

MOLEKULARNE MECHANIZMY AKTYWNOŚCI TERAPEUTYCZNEJ RYTUKSYMABU – PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNEGO ANTY-CD20

MOLECULAR MECHANISMS OF THE THERAPEUTIC ACTIVITY
OF RITUXIMAB – THE MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST CD20
ANTIGEN

Jacek BIL¹, Magdalena WINIARSKA^{1,2}

¹Zakład Immunologii Centrum Biostruktury oraz ²Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: Rytuksymab to chimeryczne przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko antygenowi CD20. Częsteczką tą występuje tylko na limfocytach B, brak jej na komórkach prekursorowych, a także na komórkach plazmatycznych. Antygen CD20 nie podlega endocytozie, ani nie jest uwalniany z powierzchni komórki. Podanie rytuksymabu wywołuje szybką eliminację limfocytów B z krążenia. Dzieje się to wskutek aktywacji dopełniacza i cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał. Ponadto rytuksymab działa synergistycznie z konwencjonalną chemioterapią, uwrażliwiając komórki na apoptozę, poprzez hamowanie ekspresji białka Bcl-2. Rytuksymab został zarejestrowany przede wszystkim w leczeniu chłoniaków nieziarniczych, lecz spektrum jego zastosowań ciągle się powiększa. Obecnie jest także zarejestrowany do leczenia reumatoidalnego zapalenia stawów, ale wykorzystywany jest również w leczeniu innych chorób o podłożu autoimmunizacyjnym oraz w transplantologii. Dzięki sukcesowi rytuksymabu powstają nowe leki wykorzystujące antygen CD20. Są to m.in. przeciwciała monoklonalne połączone z radioizotopami, całkowicie ludzkie przeciwciała bądź małe peptydy (mimotopy), których celem jest pobudzenie układu immunologicznego do wytworzenia przeciwciał anty-CD20.

Słowa kluczowe: rytuksymab, CD20, przeciwciało monoklonalne.

Summary: Rituximab is a chimeric monoclonal antibody directed against CD20 antigen. This molecule is expressed only on the surface of B lymphocytes, it is present neither on precursor cells nor on plasma cells. CD20 antigen is not internalized nor shed. Infusion of rituximab evokes rapid B-cell depletion. It is caused mainly due to complement activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity. Furthermore, rituximab acts synergistically with standard chemotherapy, sensitizing cells to apoptosis, via inhibition of the expression of Bcl-2 protein. Rituximab has been registered for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma, but its indications are still expanding. Currently it is also approved in the treatment of rheumatoid arthritis, however it is also used in other autoimmune disease as well as in transplantology. On the basis

of success of rituximab new drugs are being made against CD20 antigen. These are, among others: monoclonal antibodies conjugated with radioisotopes, completely human monoclonal antibodies or small peptides (mimotops), which are designed to induce the response of the immune system against CD20 antigen.

Keywords: rituximab, CD20, monoclonal antibody.

Wykaz skrótów: **AP-1** (*activating protein 1*) – czynnik transkrypcyjny; **Apaf-1** (*apoptotic protease activating factor 1*) – czynnik 1 aktywujący proteazy uczestniczące w apoptozie; **ADCC** (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*) – cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał; **BAFF** (*B-cell activation factor*) – czynnik aktywujący limfocyty B; **CD** (*cluster of differentiation*) – gronko różnicowania; **CDC** (*complement dependent cytotoxicity*) – cytotoksyczność zależna od dopełniacza; **CHOP** (*cytoxan, hydroxyrubicin, oncovin, prednisone*) – cyklofosfamid, doksorubicyna, winkrystyna, prednizon; **CVP** (*cyclophosphamide, vincristine, prednisone*) – cyklofosfamid, winkrystyna, prednizon; **c-IAP-1** (*inhibitor of apoptosis protein 1*) – inhibitor białek apoptotycznych; **EBM** (*evidence-based medicine*) – medycyna oparta na dowodach; **EPOCH** (*etoposide + CHOP*) – etopozyd + CHOP; **ERK** (*extracellular signal-regulated protein kinase*) – kinaza białkowa regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym; **FDA** (*Food and Drug Administration*) – Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków; **GM-CSF** (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) – czynnik stymulujący kolonie granulocytów i makrofagów; **HAMA** (*human antimouse antibodies*) – ludzkie przeciwciała przeciw mysim immunoglobulinom; **HLA** (*human leukocyte antigens*) – antygeny ludzkich leukocytów, tradycyjna nazwa układu MHC człowieka; **IVIG** (*intravenous immunoglobulin*) – immunoglobuliny podawane dożylnie; **MAC** (*membrane attacking complex*) – kompleks atakujący błonę; **MAPK** (*mitogen-activated protein kinase*) – kinaza białkowa aktywowana mitogenem; **MBL** (*mannose binding lectin*) – lektyna wiążąca mannozę; **MEK** (*mitogen-activated or extracellular signal-regulated protein kinase*) – kinaza białkowa aktywowana mitogenem lub regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym; **MHC** (*major histocompatibility complex*) – główny układ zgodności tkankowej; **MS4A** (*membrane-spanning 4-domains, subfamily A*) – podrodzina A tetraspanin; **NF-κB** (*nuclear factor κB*) – czynnik jądrowy κB; **PARP** (*poly(ADP-ribose)polymerase*) – poli(ADP-rybozo)polimeraza; **PTLD** (*posttransplant lymphoproliferative disease*) – potransplantacyjny zespół limfoproliferacyjny; **STAT3** (*signal transducer and activator of transcription 3*) – czynnik transkrypcyjny; **RKIP** (*Raf kinase inhibitor protein*) – inhibitor kinazy Raf; **TNF** (*tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy guza; **TRAIL-R** (*receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) – receptor dla ligandu podobnego do TNF indukującego apoptozę; **YY1** (*yin yang 1*) – czynnik transkrypcyjny.

Koncepcję terapii celowanej wymyślił już ponad sto lat temu Paul Ehrlich. Jego magiczna kula miała być skierowana wybiórczo przeciwko danej chorobie. Dziś na terapię celowaną, czyli nowe metody terapeutyczne polegające na hamowaniu określonych szlaków molekularnych, głównie onkogenezy, składają się: przeciwciała monoklonalne, leki drobnocząsteczkowe (np. imatynib – inhibitor kinazy tyrozynowej Bcr/Abl), mimetyki peptydowe oraz oligonukleotydy antysensowe (np. oblimersen – anty-Bcl-2).

Historia przeciwciał w medycynie jest już dość długa. Pierwszym zastosowaniem przeciwciał, co prawda poliklonalnych, było zapobieganie chorobie hemolitycznej noworodków poprzez podawanie kobietom poliklonalnej surowicy anty-D. Natomiast wytwarzanie przeciwciał monoklonalnych stało się możliwe dopiero od roku 1975, kiedy to Georges Köhler i Cesar Milstein opracowali metodę ich syntezy [49], za którą dostali w 1984 roku Nagrodę Nobla. Od tamtego czasu wiele się zmieniło. Przeciwciała zaczęto modyfikować tak, aby były bardziej skuteczne, mniej immunogenne i tym samym miały dłuższy okres półtrwania. I tak z mysich powstawały najpierw chimeryczne, potem humanizowane, aż obecnie całkowicie ludzkie przeciwciała monoklonalne, wytwarzane bądź przy wykorzystaniu bibliotek fagowych, bądź też myszy transgeniczných [1].

TABELA 1. Zarejestrowane przez FDA przeciwciała monoklonalne

Rodzaj	Nazwa	Antygen	Dziedzina	Rok
Mysie	Muromonab	CD3	Transplantologia	1986
	Ibrytumomab*	CD20	Onkologia	2002
	Tositumomab**	CD20	Onkologia	2003
	Fanolesomab	CD15	Onkologia	2004
Chimeryczne	Abciximab	GPIIb/IIIa	Kardiologia	1997
	Rytuksymab	CD20	Onkologia	1997
	Bazyksimab	CD25	Transplantologia	1998
	Infliksimab	TNF	Reumatologia, Gastroenterologia	1998
	Cetuksimab	EGFR	Onkologia	2004
Humanizowane	Daklizumab	CD25	Transplantologia	1997
	Trastuzumab	HER2	Onkologia	1998
	Palivizumab	antygen wirusa RS	Pneumonologia	1998
	Gemtuzumab***	CD33	Onkologia	2000
	Alemtuzumab	CD52	Onkologia	2001
	Omalizumab	IgE	Alergologia	2003
	Efalizumab	CD11a	Dermatologia	2003
	Bevacizumab	VEGF	Onkologia	2004
	Natalizumab	α 4-integryny	Neurologia	2004
	Ranibizumab	VEGF-A	Okulistyka	2006
Ludzkie	Adalimumab	TNF	Reumatologia	2002
	Panitumumab	EGFR	Onkologia	2006

* koniugat z radioizotopem $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ i chelatorem metali – tiuksetanem; ** koniugat z radioizotopem ^{131}I ; *** koniugat z cytostatykiem – pochodną kalichecyny (gemtuzumab ozogamicin)

W 1980 roku po raz pierwszy w klinice eksperymentalnie zastosowano przeciwciało monoklonalne (Ab 89) przeciw antygenom obecnym na komórkach chłoniaka [65], a sześć lat później Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) zarejestrowała muromonab – przeciwciało monoklonalne anty-CD3 stosowane w leczeniu ostrego odrzucania przeszczepu nerki. Jednakże dopiero ostatnia dekada przyniosła prawdziwy rozwój i popularyzację przeciwciał w medycynie. Obecnie w klinice stosowanych jest 21 przeciwciał monoklonalnych (tab. 1). Najwięcej, bo 10 jest używanych w onkologii, niemniej znajdują one zastosowanie w różnych dziedzinach medycyny, takich jak: transplantologia, reumatologia, dermatologia czy okulistyka.

CHARAKTERYSTYKA RYTUKSYMABU

Rytuksymab jest pierwszym przeciwciałem monoklonalnym zarejestrowanym w 1997 roku przez FDA do leczenia nowotworów. Jest to chimeryczne przeciwciało skierowane przeciwko antygenowi CD20, będące pod względem biochemicznym glikozylowaną

TABELA 2. Zastosowania rytuksymabu

Wskazania
Zarejestrowane Chłoniaki nieziarnicze CD20 ⁺ Reumatoidalne zapalenie stawów
W badaniach klinicznych Przewlekła białaczka limfocytowa Makroglobulinemia Waldenströma Szpiczak mnogi Ziarnica złośliwa Toczeń trzewny układowy Idiopatyczna plamica małopłytkowa Autoimmunizacyjna niedokrwistość hemolityczna Choroba Gravesa-Basedowa Pęcherzyce Krioglobulinemia Zapalenie skórno-mięśniowe Kłębkowe zapalenia nerek Zespoły limfoproliferacyjne po przeszczepach narządowych

immunoglobuliną, składającą się z łańcuchów ciężkich klasy IgG1 oraz łańcuchów lekkich κ . Łańcuchy ciężkie zbudowane są z 451 aminokwasów, a lekkie z 213, dając łączną masę 145 kDa. Rytuksymab jest wytwarzany przez transfektomy powstałe wskutek wprowadzenia do komórek jajnika chomika chińskiego wektora zawierającego geny dla części zmiennych łańcuchów lekkich i ciężkich pochodzących z mysiego przeciwciała 2B8 oraz ludzkie sekwencje stałe obu łańcuchów [72].

