

Christian Gemmel  
Dr. med.

**Anti-CD20 Antikörper Rituximab<sup>®</sup> als Konsolidierungstherapie bei Patienten mit Multiplem Myelom nach Hochdosistherapie und Autologer Peripherer Blutstammzelltransplantation**

Geboren am 01.10.1974 in Trier

Reifeprüfung am 10.06.1994

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1995 bis WS 2001/2002

Physikum am 27.03.1997 an der Universität Marburg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in der Schweiz und Heidelberg

3.Staatsexamen am 06.05.2002 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. H. Goldschmidt

Das Multiple Myelom (MM) und die Primäre Plasmazellenleukämie (PCL) sind klonale B-Zellerkrankungen, die durch eine klonale Expansion terminal differenzierter maligner B-Zellen, den Plasmazellen, gekennzeichnet sind. Hochdosistherapie (HDT) mit autologer peripherer Blutstammzelltransplantation (PBSCT) haben die Raten an kompletten Remissionen erhöht, jedoch sind diese Erkrankungen bei den meisten Patienten nicht heilbar. In jüngerer Zeit werden daher zunehmend verschiedene immuntherapeutische Ansätze geprüft.

Beim MM zeigen Untersuchungen eine geringe proliferative Aktivität der malignen Plasmazellen. Neben den malignen Plasmazellen wurden klonotypische B-Zellen identifiziert. Ähnlich der physiologischen B-Zellentwicklung wurde diesen klonotypischen B-Zellen die Funktion eines Vorläuferkompartiments mit hoher Teilungsaktivität zugeschrieben.

Rituximab ist ein gentechnisch hergestellter monoklonaler, chimärer Antikörper, der gegen das CD20 Oberflächenantigen gerichtet ist. CD20 wird im Laufe der physiologischen B-Zellentwicklung vom Stadium der prä-B-Zelle bis zur reifen B-Zelle, nicht jedoch auf Plasmazellen, exprimiert. Auch die klonotypischen Vorläuferzellen weisen dieses Antigen auf der Oberfläche auf.

Im Rahmen einer PhaseI/II- Studie wurden 13 Patienten mit MM und ein Patient mit PCL mit dem Rituximab<sup>®</sup> als Konsolidierungstherapie nach HDT und PBSCT behandelt.

Es wurden vor Beginn und im Verlauf nach Antikörpertherapie mononukleäre Zellen (MNZ) aus dem peripheren Blut (PB) und Knochenmark (KM) jedes Studienpatienten isoliert und mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Scan)- Analysen der Anteil der CD20<sup>+</sup>-, CD19<sup>+</sup>- und CD37<sup>+</sup>-B-Zellen, sowie CD38<sup>++</sup>/CD138<sup>+</sup>-Plasmazellen bestimmt. Außerdem wurden die klonotypischen Zellen im Verlauf unter den MNZ des PB mittels quantitativer Polymerase-Ketten-Reaktion mit allelspezifischen Oligonukleotid-Primern (ASO-PCR) nach Auftrennung der Zellen in CD20<sup>+</sup> und CD20<sup>-</sup> Fraktionen durch MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) bestimmt.

Insgesamt traten während der Infusion milde nicht-hämatologische und hämatologische Nebenwirkungen auf. Bei einem Patienten wurde die Therapie aufgrund einer allergischen Reaktion abgebrochen. Im Zeitraum zwischen 2 Monaten und 12 Monaten nach Beendigung der Therapie traten bei 5 Patienten Infektionen auf, die insgesamt als mild klassifiziert wurden. Gemäß WHO-Klassifikation traten im Beobachtungszeitraum bei 5 Patienten eine hämatologische Toxizität auf, die jeweils spätestens nach 4 Monaten reversibel war. Bei einem Patienten trat eine Leukopenie Grad III und Neutropenie Grad IV auf. Bei 7 Patienten konnte ein IgM- Abfall, bei jeweils einem Patienten eine IgG- bzw. IgA-Abfall bedingt durch die Antikörpertherapie beobachtet werden. Es ist denkbar, dass der präferentielle Abfall des IgM durch die Elimination eines Großteils des physiologischen B-Zellkompartiments und die damit unterbundene Ausreifung der B-Zellen in Antikörper produzierende Plasmazellen bedingt war. Gerade die neu gebildeten Plasmazellen bilden das IgM.

Von den 8 Patienten mit MM in kompletter Remission vor der Anti-CD20 Antikörpertherapie entwickelten 3 Patienten ein Rezidiv der Erkrankung, die 3 Patienten in partieller Remission rezidierten im Verlauf, ein Patient mit Progression der Erkrankung zeigte eine zunehmende Krankheitsaktivität unter Antikörpertherapie und der Patient mit PCL in kompletter Remission entwickelte ein Rezidiv der Erkrankung. 5 Patienten befinden sich weiterhin in einer kompletten Remission, im Median 48 Monate nach der Antikörpertherapie und 59 Monate nach erster Hochdosistherapie. Vergleicht man das progressionsfreie Überleben mit Hilfe von „Matched-Pair-Untersuchungen“, so ergibt sich nach einem Beobachtungszeitraum von 90 Monaten folgendes Ergebnis: Das mediane PFS beträgt 42 („Matched-pair-Patienten“) versus 50 (Studienpatienten) Monate. Das PFS unterscheidet sich in beiden Gruppen nicht signifikant.

