

Aus dem Institut für klinische Neuroimmunologie
der Ludwig-Maximilians-Universität

Direktor: Prof. Dr. Reinhard Hohlfeld

Therapie der Multiplen Sklerose mit Natalizumab:
Klinische Wirksamkeit und Veränderung der
zirkulierenden Immunzellsubtypen
bei einem hochaktiven Patientenkollektiv

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Ingrid Meinl

aus

Mannheim

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Tania Kümpfel
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Silvia Stojanov

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Markus Krumbholz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Multiple Sklerose	5
1.1.1	Geschichte	5
1.1.2	Epidemiologie und Genetik.....	5
1.1.3	Immunpathogenese.....	7
1.1.4	Diagnose und klinischer Verlauf	7
1.1.5	Therapie	11
1.2	Natalizumab.....	12
1.2.1	Struktur und Funktion der Integrine	12
1.2.2	$\alpha 4\beta 1$ Integrine bei Entzündung im ZNS und Wirkungs- mechanismus von Natalizumab	16
1.2.3	Klinische Wirksamkeit von Natalizumab.....	17
1.2.4	Nebenwirkungen von Natalizumab	18
1.2.5	Progressive Multifokale Leukenzephalopathie (PML).....	18
1.3	Zielsetzungen der Arbeit	20
2	Patienten, Material und Methoden	20
2.1	Patienten und Monitoring.....	20
2.2	Verlaufparameter für das Monitoring der Patienten	24
2.2.1	Schubrate	24
2.2.2	Bestimmung des Grades der Behinderung mit dem EDSS	24
2.2.3	MRT zur Bestimmung der paraklinischen Krankheitsaktivität.....	24
2.3	Untersuchung der Blutzellen.....	25
2.3.1	Bestimmung von Lymphozyten und Monozyten	25
2.3.2	Lymphozytentypisierung mittels Durchflusszytometrie	25
2.3.3	Quantitative PCR nach RNA-Isolierung und cDNA Synthese	25
3	Ergebnisse	27
3.1	Erkrankungsverlauf unserer Patienten vor Behandlung mit Natalizumab im Vergleich zu den Patientenkollektiven aus den Zulassungsstudien.....	27
3.2	Erkrankungsverlauf unter Behandlung mit Natalizumab im Vergleich zu den Zulassungsstudien.....	29

3.3	Nebenwirkungen von Natalizumab in unserer Kohorte	32
3.4	Erkrankungsverlauf nach Beenden der Natalizumabtherapie	33
3.5	Erkrankungsverlauf nach Beenden der Natalizumabtherapie und Beginn einer Therapie mit Glatirameracetat	39
3.6	Erkrankungsverlauf nach Wiederaufnahme der Natalizumabtherapie.....	40
3.7	Exemplarischer Erkrankungsverlauf eines Patienten	42
3.8	Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen im Blut unter Therapie mit Natalizumab	44
3.8.1	Befunde der Durchflusszytometrie	44
3.8.2	Molekularbiologische Befunde	48
4	Diskussion	50
4.1	Wirksamkeit von Natalizumab bei hochaktiver schubförmiger MS	50
4.2	Rückkehr der Krankheitsaktivität nach Absetzen der Natalizumabtherapie.....	51
4.3	Veränderungen von Immunzellsubtypen im Blut unter der Therapie mit Natalizumab	54
4.3.1	Disproportionaler Anstieg verschiedener Immunzellsubtypen	54
4.3.2	Effekte auf hämatopoetische Progenitorzellen	55
4.4	PML verursacht durch JC-Virus: Ist eine Risikostratifizierung möglich? ..	55
4.5	Risiko-Nutzen Abwägung der Natalizumabtherapie.....	57
5	Literaturverzeichnis	59
6	Abkürzungen	68
7	Zusammenfassung	71
8	Publikationen und Kongressbeiträge	73
9	Danksagung	74
10	Lebenslauf	75

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Geschichte

Der vermutlich älteste Bericht einer Multiple Sklerose (MS)-Erkrankung ist uns in der Island-Saga von Thorlacr überliefert. Dort wird von der Wikingerfrau Hala berichtet, die vorübergehend an Blindheit und Sprachstörungen litt, die sich unter Gebeten und Opfern zurückbildeten (Poser, 1995). Das Tagebuch und die Briefe von Augustus Frederick d'Este (1794-1848), einem Enkel des englischen Königs Georg III, protokollieren den typischen Krankheitsverlauf seiner MS, die sich erstmals im Alter von 28 Jahren mit einer passageren Sehstörung manifestierte.

Im 19. Jahrhundert wurde die MS mehrfach von Ärzten beschrieben durch Jean Cruveilhier (1793-1873), Robert Carswell (1793-1857) und Jean-Martin Charcot (1825-1893). Charcot behandelte seine MS Patienten empirisch mit Goldchlorid, Zinksulfat, Belladonna- und Mutterkornpräparaten. An der Wirksamkeit von Arsenpräparaten zweifelte er. *En vogue* waren damals Quecksilberschmierkuren (1913 von Oppenheim in seinem Lehrbuch noch als Mittel der Wahl empfohlen). 3-5 g Quecksilber wurden 40 Tage lang täglich auf wechselnde Hautpartien einmassiert, chronische Quecksilbervergiftungen blieben dabei unbeachtet (Schmidt und Hoffmann, 2006).

Seit den 50iger Jahren des 20. Jahrhunderts werden MS Patienten mit Cortison behandelt, zunächst niedrigdosiert, später seit den 70iger Jahren hochdosiert (Trotter and Garvey, 1980). Seit den 70iger Jahren wurde die MS immunsuppressiv mit Azathioprin behandelt (Patzold et al., 1982), seit den 80iger Jahren mit Mitoxantron (Kieseier et al., 2003). 1993 wurde mit Interferon-beta 1b die erste immunmodulatorische Therapie für die MS zugelassen.

1.1.2 Epidemiologie und Genetik

Die MS ist eine entzündliche Entmarkungskrankheit des zentralen Nervensystems (ZNS) und stellt die häufigste Ursache neurologischer Behinderung im jungen Erwachsenenalter dar. Allein in Deutschland geht man von ca. 120.000 – 150.000

Betroffenen aus, weltweit sind es etwa 2,5 Millionen (Compston and Coles, 2008). Die Erkrankung manifestiert sich bei der Mehrzahl der Patienten im Alter von 20 - 40 Jahren, selten bei Kindern oder im höheren Lebensalter. Bei Frauen kommt die MS häufiger vor als bei Männern (~2:1).

Die geographische Verteilung der MS ist ungleich, die Prävalenzraten folgen einem Nord-Süd-Gradienten (die MS ist in Äquatornähe selten) und einem West-Ost-Gradienten (die MS ist in Asien, vor allem auf dem Gebiet der ehemaligen Sowjetunion selten). Regionen mit hohen Prävalenzraten über 30 : 100.000 sind Europa, Nordamerika und Australien, mit niedrigen Prävalenzraten von < 5 : 100.000 Japan, China, Teile Russlands, Zentralafrika und Südamerika (Flachenecker und Zettl, 2006a). Migrationsstudien unterstützen die Hypothese, dass ein Umweltfaktor in frühen Lebensjahren für das Auftreten einer MS mitverantwortlich ist. Siedeln Personen aus einem Hochrisikogebiet nach Vollendung der Pubertät in ein Land mit niedrigem Risiko, so nehmen sie das hohe Risiko aus ihrer Heimat mit. Umgekehrt gilt für Einwanderer die niedrige Erkrankungswahrscheinlichkeit des Ziellandes, wenn sie eine Region mit hohem Erkrankungsrisiko bereits vor der Pubertät verlassen (Poser, 1994). Nach gegenwärtiger Vorstellung wird die MS über ein Zusammenwirken von Umwelteinflüssen und Genen ausgelöst. Die Liste verdächtiger Erreger als Ursache der MS wächst ständig, kritischen Überprüfungen im Verlauf der Zeit konnten diese Berichte jedoch zumeist nicht standhalten (Gilden, 2005; Giovannoni et al., 2006; Meinl, 1999). Aktuell wird die Rolle von Epstein-Barr-Virus bei der MS kontrovers diskutiert (Serafini et al., 2007; Willis et al., 2009).

Familienanalysen sprechen für die Rolle genetischer Faktoren im Sinne eines polygenen Vererbungsmusters, die Konkordanzrate eineiiger Zwillinge beträgt 31 % gegenüber 5% bei zweieiigen Zwillingen, sind Vater oder Mutter an einer MS erkrankt, beträgt die Erkrankungswahrscheinlichkeit der Kinder 1,83 %, sind beide erkrankt, ca. 6 % (Hardt, 2006).

Genetische Untersuchungen tragen zu unserem Verständnis der Entstehung von Autoimmunerkrankungen bei. Genomweite Studien identifizieren Genvarianten, die das Risiko zu erkranken erhöhen, oder davor schützen. Die Beteiligung der MHC-Region (*major histocompatibility complex*) auf Chromosom 6p21 ist bislang mit dem höchsten Risiko an einer MS zu erkranken assoziiert. In genomweiten Studien konnten außerdem neben anderen die Gene für Interleukin-2-Rezeptor (IL2RA), Interleukin-7-Rezeptor (IL7RA) (Hafler et al., 2007), CD6, IRF8,

TNFRSF1A (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-1) (De Jager et al., 2009) als Suszeptibilitätsfaktoren für die MS identifiziert werden.

1.1.3 Immunpathogenese

Bei der MS ist das Eindringen von Immunzellen, insbesondere von aktivierten T-Zellen, aus der Blutbahn in das ZNS ein entscheidender Schritt in der Immunpathogenese der MS und daher auch ein Ansatz bei der Entwicklung von neuen Medikamenten. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Immunzellsubtypen, nämlich T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen mit Hirn-eigenen Zellen wie Oligodendrozyten, Mikrogliazellen und Astrozyten, welche zu Demyelinisierung und axonalen Schaden in den Läsionen führen (Hohlfeld, 1997; Sospedra and Martin, 2005; Meinl et al., 2006). Die akut entzündlichen Reaktionen sind auch von einer gestörten Blut-Hirn-Schranke begleitet, welche sich in der Magnetresonanztomographie (MRT) als Kontrastmittel-anreichernde Läsionen in T1-Gewichtung darstellen lassen.

Histologisch können 4 verschiedene Läsionstypen unterschieden werden (Lucchinetti et al., 2000). Typ 1 wird von den aktivierten Makrophagen dominiert, bei Typ 2 spielen Antikörper-vermittelte Schäden und Komplementaktivierung eine große Rolle, bei Typ 3 steht die entzündlich und toxisch bedingte Apoptose der Oligodendrozyten im Vordergrund, bei Typ 4 kommt es zu einer primären Oligodendrozytendegeneration. Parallel zur Demyelinisierung werden auch unterschiedlich stark ausgeprägte Remyelinisierungsvorgänge in den Läsionen beobachtet (Patrikios et al., 2006). Neben der Schädigung des Myelins kommt es auch zu einer Schädigung der Axone (Trapp et al., 1998), die letztendlich das morphologische Korrelat für einen klinischen Funktionsverlust sind (Trapp et al., 1999; Truyen et al., 1996).

1.1.4 Diagnose und klinischer Verlauf

Die Diagnose der MS wird seit 2001 nach den McDonald Kriterien gestellt, welche auf dem Nachweis der Dissemination in Zeit und Ort basieren und aktuell erneut revidiert wurden (McDonald et al., 2001; Polman et al., 2005) (Polman et al., 2011).

Klinisch werden nach Lublin et. al. vier Verlaufsformen der MS unterschieden (Abb. 1): der schubförmige Verlauf (RR-MS), der sekundär progrediente - (SP-MS), der primär progrediente - (PP-MS) und der progredient schubförmige Verlauf (PR-MS) (Lublin and Reingold, 1996). Etwa 85 % der Patienten präsentieren sich initial mit Schüben, die sich komplett zurückbilden, der schubförmigen Verlaufsform der MS (*relapsing-remitting* MS, RR-MS). Bleiben nach einem Schub neurologische Defizite zurück, spricht man von einer schubförmigen MS mit inkompletten Remissionen. Nach einer 10-15 jährigen Krankheitsdauer mit initial schubförmigen Krankheitsbeginn gehen ca. 30-40 % der Patienten in eine sekundär progrediente Verlaufsform (*secondary-progressive* MS, SP-MS) über, eventuell mit überlagerten Schüben. Nach über 20 Jahren Krankheitsdauer sind es 90%. Bei etwa 15 % der Betroffenen manifestiert sich die MS von Beginn an mit einer progredienten Verschlechterung der neurologischen Symptome und wird dann primär progrediente MS (*primary-progressive* MS, PP-MS) genannt (Keegan and Noseworthy, 2002). Die progredient schubförmige MS (*progressive-relapsing* MS, PR-MS) zeichnet sich durch einen von Beginn an progredienten Verlauf aus, der im weiteren Verlauf durch komplett- oder teilremittierte Schübe überlagert ist (Lublin and Reingold, 1996).

In klinischen Studien ist die Schubrate bzw. Schubratenreduktion unter einer bestimmten Therapie ein wichtiger Verlaufsparemeter.

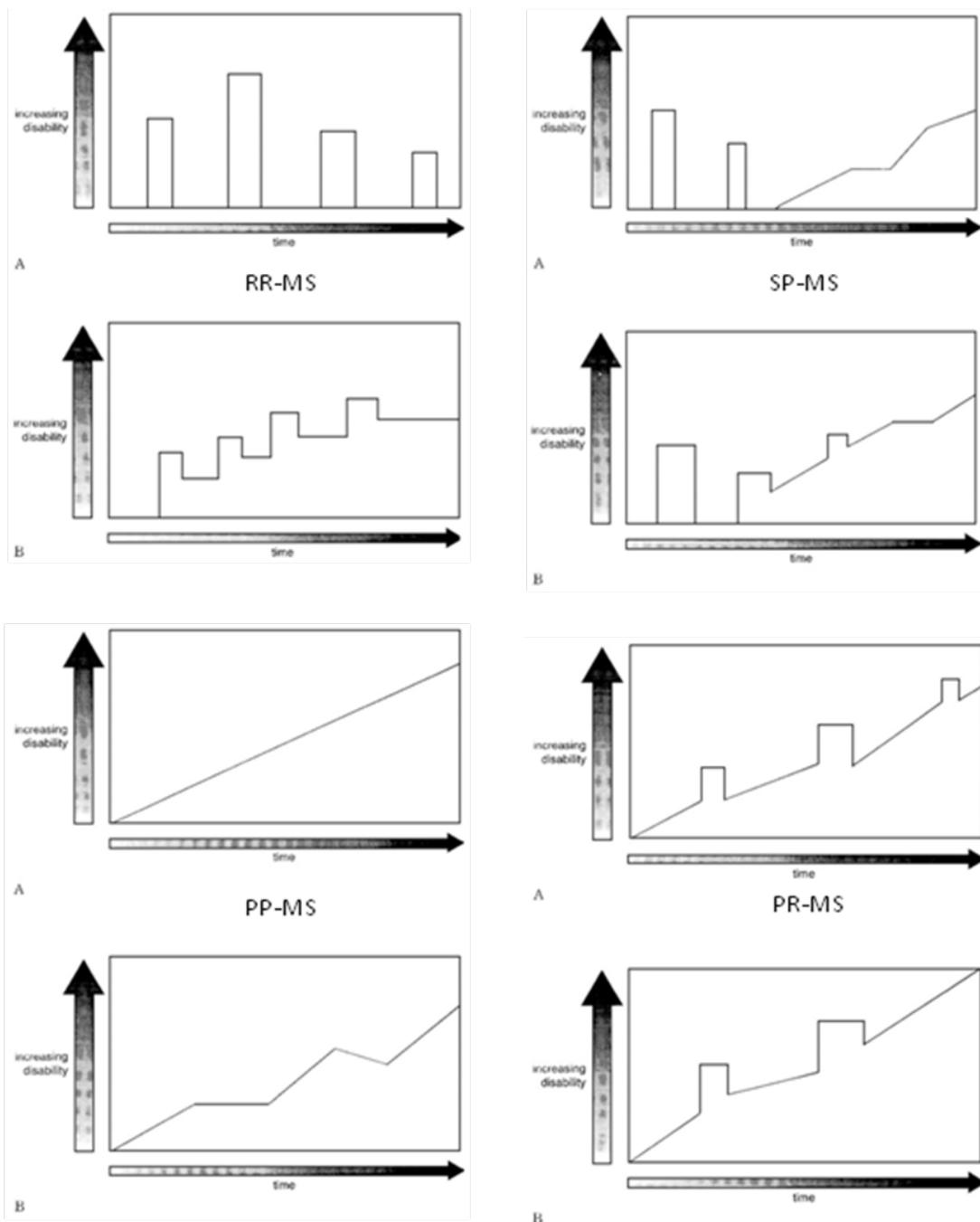


Abbildung 1: Klinische Verlaufsformen der MS (nach (Lublin and Reingold, 1996)). RR-MS ist charakterisiert durch klar abgrenzbare Schübe, die entweder komplett (A) oder teilweise (B) remittieren. Der Krankheitsverlauf der SP-MS ist zu Beginn schubförmig, im weiteren Verlauf progredient ohne (A) oder mit (B) überlagerten Schüben. Der Krankheitsverlauf der PP-MS ist von Beginn an progredient (A), Plateaus und leichte Besserung der Behinderung sind möglich (B). Die PR-MS ist definiert durch einen von Beginn an progredienten Verlauf, welcher im weiteren Verlauf von komplettremittierenden (A) oder teilremittierenden (B) Schüben überlagert ist.

Das MRT hat in der Diagnosestellung und als sekundärer Studienparameter in der Untersuchung des Krankheitsverlaufes der MS an Bedeutung gewonnen. Die typische MS-Läsion stellt sich in der T2-gewichteten MRT-Aufnahme mit hoher Signalintensität dar. Ödem, Entzündung oder Demyelinisierung lassen sich in der T2-Gewichtung nicht unterscheiden. Ca. 20-30% der signalintensiven Läsionen in T2-gewichteten Aufnahmen lassen sich in der T1-Wichtung ebenfalls darstellen: Akute Läsionen als hypointens (Ödem als pathologisches Substrat, reversibel), chronische Läsionen als *black holes* (strukturelle, irreversible Gewebeveränderungen: axonaler Untergang oder ausgeprägter gliotischer Umbau). Durch Applikation von Kontrastmittel (Gadolinium) wird das Magnetresonanz-Signal verstärkt, dies führt zu einem intensiven Signal in T1-gewichteten Aufnahmen. Bei Störung der Blut-Hirn-Schranke reichert sich das Kontrastmittel in den akuten entzündlichen Läsionen an, es ist ein Zeichen für die Aktivität der Erkrankung. Die Anzahl der KM-anreichenden Läsionen korreliert signifikant mit der Anzahl der Schübe (Grossman et al., 1988). Die Gesamtanzahl, bzw. das Gesamtvolumen aller Läsionen eines Patienten bezeichnet man als Läsionslast. In longitudinalen Studien konnte gezeigt werden, dass die initiale Läsionslast signifikant mit dem Krankheitsverlauf nach 10 Jahren korreliert (Sailer et al., 1999).

In MRT-Studien zeigt sich im Verlauf der Erkrankung zudem eine generalisierte Hirnatrophie der weißen und grauen Substanz (Sailer et al., 2003; Sailer et al., 2001) bei MS-Patienten.

Die individuelle Prognose der MS ist für den einzelnen Patienten kaum vorherzusagen: Während etwa ein Drittel der MS-Kranken kaum in den Alltagsaktivitäten eingeschränkt sind, erleiden umgekehrt bis zu 15% innerhalb kürzester Zeit einen Zustand schwerster Beeinträchtigung (Compston and Coles, 2008). Eine hohe Schubrate in den ersten Krankheitsjahren kann als prognostisch ungünstig gelten (Confavreux et al., 2000). Der Behinderungsgrad nach einer Krankheitsdauer von 5 Jahren ist ein prognostischer Marker für den weiteren Krankheitsverlauf (Flachenecker und Zettl, 2006b). Dabei ist der 1954 erstmals von J. Kurtzke entwickelte und 1983 von ihm erweiterte *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) heute noch der „Goldstandard“ zur Quantifizierung des Behinderungsschweregrades und des Fortschreitens der MS und wird in allen Zulassungsstudien für neue Therapien verwendet. Der EDSS ist eine standardisierte neurologische Untersuchung, die basierend auf der Untersuchung der sieben

Funktionssysteme (Visuell, Hirnstamm, Pyramidal, sensorisches, Kleinhirn/Koordination, Blase/Mastdarm, zerebrales Funktionssystem) und der Gehstrecke den Behinderungsgrad quantifiziert und in eine Skala von 0 (keine neurologischen Defizite) bis 10 (Tod durch MS) einordnet. Die Skala wurde von J.F. Kurtzke 1983 in Halbpunktschritte unterteilt, deshalb heißt sie *expanded* (Kurtzke, 1983). Genaue Informationen zu den heute geltenden Definitionen sind unter <http://www.neurostatus.net> erhältlich.

1.1.5 Therapie

Eine Heilung der MS ist nach wie vor nicht möglich, dennoch haben sich die Therapiemöglichkeiten in den letzten 10-15 Jahren enorm erweitert (Hohlfeld and Wekerle, 2004). Die individuelle MS-Therapie beruht auf insgesamt drei Säulen: 1. Therapie des akuten Schubes, 2. Krankheitsverlaufsmodifizierende Basistherapie und 3. symptomatische Therapie von Krankheitssymptomen.

Die symptomatische Therapie umfasst sowohl die medikamentöse, als auch die nicht-medikamentöse Therapie (z.B. Krankengymnastik) typischer MS-Symptome, wie z.B. Fatigue, neurogene Blasenstörung, Spastik, Schmerzen (Henze, 2005).

Die hochdosierte intravenöse Gabe von Glukokortikosteroiden ist die allgemein empfohlene Standardtherapie des akuten Erkrankungsschubes (aktuelles Therapieschema: 3 Tage lang je 1000 mg Glukokortikosteroide i.v. unter Thromboseprophylaxe und Magenschutz). Bei ungenügender Besserung der neurologischen Symptome nach 2 Wochen kann eine erneute hochdosierte Cortison-Stoß-Therapie i.v. erfolgen. Bei weiter ausbleibender Besserung kann im Einzelfall eine Plasmapheresebehandlung erwogen werden (Empfehlungen der Konsensusgruppe des Ärztlichen Beirates der DMSG (Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG)).

