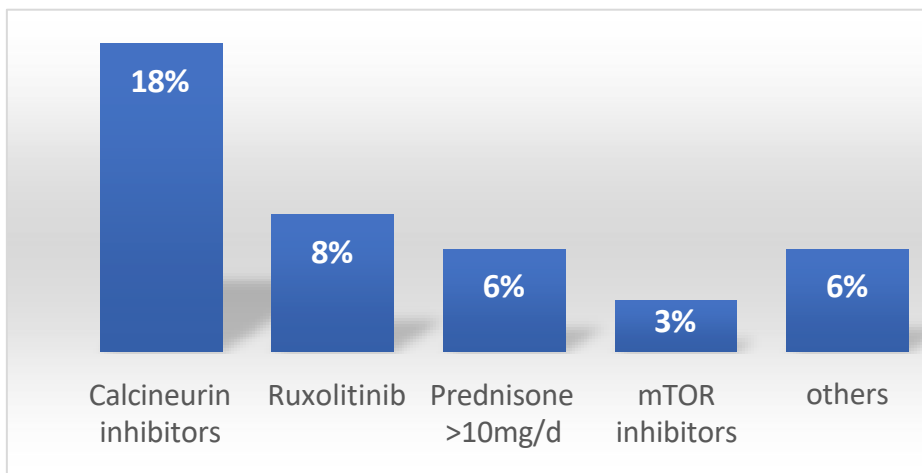


Abb. 2: Verteilung der Immunsuppressiva innerhalb der Patientenkohorte

Während der Grundimmunisierung erhielten 28 Patienten (32 %) eine immunsuppressive Therapie. Der größte Teil (18 %) fiel darunter auf die Einnahme von Calcineurininhibitoren (Advagraf, Prograf), gefolgt von der Einnahme von Ruxolitinib (8 %) und Prednison >10mg/Tag (6 %). Nur ein geringer Anteil der Patienten (3 %) wurde mit *mTOR*-Inhibitoren (Sirolimus, Everolimus) behandelt oder anderen, nicht näher bezeichneten Immunsuppressiva (6 %).

Einschlusskriterien

Um in die Studie eingeschlossen zu werden, war ein Alter über 18 Jahre, eine stattgehabte alloHSZT aufgrund einer hämatoonkologischen Grunderkrankung, eine abgeschlossene SARS-CoV-2-Impfung innerhalb der letzten drei Monate und ein Intervall zur letzten SARS-CoV-2-Impfung von mehr als 14 und weniger als 120 Tagen die Voraussetzung.

Ausschlusskriterien

Ausschlusskriterien waren ein Abstand zur letzten Impfung von weniger als 14 Tagen bei der ersten Messung, ein Abstand zur letzten Impfung von mehr als 120 Tagen, eine nach technischen Angaben nicht abgeschlossene Impfung, eine passive intravenöse Therapie mit humanen Immunglobulinen innerhalb der letzten vier Wochen, eine hochgradige Immunsuppression mit mehr als 1 mg/kg KG Prednison pro Tag, eine frühere oder zwischenzeitliche Infektion und eine fehlende schriftliche Einverständniserklärung.

2.2 Projektübersicht/ Zeitplan

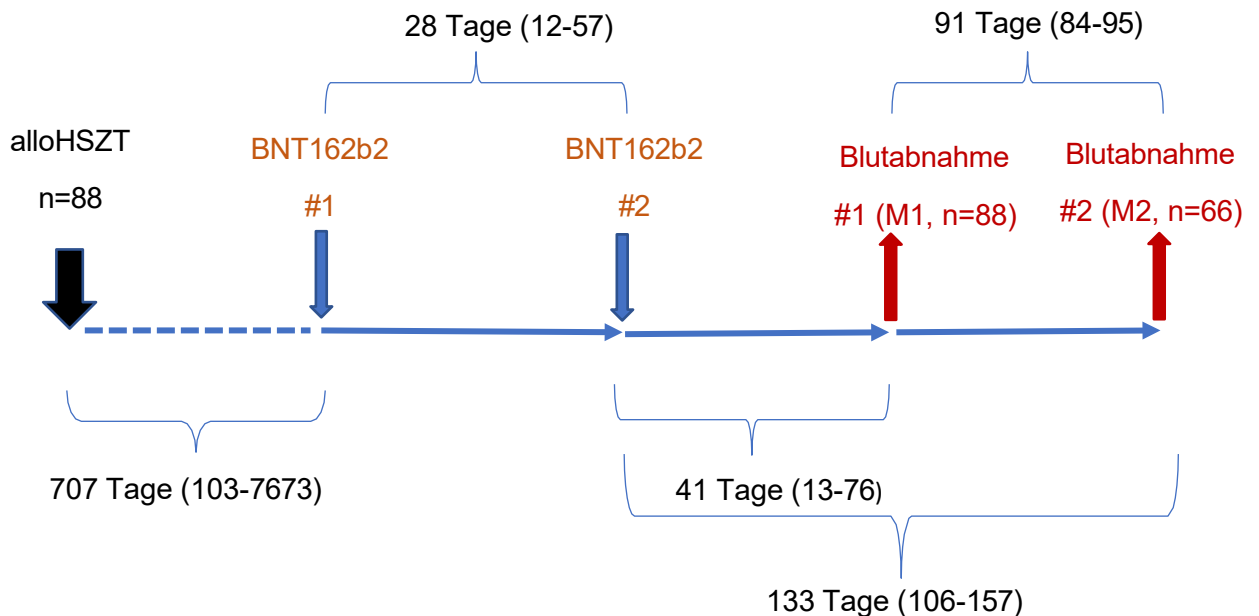


Abb. 3: Zeitintervalle, angegeben in Median und (Spannweite)

Der mediane Zeitabstand zwischen alloHSZT und erster Impfung (BNT162b2 #1) betrug 707 Tage (103-7673). Zwischen den beiden Impfungen lagen im Median 28 Tage (12-57). Das Intervall zwischen der zweiten Impfung (BNT162b2 #2) und der ersten Blutabnahme (Blutabnahme #1) betrug 41 Tage (13-76). Zwischen den beiden Blutabnahmen lagen im Median 91 Tage (84-95) und zwischen der zweiten Impfung und der zweiten Blutabnahme (Blutabnahme #2) im Median 133 Tage (106-157). M1: Messung 1, M2: Messung 2; n: Anzahl der teilnehmenden Patienten zum jeweiligen Messzeitpunkt

2.3 Messparameter

Die Erhebung klinischer Daten wie der Grunderkrankung, das Datum der Transplantation, die Einnahme von Immunsuppressiva, den Status der aktiven Erkrankung oder das Vorliegen einer *GvHD* erfolgte aus den Krankenakten. Zudem füllten die Patienten einen Fragebogen (siehe Anhang) aus mit dem Datum der jeweiligen Impfungen und möglichen Impfreaktionen wie Schmerzen an der Einstichstelle, Kopf- und Gliederschmerzen, Fieber, Schüttelfrost, Müdigkeit, Schwäche und sonstigen Beschwerden.

In allen Serumproben wurde die impfinduzierte humorale Immunantwort durch das Messen der *Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG* und der Neutralisationstiter überprüft. Des Weiteren konnten Patienten mit durchgemachter *SARS-CoV-2*-Infektion durch das Messen der Nukleokapsidantikörper detektiert und ausgeschlossen werden.

Außerdem bestimmten wir aus dem Blut der Patienten den peripheren T- und B-Zellstatus. Dazu gehörte die Gesamt-T-Zellzahl (CD3+), die Anzahl der T-Helferzellen (CD3+CD4+), die Anzahl der zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8+), die Anzahl der NK-Zellen (CD16+CD56+) und die Anzahl der B-Lymphozyten (CD19+). Die quantitativen Immunglobuline A, G und M wurden ebenfalls mit einem ELISA (Roche) differenziert.

2.4 Gesundes Vergleichskollektiv

Das Institut für Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf untersuchte eine gesunde Kontrollgruppe auf impfinduzierte SARS-CoV-2-S1-spezifische-IgG-Titer und neutralisierende SARS-CoV-2-Antikörper zwischen den beiden Impfstoffdosen (BNT162b2), siebzehn Tage nach der zweiten Impfung und etwa ein halbes Jahr nach der zweiten Impfung, um die Titerhöhe im Zeitverlauf zu beobachten. Die erste Blutprobe wurde am 15. Januar 2021, die zweite Blutprobe am 5. Februar 2021 und die dritte Blutprobe am 29. Juli 2021 entnommen. Alle zuvor infizierten Patienten konnten durch die Messung des Nukleokapsid-Antikörpers detektiert und ausgeschlossen werden. Um das Kollektiv mit unseren Patienten und den Messzeitpunkten adäquat zu vergleichen, fokussierten wir uns auf die Untersuchung der zweiten und dritten Blutabnahme. Die Analyse umfasste v.a. altersbedingte Unterschiede in der Immunantwort durch Differenzierung in eine junge (≤ 60 Jahre) und ältere (≥ 80 Jahre) Kohorte sowie Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Vergleich zu Patienten nach alloHSZT [45, 46].

Die Kontrollgruppe bestand aus insgesamt 112 gesunden Teilnehmern, wovon 47 % 60 Jahre alt oder jünger waren und 53 % 80 Jahre alt oder älter waren. Insgesamt 81 Personen (72 %) des Vergleichskollektivs waren weiblich. Das Alter lag in dieser Kohorte bei einem Median von 80 Jahren (Spannweite 19-100).

2.5 Ethikvotum und Einverständniserklärung

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Studennummer 2021-1515 des Patientenkollektivs und 2021-1287 des Vergleichskollektivs).

Alle Patienten haben nach ausführlicher Aufklärung schriftlich zur Teilnahme an der Studie eingewilligt (siehe Anhang). Sie wurden aufgeklärt über die Blutabnahme (je

15 ml Blut pro Messzeitpunkt) als invasive Maßnahme und die damit verbundenen möglichen Gefahren, wie einem Hämatom, einer Infektion oder, in seltenen Fällen, einer Nervenläsion. Die Patienten konnten zusätzlich entscheiden, ob sie über das Ergebnis informiert werden möchten. Dabei wurden sie ausdrücklich darauf hingewiesen, dass es noch keine Information zu einem Titer-Grenzwert gab, ab dem ein effektiver Immunschutz gegen SARS-CoV-2 vorliegt. Des Weiteren erfolgte eine Aufklärung über den Datenschutz und die pseudonymisierte Datenanalyse. Die Verarbeitung der Daten erfolgte nach den gesetzlichen Bestimmungen und setzte gemäß Artikel 6 Abs.1 S.1 lit. a, 9 Abs. 2 lit. a der Datenschutz-Grundverordnung (DSGVO) eine unterschriebene Einwilligungserklärung voraus. Im Rahmen der Untersuchung wurden die Vorgaben der Berufsordnung und der revidierten Deklaration von Helsinki berücksichtigt.

2.6 Messmethoden

Sowohl im Patientenkollektiv als auch im gesunden Kontrollkollektiv wendeten wir dieselben Messmethoden an. Mithilfe des „Euroimmun Anti-SARS-CoV-2-Quantivac-Enzymimmunoassay“ wurde der SARS-CoV-2-S1-IgG-Antikörpertiter gemessen. Dies ist ein quantitativer *ELISA* (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), der die Antikörperkonzentration mittels 6-Punkt-Kalibrierungskurve bestimmt, basierend auf dem „Euroimmun Analyzer I-2P-System“, gemäß den Anweisungen des Herstellers. Er gibt die Antikörperkonzentration als standardisierte Einheit in BAU/ml (*Binding Antibody Units*) wieder. Titer unterhalb eines *cutoff* von 25,6 BAU/ml galten dabei als negativ, Titer größer 35,2 BAU/ml als positiv und Ergebnisse dazwischen wurden als unsicher gewertet. Für unverdünnte Proben lag die untere Nachweisgrenze bei < 3,2 BAU/ml und die obere Nachweisgrenze bei > 384 BAU/ml. Es erfolgte eine 1:10 oder 1:100 Verdünnung in einem IgG-Probenpuffer für Proben oberhalb der Nachweisgrenze.

Der „SARS-CoV-2-IgG-Chemilumineszenz-Mikropartikel-Immunoassay“ (CMIA) von Abbott wurde auf einem ARCHITECT i2000 SR durchgeführt, um IgG-Antikörper gegen das Nukleokapsid zu messen, die eine frühere Exposition gegenüber dem Virus anzeigen. Der berechnete Index (S/C) resultiert aus dem Verhältnis zwischen der chemilumineszenten relativen Lichteinheit (*RLU = relative light unit*) und dem Kalibrator. Die resultierende Chemilumineszenzreaktion wird folglich als relative

Lichteinheit gemessen. Dabei wurde ein Index (S/C) $< 1,4$ als negativ und ein Index $\geq 1,4$ als positiv gewertet [45].

Um den SARS-CoV-2-Neutralisationstiter der Patientenproben zu bestimmen, wurde ein serieller Verdünnungsendpunkt-Neutralisationstest mit dem infektiösen SARS-CoV-2-Isolat NRW-42 (EPI_ISL_425126) in einem Labor der Sicherheitsstufe S3 durchgeführt. Im Vergleich zur Wuhan-Hu1-Referenzsequenz besteht hier ein Einzelnukleotidaustausch in den *Spike-ORF (open reading frames)*. Die Adenosin>Guanin-Mutation befindet sich an der Nukleotidposition 23.403, welche die S1-Domäne, aber nicht die Rezeptor-bindende-Domäne umfasst. Zunächst wurden die seriellen Verdünnungen der Serumproben durch Wärme (56°C, 30 Minuten) inaktiviert und anschließend in zellfreien Platten mit 100 Gewebekulturen (50 Einheiten SARS-CoV-2) für eine Stunde bei 37°C vorinkubiert. Danach erfolgte die Hinzugabe von 100 µl der Zellsuspension mit 7×10^4 /ml Viruszellen (ATTC-CCL-81). Anschließend fand eine Bebrütung der Platten bei 37°C und 5 % CO₂ für 4 Tage statt. Danach erfolgte die mikroskopische Diagnostik auf Virus-induzierte zytopathische Effekte. Es erfolgte eine Bestimmung der Neutralisationstiter als höchste Serumverdünnung ohne sichtbaren zytopathischen Effekt, wobei der Kehrwert der Serumverdünnung den Neutralisationstiter widerspiegelt [45, 47].

Das Patientenkollektiv stammte aus dem Uniklinikum Düsseldorf (74 Patienten) und dem Uniklinikum Aachen (14 Patienten). Das Institut für Virologie Aachen verwendete den „LIASION SARS-CoV-2 S1/S2-IgG Test“ von DiaSorin zur Messung des Antikörpertiters, der in der Einheit AU/ml (*antibody units/ml*) angegeben wird. Wir übersetzten die Einheit in die Standardeinheit der WHO "BAU/ml" mit einem angepassten Umrechnungsfaktor (2,6), um die Ergebnisse zusammenzufügen. Dies ist ein Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA). Zuerst erfolgt eine Beschichtung von Magnetpartikeln mit S1/S2-Antigenen. Monoklonale Antikörper von Mäusen gegen humanes IgG werden mit einem Isoluminol-Derivat konjugiert. Während der Inkubation bindet somit in Serumproben vorhandenes Anti-SARS-CoV-2-S1/S2-IgG an die Antigene. Im Rahmen einer zweiten Inkubation verbindet sich das Antikörperkonjugat mit dem gebundenen Anti-SARS-CoV-2-IgG. Durch die Hinzugabe von Reagenzien wird eine Chemilumineszenzreaktion ausgelöst. Mittels Photomultiplier wird das Lichtsignal, das der Menge an Isoluminol-Antikörper-Konjugat entspricht, als relative Lichteinheit gemessen. Proben mit einem Antikörpertiter < 15 AU/ml wurden als negativ und ≥ 15 AU/ml als positiv gewertet [47, 48].

Zusammenfassend erfolgte die Messung der drei folgenden Endpunkte:

1. Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG in BAU/ml (positiv ab 35,2).
2. SARS-CoV-2-Nukleokapsid-spezifische Antikörper, um eine natürliche Infektion zuvor auszuschließen.
3. Neutralisierende Antikörper gegen SARS-CoV-2-S1.

2.7 Studienart, Datenverarbeitung und Statistische Analyse

Dies ist eine prospektive nicht-interventionelle klinische Beobachtungsstudie. Die Daten wurden aus Patientenakten und dem Krankenhausinformationssystem Medico (CompuGroup Medical SE& Co. KGaA, Koblenz) sowie dem klinikinternen KMT-Manager gewonnen und mit dem Softwareprogramm Microsoft Excel für Microsoft 365 MSO (Version 2303 Build 16.0.16227.20202) dokumentiert. Einige Abbildungen wurden mit dem Softwareprogramm Microsoft PowerPoint für Microsoft 365 MSO (Version 2402 Build 16.0.17328.20124) erstellt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm „SPSS“ in der Version 27. Mittels *Shapiro-Wilk-Test* wurde die Prüfung der Variablen auf Normalverteilung durchgeführt. Da alle Variablen nicht normalverteilt waren, wurde die Analyse der nicht-parametrischen Variablen und der dichotomen nominalskalierten Variablen mit dem *Mann-Whitney-U-Test* ermittelt. Nominalskalierte Variablen, die nicht dichotom sind und somit mehrere Unterkategorien aufweisen wurden mithilfe des *Kruskal-Wallis Test* ausgewertet. Bei konstitutiven Stichproben mit Fallzahlen über 30 wurde hier stetig die asymptotische Signifikanz angegeben und anschließend ein paarweiser Vergleich mittels *Mann-Whitney-U-Test* durchgeführt. Als *post hoc*-Test erfolgte eine Bonferroni-Korrektur. Um die Effektstärke nach Durchführung eines signifikanten *Kruskal-Wallis*- oder *Mann-Whitney-U-Test* angeben zu können, wurde der Betrag von $r = z/\sqrt{n}$ berechnet, wobei z die Standardteststatistik darstellt und n die Anzahl der Personen im Paarvergleich.

Die Korrelationen wurden bei nicht-normalverteilten Daten durch *den Spearman's rank Korrelationskoeffizienten* überprüft. Um Vergleiche zwischen den Ergebnissen der ersten und zweiten Blutabnahme zu ziehen, erfolgte die Auswertung mittels *Wilcoxon*

Matched Pair Test. Gruppenvergleiche wurden mit dem Chi-Quadrat-Test gezogen und *post hoc* durch die Bonferroni-Korrektur angepasst.

Da Antikörpertiter $< 3,2$ in SPSS nicht angegeben werden können, muss der Wert statistisch korrekt als fehlend angegeben werden oder es kann in etwa die Hälfte des letztmessbaren Wertes angegeben werden, um eine Auswertung vorzunehmen. Die untere Grenze wurde bei 1,5 festgelegt.

Das Signifikanzniveau wurde bei einem p-Wert unter oder gleich 0,05 definiert. Die Annahme entspricht dem statistischen Standard. Die angegebenen p-Werte sind zweiseitig getestet.

3 Ergebnisse

3.1 Resultate der ersten Blutabnahme – 3 Monate nach der zweiten Impfung

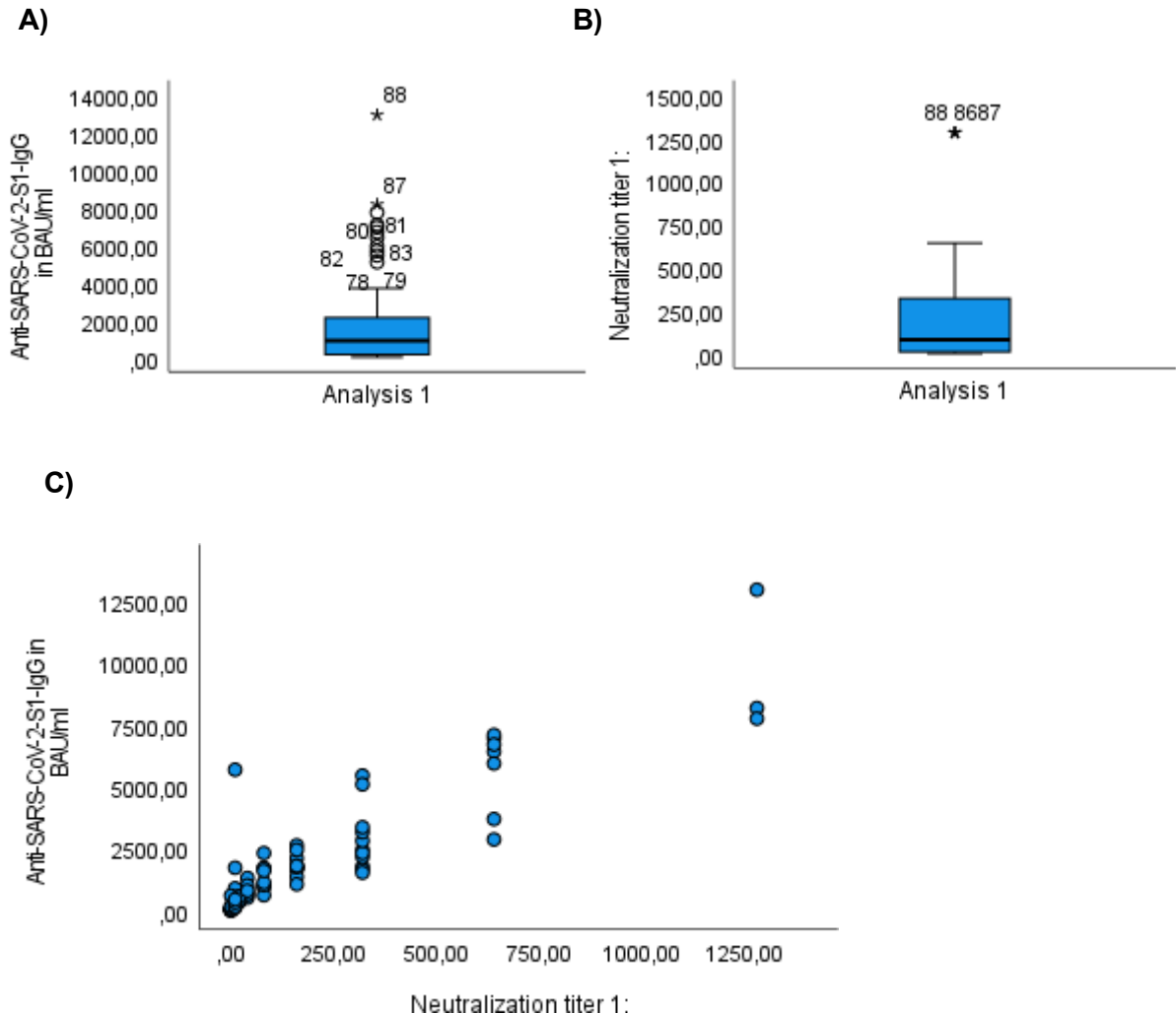


Abb. 4: Übersicht über die Verteilung der Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG- und der Neutralisationstiter im Rahmen der ersten Analyse

Dargestellt sind die Verteilungen der Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer (A) und der Neutralisationstiter (B) von 88 Patienten in Form von Boxplots etwa drei Monate nach der zweiten Impfung. Zudem ist ein Streudiagramm (C) aufgeführt, das die positive Korrelation zwischen dem Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG- und Neutralisationstiter verdeutlicht.

