

Cover Page



Universiteit Leiden

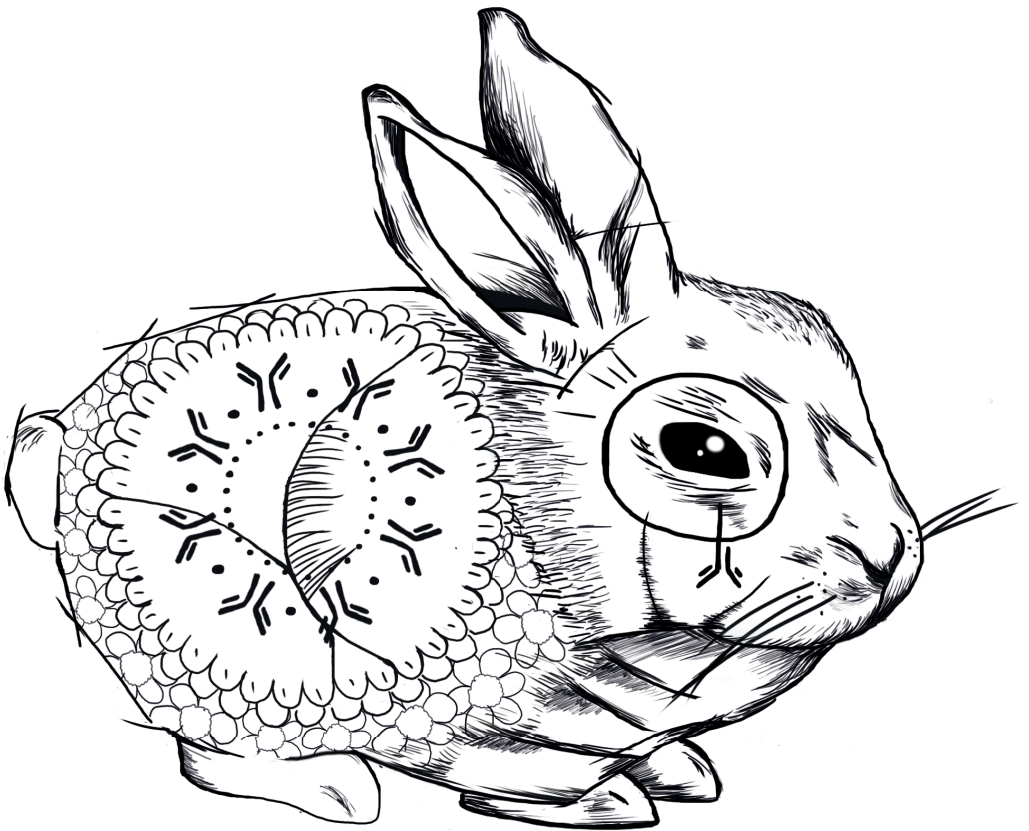


The handle <http://hdl.handle.net/1887/46717> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Admiraal, R.

**Title:** Individualized dosing of serotherapy in allogeneic hematopoietic cell transplantation - a delicate balance

**Issue Date:** 2017-03-15



# Chapter 13

---

**Nederlandse Samenvatting /Dutch Summary**



## GEÏNDIVIDUALISEERDE DOSERING VAN SEROTHERAPIE IN ALLOGENE HEMATOPOIETISCHE CELTRANSPLANTATIE – EEN DELICATE BALANS

### Deel I: Achtergrond en introductie

Allogene stamceltransplantatie (SCT) is een potentieel levensreddende behandeling voor ernstige ziektes waaronder leukemie, immuundeficiënties en beenmergfalen. Bij deze behandeling ontvangt de patiënt bloedstamcellen van een donor, welke vervolgens uitgroeien tot een gezond bloed- en afweersysteem. De bloedstamcellen zijn meestal afkomstig uit het beenmerg van een donor. Hiernaast kan navelstrengbloed van niet-gerelateerde donoren worden gebruikt. Dit zou normaliter weg worden gegooid. Een derde optie, voornamelijk gebruikt bij volwassenen, zijn gemobiliseerde en uit bloed gewonnen stamcellen. Voordat de nieuwe bloedstamcellen gegeven kunnen moet ruimte worden gemaakt in het beenmerg. Hiervoor ontvangen patiënten chemotherapie of lichaamsbestraling. Na de SCT kan een afweerreactie ontstaan vanuit de patiënt gericht tegen de donor (afstoting), of van de donor tegen de patiënt (transplantatieziekte). Om deze afweerreacties te voorkomen worden patiënten voor de transplantatie behandeld met serotherapie (anti-thymocyten globuline [ATG] of alemtuzumab). Het nadeel van serotherapie is dat het zowel de afweercellen van de ontvanger als van de donor vernietigt; dit laatste kan resulteren in matig tot geen afweerherstel na de transplantatie. Zonder deze afweercellen hebben patiënten een hoger risico op infecties en een eventueel recidief van de leukemie. De dosering serotherapie is dus cruciaal; te weinig kan leiden tot transplantatieziekte of relectie, te veel geeft slecht immuunherstel. De relatie tussen de dosering serotherapie en de concentraties in het bloed (farmacokinetiek; PK) is grotendeels onbekend en hoogst variabel. Hiernaast is ook de optimale blootstelling aan serotherapie (farmacodynamiek; PD) niet goed onderzocht. Het doel van deze thesis is het beschrijven van de PK en PD van ATG en alemtuzumab in kinderen en volwassenen teneinde een evidence based, geïndividualiseerde dosering te ontwikkelen voor beide middelen.

### Deel II: Farmacokinetiek van serotherapie

In de huidige praktijk worden beide middelen voor serotherapie rechtlijnig met lichaamsgewicht (in mg per kg) gedoseerd in zowel kinderen als volwassenen. Dit doseerregime impliceert dat de onderliggende farmacokinetische processen, bijvoorbeeld klaring en distributievolume, ook rechtlijnig toenemen met gewicht. Echter, doordat groei en ontwikkeling vaak niet rechtlijnig zijn met gewicht, leiden de rechtlijnige doseerregimes voor serotherapie tot onder- en overdosering in bepaalde patiëntengroepen. Hiernaast zijn ATG en alemtuzumab beide antilichamen, waarvan beschreven is dat de PK hoogst variabel kan zijn. Het is daarom belangrijk om de PK van serotherapie te beschrijven en zodoende een gelijke blootstelling te verkrijgen in alle patiënten. Een veel gebruikte techniek is het zogenaamde populatie PK/PD modelleren. Hiermee wordt in een model de PK en diens

relatie met de PD beschreven. Met deze modellen kan men op een geïnformeerde wijze een dosering berekenen om een zo optimaal mogelijk effect van behandeling te bereiken. In **hoofdstuk 2** wordt het concept van geïndividualiseerde dosering op basis van PK/PD modelleren verder besproken teneinde de behandeling te verbeteren.