Die langfristige, verlaufsbeeinflussende Therapie der MS erfolgt in Anlehnung an die Empfehlungen der MSTKG und seit 2010 auch des Kompetenznetzeswerkes Multiple Sklerose in Deutschland, welche regelmäßig aktualisierte Therapieempfehlung unter Berücksichtigung der aktuellen Studienlage und neuesten klinischen Erfahrungen herausgegeben haben.

Die immunmodulatorische Stufentherapie sieht dabei für die Behandlung der schubförmigen MS als Basistherapeutika die β -Interferone und Glatirameracetat vor, bei weiterhin hoher Krankheitsaktivität als Eskalationstherapie Natalizumab, Mitoxantron oder Cyclophosphamid (Empfehlung der MSTKG. Publikation: (Wiendl et al., 2008)). Es ist davon auszugehen, dass sich dieses Stufenschema in nächster Zeit mit Zulassung neuer Medikamente zur Therapie der MS verändern wird.

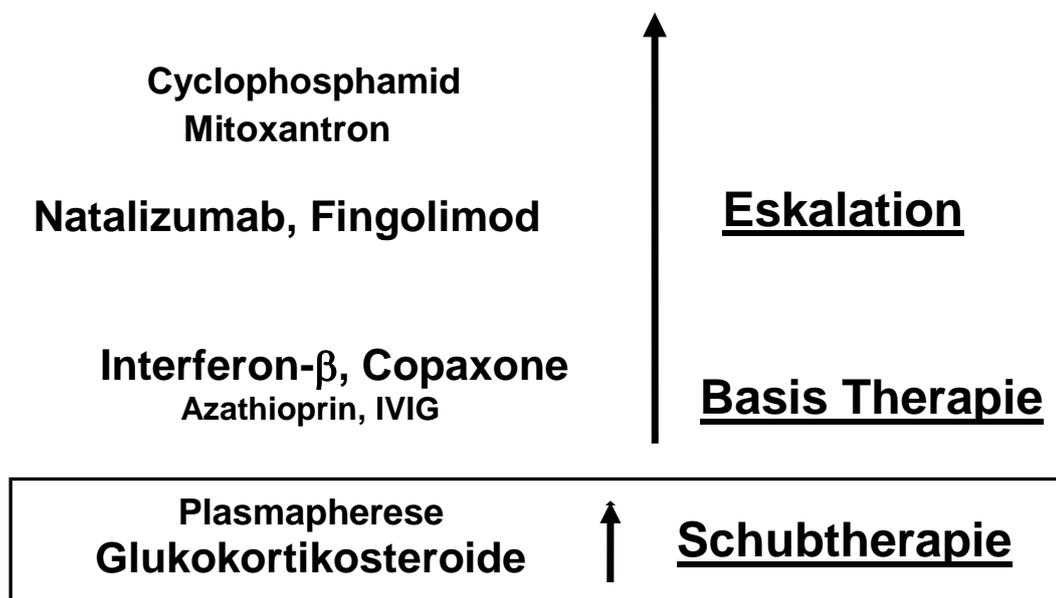


Abbildung 2: Immunmodulatorische Stufentherapie der MS. Modifiziert nach den Empfehlungen der MSTKG. Publikation: (Rieckmann, 2006).

1.2 Natalizumab

Natalizumab ist der erste monoklonale Antikörper, der in der Therapie der MS zugelassen wurde und ist gegen $\alpha 4$ -Integrin auf Leukozyten gerichtet.

1.2.1 Struktur und Funktion der Integrine

Integrine sind eine große Familie von heterodimeren transmembranösen Glykoproteinen. Sie bestehen jeweils aus einer nicht-kovalent verbundenen α - und β -Untereinheit mit einer langen extrazellulären Domäne (ca. 800 Aminosäuren), die zur

Ligandenbindung beiträgt, einer transmembranösen Domäne (ca. 20 Aminosäuren) und einem kurzen intrazellulären Ende (ca.13-70). Integrine können in verschiedenen Affinitätszuständen existieren: Im niedrigen Affinitätsstatus ist die extrazelluläre Domäne der Integrine gebeugt, im intermediären Status etwas aufgerichteter und im Status mit der höchsten Affinität gestreckt. An den kurzen intrazytoplasmatischen Teil der β -Untereinheit der Integrine bindet Talin, unterstützt von Kindlin und erhöht über die Trennung der intrazytoplasmatischen Abschnitte der Integrine deren Affinität (Moser et al., 2009) (Abb. 3).

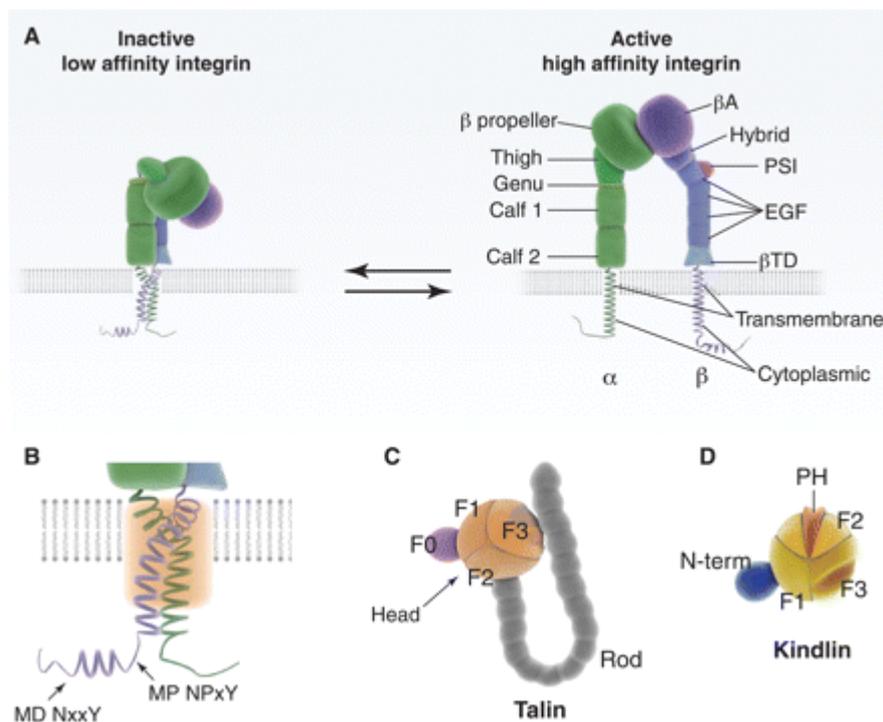


Abbildung 3: Struktur der Integrine. In A und B ist die Struktur der Integrine im Zustand der niedrigen und hohen Affinität für Ihren extrazellulären Liganden angegeben. In B-D sind die intrazellulären Interaktionspartner der Integrine Talin und Kindlin gezeigt. Abbildung aus (Moser et al., 2009).

In der Phylogenese treten Integrine schon früh auf (Johnson et al., 2009). Die Anzahl der Integrine ist in höher entwickelten Lebewesen deutlich größer als in niedrig entwickelten. Der Mensch besitzt 24 verschiedene Integrine, welche durch nicht-kovalente Bindungen von 18 verschiedenen α - und 8 verschiedenen β -Untereinheiten entstehen (Abb. 4) (Gahmberg et al., 2009).

Integrine binden an eine große Anzahl von Molekülen der Extrazellulärmatrix, löslichen Proteinen oder Gegen-Rezeptoren auf anderen Zellen in Abhängigkeit von

ihrem eigenen Aktivitätsstatus (*inside-out signaling*). Gleichzeitig agieren sie als Signaltransduktionsrezeptoren, die Signale von dem Extrazellulärraum zu dem Zytoplasma transferieren (*outside-in signaling*) und so verschiedene Prozesse regulieren wie Proliferation, Zellüberleben, Immunantwort und die Zellform (Bauer, 2008). Funktionen der Leukozyten, wie z.B. Migration, Proliferation, Zytokinsekretion, werden durch *outside-in signaling* gesteuert (Abram and Lowell, 2009).

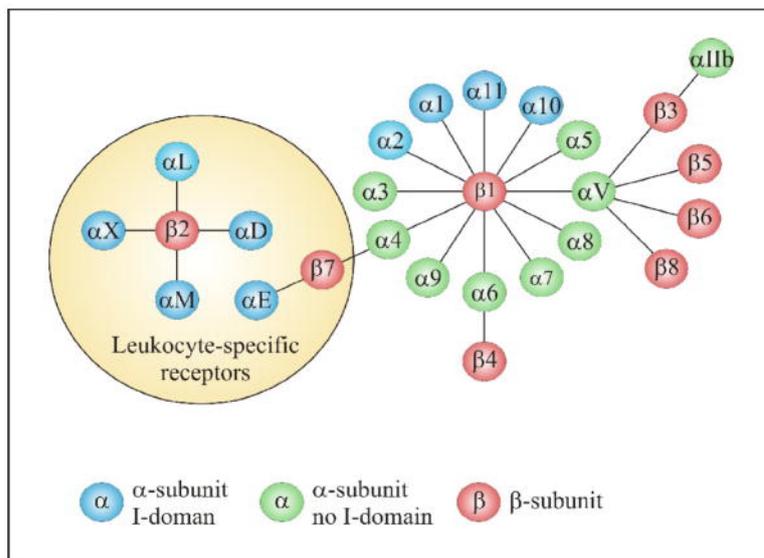


Abbildung 4: Integrinheterodimere des Menschen. Das $\alpha 4$ -Integrin bildet mit $\beta 1$ - und $\beta 7$ -Integrin Heterodimere. Aus: (Gahmberg et al., 2009).

Der Hauptligand von $\alpha 4\beta 1$ (*very late antigen*, VLA-4) ist das *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1), das von Endothelzellen exprimiert wird. Das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin bindet an das *mucosal addressin cell adhesion molecule* (MAdCAM-1), welches auf dem Endothel im Darm, also z.B. in mesenterialen Lymphknoten, exprimiert wird (von Andrian and Engelhardt, 2003). Bei aktivierten Lymphozyten kann $\alpha 4\beta 7$ auch an VCAM-1 binden. VCAM-1 ist auf Endothelzellen hochreguliert während einer Entzündung. Außerdem interagiert $\alpha 4$ -Integrin mit dem *connecting segment 1* (CS-1) von Fibronectin, weitere Interaktionspartner sind Osteopontin und Thrombospondin (Engelhardt and Kappos, 2008).

Die Integrine $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) und LFA-1-ICAM1/2 und (VLA-4 –VCAM) auf den Lymphozyten, sind auch an der Bildung der „immunologischen Synapse“ beteiligt zwischen antigenpräsentierender Zelle und Antigen-erkennender T-Zelle (Dustin and Colman, 2002).

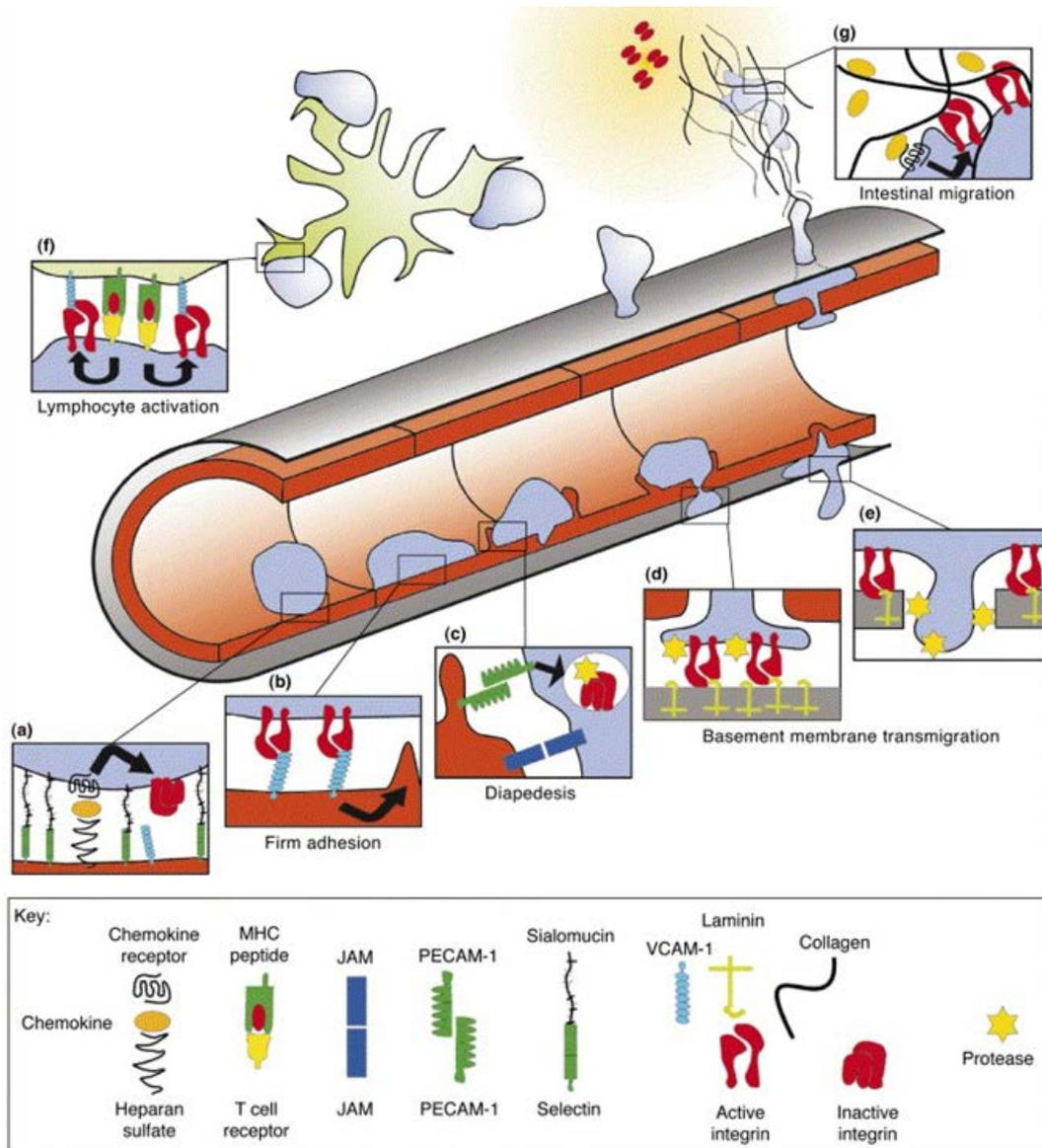


Abbildung 5: Die Rolle von $\beta 1$ -Integrinen in Extravasation, interstitieller Migration und Lymphozyten-Aktivierung. (a) Selektin-vermitteltes *Rolling*. Die wandernde Blutzelle reagiert auf Chemokine, die an der Oberfläche der Endothelzellen immobilisiert sind, was über *inside-out-signaling* zu einer Aktivierung der $\alpha 4\beta 1$ Integrine führt. (b) Die $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 Interaktion führt zu einer festen Adhäsion und stimuliert ein reverses Signal über VCAM-1, das die Extension von endothelialen Protrusionen stimuliert, die eine feste Bindungsstelle bilden. (c) Die Diapedese wird durch andere Adhäsionsmoleküle vermittelt, PECAM-1 und JAM. Signale der Endothelzelle induzieren die Oberflächenexpression von $\alpha 6\beta 1$ Integrin und Proteasen auf der transmigrierenden Zelle. (d,e) Das Laminin-bindende Integrin $\alpha 6\beta 1$ und Proteasen können den Durchtritt durch Basalmembranen vermitteln. (f) $\alpha 4\beta 1$ Integrine lokalisiert zu immunologischen Synapsen zwischen B-Zellen und Follikulär-Dendritischen Zellen und T-Zellen und Dendritischen Zellen. Die interstitielle Migration wird am ehesten durch $\alpha 2\beta 1$ Integrine vermittelt. Aus (Sixt et al., 2006).

In der sequentiellen Interaktion von verschiedenen Adhäsions- und Signal-Molekülen ist die Bildung der VLA/VCAM-Bindung für das feste Anbinden an die Endothelzelle zuständig (Sixt et al., 2006). Chemokine, die in entzündetem Gewebe produziert werden, binden an einen G-Protein-verbundenen Rezeptor auf der Oberfläche der Leukozyten und bewirken so in dem Leukozyten einen Übergang von der inaktiven Form zur aktiven Form des $\alpha 4\beta 1$ -Integrins, die die Avidität des $\alpha 4\beta 1$ -Integrins erhöht (Abb. 5) (Sixt et al., 2006; Engelhardt and Kappos, 2008).

1.2.2 $\alpha 4\beta 1$ Integrine bei Entzündung im ZNS und Wirkungsmechanismus von Natalizumab

Der Eintritt von im Blut zirkulierenden Lymphozyten durch die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn ist ein wichtiger Schritt in der Entstehung von entzündlichen Läsionen bei der MS. 1992 konnte erstmals im Tierversuch durch einen anti- $\alpha 4$ -Integrin-Antikörper das Einwandern von Entzündungszellen in das ZNS und somit eine experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (EAE), verhindert werden (Yednock et al., 1992). Diese Befunde waren die Grundlage für die Entwicklung von Natalizumab.

Natalizumab (Tysabri®, Biogen Idec, Elan) ist ein rekombinanter, humanisierter monoklonaler Antikörper, der an die $\alpha 4$ -Untereinheit der Integrine (VLA4) auf Leukozyten bindet, unabhängig von der assoziierten β -Kette, so dass Natalizumab sowohl die $\alpha 4\beta 1$ -Integrine, als auch die $\alpha 4\beta 7$ -Integrine blockiert.

Natalizumab bindet an die $\alpha 4$ -Untereinheit der Integrine aller Leukozyten, mit Ausnahme der neutrophilen Granulozyten, da diese kein $\alpha 4$ -Integrin exprimieren (Stuve et al., 2006b). Natalizumab blockiert die Bindung dieser Integrindimere an ihren Liganden VCAM-1. Dadurch wird die Migration von T-Zellen in das ZNS und im ZNS blockiert (Yednock et al., 1992).

Durch viele tierexperimentelle Studien ist die vorherrschende Rolle der Bindung von $\alpha 4$ -Integrin an seinen endothelialen Rezeptor VCAM-1 in der Rekrutierung von Entzündungszellen in das ZNS belegt (Engelhardt, 2008).

Per Intravital-Fluoreszenz-Videomikroskopie konnte gezeigt werden, dass $\alpha 4$ -Integrine verantwortlich sind für die feste Adhäsion von reifen und unreifen dendritischen Zellen an entzündete Hirngefäße und so die Rekrutierung von dendritischen Zellen vermitteln (Jain et al., 2010).

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass die Blockade eines einzelnen Endothel-Adhäsionsmolekültyps (ICAM-1, ICAM-2 oder VCAM) alleine, nicht zu einer kompletten Inhibierung der T-Zellrekrutierung in das ZNS führt (Steiner et al., 2010).

Eine andere Gruppe konnte in EAE-Tierversuchen mit Mäusen, die entweder defizient für $\beta 1$ auf allen Immunzellsubtypen oder nur auf den T-Zellen waren, zeigen, dass $\beta 1$ -Integrin essentiell für die Migration von T-Zellen in das Hirngewebe ist (Bauer et al., 2009).

1.2.3 Klinische Wirksamkeit von Natalizumab

In zwei Zulassungsstudien (AFFIRM, SENTINEL) konnte eindrucksvoll die Wirksamkeit von Natalizumab bei der MS gezeigt werden. In der AFFIRM-Studie, einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Multicenter Phase III Studie zeigte sich gegenüber der Placebogruppe eine Reduktion der Gadolinium-aufnehmenden Herde um 90 %, eine Schubreduktion um 68% und eine Verlangsamung der Behinderungsprogression gemessen am EDSS um 42 % über 2 Jahre (Polman et al., 2006). In der gleichzeitig laufenden SENTINEL-Studie zeigte sich, dass die Behandlung mit der Kombinationstherapie Natalizumab und Interferon- β -1a (Avonex®) zu einer Schubreduktion von 53 % gegenüber einer Monotherapie mit Interferon- β -1a führte (Rudick et al., 2006). Im November 2004 wurde Natalizumab wegen der positiven Zwischenauswertung vorzeitig von der FDA in den USA zur Behandlung der MS zugelassen, musste jedoch nach Bekanntwerden von 3 Fällen einer **Progressiven Multifokalen Leukenzephalopathie (PML)** (Ransohoff, 2005) von dem Hersteller im Februar 2005 wieder vom Markt genommen werden. Zwei der drei PML-Fälle traten unter der Kombinationstherapie Tysabri®/Avonex® auf, der dritte betroffene Patient war ein Patient mit Morbus Crohn, der zusätzlich mit Immunsuppressiva behandelt wurde. Im Juni 2006 wurde Natalizumab dann von der FDA erneut nach Risiko-Nutzen-Abwägung zugelassen, allerdings mit Einschränkungen: nur als Monotherapie bei schubförmiger MS mit hoher Krankheitsaktivität und bei Therapieversagen oder Unverträglichkeit der Basistherapeutika.

1.2.4 Nebenwirkungen von Natalizumab

In den Zulassungsstudien traten bei 4% der Patienten Überempfindlichkeitsreaktionen auf im Rahmen der Infusion. Anaphylaktoide Reaktionen traten bei weniger als 1% der Patienten auf. Bei 10% der Patienten konnten einmalig Antikörper gegen Natalizumab nachgewiesen werden, bei 6% persistierten diese Antikörper auch in einem Wiederholungstest. Bei diesen Patienten muss die Natalizumabtherapie beendet werden, da die persistierenden Antikörper zu einer herabgesetzten Wirksamkeit führen und auch verantwortlich für eine Anaphylaxie sind.

In den Zulassungsstudien traten Herpes zoster- und Herpes simplex-Erkrankungen bei den Natalizumabpatienten häufiger auf, als in der Placebogruppe. Nach Markteinführung wurde von einer tödlich verlaufenden Herpesenzephalitis berichtet. Nach Markteinführung gab es einzelne Berichte über eine Hepatotoxizität von Natalizumab mit stark erhöhten Leberwertenzymen und Hyperbilirubinämie.

Bislang gibt es noch keine Hinweise, dass die Inzidenz von Malignomen durch eine Natalizumabtherapie ansteigt, Einzelfälle sind beschrieben.