Der Median des Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG lag in der ersten Messung bei 892 BAU/ml (Spannweite 1,5-12934). Dieser korrelierte stark positiv und signifikant mit dem Neutralisationstiter, der im Median bei 1:80 (Spannweite 0-1280) lag ($r = 0,908$, $p < 0,001$). Je größer der Zeitabstand zwischen alloHSZT und erster Impfung, desto signifikant höhere Titer wurden gemessen ($r = 0,51$, $p < 0,001$). Hingegen gab es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Zeitabstand beider Impfungen

und der Titerhöhe ($r = -0,191$, $p = 0,075$) sowie dem Zeitabstand zwischen zweiter Impfung und erster Blutabnahme und der Titerhöhe ($r = 0,058$, $p = 0,594$).

Die Gesamtleukozytenzahl zeigte einen schwachen signifikant positiven Effekt auf die Titerhöhe ($r = 0,242$, $p = 0,023$). Unter den Leukozyten dominierte die T-Helferzellzahl mit dem größten signifikanten Einfluss auf den Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer ($r = 0,61$, $p < 0,001$), gefolgt von der Anzahl der Lymphozyten ($r = 0,46$, $p < 0,001$) und der Anzahl der T-Zellen insgesamt ($r = 0,42$, $p < 0,001$). Die NK-Zellzahl ($r = 0,35$, $p < 0,001$) sowie die Höhe der B-Zellen ($r = 0,44$, $p < 0,001$) hatten einen moderaten signifikanten Einfluss auf die Antikörperbildung. Unter den Leukozyten zeigten lediglich die zytotoxischen T-Zellen keinen signifikanten Einfluss ($r = 0,19$, $p = 0,079$) auf die humorale Immunantwort. Die Analyse der quantitativen Immunglobuline ergab einen moderaten bis geringen signifikanten Einfluss auf die Titerhöhe (IgG $r = 0,33$, $p = 0,001$; IgA $r = 0,23$, $p = 0,035$; IgM $r = 0,24$, $p = 0,025$). Eine zusammenfassende Übersicht der Korrelationen zwischen dem Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer und den einzelnen Messvariablen mit dem zugehörigen Signifikanzniveau sind in Tabelle 2 aufgezeigt. Die Mediane der Zellzahlen und der Immunglobuline sind in Tabelle 3 zur Übersicht dargestellt.

Tabelle 2: Korrelationen zwischen dem Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer und den metrischen Variablen

Variable	Spearman's rank Korrelationskoeffizient (r)	Signifikanzniveau ($p \leq 0,05$)
T-Helferzellen	0,61	< 0,001
Zeitabstand zwischen alloHSZT und erster Impfung	0,51	< 0,001
Lymphozyten	0,46	< 0,001
B-Zellen	0,44	< 0,001
T-Zellen	0,42	< 0,001
NK-Zellen	0,35	< 0,001
Immunglobulin G	0,33	0,001
Immunglobulin M	0,24	0,025
Immunglobulin A	0,23	0,035
Leukozytenzahl	0,242	0,023
Zytotoxische T-Zellen	0,19	0,079
Alter	0,033	0,762

Außerdem beeinflusste die Grunderkrankung vor der alloHSZT tendenziell die Antikörperspiegel (*Kruskal-Wallis-H* = 13,263 („5“), $p = 0,021$). Die Analyse im paarweisen Vergleich ergab signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit AML und MDS (*Mann-Whitney-U* = 189, $z = -164$, $p = 0,03$), zwischen AML und ALL (*Mann-Whitney-U* = 74, $z = -2,193$, $p = 0,028$), zwischen MDS und NHL/HL (*Mann-Whitney-U* = 15, $z = -2,537$, $p = 0,011$), zwischen MPN und NHL/HL (*Mann-Whitney-U* = 14, $z = -2,049$, $p = 0,04$) und zwischen ALL und NHL/HL (*Mann-Whitney-U* = 4, $z = -2,619$, $p = 0,009$). Patienten mit AML als Vorerkrankung hatten einen signifikant niedrigeren Titer im Median von 576 BAU/ml (Spannweite 1,5-6400) als Patienten mit MDS (Median 1368 BAU/ml, Spannweite 13-8159). Patienten mit ALL hatten im Median einen signifikant höheren Titer von 1785 BAU/ml (Spannweite 431-12934) als Patienten mit NHL/HL (Median 59 BAU/ml, Spannweite 1,5-1768). Patienten mit MPN hatten einen medianen Titer von 1385 BAU/ml (Spannweite 54-6928) und damit eine signifikant größere humorale Immunantwort als Patienten mit NHL/HL. Patienten mit

ALL (Median 1785 BAU/ml, Spannweite 431-12934) hatten einen signifikant höheren Titer als Patienten mit AML (Median 576 BAU/ml, Spannweite 1,5-6400). Patienten mit MDS (Median 1368 BAU/ml, Spannweite 13-8159) hatten einen signifikant höheren Titer als Patienten mit NHL/HL (Median 59 BAU/ml, Spannweite 1,5-1768). Nach der *post hoc* Bonferroni-Korrektur im paarweisen Vergleich konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden (die angepassten Signifikanzen lagen bei $p > 0,05$). Die Gruppe der Patienten mit einer anderen, nicht näher bezeichneten Grunderkrankung (Median 1135 BAU/ml, Spannweite 69-3675), hatte keinen signifikanten Unterschied zu den übrigen Grunderkrankungen in den paarweisen Vergleichen. Der Spendertyp zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Titerhöhe (*Kruskal-Wallis* $H = 1,487$ („3“), $p = 0,685$).

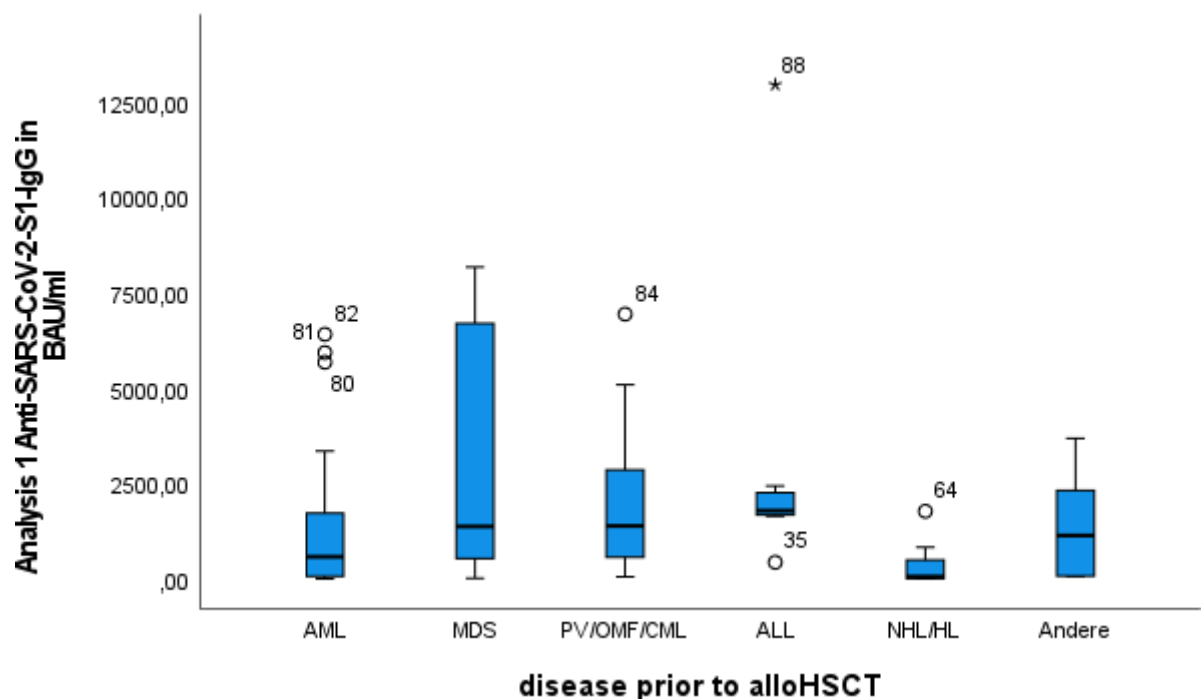


Abb. 5: Die Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titerhöhe in Abhängigkeit von der Grunderkrankung

Auf der x-Achse sind die verschiedenen Grunderkrankungen vor alloHSZT aufgelistet, auf der y-Achse die Titerhöhe. Dargestellt sind die Antikörpertiter der verschiedenen Subgruppen in Form von Boxplots. Einzelne Fälle sind Ausreißer (Kreis) oder Extremwerte (Stern). AML = Akute myeloische Leukämie; MDS = Myelodysplastisches Syndrom; PV/OMF/CML = Polycythaemia vera/ Osteomyelofibrose/ Chronische myeloische Leukämie (als Myeloproliferative Neoplasien zusammengefasst). Analysis 1 = Erster Messzeitpunkt.

Tabelle 3: Peripherer Zellstatus und Quantität der Immunglobuline

Zelltyp/ Immunglobuline	Median (Spannweite)
Gesamt-Leukozytenzahl/ μ l	6100 (2300-76000)
Lymphozyten/ μ l	1676 (382-17404)
CD3+/ μ l	948 (149-10747)
CD3+CD4+/ μ l	334 (60-5528)
CD3+CD8+/ μ l	472 (59-4233)
CD16+56+/ μ l	320 (78-1990)
CD19+/ μ l	313 (2-5066)
IgA mg/dl	114 (5-547)
IgG mg/dl	843 (203-1973)
IgM mg/dl	60 (5-282)

μ l = Mikroliter; mg/dl = Milligramm pro Deziliter; CD3+-Zellen = Gesamt-T-Zellzahl; CD3+CD4+-Zellen = T-Helferzellen; CD3+CD8+-Zellen = zytotoxische T-Zellen; CD16+56+-Zellen = NK-Zellen; IgA = Immunglobulin A; IgG = Immunglobulin G; IgM = Immunglobulin M

Des Weiteren ist hervorzuheben, dass eine aktive Erkrankung einen signifikant nachteiligen Effekt auf den Antikörpertiter hatte (*Mann-Whitney-U* = 50, z = -2,365, p = 0,018). Somit war der Median des Titers bei Patienten mit aktiver Grunderkrankung signifikant niedriger (Median 7 BAU/ml, Spannweite 1,5-583) verglichen mit Patienten, die sich in kompletter Remission befanden (Median 1001 BAU/ml, Spannweite 1,5-12934). Jedoch gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patienten, die eine Chemotherapie erhielten zu jenen, die nicht unter chemotherapeutischer Behandlung standen (*Kruskal-Wallis-H* = 0,991 („2“), p = 0,609) (Tabelle 4).

Unter den Immunsuppressiva hatte Ruxolitinib einen signifikant negativen Einfluss auf die humorale Immunantwort der Patienten (*Mann-Whitney-U* = 152,5, z = -2,021, p = 0,043). Demnach hatten Patienten, die Ruxolitinib zum Impfzeitpunkt einnahmen signifikant niedrigere Titer (Median 306 BAU/ml, Spannweite 1,5-1297) als Patienten, die dieses Immunsuppressivum nicht einnahmen (Median 998 BAU/ml, Spannweite 1,5-12934). Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Antikörperbildung gegen SARS-CoV-2-S1 hinsichtlich der Anwendung von Immunsuppressiva im Allgemeinen (*Mann-Whitney-U* = 765,5, z = -0,668, p = 0,504) oder, differenzierter betrachtet, hinsichtlich der Verwendung von Prednison > 10mg pro Tag (*Mann-Whitney-U* = 147,5, z = -1,082, p = 0,279), Calcineurin-Inhibitoren (*Mann-Whitney-U* = 574, z = -0,022, p = 0,983), *mTOR*-Inhibitoren (*Mann-Whitney-U* = 51, z = -1,76, p = 0,078) oder anderen, nicht weiter spezifizierten Immunsuppressiva (*Mann-Whitney-U* = 187, z = -0,370, p = 0,712).

Das Geschlecht (*Mann-Whitney-U* = 736, $z = -1,633$, $p = 0,102$), das Alter ($r = 0,033$, $p = 0,762$), ein vorhandenes *Mismatch* im Transplantat (*Mann-Whitney-U* = 434, $z = -0,268$, $p = 0,789$) oder das Vorliegen einer chronischen *GvHD* (*Mann-Whitney-U* = 854, $z = -0,258$, $p = 0,797$) hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Titerhöhe (Tabelle 2 und 4).

Tabelle 4: Übersicht der Zusammenhänge zwischen dem Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer und den nominal skalierten Variablen

Variable	Signifikanzniveau ($p \leq 0,05$)
Aktive Erkrankung	0,018
Ruxolitinib	0,043
Chemotherapie	0,609
Prednison >10mg/Tag	0,279
Calcineurininhibitoren	0,983
mTOR-Inhibitoren	0,078
Andere Immunsuppressiva	0,712
Geschlecht	0,102
Chronische <i>GvHD</i>	0,797

Nach der ersten Impfung traten bei 49 Patienten von insgesamt 88 Patienten (56 %) Impfreaktionen auf (Tabelle 5). Impfreaktionen im Allgemeinen hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Titerhöhe (*Mann-Whitney-U* = 782, $z = -1,458$, $p = 0,145$), dies gilt auch für Schmerzen an der Injektionsstelle (*Mann-Whitney-U* = 903, $z = -0,039$, $p = 0,969$), Kopfschmerzen (*Mann-Whitney-U* = 156, $z = -0,929$, $p = 0,353$), Gliederschmerzen (*Mann-Whitney-U* = 43, $z = -1,204$, $p = 0,228$), Fieber (*Mann-Whitney-U* = 3, $z = -1,595$, $p = 0,111$), Schüttelfrost (*Mann-Whitney-U* = 3, $z = -1,595$, $p = 0,111$), Schwäche (*Mann-Whitney-U* = 156, $z = -1,49$, $p = 0,136$) und andere, nicht näher bezeichnete Symptome (*Mann-Whitney-U* = 411,5, $z = -1,215$, $p = 0,224$). Patienten mit dem Symptom Fatigue zeigten hingegen signifikant bessere Impfantworten (Median 2851 BAU/ml, Spannweite 4-12934) verglichen mit Patienten, die keine Fatigue nach der Impfung aufwiesen (Median 643 BAU/ml, Spannweite 1,5-8159) (*Mann-Whitney-U* = 313, $z = -3,071$, $p = 0,002$).

Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung der angegebenen Symptome von insgesamt 49 symptomatischen Patienten nach der ersten Impfung

Symptome nach der ersten Impfung	n (%) von jeweils 49 symptomatischen Patienten
Schmerzen an der Einstichstelle	33 (67 %)
Kopfschmerzen	5 (10 %)
Gliederschmerzen	2 (4 %)
Fieber	1 (2 %)
Schüttelfrost	1 (2 %)
Fatigue	17 (35 %)
Schwäche	6 (12 %)
Andere Symptome	14 (29 %)

n = absolute Anzahl der Patienten, die das Symptom angegeben haben von 49 symptomatischen Patienten; % = prozentualer Anteil, wie häufig das Symptom von insgesamt 49 Patienten mit Impfreaktionen angegeben wurde; Fatigue = stark ausgeprägte Müdigkeit

Nach der zweiten Impfung traten bei 46 Patienten von insgesamt 88 Patienten (52 %) Impfreaktionen auf (Tabelle 6). Analog zu den Impfreaktionen nach der ersten Impfung, hatten Impfreaktionen im Allgemeinen (*Mann-Whitney-U* = 778, $z = -1,571$, $p = 0,116$) und, differenziert betrachtet, Schmerzen an der Injektionsstelle (*Mann-Whitney-U* = 810, $z = -0,528$, $p = 0,597$), Kopfschmerzen (*Mann-Whitney-U* = 127, $z = -0,822$, $p = 0,411$), Gliederschmerzen (*Mann-Whitney-U* = 199,5, $z = -0,144$, $p = 0,885$), Schwäche (*Mann-Whitney-U* = 384, $z = -1,218$, $p = 0,223$) und andere Symptome, die nicht näher bezeichnet sind (*Mann-Whitney-U* = 408,5, $z = -0,189$, $p = 0,85$) keinen signifikanten Einfluss auf die Titerhöhe. Aufgetretenes Fieber oder Schüttelfrost wurden nach der zweiten Impfung verneint. Wie bereits bei der ersten Messung festgestellt, war Fatigue das einzige Symptom, das signifikante Unterschiede in der Titerhöhe erkennen ließ (*Mann-Whitney-U* = 401, $z = -3,292$, $p < 0,001$). Patienten, die nach der zweiten Impfung ausgeprägte Müdigkeit empfanden, hatten einen signifikant höheren Titer (Median 1785 BAU/ml, Spannweite 4-12934) im Vergleich zu Patienten ohne Fatigue (Median 583 BAU/ml, Spannweite 1,5-8159).

Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung der angegebenen Symptome von insgesamt 46 symptomatischen Patienten nach der zweiten Impfung

Symptome nach der zweiten Impfung	n (%) von jeweils 46 symptomatischen Patienten
Schmerzen an der Einstichstelle	30 (65 %)
Kopfschmerzen	4 (9 %)
Gliederschmerzen	5 (11 %)
Fieber	0
Schüttelfrost	0
Fatigue	23 (50 %)
Schwäche	13 (28 %)
Andere Symptome	11 (22 %)

n = absolute Anzahl der Patienten, die das Symptom angegeben haben von 49 symptomatischen Patienten; % = prozentualer Anteil, wie häufig das Symptom von insgesamt 49 Patienten mit Impfreaktionen angegeben wurde; Fatigue = stark ausgeprägte Müdigkeit

3.2 Resultate der zweiten Blutabnahme – 5 Monate nach der zweiten Impfung und Titerabfall im Zeitverlauf

Nach etwa 5 Monaten nahmen noch insgesamt 66 Patienten an der Studie teil, dies entsprach 75 % der initialen Kohorte. Analog zu der ersten Messung wurde erneut die humorale Immunantwort gegen das SARS-CoV-2-S1-Antigen gemessen. Hierbei betrug der Median des Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titers 335 BAU/ml (Spannweite 1,5-3401) und der Median des Neutralisationstiters 1:20 (Spannweite 0-320).

Wie bereits in der ersten Messung detektiert, korrelierten der Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer und der Neutralisationstiter stark miteinander ($r = 0,939$, $p < 0,001$).

Im Median fiel der Titer zwischen beiden Messungen signifikant um 73 % (Spannweite -95 % bis +40 %) ab ($Z = -6,924$, $p < 0,001$) (**Abb. 6**). Die Abnahme des Titers der neutralisierenden Antikörper von 1:80 (Median, Spannweite 0-1280) auf 1:20 (Median, Spannweite 0-320) war ebenfalls signifikant ($Z = -5,813$, $p < 0,001$), was einem mittleren Abfall von 75 % im Median (Spannweite -100 % bis +1500 %) entsprach (**Abb.7**).