In **hoofdstuk 3** wordt de populatie PK van ATG (Thymoglobulin) beschreven in een cohort van 267 patiënten (0.2-23 jaar oud) die een SCT hebben gekregen op de kinderafdeling van het Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMCU) en het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC). In meer dan 3000 bloedmonsters die zijn afgenomen tussen 2004 en 2012 is de ATG-concentratie bepaald, deze zijn gebruikt om een PK-model te ontwikkelen. Bijzonder aan dit model is de wijze van klaring van dit geneesmiddel. Deze vindt plaats door zowel normale (lineaire) klaring, zoals in de meeste geneesmiddelen wordt gezien, alsmede een verzadigbare klaring, die afhankelijk is van de concentratie ATG in het bloed. Bij hoge concentraties is deze component verzadigd en hierdoor weinig bijdragend, bij lagere concentraties speelt de verzadigbare klaring een relatief grotere rol. Vervolgens werden eventuele voorspellers van de PK geanalyseerd, welke een rol zullen spelen in de dosering van toekomstige patiënten. Lichaamsgewicht was een voorspeller van zowel lineaire klaring als verdelingsvolume, terwijl het aantal lymfocyten voor de eerste dosis ATG alleen de lineaire klaring beïnvloed. Dit laatste is te verklaren door het werkingsmechanisme van ATG: het bindt aan receptoren die voornamelijk op lymfocyten tot expressie komen waarna het uit de circulatie verdwijnt. Meer lymfocyten leidt dus tot een hoger aanbod van receptoren, waardoor meer ATG kan binden en de klaring sneller wordt. Met het finale model is de huidige dosering ATG bij kinderen geëvalueerd door middel van simulatiestudies. Hieruit blijkt dat kinderen met laag lichaamsgewicht (jonge kinderen) een significant lagere blootstelling aan ATG hebben vergeleken met zwaardere (oudere) kinderen. In een nieuw doseerregime, waarvoor dit PK-model de basis vormt, moet de dosis aangepast worden zodat alle kinderen gelijke blootstelling hebben.

De populatie PK van alemtuzumab in kinderen wordt beschreven in **hoofdstuk 4**. Voor deze analyse is data verzameld van 206 patiënten van 0.2 tot 19 jaar oud die een SCT op de kinderafdeling van het LUMC en het Great Ormond Street Hospital (GOSH) in Londen, Verenigd Koninkrijk, hebben gekregen. Het PK-model was structureel vergelijkbaar met dat van ATG; ook hier werden zowel lineaire klaring als verzadigbare klaring geïdentificeerd. Lichaamsgewicht was een voorspeller voor lineaire klaring en distributievolume, waarbij de relatie tussen gewicht en klaring werd beschreven met een zogenoemde lichaamsgewicht-afhankelijke exponent. Deze exponent maakt dat de relatie tussen gewicht en klaring een sigmoïdaal verband heeft waarmee de klaring in zowel kleinste kinderen als de adolescenten goed wordt voorspeld. Interessant genoeg was het aantal lymfocyten geen voorspeller voor de klaring van alemtuzumab.

### Deel III: Farmacodynamiek van serotherapie

Waar nadruk in de hoofdstukken 2, 3 en 4 voornamelijk lag op de relatie tussen dosis en blootstelling zullen hoofdstukken 5 tot en met 8 voornamelijk de relatie tussen blootstelling en klinische effecten beschrijven, de farmacodynamiek. Beschrijving van de farmacodynamiek werpt een licht op de therapeutische breedte. Dit zal de optimale benodigde blootstelling voor geïndividualiseerde dosering bepalen.

In **hoofdstuk 5** wordt de relatie tussen de blootstelling aan ATG en zowel immuunherstel als klinische uitkomsten wordt bestudeerd in een cohort van 251 patiënten die een eerste SCT ondergaan. In deze studie werden alle patiënten geïnccludeerd die behandeld werden op de kinderafdeling van het LUMC en UMCU. Met behulp van het PK-model werden diverse maten voor blootstelling berekend, waaronder de oppervlakte onder de concentratie-tijd grafiek (area under the curve; AUC). De AUC na de infusie van het transplantaat (AUC na SCT) was een sterke voorspeller voor immuunherstel van het afweersysteem, in het bijzonder een subset van zogenoemde T-cellen, de T-helper cellen. Deze cellen brengen het eiwit Cluster of Differentiation 4 (CD4) tot expressie, en worden dan ook CD4+ T-cellen genoemd.

De AUC na SCT had geen invloed op het optreden van transplantatieziekte. Herstel van CD4+ T-cellen was vervolgens een sterke voorspeller voor verbeterde overleving; het verminderde de kans op overlijden door zowel een recidief leukemie alsmede mortaliteit door de behandeling (infecties, transplantatieziekte, afstoting et cetera). In subgroepen werd een directe relatie tussen AUC na SCT en overleving gezien, waarbij de optimale AUC na SCT lager was bij patiënten die navelstrengbloed ontvingen in vergelijking met beenmerg.

De effectiviteit van ATG in het voorkomen van transplantatieziekte en afstoting werd voornamelijk bepaald door de blootstelling aan ATG vóór infusie van de stamcellen (AUC voor SCT), deze moest voldoende hoog zijn. Dit onderzoek toont aan dat de blootstelling aan ATG voornamelijk voor de SCT belangrijk is voor het farmacologisch effect, terwijl blootstellen aan ATG na de transplantatie nadelige effecten veroorzaakt. De optimale blootstelling die in deze studie werd aangetoond, gecombineerd met het PK-model uit hoofdstuk 2, hebben geleid tot een geïndividualiseerd doseerregime voor ATG in kinderen die op het moment wordt geëvalueerd.

De blootstelling van ATG lijkt meest belangrijk na een navelstrengbloed transplantatie, welke verder werd geanalyseerd in een groter cohort in **hoofdstuk 6**. Een cohort van 137 kinderen die een eerste SCT met navelstrengbloed ontvingen in het UMCU werd onderzocht, die een uniforme behandeling ondergingen wat betreft chemotherapie en ondersteunende behandeling als antibiotica. De optimale blootstelling aan ATG na de transplantatie lijkt iets lager dan wat voorgesteld werd in hoofdstuk 5, hogere blootstelling leidt tot langzaam of afwezig immuunherstel. Lage blootstelling na SCT leidt tot betere event free survival,

gedefinieerd als overleving zonder relapse of rejectie. Hiernaast werd ook het belang van CD4+ T-cel immuunherstel benadrukt: patiënten met immuunherstel hadden een betere overleving en event free survival, hiernaast was mortaliteit door zowel recidief leukemie alsmede de behandeling lager. Deze studie valideert de resultaten uit hoofdstuk 5.

**Hoofdstuk 7** beschrijft de farmacokinetiek en farmacodynamiek van ATG in 146 volwassen patiënten met acute leukemie die een perifeer bloed transplantatie ontvingen na milde chemotherapie in het UMC Utrecht. Eerst werd de farmacokinetiek beschreven, waarbij data van deze 146 patiënten werd gecombineerd met de pediatrische data uit hoofdstuk 3 en 81 volwassenen met andere diagnoses en/of intensieve chemotherapie. Dit PK-model kwam overeen met de resultaten zoals beschreven in hoofdstuk 2, waarbij slechts de parameterschattingen alsmede de wiskundige relatie tussen gewicht en lineaire klaring verschilde. In het kindermodel werd deze met een enkele exponent werd beschreven, terwijl in het gecombineerde model een lichaamsgewichts-afhankelijke exponent de beste beschrijving van de data gaf. De exponent bereikte een asymptoot van 0 vanaf een gewicht van 50 kg, wat bekend dat de lineaire klaring van ATG vanaf 50 kg niet toeneemt op basis van gewicht. Het aantal lymfocyten in het bloed voordat de eerste gift ATG wordt gegeven blijft echter de lineaire klaring beïnvloeden. Vervolgens werden diverse maten voor blootstelling aan ATG berekend met het PK-model welke werden gerelateerd aan klinische uitkomsten. De blootstelling aan ATG na de SCT (AUC na SCT) was een sterke voorspeller van overleving. Er lijkt een optimale blootstelling aan ATG na SCT te zijn bij deze patiëntengroep: te lage blootstelling resulteerde in hogere mortaliteit door de behandeling, terwijl te hoge blootstelling meer recidieven van leukemie tot gevolg had. Ook hadden patiënten met een te lage blootstelling veel transplantatieziekte, wat de verhoogde sterfte door de behandeling kan verklaren. Er werd geen optimale blootstelling voor de SCT gevonden, mogelijk doordat vrijwel alle patiënten een AUC voor SCT hadden die ruim boven het optimum zoals bepaald in hoofdstuk 5. Afsluitend werden diverse bestaande doseringsschema's voor ATG vergeleken op het behalen van optimale blootstelling. Hiernaast werd ook een nieuw doseerregime ontworpen en onderzoek dat gebaseerd is op het gecombineerde PK-model. Omdat de klaring niet toeneemt boven de 50 kg is dit doseerregime alleen gebaseerd op het lymfocytentotal, niet op gewicht. Van alle huidige doseerschema's, gebaseerd op een mg/kg dosering, behaalde slechts maximaal 30-53% van de patiëntengroepen de optimale blootstelling, terwijl dit voor het geïndividualiseerde regime op 93% lag. Dit geïndividualiseerde doseerregime voor ATG zou een verbetering in overleving van de behandeling kunnen bewerkstelligen.