Infusionsbedingte Nebenwirkungen, die in den Zulassungsstudien in der Verumgruppe leicht häufiger auftraten als in der Kontrollgruppe, waren: Kopfschmerzen, Schwindel, Erbrechen, Übelkeit, Arthralgie, Rigor, Fieber, Abgeschlagenheit und Urtikaria. Harnwegsinfektionen und Nasopharyngitiden traten in der Verumgruppe ebenfalls etwas häufiger auf (siehe auch Natalizumab-Fachinformation).

1.2.5 Progressive Multifokale Leukenzephalopathie (PML)

Die PML ist die schwerste mögliche Nebenwirkung, die unter Therapie mit Natalizumab auftreten kann. Die PML ist eine sehr seltene, häufig fatal verlaufende demyelinisierende Erkrankung des ZNS, der eine opportunistische Infektion der Oligodendrozyten mit dem JC-Virus, einem DNS-haltigen humanen Polyoma Virus (zur Familie der Papovoviridae gehörend) zugrunde liegt. JC sind die Initialien des Patienten, bei dem erstmals 1971 das Virus entdeckt wurde (Padgett et al., 1971). Derzeit geht man davon aus, dass bis zu 80% der Erwachsenen seropositiv sind für JC-Virus. Dabei verläuft die Erstinfektion asymptomatisch. Die Stromazellen in den Tonsillen, B-Zell-Vorläuferzellen im Knochenmark und Nierenepithelzellen können

latent infiziert sein (Tan and Koralnik, 2010). Eine PML tritt nur bei immunsupprimierten Patienten auf, besonders häufig bei Patienten mit AIDS und bei Patienten mit iatrogener Immunsuppression nach Organtransplantation, Tumoren, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreis besonders beim SLE (systemischer Lupus erythematoses). Bei AIDS-Patienten beträgt die Inzidenz einer PML 4%-6% (Monaco et al., 1996).

Natalizumab ist das erste MS-Medikament, bei dem eine PML beschrieben wurde. Im Verlauf nach Wiedertzulassung sind weitere PML-Fälle berichtet worden (Abb. 6). Aktuell (Biogen Idec: Stand 04.10.2011) haben 170 mit Natalizumab behandelte Patienten seit der Wiedertzulassung eine PML entwickelt, davon sind 33 (19%) verstorben. Das PML-Risiko nimmt bei längerer Behandlungsdauer und immunsuppressiver Vortherapie zu. Dies führte dazu, dass 2010 die EMA (European Medicines Agency) nach 2 Jahren Therapie eine erneute ausführliche (von den Patienten zu unterschreibende) Aufklärung über das PML-Risiko empfahl und dass viele Patienten erwägen, die Natalizumabtherapie nach zwei Jahren Behandlung wieder zu beenden.

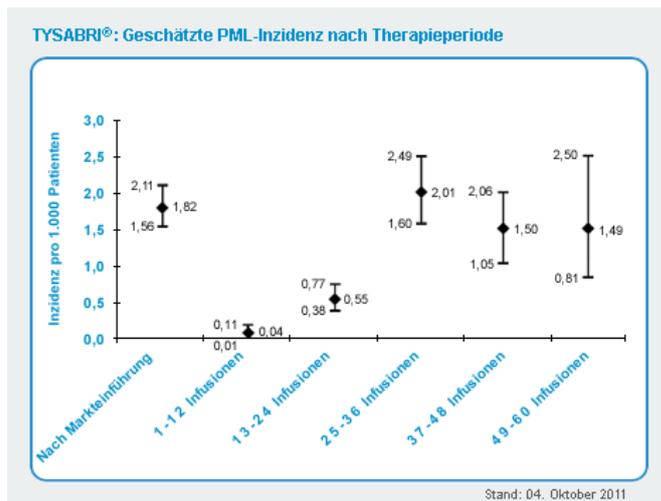


Abbildung 6: PML-Inzidenz nach Therapieperiode. (Biogen Idec)

1.3 Zielsetzungen der Arbeit

Kern dieser Arbeit ist es, weitere Erkenntnisse bezüglich Wirksamkeit und Dauer einer Natalizumabtherapie in einer eigenen Kohorte am Institut für klinische Neuroimmunologie (Klinikum der Universität München) über 2-4 Jahre zu untersuchen. Dabei sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1) Die aufgrund der aktuellen Zulassungsbedingungen mit Natalizumab behandelten Patienten unterscheiden sich von denen der Zulassungsstudien durch einen schwereren Krankheitsverlauf. Es soll untersucht werden, wie wirksam Natalizumab in diesem Patientenkollektiv ist und welche Nebenwirkungen auftreten.

2) Aufgrund des PML-Risikos beenden viele Patienten nach etwa 2 Jahren Therapie die Behandlung mit Natalizumab. Der Krankheitsverlauf in Bezug auf Schubrate, Behinderungsprogression und MRT-Aktivität soll bei Patienten, die die Natalizumabtherapie beenden, beobachtet werden.

3) Die Effekte einer Natalizumabtherapie auf im Blut zirkulierende Immzellsubtypen sollen begleitend in einer Subgruppe der Patienten longitudinal untersucht werden. Diese Arbeiten wurden in einem gemeinsamen Projekt mit Dr. Markus Krumbholz am Max-Planck-Institut für Neurobiologie durchgeführt.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten und Monitoring

Zwischen 2006 und 2010 wurde am Institut für klinische Neuroimmunologie bei 48 Patienten mit schubförmiger MS die Indikation für eine Eskalationstherapie mit Natalizumab gestellt. Alle 48 Patienten wurden in die Beobachtungsstudie eingeschlossen und ihr Krankheitsverlauf unter der Natalizumabtherapie im Mittel 23 Monate (+/- 11 Monate), maximal bis zu 48 Monate verfolgt. (siehe Tabelle 1). Diese Patienten erhielten dann alle 28 Tage 300 mg Natalizumab i.v. ambulant und wurden standardisiert während und 1 Stunde nach der Infusion nach Protokoll behandelt und beobachtet (Abb. 7).

20 von 23 Patienten, die Natalizumab in unserer Ambulanz erhielten und die Therapie beendeten, wurden weiter regelmäßig betreut und der Krankheitsverlauf

prospektiv beobachtet (Schubhäufigkeit, EDSS, MRT). Weitere 3 Patienten stellten sich nach Beenden ihrer Natalizumabtherapie in auswärtigen Praxen erstmals in unserer Neuroimmunologischen Ambulanz vor und wurden hier weiterbetreut und alle Verlaufparameter ebenfalls erhoben (Tabelle 1A). Der Beobachtungszeitraum dieser Patientengruppe mit 23 Patienten betrug im Mittel 14,3 (+/- 7,8) Monate.

10 der 23 Patienten nahmen erneut eine Natalizumabtherapie auf, ihr weiterer Krankheitsverlauf wurde ebenfalls beobachtet (Tab. 1A). Der Beobachtungszeitraum des Erkrankungsverlaufs der Patienten unter erneuter Natalizumabtherapie betrug 15 (+/- 7,7) Monate, bis zum erneutem Therapiebeginn 12,4 (+/- 9,4) Monate.

Der Krankheitsverlauf unter Natalizumab wurde klinisch mit dem EDSS und paraklinisch mittels MRT regelmäßig untersucht und evaluiert. Der EDSS wurde vor Therapiebeginn, nach der 3. Infusion, nach der 6. Infusion und weiter in halbjährlichen Abständen erhoben. Im Rahmen des Routinesicherheitsmonitoring wurden zur Beurteilung der paraklinischen Krankheitsaktivität vor Therapiebeginn und unter Natalizumabtherapie jährlich ein MRT durchgeführt. Unmittelbar vor den Natalizumabinfusionen wurden routinemäßig bei allen Patienten Na, K, CRP, Leberwerte, kleines Blutbild und Differentialblutbild bestimmt. In einer Subgruppe (n = 17) von Patienten erfolgten zusätzliche Blutentnahmen aufgrund der begleitenden Laboruntersuchung zur Bestimmung der Immunzellsubtypen. Für diese Subgruppenuntersuchungen wurden zum Vergleich auch Blut von unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollen untersucht.

Natalizumab-Infusion am __.__.2011 für _____ (Etikett)

1. Infusion am __.__.__ *aktuell:* __. Infusion (300 mg i.v. über 1 h)
Woche: ____

cmRT vor Behandlungsbeginn, **Patientenpass** ausgestellt, Einschluß in **Tygris-**
Beobachtungsstudie,
Einverständniserklärung für begleitende Laborstudie (siehe Rückseite)? **ja /**
nein

Labor und klinische Untersuchung entspr. Protokoll (Rückseite) durchgeführt? **ja /**
nein

Schwangerschaft **nicht möglich / möglich** Schwangerschaftstest:
neg. / pos.

Hinweise für klinische Verschlechterung/neue Beschwerden seit letzter Infusion:
nein / folgende:

Weitere Medikamente: **nein / folgende:**

Uhrzeit	Puls	RR	Begleitsymptome
<i>vor Infusionsbeginn</i>			Temperatur __, __°C
<i>Infusionsbeginn: __: __ Uhr → Infusion über 1 h</i>			
<i>Infusionsende: __: __ Uhr → 1 h Nachbeobachtung</i>			Temperatur __, __°C
<i>1 H nach Infusionsende __: __ Uhr</i>			Temperatur __, __°C

Hinweise für Infusionsreaktionen oder andere Auffälligkeiten? **nein / folgende:**

Abbildung 7: Natalizumab-Behandlungsprotokoll

Tabelle 1 A: Patienten, die mit Natalizumab behandelt wurden

Patienten-Subgruppen	Anzahl	Geschlecht (weibl.)	Alter ¹	Krankheitsdauer ²	EDSS	Progressions-index ³
Patienten, die mit Natalizumab behandelt wurden	48	37 (77%)	25 +/- 8,5	9,8+/-6,6	4,1 +/- 1,1	0,64 +/- 0,54
Patienten, die die Natalizumabtherapie beendet haben	23	19 (83%)	27,2 +/- 8,5	10 +/- 6,8	4,4 +/- 0,9	0,73 +/- 0,72
Patienten, die die Natalizumabtherapie wiederaufgenommen haben	10	9 (90%)	26 +/- 9,2	10 +/- 5,4	4,2 +/- 0,8	0,59 +/- 0,61

Tabelle 1 B: Patienten und Kontrollen für die Untersuchungen der Immunzellsubtypen

Patienten-Subgruppen	Anzahl	Geschlecht (weibl.)	Alter ¹	Krankheitsdauer ²	EDSS	Progressions-index ³
Patienten, bei denen die Lymphozyten untersucht wurden	17	13 (77%)	22 +/- 6,5	10,9+/-8,5	4,1 +/- 0,9	0,68 +/- 0,5
Kontrollgruppe der unbehandelten MS-Patienten	10	7 (70%)	33,9 +/- 6,7	4,2 +/- 5,0	2,45 +/- 1,1	1,2 +/- 0,9
Kontrollgruppe der Gesunden	13	5 (39%)	26,9 +/- 6,3			

Fußnoten zu Tabelle 1A und 1B. ¹Alter in Jahren bei Krankheitsbeginn bzw. bei Kontrollen zum Zeitpunkt der Blutabnahme ²in Jahren bis Therapiebeginn mit Natalizumab ³Grad der Behinderung geteilt durch die Dauer der Erkrankung.

2.2 Verlaufparameter für das Monitoring der Patienten

2.2.1 Schubrate

Bei allen Patienten wurde die jährliche Schubrate als Anzahl der Schübe pro Jahr bestimmt. Für die Zeit vor Beginn der Natalizumabtherapie konnte die tatsächliche jährliche Schubrate erfragt werden. Es galten die Definitionen eines Schubes nach Schumacher et al. als klinische Verschlechterung, die mindestens 24 Stunden andauert und mehr als 30 Tage Abstand zum vorherigen Schubbeginn hat (SCHUMACKER et al., 1965). Waren die Beobachtungszeiträume länger oder kürzer als 1 Jahr, wurde die jährliche Schubrate errechnet aus der Anzahl der Schübe mal 12 Monate geteilt durch die Anzahl der tatsächlichen Monate (annualisierte Schubrate).

2.2.2 Bestimmung des Grades der Behinderung mit dem EDSS

Das Ausmaß der Behinderung wurde regelmäßig mit Hilfe des EDSS gemessen.

Der EDSS wurde vor Therapiebeginn mit Natalizumab, nach der 3. Infusion, nach der 6. Infusion und weiter in halbjährlichen Abständen bei allen mit Natalizumab behandelten Patienten erhoben.

Bei den Patienten, die die Natalizumabtherapie beendeten wurde anfangs ebenfalls in 3 monatigen Abständen der EDSS bestimmt, außerdem auch bei Erkrankungsschub zu anderen Zeitpunkten.

2.2.3 MRT zur Bestimmung der paraklinischen Krankheitsaktivität

Jeder Patient führte regelmäßig MRT-Kontrollen des Schädels durch. Da die MRTs z. T. extern bei verschiedenen niedergelassenen Neuroradiologen durchgeführt wurden, war das MRT-Protokoll nicht standardisiert. Sämtliche MRTs wurden hinsichtlich eines positiven oder negativen Nachweises von KM- aufnehmenden Läsionen untersucht und die Anzahl der KM-aufnehmenden Läsionen wurde bestimmt. Vor Beginn der Natalizumabtherapie wurde ein Referenz-MRT durchgeführt, unter der Natalizumabtherapie erfolgten $\frac{1}{2}$ bis jährliche Kontrollen, nach Beenden der Natalizumabtherapie 3-6 monatige Kontrollen.

2.3 Untersuchung der Blutzellen

2.3.1 Bestimmung von Lymphozyten und Monozyten

Im Routinediagnostiklabor des Klinikums der LMU wurden routinemäßig ein kleines Blutbild und ein Differentialblutbild zur Bestimmung der Monozyten und Lymphozyten durchgeführt und evaluiert.

2.3.2 Lymphozytentypisierung mittels Durchflusszytometrie

Die begleitenden Blutuntersuchungen wurden von der Ethikkommission der Universität München genehmigt und eine schriftliche Einverständniserklärung von allen Patienten liegt vor. Das Blut von 17 Natalizumab-Patienten wurde untersucht, zusätzlich als Kontrolle auch von 10 unbehandelten MS-Patienten und 13 gesunden Probanden (siehe Tabelle 1).

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersuchten wir insgesamt 111 EDTA-Proben von 17 Natalizumab-Patienten longitudinal (monatlich über einen Zeitraum von einem Jahr).

Die Lymphozytensubtypen wurden im Durchflußzytometer (FACS) der Klinischen Chemie nach Routine Methoden bestimmt. Eingesetzt wurde dabei der FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Die Färbungen wurden am Vollblut gemacht. Zur Identifizierung der Lymphozytensubpopulationen wurde der Simultest IMK Lymphocyte kit (Becton Dickinson) eingesetzt, der folgende Marker erkennt: CD3 (Klon SK7), CD4 (Klon SK3), CD8 (Klon SK1), CD19 (Klon 4G7), CD45 (Klon 2D1). Weiter wurde eingesetzt ein mAb gegen CD138 von IQ Products BV, Groningen, Niederlande (Klon B-B4 (FITC)) und von Becton Dickinson und ein mAb gegen CD10 (Klon W8E7 (FITC)). Reife B-Zellen wurden definiert als alle CD19⁺ Zellen minus CD19⁺CD10⁺ Prä-B-Zellen minus der CD19⁺CD138⁺Plasmablasten.

2.3.3 Quantitative PCR nach RNA-Isolierung und cDNA Synthese

Hämatopoetische Vorläuferzellen im peripheren Blut wurden auch mit Hilfe einer quantitativen PCR (qPCR) nachgewiesen. Diese molekularbiologischen Experimente

wurden gemeinsam mit Dr. Markus Krumbholz am Max-Planck-Institut für Neurobiologie durchgeführt.

CD10, das bei der Durchflusszytometrie in einer Doppelfärbung mit CD19 als ein Marker für Prä-B-Zellen gedient hat, kann nicht in der qPCR aus Vollblut benutzt werden, weil CD10 auch auf Granulozyten exprimiert wird. Deshalb benutzten wir Primer für Vpre β 1 (Element des Prä-B-Zell-Rezeptors auf unreifen B-Zellen), DNNT (Marker für Lymphozytenvorläuferzellen) und CD34 (Marker für Progenitorzellen, aus denen Lymphoid- und Myeloidzellen entstehen). 65 Proben von 14 Patienten wurden longitudinal (monatlich über einen Zeitraum von einem halben Jahr) untersucht.

Das Vollblut wurde bei der Blutabnahme direkt in PAXgene™ Blood RNA Tube (Qiagen, Hilden, Deutschland) überführt, pro PAXgene™ Blood RNA-Röhrchen 2,5 ml Vollblut. Dieses System erhält einen speziellen RNA-Stabilisator, welcher es erlaubt, Proben mehrere Tage bei Raumtemperatur und über lange Zeit eingefroren bei -20 °C zu lagern. Dieses System ist im Labor bereits in früheren Arbeiten eingesetzt worden (Krumbholz et al., 2008a).

Die quantitative PCR wurde auf dem ABI 7900 TaqMan thermocycler in 96 *well* Reaktionsplatten durchgeführt. Folgende Primer und Sonden wurden verwendet:

GAPDH: Vorwärts-Primer (Exon 2): 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'; Rückwärts-Primer (Exon 4): 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'; Sonde (Exon 4): FAM-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC-TAMRA. Diese Primer und die Sonde wurden synthetisiert von Metabion GmbH (Martinsried, Deutschland). Die assays mit Primern und Sonde für Pre-B-lymphocyte gene 1 (Vpre β 1), CD34, Terminale Deoxynucleotidyltransferase (DNNT) und Peptidyl-Prolyl-Isomerase A (PPIA) wurden von ABI gekauft.

3 Ergebnisse

3.1 Erkrankungsverlauf unserer Patienten vor Behandlung mit Natalizumab im Vergleich zu den Patientenkollektiven aus den Zulassungsstudien

Im Vergleich zum Patientenkollektiv der klinischen Zulassungsstudien AFFIRM und SENTINEL zeichnet sich unser Patientenkollektiv durch eine höhere jährliche Schubrate, einen höheren EDSS, und eine längere Krankheitsdauer vor Therapiebeginn aus (Überblick in Abb. 8 und weitere Details in Tab. 2). Das heißt unsere MS-Patienten waren vor Beginn der Natalizumab-Therapie im Mittel länger krank und zeigten eine höhere Krankheitsaktivität.

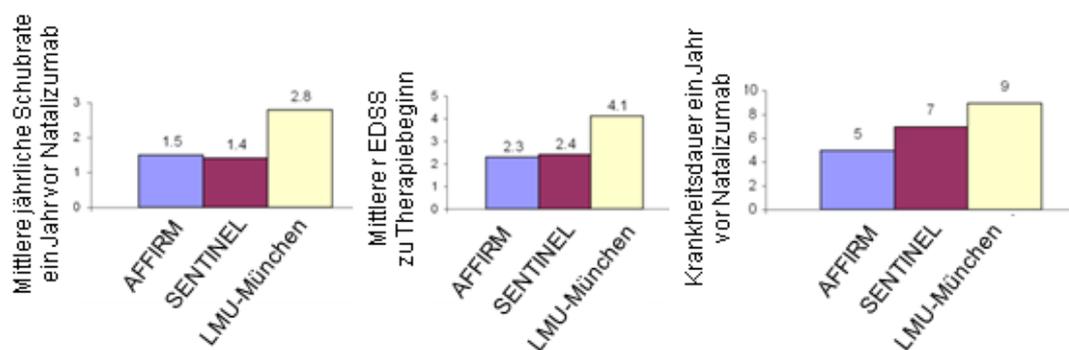


Abbildung 8: Unterschiede zwischen Patientengruppen der Zulassungsstudien (AFFIRM, SENTINEL) und dem eigenem Patientenkollektiv. Die Patientengruppe der LMU-München unterscheidet sich durch eine höhere mittlere jährliche Schubrate, einen höheren mittleren EDSS und eine längere mittlere Krankheitsdauer. Angegeben sind die Mediane.

Tabelle 2: Patientencharakteristika vor Behandlung mit Natalizumab im Vergleich

		AFFIRM	SENTINEL	LMU-München
Alter (Jahre)	Mittelwert	35.6	38.8	35
	SD +/-	8,5	7,7	10
	Bereich	18-50	18-55	21-56
Geschlecht n (%)	männlich	178 (28)	147 (25)	12 (25)
	weiblich	449 (72)	442 (75)	36 (75)
Krankheitsdauer (Jahre)	Median	5	7	9
	Bereich	0-34	1-34	2-30
Jährliche Schubrate ein Jahr vor Natalizumab	Mittelwert	1,5	1,4	2,8
	SD +/-	0,91	0,75	1,7
	Bereich	0-12	1-7	1-7
EDSS vor Natalizumab (Basiswert)	Mittelwert	2,3	2,4	4,1
	SD +/-	1,2	1,1	1,1
	Bereich	0-6	0-6	2-7
Patienten mit KM-Aufnahme im MRT vor Natalizumab	Anzahl aller Patienten	627	589	48
	Anzahl der Pat. ohne KM-Aufnahme (%)	307 (49)	392 (67)	19 (40)
	Pat. mit KM-Aufnahme (%)	319 (51)	192 (32)	24 (50)
	Fehlende Angaben (%)	1 (<1)	5 (<1)	5 (10)

Keiner unserer Patienten (LMU München) war behandlungsnaiv, d.h. alle Patienten wurden vor der Natalizumabtherapie mit anderen, den Krankheitsverlauf beeinflussenden Medikamenten behandelt (siehe Abb. 9). 13 von 48 Patienten (27%) hatten eine immunsuppressive Vorthherapie.

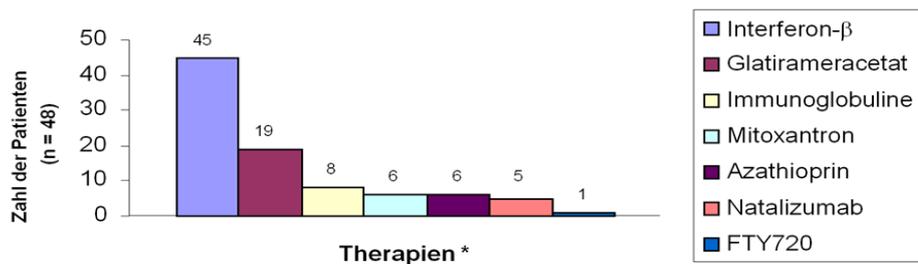


Abbildung 9: Anzahl der Krankheits-modifizierende Therapien vor Beginn der Natalizumabtherapie in unserer Kohorte. * Manche Patienten erhielten mehr als eine Krankheits-modifizierende Therapie vor Natalizumab.