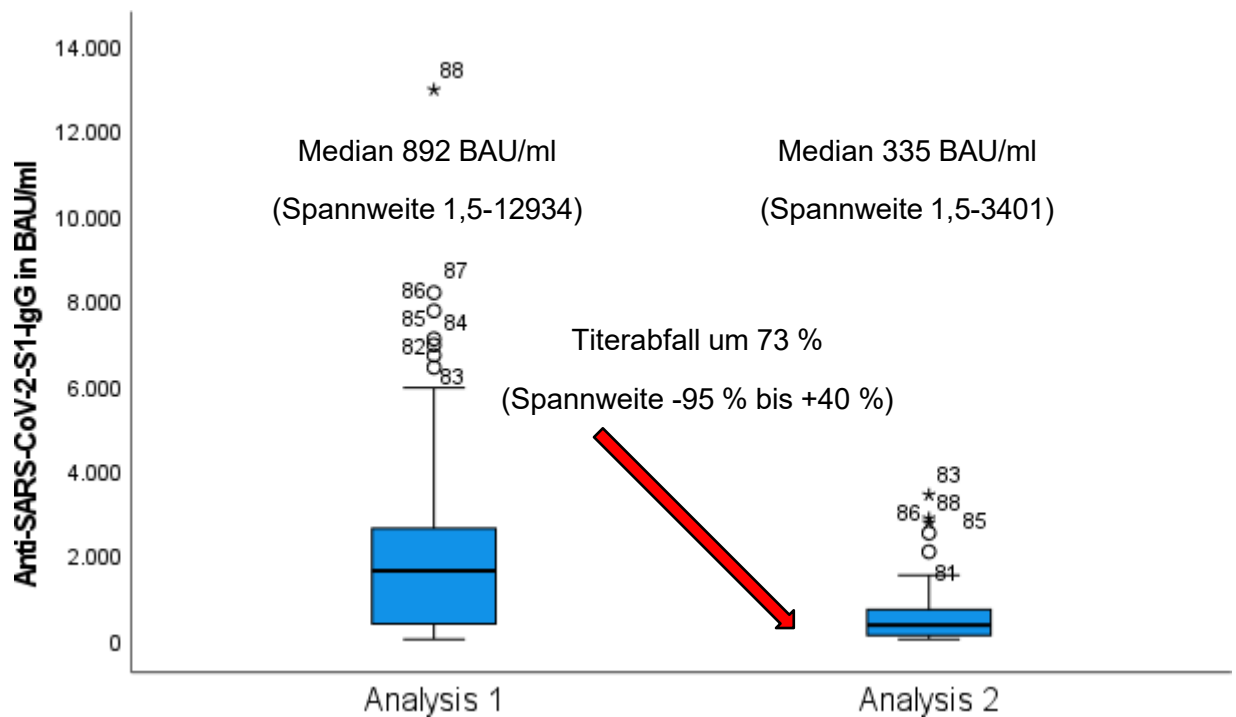


Abb. 6: Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titerabfall über im Median 91 Tage (Spannweite 84-95)

Dargestellt ist der Titerabfall über etwa 3 Monate hinweg. Auf der y-Achse ist die Höhe des Antikörpertiters in BAU/ml angegeben, auf der x-Achse die beiden Messzeitpunkte. Die Titer der Patienten sind in Form von Boxplots dargestellt. Die Ziffern oberhalb der Boxplots sind Ausreißer (Kreis) oder Extremwerte (Stern).

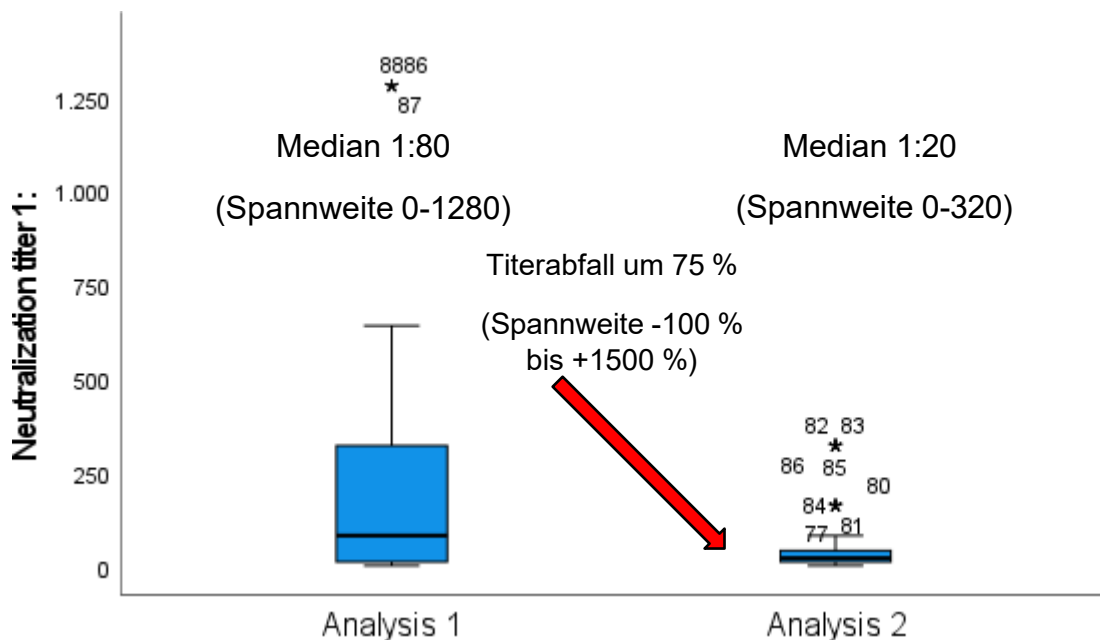


Abb. 7: Abfall des Neutralisationstitors über im Median 91 Tage (Spannweite 84-95)

Dargestellt ist der Abfall des Neutralisationstitors über ca. 3 Monate hinweg. Auf der y-Achse ist die Höhe des Neutralisationstitors angegeben, auf der x-Achse die beiden Messzeitpunkte. Die Titer der Patienten sind in Form von Boxplots dargestellt. Die Ziffern oberhalb der Boxplots sind Ausreißer (Kreis) oder Extremwerte (Stern).

3.3 Insuffiziente Immunantwort der innerhalb eines Jahres nach alloHSZT geimpften Patienten

Sowohl in der Gruppe der Patienten, die binnen eines Jahres nach alloHSZT geimpft worden waren ($Z = -2,366$, $p = 0,018$) als auch in der Gruppe der Patienten, deren Abstand zwischen alloHSZT und erster Impfung ≥ 365 Tage betrug ($Z = -6,538$, $p < 0,001$), gab es einen signifikanten Titerabfall.

Insgesamt wurden 24 Patienten (27 %) frühzeitig (< 365 Tage) nach alloHSZT geimpft. Unter den frühzeitig Geimpften lag der Median des Antikörpertiters der ersten Messung bei 100 BAU/ml (Spannweite 1,5-1040), in der zweiten Messung betrug er 66 BAU/ml (Spannweite 7-254). Dies entspricht einem Titerabfall von im Median -44,58 % (-77,45 bis -29,47). Im Median lag der Neutralisationstiter in der Gruppe der innerhalb eines Jahres nach alloHSZT Geimpften bei 1:10 (Spannweite 0-40) zum ersten Messzeitpunkt und bei 1:0 (Spannweite 0-20) zum zweiten Messzeitpunkt.

Basierend auf der Beobachtung, dass ab einem Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer-*cutoff* von 200 BAU/ml ein Anstieg des Neutralisationstiters zu verzeichnen war, wurden Titer unterhalb von 200 BAU/ml als insuffizient eingestuft. Bei Patienten mit einem Antikörpertiter < 200 BAU/ml wurden keine neutralisierenden Antikörper detektiert. Zusammenfassend ergab die Analyse, dass die humorale Immunantwort von 63 % der Patienten, die innerhalb des ersten Jahres nach alloHSZT eine Impfung erhielten, insuffizient (< 200 BAU/ml) war, während nur 14 % der Patienten, die zum Zeitpunkt der Impfung ≥ 365 Tage oder länger transplantiert waren, insuffiziente Titer hatten ($X^2(1) = 20,646$, $p < 0,001$, Carmer-V = 0,484) (**Abb. 8**). Auch nach der Bonferroni-Korrektur muss die Nullhypothese, dass Unabhängigkeit zwischen den Gruppen besteht, verworfen werden, da signifikant mehr Patienten mit insuffizientem Titer in der Gruppe der Patienten, die frühzeitig eine Impfung erhielten, vertreten waren und umgekehrt mehr Patienten mit suffizientem Titer in der Gruppe vertreten waren, die zu einem späteren Zeitpunkt geimpft wurde ($p = 0,0000068$). Das Alpha-Fehlerniveau wurde gemäß Bonferroni-Korrektur hierbei auf $p = 0,0125$ angepasst.

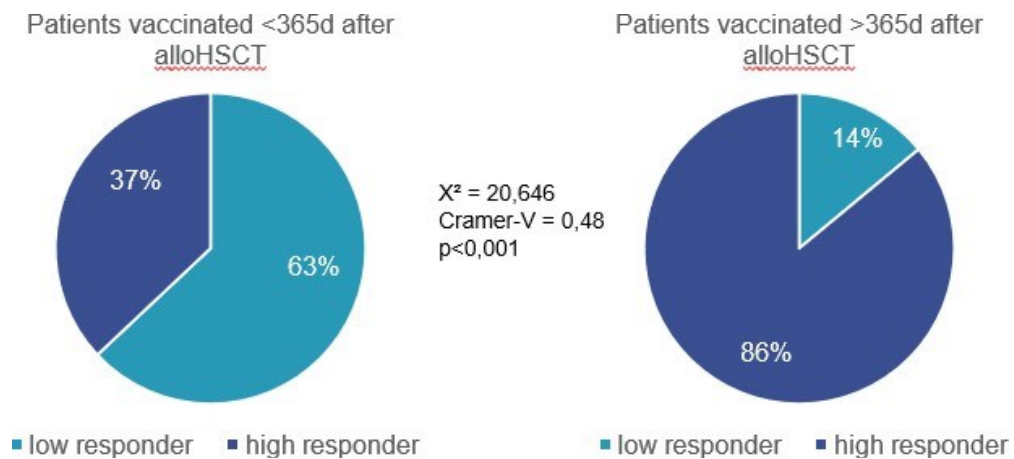


Abb. 8: Vergleich der Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer zwischen Patienten mit frühzeitiger Impfung nach alloHSCT (< 365 Tage) und Patienten, die ≥ 365 Tage nach alloHSCT die Impfung erhielten

In der Gruppe der frühzeitig Geimpften hatten 63 % einen insuffizienten Impftiter (< 200 BAU/ml), hingegen hatten nur 14 % einen insuffizienten Titer, die ein Jahr oder später nach der Transplantation geimpft worden waren. *low responder* = Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer < 200 BAU/ml, da ab diesem *cutoff* ein simultaner Anstieg der neutralisierenden Antikörper beobachtet wurde. *High responder* = Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer ≥ 200 BAU/ml.

3.4 Low-/non-responder ≥ 365 Tage nach alloHSCT

Insgesamt 64 Patienten (73 % der Gesamtkohorte) bekamen die Grundimmunisierung gegen SARS-CoV-2 365 Tage oder später nach alloHSCT. Darunter befanden sich neun Patienten (14 %), die sich als *low-* oder *non-responder* (Titer < 200 BAU/ml) herausstellten (Median 9 BAU/ml, Spannweite 1,5-152). Der Fokus auf diesem Patientenkollektiv sollte hervorbringen, in welchen Variablen sich die Patienten von denjenigen mit höherem Impftiter unterscheiden. Unter den Patienten, die bessere humorale Immunantworten zeigten, betrug der Antikörpertiter im Median 1721 BAU/ml (Spannweite 330-12934). Der Unterschied in der Titerhöhe zwischen beiden Gruppen war signifikant ($p < 0,001$) (**Abb. 10**).

Eine Übersicht der statistisch signifikanten Variablen ist in Tabelle 7 aufgezeigt, aus **Abb. 9** geht die Effektstärke dieser hervor. *Low-* und *non-responder* unterschieden sich signifikant in der CD3+CD4+-Zellzahl (Median 262/ μ l, Spannweite 60-747) im Vergleich zu *high responders* (Median 480/ μ l, Spannweite 96-5528) (*Mann-Whitney-U* = 120, $z = -2,462$, $p = 0,014$). Auch gab es einen signifikanten Unterschied in der CD19+-Zellzahl, die im Median unter den *low-* und *non-responder* 194/ μ l (Spannweite 7-477) betrug und unter den *high responders* im Median bei 438/ μ l (Spannweite 13-5066) (*Mann-Whitney-U* = 109, $z = -2,675$, $p = 0,007$) lag. Zudem gab es einen

signifikanten Unterschied in der Anzahl der Gesamt-Lymphozytenzahl (*Mann-Whitney-U* = 136, $z = -2,153$, $p = 0,031$). So lag die Lymphozytenzahl der *low-* und *non-responder* im Median bei 1095/ μ l (Spannweite 490-4888) und die der *high responder* im Median bei 1900/ μ l (Spannweite 571-17404). Die NK-Zellzahl war in der Gruppe, die ein besseres Impfansprechen zeigte, höher (Median 439/ μ l, Spannweite 99-1990) als in der Gruppe mit insuffizientem Titeranstieg (Median 223/ μ l, Spannweite 79-1070) (*Mann-Whitney-U* = 131, $z = -2,250$, $p = 0,024$).

Unter den quantitativen Immunglobulinen gab es einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des IgG, welches in der Gruppe der *high responder* mit einer besseren Immunantwort einherging (Median 942 mg/dl, Spannweite 272-1973) als in der Gruppe der *low-* und *non-responder* (Median 672 mg/dl, Spannweite 445-1044) (*Mann-Whitney-U* = 144, $z = -1,999$, $p = 0,046$). Die Höhe des IgA unterschied sich ebenfalls signifikant bei Patienten mit besserem Impfansprechen (Median 131 mg/dl, Spannweite 16-547) im Vergleich zu Patienten mit eingeschränkter Immunantwort (Median 81 mg/dl, Spannweite 5-258) (*Mann-Whitney-U* = 145,5, $z = -1,970$, $p = 0,049$). Keinen signifikanten Einfluss auf die Titerhöhe hatte die Höhe des IgM (*Mann-Whitney-U* = 148,5, $z = -1,912$, $p = 0,056$). Auch die zytotoxische T-Zellzahl unterschied sich nicht signifikant in beiden Gruppen (*Mann-Whitney-U* = 220, $z = -0,531$, $p = 0,595$).

Die Einnahme von Immunsuppressiva führte zu keinem signifikanten Unterschied in der Titerhöhe beider Gruppen ($X^2(1) = 0,141$, $p = 0,708$, Cramer-V = 0,047).

Tabelle 7: Übersicht der signifikanten Unterschiede zwischen *low-/non-respondern* und *high respondern*

Variable	<i>Low-/non-responder</i> Median (Spannweite)	<i>High responder</i> Median (Spannweite)	Signifikanz- niveau ($p \leq 0,05$)
T-Helferzellen	262/ μ l (60-747)	480/ μ l (96-5528)	0,014
B-Zellen	194/ μ l (7-477)	438/ μ l (13-5066)	0,007
Lymphozyten	1095/ μ l (490-4888)	1900/ μ l (571-17404)	0,031
Natürliche Killerzellen	223/ μ l (79-1070)	439/ μ l (99-1990)	0,024
Immunglobulin G	672 mg/dl (445-1044)	942 mg/dl (272-1973)	0,046
Immunglobulin A	81 mg/dl (5-258)	131 mg/dl (16-547)	0,049

μ l = Mikroliter, mg/dl = Milligramm/ Deziliter

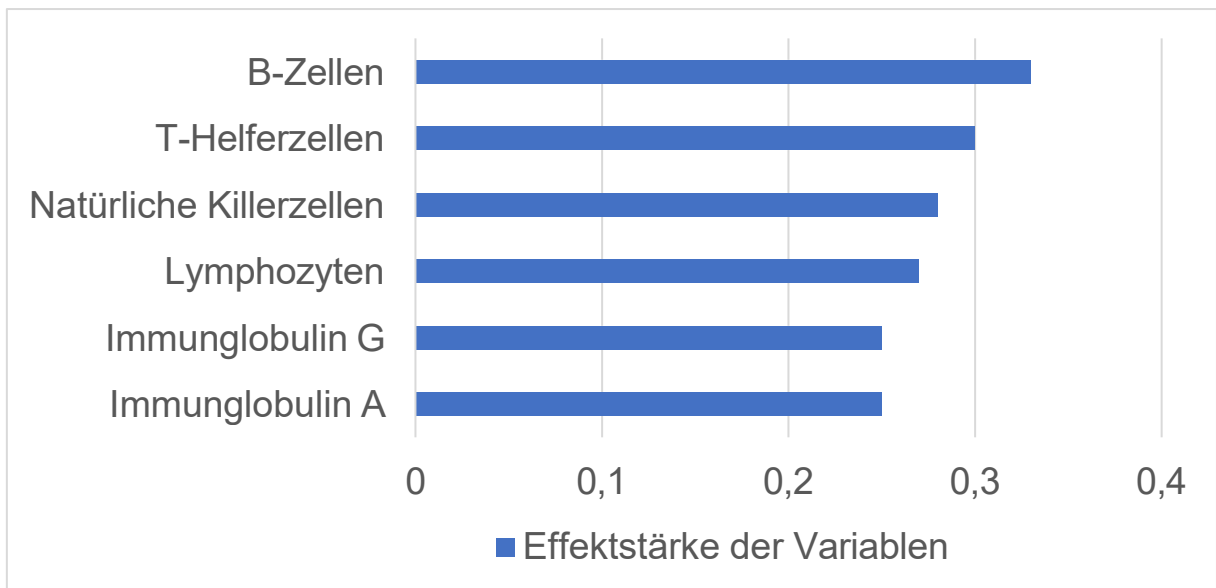


Abb. 9: Die Effektstärke der statistisch signifikanten Variablen

Effektstärke berechnet aus dem Betrag von $r = z/\sqrt{n}$; $r > 0,1$ = schwach, $r > 0,3$ = mittel, $r > 0,5$ = stark

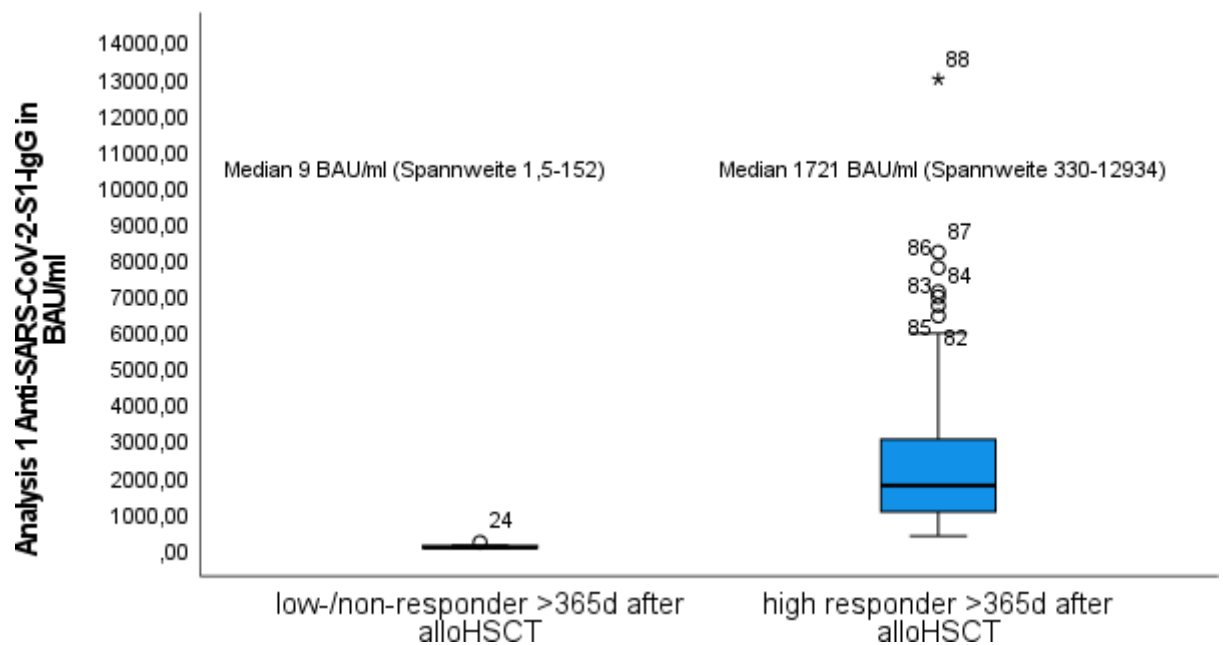


Abb. 10: Patienten ≥ 365 Tage nach alloHSZT mit insuffizienter Immunantwort

Dargestellt sind die Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer (Boxplots) der *low-* und *non-responder* sowie der *high-responder* (*cutoff* 200 BAU/ml), deren Zeitintervall zwischen alloHSZT und Impfung ein Jahr oder mehr betrug. *alloHSCT* = *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Kreise stellen Ausreißer, Sterne Extremwerte dar.

