

Gitta Pantel

Dr. med.

In vivo und in vitro Untersuchungen zur Wirkung des humanisierten monoklonalen B-Zell spezifischen CD20-Antikörpers Rituximab auf normale und maligne B-Zellen.

Geboren am 29.05.1975 in Tübingen

Reifeprüfung am 17.06.1994 in Tübingen vom

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1994/95 bis SS 2001

Physikum am 21.08.1996 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Karlsruhe

Staatsexamen am 15.05.2001 an der Universität Freiburg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. R. Haas

Hintergrund und Ziele.

Der chimäre monoklonale CD20 Antikörper Rituximab hat bei Patienten mit B-Zell Non Hodgkin-Lymphomen (NHL) einen signifikanten Anti-Tumor Effekt und führt in vivo zur Abnahme der B-Zell-Zahl. Als mögliche Wirkmechanismen sind in Zelllinien-Modellen die direkte Induktion von Apoptose, die Komplement-vermittelte Zytolyse und die Effektorzell-abhängige Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität beschrieben worden. Es war unser Ziel, den Anteil der unterschiedlichen Mechanismen an der Wirkung von Rituximab auf native menschliche Zellen *in vitro* zu quantifizieren und daraus mögliche weitere Therapieoptionen abzuleiten. Des weiteren untersuchten wir die Wirkungen von Rituximab *in vivo*, wenn er im Rahmen eines Hochdosis-Behandlungsprogrammes für Patienten mit follikulärem und Mantelzell-Lymphom vor der Sammlung und Transplantation hämatopoetischer Stammzellen verabreicht wurde. Unser Ziel hierbei war es durch zusätzliche Behandlung mit Rituximab eine maximale B-Zell-Reduktion in vivo zu erreichen sowie die Kontamination des Transplantats mit Tumorzellen auf ein Minimum zu reduzieren. Eine Tumormassenreduktion in vivo sowie ein Tumorzellpurgung des autologen Transplantates könnten dazu beitragen die klinischen Resultate zu verbessern.

Aufbau und Methoden.

Für die *in vitro* Untersuchungen wurden primäre menschliche B-Zellen sowie verschiedene Effektor-Zellfraktionen mittels einer immunomagnetischen Methode aus peripherem Blut gesunder Spender isoliert. Parallel dazu wurden auch B-Zellen von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) untersucht. Die Burkitt-Lymphom Zelllinie Daudi wurde als Kontrolle verwendet. Die B-Zellen wurden mit oder ohne Rituximab und Zugabe eines quervernetzenden Antikörpers, von Plasma als Komplementquelle oder in Anwesenheit von verschiedenen Effektor-Zell-Populationen kultiviert. Am Ende der Kultur wurden die Zellen gezählt und durchflusszytometrisch auf den Gehalt an B-Zellen analysiert.

In die klinische Pilotstudie wurden 18 Patienten eingeschlossen, die mit einer Kombination aus Rituximab und hochdosierter Chemotherapie und anschliessend mit Hochdosis-Chemotherapie und autologer Stammzelltransplantation behandelt wurden. Wir untersuchten neben der B-Zell-Depletion *in vivo* auch das Vorhandensein von Tumorzellen im Transplantat mittels einer Polymerasenkettenreaktion (PCR) für die tumor-spezifische Translokation t(14;18) sowie die nach der Transplantation erfolgende hämatopoetische Rekonstitution.

Ergebnisse.

Rituximab alleine hatte sowohl auf die lymphoblastoiden Daudi-Zellen als auch auf die angereicherten normalen B-Zellen des peripheren Blutes einen mässigen aber signifikanten Effekt. Im Gegensatz zur Burkitt-Lymphom Zelllinie Daudi kam es bei normalen humanen B-Zellen in Anwesenheit von Plasma zu keiner wesentlichen zusätzlichen Reduktion der B-Zell-Zahl. Jedoch war eine signifikante Reduktion der B-Zell-Zahl zu beobachten, wenn mononukleäre Zellen (MNC) zugegeben wurden. Um die Effektor-Zellpopulation zu ermitteln, die für diesen Effekt verantwortlich war, wurden CD3-positive T-Zellen, CD56-positive NK-Zellen und CD14-positive Monozyten zu den CD22-positiven B-Zellen gegeben. Eine wesentliche Reduktion der B-Zell-Zahl wurde durch Ko-kultivierung mit CD14-positiven beziehungsweise CD56-positiven Zellen im Verhältnis 10 : 1 erreicht. In den Versuchen mit MNC von Patienten mit CLL zeigte sich eine Reduktion der B-Zell-Zahl durch Rituximab, die durch Zugabe von CD14-positiven Zellen, die zuvor mittels GM-CSF aktiviert worden waren, signifikant zunahm.

In vivo kam es nach der kombinierten Immuno-/Chemotherapie zu einer deutlichen Reduktion der B-Zell-Zahl. Bei sechs von sieben Patienten waren im peripheren Blut nach der

Rituximab/HAM-Therapie keine t(14,18)-positiven Zellen mehr nachweisbar und bei allen sieben analysierten Patienten war es möglich, t(14;18)-PCR negative Leukaphereseprodukte zu sammeln. Die hämatopoetische Erholung nach Transplantation erschien unbeeinflusst im Vergleich zu Patienten, die keinen Antikörper erhalten hatten.

Interpretation und Schlussfolgerungen.

Diese Ergebnisse bekräftigen die entscheidende Rolle Zell-vermittelter Mechanismen bei der durch Rituximab beobachteten B-Zell-Depletion und lassen vermuten, dass diese durch eine Vorbehandlung mit GM-CSF verstärkt werden könnten.

Die kombinierte Immuno-/Chemotherapie mit Rituximab führt zu einer in vivo B-Zell-Depletion, die es erlaubt, Stammzelltransplantate zu sammeln, die selbst mit sehr empfindlichen Nachweismethoden als tumorfrei bezeichnet werden können, ohne dass dabei die Effektivität der Stammzellsammlung vermindert wird.