Een recente publicatie beschreef een relatie tussen peri-transplantatie concentraties van alemtuzumab ( $\pm 3$  dagen) en de incidentie van GvHD en gemengd chimerisme<sup>1</sup>. In **hoofdstuk 8** wordt de therapeutische breedte en optimale blootstelling van alemtuzumab verkend



in een cohort van 176 kinderen die een stamceltransplantatie ondergaan in het LUMC in Leiden en Great Ormond Street Hospital in London. Alemtuzumab concentraties op de dag van transplantatie werden berekend met het PK-model uit hoofdstuk 4, en werden geëvalueerd als voorspeller voor klinische uitkomsten. Vergeleken met de eerdere studie, waar een alemtuzumab subcutaan en verder van de transplantatie werd gegeven, waren de concentraties alemtuzumab op de dag van transplantatie opvallend hoger. De incidentie van graad 2-4 en graad 3-4 acute GvHD werd beïnvloed door de concentratie alemtuzumab, er werd echter geen invloed op overleving, gemengd chimerisme, virale reactivaties of immuunherstel van T-cellen gevonden. Het ontbreken van een blootstelling-toxiciteit-relatie in combinatie met een matige blootstelling-effectiviteit-relatie zou kunnen wijzen op een relatieve overdosering in een groot deel van de patiënten wanneer intraveneuze alemtuzumab kort voor de stamceltransplantatie wordt gegeven.

#### **Deel IV: De rol van immuunherstel op klinische uitkomsten**

Zoals hierboven besproken leidt te hoge blootstelling aan ATG na de SCT tot vertraagd of afwezig immuunherstel. Hierdoor lopen patiënten verhoogd risico op een recidief leukemie en virale reactivaties, welke beiden een dodelijke afloop kunnen hebben. De hoofdstukken 9 en 10 beschrijven de rol van immuunherstel op een recidief van leukemie en virale reactivaties.

Vroeg herstel van CD4+ T-cellen na navelstrengbloedtransplantatie was een voorspeller van een recidief leukemie, echter alleen in acute myeloïde leukemie (AML). In acute lymfhoïde leukemie (ALL) werd geen relatie tussen immuunherstel en een recidief gevonden. De voorspellende waarde van slecht immuunherstel voor een recidief werd verder onderzocht in een groter cohort in **hoofdstuk 9**. Hier werden kinderen geïncludeerd die ATG hebben gekregen of geen serotherapie hadden gehad. In totaal bestond het cohort uit 87 kinderen die behandeld waren in het UMCU en GOSH, van wie 41% ATG had ontvangen. De overleving vrij van leukemie was significant lager in patiënten met CD4+ T-cel immuunherstel in AML, echter dit was niet het geval in ALL. De sterfte door de procedure was echter verminderd door immuunherstel in alle patiënten. Deze studie valideert de resultaten uit hoofdstuk 5.

In **hoofdstuk 10** worden virale reactivaties en geassocieerde uitkomsten onderzocht in het licht van immuunrestitutie in een cohort van 273 patiënten uit het UMCU. Virale reactivaties die bij gezonde mensen slechts milde griepachtige symptomen veroorzaken kunnen bij SCT-patiënten ernstige ziekte veroorzaken. In het eerste deel van dit onderzoek werd het immuunherstel van diverse afweercellen (CD3+, CD4+ en CD8+ T-cellen, B-cellen en NK-cellen) bekeken als voorspeller van virale reactivaties van adenovirus (AdV), Epstein-Barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV), humaan herpesvirus 6 (HHV6) en BK-virus

(BK). Herstel van CD4+ T-cellen voorspelde virale reactivaties; hogere cel-aantallen leidden tot minder reactivatie van AdV, EBV en HHV6. CMV en BK waren met geen enkele immuunherstel-marker geassocieerd. In de volgende stap werden virale reactivaties na SCT gerelateerd aan klinische uitkomsten. Hier bleek dat AdV een belangrijke voorspeller voor overlijden na SCT was. Echter, het nadelige effect van AdV op overleving wordt teniet gedaan door CD4+ immuunherstel: patiënten met AdV én CD4+ T-cel herstel hadden een vergelijkbare overleving als patiënten zonder AdV, terwijl patiënten met AdV zonder CD4+ herstel een slechte prognose hebben. De incidentie van transplantatieziekte was hoger na een EBV of HHV6 reactivatie, terwijl CMV en BK geen enkele klinische uitkomst beïnvloedden. Deze data ondersteunt het belang van CD4+ T-cel immuunherstel, zowel in het reduceren van de kans op virale reactivaties als in het voorkomen van virus-geassocieerde mortaliteit.

### **Deel V: Klinische implementatie van geïndividualiseerde dosering**

In **hoofdstuk 11** wordt een overzicht gegeven van het gebruik van geïndividualiseerde conditionering (chemotherapie en serotherapie) in navelstrengbloedtransplantaties. Hierbij ligt de nadruk op de huidige klinische uitkomsten, de behoeftes, en toekomstperspectieven van geïndividualiseerde behandeling in navelstrengbloedtransplantaties.

### **Deel VI: Conclusies en perspectieven**

Allogene stamceltransplantatie is een potentieel curatieve behandeling voor onder andere leukemie, afweerstoornissen, hematologische ziektes en metabole ziekten. Om transplantatieziekte en afstoting te voorkomen wordt serotherapie (anti-thymocyten globuline [ATG] of alemtuzumab) gebruikt in de voorbereidende behandeling. Inherent aan het werkingsmechanisme van serotherapie, namelijk depletie van T-cellen, kan overmatige blootstelling aan serotherapie het immuunherstel na de transplantatie vertragen of zelfs volledig tegengaan. Traag immuunherstel maakt patiënten kwetsbaar voor virale infecties en een recidief van de leukemie.

In dit proefschrift werden de farmacokinetiek en de farmacodynamiek van serotherapie in allogene hematopoietische stamceltransplantatie bestudeerd om uiteindelijk tot een evidence-based doseeradvies te komen. Hiernaast wordt de rol van traag immuunherstel, de belangrijkste toxiciteit van serotherapie, onderzocht als voorspeller van uitkomst van de transplantatie. Als laatste wordt inzicht gegenereerd in de farmacokinetiek van antilichamen in kinderen.