3.5 Gesunde Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bestand aus 112 Personen, von denen 81 (72 %) weiblich waren. Insgesamt setzte sich das Kollektiv aus 53 Personen (47 %), die 60 Jahre alt oder jünger waren und 59 Personen (53 %), die mindestens 80 Jahre alt waren, zusammen. Das Alter, der Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer und der Neutralisationstiter unterlagen keiner Normalverteilung ($p < 0,001$). Das Alter betrug im Median 80 Jahre (Spannweite 19-100). Patienten mit vorheriger SARS-CoV-2-Infektion wurden durch die Bestimmung des Nukleokapsid-Antikörpers ausgeschlossen. Im Median betrug der Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer siebzehn Tage nach der zweiten Impfung 1841 BAU/ml (Spannweite 18-32000), hingegen lag er ein halbes Jahr nach der zweiten Impfung bei 125 BAU/ml (Spannweite 3,5-1800). Dies entsprach einem Titerabfall von im Median 93 % (Spannweite -99 bis -29). Der Neutralisationstiter lag siebzehn Tage nach der Impfung im Median bei 1:40 (Spannweite 0-2560), während dieser ein halbes Jahr später auf 1:10 (Median, Spannweite 0-640) abgesunken war.

Im gesunden Vergleichskollektiv hatte das Alter einen signifikanten stark negativen Effekt auf die Antikörperhöhe nach der zweiten Impfung ($r = -0,662$, $p < 0,001$) und auf die Bildung neutralisierender Antikörper ($r = -0,618$, $p < 0,001$). Die Einteilung der Gesamtkohorte in zwei Subgruppen von Patienten ≥ 80 Jahre und ≤ 60 Jahre erbrachte einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Altersgruppe und der Höhe des Antikörpertiters (*Mann-Whitney-U* = 334, $z = -7,107$, $p < 0,001$). Dies trifft auch auf die Altersgruppe und den Neutralisationstiter zu (*Mann-Whitney-U* = 419, $z = -6,793$, $p < 0,001$). So zeigte die jüngere Subpopulation einen höheren Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer von im Median 2751 BAU/ml (Spannweite 838-32000) als die ältere Subpopulation (Median 623 BAU/ml, Spannweite 18-16891). Der Neutralisationstiter lag in der jüngeren Kohorte im Median bei 1:160 (Spannweite 20-2560), in der älteren Kohorte bei im Median 1:20 (Spannweite 0-320). Der Median des Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titerabfalles betrug 93 % (Spannweite -99 % bis -75 %) unter den jungen Geimpften und ebenso 93 % (Spannweite -98 % bis -29 %) unter den älteren Geimpften. Sowohl der Titerabfall in der jungen ($Z = -6,334$, $p < 0,001$) als auch in der älteren Kohorte war signifikant ($Z = -0,6680$, $p < 0,001$).

Tabelle 8: Übersicht Vergleichskollektiv (n = 112)

Patientencharakteristika	Median (Spannweite)
Alter	80 (19-100)
Geschlecht	n = 81 (72 %)* weiblich
Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG 17 Tage nach der zweiten Impfung	1841 BAU/ml (18-32.000)
Neutralisationstiter 17 Tage nach der zweiten Impfung	1:40 (0-2560)
Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG 6 Monate nach der zweiten Impfung	125 BAU/ml (3,2-1800)
Neutralisationstiter 6 Monate nach der zweiten Impfung	1:10 (0-640)
Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titerabfall zwischen beiden Messungen	-93 % (-99 bis -29)

*n = absolute Anzahl, % = prozentualer Anteil

3.6 Vergleich der Subpopulationen mit den Patienten nach alloHSZT

Etwa sechs Monate nach der zweiten Impfung war ein ähnlich niedriger Titer in der Gruppe der Kontrollen, die 80 Jahre alt oder älter waren (Median 55 BAU/ml, Spannweite 3-1111) wie in der Gruppe der Patienten, die innerhalb des ersten Jahres nach alloHSZT eine Impfung erhielten (Median 66 BAU/ml, Spannweite 7-254), zu verzeichnen. Der Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer fiel bei den jungen Probanden auf im Median 215 BAU/ml (Spannweite 77-1800) ab.

Der Vergleich der Titer ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den gesunden Probanden, die älter als 80 Jahre und jünger als 60 Jahre waren und den transplantierten Patienten (*Kruskal-Wallis-H* = 53,952 („2“), $p < 0,001$). Die paarweisen Vergleiche der *post hoc* Bonferroni-Korrektur zeigten einen signifikanten Unterschied der Titerhöhe zwischen jüngeren gesunden Kontrollen und gesunden älteren Kontrollen ($p < 0,001$). Junge Probanden mit einem gut funktionierenden Immunsystem erzielten eine suffizientere humorale Immunantwort (Median 2751 BAU/ml, Spannweite 838-32000) als ältere Probanden (Median 623 BAU/ml, Spannweite 18-16891). Diese signifikante Korrelation ging mit einer großen Effektstärke einher ($r = 0,67$). Die humorale Immunantwort unterschied sich signifikant zwischen jungen gesunden Probanden und Patienten nach alloHSZT ($p < 0,001$).

Junge Kontrollpersonen erreichten einen signifikant höheren Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer (Median 2751 BAU/ml, Spannweite 838-32000) als Patienten nach alloHSZT (Median 892 BAU/ml, Spannweite 1,5-12934). Auch diese signifikante Korrelation zeigte eine große Effektstärke ($r = 0,51$). Gesunde ältere Menschen mit einem altersadaptiert schwachen Immunsystem und Patienten nach alloHSZT hatten keinen signifikanten Unterschied in der Titerhöhe ($p = 0,41$) (**Abb. 11**).

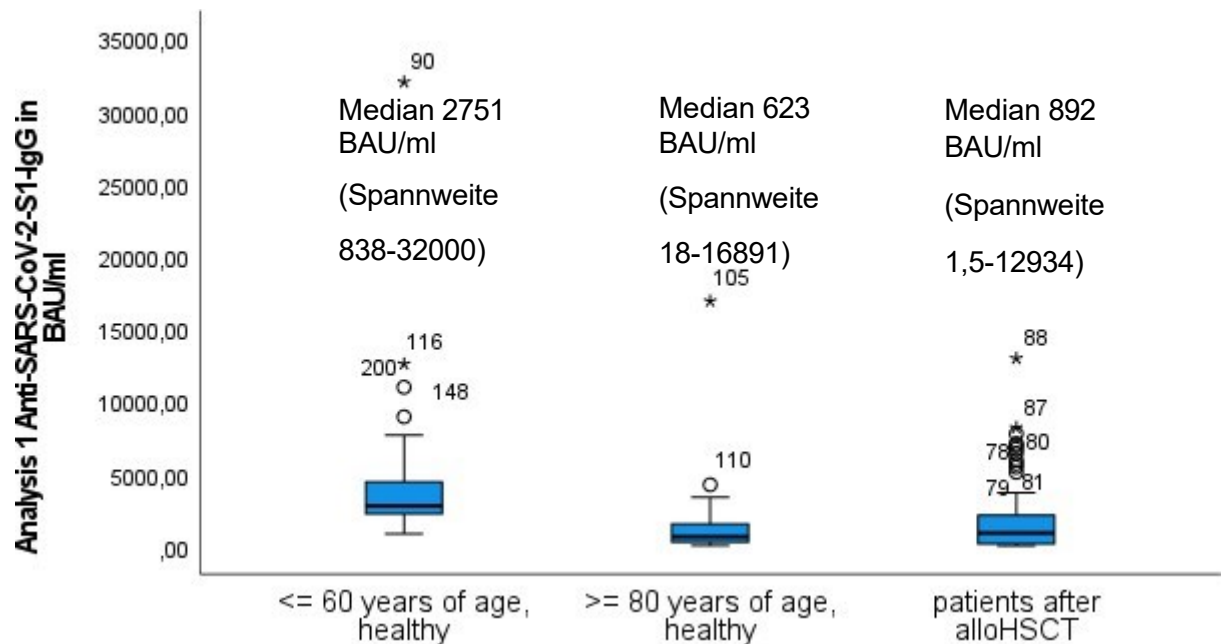


Abb. 11: Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer der Kontrollgruppe und der Patienten nach alloHSZT im Vergleich

Dargestellt sind die Titerhöhen der gesunden Probanden ≤ 60 Jahre und ≥ 80 Jahre (im Median 17 Tage nach der zweiten Impfung) sowie der Patienten nach alloHSZT (im Median 41 Tage nach der zweiten Impfung) in Form von Boxplots. Einige Fälle (Fallnummern) sind Ausreißer (Kreis) oder Extremwerte (Stern). *alloHSCT* = *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*; Analysis 1 = Erste Messung der Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer nach zweifacher Impfung mit BNT162b2.

4 Diskussion und Schlussfolgerung

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser klinischen Studie erfolgte die Messung der Impfantwort nach zweifacher Impfung mit dem *mRNA*-Impfstoff BNT162b2 in einer Kohorte von 88 Patienten nach alloHSZT. Anhand der Ergebnisse konnten wichtige Prädiktoren für eine erfolgreiche humorale Immunantwort analysiert werden. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die Vulnerabilität des Kollektivs zum einen auf eine verzögerte Immunrekonstitution nach alloHSZT in Abhängigkeit von Patienten- und Transplantationsfaktoren zurückzuführen ist und zum anderen eine reduzierte humorale Immunantwort im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv beobachtet wurde.

Die Analyse zeigte, dass neben höheren Zellzahlen, wie die Anzahl der T-Zellen, der T-Helferzellen, der Gesamt-Lymphozyten, der B-Lymphozyten und der NK-Zellen, auch der Abstand zur alloHSZT einen entscheidenden günstigen Einfluss auf die humorale Immunantwort hatte. Die Höhe der Immunglobuline G und A zum Zeitpunkt der Impfung begünstigten einen höheren Impftiter. IgA ist entscheidend für die Immunabwehr an Schleimhautbarrieren und daher auch bedeutend im Respirationstrakt. Entscheidend ist zudem, dass mit der Höhe des *Anti-SARS-CoV-2-S1*-IgG-Titers auch die Anzahl der neutralisierenden Antikörper stieg, die letztlich für den Schutz vor dem *ACE2*-abhängigen-Viruseintritt essenziell sind und mit der Effektivität eines durch Impfung erlangten Impfschutz korrelieren [49]. Die Einnahme von Ruxolitinib oder eine aktive Erkrankung während der Impfung beeinflussten die Antikörperbildung gegen *SARS-CoV-2* negativ. Das Alter, das Geschlecht, der Spendertyp, ein *Mismatch* im Transplantat, das Vorliegen einer chronischen *GvHD* und eine immunsuppressive Therapie mit anderen Immunsuppressiva als Ruxolitinib hatten keinen signifikanten Einfluss auf den Antikörpertiter.

Schlussendlich leistet diese Arbeit wichtige Erkenntnisse zu einer Impfantwort nach zweifacher *SARS-CoV-2*-Impfung von Patienten nach alloHSZT, mit dem Ziel, Patienten- und Transplantations-assoziierte Faktoren für eine erfolgreiche Impfung hervorzuheben, Empfehlungen zur *Boosterung* zu diskutieren sowie die Antikörperkinetik im Zeitverlauf zu beurteilen. Die Analyse in dieser vulnerablen Population ist besonders wichtig im Hinblick auf die Reduktion schwerer oder letaler Verläufe.

Wichtig ist, darauf hinzuweisen, dass die Analysen in unserem Patientenkollektiv im Jahr 2022 erfolgten, als verschiedene VOC mit hoher Pathogenität und Mortalität zirkulierten. Auf diesen Zeitraum beziehen sich demnach angegebene Mortalitätsraten. Diese haben sich aufgrund der Virusevolution, der mittlerweile geimpften und/oder genesenen Bevölkerung und verschiedener Therapieregime deutlich verändert.

4.2 Einflussfaktoren auf die humorale Immunantwort

4.2.1 Lymphopenie und Intervall zwischen Impfung und alloHSZT

Pagano et al. beschrieben den Tod von 688 Patienten mit hämatoonkologischer Grunderkrankung aufgrund einer *Covid-19*-Infektion (entspricht 58,1 % der Kohorte) und zogen zugleich einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Mortalitätsrate (40,7 % vs. 24,8 %) zwischen der ersten SARS-CoV-2-Welle (März-Mai 2020) und der zweiten SARS-CoV-2-Welle (Oktober-Dezember 2020). Der Unterschied wird u.a. auf präventive Maßnahmen, auch die Impfung miteinbeziehend, zurückgeführt. In der Multivariatanalyse wird ein hohes Alter, aktive Grunderkrankung, Kardiomyopathie, Niereninsuffizienz, Lebererkrankungen, ein Intensivaufenthalt sowie die AML als hämatologische Grunderkrankung als eine höhere Mortalitätsrate begünstigend eingestuft [50]. Schaffrath et al. publizierten im Jahr 2022 ebenfalls ein erhöhtes Sterberisiko nach einer *Covid-19*-Infektion bei Patienten nach alloHSZT im Vergleich zur Normalbevölkerung. Dabei werden Risikofaktoren wie ein höheres Alter, eine frühe Infektion nach der Transplantation und aktive Immunsuppression hervorgehoben [51].

Vor diesem Hintergrund gab es im Rahmen des Pandemiegeschehens zunehmend Studien, die Prädiktoren eines hohen oder niedrigen Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titers bei immunsupprimierten Patienten nach alloHSZT analysierten. Eine frühe Erkenntnis war z.B., dass eine Lymphopenie, das Vorliegen einer aktiven *GvHD* und ein geringer Zeitabstand zwischen alloHSZT und Impfung mit einer unzureichenden humoralen Immunantwort assoziiert waren [52, 53]. Insbesondere der Zeitabstand zwischen Impfung und alloHSZT wird in mehreren wissenschaftlichen Arbeiten hervorgehoben [7, 54]. Redjoul et al. beschrieben Titerantworten von 78 % nach der Grundimmunisierung von 88 Patienten nach alloHSZT. Die Titerhöhe korrelierte auch hier positiv mit dem Abstand der alloHSZT zur Impfung und der Lymphozytenzahl [55].

Im Vergleich werden bei gesunden Kontrollpersonen ($n = 205$) nach zweifacher Impfung mit BNT162b2 Serokonversionsraten von 100 % beschrieben [56].

Auch die Behandlung mit einem B-Zell-depletierenden Antikörper wie Rituximab bis zu einem Jahr vor der Impfung führt nach Canti et al. zu niedrigeren Serokonversionsraten [53]. Dies unterstreicht wiederum die Relevanz einer ausreichenden B-Zellzahl zum Impfzeitpunkt. Es wird die Lymphopenie als wichtigster limitierender Faktor einer suffizienten humoralen Immunantwort genannt und ein *cutoff* von $< 0,5 \times 10^9/\text{ml}$ definiert [52]. Patienten, die an einer akuten *GvHD* litten, aber zeitgleich $> 1 \times 10^9/\text{ml}$ Lymphozyten hatten, wiesen Serokonversionsraten von 80 % auf [52].

In der vorliegenden Arbeit differenzierten wir zusätzlich in die Sublinien der Immunzellen und fokussierten nicht nur auf die Lymphozytenzahl allgemein als positiven Prädiktor für einen Impferfolg. Dies trug zu wichtigen Erkenntnissen hinsichtlich eines Impferfolges in dieser vulnerablen Gruppe bei, für den neben der Relevanz der humoralen Immunantwort mittlerweile auch die Relevanz der zellulären Immunität hervorgehoben wird [57]. Unsere Daten zeigten, dass eine hohe Anzahl von Lymphozyten, T-Helferzellen, B-Lymphozyten und NK-Zellen einen signifikant positiven Einfluss auf den Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer hatten. Dies ist konkordant zu anderen Studien, die auch eine höhere Lymphozytenzahl als positiven Prädiktor analysierten. Dabei werden vor allem B-Zellen und T-Helferzellen als Zellpopulation hervorgehoben, die einen höheren Impftiter begünstigten [53, 58]. Cuapio et al. berichteten von einem günstigen Einfluss einer NK-Zellsubgruppe (NKG2C+) auf den Antikörpertiter bei gesunden Probanden und bei Patienten mit primärer oder sekundärer Immundefizienz [59]. Es wird ausgeführt, dass stimulierte NK-Zellen zu einer erhöhten IFN γ -Konzentration führen und eine wichtige Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort darstellen und somit auch die humorale Immunantwort, v.a. die Produktion von neutralisierenden Antikörpern, begünstigen [57, 60, 61]. Die zytotoxischen T-Zellen zeigten unseren Daten zufolge keinen signifikanten Einfluss auf den Antikörpertiter. Gegenteilig wird sogar vermutet, dass hohe zytotoxische T-Zellzahlen nach alloHSZT einen supprimierenden Einfluss auf die zelluläre Immunantwort haben, da sie die Vakzin-induzierte IFN γ -Expression negativ beeinflussen [57].

Eine dezidierte und gemeinsame Konklusion vieler Studien ist, dass eine Lymphopenie und ein Abstand der alloHSZT kleiner als 365 Tage zur ersten Impfung mit einem

reduzierten Impfansprechen einhergeht [52, 57, 62-65]. Dieses Resultat ist kongruent zu unseren Ergebnissen und überwiegend auf die verzögerte Immunrekonstitution sowie immunmodulatorische Behandlungen nach alloHSZT zurückzuführen. Der Großteil der Studien hat einen Zeitabstand von weniger als einem Jahr zwischen alloHSZT und Impfung als „frühzeitig“ eingestuft. Unser Patientenkollektiv eignete sich gut, um diesbezügliche Analysen durchzuführen, da etwa ein Drittel (27 %) der Patienten innerhalb von 365 Tagen nach der alloHSZT geimpft wurden.

Wir haben zudem Unterschiede zwischen Patienten analysiert, deren Transplantation zum Impfzeitpunkt mehr als ein Jahr zurücklag, deren humorale Immunantwort aber dennoch reduziert war. Insgesamt 14 % der zu einem späteren Zeitpunkt nach alloHSZT geimpften Patienten hatte einen unzureichenden Titer (< 200 BAU/ml), während 63 % der früh nach alloHSZT geimpften Patienten in dieser Gruppe vertreten waren. Obwohl es keine Grenzwerte des Titers für den klinischen Schutz vor einer Infektion gibt, erfolgte die Einteilung basierend auf der Beobachtung, dass ein Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer über 200 BAU/ml mit einem Anstieg des Neutralisationstiters einherging. Diese Beobachtung war auch statistisch signifikant ($p < 0,001$). Da die Bestimmung der neutralisierenden Antikörper ein in der Praxis sehr aufwändiges Verfahren ist, ist ein *cutoff* des Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titers als Referenz für einen simultanen Anstieg der neutralisierenden Antikörper perspektivisch von Bedeutung. Für diese vulnerable Subpopulation, sowie Patienten mit reduziertem Impfansprechen allgemein, wurden Empfehlungen für *Booster*-Impfungen ausgesprochen sowie passive Immunisierungsstrategien in Betracht gezogen.

Leclerc et al. stellten im Vergleich zu den übereinstimmenden Ergebnissen anderer Arbeiten heraus, dass der Abstand zur alloHSZT keinen signifikanten Einfluss auf den Impferfolg hatte. Dies könnte jedoch darauf zurückgeführt werden, dass 72 % der Patienten mit einem Zeitintervall weniger als einem Jahr zwischen alloHSZT und Impfung bereits frühzeitig eine *Booster*-Impfung aufgrund einer insuffizienten Impfantwort benötigten und damit einen höheren Impftiter erreichten, während nur 23 % der Patienten, deren alloHSZT mehr als ein Jahr zurücklag, eine *Booster*-Impfung aufgrund eines insuffizienten Titers erhielten [66]. Das hebt die Relevanz einer zeitnahen *Booster*-Impfung bei Patienten mit insuffizienter Titerantwort hervor.

4.2.2 Impfung während immunsuppressiver Behandlung

Die Einnahme von Ruxolitinib beeinflusste die Titerantwort signifikant negativ ($p = 0,043$). Andere Immunsuppressiva wie die Einnahme von Prednison ($> 10\text{mg/d}$), Calcineurininhibitoren und *mTOR*-Inhibitoren hatten im Patientenkollektiv keinen signifikanten Einfluss auf die humorale Immunantwort. Eine Studie, die Patienten ($n = 104$) mit Myeloproliferativen Neoplasien (MPN) hinsichtlich der humoralen und zellulären Immunantwort untersuchte, zeigte ebenso insuffiziente Impftiter bei Patienten während einer Therapie mit Ruxolitinib, das in der Behandlung der MPN sehr häufig eingesetzt wird. Insbesondere war die IFN γ - und IL-2-Produktion der T-Zellen in diesem Kollektiv auch nach drei *mRNA*-Impfstoffdosen durch Ruxolitinib herabgesetzt [67]. Aktuelle Studien bringen sogar hervor, dass eine immunsuppressive Therapie sich nicht nur ungünstig auf die Titerantwort auswirkt, sondern sogar Durchbruch-Infektionen bei Patienten nach alloHSZT begünstigt [68].