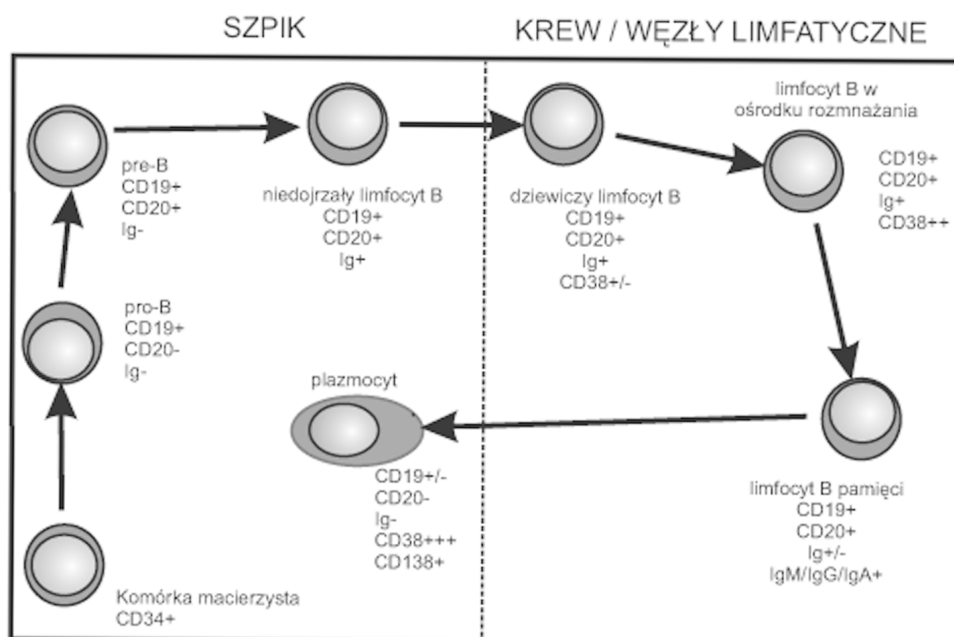
Początkowo rytuksymab został zarejestrowany do leczenia grudkowego chłoniaka nieziarnicznego, jednakże w ciągu dziesięciolecia jego istnienia zwiększyła się liczba wskazań jego stosowania. Obecnie jest używany w leczeniu

większości chłoniaków nieziarnicznych wykazujących ekspresję antygenu CD20, a także w wielu chorobach o podłożu autoimmunizacyjnym oraz w transplantologii (tab. 2).

ANTYGEN CD20

Cząsteczką docelową dla rytuksymabu jest antygen CD20, który został zidentyfikowany już prawie 30 lat temu jako marker limfocytów B. Jest to białko zlokalizowane na niedojrzałych komórkach pre-B oraz dojrzałych limfocytach B, nie ma go natomiast na wcześniejszych komórkach prekursorowych ani też na komórkach plazmatycznych [83] (ryc. 1). Dzięki temu podczas terapii organizm nie zostaje całkowicie pozbawiony odpowiedzi humoralnej, a liczba limfocytów B wraca do normy w ciągu 9–12 miesięcy po zakończeniu leczenia [50]. Wraz z wiekiem wzrasta ekspresja cząsteczek CD20 na powierzchni limfocytów B [33].

Antygen CD20 (B1, Bp35) jest tetraspaniną, należącą do rodziny białek MS4A. Gen dla niego znajduje się w chromosomie 11. Obecnie do tej rodziny zalicza się 16 białek, m.in. podjednostkę β receptora Fc ϵ RI dla IgE oraz białko będące regulatorem cyklu komórek hematopoetycznych – HTm4 [27]. Cząsteczka CD20 zbudowana jest z 297 aminokwasów i wyróżnia się 3 jej izoformy o masach 33, 35 oraz 37 kDa, których występowanie wiąże się z różnym stopniem fosforylacji reszt serynowych i treoninowych domen cytoplazmatycznych [83]. Antygen CD20 przechodzi cztery razy przez błonę komórkową zarówno koniec C, jak i N położone są w cytoplazmie, a pomiędzy regionami transbłonowymi wyróżnia się dwie pętle: dużą (44 aminokwasy) zlokalizowaną między



RYCINA 1. Zmiana ekspresji markerów powierzchniowych podczas dojrzewania limfocytów B

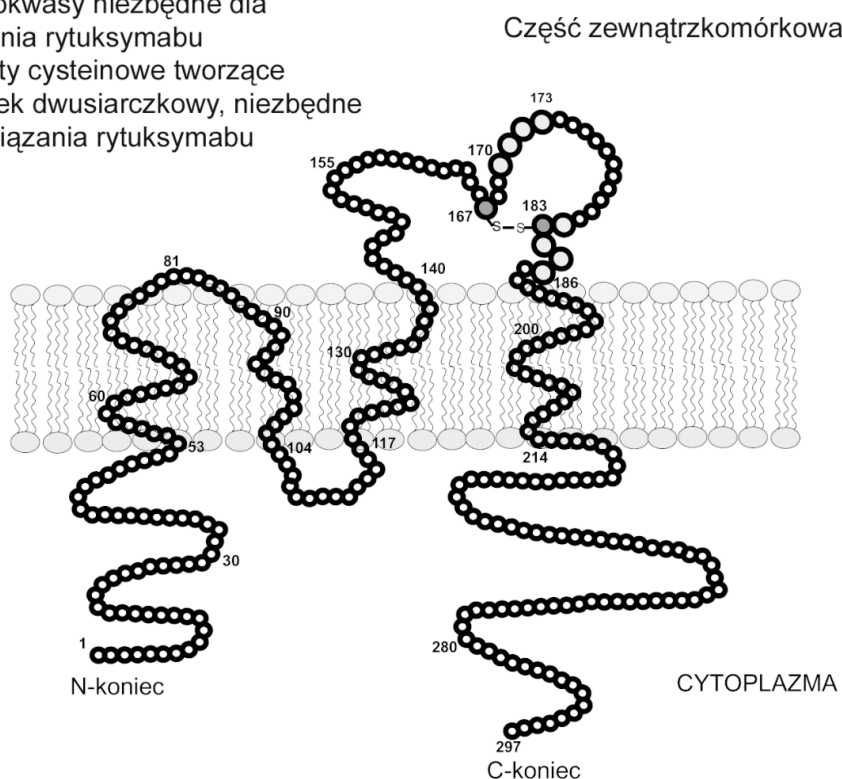
3 a 4 regionem transbłonowym i odpowiedzialną za wiązanie przeciwciał oraz małą (7 aminokwasów) między 1 a 2 regionem transbłonowym, która prawdopodobnie pozostaje cały czas w błonie [27] (ryc. 2).

Jak dotąd nie znaleziono naturalnego ligandu dla antygenu CD20, jak również nie do końca znana jest rola tego białka. Tworzy on razem z CD40 i MHC klasy II oligocząsteczkową strukturę na powierzchni limfocytu [52] i przypuszczalnie pełni rolę kanału wapniowego, uczestnicząc w aktywacji, proliferacji i różnicowaniu limfocytów B [53]. Sekwencja aminokwasowa ludzkiego antygenu CD20 wykazuje w 73% zgodność z sekwencją mysiego CD20, a transgeniczne myszy pozbawione genu dla CD20 nie wykazują żadnych zaburzeń w odpowiedzi humoralnej [90].

Z jednej strony pod wpływem cytokin, takich jak IFN- α , GM-CSF czy TNF, wzrasta ekspresja CD20 [98], która zależy od fosforylacji ERK1/2, ale nie od kinazy MAP p38 [104], a z drugiej strony pod wpływem aktywacji CD40 – jego poziom dramatycznie maleje na skutek internalizacji [4], tak jak ma to miejsce podczas przekształcania się limfocytu B w komórkę plazmatyczną.

Związanie CD20 przez przeciwciało wyzwała szereg różnorodnych reakcji, takich jak: indukcja ekspresji onkogenów c-myc i B-myb, wzrost fosforylacji samego CD20, jak i innych białek komórkowych, a także wzrost ekspresji cząsteczek powierzchniowych: CD18, CD58 oraz MHC klasy II [27]. Jednakże to co się wydarzy w komórce ściśle zależy od specyficzności danego przeciwciała. I tak np. przeciwciało 1F5 indukuje przejście komórki z fazy G_0 do G_1 , podczas gdy przeciwciało B1 hamuje przejście z G_1

- Aminokwasy niezbędne dla wiązania rytuksymabu
- Reszty cysteinowe tworzące mostek dwusiarczkowy, niezbędne dla wiązania rytuksymabu



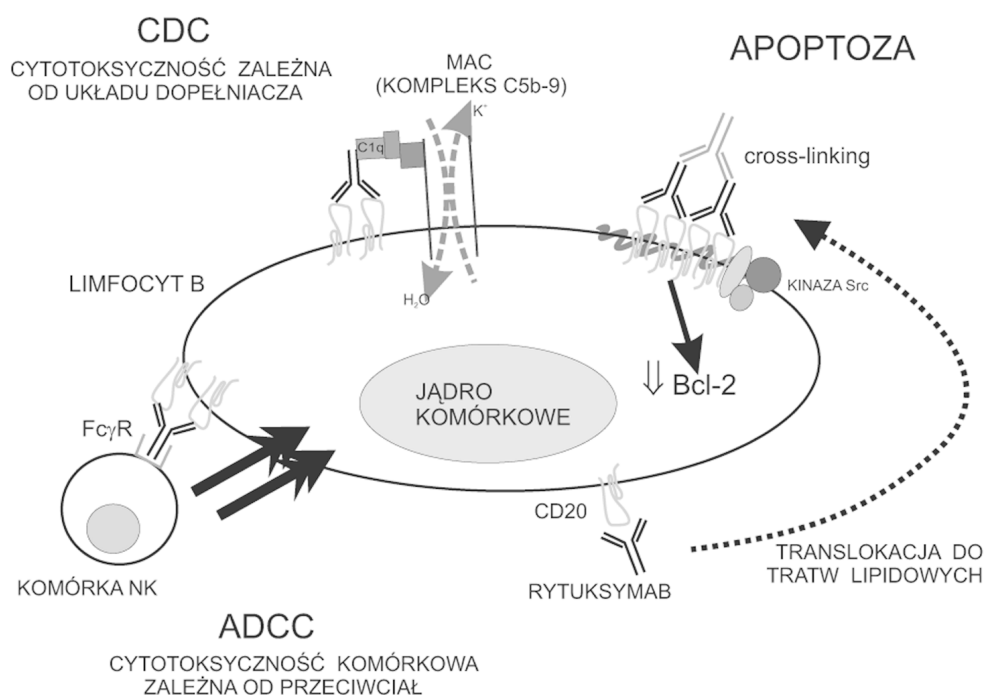
RYCINA 2. Budowa antygenu CD20

do S/G₂ [17]. Dlatego tak ważne było ustalenie, który fragment antygenu CD20 rozpoznaje rytuksymab. Wcześniej stwierdzono, że jest to fragment zlokalizowany w dużej pętli i że kluczową rolę odgrywają dwa aminokwasy: alanina w pozycji 170 i prolina w 172 [69]. Obecnie ustalono, że epitop ma charakter nieciągły i przeciwciało wiąże dwie sekwencje (170)Ala-Asn-Pro-Ser(173) oraz (182)Tyr-Cys-Tyr-Ser-Ile(186) zbliżone do siebie dzięki mostkowi disiarczkowemu utworzonemu między resztami cysteiny w pozycjach 167 i 183 [10].

Antygen CD20 został wybrany nieprzypadkowo, ma on bowiem kilka właściwości pożądaných w terapii celowanej. Po pierwsze jest charakterystyczny tylko dla limfocytów B, po drugie – nie ma formy rozpuszczalnej, ani nie jest złuszczany z powierzchni komórki, dzięki czemu rytuksymab nie jest neutralizowany w surowicy przed połączeniem z komórką docelową i wreszcie po trzecie – nie podlega internalizacji po połączeniu z rytuksymabem, przez co komórki nie zmniejszają swojej wrażliwości na to przeciwciało. Ostatnio pojawiły się doniesienia o obecności CD20 na komórkach chłoniaków wywodzących się z limfocytów T [85], obecności krążących CD20 u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową [59], czy spadku ekspresji CD20 podczas leczenia rytuksymabem [47], jednakże zdają się to być rzadkie sytuacje.

MECHANIZM DZIAŁANIA RYTUKSYMABU

Nie wyjaśniono jeszcze wszystkich wątpliwości związanych z mechanizmem działania rytuksymabu, jednakże uważa się, że decydującą rolę odgrywa aktywacja kaskady dopełniacza (CDC) oraz cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał (ADCC). Ponadto ważny jest fakt uwrażliwiania komórek nowotworowych na stosowaną standardową chemioterapię. Postuluje się także jego działanie antyproliferacyjne, indukujące apoptozę oraz „szczepionkowe” (ryc. 3).