3.2 Erkrankungsverlauf unter Behandlung mit Natalizumab im Vergleich zu den Zulassungsstudien

Die Therapie mit Natalizumab führte zu einer deutlichen Abnahme der mittleren jährlichen Schubrate (siehe Tab. 3). Dabei zeigte Natalizumab in unserem hochaktiven Patientenkollektiv eine ähnlich hohe relative Schubreduktion von 79% wie in den Patientenkollektiven der Zulassungsstudien (von 68% bzw. 55%). Von unseren hochaktiven Patienten zeigten zu Beginn der Natalizumabtherapie, d.h. in den ersten drei Monaten, noch 20,8% (10/48) Schubaktivität. Insgesamt blieben 45,8 % der Patienten (22/48) schubfrei.

Tabelle 3: Schubreduktion unter Natalizumab

Jährliche Schubrate	Patientengruppen		
	AFFIRM	SENTINEL	LMU-München
Mittelwert der Kontrollgruppe (AFFIRM, SENTINEL) bzw. Mittelwert vor Natalizumab (LMU München)	1,5	1,4	2,8
Mittelwert unter Natalizumab	0,24	0,34	0,6
Prozent Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (AFFIRM, SENTINEL) bzw. zur Zeit vor Natalizumab (LMU München)	68	55	79

Durch die Natalizumabtherapie kam es zu einer Stabilisierung der Behinderungsprogression in unserer Kohorte. Der mittlere EDSS von 23 Patienten, die länger als 2 Jahre mit Natalizumab therapiert wurden, betrug zu Beginn 4,2; nach einem Jahr 3,7 und nach zwei Jahren 3,9 (Abb. 7).

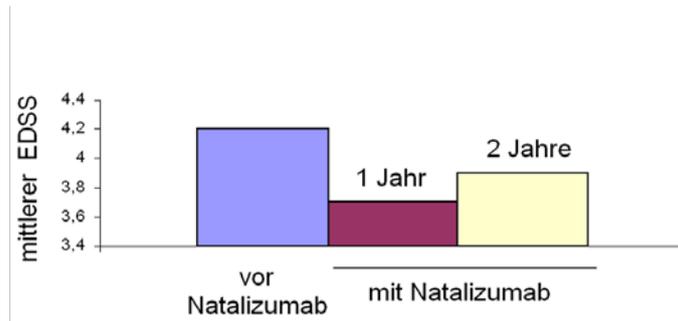


Abbildung 10: Stabilisierung der Behindertenprogression unter Natalizumab in einem hochaktiven Patientenkollektiv . Entwicklung des mittleren EDSS von 23 Patienten unter Natalizumabtherapie, die über 2 Jahre klinisch beobachtet wurden.

In dieser Untergruppe der 23 Patienten, die länger als 24 Monate mit Natalizumab behandelt wurden, verschlechterten sich 3 Patienten im EDSS, acht blieben stabil und 12 Patienten verbesserten sich (Details in Tab. 4).

Tabelle 4: Veränderung des EDSS bei 23 mit Natalizumab behandelten Patienten, die über 2 Jahre klinisch beobachtet wurden

Veränderung des EDSS nach 2 Jahren	Zahl der Patienten
Verschlechterung >1 Punkt	1
Verschlechterung 1 Punkt	1
Verschlechterung 0,5 Punkte	1
stabil	8
Verbesserung 0,5 Punkte	6
Verbesserung 1 Punkt	3
Verbesserung > 1 Punkt	3

24 der 48 Patienten (50%) zeigten im Referenz-MRT eine oder mehrere KM-aufnehmende Läsionen vor Beginn der Natalizumabtherapie, im weiteren Verlauf zeigten nur noch 3 dieser 48 Patienten passager eine KM-Aufnahme.

Zusammenfassend zeigt sich, dass in unserer Patientenkohorte, die sich von den Patienten in den Zulassungsstudien durch eine höhere Krankheitsaktivität unterscheidet, Natalizumab hochwirksam ist und den Krankheitsverlauf positiv beeinflusst hat.

3.3 Nebenwirkungen von Natalizumab in unserer Kohorte

Die im folgenden angegebenen Nebenwirkungen beziehen sich auf insgesamt 51 Patienten, 48 Patienten der eigenen Kohorte zuzüglich 3 weiterer Patienten, die ihre Natalizumabtherapie unterbrochen hatten und in unserer neuroimmunologischen Ambulanz weiterbetreut wurden (siehe Kapitel 2.1.).

Die monatlichen Natalizumabinfusionen wurden im Allgemeinen gut vertragen, bei einigen Patienten kam es zu leichter Müdigkeit (7/51) und/oder leichten Kopfschmerzen (10/51) während der Infusion oder im weiteren Tagesverlauf nach der Infusion. Bakterielle Harnwegsinfektionen traten zu Beginn der Natalizumabtherapie bei 8 von 51 Patienten mehrfach auf. Eine Patientin litt an häufigen Lippenherpes-Exazerbationen, bei zwei weiteren Patientinnen kam es unter der Natalizumabtherapie zu einem Herpes zoster. Ein Patient hatte eine Lungenentzündung. Bei zwei Patientinnen zeigte sich in der gynäkologischen Tumorscreeninguntersuchung eine Verschlechterung des histologischen Befundes auf PAP IIID mit positiven Papillom-Virusnachweis. Bei einer Patientin wurde ein superfiziell spreitendes malignes Melanom im Verlauf der Behandlung entfernt. Eine Patientin hatte eine leichte absolute Leukozytose.

Bei drei Patienten musste aufgrund von Nebenwirkungen die Natalizumabtherapie abgebrochen werden. Eine Patientin litt an rezidivierenden opportunistischen Nagelbettentzündungen. Bei einem Patienten manifestierten sich mit Beginn der Natalizumabtherapie zunächst Arthralgien und im weiteren Verlauf eine Rheumatoide Arthritis. Eine der Patientinnen mit Herpes zoster beendete deswegen die Natalizumabtherapie.

Bei zwei Patienten musste aufgrund von persistierenden Antikörpern gegen Natalizumab die Therapie beendet werden. Einer von ihnen zeigte nach der zweiten Infusion eine allergische Reaktion vom verzögerten Typ (Typ III) (Krumbholz et al., 2007). Bei der zweiten Patientin zeigten drei Schübe in 5 Monaten eine fehlende Wirksamkeit an.

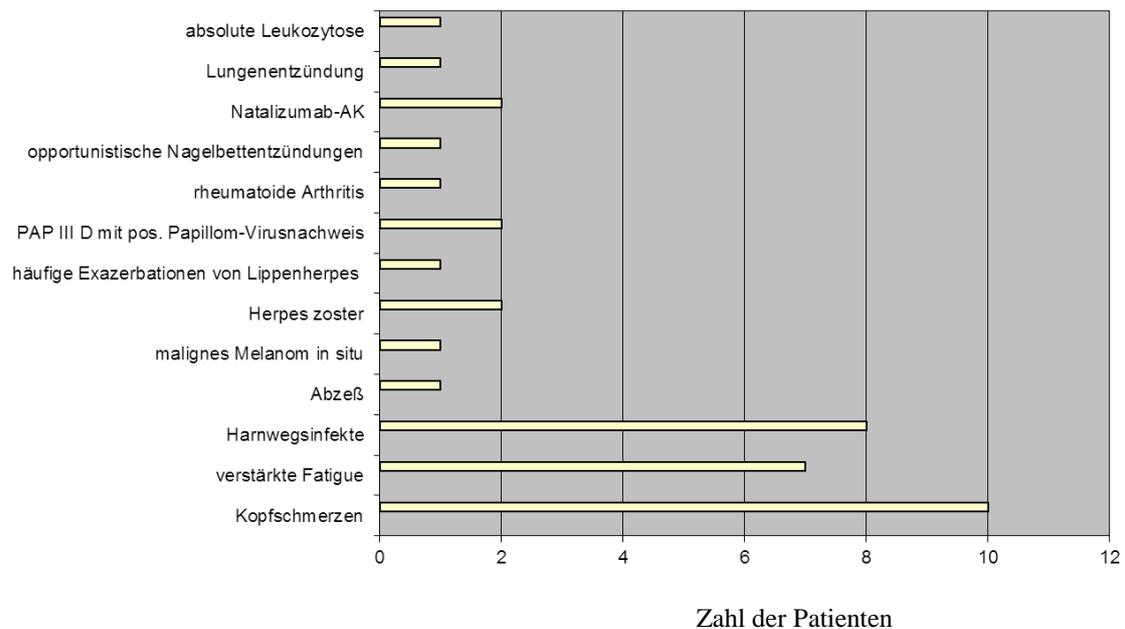


Abbildung 11: Nebenwirkungen unter Natalizumab. Hier sind die Nebenwirkungen der mit Natalizumab behandelten Patienten der eigenen Kohorten aufgeführt. Ein Patient kann mehrfach genannt werden.

3.4 Erkrankungsverlauf nach Beenden der Natalizumabtherapie

Insgesamt beendeten 23 Patienten aus verschiedenen Gründen die Natalizumabtherapie (Tabelle 5). Aufgrund des unter langfristiger Natalizumabtherapie ansteigenden PML-Risikos, beendeten 13 Patienten aus unserer Kohorte ihre Natalizumabtherapie im Mittel nach 21 (+/-11) Monaten. Bei allen Patienten war es unter der Natalizumabtherapie zu einer deutlichen Stabilisierung des Krankheitsverlaufes gekommen, so dass diese Patienten auf einen stabilen Verlauf auch nach Beenden der Natalizumabtherapie hofften. Zu diesem Zeitpunkt gab es noch keine ausreichenden Erfahrungen von Patienten, die eine Natalizumabtherapie beendet hatten.

Tabelle 5: Patienten, die die Natalizumabtherapie beendet haben

Patient	m/w	Alter ¹	Krankheitsdauer ²	Dauer der Natalizumab-Therapie (Monate)	EDSS ³	Grund für Beenden der Natalizumabtherapie	Anschlusstherapie (Monate)	Erneute Natalizumabtherapie nach (Monate)
1	w	29	4	29	5.5	Angst vor PML	Unverträglichkeit AZA (4), FTY (seit 17)	
2	w	18	5	38	4	Angst vor PML	GLAT(1-3)	4
3	w	20	13	20	4.5	Schwangerschaft	GLAT bis zur Schwangerschaft (1-3)	14
4	w	26	30	25	6	Angst vor PML	GLAT (1-7), AZA (seit 8)	
5	w	18	2	35	4	Angst vor PML	GLAT(1-8)	9
6	m	18	21	26	4	Angst vor PML	GLAT (seit 1)	
7	w	36	10	36	6	Angst vor PML	GLAT (seit 1)	
8	w	40	12	14	3	Angst vor PML	keine	6
9	w	27	10	17	3	Schwangerschaftswunsch	keine	
10	m	22	2	11	3.5	rheumatische Arthritis	Rituximab (seit 3)	
11	w	28	12	19	4	Angst vor PML	GLAT (seit 1)	
12	w	20	8	13	2	Schwangerschaft	keine	9
13	m	44	7	36	5	Angst vor PML	GLAT (1-4)	6
14	w	29	17	35	4	Angst vor PML	GLAT (1-16)	17
15	w	40	2	5	4.5	Anti-Natalizumab-AK	Mitox (seit 6)	
16	m	26	6	4	6	kein Therapieeffekt, Übergang SPMS	keine	
17	w	28	6	31	1.5	Studienende SENTINEL	IFN (1-36)	37
18	w	26	19	12	5.5	Angst vor PML	keine	17
19	w	21	11	3	3	Infusionsreaktion	keine	5
20	w	19	5	6	2.5	Nagelbettentzündung	Rituximab (seit 6)	
21	w	24	10	20	4	Herpes zoster	GLAT (seit 1)	
22	w	46	12	14	6	Angst vor PML	Mitox (3)	
23	w	20	7	23	4	Angst vor PML	FTY(seit 7)	

¹Alter in Jahren. ²Krankheitsdauer in Jahren. ³EDSS zu Beginn der Natalizumabtherapie.

Obwohl 15 von 23 Patienten im ersten halben Jahr nach Natalizumab eine den Krankheitsverlauf beeinflussende Therapie starteten (10 GLAT, 1 INF, 2 Rituximab, 2 Mitox) zeigten 18/23 Patienten erneut Schubaktivität innerhalb des ersten Jahres nach Absetzen von Natalizumab. Im weiteren Verlauf blieben bislang nur 4 Patienten schubfrei (1 GLAT, 2 Rituximab, 1 FTY720 (ab 7. Monat)).

5/23 Patienten erlitten drei Monate nach dem Beenden der Natalizumabtherapie einen ersten Schub, 5 weitere Patienten 4 Monate nach dem Beenden der Natalizumabtherapie. 14/23 hatten innerhalb der ersten 6 Monate mindestens einen Schub (Abb. 10). Daraus ergibt sich ein Wiederauftreten eines erneuten Erkrankungsschubes im Mittel 5,4 Monate nach Beenden der Natalizumabtherapie. 7 Patienten hatten dabei schwere Schübe mit klinisch relevanter Symptomatik wie z.B. massive Verkürzung der Gehstrecke oder Visusminderung. Die Schübe waren meist sehr heftig und klinisch beeinträchtigend.

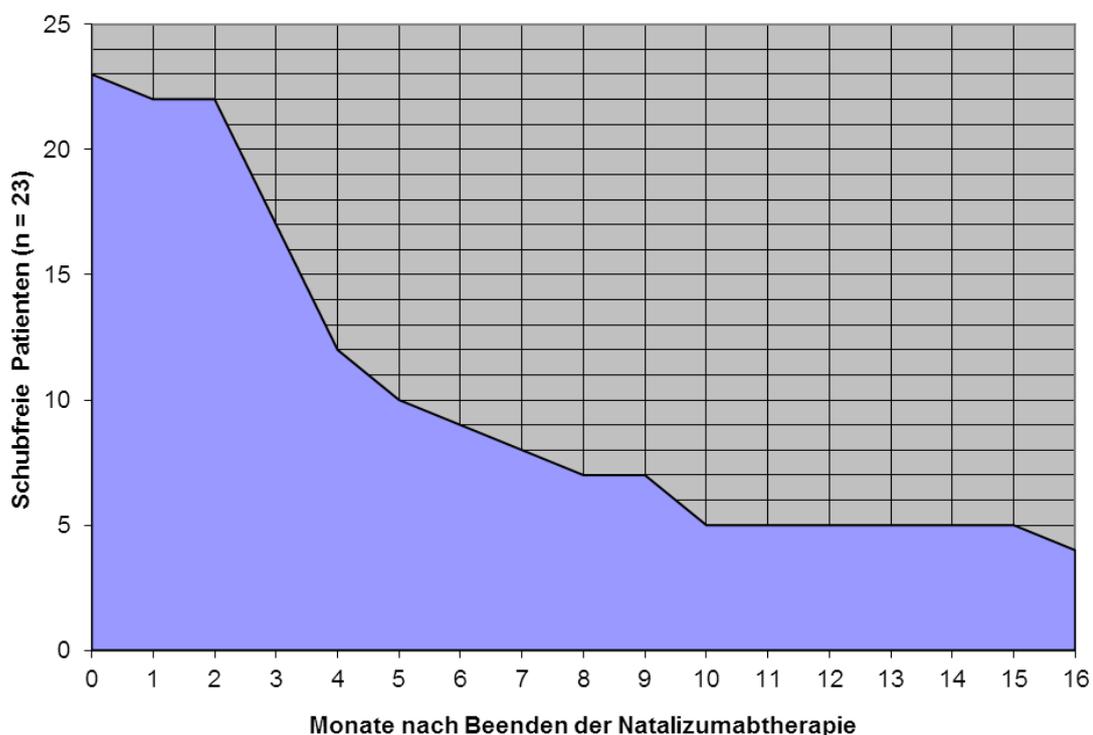


Abbildung 12: Anzahl schubfreier Patienten nach Absetzen von Natalizumab. Wir beobachteten eine schnelle Rückkehr der Krankheitsaktivität nach Absetzen der Natalizumabtherapie.

Eine Patientin mit persistierenden Antikörpern gegen Natalizumab erlitt einen Monat nach Absetzen von Natalizumab einen weiteren Schub. Da bei ihr die

Schubrate auch unter der Natalizumabtherapie hoch blieb, ist dieser Schub nicht im Rahmen eines Absetzphänomens zu sehen, da durch die neutralisierenden Antikörper Natalizumab nicht seine Wirkung entfalten konnte, sondern ist durch die hohe Krankheitsaktivität zu erklären.

In der Gruppe der 23 Patienten, die die Natalizumabtherapie beendet haben, war die mittlere jährliche Schubrate 2,4 (+/- 1,4) vor Beginn der Natalizumabtherapie, sank dann im Mittel auf 0,8 (+/- 1,8) unter Natalizumab und stieg nach Absetzen von Natalizumab aber wieder auf 2,0 (+/- 1,4) an (Abb. 13).

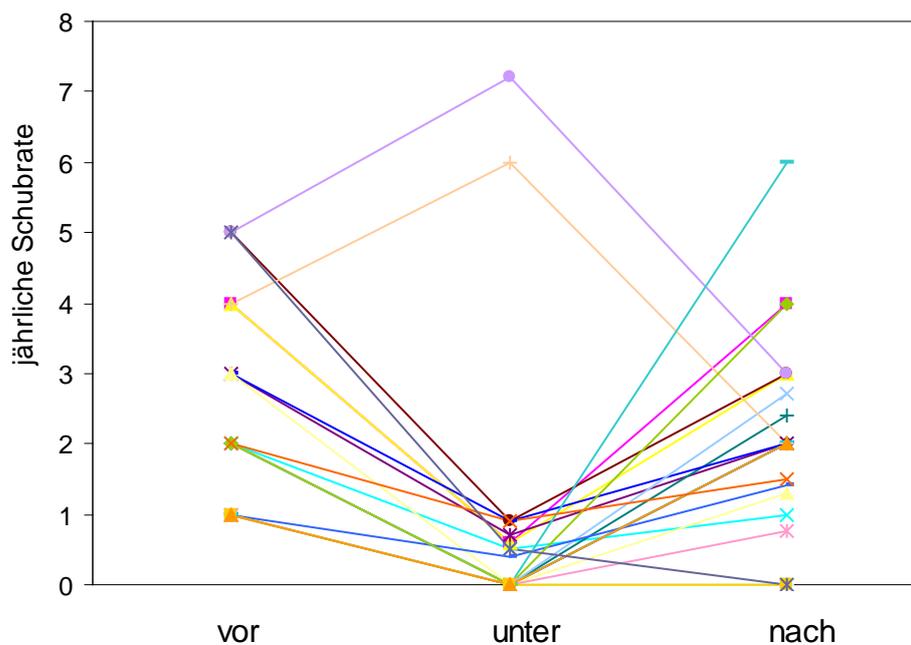


Abbildung 13: Mittlere jährliche Schubrate vor, unter und nach Natalizumabtherapie. Von den zwei Patienten mit hoher Schubrate unter Natalizumab hatte eine Patientin persistierende anti-Natalizumab-Antikörper, der andere zeigte keinen Therapieeffekt bei V.a. Übergang in SPMS.

Der mittlere EDSS verschlechterte sich nach Absetzen von Natalizumab von 4,2 (+/- 1,3) auf 4,7 (+/- 1,3). Damit war der mittlere EDSS nach Absetzen von Natalizumab schlechter als der mittlere EDSS vor Beginn der Natalizumabtherapie mit 4,4 (+/- 0,9), obwohl zur Bestimmung der der jeweils zuletzt gemessene EDSS jedes einzelnen Patienten (z. B. vor Beginn einer erneuten Natalizumabtherapie bzw. vor Datenschluss) berücksichtigt wurde. (Abb. 14).

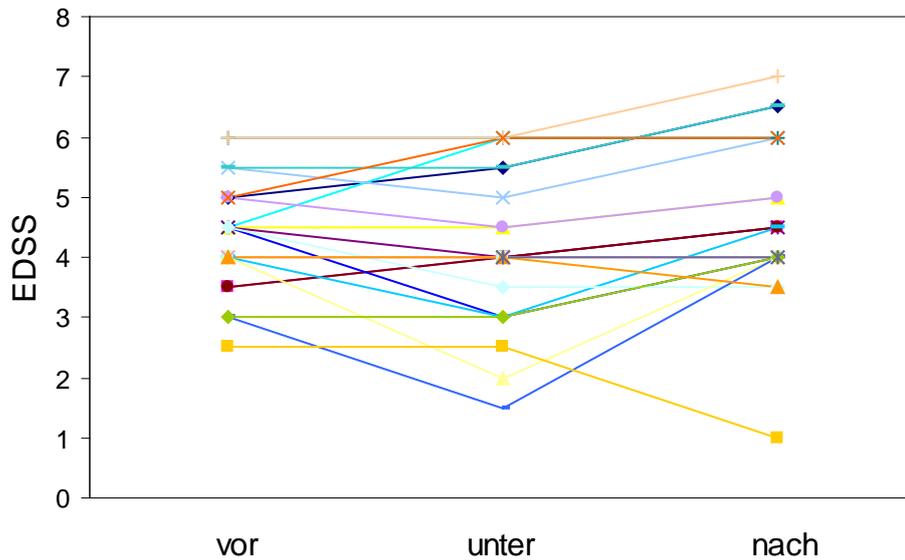


Abbildung 14: EDSS vor, unter und nach Natalizumabtherapie. In jedem Zeitfenster wurde der zuletzt gemessene Wert zugrunde gelegt.

Drei Monate nach Beenden der Natalizumabtherapie blieb der mittlere EDSS konstant bei 10/23 Patienten : 4,4 (+/-1,05) unter Natalizumab und 4,35 (+/-0,91) drei Monate nach Natalizumab. Sechs Monate nach Natalizumab zeigte sich eine Verschlechterung des mittleren EDSS bei 14/23 Patienten von 4,25 (+/-1,4) unter Natalizumab auf 4,57 (+/-1,44) sechs Monate später. Neun Monate nach Absetzen zwar der mittlere EDSS bei 9/23 konstant bei 4,35 (+/-1,42) unter Natalizumab und 4,39 (+/-1,64) nach Natalizumab.