In der Studie von Minehart et al. wird z.B. übereinstimmend mit unserer Studie die Einnahme von Immunsuppressiva bei etwa einem Drittel in einer Kohorte von 63 Patienten nach alloHSZT beschrieben, die hier keinen signifikanten Einfluss auf die Titerhöhe hatte [69]. Dies steht jedoch in Diskrepanz zu anderen Arbeiten, die während immunsuppressiver Therapie oder ab der Einnahme von mindestens zwei Immunsuppressiva eine eingeschränkte Fähigkeit zur Antikörperproduktion beobachteten [62, 70]. Auffällig ist, dass die Studien im Vergleich zu unseren Daten Patienten mit akuter *GvHD* erfassen und daher eine intensivere immunsuppressive Therapie vorliegen könnte, die einen größeren negativen Einfluss auf die Bildung von Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG nimmt. Einige Studien differenzieren zwischen unterschiedlichen Immunsuppressiva, wiederum andere Studien prüfen lediglich den Einfluss von immunsuppressiver Therapie allgemein auf die Antikörperbildung. Somit entsteht diesbezüglich ein heterogenes Bild, da z.B. Prednison als signifikantes Immunsuppressivum in der Studie von Dhakal et al. hervorgehoben wird [4], in der Studie von Chiarucci et al. ist es Ciclosporin, das die Immunantwort signifikant beeinflusst [13]. Dieses heterogene Bild entsteht am ehesten durch unterschiedliche Fallzahlen in den Subgruppen und durch die Heterogenität der eingesetzten Immunsuppressiva, die verschiedene Zentren präferieren. Festzuhalten ist, dass eine immunsuppressive Therapie Auswirkungen auf die Aktivität und die Proliferation von B- und T-Lymphozyten hat und dadurch einen supprimierenden Einfluss auf die

humorale und zelluläre Immunantwort nehmen kann. Perspektivisch sind multizentrische Datenauswertungen diesbezüglich hilfreich.

Homogener sind die Resultate unterschiedlicher Datenanalysen bezüglich B-Zell-depletierender Therapien, wie z.B. mit den monoklonalen Antikörpern Rituximab oder Obinutuzumab. Studienergebnisse zeigen hier übereinstimmend signifikant negative Effekte auf die humorale Immunantwort während einer B-Zell-depletierenden Therapie. In der Studie von Liebers et al. wurden 80 Lymphom-Patienten während einer B-Zell-depletierenden Therapie untersucht. Es wurde eine Serokonversionsrate nach zweifacher Impfung mit einem *mRNA*-Impfstoff bei 68 % der Patienten detektiert, deren Therapie mehr als 12 Monate zurücklag, hingegen wurde eine Serokonversionsrate bei 22 % der Patienten, deren Therapie 3-12 Monate und bei 16 % der Patienten, deren Therapie weniger als 3 Monate zurücklag, verzeichnet [71]. Dies korreliert mit unserer Beobachtung des signifikant negativen Effektes der Lymphopenie auf die Titerhöhe. Zudem hatten Lymphompatienten im Vergleich zu den anderen der alloHSZT zugrunde liegenden Erkrankungen in unserer Patientenkohorte den niedrigsten Titer-Median. Diese Beobachtung war jedoch statistisch nicht signifikant. Es ist nicht auszuschließen, dass B-Zell-depletierende Therapien vor der alloHSZT einen Einfluss darauf hatten.

Diesbezüglich wurde die Frage nach dem Ausmaß und der Effektivität der zellulären Immunantwort in anderen Studien intensiver fokussiert. Die zelluläre Immunantwort kann mittels *IFNg-ELISpot-Assay* ermittelt werden. Demnach hatten 70 % der Lymphom-Patienten in der Studie von Liebers et al., die eine Serokonversion zeigten, eine T-Zell-Antwort. Insgesamt 50 % der Patienten, die keine messbare humorale Immunantwort hatten, zeigten dennoch eine T-Zell-Antwort [71]. Die T-Zellantwort scheint insbesondere nach der Auffrischimpfung verstärkt und ist wichtig für einen langanhaltenden Impfschutz [72]. In der Studie von GeurtsvanKessel et al. erfolgte die Untersuchung der vakzininduzierten humoralen und zellulären Immunantwort hinsichtlich verschiedener SARS-CoV-2-Varianten. Dabei stellte sich eine suffiziente Kreuzreaktivität neutralisierender Antikörper gegenüber der Beta- und Delta-Variante heraus, jedoch nur partiell gegenüber der Omikron-Variante. Nach einer *Booster*-Impfung konnte jedoch kein signifikanter Unterschied der T-Zellreaktion gegenüber dem SARS-CoV-2-Wildtyp oder der Omikron-Variante nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass die T-Zell-Antwort resistenter gegenüber dem *immune escape* der Virusvarianten ist [73]. Die Kreuzreaktivität dieser Gedächtnis-T-Zellen erscheint

vorteilhaft, da die Zellen zusammenfassend auch Subvarianten erkennen können [74]. Nach Meyer et al. erreichten 110 Patienten nach alloHSZT reduzierte zelluläre Immunantworten (55 % des Gesamtkollektivs hatten eine T-Zellantwort) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (100 % des Gesamtkollektivs hatten eine T-Zellantwort). Dabei entsprachen die negativen Prädiktoren überwiegend denen der humoralen Immunantwort, wie z.B. ein höheres Alter oder ein geringer Zeitabstand zur alloHSZT [57]. Bereits zuvor gab es Studienergebnisse, dass Patienten ohne SARS-CoV-2-Impfung oder Infektion T-Zell-Reaktionen zeigten, die am ehesten als Kreuzreaktionen von Gedächtnis-T-Zellen nach einer früheren Infektion mit saisonalen Coronaviren auftreten [75, 76]. Ein/e Patient/in unserer Studie hatte in der zweiten Messung einen deutlichen Abfall des Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer, jedoch zugleich einen außerordentlichen Anstieg des Neutralisationstiter. Dies ist auch a.e. auf eine Exposition mit vorherigen saisonalen Corona-Viren zurückzuführen. Wir haben keine T-Zell-Antwort nach einer SARS-CoV-2-Impfung gemessen, dies stellt eine Limitation unserer Studie dar. Die Messung der T-Zellantwort in zukünftigen Studien ist besonders im Hinblick auf die Bildung von kreuzreagierenden Antikörpern gegen die multiplen Subvarianten von Bedeutung.

4.2.3 Einfluss einer *GvHD* oder aktiven Grunderkrankung auf den Impferfolg

Einunddreißig Patienten (35 %) unserer Studie hatten eine chronische *GvHD*, die keinen signifikanten Einfluss auf die Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titerhöhe nahm. Einige Studien beschreiben einen signifikant negativen Effekt einer aktiven *GvHD* auf die humorale Immunantwort, differenzieren hierbei jedoch nicht, ob eine akute oder chronische *GvHD* der Patienten vorlag [52, 77]. Dies könnte essenziell sein im Hinblick auf die Anzahl der immunsuppressiven Medikamente, die Dosierungen und die Dauer der Einnahme. Aus der Studie von Pabst et al. geht hervor, dass nicht die *GvHD* selbst, sondern die damit verbundene immunsuppressive Therapie der entscheidende Einflussfaktor ist [62]. Auch die Angabe des Schweregrades ist perspektivisch in zukünftigen Studien sinnvoll. So zeigt die Studie von Canti et al. (n = 40), dass eine milde *GvHD* keinen Effekt auf den Antikörpertiter zeigte, eine moderate bis schwere *GvHD* jedoch mit einer reduzierten Immunantwort einherging [78]. Aktuelle Daten weisen darauf hin, dass eine COVID-19-Impfung eine chronische *GvHD* aggravieren kann, wobei eine Exazerbation als Neustart einer immunsuppressiven Behandlung oder als eine Eskalation der bereits bestehenden immunsuppressiven Behandlung

definiert wurde. Dabei erfolgte die Messung von Zytokinen, deren Anstieg mit dem Auftreten einer *GvHD* assoziiert ist (IL-18, ANG2, CXCL9/MIG, IFN γ). Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg von IL-18, ANG2 und IFN γ simultan zu der Verschlechterung einer *GvHD*, wobei ein erhöhter ANG2-Spiegel mit der Exazerbation der *GvHD* -und mit einem niedrigeren Anti-SARS-CoV-2-Titer einherging. Die Impfung erfolgte sowohl mit *mRNA*- als auch mit Vektor-Impfstoffen. Ob ANG2 als Biomarker zur Nutzen-Risiko-Abwägung einer Impfung gegenüber einer möglichen Exazerbation der *GvHD* genutzt werden kann, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt [62]. Nach den Leitlinien der *EBMT* (*European Society for Blood and Marrow Transplantation*) sollte eine Impfung bei schwerer, unkontrollierter *GvHD* Grad III-IV verschoben werden [79]. Dies hebt die Relevanz der engmaschigen klinischen Kontrollen der Patienten im Rahmen der Impfungen hervor. Dabei gilt es zu eruieren, ob eine unkontrollierte *GvHD* oder *GvHD* höheren Schweregrades vorliegt, um alternative Sicherheitsmaßnahmen, wie die Impfung des Umfeldes des Patienten oder passive Immunisierungsstrategien neben hygienischen Maßnahmen, zu diskutieren.

Eine aktive Grunderkrankung beeinflusste das Impfansprechen signifikant negativ ($p = 0,018$). Dass Patienten, die nach der alloHSZT nicht in Remission waren, niedrigere Antikörpertiter aufwiesen als Patienten in Remission, ist am ehesten auf immunsuppressive Therapien und den immunsuppressiven Effekt der hämatoonkologischen Krankheit selbst zurückzuführen, da überwiegend unreife und funktionsunfähige Immunzellen proliferieren. So wird in der Studie von Maneikis et al. dargelegt, dass Patienten mit hämatoonkologischer Grunderkrankung ($n = 857$) signifikant niedrigere Titer nach zweifacher Impfung mit BNT162b2 hatten (Median 6961 AU/ml) als ein gesundes Vergleichskollektiv (Median 21395 AU/ml). Es erfolgte zudem ein Vergleich von Patienten mit hämatoonkologischer Grunderkrankung während einer Therapie und jenen, die keine Behandlung erhielten, wobei die Therapie mit Brutontyrosinkinaseinhibitoren, Ruxolitinib, Venetoclax und B-Zell-Depletion signifikant negative Einflüsse auf die Titerhöhe zeigten [80]. Noori et al. berichteten im Rahmen einer Metaanalyse ebenfalls davon, dass Patienten während aktiver Grunderkrankung eine eingeschränkte humorale Immunantwort hatten [81].

Die Therapie aufgrund von aktiver Erkrankung zeigte in unserer Studie keinen signifikanten Unterschied in der Titerhöhe. Allerdings ist hervorzuheben, dass die Patienten, die eine Therapie erhielten in der Gruppe „Andere“ der Grunderkrankungen vertreten waren und es dabei um Immunmodulatoren wie Lenalidomid oder

Therapieregime mit Bortezomib, Panobinostat und Dexamethason ging. Diese Beobachtung wird unterstützt durch eine Arbeit, die die Immunantwort von 171 Patienten mit Multiplem Myelom nach zwei Dosen BNT162b2 im Jahr 2021 untersuchte und keinen signifikanten Einfluss von Lenalidomid oder Bortezomib auf die humorale Immunantwort analysierte, was auf den größeren Benefit der Krankheitskontrolle durch diese Substanzen zurückzuführen sein könnte [82].

4.2.4 Einfluss des Alters, des Geschlechtes und der Impfreaktionen auf den Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer

Unsere Daten zeigten bei den gesunden Probanden einen signifikant negativen Einfluss des Alters auf die Immunantwort. So führte eine Impfung bei den über 80-Jährigen zu einem signifikant niedrigeren Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer als bei den unter 60-Jährigen ($p < 0,001$). Die Immunseneszenz ist die nachlassende Funktion des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Der Thymus unterliegt der Altersinvolution, d.h. die Anzahl der naiven T-Zellen nimmt mit zunehmendem Alter konsekutiv ab, es dominieren Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen, dies führt wiederum zu einem veränderten Zytokinmilieu. Insgesamt wirkt sich das auch auf die B-Zell-Reifung und die Antikörperbildung aus [83].

Im Gegensatz dazu zeigte die humorale Immunantwort bei Patienten nach alloHSZT im Vergleich zu älteren Patienten mit altersadaptiert schwachem Immunsystem keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,41$). Dies verdeutlicht die Vulnerabilität des Immunsystems der beiden Subgruppen und bestärkt die Argumentation, dass passive Immunisierungsstrategien oder mehrere Auffrischimpfungen mit Titerkontrollen in diesen Kohorten wichtig sind. Jedenfalls lässt dies vorsichtig vermuten, dass die Dynamik und Kinetik der Immunsysteme hinsichtlich der Covid-Impfung vergleichbar reduziert und somit verlangsamt sind. Im Rahmen der Altersinvolution verliert der Thymus an funktionellem Gewebe, durch eine alloHSZT verliert der Thymus zusätzlich durch Bestrahlungs- und Chemotherapiebehandlungen an Funktion [20]. Die T-Zellreifung ist verlangsamt und zum Teil abhängig von extrathymischer T-Zellreifung in z.B. sekundär lymphatischen Organen, dem Darm und der Leber. Extrathymisch gereifte T-Zellen lassen sich von thymisch gereiften T-Zellen durch den Phänotyp unterscheiden [84, 85].

Die Datenlage hierzu ist vielfältig. Es gibt einige Studien, welche ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Antikörperhöhe und dem Alter der Patienten nach alloHSZT feststellten [77], die Mehrheit der Studien beschreibt jedoch einen signifikanten Einfluss des Alters auf den Antikörpertiter. Dabei wird ein höheres Alter mit einer niedrigeren Serokonversionsrate assoziiert [57, 62, 63]. Die Tatsache, dass ältere Menschen mit Immundefizienz ausgeprägter reduzierte Impfantworten haben, geht auch mit einer höheren Mortalitätsrate nach *COVID-19*-Infektion in dieser Population einher [86]. Der fehlende signifikante Einfluss des Alters in unserem Patientenkollektiv könnte daraus resultieren, dass sich das Alter der Patienten sehr homogen auf einen Bereich von 50-65 Jahren beschränkt und nur vereinzelt jüngere oder ältere Ausreißer existierten.

Das Geschlecht hatte in unserer Studie keinen signifikanten Einfluss auf den Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer. Allerdings bestand unser Patientenkollektiv zu 60 % aus Männern und zu 40 % aus Frauen. In anderen Studien wird das weibliche Geschlecht als den Impftiter begünstigend eingestuft. Henig et al. haben hinsichtlich der Geschlechterverteilung ein homogeneres Kollektiv (53 % weiblich) und analysierten das weibliche Geschlecht als positiven Prädiktor der Titerhöhe [87]. Es gibt Hinweise darauf, dass das männliche Geschlecht eine höhere Expression von *ACE2* und *TMPRSS2* hat und das weibliche Geschlecht zudem eine robustere und stärkere Stress-Antwort, gemessen am Stresshormonlevel liefert, die sich protektiv auf einen schweren Verlauf auswirken kann [88]. In der Studie von Hütter-Krönke et al. hatte das Geschlecht in der Multivariatanalyse auch keinen signifikanten Einfluss auf den Antikörpertiter von Patienten nach alloHSZT (n = 243), wobei das weibliche Geschlecht mit anteilig 44 % leicht unterrepräsentiert war [89]. Letztlich bleibt der Einfluss des Geschlechtes auf die Titerantwort nach aktueller Datenlage unklar und bedarf mehrerer Multivariatanalysen, die das Geschlecht als unabhängige Variable aus- oder einschließen.

In unserer Studie bestand eine signifikante Korrelation zwischen dem Symptom „Fatigue“, welches von 35 % der symptomatischen Patienten nach der ersten Impfung und von 50 % der symptomatischen Patienten nach der zweiten Impfung angegeben wurde, und dem Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer. Neben den erfassten Symptomen (Schmerzen an der Einstichstelle, Kopfschmerzen, Gliederschmerzen, Fieber, Schüttelfrost, Fatigue, Schwäche) kam es zu keinen schweren Impfreaktionen. In Übereinstimmung gibt es auch bei gesunden Personen Hinweise darauf, dass

Impfreaktionen signifikant positiv mit dem Antikörpertiter korrelieren [90]. Dabei war Fatigue auch das zweithäufig angegebene Symptom in der Kohorte.

4.3 Vergleich der Titerantwort von Patienten nach alloHSZT und gesunden Kontrollprobanden

Wir verglichen die humorale Immunantwort von Patienten nach alloHSZT mit 112 gesunden Probanden (Altersmedian 80 Jahre, Spannweite 19-100). Die gesunden Probanden wurden in zwei Gruppen unterteilt, wobei 47 % der Patienten 60 Jahre alt oder jünger waren und 53 % der Patienten 80 Jahre alt oder älter waren. Es konnte ein signifikanter Unterschied der Titerhöhe zwischen älteren und jüngeren gesunden Probanden festgestellt werden. Der Antikörpertiter-Median der jungen gesunden Teilnehmer/innen war in etwa dreifach höher (Median 2751 BAU/ml, Spannweite 838-32000) im Vergleich zu den Patienten nach alloHSZT (Median 892 BAU/ml, Spannweite 1,5-12934). Die humorale Immunantwort von Patienten nach alloHSZT und von gesunden Probanden ≥ 80 Jahre (Median 623 BAU/ml, Spannweite 18-16891) war vergleichsweise niedrig, zwischen diesen Gruppen gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Nach Müller et al. hatten bereits sechs Monate nach der ersten Impfung 41,6 % der älteren Probanden (≥ 80 Jahre) einen Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer unterhalb des *cutoff* von 35,2 BAU/ml, während die jüngere Kontrollgruppe (≤ 60 Jahre) keine Titer unterhalb des *cutoff* aufwies. Es wird beschrieben, dass erst nach der *Booster*-Impfung kein statistisch signifikanter Unterschied in der Impfantwort zwischen der älteren und jüngeren Kohorte bestand [46].

Basierend auf der aktuellen Datenlage entwickelten durchschnittlich 75 % der Patienten nach alloHSZT nach zweifacher Impfung eine Serokonversion [91]. Daten zur Protektion vor einer Infektion existieren nur vereinzelt an kleinen Kohorten, eine Metaanalyse liegt zum jetzigen Zeitpunkt nicht vor. In einem Nachbeobachtungszeitraum von sechs Monaten nach der Grundimmunisierung wird bei gesunden Probanden eine Protektion vor einer Infektion zu 91,3 % und eine Protektion vor einem schweren Verlauf einer SARS-CoV-2-Infektion zu 96,7 % beschrieben [92].

In der Studie von Belkacem et al. wurde die Höhe der neutralisierenden Antikörper von 26 Patienten nach alloHSZT (Altersmedian 61 Jahre, Spannweite 31-75) mit der von

22 gesunden medizinischen Fachkräften (Altersmedian 40 Jahre, Spannweite 21-56) verglichen. Die Blutabnahme erfolgte im Median 27 Tage (Spannweite 20-58) nach der zweiten Impfung sowie im Median 26 Tage (Spannweite 20-34) nach der dritten Impfung bei Patienten nach alloHSZT. Die gesunde Kontrollgruppe erhielt die Blutabnahme 22 Tage (Median, Spannweite 18-30) nach der zweiten Impfung. Es wurden neutralisierende Antikörper in Bezug auf verschiedene Varianten (D614G-Mutation, Beta, Delta, Omicron BA.1) gemessen. Dabei war nach der Grundimmunisierung ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Titerhöhe zu erkennen. Die *Boosterung* der Patienten nach alloHSZT führte zu Impfantworten, die gesunden Probanden nach der Grundimmunisierung entsprachen und reduzierte signifikant den Anteil der *non-responder* (D614G-Mutation: von 42 % auf 11 %, Beta: von 30 % auf 4 %, Delta: von 58 % auf 19 %, Omicron BA.1: von 73 % auf 42 %) [93].

Tamari et al. beschreiben 54 gesunde Kontrollprobanden in ihrer Studie mit einem Altersmedian von 31 Jahren (Spannweite 22-67). Etwa drei Monate nach der ersten Impfung, und somit nach der Komplettierung der Grundimmunisierung, stieg der Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer auf im Median 7720 AU/ml (IQR 3885-9746) an. Signifikant niedrigere Titer wurden bei Patienten nach alloHSZT (n = 149) festgestellt (Median 5019,8 AU/ml, IQR 635,4-15914,5) [94].

Übereinstimmend mit unseren Daten fällt bei gesunden Erwachsenen der Anti-SARS-CoV-S1-IgG-Titer nach der Grundimmunisierung signifikant ab und ist nach sechs Monaten auf einem Niveau, welches der Antikörperreaktion nach der ersten Impfung gleicht [90]. Daraus lässt sich ableiten, dass gesunde Erwachsene nach einem halben Jahr noch einen, wenn auch reduzierten, Impfschutz aufweisen. Die Kinetik des Titerabfalles ist nach unseren Daten, und übereinstimmend mit der aktuellen Datenlage, nicht so ausgeprägt wie bei Patienten nach alloHSZT. Vermutlich stellt sich bereits nach der Grundimmunisierung eine stabilere Persistenz der Antikörper ein, einer Art *steady state*, welches durch eine *Booster*-Impfung effektiv adressiert wird.