RYCINA 3. Mechanizmy aktywności terapeutycznej rytuksymabu

Układ dopełniacza

Układ dopełniacza tworzy około 30 białek, których aktywacja może nastąpić na trzy sposoby: drogą klasyczną, alternatywną oraz lektynową. Dopełniacz pełni wiele ważnych funkcji w organizmie, takich jak: liza komórek bakteryjnych, pasożytniczych czy nowotworowych, opsonizacja komórek ułatwiająca fagocytozę, a także chemotaksja i aktywacja komórek żernych oraz usuwanie kompleksów immunologicznych. Droga klasyczna aktywowana jest przez przeciwciała klasy IgG (oprócz IgG4) oraz IgM, droga alternatywna rozpoczyna się spontanicznie i atakuje każdą dostępną błonę biologiczną, także błony komórek własnego organizmu, jednakże jest na nich

unieszkodliwiana. Natomiast droga lektynowa jest aktywowana nie przez przeciwciała, ale przez kolektyny – białka nieswoiście wiążące grupy cukrowe na powierzchni drobnoustrojów. Do kolektyń należą m.in. białka surfaktantu płucnego A i D oraz lektyna wiążąca mannozę (MBL), występująca w osoczu.

Rytuksymab, jako przeciwciało, aktywuje dopełniacz drogą klasyczną. Jego fragment Fc wiąże składnik C1q, co uruchamia całą kaskadę reakcji prowadzącą do utworzenia kompleksu atakującego błonę C5b-9 (MAC). Tworzy on w błonie komórkowej kanał, przez który z komórki wypływają jony, ATP i substancje odżywcze, a wnikają: woda, czynniki bakteriobójcze (np. lizozym) oraz antybiotyki, co w efekcie kończy się lizą komórki.

Stopień aktywacji dopełniacza uzależniony jest od dwóch czynników: od rodzaju komórek i od typu przeciwciała. Stwierdzono, że dopełniacz najskuteczniej niszczy komórki chłoniaka grudkowego i płaszczą, słabiej chłoniaka z dużych komórek B, a najslabiej komórki przewlekłej białaczki limfocytowej [58]. Wiąże się to z poziomem ekspresji CD20 na powierzchni komórek docelowych. Ważny jest także rodzaj przeciwciała, tzn. jego klasa (dopełniacz aktywują tylko IgG1-3 oraz IgM), a także rozpoznawany epitop. Przeciwciała, takie jak rytuksymab, 1F5 czy HI47, wykazują bardzo dobrą aktywność cytolityczną, w przeciwieństwie do takich, jak: B1, 2H7 czy LT20 [18]. Te pierwsze po związaniu się z antygenem, wywołują migrację CD20 do tratw lipidowych (ang. *lipid rafts*), które są małymi (10–200 nm), wysoce dynamicznymi, bogatymi w cholesterol i sfingolipidy domenami w błonie komórkowej związanymi z przekazywaniem sygnału [79]. Wykazano, że stopień (szybkość) translokacji i grupowania się CD20 w tratwach dodatnio koreluje z efektywnością CDC [18].

Istnieje szereg badań stwierdzających, że działanie rytuksymabu związane jest głównie z aktywacją kaskady dopełniacza. Potwierdza to między innymi doświadczenie, w którym myszom wszczepiono komórki chłoniaka EL4 transfekowane ludzkim cDNA dla CD20. Zwierzęta, które były genetycznie pozbawione składnika C1q dopełniacza, nie odpowiadały na leczenie rytuksymabem [21]. Ponadto zaobserwowano, że u ludzi główne działania niepożądane występujące podczas infuzji rytuksymabu i krótko po niej są związane ze znacznym wzrostem we krwi stężenia składników aktywowanego układu dopełniacza, głównie C3b oraz C4b [93].

Komórki, żeby bronić się przed niepożądaną aktywacją układu dopełniacza, która w surowicy może zachodzić spontanicznie, mają na swojej powierzchni szereg inhibitorów. Za najważniejsze uważa się trzy z nich: CD46 (błonowy kofaktor białkowy wiążący składniki C3b i C4b), CD55 (czynnik przyspieszający rozkład konwertaz C3 i C5) oraz CD59 (blokuje kompleks atakujący błonę). Powyższe inhibitory są obecne także na komórkach nowotworowych, co mogłoby powodować zwiększenie ich oporności na leczenie. O ile udowodniono zależność między poziomem ekspresji CD20 i skutecznością rytuksymabu, choć krzywa opisująca tę zależność nie jest linią prostą, a ma raczej charakter krzywej sigmoidalnej [94], o tyle nie znaleziono istotnej korelacji między poziomem ekspresji CD46, CD55 i CD59 a efektywnością rytuksymabu [99]. Część prac wskazuje, że o stopniu skuteczności rytuksymabu decyduje stosunek CD20 do łącznej ilości inhibitorów na powierzchni komórki, co wydaje się być w zgodzie z wykazanym doświadczalnie zwiększeniem skuteczności dopełniacza poprzez blokowanie CD59 oraz w mniejszym stopniu CD46 i CD55 z użyciem innych przeciwciał [58].

Ponadto zaobserwowano, że w wyniku aktywacji dopełniacza dochodzi w komórce do nagromadzenia się reaktywnych form tlenu, takich jak: O_2^- , OH^* czy H_2O_2 , których poziom korelował dodatnio ze stopniem ekspresji CD20 [6].

Cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał

Kolejnym sposobem niszczenia komórek przez rytuksymab jest cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał, która zdaje się być nie mniej ważna niż aktywacja układu dopełniacza. Po związaniu antygenu CD20 rytuksymab może aktywować komórki efektorowe za pośrednictwem receptora dla fragmentu Fc przeciwciała. Komórkami efektorowymi mogą być m.in. monocyty, makrofagi, neutrofile, eozynofile czy komórki NK, które niszczą komórki docelowe w drodze fagocytozy bądź też poprzez uwolnienie enzymów cytolitycznych ze swoich ziarnistości. Fragment Fc rytuksymabu jest rozpoznawany przez receptory z rodziny $Fc\gamma R$, wśród których wyróżnia się obecnie 4 typy: $Fc\gamma RI$ (CD64), $Fc\gamma RIIA$, B i C (CD32), $Fc\gamma RIII$ (CD16) oraz $Fc\gamma RIV$ (CD16b). Wszystkie te receptory aktywują komórkę efektorową, oprócz receptora $Fc\gamma RIIB$, który przekazuje sygnał supresyjny, głównie limfocytom B.

Zaobserwowano, że u myszy pozbawionych receptora $Fc\gamma RIIB$ aktywność cytotoksyczna rytuksymabu jest o wiele wyższa niż w warunkach prawidłowych (swoista nadwrażliwość na rytuksymab). Natomiast u myszy pozbawionych receptora $Fc\gamma RI$ czy też $Fc\gamma RIII$ zahamowanie wzrostu guza przez to przeciwciało monoklonalne nie jest możliwe [16].

Ponadto wykazano wpływ polimorfizmu receptora $Fc\gamma RIII$ na skuteczność działania przeciwnowotworowego rytuksymabu. Dimorfizm genu *FCGR3A*, związany z zamianą fenyloalaniny z waliną w pozycji 158, prowadzi do tego, że homozygoty z waliną mają większe powinowactwo do ludzkiej IgG1. Co za tym idzie, skuteczność ADCC jest u nich większa niż u homozygot z fenyloalaniną bądź też heterozygot [19]. Zależność tę zaobserwowano u pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi i u osób z makroglobulinemią Waldenströma [100], jednak nie udało się tego potwierdzić u pacjentów chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową [28].

Obecnie trwają prace nad zwiększeniem skuteczności rytuksymabu poprzez wpływanie na ADCC. Uzyskano to między innymi poprzez podawanie łącznie z przeciwciałem rekombinowanej IL-2 [57] czy pozaustrojowo aktywowanych IFN- γ makrofagów [51]. Wykazano także, że przeciwciała monoklonalne anty-CD20 o większym powinowactwie do CD16 niż rytuksymab skuteczniej aktywują komórki NK nawet w mniejszym stężeniu i niezależnie od polimorfizmu receptora [12].

Jednakże ostatnio udowodniono też niechlubną rolę komórek efektorowych. Stwierdzono, że u osób z przewlekłą białaczką limfocytową dochodzić może do zmniejszenia ekspresji antygenu CD20 na powierzchni komórek, co było szczególnie widoczne przy stosowaniu wysokich, wysycających dawek rytuksymabu. Zaproponowano mechanizm, który można nazwać „zgoleniem” (ang. *shaving*). Otóż po opsonizacji komórki nowotworowej przez rytuksymab, jego fragment Fc łączy się z receptorem $Fc\gamma RI$ (ten typ ma być kluczowy) znajdującym się na makrofagach. Powstaje swego rodzaju synapsa immunologiczna, w obrębie której dochodzi do

oderwania fragmentu błony wokół kompleksu antygen CD20/rytuksymab i internalizacji go przez makrofag w swego rodzaju endocytozie nazwanej trogocytozą (z grec. *trogo* – odgryzać) [7]. Natomiast w badaniach klinicznych udowodniono, że stosowanie mniejszych dawek rytuksymabu, lecz częściej, zmniejsza to zjawisko i zwiększa efektywność przeciwciała [102].

Mechanizmy związane ze przekazywaniem sygnału przez CD20

Antyproliferacyjne, proapoptotyczne i uwrażliwiające na chemioterapeutyki działanie rytuksymabu wydaje się mieć wspólne podłoże molekularne.

Apoptoza klasycznie zachodzi dwoma szlakami: zewnętrznym i wewnętrznym. Ten pierwszy inicjowany jest przez pobudzenie receptorów śmierci, np. Fas (CD95) czy TRAIL-R. Skutkiem tego jest aktywacja kaspazy 8 bądź 10, które z kolei aktywują kaspazę 3. Dodatkowo może dochodzić do wzmocnienia sygnału w wyniku pobudzenia proapoptotycznego białka Bid aktywowanego przez kaspazę 8. Białko to przedostaje się do mitochondriów i aktywuje wewnętrzny szlak. Szlak wewnętrzny związany jest z oddziaływaniem różnych substancji, np. reaktywnych form tlenu z błoną mitochondrialną. Istotą tego mechanizmu jest uwolnienie cytochromu c, który tworzy kompleksy zwane apoptosomami, w wyniku czego dochodzi do aktywacji kaspazy 9, uczynniającej kaspazę 3. Jak widać, oba szlaki doprowadzają do aktywacji tej samej kaspazy egzekutorowej, a mianowicie kaspazy 3. Degraduje ona poli(ADP-rybozo)polimerazę (PARP – jeden z enzymów naprawiających uszkodzenia DNA), aktywuje fosfolipazę C oraz doprowadza do proteolizy inhibitora DNAzy, skutkiem czego dochodzi do fragmentacji DNA. Również rozpad komórek i powstanie ciałek apoptotycznych jest efektem proteolizy białek cytoszkieletu (np. aktyny) w wyniku działania kaspaz.

Obecnie wyróżnia się także apoptozę niezależną od kaspaz. Postuluje się rolę flawoproteiny AIF (ang. *apoptosis inducing factor*), kalpain – proteaz cysteinowych zależnych od wapnia, proteaz serynowych, takich jak białko Omi oraz katepsyn [9]. Te ostatnie mogą zostać uwolnione poprzez szlak ceramidowy, w którym dochodzi do aktywacji sfingomielinazy i ceramidazy. Skutkuje to rozpadem sfingomieliny i powstaniem fosforanu choline i ceramidu, z którego powstaje sfingozyna, akumulująca się w lizosomach. Jej nagromadzenie indukuje rozpad lizosomów oraz uwolnienie proteaz – katepsyn. Warto zauważyć, że reaktywne formy tlenu także mogą uwalniać katepsyny z lizosomów.