Bei 22/23 Patienten konnten vor Therapiebeginn, bei 19/23 Patienten unter der Natalizumabtherapie und bei 19/23 Patienten nach Beenden der Natalizumabtherapie MRTs ausgewertet werden. 13/23 Patienten hatten vor Beginn der Natalizumabtherapie KM-aufnehmende Läsionen und bei 13/19 Patienten zeigten sich nach Beenden der Natalizumabtherapie KM-aufnehmende Läsionen im MRT. Die mittlere Anzahl der KM-aufnehmenden Herde stieg von 1,6 (+/- 1,95) vor Natalizumab auf 2,9 (+/-4,0) nach Natalizumab (Anzahl der KM-aufnehmenden Läsionen unter Natalizumab betrug 0,16 (+/- 0,49)). Bei 3 Patienten zeigte sich dabei eine hohe Anzahl KM-aufnehmender Läsionen. Die hohe Anzahl der KM-aufnehmenden Läsionen einzelner Patienten korrelierte mit der Schubschwere und anhaltender Schubaktivität.

Patienten mit einer frühen Rückkehr der Erkrankungsaktivität nach Absetzen von Natalizumab hatten vor Beginn der Natalizumabtherapie im Mittel eine höhere Anzahl KM-aufnehmender Läsionen.

6/23 Patienten, deren MRT schon nach 3 Monaten ausgewertet werden konnte, zeigten im Mittel 4,3 (+/-6,8) KM-aufnehmende Läsionen. Dieselben 6 Patienten hatten vor Beginn der Natalizumabtherapie 3,2 (+/-2,5) KM-aufnehmende Läsionen. Sechs Monate nach Beenden der Natalizumabtherapie war bei 7/23 Patienten die mittlere Anzahl der KM-aufnehmenden Läsionen geringer 1,3 (+/-1,4), vor Beginn der Natalizumabtherapie betrug deren mittlere Anzahl KM-aufnehmenden Läsionen 0,9 (+/-1,5). Neun Monate nach Beenden der Natalizumabtherapie hatten 4/23 Patienten 1,8 (+/- 1) KM-aufnehmende Läsionen, vor Therapiebeginn ebenfalls 1,8 (+/-1,3) KM-aufnehmenden Läsionen.

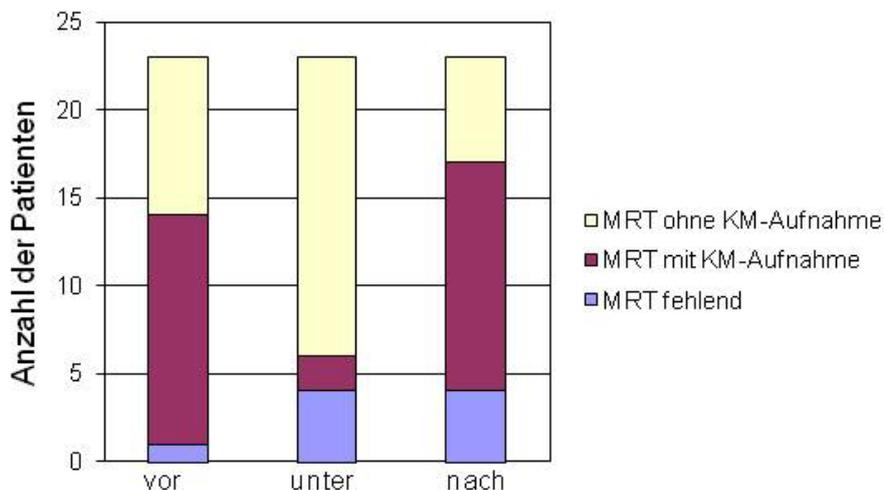


Abbildung 15: Kontrastmittel-aufnehmende Herde im MRT-Schädel vor, unter und nach Natalizumabtherapie. Die Anzahl der Patienten mit KM-aufnehmenden Herden im MRT steigt nach Beenden der Natalizumabtherapie wieder auf das Niveau vor Beginn der Therapie an.

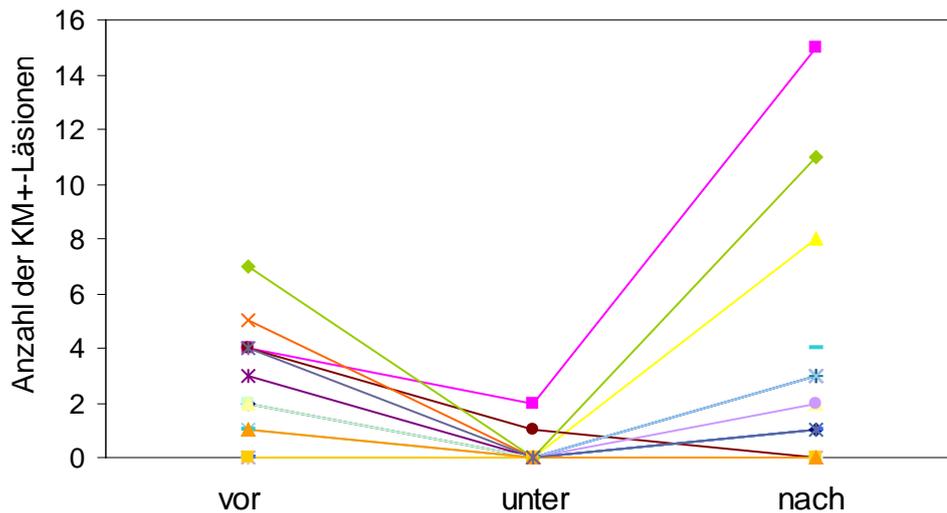


Abbildung 16: Anzahl der Kontrastmittel-aufnehmenden Läsionen im MRT vor, unter und nach Natalizumabtherapie. Die Werte eines einzelnen Patienten sind durch Linien miteinander verbunden.

3.5 Erkrankungsverlauf nach Beenden der Natalizumabtherapie und Beginn einer Therapie mit Glatirameracetat

10/23 Patienten starteten zeitnah nach Beenden der Natalizumabtherapie eine immunmodulatorische Therapie mit Glatirameracetat.

In der Gruppe der 10 Patienten, die die Natalizumabtherapie beendet haben und zeitnah eine Therapie mit Glatirameracetat begonnen haben, betrug die mittlere jährliche Schubrate 2,4 (+/- 1,5) vor Beginn der Natalizumabtherapie, sank dann im Mittel auf 0,3 (+/- 0,4) unter Natalizumab und stieg nach Absetzen von Natalizumab wieder auf 2,1 (+/- 1,2) an.

Der mittlere EDSS verschlechterte sich nach Absetzen von Natalizumab, von 4,6 (+/- 0,8) auf 4,8 (+/- 1,0). Der mittlere EDSS in dieser Gruppe von 10 Patienten verschlechterte sich im Mittel schon unter der Natalizumabtherapie, weil 3/10 Patienten sich verschlechterten, 2/10 aufgrund einer Verschlechterung der Gangunsicherheit. Der mittlere EDSS vor Beginn der Natalizumabtherapie betrug 4,4 (+/- 0,8).

Bei 10/10 Patienten konnten MRTs vor Therapiebeginn, unter und nach Beenden der Natalizumabtherapie ausgewertet werden. 7/10 Patienten hatten vor Beginn der Natalizumabtherapie KM-aufnehmende Läsionen und 6/10 Patienten

nach Beenden der Natalizumabtherapie KM-aufnehmende Läsionen im MRT. 2/10 Patienten hatten auch während der Natalizumabtherapie KM-aufnehmende Läsionen. Die mittlere Anzahl der KM-aufnehmenden Herde stieg von 1,6 (+/- 1,5) vor Natalizumab auf 3,3 (+/-4,8) nach Natalizumab. Die mittlere Anzahl der KM-aufnehmenden Läsionen unter Natalizumab betrug 0,3 (+/- 0,7). 2 Patienten hatten eine hohe Anzahl KM-aufnehmender Läsionen nach Beenden der Natalizumabtherapie.

Von diesen 10 Patienten beendeten 5 Patienten die Therapie mit Glaterimeracetat und begannen erneut eine Natalizumabtherapie (siehe Tab. 5).

3.6 Erkrankungsverlauf nach Wiederaufnahme der Natalizumabtherapie

Aufgrund des Wiederanstiegs der Krankheitsaktivität nahmen 10 von 23 Patienten die Natalizumabtherapie wieder auf, im Mittel 12,4 (+/- 9,4) Monaten nach Beenden der Therapie (Spannweite 4-37 Monate) wieder auf, die sie zuvor aus Angst vor der PML beendet hatten. Der Beobachtungszeitraum des Erkrankungsverlaufs der Patienten mit Reexposition Natalizumab betrug 15 (+/- 7,7) Monate.

Nach Wiederaufnahme der Natalizumabtherapie sank die Schubrate von 2,7 (+/- 1,6) erneut auf 0,6 (+/- 0,6) (Abb. 17).

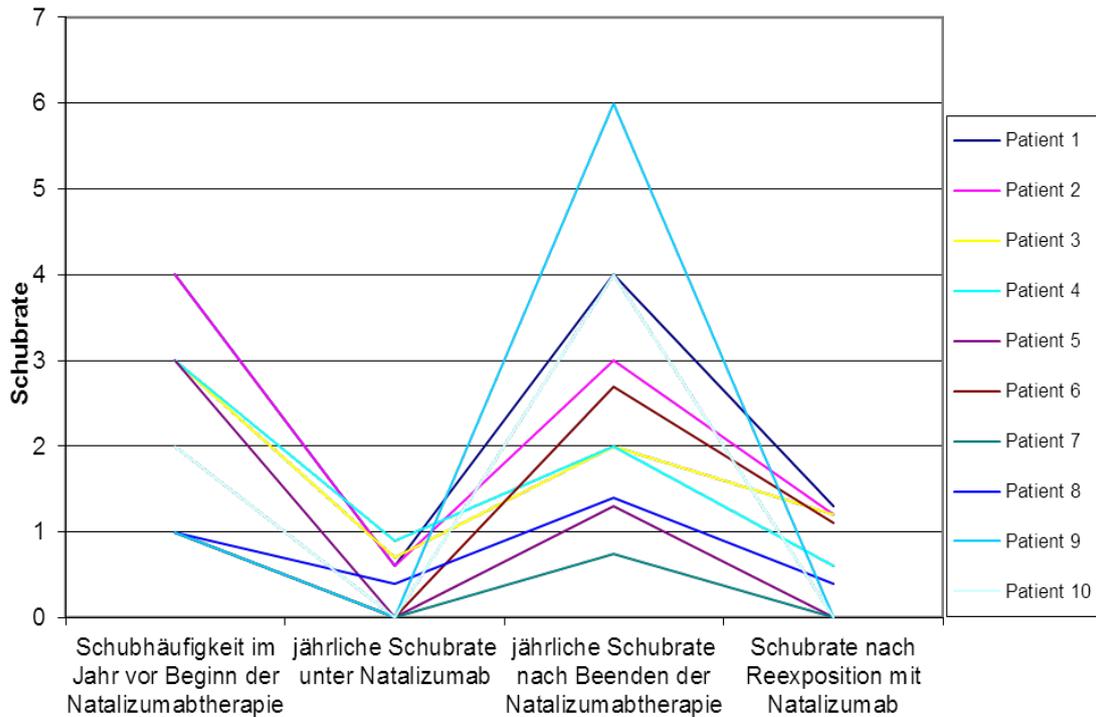


Abbildung 17: Jährliche Schubrate vor, unter, nach und unter erneuter Natalizumabtherapie

Nach Beenden der Natalizumabtherapie kam es bei diesen 10 Patienten zu einer deutlichen Behinderungsprogression von 3,7 (\pm 1,3) auf 4,7 (\pm 0,9). Nach Wiederaufnahme der Natalizumabtherapie stabilisierte sich der Erkrankungsverlauf erneut bei allen Patienten. So besserte sich der mittlere EDSS unter erneuter Natalizumabtherapie auf 4,1 (\pm 1,0) (Abb. 18).

Die Wiederaufnahme der Natalizumabtherapie bewirkte ein Absinken der KM-aufnehmenden Läsionen von 5,2 (\pm 5,0) auf 0,5 (\pm 1,4).

Insgesamt zeigten sich kein Wirkungsverlust und keine relevanten Nebenwirkungen nach Wiederaufnahme der Therapie.

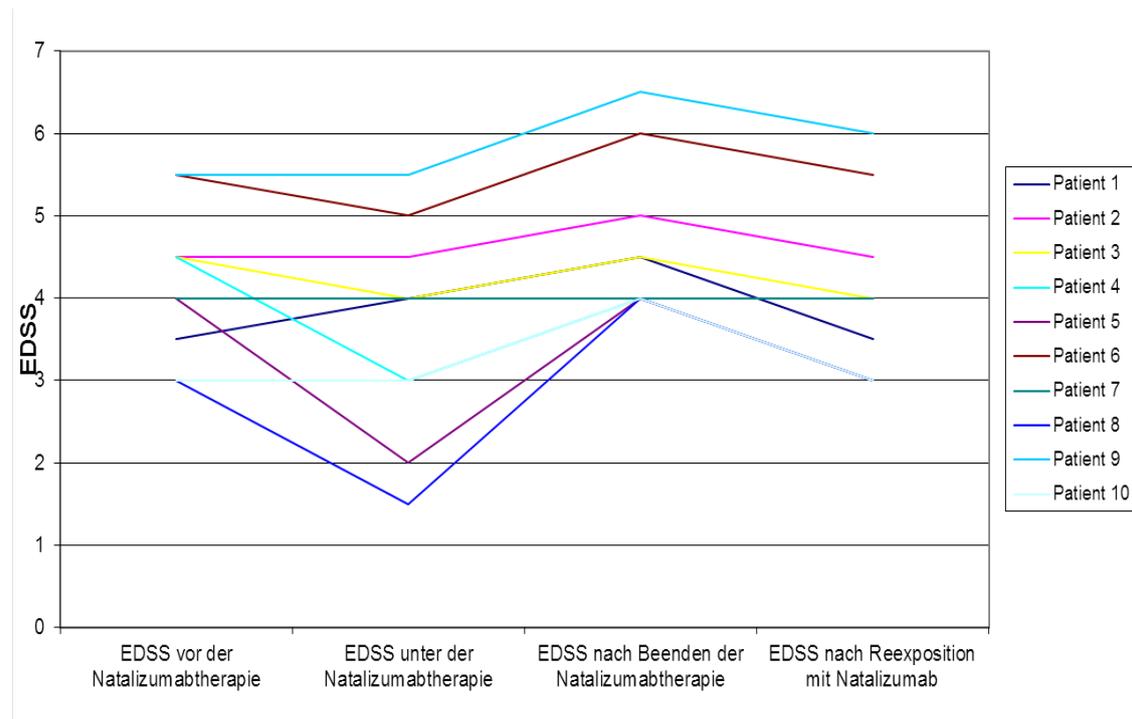


Abbildung 18: Behinderungsgrad der Patienten, EDSS-Verlauf vor, unter, nach und unter erneuter Natalizumabtherapie

3.7 Exemplarischer Erkrankungsverlauf eines Patienten

Bei einer 19-jährigen Patientin manifestierte sich im Juli 2002 erstmals eine schubförmige MS mit einer Hemiparese rechts und einer NNO rechts. Von Oktober 2002 bis Dezember 2006 bestand eine immunmodulatorische Basistherapie mit Rebif 44 µg. Unter dieser Therapie kam es anfangs zu jährlichen Schüben, im weiteren Verlauf zu einem Wirkungsverlust mit zuletzt 4 Schüben pro Jahr, die zu einer zunehmenden Behinderung führten mit einem EDSS von 3,5. Im Januar 2007 wurde eine Natalizumabtherapie begonnen. Im Referenz-MRT zeigten sich vor Therapiebeginn 4 KM-aufnehmende Herde. Unter der Natalizumabtherapie stabilisierte sich der Erkrankungsverlauf. Die jährliche Schubrate unter Natalizumab betrug 0,9. Der EDSS blieb unter der Natalizumabtherapie im Wesentlichen stabil bei 4,0. In den halbjährlichen MRT-Kontrollen unter Natalizumab zeigten zwei MRTs noch diskrete KM-Aufnahme (im zeitlichen Zusammenhang mit den beiden Schüben), die anderen MRTs zeigten keine Befundprogredienz und keine KM-Aufnahme. Im März 2010 beendete die Patientin aufgrund starker Ängste vor einer möglichen PML die 3-jährige Natalizumab-Therapie und begann drei Wochen später

mit einer Copaxone-Basistherapie. Nach Absetzen von Natalizumab zeigte sich im MRT drei Monate später deutliche Befundprogredienz mit neuen und größtenproredienten Läsionen sämtlich mit KM-Aufnahme. Es kam zu einem Erkrankungsschub im Juni 2010 mit Gehstreckenreduktion auf 330 m, so dass wiederholte Hochdosis Cortison-Stoß-Therapien erfolgten. Ende Juli 2010 wurde die Natalizumab-Therapie wieder aufgenommen. Seitdem stabilisierte sich der Krankheitsverlauf erneut. Der EDSS besserte sich 2011 wieder auf 3,5 und die Gehstrecke stabilisierte sich sicher über 500 m.

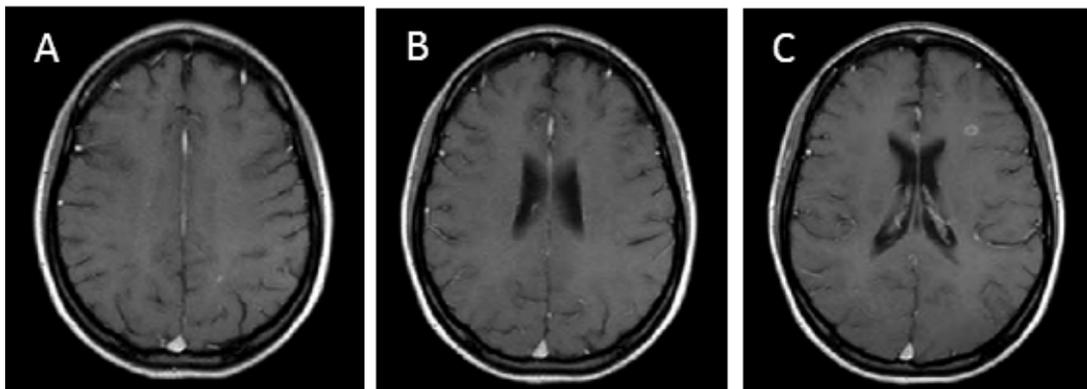


Abbildung 19: Anzahl der KM-aufnehmenden Läsionen im MRT vor Beginn der Natalizumabtherapie mit einigen KM aufnehmenden Läsionen in den T1-gewichteten Aufnahmen.

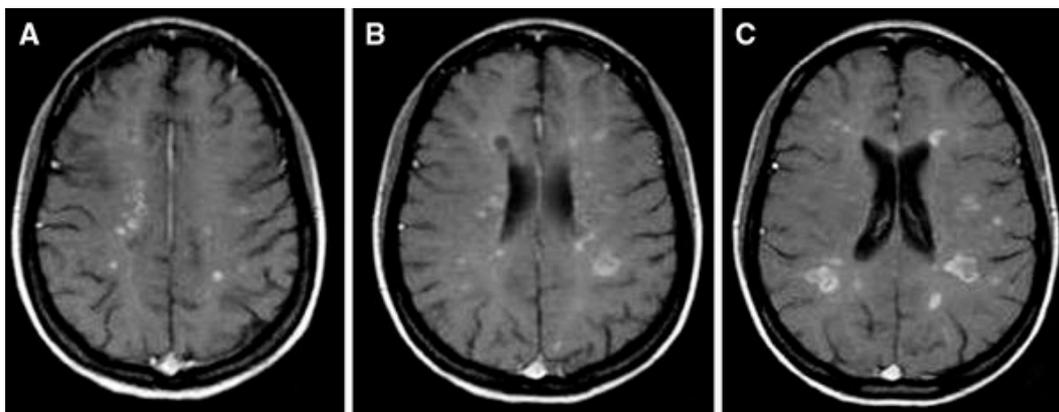


Abbildung 20: MRT derselben Patientin wie in Abb. 19 3 Monate nach Beenden der Natalizumabtherapie mit multiplen KM-aufnehmenden Läsionen in den T1-gewichteten Aufnahmen.

3.8 Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen im Blut unter Therapie mit Natalizumab

3.8.1 Befunde der Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersuchten wir longitudinal insgesamt 111 EDTA- Proben von 17 mit Natalizumab behandelten MS-Patienten und 10 Proben von 9 unbehandelten MS-Patienten. Wir fanden einen Anstieg aller untersuchten Immunzellsubtypen, nämlich der Monozyten, der CD4⁺ T-Helfer-Zellen, der CD8⁺ T-zytotoxischen-/Suppressor-Zellen, der CD19⁺CD138⁺ Plasmablasten, der reifen CD19⁺ B-Zellen und der CD19⁺CD10⁺ prä-B-Zellen während der Natalizumabtherapie (7,4 fach). Wir fanden, dass die verschiedenen Immunzellsubtypen als Konsequenz der Natalizumabtherapie in unterschiedlicher Weise anstiegen (Abb. 21). Dieser unproportionale Anstieg der verschiedenen Leukozytentypen wurde sowohl im intra-individuellen Vergleich, als auch im interindividuellen Vergleich mit den 9 unbehandelten MS-Patienten beobachtet. Der intraindividuelle Anstieg der reifen CD19⁺ B-Zellen (Median: 2,8 fach) und besonders der CD19⁺CD10⁺ prä-B-Zellen (7,4 fach) ist signifikant ($p < 0.01$) größer als der Anstieg der Gesamt-Lymphozytenpopulation (1,5 fach), der CD19⁺CD138⁺ Plasmablasten (1,5 fach), der CD8⁺ T-Zellen (1,8 fach), der CD4⁺ T-Zellen (1,5 fach) und der Monozyten (1,3 fach). Diese Erhöhung der Leukozytenuntergruppen hielt während der gesamten Therapie mit Natalizumab an. MS-Patienten vor Beginn der Natalizumabtherapie unterschieden sich nicht von den unbehandelten MS-Patienten (Krumbholz et al., 2008b)(Abb.21 und Abb. 22).