Basierend auf unseren Daten und deckungsgleich mit o.g. Studien können wir festhalten, dass es innerhalb der gesunden Probanden (≤ 60 Jahre) in den vergleichenden Studien keine *non-responder* nach der Grundimmunisierung gab. Die humorale Immunantwort unterschied sich jedoch bei Gesunden deutlich von Patienten nach alloHSZT, die trotz eines Abstandes von mehr als 12 Monaten zur alloHSZT, insgesamt 14 % *low*- und *non-responder* aufwiesen. Während gesunde Probanden bereits nach der Grundimmunisierung effiziente Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer

hatten, benötigen Patienten nach alloHSZT zeitnah Auffrischimpfungen, um einen adäquaten Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer zu erreichen. Der limitierende Faktor bei gesunden Kontrollen war in unserer Kohorte das Alter. Gesunde Probanden ≥ 80 Jahre benötigten ebenso frühzeitig Auffrischimpfungen, um einen suffizienten Impftiter zu erzielen. Diese vulnerable Population zeigte nach der Grundimmunisierung ähnlich niedrige Titer wie Patienten nach alloHSZT. Auch die STIKO (Ständige Impfkommission) weist darauf hin, dass Personen ab dem 60. Lebensjahr in der aktuellen Pandemiesituation ein Risiko für schwere Infektionsverläufe haben und daher eine jährliche Impfung mit einem zugelassenen *mRNA*- oder proteinbasierten Impfstoff erhalten sollen [95].

Zusammenfassend geht aus unseren Daten einhellig zu den Daten der anderen Studien hervor, dass junge (≤ 60 Jahre) gesunde Probanden auch nach 3 – 6 Monaten noch adäquate Impftiter aufzeigten, während Patienten nach alloHSZT nach der Grundimmunisierung bereits signifikant niedrigere Titer hatten und im Zeitverlauf dramatische Abfälle der Titer nachgewiesen werden konnten. Somit ist es notwendig, dass Patienten nach alloHSZT mindestens drei Impfstoffdosen im Rahmen der Grundimmunisierung erhalten, während bei jungen (≤ 60 Jahre) gesunden Probanden ein Abstand von 6 Monaten nach der Grundimmunisierung bis zur Auffrischimpfung vertretbar erscheint.

4.4 Abfall der Antikörpertiter im Zeitintervall

Über einen Zeitraum von etwa drei Monaten beobachteten wir bei Patienten nach alloHSZT einen Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titerabfall von im Median 73 % (-95 % bis +40 %). Auch der Neutralisationstiter fiel um 75 % im Median (Spannweite -100 % bis +1500 %) signifikant ab. Dies ist vor dem Hintergrund, dass der Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer stark mit dem Neutralisationstiter korrelierte ($r = 0,908$), nicht verwunderlich. Der Titeranstieg eines Probanden/ einer Probandin kann vermutlich durch kreuzreagierende Antikörper mit saisonalen Coronaviren erklärt werden. Der starke Abfall des Antikörpertiters innerhalb eines kurzen Zeitintervalles ist vor allem im Kontext dessen dramatisch, dass die Ausgangstiter von Patienten nach alloHSZT bereits signifikant niedriger waren.

Nach Huang et al. war die Titerantwort bei Patienten nach alloHSZT etwa einen Monat nach der Grundimmunisierung am größten, während bereits drei Monate und sechs

Monate nach der zweiten Impfung ein signifikanter Titerabfall zu verzeichnen war [96]. Naaber et al. führen als mögliche Hypothese an, dass die impfstoffinduzierten Plasmablasten eine kürzere Lebenszeit haben und nicht alle zu Plasmazellen ausdifferenzieren [90]. Dies verdeutlicht, dass Patienten nach alloHSZT kürzere Zeitabstände zwischen der Grundimmunisierung und Auffrischimpfung benötigen. Einen ebenso drastischen Titerabfall konnten wir bereits 133 Tage (Median, Spannweite 106-157) nach der Grundimmunisierung beobachten. Aus dem Großteil der Studien ist zu entnehmen, dass eine Messung der humoralen Immunantwort etwa einen Monat nach der Grundimmunisierung erfolgte. Wir haben die humorale Immunantwort im Median 41 Tage (Spannweite 13-76) nach der zweiten Impfung gemessen. Da bei gesunden Probanden ein erster Titerabfall bereits nach sechs Wochen zu verzeichnen ist [90], könnte es sein, dass der Titerabfall in unseren Daten sogar noch unterschätzt wurde.

Es gibt bereits Studien, die den Titerabfall nach der *Booster*-Impfung beschreiben. So berichteten Henig et al., dass der Titer von 30 Patienten nach alloHSZT einen Monat nach der dritten Impfung im Median bei 8105 AU/ml (Spannweite 715-40.000) lag, während dieser drei Monate nach der dritten Impfung auf im Median 4026 AU/ml (Spannweite 76-40.000) abfiel [87]. Zudem gibt es Studien, die zu der Erkenntnis kommen, dass der Antikörpertiter-Median nach der *Booster*-Impfung signifikant höher war als nach der Grundimmunisierung bzw. die *Booster*-Impfung dazu führte, dass die Antikörpertiter von 83 % der Patienten nach alloHSZT signifikant anstiegen [68, 97]. Dabei werden in den einzelnen Studien jedoch v.a. die Titer-Spitzenwerte nach den Impfungen beleuchtet und es gibt derzeit wenig Studien, die den Titerabfall im Zeitverlauf nach den *Booster*-Impfungen beobachten. Ob sich eine *Booster*-Impfung neben einer erfolgreichen Impfantwort auch entschleunigend auf die Dynamik des Titerabfalles auswirkt, ist demnach derzeit noch zu diskutieren bzw. in zukünftigen Studien zu analysieren. Perspektivisch ist es interessant, wie viele Auffrischimpfungen notwendig sind, um ein Antikörperplateau zu erreichen. Offen bleibt dabei natürlich, ob dieses überhaupt im Verlauf erzielt werden kann in Abhängigkeit von Patienten- und Transplantationsassoziierten Faktoren, aber v.a. auch im Hinblick auf die Virusevolution.

In der Arbeit von Leclerc et al. korrelierte der Antikörper-Spitzenwert nach der zweiten und dritten Impfung signifikant positiv mit der Titerantwort nach 6 Monaten. Interessant ist, dass sich die mittleren Antikörpertiter von Patienten, die zwei oder drei Impfungen

erhielten, nach sechs Monaten nicht signifikant voneinander unterschieden [66]. Dies lässt vorsichtig vermuten, dass Patienten, die aufgrund von initial niedrigen Titern eine *Booster*-Impfung benötigten, ein ähnlich niedriges Antikörpersniveau nach einem halben Jahr erreichen wie jene Patienten, die bereits nach der Grundimmunisierung ein gutes Impfansprechen zeigten. Durch eine *Booster*-Impfung kann scheinbar ein besserer Impftiter-Spitzenwert erzeugt werden oder überhaupt ein Impfansprechen im Sinne einer Serokonversion induziert werden, die Nachhaltigkeit der humoralen Immunantwort erscheint jedoch derzeit im Zeitverlauf ähnlich reduziert wie nach der Grundimmunisierung. Das Ausmaß der Antikörperreduktion in einem Zeitintervall von etwa drei Monaten erscheint demnach auch bei initial gutem Ansprechen ausgeprägt.

Müller et al. beschreiben, dass keiner der jungen gesunden Probanden ≤ 60 Jahre ein halbes Jahr nach der Grundimmunisierung Antikörpertiter unterhalb des *cutoff* ($\leq 35,2$ BAU/ml) aufwies, während 41,6 % der älteren Probanden ≥ 80 Jahre nach einem halben Jahr Titer unterhalb des *cutoff* hatten [46]. Es ist perspektivisch interessant, Antikörpertiter nach weiteren drei bis sechs Monaten zu messen, um besser beurteilen zu können, ob die etablierten Antikörper sich auf einem niedrigen Niveau stabilisieren oder ob es konsekutiv zu einer weiteren Abnahme kommt. Allerdings sind die aktuelle Datenlage und Bewertung, durch die zu diesem Zeitpunkt bereits durchgeführten *Booster*-Impfungen, erschwert. Dies ist zudem ethisch fraglich, da eine *Booster*-Impfung nach fünf Monaten nachweislich mit einer reduzierten Mortalitätsrate einer SARS-CoV-2-Infektion assoziiert ist [98].

Weiterhin sind die Betrachtung und die Beratung jedes Patienten als individueller Fall essenziell. Es ist z.B. möglich, dass ein Patient nach der Grundimmunisierung ein adäquates Ansprechen zeigt, jedoch im Verlauf nach der alloHSZT eine *GvHD* entwickelt, die mit einer intensiveren Immunsuppression einhergeht und damit zu einem schlechteren Impfansprechen nach einer Auffrischimpfung führen könnte. Bei dem SARS-CoV-2-Impfschema nach alloHSZT handelt es sich somit nicht um ein festes Impfschema, das nach vorgegebenen Kriterien durchgeführt werden kann, sondern um einen dynamischen Prozess, der vom individuellen Krankheitsverlauf und von eventuell hinzukommenden oder entfallenden suppressiven Einflüssen nach einer alloHSZT abhängig ist. Zudem ist auch noch nicht bekannt, wie ein Impfansprechen zu erwarten ist, wenn nach der Transplantation Infektionen mit anderen Viren oder Erregern auftreten, wie z.B. CMV. In einer Arbeit aus dem Jahr 2023 gibt es erste Hinweise darauf, dass eine CMV-Infektion mit schlechteren Impftitern assoziiert ist

[99]. Eine weitere Studie beschreibt sogar ein schlechteres Gesamtüberleben von Patienten nach alloHSZT, die CMV positiv sind und zugleich an *Covid-19* erkrankt sind [100]. Hierzu bedarf es zukünftig weiterer Forschungsarbeiten.

4.5 Boostern

Nach dem Ende unseres Dateneinschlusses beschrieben erste Studien einen Benefit der *Boosterung*, welcher insbesondere bei Patienten nach alloHSZT, die nach der Grundimmunisierung eine reduzierte oder keine humorale Immunantwort hatten, beobachtet werden konnte [64, 101, 102]. Nach den Empfehlungen der *EBMT* aus dem Jahr 2022 wurde eine *Booster*-Impfung bei Patienten nach alloHSZT innerhalb von 1-5 Monate nach der zweiten Impfung empfohlen [79].

Es wird in der Studie von Maillard et al. (n = 181 nach alloHSZT) aus dem Jahr 2022 beschrieben, dass Patienten, die nach der Grundimmunisierung kein Impfansprechen zeigten, durch eine *Boosterung* einen nachweisbar höheren Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer erreichten. Zudem wurde ein Titeranstieg (> 250 BAU/ml) in der Kohorte beobachtet, die initial ein niedrigeres Ansprechen zeigten. Die Patienten, die bereits durch die Grundimmunisierung einen Titer > 250 BAU/ml erzielten, verzeichneten nochmal einen Titeranstieg oder blieben im Bereich des oberen Grenzwertes, der durch den verwendeten Assay messbar war [64]. In der Studie von Belkacem et al. wurden die neutralisierenden Antikörperreaktionen gegen die Beta- und Deltavariante von SARS-CoV-2 bei Patienten nach alloHSZT gemessen. Hier wurde ein Anstieg der neutralisierenden Antikörper nach einer dritten Impfung mit BNT162b2 auf Werte beobachtet, die jenen ähneln, die gesunde Erwachsene nach der Grundimmunisierung erzielen [93]. In der Studie von Henig et al. wird beschrieben, dass nach zweifacher Impfung eine Impfantwort bei 66 % der Patienten induziert wurde, während die Impfantwort einen Monat nach der *Booster*-Impfung auf 79,5 % anstieg. Die Titerantwort wurde erneut drei Monate nach der *Booster*-Impfung gemessen, wobei noch 93 % der Patienten Titer $\geq$ 150 AU/ml aufwiesen [87]. Dies lässt hoffen, dass sich die *Booster*-Impfung begünstigend auf die Antikörperpersistenz auswirkt.

Seit Februar 2024 hat die STIKO neue Impfempfehlungen formuliert. Demnach sollten alle immungesunden und immundefizienten Personen eine Basisimmunität bestehend aus drei Antigenkontakten (mindestens eine Impfung im Abstand von drei Monaten zur durchgemachten Infektion) erhalten. Zur Verfügung stehen weiterhin *mRNA*-Impfstoffe

von Comirnaty (30 µg je Impfdosis ab einem Alter von 12 Jahren) sowie Spikevax (50 µg je Impfstoffdosis ab einem Alter von 30 Jahren) und der proteinbasierte Impfstoff Novavax (50 µg je Impfstoffdosis ab einem Alter von 12 Jahren). Zudem gibt es seit September 2023 an die aktuell weltweit vorherrschende Omikron-Subvariante XBB.1.5 angepasste monovalente Impfstoffe, die als Auffrischimpfung im Abstand von drei Monaten zur letzten Impfung empfohlen werden [95]. Die Herausforderungen, die im Zusammenhang mit den verschiedenen Virusvarianten stehen, werden im Abschnitt „Virus evolution“ näher beleuchtet.

Vor dem Hintergrund der Erkenntnisse des raschen Titerabfalles bei immunsupprimierten Patienten liegt es im Ermessen des behandelnden Arztes unter Berücksichtigung des Patientenwunsches, in dieser vulnerablen Kohorte weitere Impfungen im Abstand von vier Wochen durchzuführen, um einen Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titeranstieg zu erzielen. Die Serokonversion sollte vier Wochen nach der jeweiligen Impfung überprüft werden und basierend auf dem Ergebnis die Entscheidung für eine weitere Impfung getätigt werden [95].

Die Impfstrategien und Empfehlungen müssen weiterhin verfolgt werden, da Patienten, die in den nächsten Wochen und Monaten eine alloHSZT aufgrund einer hämato-onkologischen Erkrankung benötigen, ihren aktuellen Impfschutz verlieren und auf einen erneuten Schutz gegen die vorherrschenden Virusvarianten von SARS-CoV-2 angewiesen sind. In dem Zusammenhang sollte die Covid-19-Impfung vor anderen Impfungen priorisiert werden im Hinblick auf die hohen Prävalenzen und Inzidenzen und die hohe Mortalitätsrate [79].

4.6 Aktuelle Einordnung im Hinblick auf die Virusevolution

Die größte Herausforderung im Rahmen der Pandemie stellt die Virusevolution und die damit verbundene abgeschwächte Wirksamkeit der Impfstoffe gegen unterschiedliche VOC dar. Durch Mutationen im *Spike*-Protein und *immune escape*-Mechanismen, können SARS-CoV-2-Varianten sich der Immunantwort entziehen und zukünftig immer wieder zu sog. Durchbruch-Infektionen führen. Die zunehmende Populationsimmunität führt zu einem stärkeren Selektionsdruck des Virus, was wiederum den *Antigen-Drift* im *Spike*-Protein vorantreibt [25]. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass das Virus auch in anderen Genombereichen mutiert und dass es Rekombinationen zwischen SARS-CoV-2-Kladen gibt [103]. Im November 2021 wurde

die Omikron-Variante B.1.1.529 von der *WHO* als VOC eingestuft. Von dieser werden mittlerweile mehrere Sublinien abgeleitet, wobei BA.5 die derzeit in Deutschland vorherrschende Variante darstellt [25].

Um die Neutralisationstiter konventionell nachzuweisen, wird ein Labor der Biosicherheitsstufe 3 benötigt. Mittlerweile gibt es die Möglichkeit, mittels Pseudoviren neutralisierende Antikörper gegen unterschiedliche Varianten zu erfassen [90]. So beschrieben Sahin et al., dass die Seren von geimpften Patienten 22 Pseudoviren, die sich durch Mutationen im *Spike*-Protein voneinander unterschieden, neutralisieren konnten. Das Fazit der Studie ist, dass BNT162b2 eine effektive humorale und zelluläre Immunantwort gegen virale Epitope auslöst, die in einem breiten Spektrum in allen Virusvarianten vertreten sind [104]. Diese Studie wurde allerdings im Mai 2021 publiziert, also vor der Expansion der derzeit vorherrschenden Omikron-Variante.

Die SARS-CoV-2-Variante Omikron B.1.1.529 hingegen beeinträchtigte die Wirksamkeit der Impfstoffe und führte zu Re-Infektionen. In einer Studie wurde die Effizienz der Neutralisierungsaktivität von Probanden nach zweifacher BNT162b2-Impfung ohne vorherige Infektion sowie von genesenen und geimpften Probanden gegen Omikron B.1.1.529 und, im Vergleich, gegen die D614G-Variante, untersucht. Dabei hatte sowohl die Gruppe der genesenen Geimpften als auch die Gruppe der Geimpften eine 22-fach niedrigere Neutralisierungseffektivität in Bezug auf Omikron B.1.1.529 im Vergleich zu dem älteren Virusstamm D614G [105]. Einige Daten weisen darauf hin, dass eine *Boosterung* die Effizienz der Neutralisierung von Omikron signifikant erhöht, was auf eine erhöhte Kreuzreaktivität der neutralisierenden Antikörper hindeutet [105, 106].

In Bezug auf die weltweit vorherrschenden BQ- und XBB-Subvarianten konnte auch eine deutlich reduzierte Wirksamkeit der Neutralisation durch den entwickelten bivalenten *mRNA*-Impfstoff, der sowohl gegen den Wildtyp als auch gegen BA.5 immunisiert, nachgewiesen werden [107]. Auf Basis der aktuellen Datenlage und laut *WHO* gibt es eine Restimmunität der bisher angewandten *mRNA*- und proteinbasierten Impfstoffe, die vor schweren *COVID-19*-Verläufen schützen kann. Dennoch wurden nun XBB.1.5 adaptierte *mRNA*- und proteinbasierte Impfstoffe zugelassen mit der Empfehlung einer Impfdosis unabhängig vom aktuellen Impfstatus und einem Abstand von drei Monaten zur letzten Impfung [95].

Es existiert ein *Case-Report*, der den Verlauf einer Patientin mit Nachweis einer Omikron BA.5-Infektion kurz vor der geplanten alloHSZT mit einem *MUD* aufgrund einer Hochrisiko-ALL beschreibt. Die Patientin wurde unmittelbar mit Nirmatrelvir/Ritonavir behandelt und erhielt zwei Tage vor der Transplantation eine passive Immunisierung mit Tixagevimab/Cilgavimab. Während der myeloablativen Chemotherapie stieg die Viruslast an, wobei die Patientin asymptomatisch war. Erst nach dem *Engraftment* an Tag +23 trat eine leichte Symptomatik auf, bestehend aus Fieber, Husten und Rhinokonjunktivitis, wobei bereits an Tag +28 das Virus nicht mehr nachgewiesen werden konnte [108]. Zwei weitere *Case-Reports* bestätigen eine wirksame Kombinationstherapie von Nirmatrelvir/Ritonavir, Remdesivir und Sotrovimab bei zwei Patienten, die während der Therapie mit Rituximab an einer SARS-CoV-2-Infektion erkrankten. Sotrovimab wurde als monoklonaler Antikörper aufgrund der zu dem Zeitpunkt epidemiologisch anzunehmenden BA.1-Variante ausgewählt [109]. Dies hebt die Komplexität der Patienten im Kontext der Pandemie hervor. Patienten können auch während der myeloablativen Chemotherapie vor alloHSZT an einer SARS-CoV-2-Infektion erkranken oder aber der Therapiedruck ist so hoch, dass eine alloHSZT trotz vorliegender Infektion nicht verschoben werden kann.

In Frankreich wurde bereits 28 Tage nach der Grundimmunisierung bei den Patienten, die keine Serokonversion aufzeigten oder niedrige Antikörpertiter aufwiesen, eine *Booster*-Impfung durchgeführt. Es wurde die Neutralisationseffizienz hinsichtlich der Varianten D614G, Beta, Delta und Omikron BA.1 untersucht. Daraus resultierte ein signifikanter Anstieg neutralisierender Antikörper bei Patienten nach alloHSZT (88 % D614G, 92 % Beta, 80 % Delta und 73 % Omikron) im Vergleich zu der Antikörperantwort nach der zweiten Impfung, wobei die Neutralisation gegen Omikron im Vergleich ineffizienter ausfiel [93].

Trotz, dass die aktuelle Datenlage auf eine defizitäre Neutralisationskapazität der *mRNA*-Impfstoffe hinweist, die gegen den Wildtyp von SARS-CoV-2 gerichtet waren, zeigen die Daten, dass Durchbruchinfektionen bei geimpften Patienten nach alloHSZT die Mortalitätsrate nicht anheben und v.a. schwerere Verläufe signifikant verhindert werden konnten [68]. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die *Booster*-Impfung auch bei Menschen mit Immundefizienz effiziente T-Zell-Antworten auslöst, die robuste Immunantworten gegen verschiedene Omikron-Subvarianten erzeugen. Die T-Zellen sind durch ein langlebiges CD45RA+ Effektor-Gedächtnis-Profil gekennzeichnet [110].

Aus den aktuellen Empfehlungen der *EBMT-Guidelines* (Januar 2024) geht hervor, dass eine alloHSZT bei symptomatischer Infektion, insbesondere der unteren Atemwege mit nachgewiesener Pneumonie, aufgeschoben werden sollte, insofern dies vertretbar ist. Patienten, die über einen längeren Zeitraum asymptomatisch, aber noch in der *PCR* positiv sind, könnten von einer antiviralen Behandlung mit bevorzugt Nirmatrelvir/Ritonavir oder Remdesivir profitieren. Falls die Patienten trotz Therapie Risikofaktoren für eine schwere oder lang anhaltende SARS-CoV-2-Infektion aufweisen (z.B. Anti-CD20-Behandlung im letzten Jahr oder Sauerstoffbedarf), kann zusätzlich zur Behandlung mit Virostatika die Gabe von hochtitrigem Rekonvaleszenzplasma in Betracht gezogen werden [111].