Forma monomeryczna rytuksymabu nie indukuje apoptozy. Jej wywołanie jest możliwe dopiero po związaniu dwóch cząsteczek rytuksymabu przeciwciałem rozpoznającym ich fragmenty Fc (ang. *cross-linking*) lub przy użyciu dimeru (tzw. homodimeru) [32] bądź też dekstranowego polimeru rytuksymabu, jeszcze skuteczniejszego od homodimeru [110]. Dla porządku należałoby wspomnieć, że istnieją przeciwciała anti-CD20 (np. B1), które same indukują apoptozę [17]. Natomiast pojedyncza cząsteczka rytuksymabu może tylko spowodować umiarkowane zatrzymanie cyklu w fazie G₁, co związane jest ze wzrostem kwaśnej sfingomielinazy w komórce i gromadzeniem w tratwach lipidowych ceramidu. To z kolei powoduje aktywację szlaku kinaz białkowych MAPK, szczególnie ERK oraz indukcję inhibitora cyklu komórkowego – białka p27 [8].

Indukcja apoptozy przez rytuksymab zależy jeszcze od innych czynników. Przede wszystkim niezbędna jest translokacja cząsteczek CD20 do tratw lipidowych [40]. Proces ten może być utrudniony przez zmniejszenie ilości cholesterolu w błonie komórkowej. Obecność cholesterolu wpływa także na stopień aktywacji kinaz z rodziny Src i wtórne gromadzenie wapnia oraz indukcję apoptozy [91]. Niedobór cholesterolu w błonie może także wpływać negatywnie na możliwości rozpoznawania antygeny CD20 przez przeciwciało, wskutek prawdopodobnego wpływu cholesterolu na konformację epitopu [68].

Rytuksymab może indukować apoptozę zarówno szlakiem zewnętrznym, jak i wewnętrznym, a także drogą niezależną od kaspaz. Odnosnie drogi zewnętrznej, rytuksymab może zwiększać ekspresję cząsteczki Fas (CD95) na powierzchni komórek docelowych, tzn. mających antygen CD20 [96], a także jej grupowanie w tratwach lipidowych, co ma wzmacniać przekazywanie sygnału proapoptotycznego [84].

Pojawiły się także doniesienia o aktywacji klasycznej wewnętrznej drogi apoptozy poprzez kaspazy 9 i 3 oraz wzrost poziomu rozszczepionej poli(ADP-rybozo)polimerazy [14]. Antygen CD20 związany jest w błonie z kinazami tyrozynowymi z rodziny Src: Fyn, Lck oraz p75/85, które uczestniczą w aktywacji fosfolipazy C γ [54]. Fosfolipaza ta ma plejotropowe działanie, m.in. katalizuje rozpad fosfatydyloinozytolu na diacyloglicerol i trifosforan inozytolu. Ten ostatni zwiększa stężenie wapnia w komórce poprzez uwolnienie go z siateczki endoplazmatycznej, co może zainicjować apoptozę. Ponadto opisano możliwość indukcji apoptozy w mechanizmie zależnym od kinaz MAP (p38, JNK oraz ERK), które mogą być aktywowane przez fosfolipazę C [67].

Opisano również alternatywną, niezależną od kaspaz ścieżkę apoptozy, w której nie zaobserwowano ich aktywacji, kondensacji chromatyny, degradacji PARP, ani fosfolipazy C, która jest rozszczepiana przez kaspazę 3 z utworzeniem aktywnego 40 kDa fragmentu [82, 92].

W regulacji apoptozy ważną rolę pełni rodzina białek Bcl-2. Podzielono ją na dwie grupy: białka proapoptotyczne (Bax, Bak, Bik, Bad, Bid, Bim) oraz na białka chroniące komórkę przed apoptozą (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w oraz Mcl-1). Chłoniaki grudkowe, czyli te, które stanowiły pierwsze wskazanie do zastosowania rytuksymabu, charakteryzuje translokacja chromosomalna t(14;18), która doprowadza do zwiększonej ekspresji białka Bcl-2. Uważa się, że jest ona kluczowa dla transformacji limfocyty. Standardowa chemioterapia nie jest w stanie wyeliminować z krwi obwodowej i ze szpiku komórek z tą translokacją, podczas gdy przy pomocy rytuksymabu z chemioterapią było możliwe uzyskanie całkowitej molekularnej remisji [38].

Chemioterapia, czyli leczenie cytostatykami stanowi najczęściej wykorzystywany i najważniejszy sposób leczenia chłoniaków. Rytuksymab wykazuje działanie synergistyczne z wieloma chemioterapeutykami, m.in. z lekami alkilującymi (cyklofosfamid [103], chlorambucyl [61] czy cisplatyna [62]), antymetabolitami (metotreksat [73], fludarabina [86]), antracyklinami (doksorubicyna [103]), taksoidami (paklitaksel [41]) czy lignanami (etopozyd [31]). Często stosuje się kombinacje powyższych leków, tzw. schematy, standardowo używane w leczeniu chłoniaków nieziarniczych, np. CHOP [109] czy też EPOCH [44], łącznie z rytuksymabem potęgującym ich skuteczność.

Obserwowany synergizm pozwoliłby na stosowanie mniejszych dawek leków powodujących mniej działań ubocznych.

Synergistycznie działające z rytuksymabem okazały się także glikokortykosteroidy, które działają antyproliferacyjnie i proapoptotycznie. Podawane jednocześnie z przeciwciałem nie wpływały na skuteczność ADCC ani CDC, natomiast preinkubacja z deksametazonem zwiększała skuteczność CDC, a zmniejszała ADCC. Ponadto podawanie sterydów w połączeniu z rytuksymabem zapobiega efektom ubocznym związanym z infuzją preparatu [74].

Pierwszy zaproponowany mechanizm, który tłumaczyłby obserwowany synergizm rytuksymabu i chemioterapii, jest związany z interleukiną 10. Wykazano, że rytuksymab hamuje jej transkrypcję i wydzielanie prawdopodobnie poprzez wpływ na aktywność kinazy MAP p38. Niedobór IL-10 wiązał się z obniżeniem poziomu fosforylacji i zdolności wiązania DNA przez czynnik transkrypcyjny STAT3. Przy braku tego aktywatora transkrypcji spadała także ekspresja antyapoptotycznego białka Bcl-2 [95].

W jednej z prac scharakteryzowano także synergizm działania rytuksymabu i paklitakselu. Oddzielnie oba leki nie indukowały programowanej śmierci komórki, natomiast ich połączenie wywierało silny efekt proapoptotyczny. Zaobserwowano, że w monoterapii rytuksymab selektywnie obniża ekspresję Bcl-xL i indukuje Apaf-1, podczas gdy paklitaksel obniża poziom Bcl-xL oraz poziom inhibitora białek apoptotycznych c-IAP-1, a także indukuje ekspresję białek Bad i Apaf-1. Natomiast ich kombinacja doprowadza do nagromadzenia w cytoplazmie cytochromu c, aktywacji kaspaz: 9, 7 oraz 3, a także rozszczepienia PARP [41].

A więc rytuksymab obniżając poziom białka Bcl-2, zmniejsza oporność komórek nowotworowych na indukcję apoptozy. Poniżej opisano dwa kolejne czynniki transkrypcyjne wpływające na ekspresję tego białka.

Udowodniono, że rytuksymab zwiększa ekspresję inhibitora kinazy białka Raf-1 (RKIP), co uniemożliwia fosforylację białek MEK1/2 oraz ERK1/2 przez Raf-1. Brak aktywnej formy białka ERK1/2 hamuje proliferację komórek, a także zmniejsza poziom czynnika AP-1 oraz jego zdolność do wiązania z DNA. Brak AP-1 wpływa hamująco na ekspresję Bcl-2 [43].

Wzrost aktywności RKIP po rytuksymabie wpływa także na obniżenie aktywności drugiego czynnika transkrypcyjnego, jakim jest NF- κ B, co także doprowadza do obniżenia poziomu Bcl-2 w komórce i ułatwia indukcję apoptozy szlakiem wewnętrznym [42]. Jednakże niedobór NF- κ B prowadzi również do uwrażliwienia komórki na indukcję apoptozy drogą zewnętrzną poprzez wzrost ekspresji na powierzchni komórek cząsteczek Fas. Brak NF- κ B prowadzi bowiem do obniżenia transkrypcji białka YY1, które to wiążąc się z promotorem genu dla Fas hamuje jego transkrypcję [97].

Reasumując, cytostatyki hamują podziały komórkowe i powodują rozmaite uszkodzenia subletalne (uszkodzenie nici DNA, zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu) indukując w komórce proces apoptozy. Rytuksymab zmniejszając ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2 uwrażliwia komórki na ich działanie. Oczywiście jak można się było spodziewać, nie czyni tego w jeden sposób, ale przez kilka szlaków prawdopodobnie zachodzących na siebie i wzajemnie się uzupełniających.

Warto dodać, że synergistyczny wpływ fludarabiny i rytuksymabu może wynikać jeszcze z jednego mechanizmu. A mianowicie fludarabina, analog nukleozydowy, obniża ekspresję na powierzchni komórki cząsteczek CD55 i CD59, co mogłoby zwiększać efektywność kaskady dopełniacza [22].

Ponadto, rytuksymab działa synergistycznie nie tylko z konwencjonalną chemioterapią, ale także z nowymi lekami, takimi jak immunotoksyna anti-CD19 (zawierająca saporynę – białko inaktywujące rybosomy) w leczeniu chłoniaka Burkitta [29] czy bortezomib w leczeniu przewlekłej białaczki limfocytowej [81]. Stworzono również immunotoksynę łącząc rytuksymab z kalichecyną, antybiotykiem antracyklinowym uszkadzającym strukturę DNA i wykorzystanym już w klinice w połączeniu z przeciwciałem monoklonalnym anti-CD33 (gemtuzumabem). Zwiększała ona toksyczność rytuksymabu nie upośledzając jego zdolności do aktywacji CDC i ADCC [23].

Efekt szczepionkowy

Część badaczy postuluje jeszcze jeden mechanizm działania rytuksymabu tzw. szczepionkowy związany z tym, że maksymalna odpowiedź na rytuksymab może niekiedy być odroczone w czasie. Wy tłumaczeniem może być fakt, że wskutek niszczenia komórek nowotworowych przez rytuksymab w mechanizmie CDC i ADCC we krwi zaczynają krążyć wolne antygeny tych komórek, które mogą zostać wychwycone przez komórki dendrytyczne i być zaprezentowane cytotoksycznym limfocytom T [71, 78]. Za tą teorią przemawia obserwowany czasem tzw. efekt wzmacniacza (ang. *booster effect*), czyli dobra i szybka odpowiedź na rytuksymab przy jego ponownym podaniu [20].

Podsumowując, należy zaznaczyć, że CDC, ADCC i apoptoza nie są mechanizmami niezależnymi i wzajemnie wykluczającymi się, a raczej wzajemnie się uzupełniającymi. W dodatku, poszczególne sposoby działania mogą mieć różny udział w efektywności rytuksymabu w różnych schorzeniach. Ostatnio także podkreśla się rolę mikrośrodowiska otaczającego komórkę, jako jednego z elementów determinujących skuteczność immunoterapii [34].

NIEPOŻĄDANE DZIAŁANIA RYTUKSYMABU

Z mechanizmami aktywności rytuksymabu związane są jego działania niepożądane. Większość efektów ubocznych jest stosunkowo łagodna (gorączka, dreszcze, nudności, bóle głowy, spadek ciśnienia, wysypka) i występuje głównie podczas pierwszego dożylnego podania leku. Odpowiedzialna jest za to nadmierna aktywacja układu dopełniacza. Zmierzone stężenie C3a-desArg (produkt degradacji C3, będący markerem aktywacji kaskady dopełniacza) było powyżej normy tylko u osób mających objawy związane z pierwszą dawką i występowało znacznie częściej u pacjentów z zajęciem szpikiem [36]. Gwałtownie może przebiegać zespół uwalniania cytokin (głównie IL-6, IL-8 oraz TNF) charakteryzujący się nasiloną dusznością, często z jednoczesnym

skurczem oskrzeli i niedotlenieniem, z towarzyszącą gorączką, dreszczami, sztywnością mięśni, pokrzywką i obrzękiem naczynioruchowym [2].