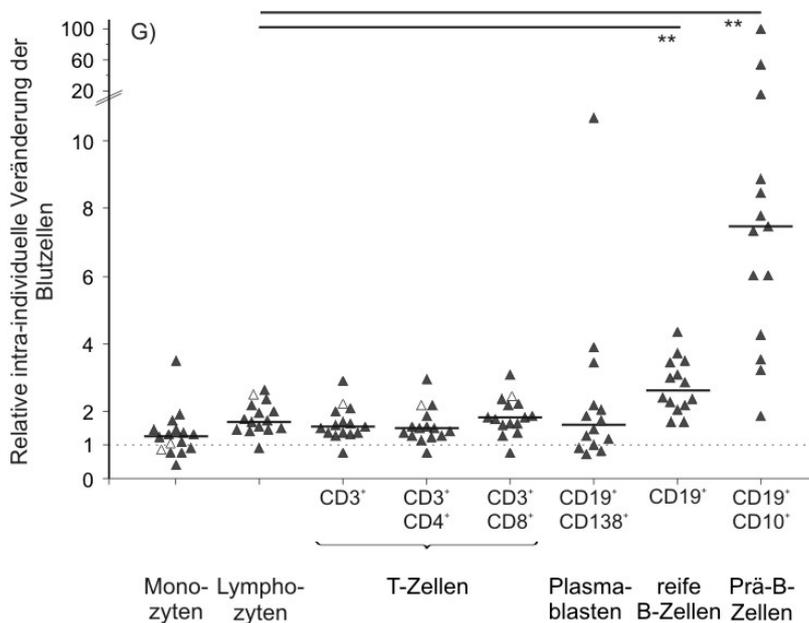
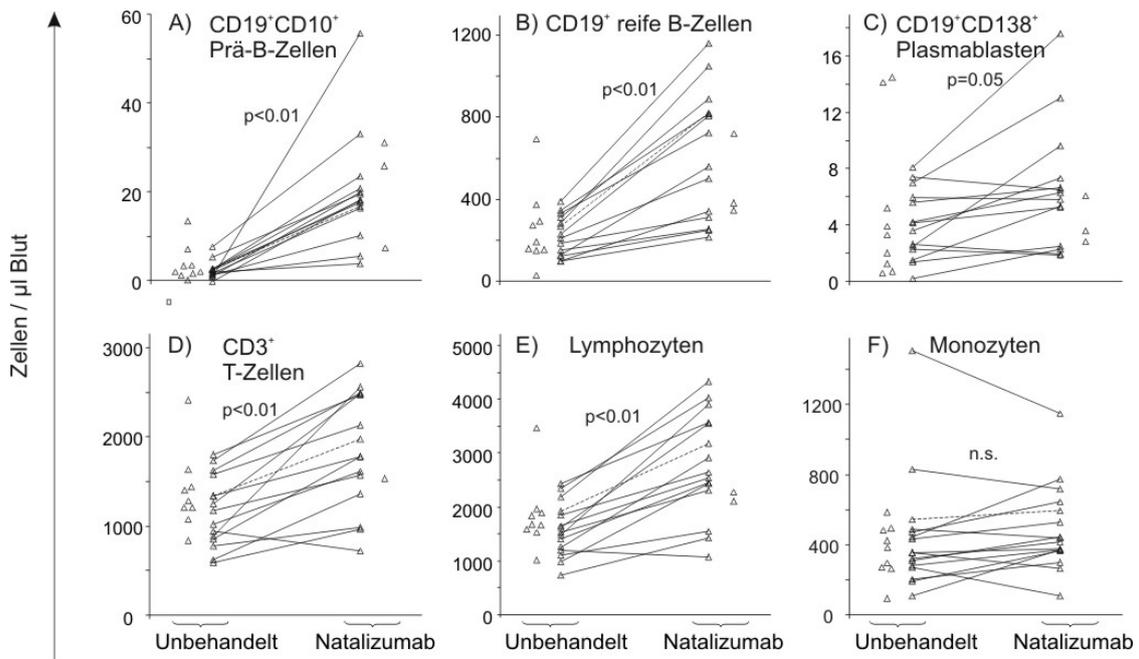


Abbildung 21: Im peripheren Blut der Natalizumab-Patienten sind reife B-Zellen und insbesondere unreife B-Zellen signifikant stärker erhöht als die Gesamtlymphozytenpopulation. Die absolute Anzahl der angegebenen Zelltypen wurde in 121 Blutproben im Durchflußzytometer gemessen.

(A-F): Jeder Datenpunkt repräsentiert den Median aller Proben eines Patienten: links vor und rechts nach Beginn der Natalizumabtherapie. Die Linien zeigen die intraindividuelle Veränderung. Datenpunkte, die nicht mit einer Linie verbunden sind, stellen entweder unbehandelte Patienten dar (links) oder Patienten, von denen kein Wert vor Beginn der Natalizumabtherapie erhältlich war (rechts). Die gepunkteten Linien verbinden den Median vor und unter Natalizumabtherapie desjenigen Patienten,

dessen Werte exemplarisch longitudinal in Abb.22 gezeigt werden. Die p-Werte wurden mit Wilcoxon Test für Paare gefolgt von Bonferroni Korrektur errechnet.

(G) Für die Gesamtlymphozyten, Monozyten und verschiedene Lymphozytensubpopulationen werden die intraindividuellen Veränderungen der absoluten Zellzahl als Faktor dargestellt. Die Faktoren werden wie folgt errechnet: Median aller Proben während Therapie dividiert durch Median aller Proben vor Therapie. Die horizontalen Linien repräsentieren den Median dieser Faktoren für jeden Zelltyp. Werte von Patienten, von denen nicht von allen Zelltypen Messungen erhältlich waren, sind durch ein offenes Dreieck dargestellt und wurden nicht in die statistische Evaluation eingeschlossen. P Werte für Lymphozyten, B-Zellen und prä-B-Zellen wurden mit Hilfe der *Friedman repeated measures analysis of variance on ranks* gefolgt von Dunn-Test berechnet. $CD19^+CD10^+$ prä-B-Zellen und $CD19^+$ B-Zellen waren signifikant stärker erhöht als die Gesamtlymphozyten. ** $p < 0,01$. Statistische Auswertung durch Dr. Markus Krumbholz.

In Abbildung 22 ist exemplarisch bei einem Patienten der longitudinale Verlauf aller Immunzellsubtypen dargestellt, die im Durchflußzytometer bestimmt wurden.

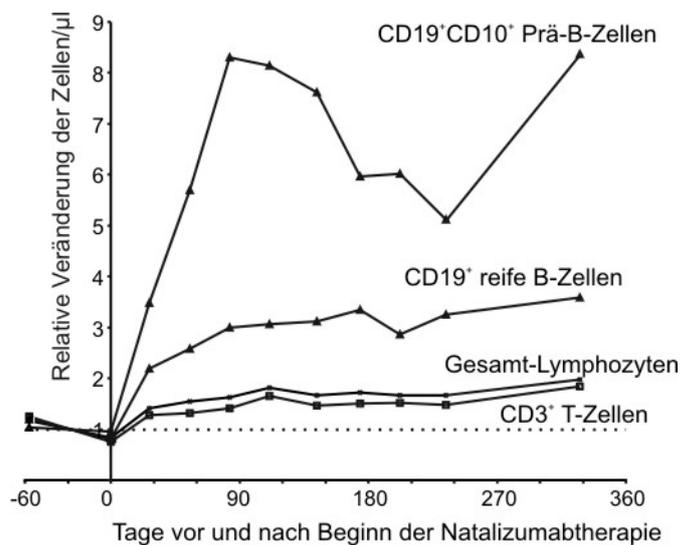


Abbildung 22: Reife und unreife B-Zellen zeigen longitudinal einen stabilen Anstieg, welcher größer ist als der anderer Immunzellen. Dargestellt ist der n-fache Anstieg der $CD19^+$ reifen B-Zellen, der $CD19^+CD10^+$ prä-B-Zellen, der $CD3^+$ T-Zellen und der Gesamtlymphozyten eines repräsentativen Patienten im zeitlichen Verlauf gegenüber dem Durchschnittswert von zwei Messungen vor Beginn der Natalizumabtherapie (dieser wird auf 1 gesetzt). Derselbe Patient ist in Abb. 21 A-F mit einer gepunkteten Linie dargestellt.

Die Abbildung 22 zeigt, dass der relative Anstieg der prä-B-Zellen besonders ausgeprägt ist. In Abbildung 23 sind die Absolutwerte der zirkulierenden B-Zellen (Abb. 23 A) und der prä-B Zellen (Abb. 23 B) von jedem untersuchten Patienten longitudinal dargestellt. Der Einfluss der Natalizumabtherapie auf die im Blut zirkulierenden hämatopoetischen Vorläuferzellen wurde weiter untersucht, auch mit molekularbiologischen Methoden (siehe auch 3.2.2.). In Abbildung 23 C-E ist von den gleichen Blutproben wie in A-B das Vorhandensein von Transkripten für Lymphoztenvorläuferzellen dargestellt.

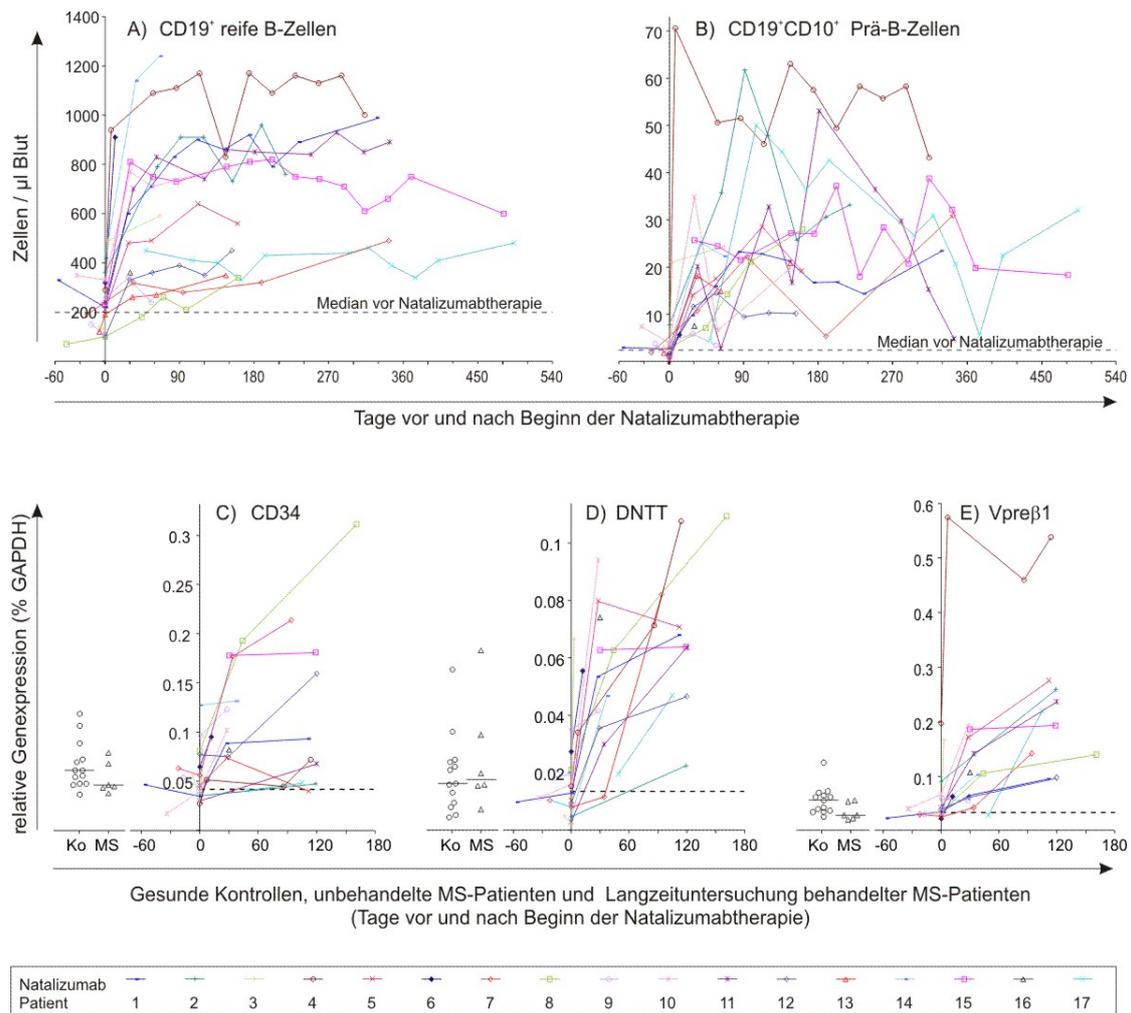


Abbildung 23: Longitudinale Untersuchung von reifen B-Zellen, prä-B-Zellen und Vorläufern von Immunzellen im Blut von Natalizumab behandelten MS Patienten. Die Zahl der reifen B-Zellen (A) und der prä-B-Zellen (B) pro µl Blut ist angegeben. Diese Werte ergeben sich aus Messungen mit der Durchflusszytometrie in Kombination mit den Werten aus dem Differentialblutbild. Jeder einzelne Patient wird durch eine Farbe repräsentiert. In (C-E) ist die zusammenfassende Darstellung der Transkripte für CD34, DNNT und Vpreβ1 aller Proben der drei Gruppen (gesunde Kontrollen, unbehandelte MS-Patienten und der mit Natalizumab behandelten

Patienten). Die gleichen Patienten sind mit den gleichen Farben gekennzeichnet wie in A und B. Gesunde Kontrollen und unbehandelte MS-Patienten werden auf der linken Seite in den Diagrammen gezeigt. Die gepunkteten Linien zeigen den Median aller Proben vor Beginn der Natalizumabtherapie an.

3.8.2 Molekularbiologische Befunde

Die Anwesenheit von hämatopoetischen Vorläuferzellen im peripheren Blut wurde auch mit Hilfe der qPCR nachgewiesen. CD10, das bei der Durchflusszytometrie in einer Doppelfärbung mit CD19 als ein Marker für Prä-B-Zellen gedient hat, kann nicht in der qPCR aus Vollblut bestimmt werden, weil CD10 auch auf Granulozyten exprimiert wird. Deshalb benutzten wir Primer für Vpre β 1 (Element des Prä-B-Zell-Rezeptors auf unreifen B-Zellen), DNTT (Marker für Lymphozytenvorläuferzellen) und CD34 (Marker für Progenitorzellen, aus denen Lymphoid- und Myeloidzellen entstehen).. Unter der Natalizumabtherapie zeigte sich ein intraindividueller Anstieg der relativen Genexpression dieser Gesamtblut-RNA-Transkripte im Vergleich zu zwei *Housekeeping* Genen (PPIA und GAPDH) (Abb.24). Dieser Anstieg zeigte sich ebenso im interindividuellen Vergleich zwischen unbehandelten MS-Patienten/Kontrollen und Natalizumabpatienten (Abb. 23 C-E).

Der gemessene Anstieg des Vpre β 1 Gentranskripts in der qPCR ist ein relativer, weil er errechnet wird aus dem Zielgen-Messwert geteilt durch den *Housekeeping*-Messwert (GAPDH und PPIA). Wir beobachteten einen 5,2/3,7 fachen Anstieg von DNTT im Vergleich zu GAPDH/PPIA als Marker für Lymphozytenvorläuferzellen unter der Natalizumabtherapie, einen 2,8/2,1 fachen Anstieg von Vpre β 1 als Marker für die Prä-B-Zellen und einen 1,9/1,5 fachen Anstieg von CD34 als Marker für die frühen Vorläuferzellen. Der Anstieg der lymphatischen Vorläuferzellen (Vpre β 1 und DNTT Transkripte) ist ausgeprägter als die der frühen CD34-Progenitorzellen. Die qPCR und die FACS-Untersuchung zeigen übereinstimmend, dass die Prä-B-Zellen im peripheren Blut unter der Natalizumabtherapie überproportional ansteigen (Krumbholz et al., 2008b)

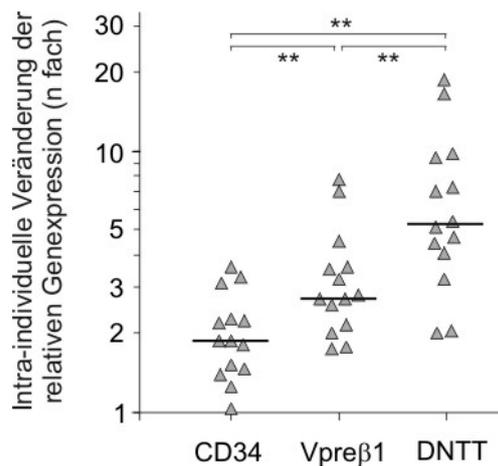


Abbildung 24: Veränderung der Menge von Transkripten für hämatopoetische Vorläuferzellen im Blut unter Natalizumabtherapie. Aus dem Vollblut wurde RNA extrahiert und cDNA umgeschrieben. Mit der TaqMan PCR wurden die Transkripte für CD34 (hämatopoetische Vorläuferzellen, aus denen sich sowohl Lymphozyten als auch myeloide Zellen entwickeln können), Vpreβ1 (ein Teil des Rezeptors der prä-B-Zellen) und DNTT (exprimiert von Lymphozytenvorläuferzellen) quantifiziert. Die angezeigten Faktoren repräsentieren die intraindividuelle Veränderung und wurden wie folgt berechnet: Median aller Probenwerte während der Natalizumabtherapie geteilt durch den Median aller Probenwerte vor Therapiebeginn. Nach logarithmischer Umwandlung folgten die Werte einer Normalverteilung und konnten durch ANOVA gefolgt vom Holm-Sidak Test für multiple Vergleiche analysiert werden (**p<0,01). Statistische Auswertung durch Dr. Markus Krumbholz.

4 Diskussion

4.1 Wirksamkeit von Natalizumab bei hochaktiver schubförmiger MS

Natalizumab ist aufgrund des Nebenwirkungsprofils mit möglichem Auftreten einer PML nur als Eskalationstherapie zur Behandlung hochaktiver Krankheitsverläufe zugelassen, d.h. für Patienten, die auf eine vorherige immunmodulatorische Basistherapie mit IFN- β oder Glatirameracetat nicht angesprochen haben (Rudick et al., 2006; Polman et al., 2006). Das erklärt, warum unser Patientenkollektiv bezüglich der Krankheitsdauer, der höheren Schubrate und dem höheren Behinderungsgrad von dem Patientenkollektiv der Zulassungsstudien abweicht.

In dieser Anwendungsbeobachtung von Natalizumab bei hochaktiven MS-Patienten mit schubförmigen Verlauf zeigt sich, dass Natalizumab auch bei einem Patientenkollektiv, welches von dem Studienpatientenkollektiv der AFFIRM- und SENTINEL-Zulassungsstudien in Hinsicht auf die höhere Krankheitsaktivität abweicht, sehr wirksam ist. Die Schubratenreduktion war mit 76% vergleichbar mit der in der AFFIRM-Studie erzielten Reduktion von 68% gegenüber der Placebogruppe.

In unserem Patientenkollektiv blieb der mittlere EDSS über den gesamten Beobachtungszeitraum von zwei Jahren stabil, dies kann vorsichtig als fehlende Behinderungsprogression gewertet werden. Zum einen sank die Schubrate deutlich in unserem zuvor hochaktiven Patientenkollektiv, die noch auftretenden Schübe waren mild und führten nicht zu einer Zunahme der Behinderung, zum anderen zeigte der stabilisierte mittlere EDSS in unserem Patientenkollektiv, dass auch unabhängig von den Schüben keine sekundär progrediente Verschlechterung eintrat. Die gute klinische Wirksamkeit bezüglich Schubrate und EDSS bei hochaktiven MS Patienten wurde inzwischen auch von anderen Gruppen beschrieben (Siehe vergleichende Darstellung der Daten in Tabelle 6) (Outteryck et al., 2010; Oturai et al., 2009; Putzki et al., 2010b).

Tabelle 6: Krankheitsaktivität unter Natalizumab bei hochaktiven Patienten in verschiedenen Zentren

	AFFIRM- Placebo- gruppe	AFFIRM- Verum- gruppe	Outteryck et al. 2010	Oturai et al. 2009	Putzki et al. 2010b	LMU- München
Anzahl	315	627	384	234	97	48
Alter bei Therapieanfang (Mittelwert)	36,7	35,6	38,05	39,5	36,5	35,4
Krankheitsdauer ¹(Spannweite)	6,0 (0-33)	5,0 (0-34)		8 (0-36)		10 (2-30)
Schübe 1 Jahr vor Natalizumab	1,5	1,53	2,19	2,53	2,3	2,8
Jährliche Schubrate unter Natalizumab	0,73	0,23	0,59	0,68	0,17	0,6
EDSS bei Therapiebeginn	2,3	2,3	3,53	4	3,5	4,1
EDSS nach einem Jahr Natalizumab			3,02		3,2	3,7
Schubraten- Reduktion		68%	73%	73%	93%	79%
Anteil der weiblichen Patienten	67%	72%	72%	63%	69%	75%

Fußnote zu Tabelle 6. ¹Der Median und die Spannweite der Krankheitsdauer sind in Jahren angegeben.

4.2 Rückkehr der Krankheitsaktivität nach Absetzen der Natalizumabtherapie

Die aktuellen Empfehlungen der EMA (*European Medicines Agency*) sehen vor, dass nach 2 Jahren Therapie mit Natalizumab mit dem Patienten ganz gezielt ein Aufklärungsgespräch bezüglich des PML-Risikos bei Fortführung der Natalizumabtherapie geführt wird (Pressemitteilung vom 21. Januar 2010 (www.ema.europa.eu)). Dies führt dazu, dass viele Patienten und zum Teil auch Ärzte die Natalizumabtherapie beenden. In unserer Gruppe beendeten 13 von 23 Patienten die Natalizumabtherapie aus Angst davor, an einer PML zu erkranken. Genaue Daten über den Krankheitsverlauf nach Beenden der Natalizumabtherapie fehlten zu diesem Zeitpunkt. In einer kleinen Arbeit wurde bei 10 Patienten wurde nach Absetzen einer kurzfristiger Natalizumabtherapie ein starker Anstieg der T2-Läsionen beschrieben, während nach Absetzen einer langfristigen Natalizumabtherapie sich nur eine geringe

T2-Läsionslastzunahme zeigte (Vellinga et al., 2008). Die Autoren schlossen daraus, dass für kurzzeitig behandelte Patienten die Gefahr eines Rebounds bestehen könnte. Der klinische Verlauf dieser Studienpatienten wurde nicht beschrieben (Vellinga et al., 2008). Stüve et. al. veröffentlichten 2009 den ersten Bericht über den klinischen Verlauf nach Absetzen von Natalizumab bei 23 Patienten, die ehemalige Teilnehmer an den Zulassungsstudien SENTNEL und AFFIRM waren (Stuve et al., 2009). Von den 23 Patienten in dieser Studie - 17 davon unter einer immunmodulatorischen Therapie (meist Interferon, zweimal Glaterimeracetat) - blieben 21 Patienten schubfrei, ein Patient hatte 2 Schübe und ein weiterer hatte einen Schub in einem Zeitraum von 14 Monaten nach Absetzen von Natalizumab. Der EDSS vor, unter und 14 Monate nach Natalizumabtherapie zeigte keinen signifikanten Unterschied und es wurde kein Anstieg der KM-aufnehmenden Läsionen nach Absetzen von Natalizumab festgestellt (Stuve et al., 2009). Insgesamt gingen die Autoren davon aus, dass es in einem Zeitraum von 1 Jahr nach Absetzen von Natalizumab zu keinem Rebound bzw. signifikanten Wiederanstieg der Krankheitsaktivität kommt.