### **Geïndividualiseerde dosering van ATG: klinische implementatie**

De dosering van ATG was traditioneel gebaseerd op extrapolatie van de volwassen dosering. Kinderen kregen over het algemeen een dosis van 10 mg/kg, ongeacht de leeftijd of lichaamsgewicht, en kregen de eerste dosis ATG 5 dagen voor de infusie van de stamcellen. Door op

deze manier te doseren wordt verondersteld dat de farmacokinetiek (pharmacokinetics; PK) en farmacodynamiek (pharmacodynamics; PD) rechtlijnig toenemen met lichaamsgewicht. Echter, de resultaten uit hoofdstuk 3 laten zien dat de PK van ATG niet lineair toeneemt met gewicht, en hiernaast afhankelijk is van het aantal lymfocyten in het bloed voor de eerste infusie van ATG. Hiernaast is de PD van ATG afhankelijk van de stamcelbron, en wordt de blootstelling aan ATG na transplantatie beïnvloed door de startdag van ATG ten opzichte van infusie van de stamcellen. Een geïndividualiseerd doseerregime zoals geïntroduceerd in hoofdstuk 2 lijkt een aantrekkelijke optie voor ATG. In een geïndividualiseerd doseerregime wordt de dosis voor een individuele patiënt bepaald door de karakteristieken van die patiënt om zodoende tot de meest optimale blootstelling en effecten te komen<sup>2-5</sup>. Voor ATG moeten zowel de dosering als de timing van ATG individueel worden aangepast om zo tot een optimale blootstelling voor en na infusie van het transplantaat te komen. Om de blootstelling verder te optimaliseren zou gebruik kunnen worden gemaakt van zogenaamd therapeutic drug monitoring (TDM)<sup>6-8</sup>. Hierbij worden de concentraties die na de eerste doses gemeten wordt gebruikt om de volgende doses aan te passen indien nodig. Beide hierboven beschreven methodes zijn inmiddels geïmplementeerd voor ATG in de klinische zorg op basis van de resultaten uit dit proefschrift.

Op basis van de farmacokinetische en farmacodynamische analyses uit de hoofdstukken 3 en 5 werd een doseerregime opgesteld voor ATG in kinderen. De optimale dosering hangt hierbij af van 3 factoren te weten 1) lichaamsgewicht, 2) het aantal lymfocyten in het bloed voor de eerste infusie van ATG, en 3) de stamcelbron. Patiënten met een hoger lichaamsgewicht, lager lymfocytengetal, of die navelstrengbloed (cord blood, CB) als stamcelbron hadden kregen een lagere dosis in uitgedrukt mg/kg dan patiënten met lager lichaamsgewicht, hogere lymfocytengetallen en beenmerg (BM) of perifeer bloed stamcellen (PBSC) als stamcelbron. Hiernaast wordt de eerste gift ATG 9 dagen voor de transplantatie gegeven in plaats van de voorheen gebruikelijke 5 dagen, dit om de blootstelling aan ATG voor de SCT te verhogen terwijl de blootstelling na de SCT wordt verlaagd.

De effectiviteit van dit doseerregime wordt momenteel geëvalueerd in een prospectieve, open-label, fase II klinische studie getiteld “**P**rospective **A**nalysis of an individualized dosing **R**egimen of ATG (Thymoglobulin) in Children undergoing **H**CT: redUcing Toxicity and improving **E**fficacy – a single arm phase II study”, kortweg de PARACHUTE-studie. Deze studie is geregistreerd in het Nederlands Trial Register onder nummer NTR4960. Het primaire doel in deze studie is te beoordelen of geïndividualiseerde dosering van ATG leidt tot een verbetering in immuunherstel van CD4+ T-cellen. Secundaire eindpunten zijn de overleving, transplantatieziekte, afstoting, recidieven van leukemie, virale infecties en validatie van het PK-model. De uitkomsten van deze studie zullen worden vergeleken met een recent behandeld cohort in dezelfde centra. Alle kinderen die in de twee Nederlandse

transplantatiecentra worden behandeld kunnen meedoen aan deze studie. De resultaten worden in 2018 verwacht.

De resultaten uit deze thesis worden ook door andere onderzoeksgroepen gebruikt. Zo is het geïndividualiseerde doseerregime gebruikt in de CHAMP-studie (BMT-CTN 1502), een Amerikaanse studie die de meest optimale conditionering onderzoekt in kinderen en jong volwassenen met aplastische anemie. Ook in deze studie worden bloedmonsters van de kinderen verzameld om later het PK-model verder te ontwikkelen. Hiernaast wordt het belang van optimale ATG-blootstelling erkend in de ontwikkeling van cellulaire therapieën na navelstrengbloedtransplantatie. Als laatste wordt frequent advies gegeven aan centra wereldwijd voor de dosering ATG in individuele patiënten. Op moment van schrijven hebben meer dan 50 patiënten, behandeld buiten de bovengenoemde studies, ATG ontvangen middels een geïndividualiseerde dosering.

Voor hoog-risico patiënten op rejectie, transplantatieziekte en/of doorlopende ernstige infecties die een navelstrengbloed transplantatie ontvangen is geïndividualiseerde ATG met TDM geïntroduceerd. Dit wordt momenteel gebruikt voor patiënten met inflammatie met een intacte of geactiveerde T-cel functie. Deze patiënten krijgen een dosering ATG die leidt tot een zeer hoge blootstelling voor infusie van het transplantaat, met een zeer lage blootstelling na de infusie. Momenteel werd deze manier van doseren gebruikt in 9 patiënten met een zeer hoog risicoprofiel met veelbelovende resultaten.

### **Voorkomen van transplantatieziekte na SCT: de rol van antigeen presenterende cellen**

Het voorkomen van transplantatieziekte is een van de belangrijkste redenen voor het gebruik van ATG en alemtuzumab in de conditionering. Het wordt vooral gebruikt van *in-vivo* depletie van T-cellen die met het transplantaat worden geïnfundeerd, hoewel ook immuun modulerende effecten aan ATG worden toegeschreven<sup>9</sup>. Door het productieproces bevat ATG epitopen gericht tegen een groot aantal markers op het celoppervlak waaronder die op T-cellen. De meeste epitopen richten zich tegen markers op T-cellen, echter ook andere celtypen kunnen worden herkend, waaronder natural killer (NK) cellen, monocyt en dendritische cellen. Alemtuzumab aan de andere kant is een monoklonaal antilichaam dat bindt aan CD52, wat voornamelijk tot expressie komt op T-cellen, B-cellen en NK-cellen<sup>10</sup>. Hoewel serotherapie dus voornamelijk gericht is op depletie van T-cellen worden andere cellen betrokken bij de ontwikkeling van GvHD ook gedepleteerd.

De pathofysiologie van transplantatieziekte laat zich beschrijven door een drie-fasen-model<sup>11</sup>. In de eerste fase worden antigeen presenterende cellen (APC) geactiveerd, dit betreft voornamelijk dendritische cellen (DC). De conditionering en de onderliggende ziekte zijn de meest genoemde oorzaken voor deze activering. In de tweede fase worden donor T-cellen geactiveerd door de DC's, waarna deze differentiëren, prolifereren en migreren.

Een van de belangrijkste eiwitten in deze activatie is human leukocyte antigen (HLA). Een mismatch in HLA leidt tot een ernstigere reactie in vergelijking met gematchte HLA-paren tussen donor en ontvanger<sup>12</sup>. De derde fase betreft de destructie van weefsel in longen, lever en darmen door een combinatie van cellulaire en inflammatoire effectoren. De derde fase leidt tot toegenomen weefselbeschadiging wat de eerste fase verder versterkt, en dus leidt tot een vicieuze cirkel. Het merendeel van de therapieën richt zich op de tweede fase van transplantatieziekte, waaronder donor T-cel depletie door ATG.