Groźnym powikłaniem obserwowanym tylko podczas leczenia procesów rozrostowych, a niespotykanym jak dotąd w przypadku chorób autoimmunizacyjnych, jest występujący w ciągu 12–24 h od podania leku zespół lizy guza. Związany jest, jak sama nazwa wskazuje, z gwałtownym rozpadem dużej liczby komórek (jego częstość znacząco się zwiększa, gdy we krwi jest ponad 25 000 komórek/ μ l) i występującymi wskutek tego zaburzeniami jonowymi: hiperkaliemią, hipokalcemią, hiperfosfatemią oraz ostrą niewydolnością nerek [63].

Ponieważ skutkiem działania rytuksymabu jest eliminacja limfocytów B, może dojść także do osłabienia odpowiedzi przeciwwakaźnej, zaburzenia odporności i wzrostu częstości infekcji. Z reguły są to rzadkie sytuacje, ale odnotowano śmiertelne przypadki reaktywacji wirusa HBV pod postacią piorunującego zapalenia wątroby [77], jak i oportunistycznego wirusa JC wywołującego postępującą wieloogniskową leukoencefalopatię [105].

ZASTOSOWANIA RYTUKSYMABU

Jak wcześniej wspomniano podanie rytuksymabu powoduje gwałtowny spadek liczby komórek CD20⁺ w krwioobiegu. Pierwotnie głównym celem rytuksymabu była eliminacja komórek nowotworowych, jednakże z czasem podjęto próby eliminacji limfocytów B, głównie w chorobach autoimmunizacyjnych, ale także i w transplantologii.

Procesy rozrostowe

Chłoniaki nieziarnicze stanowią heterogenną grupę zaburzeń limfoproliferacyjnych różniących się pod względem przebiegu klinicznego, leczenia i rokowania. Ich częstość w ostatnich dwudziestu latach wzrosła o ponad 70%, zajmując w USA piąte miejsce, zaraz po raku gruczołu krokowego, piersi, płuca i okrężnicy. Wzrost ten wiąże się głównie ze starzeniem się populacji, epidemią AIDS oraz zwiększającą się liczbą przeszczepionych narządów. Około 80–85% chłoniaków wywodzi się z limfocytów B, z czego około 90–95% wykazuje na swojej powierzchni ekspresję antygenu CD20 [38].

Chłoniak grudkowy jest najczęstszym chłoniakiem nieziarniczym o małej złośliwości (ang. *indolent, low-grade*). Chłoniaki z tej grupy rozwijają się w organizmie powoli, co utrudnia ich wstępne rozpoznanie. Pacjenci mogą żyć z chorobą wiele lat, jednak nieuchronnie prowadzi ona do śmierci. Stosowane leczenie ma na celu wyindukowanie jak najdłuższej remisji. Z reguły u chorych obserwuje się wysoki odsetek odpowiedzi przy pierwszym podejściu terapeutycznym, lecz istnieje ryzyko powtarzających się nawrotów choroby. Chorzy żyją przeciętnie 5–15 lat od chwili rozpoznania i są poddawani leczeniu od pięciu do sześciu razy [38]. Podczas każdego następnego leczenia obserwuje się mniejszy odsetek odpowiedzi. Obecnie rytuksymab jest zarejestrowany do leczenia

chłoniaków nieziarniczych typu grudkowego w III–IV stopniu klinicznego zaawansowania w przypadku oporności na chemioterapię lub w przypadku drugiej lub kolejnej wznowy po chemioterapii oraz u chorych uprzednio nieleczonych na nieziarnicze chłoniaki grudkowe III–IV stopnia klinicznego zaawansowania w skojarzeniu z chemioterapią wg schematu CVP. W tym ostatnim przypadku dodanie rytuksymabu spowodowało wzrost odpowiedzi na leczenie (OR – *overall response*) o 24%, a odpowiedzi całkowitej (CR – *complete response*) o 30%, ponadto wydłużył się okres, po jakim następowała wznowa, bez dodatkowej toksyczności [60].

Rytuksymab zarejestrowany jest także do leczenia chłoniaków rozlanych z dużych komórek B w skojarzeniu z chemioterapią CHOP. Ta postać jest najczęstszą postacią chłoniaków nieziarniczych. Zaliczana jest do grupy agresywnych (ang. *high-grade*), tzn. nieleczona może doprowadzić do śmierci w ciągu kilku miesięcy, jednakże istnieje szansa całkowitego wyzdrowienia. Zastosowanie rytuksymabu w połączeniu ze schematem CHOP pozwoliło na przedłużenie czasu przeżycia i zwiększało szanse wyleczenia, w porównaniu z samą chemioterapią CHOP.

Rytuksymab także próbuje się wykorzystać w leczeniu przewlekłej białaczki limfocytowej w skojarzeniu z chemioterapią [46], a także makroglobulinemii Waldenströma [45] oraz szpiczaka mnogiego, aczkolwiek w tym ostatnim średnio tylko 20% komórek nowotworowych wykazuje ekspresję CD20 [64].

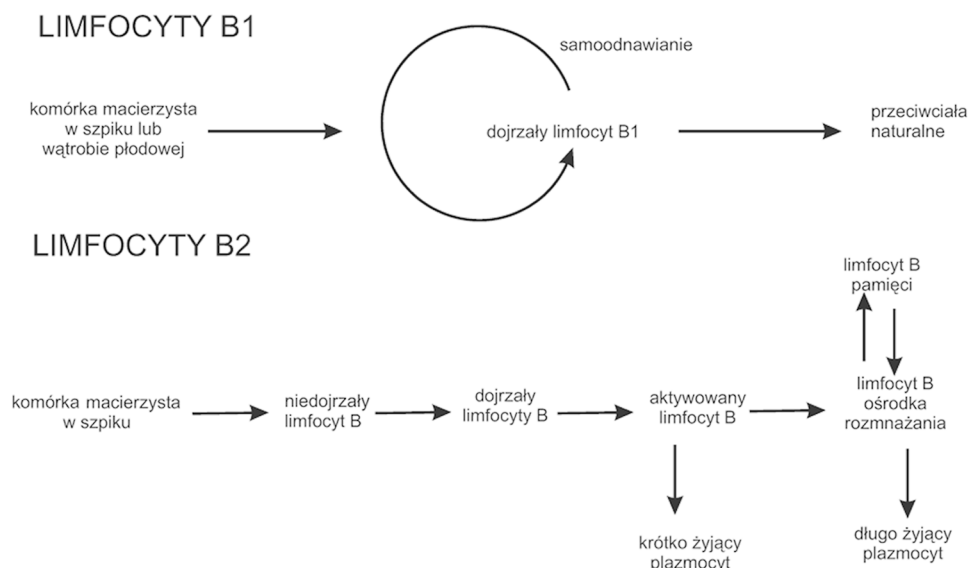
Choroby autoimmunizacyjne

Choroby autoimmunizacyjne to grupa chorób, w przebiegu których układ immunologiczny niszczy własne komórki i tkanki. Zgodnie z ostatnimi badaniami coraz większy udział w wielu chorobach przypisuje się limfocytom B. Dotychczas uważano, że kluczowa i inicjująca rola przypada głównie limfocytom T. I tak na przykład w reumatoidalnym zapaleniu stawów (RZS) wypracowany zgodny pogląd na patogenezę tej choroby zakładał inicjującą rolę limfocytów T, makrofagów oraz fibroblastów błony maziowej, natomiast limfocyty B miały odgrywać w tym procesie rolę drugorzędą [101].

Jednakże limfocyty B pełnią wiele funkcji w chorobach autoimmunizacyjnych: wytwarzają autoprzeciwciała, wydzielają cytokiny prozapalne, prezentują antygeny limfocytom T, potęgują ich aktywację, a także w miejscach przewlekłego stanu zapalnego biorą udział w indukcji ektopowych ognisk tkanki limfatycznej, tzw. neogenezie limfoidalnej [3].

Rytuksymab jest zarejestrowany, w połączeniu z metotreksatem (antymetabolit kwasu foliowego), do leczenia pacjentów z ciężkim reumatoidalnym zapaleniem stawów, u których odpowiedź na leczenie innymi lekami modyfikującymi przebieg choroby (w tym przynajmniej jednym inhibitorem TNF) jest niezadowalająca.

Na początku należałoby się zastanowić, czy i dlaczego rytuksymab może być skuteczny. Jego podanie powoduje w ciągu minut spadek krążących limfocytów B o ponad 90%, ale inne populacje limfocytów B są eliminowane już wolniej. Te z węzłów chłonnych i śledziony znikają w 60–70% w ciągu doby, natomiast liczba limfocytów B1 jamy otrzewnej znacząco obniża się dopiero po upływie tygodnia [35]. Jednakże stężenie immunoglobulin prawie się nie obniża, ponieważ głównie są one wytwarzane przez



RYCINA 4. Linie limfocytów B

komórki plazmatyczne. Poszukując wyjaśnienia wykazano, że w szpiku występują dwie populacje tych komórek: długo i krótko żyjące [80] (ryc. 4). Z niewiadomych przyczyn wytwarzanie autoprzeciwciał związane jest właśnie z tymi ostatnimi, co tłumaczyłoby dlaczego eliminacja limfocytów B wpływa na obniżenie stężenia czynnika reumatoidalnego (łącznie wszystkich izotypów IgM, IgG i IgA) w przebiegu kilku miesięcy nawet o 60% [15]. Co więcej odradzające się limfocyty B mają niedojrzały fenotyp, podobnie jak po przeszczepie szpiku czy krwi pępowinowej, czemu towarzyszy znaczny wzrost stężenia czynnika aktywującego limfocyty (BAFF) we krwi, ustępujący po normalizacji liczby limfocytów B. U około połowy pacjentów nawrót następuje kilka miesięcy, czasem lat po przywróceniu prawidłowej liczby limfocytów.

Obecnie proponowane są dwie teorie, które próbują tłumaczyć rolę rytuksymabu w RZS. Według pierwszej odbywa się to wskutek obniżenia stężenia kompleksów immunologicznych w błonie maziowej dzięki eliminacji limfocytów B, niezbędnych właśnie do odnowienia się puli krótko żyjących plazmocytów wytwarzających autoprzeciwciała, skutkiem czego zmniejsza się także wytwarzanie przez makrofagi TNF [24]. Druga teoria zakłada, że eliminacja limfocytów B, będących komórkami prezentującymi antygen, zmniejsza aktywację limfocytów T i tym samym zależne od nich zapalenie błony maziowej [101].

Rytuksymab okazuje się być skuteczny w hamowaniu postępu tej choroby, szczególnie u osób z podwyższonymi wartościami czynnika reumatoidalnego, jednakże wymaga on wielokrotnego podawania [70]. Użycie rytuksymabu jest też bardzo obiecujące w innych chorobach autoimmunizacyjnych, takich jak: choroba Gravesa-Basedowa [75], toczeń trzewny układowy [25], idiopatyczna plamica małopłytkowa [5], autoimmunizacyjna

niedokrwistość hemolityczna [37], krioglobulinemia [13], neuropatia IgM [48] czy też pęcherzyca zwykła [26].

Nie powoduje on wyleczenia, ale często wywołuje długie remisje. Dodatkową zaletą rytuksymabu w porównaniu z innymi lekami (np. glikokortykosteroidami) stosowanymi standardowo w tego rodzaju schorzeniach jest niska toksyczność. Jednakże, żeby właściwie ocenić potencjał rytuksymabu potrzeba lat, ponieważ mimo wielu różnorodnych schorzeń pacjenci z chorobami autoimmunizacyjnymi nie stanowią dużego odsetka chorych, a tym samym grupy do uzyskiwania reprezentatywnych wyników.