Zusammenfassend haben Patienten nach alloHSZT durch eine *Booster*-Impfung kreuzreagierende Antikörper, die einen Schutz vor einem schweren Verlauf bieten können. Zudem wird aktuell die Impfung mit den neuen, XBB.1.5 adaptierten, Impfstoffen empfohlen. Bei einer plötzlich aufgetretenen SARS-CoV-2-Infektion während der Transplantation ist die antiretrovirale Therapie und, im Einzelfall, die Kombination dieser mit monoklonalen Antikörpern möglich. Diese weisen überwiegend ein gutes Sicherheitsprofil auf, sodass der Einsatz vor dem Hintergrund der epidemiologisch dominierenden Variante diskutiert werden kann. Weitere Daten und Analysen sind hierfür notwendig. Letztlich bleibt die dynamische Virusevolution und damit einhergehend die Etablierung angepasster Impfstoffe und monoklonaler Antikörper in dieser hochvulnerablen Population eine Herausforderung.

4.7 Konsequenzen aus unseren Daten und Konklusion

Die Kriterien für den Beginn einer Immunisierung sind von der jeweiligen Institution und offiziellen Vorgaben abhängig. Aus unseren Daten ging in Übereinstimmung mit weiteren Studien hervor, dass eine hohe Anzahl von Lymphozyten allgemein, T-Helferzellen, B-Lymphozyten und NK-Zellen mit einem größeren Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-Titer korrelierten [52, 53, 58, 59, 64]. Die Analyse der Immunglobuline ergab für IgG und IgA einen signifikant positiven Einfluss auf die Titerhöhe. Einige Autoren sprachen konkrete *cutoffs* für den Beginn einer Immunisierung aus, z.B. CD4+-Zellen > 200/ μ l, CD19+-B-Zellen > 50 Zellen/ μ l und IgG > 500 mg/dl [94]. Basierend auf dieser Erkenntnis konnten wir die Erhebung eines Immunstatus zur Quantifizierung der bereits vorhandenen Immunzellen vor den Impfungen empfehlen, da suffiziente

Zellzahlen ein besseres Impfansprechen begünstigen. Wenn eine noch nicht ausreichende Leukozytenrekonstitution nach alloHSZT vorliegt, sollten stattdessen passive Impfstrategien oder eine frühzeitige *Boosterung* in Betracht gezogen werden.

Die Antikörpertiter sollten dabei nach jeder Auffrischimpfung überwacht werden. Ein zeitnahes Messen des Impftiters, basierend auf der aktuellen Datenlage etwa einen Monat nach der Grundimmunisierung, ist von großem Vorteil, um frühzeitig jene Patienten zu detektieren, die aufgrund eines unzureichenden Antikörpertiters hochgefährdet sind, einen schweren Verlauf einer SARS-CoV-2-Infektion zu entwickeln. Laut STIKO ist es in diesem Patientenkollektiv möglich, die Impfungen im Abstand von vier Wochen zu wiederholen, bis ein Impfansprechen zu verzeichnen ist. Zudem besteht *off-label-use* die Möglichkeit, Impfdosen zu erhöhen [95]. Aufgrund des beobachteten raschen Titerabfalles 133 Tage (Median, Spannweite 106 – 157) nach der zweiten Impfung, war es uns möglich, frühzeitig *Booster*-Empfehlungen für unsere Patienten auszusprechen. Neben der präventiven Maßnahme einer Impfung ist es weiterhin empfehlenswert, ergänzende protektive Maßnahmen wie das Tragen einer medizinischen Maske, das Vermeiden von Menschenansammlungen und das Impfen Angehöriger von Patienten nach alloHSZT zur Reduktion des Transmissionsrisikos einzuhalten [79].

Für den bestmöglichen Impfzeitpunkt spielt das Zeitintervall zwischen alloHSZT und Impfung eine wichtige Rolle. Wir konnten zeigen, dass Patienten, die 12 Monate oder später nach der alloHSZT eine Impfung erhielten, signifikant höhere Titer erreichten ($p < 0,001$). Laut *EBMT* wird eine SARS-CoV-2-Impfung frühestens drei Monate nach der alloHSZT empfohlen. Der Zeitpunkt der Impfung sollte in Nutzen-Risiko-Abwägung eruiert werden. Ein Herausögern der Impfung ist vertretbar, sofern im Patientenumfeld ein niedriges Transmissionsrisiko und niedrige Prävalenzen und Inzidenzen gemäß aktueller Pandemielage bekannt sind [79].

Es gibt Hinweise darauf, dass ein größerer Abstand zwischen den beiden Impfungen im Rahmen der Grundimmunisierung zu einer besseren Vakzin-Effektivität und damit einem besseren Schutz vor einer SARS-CoV-2-Infektion oder vor einer Hospitalisierung führt [112, 113]. Derzeit empfiehlt die STIKO daher einen erweiterten Impfabstand von 4-12 Wochen innerhalb der Grundimmunisierung. Da zum Zeitpunkt der bisherigen Studien ein Impfabstand von 3-4 Wochen gemäß den Angaben des Herstellers eingehalten wurde, gibt es bei Patienten nach alloHSZT derzeit keine

Literatur dazu. Dies ist perspektivisch interessant für Patienten, die zukünftig eine alloHSZT erhalten und somit eine neue Basisimmunität benötigen. Hierbei ist zu hinterfragen, ob dies auch auf Patienten nach einer alloHSZT angewendet werden kann, da die Antikörperkinetik und die Antikörperdynamik durch die verschiedenen Einflussfaktoren in Zusammenhang mit der immunsuppressiven Therapie besonders anspruchsvoll bleiben.

Des Weiteren sollte die Impfung basierend auf der aktuellen Datenlage bei einer akuten, schwer kontrollierbaren *GvHD* dritten oder vierten Grades aufgeschoben werden [79]. Insgesamt 35 % unseres Patientenkollektivs litt an einer chronischen *GvHD*, die keinen signifikanten Einfluss auf die Antikörpertiter hatte. Unter den Immunsuppressiva hatte Ruxolitinib einen signifikant negativen Einfluss auf den Antikörpertiter. Aus anderen Studien geht hervor, dass Immunsuppressiva einen supprimierenden Effekt auf den Antikörpertiter haben können [4, 13, 62]. Entsprechend unserer Daten ist ein Impferfolg trotz immunsuppressiver Therapie und chronischer *GvHD* möglich.

Herausfordernd bleibt derzeit, dass es noch keinen etablierten Grenzwert des Anti-*SARS-CoV-2-S1-IgG*-Titers sowie des Neutralisationstiters gibt, der mit einem konkreten Schutz vor einer Infektion korreliert. In unserer Studie korrelierte der Anti-*SARS-CoV-2-S1-IgG*-Titer stark positiv mit dem Neutralisationstiter. Es gibt Studien von gesunden Probanden die z.B. beobachteten, dass ab einem Antikörpertiter von 100 BAU/ml nach der Grundimmunisierung zwei Drittel der Teilnehmenden einen klinischen Schutz vor einer *SARS-CoV-2*-Infektion entwickelten [114]. Jedoch wäre ein Titergrenzwert von gesunden Probanden nicht ausnahmslos auf Patienten nach alloHSZT zu übertragen, da in ein klinisches Modell die immunsupprimierenden Einflüsse aufgenommen werden müssten.

Die Grundimmunisierung von gesunden Probanden mit zwei Dosen des Impfstoffes BNT162b2 ging mit 95 %iger Wirksamkeit gegen eine *Covid-19*-Erkrankung einher [115]. Aus der COVE-Studie ging hervor, dass ein durch den Impfstoff *mRNA-1273* bei den Patienten erzielter Neutralisationstiter (50 %) von 10, 100, 1000 zu einer Vorbeugung der Infektion zu 78 %, 91 % und 96 % führte [116]. Die Validierung von Titergrenzwerten, die mit einem wirksamen Schutz vor einer Infektion mit *SARS-CoV-2* bei Patienten nach alloHSZT einhergehen, sollte in zukünftigen Studien erfolgen, um eine Handlungsempfehlung für den klinischen Alltag aussprechen zu können.

Als Limitation unserer Studie ist hier anzumerken, dass wir keine Aussage über die Antikörperreaktion nach einer *Booster*-Impfung machen können, da wir Patienten nach der Grundimmunisierung im Jahr 2021 einschlossen, als noch keine Indikation oder Empfehlung für eine *Booster*-Impfung bestand. Beitrag dieser Arbeit war vielmehr, eine Indikation für eine *Booster*-Impfung, basierend auf der Analyse der Antikörpertiter und des beobachteten Titerabfalles, stellen zu können.

5 Literaturverzeichnis

1. Zhu, N., et al., *A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019*. N Engl J Med, 2020. **382**(8): p. 727-733.
2. Kuderer, N.M., et al., *Clinical impact of COVID-19 on patients with cancer (CCC19): a cohort study*. The Lancet, 2020. **395**(10241): p. 1907-1918.
3. Isidori, A., et al., *Management of Patients With Hematologic Malignancies During the COVID-19 Pandemic: Practical Considerations and Lessons to Be Learned*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 1439.
4. Dhakal, B., et al., *Response to SARS-CoV-2 vaccination in patients after hematopoietic cell transplantation and CAR T-cell therapy*. Blood, 2021. **138**(14): p. 1278-1281.
5. Sharma, A., et al., *Clinical characteristics and outcomes of COVID-19 in haematopoietic stem-cell transplantation recipients: an observational cohort study*. Lancet Haematol, 2021. **8**(3): p. e185-e193.
6. Wood, W.A., et al., *Outcomes of patients with hematologic malignancies and COVID-19: a report from the ASH Research Collaborative Data Hub*. Blood Adv, 2020. **4**(23): p. 5966-5975.
7. Carreras, D., Mohty, Kröger, <2019_Book_TheEBMTHandbook.pdf>. 2019.
8. Storek, J., et al., *Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans*. Semin Immunopathol, 2008. **30**(4): p. 425-37.
9. Galmiche, S., et al., *Immunological and clinical efficacy of COVID-19 vaccines in immunocompromised populations: a systematic review*. Clin Microbiol Infect, 2022. **28**(2): p. 163-177.
10. Xhaard, A., et al., *Risk factors for a severe form of COVID-19 after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: a Societe Francophone de Greffe de Moelle et de Therapie cellulaire (SFGM-TC) multicentre cohort study*. Br J Haematol, 2021. **192**(5): p. e121-e124.
11. Sakuraba, A., A. Luna, and D. Micic, *Serologic response following SARS-COV2 vaccination in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis*. J Hematol Oncol, 2022. **15**(1): p. 15.
12. Cesaro, S., et al., *Recommendations for the management of COVID-19 in patients with haematological malignancies or haematopoietic cell transplantation, from the 2021 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 9)*. Leukemia, 2022. **36**(6): p. 1467-1480.
13. Chiarucci, M., et al., *Immunological Response Against SARS-COV-2 After BNT162b2 Vaccine Administration Is Impaired in Allogeneic but Not in Autologous Stem Cell Transplant Recipients*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 737300.
14. Prof. Georg Löffler, P.P.E.P., *Biochemie und Pathobiochemie*. 2014, 9. Auflage, Springer-Verlag: Peter C. Heinrich, Matthias Müller, Lutz Graeve. 900 ff.
15. Thoma, M.D., et al., *Peripheral blood lymphocyte and monocyte recovery and survival in acute leukemia postmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplant*. Biol Blood Marrow Transplant, 2012. **18**(4): p. 600-7.
16. Kim, H.T., et al., *Absolute lymphocyte count recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts clinical outcome*. Biol Blood Marrow Transplant, 2015. **21**(5): p. 873-80.
17. Ogonek, J., et al., *Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 507.
18. Mehta, R.S. and K. Rezvani, *Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection*. Virulence, 2016. **7**(8): p. 901-916.
19. Auletta, J.J. and H.M. Lazarus, *Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target*. Bone Marrow Transplant, 2005. **35**(9): p. 835-57.
20. Krenger, W., B.R. Blazar, and G.A. Hollander, *Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation*. Blood, 2011. **117**(25): p. 6768-76.
21. Bosch, M., F.M. Khan, and J. Storek, *Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation*. Curr Opin Hematol, 2012. **19**(4): p. 324-35.

22. Sahin, U., et al., *An overview of infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. J Infect Chemother, 2016. **22**(8): p. 505-14.
23. Jagasia, M.H., et al., *National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report*. Biol Blood Marrow Transplant, 2015. **21**(3): p. 389-401 e1.
24. Laws, H.-J., <Laws2020_Article_ImpfenBeilmmundefizienz.pdf>. 2020.
25. RKI. SARS-CoV-2: Virologische Basisdaten sowie Virusvarianten im Zeitraum 2020-2022. 2023 21.09.2023; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Virologische_Basisdaten.html.
26. WHO. *Historical working definitions and primary actions for SARS-CoV-2 variants*. 2023 15.03.2023; Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/historical-working-definitions-and-primary-actions-for-sars-cov-2-variants>.
27. WHO. *Updated working definitions and primary actions for SARS-CoV-2 variants*. 2023 04.10.2023; Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/updated-working-definitions-and-primary-actions-for-sars-cov-2-variants>.
28. Jackson, C.B., et al., *Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022. **23**(1): p. 3-20.
29. V'Kovski, P., et al., *Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2*. Nat Rev Microbiol, 2021. **19**(3): p. 155-170.
30. Ziegler, C.G.K., et al., *SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues*. Cell, 2020. **181**(5): p. 1016-1035 e19.
31. Kluge, <113-001LGI_S3_Empfehlungen-zur-stationaeren-Therapie-von-Patienten-mit-COVID-19_2023-03.pdf>. 2023.
32. RKI. STIKO: 25. Aktualisierung der COVID-19-Impfempfehlung. 2023; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2023/Ausgaben/08_23.pdf?__blob=publicationFile.
33. Primorac, D., et al., *Adaptive Immune Responses and Immunity to SARS-CoV-2*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 848582.
34. BioNTech/Pfizer. <comirnaty-epar-product-information_en.pdf>. [cited 2022; Available from: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2021/20211103153695/anx_153695_de.pdf.
35. Li, C., et al., *Mechanisms of innate and adaptive immunity to the Pfizer-BioNTech BNT162b2 vaccine*. Nat Immunol, 2022. **23**(4): p. 543-555.
36. Verbeke, R., et al., *Innate immune mechanisms of mRNA vaccines*. Immunity, 2022. **55**(11): p. 1993-2005.
37. Arunachalam, P.S., et al., *Systems vaccinology of the BNT162b2 mRNA vaccine in humans*. Nature, 2021. **596**(7872): p. 410-416.
38. Galani, I.E., et al., *Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison*. Nat Immunol, 2021. **22**(1): p. 32-40.
39. Schenkelberg, T., *Vaccine-induced protection in aging adults and pandemic response*. Biochemical and biophysical research communications, 2021. **538**: p. 218-220.
40. Quach, H.Q. and R.B. Kennedy, *Enhancing Immunogenicity of Influenza Vaccine in the Elderly through Intradermal Vaccination: A Literature Analysis*. Viruses, 2022. **14**(11).
41. Wang, Y., et al., *Immunosenescence, aging and successful aging*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 942796.
42. Barros-Martins, J., et al., *Immune responses against SARS-CoV-2 variants after heterologous and homologous ChAdOx1 nCoV-19/BNT162b2 vaccination*. Nat Med, 2021. **27**(9): p. 1525-1529.
43. Shem-Tov, N., et al., *Immunogenicity and safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in haematopoietic stem cell transplantation recipients*. Br J Haematol, 2022. **196**(4): p. 884-891.

44. Rotshild, V., et al., *Comparing the clinical efficacy of COVID-19 vaccines: a systematic review and network meta-analysis*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 22777.
45. Muller, L., et al., *Age-dependent immune response to the Biontech/Pfizer BNT162b2 COVID-19 vaccination*. Clin Infect Dis, 2021.
46. Muller, L., et al., *Adjusted COVID-19 booster schedules balance age-dependent differences in antibody titers benefitting risk populations*. Front Aging, 2022. **3**: p. 1027885.
47. Müller, L., et al., *Sensitivity of anti-SARS-CoV-2 serological assays in a high-prevalence setting*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2021. **40**(5): p. 1063-1071.
48. DiaSorin, <EUA-Diasorin-igg-ifu.pdf> LIAISON[®] SARS-CoV-2 S1/S2 IgG ([REF] 311460). 2021.
49. Qi, H., et al., *The humoral response and antibodies against SARS-CoV-2 infection*. Nat Immunol, 2022. **23**(7): p. 1008-1020.
50. Pagano, L., et al., *COVID-19 infection in adult patients with hematological malignancies: a European Hematology Association Survey (EPICOVIDEHA)*. J Hematol Oncol, 2021. **14**(1): p. 168.
51. Schaffrath, J., et al., *High Mortality of COVID-19 Early after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Retrospective Multicenter Analysis on Behalf of the German Cooperative Transplant Study Group*. Transplant Cell Ther, 2022. **28**(6): p. 337 e1-337 e10.
52. Piñana, J.L., et al., *SARS-CoV-2-reactive antibody detection after SARS-CoV-2 vaccination in hematopoietic stem cell transplant recipients: Prospective survey from the Spanish Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cell Therapy Group*. Am J Hematol, 2021.
53. Canti, L., et al., *Predictors of neutralizing antibody response to BNT162b2 vaccination in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients*. J Hematol Oncol, 2021. **14**(1): p. 174.
54. Atanackovic, D., et al., *Anti-SARS-CoV-2 Immune Responses in Patients Receiving an Allogeneic Stem Cell or Organ Transplant*. Vaccines (Basel), 2021. **9**(7).
55. Redjoul, R., et al., *Antibody response after second BNT162b2 dose in allogeneic HSCT recipients*. Lancet, 2021. **398**(10297): p. 298-299.
56. Shields, A.M., et al., *Increased Seroprevalence and Improved Antibody Responses Following Third Primary SARS-CoV-2 Immunisation: An Update From the COV-AD Study*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 912571.
57. Meyer, T., et al., *Cellular and Humoral SARS-CoV-2 Vaccination Responses in 192 Adult Recipients of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation*. Vaccines (Basel), 2022. **10**(11).
58. Barkhordar, M., et al., *Three doses of a recombinant conjugated SARS-CoV-2 vaccine early after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: predicting indicators of a high serologic response-a prospective, single-arm study*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1169666.
59. Cuapio, A., et al., *NK cell frequencies, function and correlates to vaccine outcome in BNT162b2 mRNA anti-SARS-CoV-2 vaccinated healthy and immunocompromised individuals*. Mol Med, 2022. **28**(1): p. 20.
60. Takano, T., et al., *Distinct immune cell dynamics correlate with the immunogenicity and reactogenicity of SARS-CoV-2 mRNA vaccine*. Cell Rep Med, 2022. **3**(5): p. 100631.
61. Schramm, C.A., et al., *Interaction dynamics between innate and adaptive immune cells responding to SARS-CoV-2 vaccination in non-human primates*. Nat Commun, 2023. **14**(1): p. 7961.
62. Pabst, C., et al., *Humoral Responses and Chronic GVHD Exacerbation after COVID-19 Vaccination Post Allogeneic Stem Cell Transplantation*. Vaccines (Basel), 2022. **10**(2).
63. Mamez, A.C., et al., *Antibody responses to SARS-CoV2 vaccination in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients*. Bone Marrow Transplant, 2021. **56**(12): p. 3094-3096.
64. Maillard, A., et al., *Antibody response after 2 and 3 doses of SARS-CoV-2 mRNA vaccine in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients*. Blood, 2022. **139**(1): p. 134-137.