De depletie van donor T-cellen is effectief in het voorkomen van transplantatieziekte<sup>13-15</sup>. Deze depletie heft echter ook de perifere expansie van deze T-cellen op. Dit leidt tot vertraagde of afwezig immuunherstel van T-cellen tot thymopoïese aanvangt, dit kan maanden tot jaren duren. Donor T-cellen zijn belangrijk in het voorkomen van virale reactivaties welke tot ernstige ziekte en dood kunnen leiden (hoofdstuk 10). Hiernaast hebben donor T-cellen een centrale rol in het zogenaamde graft-versus-leukemie effect, waarin donor T-cellen een anti-leukemische respons bewerkstelligen (hoofdstukken 5, 6 en 9). Dit wordt gereflecteerd door grote klinische trials, waarin de inclusie van serotherapie leidt tot een vermindering in GvHD, maar geen verbetering in overleving<sup>16,17</sup>. Dit laatste zou veroorzaakt kunnen door toegenomen sterfte door recidieven leukemie en virale reactivaties door slecht T-cel herstel<sup>13,18,19</sup>. De behandelaar staat voor een dilemma: de toevoeging van serotherapie in de conditionering heeft zowel positieve als negatieve effecten.

In de eerste grote analyse naar de blootstelling aan ATG als voorspeller van klinische uitkomsten (hoofdstuk 5) was de blootstelling aan ATG na de infusie van het transplantaat geen voorspeller voor de incidentie van acute transplantatieziekte in kinderen. Met andere woorden: de mate van depletie van donor T-cellen is geen voorspeller van het ontstaan van transplantatieziekte. Aan de andere kant werd immuunherstel wel degelijk beïnvloed door de blootstelling aan ATG na de transplantatie. Een hogere blootstelling voor infusie van het transplantaat leidde echter wel tot een verminderde incidentie van transplantatieziekte. Onze hypothese was dan ook dat niet donor T-cel depletie, maar depletie van APC's van de ontvanger belangrijk is het voorkomen van transplantatieziekte.

Vergeleken met donor APC's zijn de APC's van de ontvanger meer potent in het induceren van acute transplantatieziekte<sup>20,21</sup>. APC's van de ontvanger kunnen onder meer gevonden worden in het bloed (hematopoïetische APC's) en in andere organen (niet-hematologische APC's). Binnen de APC's zijn hematopoïetische APC's een minder belangrijke speler in de inductie van transplantatieziekte, en worden hiernaast veelal gedepleteerd door de voorbereidende chemotherapie<sup>20-23</sup>. De non-hematopoïetische APC's hebben hierom een centrale rol in het ontwikkelen van acute transplantatieziekte. Dit is in lijn met onze resultaten: hoge blootstelling aan ATG voor de infusie van de stamcellen voorkomt transplantatieziekte,

potentieel door het depletieren van de non-hematopoietische APC's in darm, long en lever. In dierstudies is aangetoond dat alemtuzumab distribueert naar deze organen<sup>24</sup>. Tevens worden in hondenstudies hogere concentraties van anti-hond konijnen immuunglobuline, vergelijkbaar met ATG in mensen, gevonden in de lever in vergelijking met bloed<sup>25</sup>. Hiernaast is het belangrijk te noemen dat APC's van de ontvanger geen rol hebben in het graft-versus-leukemie effect<sup>26,27</sup>. Een ruime blootstelling aan ATG voor de infusie van de stamcellen lijkt dus een aantrekkelijke manier om acute transplantatieziekte te voorkomen. Gecombineerd met een lage blootstelling na de transplantatie kan dit het beste van twee werelden geven: bescherming tegen transplantatieziekte gecombineerd met snel immuunherstel en dus bescherming tegen virale infecties en recidieven.

De hierboven beschreven hypothese lijkt niet op te gaan voor volwassen patiënten die een PBSC transplantatie krijgen na mildere conditionering (hoofdstuk 7). In deze setting wordt de incidentie van acute transplantatieziekte vooral bepaald door de blootstelling aan ATG na de transplantatie. Wel moet worden gezegd dat vrijwel alle patiënten een voldoende ruime blootstelling voor de transplantatie hadden. Ruime depletie van APC's lijkt dus niet voldoende in deze volwassen setting; er lijkt nog steeds wat *in-vivo* depletie van donor T-cellen nodig te zijn. Dit zou kunnen worden veroorzaakt door de milde chemotherapie, het hoge aantal T-cellen wat bij dit soort transplantaties wordt geïnfundeerd, of een combinatie van beiden. Meer onderzoek is nodig om dit verschil in optimale blootstelling tussen de beide cohorten te onderzoeken.

Concluderend zou de depletie van APC's van de ontvanger een van de werkingsmechanismen van ATG kunnen zijn. Dit gaat in tegen de huidige gedachte dat *in-vivo* lymfodepletie van donor T-cellen het primaire doel van serotherapie is. Deze hypothese lijkt echter niet op te gaan voor alle patiënten, waaronder milde conditionering en PBSC transplantaties. Meer onderzoek is nodig om voor alle patiënt-donor-conditionering-combinaties.

### **ATG versus alemtuzumab vanuit een PK/PD-perspectief**

De keuze tussen de twee beschikbare geneesmiddelen voor serotherapie is veelal gebaseerd op een voorkeur van het centrum of de behandelend arts. Er zijn enkele studies beschikbaar die de beide middelen vergelijken, waarin de incidentie van transplantatieziekte minder lijkt te zijn na alemtuzumab<sup>14,28-31</sup>. Dit voordeel wordt echter tenietgedaan door zeer matig immuunherstel in vergelijking tot ATG<sup>28,32</sup> waardoor de overleving vergelijkbaar is na behandeling met de twee middelen<sup>14,29,31</sup>. De meeste studies vergelijken echter het gebruik van ATG versus alemtuzumab, doseringen of blootstelling werd niet onderzocht in dit onderling vergelijk.