TRANSPLANTOLOGIA

W ostatnich latach rytuksymab coraz częściej stosuje się w transplantologii. Przede wszystkim próbuje się leczyć zespoły limfoproliferacyjne występujące u osób po przeszczepie (PTLD) i otrzymujących leki immunosupresyjne – analogicznie do chłoniaków nieziarniczych, a także wykorzystać rytuksymab w zapobieganiu odrzucaniu przeszczepu oraz w transplantacjach niezgodnych w układzie ABO, jak i w odczulaniu pacjentów w układzie HLA.

Zespoły limfoproliferacyjne po transplantacji narządów występują z częstością 1–10%, która uzależniona jest od rodzaju organu, zakażenia wirusem EBV oraz ilości leków immunosupresyjnych [11]. Dlatego leczeniem z wyboru tych schorzeń jest zmniejszenie dawek immunosupresji, a dopiero później ewentualna chemioterapia, mająca wiele działań niepożądanych. Ponieważ duża część komórek rozrostowych wykazuje ekspresję CD20, rytuksymab znalazł tutaj swoje zastosowanie. Był on lepiej tolerowany i po jego zastosowaniu wystąpił mniejszy odsetek wznów niż po chemioterapii [66].

Myśląc o ostrym odrzucaniu przeszczepu mamy na względzie proces związany z limfocytami T. Jednakże rośnie grupa pacjentów opornych na tradycyjną terapię nastawioną na zahamowanie aktywacji właśnie tych limfocytów. Wykazano ostatnio, że w procesie ostrego odrzucania serca dochodzi do nagromadzenia się złożeń IgG i elementów dopełniacza w naczyniach [30], a obecność w biopsjach nerki komórek CD20⁺ zmniejszała przeżycie przeszczepu [39]. I w tych przypadkach rytuksymab okazał się skuteczny, często w połączeniu z plazmaferezą i immunoglobulinami podawanymi dożylnie (IVIG).

Istotnym problemem jest także niezgodność w układzie MHC i ABO. Biorcy, którzy są uczuleni na wiele antygenów HLA, o wiele dłużej czekają na przeszczep, a ryzyko odrzucenia narządu jest większe. W okresie oczekiwania próbuje się zmniejszyć ilość przeciwciał anty-HLA w surowicy przez plazmaferezę lub immunoadsorpcję. Tu także eksperymentalnie wykorzystuje się rytuksymab. Co więcej stosuje się go także w przeszczepach niezgodnych w układzie ABO. Kiedyś taki zabieg wymagał wykonania również splenektomii, od której przy zastosowaniu rytuksymabu i immunoadsorpcji część ośrodków odchodzi [89, 108].

Początkowe wyniki są zachęcające, jednakże wymagają dalszych badań przed sformułowaniem wytycznych zgodnie z duchem dzisiejszej medycyny opartej na dowodach (EBM).

INNE FARMACEUTYKI ANTY-CD20

Rytuksymab nie jest jedynym przeciwciałem monoklonalnym rozpoznającym cząsteczkę CD20. Istnieją jeszcze dwa zarejestrowane przez FDA, ale w badaniach klinicznych jest kilka innych farmaceutyków, nie tylko przeciwciał, wykorzystujących antygen CD20 jako cel terapii.

W leczeniu chłoniaków nieziarniczych zarejestrowane są dwa mysie przeciwciała monoklonalne połączone z radioizotopami: ibritumomab oraz tositumomab. Ibritumomab jest mysim przeciwciałem w klasie IgG1, rozpoznającym ten sam epitop co rytuksymab. Połączony jest kowalencyjnie ze związkiem chelatującym metale – tiuksetanem, który wiąże radioaktywny itr (^{90}Y). Natomiast tositumomab to mysie przeciwciało klasy IgG2 α związane bezpośrednio z promieniotwórczym jodem (^{131}I). Zarówno ^{131}I , jak i ^{90}Y emitują promieniowanie β , ale ^{90}Y o wyższej energii i większej odległości penetracji w tkankach, natomiast ^{131}I dodatkowo emituje promieniowanie γ [56]. Oba przeciwciała oprócz promieniowania, niszczą komórki docelowe także poprzez aktywację dopełniacza, jak i ADCC – oczywiście nieco słabiej niż rytuksymab, gdyż mają mysie fragmenty Fc. Oba immunokoniugaty działają toksycznie na szpik na wszystkie linie hematopoetyczne, indukują tworzenie przeciwciał przeciw mysim immunoglobulinom (HAMA) i zarazem mają krótszy okres półtrwania niż rytuksymab, co jest akurat pozytywne ze względu na ewentualne niebezpieczeństwo gromadzenia się radionuklidów w organizmie. Stosuje się je w leczeniu chłoniaków nieziarniczych, głównie nawrotów, także tych opornych na rytuksymab [76].

Aby zmniejszyć immunogenność przeciwciał, dąży się do uzyskiwania humanizowanych i całkowicie ludzkich pochodnych. Ocrelizumab jest humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym anty-CD20. Obecnie jest w fazie badań klinicznych (niedawno zakończono II fazę) w leczeniu chłoniaków nieziarniczych i reumatoidalnego zapalenia stawów [106].

Natomiast ofatumumab (2F2 – HuMax-CD20) jest całkowicie ludzkim, otrzymywanym z myszy transgenicznych przeciwciałem monoklonalnym, rozpoznającym inny epitop niż rytuksymab – prawdopodobnie zlokalizowany w obu pętlach [88]. Aktualnie jest w trakcie III fazy badań klinicznych w leczeniu chłoniaków nieziarniczych, przewlekłej białaczki limfocytowej oraz reumatoidalnego zapalenia stawów. Prace eksperymentalne pokazują, że przeciwciało to znacznie silniej wiąże się z antygenem CD20 (po 3 h od CD20 oddysocjowuje 70–80% cząsteczek rytuksymabu i tylko 20–30% ludzkiego przeciwciała 2F2). Wykazuje także większą zdolność do aktywacji dopełniacza (mimo że fragment Fc rytuksymabu i HuMAX-CD20 jest identyczny) i zabijania komórek z niską ekspresją CD20 niewrażliwych na rytuksymab [87].

Kolejny farmaceutyk skierowany przeciwko antygenowi CD20 jest zaliczany do grupy określanej jako SMIP (ang. *small modular immunopharmaceutical drugs*). Jest on jednołańcuchowym polipeptydem silnie wiążącym się z antygenem CD20, aktywującym ADCC, natomiast z celowo obniżoną zdolnością do aktywacji kaskady dopełniacza. Obecnie jest w II fazie badań klinicznych w leczeniu RZS [107].

Trwają także prace eksperymentalne nad ciekawym pomysłem, jakim jest tworzenie mimotopów, czyli małych peptydów naśladujących antygen, w tym przypadku CD20. Ich podanie ma na celu wyindukowanie w organizmie przeciwciał anti-CD20, które same niszczyłyby komórki nowotworowe lub limfocyty B w chorobach autoimmunizacyjnych. Można powiedzieć, że byłaby to swego rodzaju pozytywna autoagresja, aczkolwiek skutki takiej terapii trudno na dzień dzisiejszy do końca przewidzieć [55].

WNIOSKI

Leczenie biologiczne staje się ważnym elementem terapii. Powstaje coraz to więcej leków przeciwko konkretnym antygenom (CD20, CD22 czy CD52) czy cytokinom (IL-6, TNF). Gdy w 1997 roku pojawił się rytuksymab zarejestrowany do leczenia chłoniaków nieziarniczych, nikt nie spodziewał się, że w ciągu 10 lat znajdzie on zastosowanie w tak wielu dziedzinach medycyny, na pozór nie mających ze sobą nic wspólnego, takich jak: hematologia, reumatologia, dermatologia czy transplantologia. Należy podkreślić, że dołączenie rytuksymabu do standardowo używanych chemioterapeutyków poprawiło wyniki leczenia wielu chorób, nie zwiększając przy tym toksyczności terapii. Natomiast poszukiwania dokładnych mechanizmów jego działania przyczyniły się do lepszego poznania fizjologii limfocytów B i zrozumienia ich udziału w patogenezie wielu schorzeń.

LITERATURA

- [1] ADAMS GP, WEINER LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 2005; **23**(9): 1147–1157.
- [2] AGARWAL A, VIEIRA CA, BOOK BK, SIDNER RA, FINEBERG NS, PESCOVITZ MD. Rituximab, anti-CD20, induces *in vivo* cytokine release but does not impair *ex vivo* T-cell responses. *Am J Transplant* 2004; **4**(8): 1357–1360.
- [3] ALOISI F, PUJOL-BORRELL R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**(3): 205–217.
- [4] ANOLIK J, LOONEY RJ, BOTTARO A, SANZ I, YOUNG F. Down-regulation of CD20 on B cells upon CD40 activation. *Eur J Immunol* 2003; **33**(9): 2398–2409.
- [5] ARNOLD DM, DENTALI F, CROWTHER MA, MEYER RM, COOK RJ, SIGOUIN C, FRASER GA, LIM W, KELTON JG. Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* 2007; **146**(1): 25–33.
- [6] BELLOSILLO B, VILLAMOR N, LOPEZ-GUILLERMO A, MARCE S, ESTEVE J, CAMPO E, COLOMER D, MONTSERRAT E. Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated *in vitro* by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood* 2001; **98**(9): 2771–2777.
- [7] BEUM PV, KENNEDY AD, WILLIAMS ME, LINDORFER MA, TAYLOR RP. The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes. *J Immunol* 2006; **176**(4): 2600–2609.
- [8] BEZOMBES C, GRAZIDE S, GARRET C, FABRE C, QUILLET-MARY A, MULLER S, JAFFREZOU JP, LAURENT G. Rituximab antiproliferative effect in B-lymphoma cells is associated with acid-sphingomyelinase activation in raft microdomains. *Blood* 2004; **104**(4): 1166–1173.
- [9] BIELAK-ŻMIJEWSKA A. Mechanizmy oporności komórek nowotworowych na apoptozę. *Kosmos, Problemy nauk biologicznych*. 2003; **259–260**: 157–171.