Widererwarten zu dem damaligen Wissensstand zeigte unser Patientenkollektiv einen eindeutigen Wiederanstieg der Krankheitsaktivität nach Absetzen von Natalizumab. So hatten bei uns 18 von 23 Patienten mindestens einen Schub, 14 sogar innerhalb der ersten 6 Monate nach Absetzen von Natalizumab. Die jährliche mittlere Schubrate stieg nach Absetzen von Natalizumab deutlich an, begleitet von KM-aufnahme im MRT und Zunahme der Behinderungsprogression. Dabei ist die Intensität der Rückkehr der Krankheitsaktivität individuell unterschiedlich. Einer unserer Patienten mit hoher MRT-Aktivität vor Beginn einer Natalizumabtherapie zeigte einen schnellen und heftigen Wiederanstieg der Krankheitsaktivität nach Beenden der Therapie. Dies wird gestützt aus Fallberichten, die ebenfalls einen überschießenden Anstieg der Krankheitsaktivität beschreiben: Nach Absetzen von Natalizumab kam es 9 Wochen später zu einem Schub und KM-Aufnahme im MRT, nach eskalierter Schubtherapie mit Plasmapherese verschlechterte sich die Klinik unerwartet weiter bis auf EDSS 9,5 und das MRT zeigte ebenfalls eine weitere Zunahme der KM-aufnehmenden Läsionen. Eine Hirnbiopsie zeigte eine aktive Typ 1 Läsion mit ausgeprägtem axonalen Schaden (Lenhard et al., 2010).

In einer anderen Untersuchung wurden 32 Patienten beobachtet, die eine 4-monatige Therapiepause von Natalizumab durchführten (Miravalle et al., 2010). 12

der 32 Patienten erlitten in der Therapiepause einen Schub. Die Patienten mit Schub waren jünger, hatten eine etwas geringere Therapiedauer und eine höhere Schubaktivität, sowie mehr KM-aufnehmende Läsionen vor Beginn der Natalizumabtherapie im Vergleich mit der Patientengruppe ohne Schub. In unserer Patientengruppe zeigte sich nur die Anzahl der KM-aufnehmenden Läsionen als prädiktiver Marker für eine frühe Rückkehr der Schubaktivität, gegenüber der Patientengruppe mit einem späteren Beginn oder ausbleibenden Beginn der Schubaktivität. In unserer Patientengruppe entwickelten 18/23 Patienten Schubtätigkeit im ersten Jahr nach Absetzen von Natalizumab, obwohl 15/23 Patienten mit einer nachfolgenden Therapie im ersten halben Jahr begonnen hatten, davon 10 Patienten Glatirameracetat im ersten Monat nach Absetzen. Eine Deeskalationstherapie mit Glatirameracetat zeigte sich wirkungslos gegenüber der Rückkehr der Krankheitsaktivität nach Absetzen einer Natalizumabtherapie (Havla et al., 2011). Auch eine andere Arbeitsgruppe beobachtete eine Rückkehr der Krankheitsaktivität beginnend 3 Monate nach Absetzen und schloss daraus, dass eine Therapiepause bzw. sogenannte drug-holiday nicht sinnvoll ist (Killestein et al., 2010). Eine weitere Arbeitsgruppe beobachtete in einer Gruppe von 48 Natalizumabpatienten in einem Zeitraum von 3-6 Monaten nach Beenden der Natalizumabtherapie einen erneuten Anstieg der Schubrate auf das Niveau vor Natalizumab. Ein positiver Effekt einer immunmodulatorischen Therapie (Interferone, Copaxone) konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Kaufman et al., 2011).

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild: In unserer Untersuchung und in der Mehrzahl der anderen Studien kam es nach Absetzen von Natalizumab bei vielen Patienten (>50%), zu einer erneuten Zunahme der Krankheitsaktivität, zumindest auf das Ausgangsniveau vor Natalizumab. Bei einzelnen Patienten zeigte sich eine überschießende Krankheitsaktivität, ein sogenannter Rebound. Die genauen Mechanismen sind noch nicht geklärt und müssen weiter untersucht werden. Unsere Beobachtung zeigt, dass diese Krankheitsaktivität nach Absetzen von Natalizumab nicht durch Glatirameracetat verhindert werden kann. Es ist derzeit offen, welche anderen Therapien nach Natalizumab am besten eingesetzt werden sollten, um einen Wiederanstieg der Krankheitsaktivität und damit eine Behinderungsprogression zu verhindern. Allerdings muss aufgrund unserer Daten und der Ergebnisse aus anderen Studien von einer Therapiepause ohne Beginn einer anderen immunmodulatorischen Therapie zum jetzigen Zeitpunkt abgeraten werden.

4.3 Veränderungen von Immunzellsubtypen im Blut unter der Therapie mit Natalizumab

4.3.1 Disproportionaler Anstieg verschiedener Immunzellsubtypen

Natalizumab erhöht die im Blut zirkulierenden Lymphozyten (Polman et al., 2006). Wir haben die Effekte von Natalizumab auf einzelne Immunzellsubpopulationen, nämlich T-Zellen, Monozyten, B-Zellen, Plasmazellen und prä-B Zellen untersucht. Dabei zeigte sich ein Anstieg der Gesamtlmphozyten um das 1,5 fache. In unserer Untersuchung war der Anstieg der CD4⁺-T-Zellen etwas geringer als der der CD8⁺-T-Zellen. Das stimmt mit Ergebnissen einer anderen Studie überein, dabei wurde bei 23 Patienten dies dort als sinkender CD4⁺/CD8⁺-Quotient im Blut unter der Natalizumabtherapie beschrieben (Stuve et al., 2006a).

Auffällig war in unserer Untersuchung ein überproportionaler Anstieg der B-Zellen und der prä-B-Zellen (Krumbholz et al., 2008b). Unsere Ergebnisse wurden mittlerweile bestätigt (Putzki et al., 2010a; Kowarik et al., 2011).

Der Befund, dass Natalizumab einen disproportional großen Effekt auf B-Zellen hat, hat auch Implikationen für den vermuteten Wirkungsmechanismus von Natalizumab. Der ursprüngliche Grund α 4-Integrin zu blockieren, lag in Experimenten zur EAE mit dem Ziel das Eindringen von autoreaktiven T-Zellen in das ZNS zu blockieren (Yednock et al., 1992). Aktuelle Befunde sprechen aber dafür, dass bei der MS auch andere Immunzellen, speziell B-Zellen, wesentlich zur Pathogenese beitragen (Meinl et al., 2006; Hauser et al., 2008). Mehrere Beobachtungen wie der präferentielle Anstieg von B-Zellen, die Hochregulation von Genen, die in Bezug zu einer B-Zellaktivierung stehen (Lindberg et al., 2008), ein Abfall von B-Zellen im Liquor unter der Natalizumabtherapie (Stuve et al., 2006b) und die Ko-Stimulation von B-Zellen in vitro über α 4-Integrin (Carrasco and Batista, 2006) sind vereinbar mit der Hypothese, dass Natalizumab auch pathogene B-Zellen beeinflusst. Natalizumab könnte den Eintritt pathogener B-Zellen in das ZNS blockieren, in einer ähnlichen Weise wie es für T-Zellen angenommen wird. Die therapeutische Inhibition des Eindringens von B-Zellen in das ZNS ist allerdings spekulativ, denn der Anstieg von B-Zellen im Blut kann sowohl auf einem reduzierten Austritt aus dem Blut wie einer verstärkten Mobilisierung aus dem Knochenmark/Milz beruhen.

4.3.2 Effekte auf hämatopoetische Progenitorzellen

Der Anstieg von Lymphozyten im Blut unter der Therapie mit Natalizumab kann neben reduzierter Extravasation auch auf einer vermehrten Freisetzung aus dem Knochenmark oder lymphatischen Organen beruhen. Wir fanden einen überproportionalen Anstieg der CD19⁺ CD10⁺ prä-B-Zellen im Blut um das 7,4 fache mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Dieser Befund wurde mit der quantitativen PCR bestätigt. Die ergänzenden molekularbiologischen Untersuchungen zeigten, dass Vorläuferzellen für Lymphozyten (DN1T, VpreB1) stärker ansteigen als CD34⁺ Zellen, die als Stammzellen für lymphatische und myeloische Zellen fungieren. Unsere Untersuchungen weisen darauf hin, dass beim Menschen α 4 Integrin für das Verbleiben der CD34⁺ Zellen und der Progenitorzellen im Knochenmark beteiligt ist.

Die Rolle von α 4 Integrin bei der Hämatopoese wurde tierexperimentell herausgearbeitet. Es wurden Mäuse generiert, denen α 4 Integrin spezifisch in hämatopoetischen Progenitorzellen fehlte. Das führte zu einer erhöhten Präsenz von Progenitorzellen im Blut und später auch in der Milz. Transplantationsstudien in Mäusen haben gezeigt, dass das *Homing* von hämatopoetischen Zellen in das Knochenmark von α 4 Integrin wesentlich bestimmt wird (Scott et al., 2003). Zwei weitere Arbeiten haben das vermehrte Auftreten von CD34⁺ Stammzellen im Blut unter Natalizumab-Therapie beschrieben (Zohren et al., 2008; Bonig et al., 2008). In diesen Arbeiten wurde die Durchflusszytometrie eingesetzt und ein Anstieg von CD34⁺ Zellen um das etwa 4-6 fache beschrieben und eine Synergie in der Mobilisierung aus dem Knochenmark mit G-CSF beobachtet (Zohren et al., 2008).

4.4 PML verursacht durch JC-Virus: Ist eine Risikostratifizierung möglich?

Die Angst vor einer möglichen PML führt dazu, dass viele Patienten ihre Natalizumabtherapie beenden. Dies führt aber zu einem Wiederanstieg der Krankheitsaktivität, deshalb ist eine Risikostratifizierung wichtig.

Eine Risikostratifizierung gestaltet sich aktuell noch schwierig. Es gibt keinen Prädiktor für den bevorstehenden Ausbruch einer PML. 46% der PML-Patienten unter Natalizumab hatten zuvor eine immunsuppressive Therapie, in der Tygris-Beobachtungsstudie hatten nur 20% der Patienten zuvor eine immunsuppressive

Therapie, das heißt, Patienten mit immunsuppressiver Vortherapie tragen ein höheres Risiko eine PML unter Natalizumabtherapie zu entwickeln (<http://www.tysabri.de/index.php?inhalt=login>). In unserer Kohorte ist der Anteil an immunsuppressiv vorbehandelten Patienten allerdings höher, er beträgt 27% (13/48).

Von Gorelik et al. wurde ein neuer, 2 Schritte umfassender ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) entwickelt um JC-Virus spezifische Antikörper im Serum und Plasma zu detektieren (Gorelik et al., 2010). 53,6% der Patienten waren positiv, die falsch negative Rate beträgt ca. 2,5%, alle Proben der 17 PML-Patienten wurden positiv für JC-Virus spezifische Antikörper getestet. Bei einer Serokonversionsrate von 2% jährlich ergäbe sich ein deutlich geringeres Risiko für die seronegative Gruppe, eine PML unter Natalizumab zu entwickeln. Diese Hypothese soll in großen klinischen Studien überprüft werden.

Veröffentlicht wurde kürzlich als Poster auf der Jahrestagung der American Academy of Neurology das geschätzte Risiko für das Auftreten einer PML unter einer Natalizumabtherapie: nach einem 2-Faktor Algorithmus (≤ 2 oder >2 Jahren Natalizumabtherapie) und fehlende oder zurückliegende immunsuppressive Therapie. Immunsuppressiv vorbehandelte Patienten haben nach >2 Jahren Natalizumabtherapie ein 4 fach erhöhtes Risiko eine PML zu entwickeln (1,5 versus 4,5/1000). Wird der Antikörper-Status gegen JC-Virus für die Risikokalkulation berücksichtigt, erhöht sich bei positivem JC-Virus-Antikörpernachweis das Risiko bei >2 Jahre Natalizumabtherapie für die immunsuppressiv Vorbehandelten auf 8,1/1000, und verringert sich für die JC-Virus-Antikörper negativen, immunsuppressiv Vorbehandelten auf 1,2/1000) (Sandrock et al., 2011).

Auf Grund der hohen Prävalenzrate einer JC-Virus-Infektion und der Seltenheit einer PML bei Gesunden wird vermutet, dass es viele Barrieren als Schutz vor der Erkrankung geben muss und dass das erhöhte Risiko einer PML sich nur durch das gleichzeitige Absenken mehrerer Barrieren erklären lässt (Berger et al., 2009). Es gibt noch Unklarheiten im Verständnis der JC-Virologie, insbesondere was den Mechanismus der Reaktivierung und der PML-Entstehung angeht (White and Khalili, 2011). Das JC-Virus kommt in zwei genetischen Formen vor, in der archetypischen Form (in der Niere) und in der prototypischen Form (PML-Typ). Der PML-Typ kommt im Gehirn und in zirkulierenden Blutzellen vor. Die beiden Virus-Formen unterscheiden sich in einer nicht kodierenden Region, die für die Transkription und DNA-Replikation zuständig ist (White and Khalili, 2011).

Ein möglicher Mechanismus, der zur PML prädisponieren könnte, wäre die vermehrte Freisetzung von prä-B-Zellen aus dem Knochenmark durch Natalizumab, die latent mit dem PML-Typ des Virus infiziert sein können und so das Virus ins Gehirn transportieren könnten (Ransohoff, 2007; Krumbholz et al., 2008b). Ein weiterer möglicher Mechanismus könnte eine Infektion (z.B mit HHV-6) während der Natalizumabtherapie sein, die das latente PML-Virus aggressiver werden lässt und so eine PML-Entstehung zusätzlich erleichtert (Yao et al., 2008). Als weiterer wichtiger Mechanismus für die PML-Entstehung ist die mangelhafte Immunüberwachung im Gehirn zu nennen (Stuve et al., 2006b).

4.5 Risiko-Nutzen Abwägung der Natalizumabtherapie

In der Zusammenschau aller Befunde zeigt sich, dass Patienten mit hochaktiver schubförmiger MS sehr von einer Natalizumabtherapie profitieren. Der Krankheitsverlauf gemessen als Schubrate, EDSS und kernspintomographischen Befunden stabilisiert sich dauerhaft unter einer langfristigen Therapie. Weiteres Monitoring der Patienten bezüglich des Langzeittherapieeffektes und der Verträglichkeit ist sinnvoll. Überschattet werden die positiven Therapieeffekte von dem Risiko einer PML unter Natalizumab. Mögliche prädisponierende Wirkungsmechanismen von Natalizumab wurden hier diskutiert: mangelhafte Immunüberwachung im ZNS durch effektive Unterbindung der Lymphozytenmigration ins ZNS, vermehrte Freisetzung von latent JC-Virus-infizierten prä-B-Zellen aus dem Knochenmark, die als trojanisches Pferd JC-Virus ins ZNS transportieren könnten, sowie ein viraler Infekt (z.B. mit HHV-6), der das latente PML-Virus aggressiver werden lässt. Individuelle prädisponierende Faktoren für das Entstehen einer PML bei zuvor immunkompetenten und unter der Therapie weiterhin immunkompetenten Patienten sind bislang nicht bekannt, so dass eine Risikostratifizierung zur Zeit nur über eine JC-Virus-Antikörpertestung und unter Berücksichtigung der Therapiedauer und der Vortherapie möglich ist.

Auch das Beenden einer Natalizumabtherapie kann bei hochaktiven Patienten, wie in unserer Kohorte beobachtet, problematisch sein, da die Krankheitsaktivität nach 3-4 Monaten zurückkehrt, bei einzelnen Patienten sogar überschießend, und zu einer zunehmenden Behinderung führen kann.

Mit jedem einzelnen Patienten sind intensive Gespräche zur individuellen Risiko-Nutzen-Abwägung unabdingbar, um gemeinsam das persönlich ideale Therapiekonzept zu finden.

5 Literaturverzeichnis

Abram,C.L. and Lowell,C.A. (2009). The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 27:339-62., 339-362.

Bauer,M. (2008). The roles of integrins during autoimmunity. *Zellbiologie aktuell 2/2008*, 15-21.

Bauer,M., Brakebusch,C., Coisne,C., Sixt,M., Wekerle,H., Engelhardt,B., and Fassler,R. (2009). Beta1 integrins differentially control extravasation of inflammatory cell subsets into the CNS during autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1920-1925.

Berger,J.R., Houff,S.A., and Major,E.O. (2009). Monoclonal antibodies and progressive multifocal leukoencephalopathy. *MAbs.* 1, 583-589.

Bonig,H., Wundes,A., Chang,K.H., Lucas,S., and Papayannopoulou,T. (2008). Increased numbers of circulating hematopoietic stem/progenitor cells are chronically maintained in patients treated with the CD49d blocking antibody natalizumab. *Blood.* 111, 3439-3441.

Carrasco,Y.R. and Batista,F.D. (2006). B-cell activation by membrane-bound antigens is facilitated by the interaction of VLA-4 with VCAM-1. *EMBO J.* 25, 889-899.

Compston,A. and Coles,A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet.* 372, 1502-1517.

Confavreux,C., Vukusic,S., Moreau,T., and Adeleine,P. (2000). Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 343, 1430-1438.

De Jager,P.L., Jia,X., Wang,J., de Bakker,P.I., Ottoboni,L., Aggarwal,N.T., Piccio,L., Raychaudhuri,S., Tran,D., Aubin,C., Briskin,R., Romano,S., Baranzini,S.E., McCauley,J.L., Pericak-Vance,M.A., Haines,J.L., Gibson,R.A., Naeglin,Y., Uitdehaag,B., Matthews,P.M., Kappos,L., Polman,C., McArdle,W.L., Strachan,D.P., Evans,D., Cross,A.H., Daly,M.J., Compston,A., Sawcer,S.J., Weiner,H.L., Hauser,S.L., Hafler,D.A., and Oksenberg,J.R. (2009). Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat. Genet.* 41, 776-782.

Dustin,M.L. and Colman,D.R. (2002). Neural and immunological synaptic relations. *Science.* 298, 785-789.

Engelhardt,B. (2008). Immune cell entry into the central nervous system: involvement of adhesion molecules and chemokines. *J. Neurol. Sci.* 274, 23-26.

Engelhardt,B. and Kappos,L. (2008). Natalizumab: targeting alpha4-integrins in multiple sclerosis. *Neurodegener. Dis.* 5, 16-22.

Flachenecker,P. und Zettl,U.K. (2006a). Epidemiologie. R.M.Schmidt and F.A.Hoffmann, eds. (München, Jena: Urban & Fischer), pp. 11-17.

Flachenecker,P. und Zettl,U.K. (2006b). Krankheitsverlauf und Prognose. In Multiple Sklerose, R.M.Schmidt and F.A.Hoffmann, eds. (München, Jena: Urban & Fischer), pp. 61-69.

Gahmberg,C.G., Fagerholm,S.C., Nurmi,S.M., Chavakis,T., Marchesan,S., and Gronholm,M. (2009). Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim. Biophys. Acta.* 1790, 431-444.

Gilden,D.H. (2005). Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 4, 195-202.

Giovannoni,G., Cutter,G.R., Lunemann,J., Martin,R., Munz,C., Sriram,S., Steiner,I., Hammerschlag,M.R., and Gaydos,C.A. (2006). Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 5, 887-894.

Gorelik,L., Lerner,M., Bixler,S., Crossman,M., Schlain,B., Simon,K., Pace,A., Cheung,A., Chen,L.L., Berman,M., Zein,F., Wilson,E., Yednock,T., Sandroock,A., Goelz,S.E., and Subramanyam,M. (2010). Anti-JC virus antibodies: implications for PML risk stratification. *Ann. Neurol.* 68, 295-303.

Grossman,R.I., Braffman,B.H., Brorson,J.R., Goldberg,H.I., Silberberg,D.H., and Gonzalez-Scarano,F. (1988). Multiple sclerosis: serial study of gadolinium-enhanced MR imaging. *Radiology.* 169, 117-122.

Hafler,D.A., Compston,A., Sawcer,S., Lander,E.S., Daly,M.J., De Jager,P.L., de Bakker,P.I., Gabriel,S.B., Mirel,D.B., Ivinson,A.J., Pericak-Vance,M.A., Gregory,S.G., Rioux,J.D., McCauley,J.L., Haines,J.L., Barcellos,L.F., Cree,B., Oksenberg,J.R., and Hauser,S.L. (2007). Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* 357, 851-862.

Hardt,C. (2006). Genetik und Umweltfaktoren. In Multiple Sklerose, R.M.Schmidt and F.A.Hoffmann, eds. (München, Jena: Urban & Fischer), pp. 19-31.

Hauser,S.L., Waubant,E., Arnold,D.L., Vollmer,T., Antel,J., Fox,R.J., Bar-Or,A., Panzara,M., Sarkar,N., Agarwal,S., Langer-Gould,A., and Smith,C.H. (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 358, 676-688.

Havla,J., Gerdes,L.A., Meinl,I., Krumbholz,M., Faber,H., Weber,F., Pellkofer,H.L., Hohlfeld,R., and Kumpfel,T. (2011). De-escalation from natalizumab in multiple sclerosis: recurrence of disease activity despite switching to glatiramer acetate. *J. Neurol.* 258, 1665-1669.

Henze,T. (2005). *Symptomatische Therapie der Multiplen Sklerose.* (Stuttgart, New York: Thieme).

Hohlfeld,R. (1997). Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain* 120, 865-916.

Hohlfeld,R. and Wekerle,H. (2004). Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: From pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101 *Suppl 2*: 14599-15606.