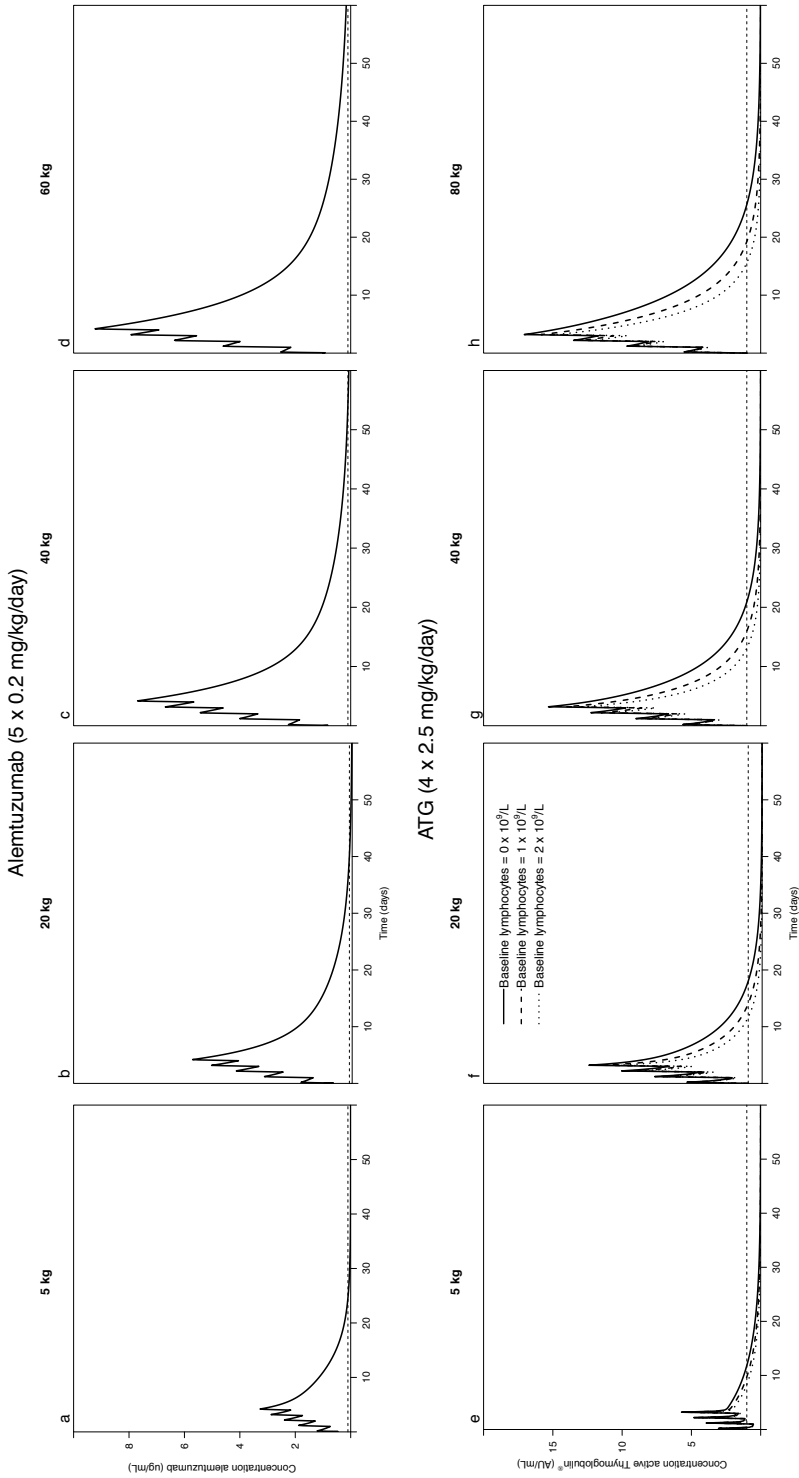
Er zijn aanzienlijke verschillen tussen ATG (Thymoglobulin) en alemtuzumab wat betreft farmacokinetiek en farmacodynamiek in kinderen. Het meest in het oog springende verschil tussen de beide middelen is het verschil in klaring, welke 10 maal (lineaire klaring) en 2 maal (maximale eliminatiesnelheid van de verzadigbare klaring) lager voor alemtuzumab in vergelijking met ATG (hoofdstuk 3 en 4). De onverklaarde variabiliteit tussen patiënten is ook groter voor alemtuzumab (hoofdstuk 3 en 4). Hiernaast is de klaring van ATG hoger in patiënten met een hoog aantal lymfocyten in het bloed, terwijl dit de klaring van alemtuzumab niet beïnvloed. Wat betreft farmacodynamiek is de zogenaamde lymfolytische concentratie lager van alemtuzumab (0.1 µg/mL) dan die van ATG (1 AU/ml), zoals aangegeven in de onderstaande figuur 1<sup>33,34</sup>. Door de lagere klaring zal de blootstelling aan alemtuzumab na de infusie van de stamcellen relatief groter zijn dan bij ATG na standaard dosering en vergelijkbare startdag. Hierdoor zullen patiënten langer blootgesteld worden aan lymfolytische concentraties bij gebruik van alemtuzumab. Hiernaast is de farmacokinetiek minder voorspelbaar in vergelijking met ATG.

De blootstelling aan alemtuzumab heeft een beperkte invloed op de klinische uitkomsten van de SCT wat betreft transplantatieziekte (hoofdstuk 8). Er werd geen invloed van alemtuzumab blootstelling op overleving of T-cel reconstitutie gevonden. Hiernaast bereikten weinig patiënten de eerder in de literatuur beschreven optimale concentratie op de dag van de infusie van stamcellen<sup>1</sup>. Deze observaties suggereren dat de in de twee studiecentra gebruikelijke dosering alemtuzumab (0.5-1 mg/kg/dag vanaf dag -8) leidt tot een te hoge blootstelling.

Aangezien vroeger T-cel reconstitutie een belangrijke voorspeller is voor overleving zouden de doseringen van serotherapie zo moeten worden gekozen dat de *in-vivo* lymfodepletie tot een minimum wordt beperkt. Gezien de relatief langzame en matig voorspelbare klaring en de hogere potentie van alemtuzumab lijkt ATG een aantrekkelijkere keuze te zijn in kinderen bij gebruik van een geïndividualiseerd doseerregime.

### **Geïndividualiseerd doseren: de toekomst van farmacotherapie bij kinderen**

De groei van een kind maakt dat de farmacokinetiek en de farmacodynamiek veranderd, wat zijn weerslag kan hebben op de farmacologische effecten van geneesmiddelen<sup>35</sup>. Deze veranderingen zijn veelal niet rechtlijnig met leeftijd of lichaamsgewicht. Desondanks wordt het merendeel van de geneesmiddelen voor kinderen gebruikt op basis van een vaste dosering uitgedrukt in mg/kg. Hierbij gaat men uit van een lineaire relatie tussen lichaamsgewicht en PK/PD parameters. Hiernaast wordt, vooral in een academische setting, de ruime meerderheid van de geneesmiddelen in kinderen gebruikt zonder dat deze voor deze indicaties of überhaupt voor kinderen zijn geregistreerd<sup>36</sup>. Voor deze geneesmiddelen is weinig of geen onderzoek in kinderen verricht, en de dosering voor deze geneesmiddelen is vaak een extrapolatie van de volwassen dosis. Dit soort empirische doseeradviezen kan leiden tot ernstige over- of onder-dosering in de verschillende leeftijdscategorieën van kinderen, en



**Figuur 1.** Gesimuleerde blootstelling na standaard dosering van alemtuzumab (cumulatief 1 mg/kg gedurende 5 dagen, paneel a-d) en ATG (cumulatief 10 mg/kg gedurende 4 dagen, paneel e-h) in kinderen met een gewicht van 5, 20, 40 en 80 kg. ATG blootstelling is gestratificeerd voor lymfocyten in het bloed. Gestreepte lijnen: lymfocytische concentraties.



kan leiden tot ongewenste en onvoorspelbare geneesmiddeleffecten. Geïndividualiseerde dosering gebaseerd op PK/PD modelleren zal leiden tot een belangrijke verbetering in farmacotherapie bij kinderen, en zal daarmee de uitkomsten van behandeling verbeteren<sup>2,4,8</sup>.