- [10] BINDER M, OTTO F, MERTELSMANN R, VEELKEN H, TREPEL M. The epitope recognized by rituximab. *Blood* 2006; **108**(6): 1975–1978.
- [11] BLAES AH, PETERSON BA, BARTLETT N, DUNN DL, MORRISON VA. Rituximab therapy is effective for posttransplant lymphoproliferative disorders after solid organ transplantation: results of a phase II trial. *Cancer* 2005; **104**(8): 1661–1667.
- [12] BOWLES JA, WANG SY, LINK BK, ALLAN B, BEUERLEIN G, CAMPBELL MA, MARQUIS D, ONDEK B, WOOLDRIDGE JE, SMITH BJ, BREITMEYER JB, WEINER GJ. Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab. *Blood* 2006; **108**(8): 2648–2654.
- [13] BRYCE AH, DISPENZIERI A, KYLE RA, LACY MQ, RAJKUMAR SV, INWARDS DJ, YASENCHAK CA, KUMAR SK, GERTZ MA. Response to rituximab in patients with type II cryoglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2006; **7**(2): 140–144.
- [14] BYRD JC, KITADA S, FLINN IW, ARON JL, PEARSON M, LUCAS D, REED JC. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab *in vivo* in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood* 2002; **99**(3): 1038–1043.
- [15] CAMBRIDGE G, LEANDRO MJ, EDWARDS JC, EHRENSTEIN MR, SALDEN M, BODMAN-SMITH M, WEBSTER AD. Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; **48**(8): 2146–2154.
- [16] CLYNES RA, TOWERS TL, PRESTA LG, RAVETCH JV. Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000; **6**(4): 443–446.
- [17] CRAGG MS, GLENNIE MJ. Antibody specificity controls *in vivo* effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood* 2004; **103**(7): 2738–2743.
- [18] CRAGG MS, MORGAN SM, CHAN HT, MORGAN BP, FILATOV AV, JOHNSON PW, FRENCH RR, GLENNIE MJ. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 2003; **101**(3): 1045–1052.
- [19] DALL'OZZO S, TARTAS S, PAINTAUD G, CARTRON G, COLOMBAT P, BARDOS P, WATIER H, THIBAUT G. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res* 2004; **64**(13): 4664–4669.
- [20] DAVIS TA, GRILLO-LOPEZ AJ, WHITE CA, MCLAUGHLIN P, CZUCZMAN MS, LINK BK, MALONEY DG, WEAVER RL, ROSENBERG J, LEVY R. Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *J Clin Oncol* 2000; **18**(17): 3135–3143.
- [21] DI GAETANO N, CITTEA E, NOTA R, VECCHI A, GRIECO V, SCANZIANI E, BOTTO M, INTRONA M, GOLAY J. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab *in vivo*. *J Immunol* 2003; **171**(3): 1581–1587.
- [22] DI GAETANO N, XIAO Y, ERBA E, BASSAN R, RAMBALDI A, GOLAY J, INTRONA M. Synergism between fludarabine and rituximab revealed in a follicular lymphoma cell line resistant to the cytotoxic activity of either drug alone. *Br J Haematol* 2001; **114**(4): 800–809.
- [23] DIJOSEPH JF, DOUGHER MM, ARMELLINO DC, KALYANDRUG L, KUNZ A, BOGHAERT ER, HAMANN PR, DAMLE NK. CD20-specific antibody-targeted chemotherapy of non-Hodgkin's B-cell lymphoma using calicheamicin-conjugated rituximab. *Cancer Immunol Immunother* 2007; **56**(7): 1107–1117.
- [24] EDWARDS JC, SZCZEPANSKI L, SZECHINSKI J, FILIPOWICZ-SOSNOWSKA A, EMERY P, CLOSE DR, STEVENS RM, SHAW T. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004; **350**(25): 2572–2581.
- [25] EISENBERG R. Targeting B cells in SLE: the experience with rituximab treatment (anti-CD20). *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2006; **6**(4): 345–350.
- [26] EL TAL AK, POSNER MR, SPIGELMAN Z, AHMED AR. Rituximab: a monoclonal antibody to CD20 used in the treatment of *Pemphigus vulgaris*. *J Am Acad Dermatol* 2006; **55**(3): 449–459.
- [27] ERNST JA, LI H, KIM HS, NAKAMURA GR, YANSURA DG, VANDLEN RL. Isolation and characterization of the B-cell marker CD20. *Biochemistry* 2005; **44**(46): 15150–15158.
- [28] FARAG SS, FLINN IW, MODALI R, LEHMAN TA, YOUNG D, BYRD JC. Fc gamma RIIa and Fc gamma RIIa polymorphisms do not predict response to rituximab in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2004; **103**(4): 1472–1474.
- [29] FLAVELL DJ, WARNES SL, BRYSON CJ, FIELD SA, NOSS AL, PACKHAM G, FLAVELL SU. The anti-CD20 antibody rituximab augments the immunospecific therapeutic effectiveness of an anti-CD19 immunotoxin directed against human B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2006; **134**(2): 157–170.
- [30] GARRETT HE JR, DUVAL-SEAMAN D, HELSLEY B, GROSHART K. Treatment of vascular rejection with rituximab in cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2005; **24**(9): 1337–1342.

- [31] GASPARETTO M, GENTRY T, SEBTI S, O'BRYAN E, NIMMANAPALLI R, BLASKOVICH MA, BHALLA K, RIZZIERI D, HAALAND P, DUNNE J, SMITH C. Identification of compounds that enhance the anti-lymphoma activity of rituximab using flow cytometric high-content screening. *J Immunol Methods* 2004; **292**(1–2): 59–71.
- [32] GHETIE MA, BRIGHT H, VITETTA ES. Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood* 2001; **97**(5): 1392–1398.
- [33] GINALDI L, DE MARTINIS M, D'OSTILIO A, MARINI L, LORETO F, MODESTI M, QUAGLINO D. Changes in the expression of surface receptors on lymphocyte subsets in the elderly: quantitative flow cytometric analysis. *Am J Hematol* 2001; **67**(2): 63–72.
- [34] GONG Q, OU Q, YE S, LEE WP, CORNELIUS J, DIEHL L, LIN WY, HU Z, LU Y, CHEN Y, WU Y, MENG YG, GRIBLING P, LIN Z, NGUYEN K, TRAN T, ZHANG Y, ROSEN H, MARTIN F, CHAN AC. Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol* 2005; **174**(2): 817–826.
- [35] HAMAGUCHI Y, UCHIDA J, CAIN DW, VENTURI GM, POE JC, HAAS KM, TEDDER TF. The peritoneal cavity provides a protective niche for B1 and conventional B lymphocytes during anti-CD20 immunotherapy in mice. *J Immunol* 2005; **174**(7): 4389–4399.
- [36] HARJUNPAA A, WIKLUND T, COLLAN J, JANES R, ROSENBERG J, LEE D, GRILLO-LOPEZ A, MERI S. Complement activation in circulation and central nervous system after rituximab (anti-CD20) treatment of B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2001; **42**(4): 731–738.
- [37] HEIDEL F, LIPKA DB, VON AUER C, HUBER C, SCHARRER I, HESS G. Addition of rituximab to standard therapy improves response rate and progression-free survival in relapsed or refractory thrombotic thrombocytopenic purpura and autoimmune haemolytic anaemia. *Thromb Haemost* 2007; **97**(2): 228–233.
- [38] HENNESSY BT, HANRAHAN EO, DALY PA. Non-Hodgkin lymphoma: an update. *Lancet Oncol* 2004; **5**(6): 341–353.
- [39] HIPPEN BE, DEMATTOS A, COOK WJ, KEW CE 2ND, GASTON RS. Association of CD20⁺ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute cellular rejection of renal allografts. *Am J Transplant* 2005; **5**(9): 2248–2252.
- [40] JANAS E, PRIEST R, WILDE JI, WHITE JH, MALHOTRA R. Rituxan (anti-CD20 antibody)-induced translocation of CD20 into lipid rafts is crucial for calcium influx and apoptosis. *Clin Exp Immunol* 2005; **139**(3): 439–446.
- [41] JAZIREHI AR, GAN XH, DE VOS S, EMMANOULIDES C, BONAVIDA B. Rituximab (anti-CD20) selectively modifies Bcl-xL and apoptosis protease activating factor-1 (Apaf-1) expression and sensitizes human non-Hodgkin's lymphoma B cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2003; **2**(11): 1183–1193.
- [42] JAZIREHI AR, HUERTA-YEPEZ S, CHENG G, BONAVIDA B. Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor-κB signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Cancer Res* 2005; **65**(1): 264–276.
- [43] JAZIREHI AR, VEGA MI, CHATTERJEE D, GOODGLICK L, BONAVIDA B. Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by Rituximab. *Cancer Res* 2004; **64**(19): 7117–7126.
- [44] JERMANN M, JOST LM, TAVERNA CH, JACKY E, HONEGGER HP, BETTICHER DC, EGLI F, KRONER T, STAHEL RA. Rituximab-EPOCH, an effective salvage therapy for relapsed, refractory or transformed B-cell lymphomas: results of a phase II study. *Ann Oncol* 2004; **15**(3): 511–516.
- [45] JOHNSON SA. Advances in the treatment of Waldenström's macroglobulinemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006; **6**(3): 329–334.
- [46] KAY NE, RAI KR, O'BRIEN S. Chronic lymphocytic leukemia: current and emerging treatment approaches. *Clin Adv Hematol Oncol* 2006; **4**(11 Suppl 22): 1–12.
- [47] KENNEDY AD, BEUM PV, SOLGA MD, DILILLO DJ, LINDORFER MA, HESS CE, DENSMORE JJ, WILLIAMS ME, TAYLOR RP. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol* 2004; **172**(5): 3280–3288.
- [48] KILIDIREAS C, ANAGNOSTOPOULOS A, KARANDREAS N, MOUSELIMI L, DIMOPOULOS MA. Rituximab therapy in monoclonal IgM-related neuropathies. *Leuk Lymphoma* 2006; **47**(5): 859–864.

- [49] KOHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; **256**(5517): 495–497.
- [50] LEANDRO MJ, CAMBRIDGE G, EHRENSTEIN MR, EDWARDS JC. Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; **54**(2): 613–620.
- [51] LEFEBVRE ML, KRAUSE SW, SALCEDO M, NARDIN A. *Ex vivo*-activated human macrophages kill chronic lymphocytic leukemia cells in the presence of rituximab: mechanism of antibody-dependent cellular cytotoxicity and impact of human serum. *J Immunother* 2006; **29**(4): 388–397.
- [52] LEVEILLE C, AL-DACCAK R, MOURAD W. CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines. *Eur J Immunol* 1999; **29**(1): 65–74.
- [53] LI H, AYER LM, LYTTON J, DEANS JP. Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts. *J Biol Chem* 2003; **278**(43): 42427–42434.
- [54] LI H, AYER LM, POLYAK MJ, MUTCH CM, PETRIE RJ, GAUTHIER L, SHARIAT N, HENDZEL MJ, SHAW AR, PATEL KD, DEANS JP. The CD20 calcium channel is localized to microvilli and constitutively associated with membrane rafts: antibody binding increases the affinity of the association through an epitope-dependent cross-linking-independent mechanism. *J Biol Chem* 2004; **279**(19): 19893–19901.
- [55] LI M, YAN Z, HAN W, ZHANG Y. Mimotope vaccination for epitope-specific induction of anti-CD20 antibodies. *Cell Immunol* 2006; **239**(2): 136–143.
- [56] LIEBENGUTH P, VOGT TEMPLE S. Radioimmunotherapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol Nurs* 2006; **22**(4): 257–266.
- [57] LOPES DE MENEZES DE, DENIS-MIZE K, TANG Y, YE H, KUNICH JC, GARRETT EN, PENG J, COUSENS LS, GELB AB, HEISE C, WILSON SE, JALLAL B, AUKERMAN SL. Recombinant interleukin-2 significantly augments activity of rituximab in human tumor xenograft models of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *J Immunother* 2007; **30**(1): 64–74.
- [58] MANCHES O, LUI G, CHAPEROT L, GRESSIN R, MOLENS JP, JACOB MC, SOTTO JJ, LEROUX D, BENSA JC, PLUMAS J. *In vitro* mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2003; **101**(3): 949–954.
- [59] MANSHOURI T, DO KA, WANG X, GILES FJ, O'BRIEN SM, SAFFER H, THOMAS D, JILANI I, KANTARJIAN HM, KEATING MJ, ALBITAR M. Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance. *Blood* 2003; **101**(7): 2507–2513.
- [60] MARCUS R, IMRIE K, BELCH A, CUNNINGHAM D, FLORES E, CATALANO J, SOLAL-CELIGNY P, OFFNER F, WALEWSKI J, RAPOSO J, JACK A, SMITH P. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood* 2005; **105**(4): 1417–1423.
- [61] MARTINELLI G, LASZLO D, BERTOLINI F, PASTANO R, MANCUSO P, CALLERI A, VANAZZI A, SANTORO P, CAVALLI F, ZUCCA E. Chlorambucil in combination with induction and maintenance rituximab is feasible and active in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 2003; **123**(2): 271–277.
- [62] MEY UJ, ORLOPP KS, FLIEGER D, STREHL JW, HO AD, HENSEL M, BOPP C, GORSCHLUTER M, WILHELM M, BIRKMANN J, KAISER U, NEUBAUER A, FLORSCHUTZ A, RABE C, HAHN C, GLASMACHER AG, SCHMIDT-WOLF IG. Dexamethasone, high-dose cytarabine, and cisplatin in combination with rituximab as salvage treatment for patients with relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Invest* 2006; **24**(6): 593–600.
- [63] MOHRBACHER A. B cell non-Hodgkin's lymphoma: rituximab safety experience. *Arthritis Res Ther* 2005; **7** Suppl 3: S19–25.
- [64] MOREAU P, VOILLAT L, BENBOUKHER L, MATHIOT C, DUMONTET C, ROBILLARD N, HERAULT O, GARNACHE F, GARAND R, VAROQUEAUX N, AVET-LOISEAU H, HAROUSSEAU JL, BATAILLE R. Rituximab in CD20 positive multiple myeloma. *Leukemia* 2007; **21**(4): 835–836.
- [65] NADLER LM, STASHENKO P, HARDY R, KAPLAN WD, BUTTON LN, KUFE DW, ANTMAN KH, SCHLOSSMAN SF. Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen. *Cancer Res* 1980; **40**(9): 3147–3154.
- [66] OERTEL SH, VERSCHUUREN E, REINKE P, ZEIDLER K, PAPP-VARY M, BABEL N, TRAPPE RU, JONAS S, HUMMEL M, ANAGNOSTOPOULOS I, DORKEN B, RIESS HB. Effect of anti-CD 20 antibody rituximab in patients with post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD). *Am J Transplant* 2005; **5**(12): 2901–2906.