65. Janssen, M.J.M., et al., *Predictive factors for vaccine failure to guide vaccination in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients*. Bone Marrow Transplant, 2021. **56**(12): p. 2922-2928.
66. Leclerc, M., et al., *Determinants of SARS-CoV-2 waning immunity in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients*. J Hematol Oncol, 2022. **15**(1): p. 27.
67. Harrington, P., et al., *Third-dose SARS-CoV-2 mRNA vaccine increases Omicron variant neutralisation in patients with chronic myeloid disorders*. Blood Adv, 2022.
68. Piñana, J.L., et al., *SARS-CoV-2-reactive antibody waning, booster effect and breakthrough SARS-CoV-2 infection in hematopoietic stem cell transplant and cell therapy recipients at one year after vaccination*. Bone Marrow Transplant, 2023. **58**(5): p. 567-580.
69. Minehart, J.C., et al., *Incidence and Predictors of Sars-Cov-2 Antibody Responses Following COVID-19 Vaccination in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients*. Blood, 2021. **138**(Supplement 1): p. 2888-2888.
70. Maillard, A., et al., *Antibody Response to 2-Dose Sars-Cov-2 mRNA Vaccine in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplant Recipients*. Blood, 2021. **138**(Supplement 1): p. 336-336.
71. Liebers, N., et al., *Humoral and cellular responses after COVID-19 vaccination in anti-CD20-treated lymphoma patients*. Blood, 2022. **139**(1): p. 142-147.
72. Clemenceau, B., et al., *SARS-CoV-2 T-Cell Responses in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Recipients following Two Doses of BNT162b2 mRNA Vaccine*. Vaccines (Basel), 2022. **10**(3).
73. GeurtsvanKessel, C.H., et al., *Divergent SARS-CoV-2 Omicron-reactive T and B cell responses in COVID-19 vaccine recipients*. Sci Immunol, 2022. **7**(69): p. eabo2202.
74. Woldemeskel, B.A., C.C. Garliss, and J.N. Blankson, *SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce broad CD4+ T cell responses that recognize SARS-CoV-2 variants and HCoV-NL63*. J Clin Invest, 2021. **131**(10).
75. Ou, X., et al., *Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 1620.
76. Le Bert, N., et al., *SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls*. Nature, 2020. **584**(7821): p. 457-462.
77. Beerlage, A., et al., *Antibody response to mRNA SARS-CoV-2 vaccination in 182 patients after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Transpl Infect Dis, 2022. **24**(3): p. e13828.
78. Canti, L., et al., *Predictors of neutralizing antibody response to BNT162b2 vaccination in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients*. J Hematol Oncol, 2021. **14**(1): p. 174.
79. Guidelines, E. <COVID vaccines version 8.3 - 2022-01-03.pdf>. 2022; Available from: <https://www.ebmt.org/sites/default/files/2022-01/COVID%20vaccines%20version%208.3%20-%202022-01-03.pdf>.
80. Maneikis, K., et al., *Immunogenicity of the BNT162b2 COVID-19 mRNA vaccine and early clinical outcomes in patients with haematological malignancies in Lithuania: a national prospective cohort study*. Lancet Haematol, 2021. **8**(8): p. e583-e592.
81. Noori, M., et al., *A systematic review and meta-analysis of immune response against first and second doses of SARS-CoV-2 vaccines in adult patients with hematological malignancies*. Int Immunopharmacol, 2022. **110**: p. 109046.
82. Avivi, I., et al., *Humoral response rate and predictors of response to BNT162b2 mRNA COVID19 vaccine in patients with multiple myeloma*. Br J Haematol, 2021. **195**(2): p. 186-193.
83. Untersmayr, E., et al., *Immunologically relevant aspects of the new COVID-19 vaccines-an OGA (Austrian Society for Allergology and Immunology) and AeDA (German Society for Applied Allergology) position paper*. Allergo J Int, 2021. **30**(5): p. 155-168.
84. Torfadottir, H., et al., *Evidence for extrathymic T cell maturation after thymectomy in infancy*. Clin Exp Immunol, 2006. **145**(3): p. 407-12.
85. McClory, S., et al., *Evidence for a stepwise program of extrathymic T cell development within the human tonsil*. J Clin Invest, 2012. **122**(4): p. 1403-15.
86. Ljungman, P., et al., *COVID-19 and stem cell transplantation; results from an EBMT and GETH multicenter prospective survey*. Leukemia, 2021. **35**(10): p. 2885-2894.

87. Henig, I., et al., *Third BNT162b2 mRNA SARS-CoV-2 Vaccine Dose Significantly Enhances Immunogenicity in Recipients of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Vaccines (Basel), 2023. **11**(4).
88. Bechmann, N., et al., *Sexual dimorphism in COVID-19: potential clinical and public health implications*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2022. **10**(3): p. 221-230.
89. Hütter-Krönke, M.L., et al., *Risk factors and characteristics influencing humoral response to COVID-19 vaccination in patients after allogeneic stem cell transplantation*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1174289.
90. Naaber, P., et al., *Dynamics of antibody response to BNT162b2 vaccine after six months: a longitudinal prospective study*. Lancet Reg Health Eur, 2021. **10**: p. 100208.
91. Bordat, J., S. Maury, and M. Leclerc, *Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the COVID-19 era*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1100468.
92. Thomas, S.J., et al., *Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine through 6 Months*. N Engl J Med, 2021. **385**(19): p. 1761-1773.
93. Ahmed-Belkacem, A., et al., *Third Early "Booster" Dose Strategy in France of bnt162b2 SARS-CoV-2 Vaccine in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients Enhances Neutralizing Antibody Responses*. Viruses, 2022. **14**(9).
94. Tamari, R., et al., *Predictors of Humoral Response to SARS-CoV-2 Vaccination after Hematopoietic Cell Transplantation and CAR T-cell Therapy*. Blood Cancer Discov, 2021. **2**(6): p. 577-585.
95. RKI. *Aktualisierung der COVID-19-Impfempfehlung in den allgemeinen Empfehlungen der STIKO 2024*. 2024 06.02.2024]; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2024/Ausgaben/02_24.pdf?__blob=publicationFile.
96. Huang, A., et al., *Antibody Response to SARS-CoV-2 Vaccination in Patients following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation*. Transplant Cell Ther, 2022. **28**(4): p. 214.e1-214.e11.
97. Kimura, M., et al., *Safety and Immunogenicity After a Three-Dose SARS-CoV-2 Vaccine Schedule in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients*. Transplant Cell Ther, 2022. **28**(10): p. 706.e1-706.e10.
98. Arbel, R., et al., *BNT162b2 Vaccine Booster and Mortality Due to Covid-19*. N Engl J Med, 2021. **385**(26): p. 2413-2420.
99. Toya, T., et al., *Attenuated humoral response against SARS-CoV-2 mRNA vaccination in allogeneic stem cell transplantation recipients*. Cancer Sci, 2023. **114**(2): p. 586-595.
100. Ljungman, P., et al., *Improved outcomes over time and higher mortality in CMV seropositive allogeneic stem cell transplantation patients with COVID-19; An infectious disease working party study from the European Society for Blood and Marrow Transplantation registry*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1125824.
101. Redjoul, R., et al., *Antibody response after third BNT162b2 dose in recipients of allogeneic HSCT*. Lancet Haematol, 2021. **8**(10): p. e681-e683.
102. Le Bourgeois, A., et al., *Interest of a third dose of BNT162b2 anti-SARS-CoV-2 messenger RNA vaccine after allotransplant*. Br J Haematol, 2022. **196**(5): p. e38-e40.
103. Telenti, A., E.B. Hodcroft, and D.L. Robertson, *The Evolution and Biology of SARS-CoV-2 Variants*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2022. **12**(5).
104. Sahin, U., et al., *BNT162b2 vaccine induces neutralizing antibodies and poly-specific T cells in humans*. Nature, 2021. **595**(7868): p. 572-577.
105. Cele, S., et al., *Omicron extensively but incompletely escapes Pfizer BNT162b2 neutralization*. Nature, 2022. **602**(7898): p. 654-656.
106. Garcia-Beltran, W.F., et al., *mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant*. Cell, 2022. **185**(3): p. 457-466.e4.
107. Wang, Q., et al., *Alarming antibody evasion properties of rising SARS-CoV-2 BQ and XBB subvariants*. Cell, 2023. **186**(2): p. 279-286.e8.

108. Oltolini, C., et al., *Case Report: Favorable outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in SARSCoV2 positive recipient, risk-benefit balance between infection and leukemia*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1184956.
109. Baldi, F., et al., *Case report: Sotrovimab, remdesivir and nirmatrelvir/ritonavir combination as salvage treatment option in two immunocompromised patients hospitalized for COVID-19*. Front Med (Lausanne), 2022. **9**: p. 1062450.
110. Müller, T.R., et al., *Additive effects of booster mRNA vaccination and SARS-CoV-2 Omicron infection on T cell immunity across immunocompromised states*. Sci Transl Med, 2023. **15**(704): p. eadg9452.
111. Guidelines, E. *EBMT Infectious Diseases Working Party Recommendations regarding pre-therapy positivity for SARS-CoV-2*. 2024 11.01.2024; Available from: <https://www.ebmt.org/sites/default/files/2024-01/%282024-01-11%29%20IDWP%20recommendations%20pre-therapy%20SARS-CoV-2%20patients%20FINAL.pdf>.
112. Skowronski, D.M., et al., *Two-Dose Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Vaccine Effectiveness With Mixed Schedules and Extended Dosing Intervals: Test-Negative Design Studies From British Columbia and Quebec, Canada*. Clin Infect Dis, 2022. **75**(11): p. 1980-1992.
113. Amirthalingam, G., et al., *Serological responses and vaccine effectiveness for extended COVID-19 vaccine schedules in England*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 7217.
114. Wei, J., et al., *Antibody responses and correlates of protection in the general population after two doses of the ChAdOx1 or BNT162b2 vaccines*. Nat Med, 2022. **28**(5): p. 1072-1082.
115. Polack, F.P., et al., *Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine*. N Engl J Med, 2020. **383**(27): p. 2603-2615.
116. Gilbert, P.B., et al., *Immune correlates analysis of the mRNA-1273 COVID-19 vaccine efficacy clinical trial*. Science, 2022. **375**(6576): p. 43-50.

6 Anhang

Patientenfragebogen zur ASR-Studie

Datum: _____

Antikörper- Seroprävalenz und Immunantworten gegen eine SARS-CoV2 Impfung bei Patienten nach allogener Blutstammzelltransplantation

Ich, _____ bin in den letzten 3 Monaten gegen SARS-CoV2 geimpft worden, und zwar mit dem Impfstoff der Firma _____.

Die **erste** Impfung war am _____

Und erfolgte in den

☐ rechten Oberarm

☐ linken Oberarm

☐ weiß nicht mehr

Die **zweite** Impfung war am _____

Und erfolgte in den

☐ rechten Oberarm

☐ linken Oberarm

☐ weiß nicht mehr

Ich hatte folgende Nebenwirkungen

1. Impfung

2. Impfung

Schmerzen an der Impfstelle

☐

☐

Kopfschmerzen

☐

☐

Gliederschmerzen

☐

☐

Fieber

☐

☐

Schüttelfrost

☐

☐

Müdigkeit

☐

☐

Schwäche

☐

☐

Sonstiges, und zwar _____

☐

☐

Ich erinnere **keine** Nebenwirkungen

☐

☐

Aufklärungsbogen über den Studienablauf und Datenschutz

Universitätsklinikum Düsseldorf

Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie

Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie

Institut für Virologie

Version 1.0 vom 20.5.2021

Probandenaufklärung und -einverständnis zur Studie:

Antikörper- Seroprävalenz und Immunantworten gegen eine SARS-CoV2 Impfung bei Patienten nach allogener Blutstammzelltransplantation

Sehr geehrte Dame, sehr geehrter Herr,

im Rahmen der oben genannten Untersuchung möchten wir Sie darum bitten, uns für die o.g. wissenschaftliche Untersuchung eine Menge von jeweils 15 ml Blut (entspricht ca. 2,5 Esslöffeln) zur Verfügung zu stellen. Dies sind nur etwa 0,2% der im Körper vorhandenen Blutmenge. Es ist somit kein Nachteil für Ihre Gesundheit zu erwarten. Die Entnahme wird durch einen Arzt oder eine medizinische Fachkraft mit Erfahrung in der Blutabnahme unter ärztlicher Aufsicht durchgeführt.

Wir möchten anhand der Blutprobe im Labor untersuchen, wie Ihr Immunsystem auf die COVID-19-Impfungen reagiert. Dazu sind bei Patienten nach allogener Blutstammzelltransplantation noch nicht viele Daten bekannt. Möglicherweise können wir durch diese Untersuchung dazu beitragen, dass die Impfungen für Patienten nach allogener Blutstammzelltransplantation weiter verbessert werden können.

Wenn Sie persönlich Ihren Antikörpertiter mitgeteilt bekommen möchten, so kreuzen Sie dies bitte bei der Einverständniserklärung an. Wir weisen jedoch ausdrücklich darauf hin, dass noch nicht bekannt ist ab welchem Titer ein Schutz gegen eine COVID-19 Infektion oder Erkrankung besteht. Auch ein hoher Titer entbindet Sie deshalb nicht von den empfohlenen Schutzmaßnahmen.

Wir gewinnen für diese Untersuchungen zu mindestens zwei Zeitpunkten Serum aus ihrem Blut, um dieses mittels verschiedener Antikörpertests zu untersuchen.

Gleichzeitig soll auch die Menge an speziellen Lymphozyten im Blut untersucht werden.

Ihr Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie und der Nutzung der bei Ihnen gewonnenen Daten zur Forschung ist selbstverständlich freiwillig. Sie können das Einverständnis jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen, ohne dass Ihnen dadurch Nachteile entstehen. Wenn Sie Ihre Zustimmung später widerrufen, wird die für Forschungszwecke entnommene Blutmenge vernichtet und erhobene Daten werden dauerhaft gelöscht.

Risiken der Blutentnahme

Bei der Entnahme von 15 ml Blut aus der Unterarmvene oder der Handvene ist das zu erwartende Risiko äußerst gering. Daher wurde keine verschuldensunabhängige Probandenversicherung für diese Untersuchung abgeschlossen.

Zu den Risiken der Blutabnahme gehört das Entstehen blauer Flecken im Bereich der Einstichstelle sowie längere Nachblutungen, wenn Sie unter einer antikoagulativen (blutverdünnenden) Therapie stehen. Es besteht das sehr geringe Risiko einer lokalen oder allgemeinen Infektion. In extrem seltenen Fällen kann es zu einer Verletzung eines Nerven, evtl. sogar mit chronischem Verlauf, kommen. Die Blutabnahme erfolgt an der Ihnen bekannten Stelle in der KMT-Ambulanz. Wir möchten Sie ausdrücklich darauf hinweisen, dass keine zusätzliche studienbedingte Wegeversicherung für etwaige Unfälle besteht, die sich auf dem Weg zur Klinik oder auf dem Heimweg ereignen, wenn Sie ausschließlich zum Zweck der Studienblutabnahme in die KMT Ambulanz kommen sollten. Mit Ihrer Unterschrift erklären Sie sich hiermit einverstanden.

Vertraulichkeit der Daten / Datenschutz

Alle im Rahmen der Untersuchung erhobenen personenbezogenen Daten werden entsprechend der ärztlichen Schweigepflicht und den gesetzlichen Bestimmungen des Datenschutzes vertraulich behandelt. Die Speicherung und wissenschaftliche Auswertung des Datenmaterials erfolgt pseudonymisiert, d.h. ohne Angabe Ihres Namens (siehe Einwilligungserklärung zum Datenschutz). Die erhobenen Daten werden nach zehn Jahren dauerhaft gelöscht.

Informationen zum Datenschutz

Während dieser Studie werden medizinische Befunde und persönliche Informationen (z.B. Alter, Geschlecht, Nationalität, Vorerkrankungen) von Ihnen erhoben und in der Studienzentrale in gesicherten Akten und elektronisch gespeichert. Rechtsgrundlage für die Verarbeitung ist Ihre freiwillige und ausdrückliche Einwilligung im Sinne des Art. 6 Abs. 1 S.1 lit. a, 9 Abs. 2 lit. a DSGVO.

Die für die Studie wichtigen Daten werden in pseudonymisierter Form gespeichert und ausgewertet. Pseudonymisierung bedeutet, dass Ihr Name oder andere Identifikationsmerkmale durch einen Code ersetzt werden, um die Feststellung Ihrer Identität auszuschließen oder wesentlich zu erschweren. Dieser „Schlüssel“ (Verbindung zwischen Ihrem Namen bzw. Ihren Identifikationsmerkmalen und dem Code) wird getrennt von Ihren übrigen Befunden oder Informationen aufbewahrt. Zugang zu dem Schlüssel hat ausschließlich autorisiertes Personal der Studienzentrale am Institut für Medizinische Soziologie.

Die ärztliche Schweigepflicht und datenschutzrechtliche Bestimmungen werden eingehalten. Die Studienleitung wird alle angemessenen Schritte unternehmen, um den Schutz Ihrer Daten gemäß den Datenschutzstandards der Europäischen Union zu gewährleisten. Die Daten sind gegen unbefugten Zugriff gesichert. Eine Entschlüsselung erfolgt nur bei einem Rücktritt von der Studie zum Zweck der Datenvernichtung. Die während der Studie erhobenen Daten werden 10 Jahre aufbewahrt und anschließend gelöscht. Die Daten werden ausschließlich zu Zwecken dieser Studie verwendet. Wir weisen darauf hin, dass bereits anonymisierte Daten und Daten, die in

wissenschaftliche Auswertungen eingeflossen sind, nicht mehr auf Wunsch gelöscht werden können. Die von Ihnen unterschriebene Einwilligungserklärung sowie der Fragebogen werden zehn Jahre nach Studienende gespeichert. Nach Ablauf dieser Frist werden die Dokumente vernichtet.

Gegebenenfalls werden die Ergebnisse dieses Forschungsprojekts auch in wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlicht. Auch dies erfolgt in vollständig anonymisierter Form, das bedeutet, ohne die Möglichkeit für Rückschlüsse auf Ihre Identität. Ihr Name wird in keinem Bericht erwähnt oder auf sonstigem Wege veröffentlicht. Der Verantwortliche für die studienbedingte Verarbeitung personenbezogener Daten ist der Studienleiter: Prof. Dr. med Guido Kobbe in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf / Universitätsklinikum Düsseldorf, Universitätsstraße 1 40225 Düsseldorf. Email: kobbe@med.uni-duesseldorf.de.

Sie können als betroffene Person jederzeit die Ihnen durch die EU-DSGVO gewährten Rechte geltend machen:

- das Recht auf Auskunft, ob und welche Daten von Ihnen verarbeitet werden (Art. 15 EU-DSGVO),
- das Recht, die Berichtigung oder Vervollständigung der Sie betreffenden Daten zu verlangen (Art. 16 EU-DSGVO),
- das Recht auf Löschung der Sie betreffenden Daten nach Maßgabe des Art. 17 EU-DSGVO,
- das Recht, nach Maßgabe des Art. 18 EU-DSGVO eine Einschränkung der Verarbeitung der Daten zu verlangen,
- das Recht eine erteilte Einwilligung jederzeit zu widerrufen. Die Rechtmäßigkeit der aufgrund der Einwilligung bis zum Widerruf erfolgten Verarbeitung wird dadurch nicht berührt (Art. 7 Abs. 3 EU-DSGVO),
- das Recht auf Widerspruch gegen eine künftige Verarbeitung der Sie betreffenden Daten nach Maßgabe des Art. 21 EU-DSGVO.

Bei Anliegen, Fragen oder Beschwerden zur Datenverarbeitung und zur Einhaltung der datenschutzrechtlichen Anforderungen wenden Sie sich bitte zunächst an den Studienleiter (Kontaktdaten siehe oben). Für weiterführende Fragen oder bei Problemen bzgl. des Datenschutzes können Sie sich an folgende Stellen wenden: Datenschutzbeauftragte/r der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf datenschutzbeauftragter@hhu.de

Im Falle einer rechtswidrigen Datenverarbeitung haben Sie das Recht, sich bei der Aufsichtsbehörde zu beschweren: Landesbeauftragte für Datenschutz und Informationsfreiheit Nordrhein-Westfalen Postfach: 20 04 44, 40102 Düsseldorf E-Mail: poststelle@ldi.nrw.de

Düsseldorf, im Mai 2021
Prof. Dr. med. Guido Kobbe
Universitätsklinikum Düsseldorf
Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie
Tel: 0211 81 17720

Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der Studie: Antikörper-Seroprävalenz und Immunantworten gegen eine SARS-CoV2 Impfung bei Patienten nach allogener Blutstammzelltransplantation

Ich, _____, habe die o.g.

Probandeninformation

gelesen und mit _____ über die geplante Studie gesprochen. Meine Fragen wurden ausreichend beantwortet. Ich bin mit der Teilnahme an der Untersuchung einverstanden.

Ich möchte das Ergebnis der Titerbestimmung mitgeteilt bekommen

☐ ja

☐ nein

Datum/Unterschrift:

Datum/Unterschrift aufklärender Arzt:

**Einwilligungserklärung zum Datenschutz (Probanden):
Antikörper- Seroprävalenz und Immunantworten gegen eine SARS-
CoV2 Impfung bei Patienten nach allogener
Blutstammzelltransplantation**

Mir ist bekannt und ich willige ein, dass bei dieser Studie personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde, über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der Studie folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus, d.h. ohne die nachfolgende Einwilligung kann ich nicht an der Studie teilnehmen.

Einwilligungserklärung zum Datenschutz

- 1) Ich willige ein, dass im Rahmen dieser Studie erhobene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, erhoben, in Papierform oder auf elektronischen Datenträgern bei/in Institut für Virologie pseudonymisiert (verschlüsselt) aufgezeichnet und gespeichert werden. Ein Personenbezug ist damit für Dritte nicht mehr herstellbar.
- 2) Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich meine Einwilligung in die Aufzeichnung, Speicherung und Verwendung meiner Daten jederzeit widerrufen kann. Bei einem Widerruf werden meine Daten unverzüglich gelöscht.
- 3) Ich willige ein, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Studie 10 Jahre lang aufbewahrt werden. Danach werden meine personenbezogenen Daten gelöscht, soweit dem nicht gesetzliche, satzungsgemäße oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.

Name Studienteilnehmer/in (Druckbuchstaben)

Datum

Unterschrift