Empirisch doseren kan ernstig negatieve effecten hebben zoals beschreven in deze thesis. ATG werd decennia gebruikt in een dosering van 10mg/kg bij kinderen, waarbij alleen grof rekening wordt gehouden met lichaamsgewicht. Dit leidt tot ernstige overdosering bij de grote kinderen en de kinderen met lage lymfocytenaantallen voor SCT. De dosering ATG in volwassenen varieert, hoewel alle doseeradviezen een vaste dosering in mg/kg voorschrijven. Ook bij volwassenen hebben wij laten zien dat vaste dosering per kilogram lichaamsgewicht leidt tot een sterk variabele blootstelling. Dit is belangrijk gezien de aangetoonde relatie tussen blootstelling aan ATG na de SCT en overleving van de procedure. In kinderen leidt een optimale blootstelling aan ATG tot over 90% overleving na 5 jaar, terwijl dat bij overmatige blootstelling slechts 57-76% bedraagt (hoofdstuk 5). Om dit verschil in perspectief te plaatsen: deze verschillen in uitkomsten zijn vergelijkbaar met de recente grote interventies in hematologie en oncologie<sup>37,38</sup>, hoewel de resultaten van deze studie gevalideerd moeten worden in een prospectieve studie. Wij verwachten dat geïndividualiseerde dosering van ATG gericht op een optimale blootstelling een verbetering in overleving zal geven. Verder zal een verbeterde veiligheid van de procedure ook invloed kunnen hebben op de selectie van patiënten. Zo kan SCT eerder in de behandeling worden ingezet van ziekten waar het nu al geïndiceerd is (bijvoorbeeld aplastische anemie, leukemie). Hiernaast kan een veiligere SCT een behandeling vormen voor ziektes waar de risico's te groot zijn in de balans tussen voor- en nadelen. Hierbij kan gedacht worden aan auto-immuunziekten die niet reageren op steroïden en immunotherapie, en mildere fenotypes van metabole ziektes.

Verder onderzoek moet zich richten op geneesmiddelen met een kritieke therapeutische breedte. Hieronder vallen andere geneesmiddelen die binnen SCT worden gebruikt (fludarabine, prednison), maar ook chemotherapie en thyrosine kinase inhibitors (TKI) in kinderoncologie en antilichamen zoals gebruikt worden in de kinderimmunologie. Voor veel van deze middelen is geen evidence-based doseerrichtlijn beschikbaar, terwijl ze een belangrijk onderdeel van de behandeling vormen. Hiernaast zijn dit complexe ziekten waar verschillende middelen naast elkaar gebruikt worden die ook invloed op elkaar kunnen hebben. Een PK/PD model waarin verschillende geneesmiddelen naast elkaar worden gemodelleerd en samen uitkomst te voorspellen is daarom nodig; deze wordt momenteel gemaakt voor SCT.

Individualisering van doseringen leidt tot sterke variabiliteit in de uiteindelijke dosis, wat mogelijk kan leiden tot doseerfouten. Oplossingen hiervoor kunnen gezocht worden in doseertabellen<sup>39</sup> of doseergrafieken, hoewel de meest voor de hand liggende oplossing een

digitaal systeem zal zijn. Dit kan zowel online als geïntegreerd in de ziekenhuisinformatie-systemen. Dit is een grote verandering in de manier van voorschrijven van medicatie, artsen moeten dan ook goed getraind worden in deze systemen. De technische implementatie van de systemen kan ingewikkeld zijn, de grootste uitdaging ligt echter bij het overtuigen van artsen van het nut van geïndividualiseerd doseren. Het is een grote verandering in farmacotherapie in kinderen in vergelijking met de huidige praktijk. Kennis over farmacologie in kinderen moet een grotere rol krijgen in de opleiding van artsen, vooral waar het de relatie tussen een opgroeiend kind en de effecten van geneesmiddelen betreft. Kinderartsen moet actief betrokken worden bij de ontwikkeling van geïndividualiseerde doseerregimes, zowel voor het includeren van patiënten alsmede vroege participatie en implementatie in de kliniek. Als laatste moeten gelden beschikbaar komen om dit type onderzoek te financieren. De kosten voor de ontwikkeling van geïndividualiseerde dosering zijn relatief laag en kunnen in beperkte tijd worden verricht. De klinische impact kan groot en belangrijk zijn, wat dit type onderzoek een aantrekkelijk veld maakt in een kosten-baten analyse.

Concluderend benadrukken deze voorbeelden het belang van geïndividualiseerde dosering, vooral bij kinderen. Geïndividualiseerde dosering kan de veiligheid en de effectiviteit van geneesmiddelen verbeteren, en hierdoor klinische uitkomst verbeteren.

## ALGEMENE CONCLUSIE

Veel geneesmiddelen worden ongeregistreerd en off-label gebruikt bij kinderen, vaak zonder goed gefundeerd doseeradvies. Dit is ook het geval bij anti-thymocyten globuline (ATG) en alemtuzumab, welke worden gebruikt voor lymfodepletie in hematopoietische stamceltransplantatie (SCT) ter voorkoming van transplantatieziekte en afstoting. Traag of afwezig immuunherstel, vooral dat van T-cellen, is de belangrijkste bijwerking, en heeft een belangrijk aandeel in de morbiditeit en mortaliteit van deze behandeling. Deze thesis beschrijft de populatie farmacokinetiek (pharmacokinetics; PK) en farmacodynamiek (pharmacodynamics; PD) van ATG en alemtuzumab teneinde geïndividualiseerde doseeradviezen met voorspelbare effectiviteit en veiligheidsbalans te ontwikkelen voor beide middelen.

De farmacokinetiek van ATG en alemtuzumab kan goed worden beschreven met de door ons ontwikkelde populatie PK-modellen. In beide modellen namen de farmacokinetische parameters niet lineair toe met leeftijd of lichaamsgewicht. De huidige op lichaamsgewicht gebaseerde dosering van ATG en alemtuzumab leidt hierom tot grote variatie in blootstelling tussen de verschillende leeftijdscategorieën op de kinderleeftijd. Wij toonden aan dat de blootstelling aan ATG en alemtuzumab wordt bepaald door lichaamsgewicht en het aantal

lymfocyten voor de eerste dosis (laatstgenoemde alleen bij ATG). Hierbij zagen wij dat de klaring van ATG in patiënten boven de 50 kg (adolescenten en volwassenen) niet verder toeneemt met lichaamsgewicht. Dit laat zien dat in patiënten boven 50 kg beter een vaste dosis gebruikt kan worden dan een dosis op basis van mg/kg teneinde een vergelijkbare blootstelling te krijgen.

Tijdig immuunherstel van CD4+ T-cellen na SCT is belangrijk in het voorkomen van virale reactivaties en recidieven van leukemie, en vergroot hierdoor de kans op overleving. Hoge blootstelling aan ATG na de infusie van het transplantaat verkleint de kans op immuunherstel van CD4+ T-cellen. Hierdoor heeft de blootstelling aan ATG een grote impact op de klinische uitkomsten, inclusief overleving, na SCT bij kinderen en volwassenen. Verder is T-cel herstel vaak traag bij navelstrengbloed-transplantatie wanneer normale doseringen van ATG worden gebruikt, wat als nadeel van dit type transplantatie wordt gezien. Het immuunherstel na navelstrengbloed-transplantatie is echter uitstekend wanneer de blootstelling aan ATG na de SCT erg laag is.

Het beschermende effect van ATG voor transplantatieziekte en afstoting is bepaald door de blootstelling aan ATG vóór de infusie van de graft, althans in kinderen. Echter, bij volwassenen die na milde chemotherapie een SCT met hoge aantallen T-cellen (perifeer bloed stamceltransplantatie) krijgen is een bepaalde hoeveelheid blootstelling na de SCT noodzakelijk. Blootstelling aan alemtuzumab aan de andere kant bepaalt de incidentie van acute transplantatieziekte, maar niet de toxiciteits-eindpunten, mogelijk wijzend op een relatieve overdosis bij de huidige doseringen.