- [67] PEDERSEN IM, BUHL AM, KLAUSEN P, GEISLER CH, JURLANDER J. The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *Blood* 2002; **99**(4): 1314–1319.
- [68] POLYAK MJ, AYER LM, SZCZEPEK AJ, DEANS JP. A cholesterol-dependent CD20 epitope detected by the FMC7 antibody. *Leukemia* 2003; **17**(7): 1384–1389.
- [69] POLYAK MJ, DEANS JP. Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure. *Blood* 2002; **99**(9): 3256–3262.
- [70] POPA C, LEANDRO MJ, CAMBRIDGE G, EDWARDS JC. Repeated B lymphocyte depletion with rituximab in rheumatoid arthritis over 7 yrs. *Rheumatology (Oxford)* 2007; **46**(4): 626–630.
- [71] RAFIQ K, BERGTOLD A, CLYNES R. Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity. *J Clin Invest* 2002; **110**(1): 71–79.
- [72] REFF ME, CARNER K, CHAMBERS KS, CHINN PC, LEONARD JE, RAAB R, NEWMAN RA, HANNA N, ANDERSON DR. Depletion of B cells *in vivo* by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994; **83**(2): 435–445.
- [73] ROMAGUERA JE, FAYAD L, RODRIGUEZ MA, BROGLIO KR, HAGEMEISTER FB, PRO B, MCLAUGHLIN P, YOUNES A, SAMANIEGO F, GOY A, SARRIS AH, DANG NH, WANG M, BEASLEY V, MEDEIROS LJ, KATZ RL, GAGNEJA H, SAMUELS BI, SMITH TL, CABANILLAS FF. High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. *J Clin Oncol* 2005; **23**(28): 7013–7023.
- [74] ROSE AL, SMITH BE, MALONEY DG. Glucocorticoids and rituximab *in vitro*: synergistic direct antiproliferative and apoptotic effects. *Blood* 2002; **100**(5): 1765–1773.
- [75] SALVIM, VANNUCCHI G, CAMPI I, CURRO N, DAZZI D, SIMONETTA S, BONARA P, ROSSI S, SINAC, GUASTELLA C, RATIGLIA R, BECK-PECCOZ P. Treatment of Graves' disease and associated ophthalmopathy with the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab: an open study. *Eur J Endocrinol* 2007; **156**(1): 33–40.
- [76] SANTOS ES, KHARFAN-DABAJA MA, AYALA E, RAEZ LE. Current results and future applications of radioimmunotherapy management of non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2006; **47**(12):2453–2476.
- [77] SARRECCIA C, CAPPELLI A, AIELLO P. HBV reactivation with fatal fulminating hepatitis during rituximab treatment in a subject negative for HBsAg and positive for HBsAb and HBcAb. *J Infect Chemother* 2005; **11**(4): 189–191.
- [78] SELENKO N, MAJDIC O, JAGER U, SILLABER C, STOCKL J, KNAPP W. Cross-priming of cytotoxic T cells promoted by apoptosis-inducing tumor cell reactive antibodies? *J Clin Immunol* 2002; **22**(3): 124–130.
- [79] SEMAC I, PALOMBA C, KULANGARA K, KLAGES N, VAN ECHTEN-DECKERT G, BORISCH B, HOESSLI DC. Anti-CD20 therapeutic antibody rituximab modifies the functional organization of rafts/microdomains of B lymphoma cells. *Cancer Res* 2003; **63**(2): 534–540.
- [80] SHAPIRO-SHELEF M, CALAME K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**(3): 230–242.
- [81] SMOLEWSKI P, DUECHLER M, LINKE A, CEBULA B, GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK O, SHEHATA M, ROBAK T. Additive cytotoxic effect of bortezomib in combination with anti-CD20 or anti-CD52 monoclonal antibodies on chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Res* 2006; **30**(12): 1521–1529.
- [82] STANGLMAIER M, REIS S, HALLEK M. Rituximab and alemtuzumab induce a nonclassic, caspase-independent apoptotic pathway in B-lymphoid cell lines and in chronic lymphocytic leukemia cells. *Ann Hematol* 2004; **83**(10): 634–645.
- [83] STASHENKO P, NADLER LM, HARDY R, SCHLOSSMAN SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol* 1980; **125**(4): 1678–1685.
- [84] STEL AJ, TEN CATE B, JACOBS S, KOK JW, SPIERINGS DC, DONDORFF M, HELFRICH W, KLUIN-NELEMANS HC, DE LEIJ LF, WITHOFF S, KROESEN BJ. Fas receptor clustering and involvement of the death receptor pathway in rituximab-mediated apoptosis with concomitant sensitization of lymphoma B cells to fas-induced apoptosis. *J Immunol* 2007; **178**(4): 2287–2295.
- [85] SUN T, AKALIN A, RODACKER M, BRAUN T. CD20 positive T cell lymphoma: is it a real entity? *J Clin Pathol* 2004; **57**(4): 442–444.

- [86] TAM CS, WOLF M, PRINCE HM, JANUSZEWICZ EH, WESTERMAN D, LIN KI, CARNEY D, SEYMOUR JF. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia or indolent non-Hodgkin lymphoma. *Cancer* 2006; **106**(11): 2412–2420.
- [87] TEELING JL, FRENCH RR, CRAGG MS, VAN DEN BRAKEL J, PLUYTER M, HUANG H, CHAN C, PARREN PW, HACK CE, DECHANT M, VALERIUS T, VAN DE WINKEL JG, GLENNIE MJ. Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2004; **104**(6): 1793–1800.
- [88] TEELING JL, MACKUS WJ, WIEGMAN LJ, VAN DEN BRAKEL JH, BEERS SA, FRENCH RR, VAN MEERTEN T, EBELING S, VINK T, SLOOTSTRA JW, PARREN PW, GLENNIE MJ, VAN DE WINKEL JG. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol* 2006; **177**(1): 362–371.
- [89] TYDEN G, KUMLIEN G, GENBERG H, SANDBERG J, LUNDGREN T, FEHRMAN I. ABO incompatible kidney transplantations without splenectomy, using antigen-specific immunoadsorption and rituximab. *Am J Transplant* 2005; **5**(1): 145–148.
- [90] UCHIDA J, LEE Y, HASEGAWA M, LIANG Y, BRADNEY A, OLIVER JA, BOWEN K, STEEBER DA, HAAS KM, POE JC, TEDDER TF. Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol* 2004; **16**(1): 119–129.
- [91] UNRUH TL, LI H, MUTCH CM, SHARIAT N, GRIGORIOU L, SANYAL R, BROWN CB, DEANS JP. Cholesterol depletion inhibits src family kinase-dependent calcium mobilization and apoptosis induced by rituximab crosslinking. *Immunology* 2005; **116**(2): 223–232.
- [92] VAN DER KOLK LE, EVERS LM, OMENE C, LENS SM, LEDERMAN S, VAN LIER RA, VAN OERS MH, ELDERING E. CD20-induced B cell death can bypass mitochondria and caspase activation. *Leukemia* 2002; **16**(9): 1735–1744.
- [93] VAN DER KOLK LE, GRILLO-LOPEZ AJ, BAARS JW, HACK CE, VAN OERS MH. Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment. *Br J Haematol* 2001; **115**(4): 807–811.
- [94] VAN MEERTEN T, VAN RIJN RS, HOL S, HAGENBEEK A, EBELING SB. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 2006; **12**(13): 4027–4035.
- [95] VEGA MI, HUERTA-YEPAZ S, GARBAN H, JAZIREHI A, EMMANOUILIDES C, BONAVIDA B. Rituximab inhibits p38 MAPK activity in 2F7 B NHL and decreases IL-10 transcription: pivotal role of p38 MAPK in drug resistance. *Oncogene* 2004; **23**(20): 3530–3540.
- [96] VEGA MI, HUERTA-YEPEZ S, JAZIREHI AR, GARBAN H, BONAVIDA B. Rituximab (chimeric anti-CD20) sensitizes B-NHL cell lines to Fas-induced apoptosis. *Oncogene* 2005; **24**(55): 8114–8127.
- [97] VEGA MI, JAZIREHI AR, HUERTA-YEPEZ S, BONAVIDA B. Rituximab-induced inhibition of YY1 and Bcl-xL expression in Ramos non-Hodgkin's lymphoma cell line via inhibition of NF-kappa B activity: role of YY1 and Bcl-xL in Fas resistance and chemoresistance, respectively. *J Immunol* 2005; **175**(4): 2174–2183.
- [98] VENUGOPAL P, SIVARAMAN S, HUANG XK, NAYINI J, GREGORY SA, PREISLER HD. Effects of cytokines on CD20 antigen expression on tumor cells from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2000; **24**(5): 411–415.
- [99] WENG WK, LEVY R. Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001; **98**(5): 1352–1357.
- [100] WENG WK, LEVY R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2003; **21**(21): 3940–3947.
- [101] WILAND P. Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych przeciw limfocytom B w terapii reumatoidalnego zapalenia stawów. *Reumatologia* 2006; **44**(3): 162–168.
- [102] WILLIAMS ME, DENSMORE JJ, PAWLUCZKOWYCZ AW, BEUM PV, KENNEDY AD, LINDORFER MA, HAMIL SH, EGGLETON JC, TAYLOR RP. Thrice-weekly low-dose rituximab decreases CD20 loss via shaving and promotes enhanced targeting in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol* 2006; **177**(10): 7435–7443.
- [103] WOHRER S, TROCH M, ZWERINA J, SCHETT G, SKRABS C, GAIGER A, JAEGER U, ZIELINSKI C, RADERER M. Influence of rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone on serologic parameters and clinical course in lymphoma patients with autoimmune diseases. *Ann Oncol* 2007; **18**(4): 647–651.

- [104] WOJCIECHOWSKI W, LI H, MARSHALL S, DELL'AGNOLA C, ESPINOZA-DELGADO I. Enhanced expression of CD20 in human tumor B cells is controlled through ERK-dependent mechanisms. *J Immunol* 2005; **174**(12): 7859–7868.
- [105] www.fda.gov/cder/drug/infopage/rituximab/default.html
- [106] www.roche-trials.com/patient/trialresults/drugplst_Ocrelizumab.html
- [107] www.trubion.com/pdf/Trubion_TRU-015_Fact_Sheet.pdf
- [108] YOSHIZAWA A, SAKAMOTO S, OGAWA K, KASAHARA M, URYUHARA K, OIKE F, UEDA M, TAKADA Y, EGAWA H, TANAKA K. New protocol of immunosuppression for liver transplantation across ABO barrier: the use of Rituximab, hepatic arterial infusion, and preservation of spleen. *Transplant Proc* 2005; **37**(4): 1718–1719.
- [109] ZAJA F, TOMADINI V, ZACCARIA A, LENOCI M, BATTISTA M, MOLINARI AL, FABBRI A, BATTISTA R, CABRAS MG, GALLAMINI A, FANIN R. CHOP-rituximab with pegylated liposomal doxorubicin for the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2006; **47**(10): 2174–2180.
- [110] ZHANG N, KHAWLI LA, HU P, EPSTEIN AL. Generation of rituximab polymer may cause hypercross-linking-induced apoptosis in non-Hodgkin's lymphomas. *Clin Cancer Res* 2005; **11**(16): 5971–5980.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

*Otrzymano: 05.03. 2007 r.
Przyjęto: 18.05. 2007 r.
ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa
jacekbil@mp.pl*