Am Tag 0 der Antikörpertherapie wurden unter den MNZ im Median 16,1% CD20<sup>+</sup>-Zellen im PB und 13,1% CD20<sup>+</sup>-Zellen im KM bestimmt. Am Tag 0 konnten bei keinem Patienten CD38<sup>++</sup>/CD138<sup>+</sup>-Zellen im PB gemessen werden. Im KM wurden am Tag 0 <0,1% - 1,29%

CD38<sup>++</sup>/CD138<sup>+</sup>-Zellen (im Median <0,1%) nachgewiesen. Bei allen 13 Patienten wurden etwa am Tag 30, 60, 90 und 180 bedingt durch den therapeutischen Effekt von Rituximab<sup>®</sup> keine CD20<sup>+</sup>-, CD19<sup>+</sup>-, CD37<sup>+</sup>-Zellen im PB und KM detektiert. Ein Wiederauftreten von CD20<sup>+</sup>-Zellen konnte frühestens am Tag 290 nach Beginn der Antikörpertherapie beobachtet werden. In der Rezidivphase konnten bei 4 Patienten mit MM und einem Patienten mit PCL ansteigende CD38<sup>++</sup>/CD138<sup>+</sup>/CD20<sup>-</sup>-Zellen ohne begleitende Zunahme der CD20<sup>+</sup>-, CD19<sup>+</sup>- bzw. CD37<sup>+</sup>-Zellen beobachtet werden. Daher ist die Existenz einer proliferierenden das Plasmazellkompartiment auffüllenden CD20<sup>+</sup>-Vorläuferzelle nach Antikörpertherapie bei diesen Patienten unwahrscheinlich.

Bei den durchflusssytometrischen Messungen bei 10 Patienten mit MM konnte eine kleine CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>-</sup> bzw. CD19<sup>+</sup>/CD37<sup>-</sup>-Zellpopulation am Tag 30 und 90 detektiert werden, die durch die Antikörpertherapie nicht eliminiert wurde. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Erkenntnissen über die physiologische B-Zellentwicklung: Die Oberflächenmarker CD20 und CD37 werden im Laufe der B-Zellentwicklung vom Stadium der prä-B-Zelle exprimiert. Sie sind im Gegensatz zum CD19-Antigen also nicht bereits auf der frühen prä-B-Zelle vorhanden. Die beschriebene Zellpopulation könnte somit die frühe prä-B-Zelle darstellen. Da der Antikörper Rituximab<sup>®</sup> gegen das CD20-Antigen gerichtet ist, ist anzunehmen, dass prä-B-Zellen nicht eliminiert wurden.

Als Grundlage für den Nachweis von klonotypischen Zellen im Verlauf der Antikörpertherapie mittels ASO-PCR wurden CD20<sup>+</sup>-Zellfraktionen aus dem PB sortiert. Durch 2 Anreicherungs-schritte mittels MACS lagen die Reinheiten für CD20<sup>+</sup>-Zellen vor der Antikörpertherapie im Median bei 95,3% und nach Wiederkehr der CD20<sup>+</sup>-Zellen bei 94,1%. Durch die Kombination der immunologischen und molekularbiologischen Untersuchungen konnte der Nachweis erbracht werden, dass Rituximab<sup>®</sup> bei 2 Patienten mit MM zu einer anhaltenden Reduktion der klonotypischen Zellen geführt hat. Eine sogenannte „molekulare Remission“ durch eine Konsolidierungstherapie ist bisher bei Patienten mit MM in der Literatur nicht beschrieben. Entsprechend den immunologischen und molekularbiologischen Ergebnissen scheint Rituximab<sup>®</sup> allerdings bei einigen Patienten mit MM einen proliferationsinduzierenden Effekt auf die klonotypischen Zellen auszuüben. Eine mögliche Ursache könnte eine durch die Antikörpertherapie bedingte Freisetzung von Interleukin-6 als Wachstumsfaktor für Myelomzellen sein, die bei einem Patienten mit MM von einer Arbeitsgruppe beschrieben wurde.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen für eine Heterogenität hinsichtlich der Existenz eines klonotypischen CD20<sup>+</sup> Proliferationspools bei Patienten mit MM. Das MM

muss mit Hilfe immunphänotypischer, zytogenetischer und molekularbiologischer Methoden weiter charakterisiert und in weitere Subtypen klassifiziert werden, um neue Therapieformen wie Immuntherapien erkrankungsspezifischer entwickeln und einsetzen zu können.