Wij concluderen dat individualisering van de dosering en de timing van ATG de stamceltransplantatie potentieel veiliger en effectiever maakt, en de kans op overleving vergroot. Geïndividualiseerde doseerregimes voor ATG bij kinderen zijn ontwikkeld op basis van de resultaten uit deze thesis, en worden momenteel geëvalueerd voor effectiviteit en veiligheid in prospectieve klinische trials.

## REFERENTIES

1. Marsh RA, Lane A, Mehta PA, et al. Alemtuzumab levels impact acute GVHD, mixed chimerism, and lymphocyte recovery following alemtuzumab, fludarabine, and melphalan RIC HCT. *Blood*. 2015;127(4):503-513.
2. Knibbe CAJ, Krekels EHJ, Danhof M. Advances in paediatric pharmacokinetics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2011;7(1):1-8.
3. Ince I, Wildt SN De, Tibboel D, Danhof M, Knibbe CAJ. Tailor-made drug treatment for children: creation of an infrastructure for data-sharing and population PK – PD modeling. *Drug Discov Today*. 2009;14(March):316-320.
4. Admiraal R, van Kesteren C, Boelens JJ, Bredius RGM, Tibboel D, Knibbe C a J. Towards evidence-based dosing regimens in children on the basis of population pharmacokinetic pharmacodynamic modelling. *Arch Dis Child*. 2014;99(3):267-272.
5. De Cock RFW, Piana C, Krekels EHJ, Danhof M, Allegaert K, Knibbe C a J. The role of population PK-PD modelling in paediatric clinical research. *Eur J Clin Pharmacol*. 2011;67 Suppl 1:5-16.
6. Mould D. Why therapeutic drug monitoring is needed for monoclonal antibodies and how do we implement this? *Clin Pharmacol Ther*. 2016;99(4):351-354.
7. Lalmohamed A, Bartelink I, van Reij L, et al. Studying the Optimal Intravenous Busulfan Exposure in Pediatric Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation (alloHCT) to Improve Clinical Outcomes: A Multicenter Study. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2015;21(2):S102-S103.
8. Mould DR, D’Haens G, Upton RN. Clinical Decision Support Tools: The Evolution of a Revolution. *Clin Pharmacol Ther*. 2016;66(5):732-740.
9. Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia*. 2007;21(7):1387-1394.
10. Kanda J, Lopez RD, Rizzieri DA. Alemtuzumab for the prevention and treatment of graft-versus-host disease. *Int J Hematol*. 2011;93(5):586-593.
11. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373(9674):1550-1561.
12. Loiseau P, Busson M, Balere ML, et al. HLA Association with Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcome: The Number of Mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 Is Strongly Associated with Overall Survival. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13(8):965-974.
13. Lindemans CA, Chiesa R, Amrolia PJ, et al. Impact of thymoglobulin prior to pediatric unrelated umbilical cord blood transplantation on immune reconstitution and clinical outcome. *Blood*. 2014;123(1):126-132.
14. Veys P, Wynn RF, Ahn KW, et al. Impact of immune modulation with in vivo T cell depletion and myeloablative total body irradiation conditioning regimen on outcomes after unrelated donor transplantation for acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood*. 2012;119(25):6155-6162.
15. Booth C, Veys P. T cell depletion in paediatric stem cell transplantation. *Clin Exp Immunol*. 2013;172(2):139-147.
16. Finke J, Bethge W a, Schmoor C, et al. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2009;10(9):855-864.
17. Theurich S, Fischmann H, Chemnitz J, Holtick U, Scheid C, Skoetz N. Polyclonal anti-thymocyte globulins for the prophylaxis of graft-versus-host disease after allogeneic stem cell or bone marrow transplantation in adults ( Review ). *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;(9).

18. Seidel MG, Fritsch G, Matthes-Martin S, et al. Antithymocyte Globulin Pharmacokinetics in Pediatric Patients After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2005;27(10):532-536.
19. Bacigalupo A, Lamparelli T, Bruzzi P, et al. Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). *Blood.* 2001;98(10):2942-2947.
20. Koyama M, Kuns RD, Olver SD, et al. Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med.* 2011;18(1):135-142.
21. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, et al. Prevention of Graft Versus Host Disease by Inactivation of Host. *Science (80).* 1999;285(July):412-415.
22. Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR, et al. Host Dendritic Cells Alone Are Sufficient to Initiate Acute Graft-versus-Host Disease. *J Immunol.* 2004;172(12):7393-7398.
23. Li H, Demetris AJ, McNiff J, et al. Profound depletion of host conventional dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells, and B cells does not prevent graft-versus-host disease induction. *J Immunol.* 2012;188(8):3804-3811.
24. De Decker M, Bacher K, Thierens H, Slegers G, Dierckx R a, De Vos F. In vitro and in vivo evaluation of direct rhenium-188-labeled anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab for radioimmunotherapy of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Nucl Med Biol.* 2008;35(5):599-604.
25. McAfee JG, Gagne G, Subramanian G, Schneider RF. The localization of indium-111-leukocytes, gallium-67-polyclonal IgG and other radioactive agents in acute focal inflammatory lesions. *J Nucl Med.* 1991;32(11):2126-2131.
26. Teshima T, Ordemann R, Reddy P, et al. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med.* 2002;8(6):575-581.
27. MacDonald KP, Shlomchik WD, Reddy P. Biology of Graft-versus-Host Responses: Recent Insights. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19(1 SUPPL.):S10-S14.
28. Willemsen L, Jol-van der Zijde CM, Admiraal R, et al. Impact of Serotherapy on Immune Reconstitution and Survival Outcomes After Stem Cell Transplantations in Children: Thymoglobulin Versus Alemtuzumab. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(3):473-482.
29. Marsh JC, Pearce RM, Koh MBC, et al. Retrospective study of alemtuzumab vs ATG-based conditioning without irradiation for unrelated and matched sibling donor transplants in acquired severe aplastic anemia: a study from the British Society for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(1):42-48.
30. Soiffer RJ, Lerademacher J, Ho V, et al. Impact of immune modulation with anti – T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies Impact of immune modulation with anti – T-cell antibodies on the outcome of reduc. *Blood.* 2011;117(25):6963-6970.
31. Norlin A-C, Remberger M. A comparison of Campath and Thymoglobulin as part of the conditioning before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol.* 2011;86(1):57-66.
32. Park SH, Choi S-M, Lee D-G, et al. Infectious complications associated with alemtuzumab use for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: comparison with anti-thymocyte globulin. *Transpl Infect Dis.* 2009;11(5):413-423.
33. Waller EK, Langston A a, Lonial S, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-thymocyte globulin in recipients of partially HLA-matched blood hematopoietic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003;9(7):460-471.

34. Morris EC, Rebello P, Thomson KJ, et al. Pharmacokinetics of alemtuzumab used for in vivo and in vitro T-cell depletion in allogeneic transplantations: relevance for early adoptive immunotherapy and infectious complications. *Blood*. 2003;102(1):404-406.
35. Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DW, Leeder JS, Kauffman RE. Developmental pharmacology—drug disposition, action and therapy in infants and children. *new Engl J Med drug Ther*. 2003;349(12):1157-1167.
36. Kimland E, Odland V. Off-label drug use in pediatric patients. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;91(5):796-801.
37. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, et al. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010;363(14):1324-1334.
38. Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1507-1517.
39. Bartelink IH, van Kesteren C, Boelens JJ, et al. Predictive performance of a busulfan pharmacokinetic model in children and young adults. *Ther Drug Monit*. 2012;34(5):574-583.