Jain,P., Coisne,C., Enzmann,G., Rottapel,R., and Engelhardt,B. (2010). Alpha4beta1 integrin mediates the recruitment of immature dendritic cells across the blood-brain barrier during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 184, 7196-7206.

Johnson,M.S., Lu,N., Denessiouk,K., Heino,J., and Gullberg,D. (2009). Integrins during evolution: evolutionary trees and model organisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1788, 779-789.

Kaufman,M.D., Lee,R., and Norton,H. (2011). Course of relapsing-remitting multiple sclerosis before, during and after natalizumab. *Mult. Scler.* 17, 490-494.

Keegan,B.M. and Noseworthy,J.H. (2002). Multiple sclerosis. *Annu. Rev. Med.* 53:285-302., 285-302.

Kieseier,B.C., Gold,R., and Hartung,H.P. (2003). Mitoxanthrone in the therapy of multiple sclerosis. *Nervenarzt.* 74, 906-910.

Killestein,J., Vennegoor,A., Strijbis,E.M., Seewann,A., van Oosten,B.W., Uitdehaag,B.M., and Polman,C.H. (2010). Natalizumab drug holiday in multiple sclerosis: poorly tolerated. *Ann. Neurol.* 68, 392-395.

Kowarik,M.C., Pellkofer,H.L., Cepok,S., Korn,T., Kumpfel,T., Buck,D., Hohlfeld,R., Berthele,A., and Hemmer,B. (2011). Differential effects of fingolimod (FTY720) on immune cells in the CSF and blood of patients with MS. *Neurology*. 76, 1214-1221.

Krumbholz,M., Faber,H., Steinmeyer,F., Hoffmann,L.A., Kumpfel,T., Pellkofer,H., Derfuss,T., Ionescu,C., Starck,M., Hafner,C., Hohlfeld,R., and Meinl,E. (2008a). Interferon-beta increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity. *Brain*. 131, 1455-1463.

Krumbholz,M., Meinl,I., Kumpfel,T., Hohlfeld,R., and Meinl,E. (2008b). Natalizumab disproportionately increases circulating pre-B and B cells in multiple sclerosis. *Neurology*. 71, 1350-1354.

Krumbholz,M., Pellkofer,H., Gold,R., Hoffmann,L.A., Hohlfeld,R., and Kumpfel,T. (2007). Delayed allergic reaction to natalizumab associated with early formation of neutralizing antibodies. *Arch. Neurol*. 64, 1331-1333.

Kurtzke,J.F. (1983). Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 33, 1444-1452.

Lenhard,T., Biller,A., Mueller,W., Metz,I., Schonberger,J., and Wildemann,B. (2010). Immune reconstitution inflammatory syndrome after withdrawal of natalizumab? *Neurology*. 75, 831-833.

Lindberg,R.L., Achtnichts,L., Hoffmann,F., Kuhle,J., and Kappos,L. (2008). Natalizumab alters transcriptional expression profiles of blood cell subpopulations of multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol*. 194, 153-164.

Lublin,F.D. and Reingold,S.C. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 46, 907-911.

Lucchinetti,C., Brück,W., Parisi,J., Scheithauer,B., Rodriguez,M., and Lassmann,H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol*. 47, 707-717.

McDonald,W.I., Compston,A., Edan,G., Goodkin,D., Hartung,H.P., Lublin,F.D., McFarland,H.F., Paty,D.W., Polman,C.H., Reingold,S.C., Sandberg-Wollheim,M., Sibley,W., Thompson,A., van den Noort,S., Weinshenker,B.Y., and Wolinsky,J.S. (2001).

Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 50, 121-127.

Meinl,E. (1999). Concepts of viral pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 12, 303-307.

Meinl,E., Krumbholz,M., and Hohlfeld,R. (2006). B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: Migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Ann. Neurol.* 59, 880-892.

Miravalle,A., Jensen,R., and Kinkel,R.P. (2011). Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in Patients With Multiple Sclerosis Following Cessation of Natalizumab Therapy. *Arch. Neurol.* 68:186-191.

Monaco,M.C., Atwood,W.J., Gravell,M., Tornatore,C.S., and Major,E.O. (1996). JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implications for viral latency. *J. Virol.* 70, 7004-7012.

Moser,M., Legate,K.R., Zent,R., and Fassler,R. (2009). The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science.* 324, 895-899.

Oturai,A.B., Koch-Henriksen,N., Petersen,T., Jensen,P.E., Sellebjerg,F., and Sorensen,P.S. (2009). Efficacy of natalizumab in multiple sclerosis patients with high disease activity: a Danish nationwide study. *Eur. J. Neurol.* 16, 420-423.

Outteryck,O., Ongagna,J.C., Zephir,H., Fleury,M.C., Lacour,A., Blanc,F., Vermersch,P., and de,S.J. (2010). Demographic and clinic characteristics of French patients treated with natalizumab in clinical practice. *J. Neurol.* 257, 207-211.

Padgett,B.L., Walker,D.L., ZuRhein,G.M., Eckroade,R.J., and Dessel,B.H. (1971). Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet.* 1 (7712), 1257-1260.

Patrikios,P., Stadelmann,C., Kutzelnigg,A., Rauschka,H., Schmidbauer,M., Laursen,H., Sorensen,P.S., Bruck,W., Lucchinetti,C., and Lassmann,H. (2006). Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain.* 129, 3165-3172.

Patzold,U., Hecker,H., and Pocklington,P. (1982). Azathioprine in treatment of multiple sclerosis. Final results of a 4 1/2-year controlled study of its effectiveness covering 115 patients. *J. Neurol. Sci.* 54, 377-394.

Polman,C.H., O'Connor,P.W., Havrdova,E., Hutchinson,M., Kappos,L., Miller,D.H., Phillips,J.T., Lublin,F.D., Giovannoni,G., Wajgt,A., Toal,M., Lynn,F., Panzara,M.A., and Sandrock,A.W. (2006). A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 354, 899-910.

Polman,C.H., Reingold,S.C., Banwell,B., Clanet,M., Cohen,J.A., Filippi,M., Fujihara,K., Havrdova,E., Hutchinson,M., Kappos,L., Lublin,F.D., Montalban,X., O'Connor,P., Sandberg-Wollheim,M., Thompson,A.J., Waubant,E., Weinshenker,B., and Wolinsky,J.S. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* 69, 292-302.

Polman,C.H., Reingold,S.C., Edan,G., Filippi,M., Hartung,H.P., Kappos,L., Lublin,F.D., Metz,L.M., McFarland,H.F., O'Connor,P.W., Sandberg-Wollheim,M., Thompson,A.J., Weinshenker,B.G., and Wolinsky,J.S. (2005). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann. Neurol.* 58, 840-846.

Poser,C.M. (1994). The epidemiology of multiple sclerosis: a general overview. *Ann. Neurol.* 36 Suppl 2:S180-93..

Poser,C.M. (1995). Viking voyages: the origin of multiple sclerosis? An essay in medical history. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 161:11-22..

Putzki,N., Baranwal,M.K., Tettenborn,B., Limmroth,V., and Kreuzfelder,E. (2010a). Effects of natalizumab on circulating B cells, T regulatory cells and natural killer cells. *Eur. Neurol.* 63, 311-317.

Putzki,N., Yaldizli,O., Maurer,M., Cursiefen,S., Kuckert,S., Klawe,C., Maschke,M., Tettenborn,B., and Limmroth,V. (2010b). Efficacy of natalizumab in second line therapy of relapsing-remitting multiple sclerosis: results from a multi-center study in German speaking countries. *Eur. J. Neurol.* 17, 31-37.

Ransohoff,R.M. (2005). Natalizumab and PML. *Nat. Neurosci.* 8, 1275.

Ransohoff,R.M. (2007). "Thinking without thinking" about natalizumab and PML. *J. Neurol. Sci.* 259, 50-52.

Rieckmann,P. (2006). [Escalating immunomodulatory therapy of multiple sclerosis. Update (September 2006)]. *Nervenarzt.* 77, 1506-1518.

Rudick,R.A., Stuart,W.H., Calabresi,P.A., Confavreux,C., Galetta,S.L., Radue,E.W., Lublin,F.D., Weinstock-Guttman,B., Wynn,D.R., Lynn,F., Panzara,M.A., and Sandrock,A.W. (2006). Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 354, 911-923.

Sailer,M., Fischl,B., Salat,D., Tempelmann,C., Schonfeld,M.A., Busa,E., Bodammer,N., Heinze,H.J., and Dale,A. (2003). Focal thinning of the cerebral cortex in multiple sclerosis. *Brain.* 126, 1734-1744.

Sailer,M., Losseff,N.A., Wang,L., Gawne-Cain,M.L., Thompson,A.J., and Miller,D.H. (2001). T1 lesion load and cerebral atrophy as a marker for clinical progression in patients with multiple sclerosis. A prospective 18 months follow-up study. *Eur. J. Neurol.* 8, 37-42.

Sailer,M., O'Riordan,J.I., Thompson,A.J., Kingsley,D.P., MacManus,D.G., McDonald,W.I., and Miller,D.H. (1999). Quantitative MRI in patients with clinically isolated syndromes suggestive of demyelination. *Neurology.* 52, 599-606.

Sandrock,A., Hotermans,C., Richman,S., Natarajan,A., Lee,S., Plavina,T., Bloomgren,G., Subramanyam,M., and Bozik,C. (2011). Risk Stratification für Progressive Multifocal Leukoencephalopathy (PML) in MS Patients: Role of prior Immunosuppressant Use, Natalizumab-Treatment Duration, and Anti-JCV Antibody Status. *Neurology* 76S4, A248.

Schmidt,R.M. and Hoffmann,F.A. (2006). Geschichte der MS. In *Multiple Sklerose*, R.M.Schmidt and F.A.Hoffmann, eds. (München, Jena: Urban & Fischer), pp. 3-9.

Schumacker,G.A., Beebe,G., Kibler,R.F., Kurland,L.T., Kurtzke,J.F., McDowell,L.F., Nagler,B., Sibley,W.A., Tourtellotte,W.W., and Willman,T.L. (1965). Problems of experimental trials of therapy im multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 122:552-68..

Scott,L.M., Priestley,G.V., and Papayannopoulou,T. (2003). Deletion of alpha4 integrins from adult hematopoietic cells reveals roles in homeostasis, regeneration, and homing. *Mol. Cell Biol.* 23, 9349-9360.

Serafini,B., Rosicarelli,B., Franciotta,D., Magliozzi,R., Reynolds,R., Cinque,P., Andreoni,L., Trivedi,P., Salvetti,M., Faggioni,A., and Aloisi,F. (2007). Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J. Exp. Med.* 204, 2899-2912.

Sixt,M., Bauer,M., Lammermann,T., and Fassler,R. (2006). Beta1 integrins: zip codes and signaling relay for blood cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 482-490.

Sospedra,M. and Martin,R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 683-747.

Steiner,O., Coisne,C., Cecchelli,R., Boscacci,R., Deutsch,U., Engelhardt,B., and Lyck,R. (2010). Differential roles for endothelial ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in shear-resistant T cell arrest, polarization, and directed crawling on blood-brain barrier endothelium. *J. Immunol.* 185, 4846-4855.

Stuve,O., Cravens,P.D., Frohman,E.M., Phillips,J.T., Remington,G.M., von,G.G., Cepok,S., Singh,M.P., Tervaert,J.W., De,B.M., MacManus,D., Miller,D.H., Radu,E.W., Cameron,E.M., Monson,N.L., Zhang,S., Kim,R., Hemmer,B., and Racke,M.K. (2009). Immunologic, clinical, and radiologic status 14 months after cessation of natalizumab therapy. *Neurology.* 72, 396-401.

Stuve,O., Marra,C.M., Bar-Or,A., Niino,M., Cravens,P.D., Cepok,S., Frohman,E.M., Phillips,J.T., Arendt,G., Jerome,K.R., Cook,L., Grand'Maison,F., Hemmer,B., Monson,N.L., and Racke,M.K. (2006a). Altered CD4+/CD8+ T-cell ratios in cerebrospinal fluid of natalizumab-treated patients with multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 63, 1383-1387.

Stuve,O., Marra,C.M., Jerome,K.R., Cook,L., Cravens,P.D., Cepok,S., Frohman,E.M., Phillips,J.T., Arendt,G., Hemmer,B., Monson,N.L., and Racke,M.K. (2006b). Immune surveillance in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *Ann. Neurol.* 59, 743-747.

Tan,C.S. and Koralnik,I.J. (2010). Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. *Lancet Neurol.* 9, 425-437.

Trapp,B.D., Peterson,J., Ransohoff,R.M., Rudick,R., Mork,S., and Bo,L. (1998). Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 338, 278-285.

Trapp,B.D., Ransohoff,R., and Rudick,R. (1999). Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr. Opin. Neurol.* 12, 295-302.

Trotter,J.L. and Garvey,W.F. (1980). Prolonged effects of large-dose methylprednisolone infusion in multiple sclerosis. *Neurology.* 30, 702-708.

Truyen,L., van Waesberghe,J.H., van Walderveen,M.A., van Oosten,B.W., Polman,C.H., Hommes,O.R., Ader,H.J., and Barkhof,F. (1996). Accumulation of hypointense lesions ("black holes") on T1 spin-echo MRI correlates with disease progression in multiple sclerosis. *Neurology.* 47, 1469-1476.

Vellinga,M.M., Castelijns,J.A., Barkhof,F., Uitdehaag,B.M., and Polman,C.H. (2008). Postwithdrawal rebound increase in T2 lesional activity in natalizumab-treated MS patients. *Neurology*. 70, 1150-1151.

von Andrian,U.H. and Engelhardt,B. (2003). Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. *N. Engl. J. Med.* 348, 68-72.

White,M.K. and Khalili,K. (2011). Pathogenesis of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy--Revisited. *J. Infect. Dis.* 203, 578-586.

Wiendl,H., Toyka,K.V., Rieckmann,P., Gold,R., Hartung,H.P., and Hohlfeld,R. (2008). Basic and escalating immunomodulatory treatments in multiple sclerosis: current therapeutic recommendations. *J. Neurol.* 255, 1449-1463.

Willis,S.N., Stadelmann,C., Rodig,S.J., Caron,T., Gattenloehner,S., Mallozzi,S.S., Roughan,J.E., Almendinger,S.E., Blewett,M.M., Bruck,W., Hafler,D.A., and O'Connor,K.C. (2009). Epstein-Barr virus infection is not a characteristic feature of multiple sclerosis brain. *Brain*. 132, 3318-3328.

Yao,K., Gagnon,S., Akhyani,N., Williams,E., Fotheringham,J., Frohman,E., Stuve,O., Monson,N., Racke,M.K., and Jacobson,S. (2008). Reactivation of human herpesvirus-6 in natalizumab treated multiple sclerosis patients. *PLoS. One.* 3, e2028.

Yednock,T.A., Cannon,C., Fritz,L.C., Sanchez-Madrid,F., Steinman,L., and Karin,N. (1992). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*. 356, 63-66.

Zohren,F., Toutzaris,D., Klarner,V., Hartung,H.P., Kieseier,B., and Haas,R. (2008). The monoclonal anti-VLA-4 antibody natalizumab mobilizes CD34+ hematopoietic progenitor cells in humans. *Blood*. 111, 3893-3895.

6 Abkürzungen

AIDS	acquired immune deficiency syndrome
AFFIRM	ClinicalTrials.gov number, NCT00027300 Natalizumab Safety and Efficacy in RR-MS
ANA	Antinukleäre Antikörper
AZA	Azathioprin
CCP	citrullinierte Peptide
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CRP	C-reaktives Protein
CS-1	connecting segment 1 von Fibronectin
DMSG	Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft
DNTT	Deoxynucleotidyltransferase
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	Expanded disability status scale
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting, Durchflußzytometer
FDA	Food and Drug Administration
FTY720	Fingolimod, ein Sphingosin-1-Rezeptor Modulator
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLAT	Glaterimeracetat
G-Protein	GPT-bindendes Protein
HHV6	Humanes Herpes-Virus 6
ICAM	intercellular cell adhesion molecule
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G oder Gammaglobulin
IVIG	Immunglobuline zur intravenösen Gabe
KM	Kontrastmittel
LFA-1	α L β 2-Integrin, lymphocyte function-associated antigen
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität

MAdCAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule
MBP	Myelin basisches Protein
Mitox	Mitoxanthron
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MSTKG	Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe
MHC	Major histocompatibility complex
MOBP	Myelin-Oligodendrozyten-basisches Protein
NAT	Natalizumab
NF-1	Transkriptionsfaktor nuclear factor 1 class X protein
NNO	Neuritis nervi optici
PAP IIID	nach Papanicolaou
PAXgene™	System mit RNA-Stabilisator zur Gewinnung von Vollblut-RNA
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, siehe auch qPCR
PLP	Proteolipidprotein
PML	Progressive Multifokale Leukenzephalopathie
PPIA	Petidyl-prolyl isomerase A
PP-MS	Primary progressive MS = primär progrediente MS
PR-MS	Progressive relapsing MS = progredient schubförmige MS
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktoren
RNA	Ribonukleinsäure
RR-MS	Relapsing remitting MS = schubförmige MS
SD	standard deviation, Standardabweichung
SDF-1	stromal cell derived factor 1, CXCL12
SENTINEL	ClinicalTrials.gov number, NCT00030966. Safety and Efficacy of Natalizumab in Combination with Interferon Beta-1a in patients with RR-MS
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SP-MS	Secondary progressive MS = Sekundär progrediente MS
VEP	Visuell evozierte Potentiale

VCAM	vascular cell adhesion molecule
VLA-4	$\alpha 4\beta 1$ -Integrin, very late antigen-4
ZNS	Zentralnervensystem

7 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die darauf beruht, dass Immunzellen aus dem Blut in das ZNS eindringen. 1992 wurde im Tiermodell gezeigt, dass die Blockade der α 4-Integrine auf pathogenen T-Zellen die Entwicklung einer autoimmunen Enzephalomyelitis verhindert. Natalizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der an α 4-Integrine bindet. Natalizumab verhindert die Interaktion zwischen α 4-haltigen Integrinen und seinen natürlichen Liganden. Das führt zu einer reduzierten Einwanderung von Lymphozyten in das ZNS.

Natalizumab reduziert die Zahl von neu auftretenden Schüben bei MS Patienten wesentlich besser als die etablierten Basistherapeutika Interferon- β und Glatirameracetat. Dieses Präparat wurde deshalb sogar vorzeitig in den USA zugelassen, jedoch von dem Hersteller im Februar 2005 vom Markt genommen nach dem Auftreten von 3 Fällen Progressiver Multifokaler Leukenzephalopathie (PML), einer durch JC-Virus verursachten schweren ZNS-Erkrankung. Im Juni 2006 wurde Natalizumab erneut zugelassen, aber eingeschränkt auf hochaktive MS-Patienten. Weitere auch zum Teil tödlich verlaufende PML-Erkrankungen sind unter Monotherapie mit Natalizumab aufgetreten, die meisten nach einer Behandlungsdauer von mehr als 2 Jahren und das mit einer Häufigkeit von etwa 1:1000.

Diese Arbeit sollte folgende Fragestellungen untersuchen. Erstens, wie wirksam ist Natalizumab in einer hochaktiven Patientengruppe, die sich von denen in den Zulassungsstudien unterscheidet? Zweitens, wegen der zunehmenden PML-Gefahr unter langfristiger Natalizumabtherapie setzen viele Patienten Natalizumab ab. Wie ist der Krankheitsverlauf nach Absetzen von Natalizumab? Drittens, wie verändern sich zirkulierende Immunzellsubtypen unter Natalizumabtherapie?

In unserem hochaktiven Patientenkollektiv (n=48) zeigte Natalizumab ähnlich wie in den Zulassungsstudien eine sehr gute Wirksamkeit. Die jährliche Schubrate wurde von 2,8 auf 0,6 reduziert und die Behinderungsprogression wurde aufgehalten (der mittlere EDSS war 4,2 vor Natalizumab und nach 2 Jahren Therapie 3,9). Auch das MRT zeigte einen Rückgang der Krankheitsaktivität an. Das Absetzen von Natalizumab führte jedoch nach 3-4 Monaten bei 10/23 Patienten zu einer Rückkehr

der Krankheitsaktivität (jährliche Schubrate stieg von 0,6 auf 2,0; der EDSS verschlechterte sich von 4,2 auf 4,7). In einem Zeitraum von einem Jahr entwickelten 18/23 Patienten neue, zum Teil schwer verlaufende Schübe. Bei Wiederaufnahme der Natalizumabtherapie bei 10/23 Patienten zeigte sich erneut ein Therapieeffekt.

In begleitenden Laboruntersuchungen wurde Blut von 17 MS-Patienten vor und während der Natalizumabtherapie untersucht. Mit der Durchflusszytometrie (Zusammenarbeit mit der Klinischen Chemie) fanden wir, dass die Natalizumabtherapie zu einem Anstieg der CD19⁺ reifen B-Zellen führte, der stärker war als der anderer Lymphozyten/Monozyten im Blut (2,8 fach versus 1,3-1,8 facher Anstieg in Zellen/ μ l). Noch stärker war der Anstieg von CD19⁺CD10⁺ prä-B-Zellen (7,4 fach). Zirkulierende hämatogene Progenitorzellen wurden auch mit der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion untersucht (Zusammenarbeit mit Dr. Krumbholz in unserem Institut). Dabei zeigte sich ein Anstieg von CD34⁺ Stammzellen und noch stärker von Lymphozytenvorläufern wie durch Messung von Vpre β 1 und DNNTT gesehen wurde.

Zusammenfassend zeigte sich, dass Natalizumab auch bei schwer betroffenen MS Patienten sehr wirkungsvoll den Krankheitsverlauf günstig beeinflussen kann und zu einer Reduktion der Schubrate und Stabilisierung der Behinderungsprogression führt. Bei einem Absetzen nach 2 Jahren ist bei den meisten Patienten mit einer Rückkehr der Krankheitsaktivität ab 3 Monaten zu rechnen. Durch Natalizumab werden im Blut verschiedene reife Immunzellsubtypen erhöht, vor allem B-Zellen. Die beobachtete starke Zunahme zirkulierender hämatopoetischer Progenitorzellen könnte auf einer Mobilisierung dieser Zellen aus dem Knochenmark beruhen. Da gerade prä-B-Zellen als Träger von JC-Virus bekannt sind, könnte dieses zusammen mit einer reduzierten Immunüberwachung des ZNS unter Natalizumab zu dem Entstehen einer PML beitragen.

8 Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Krumbholz,M., **Meinl,I.**, Kumpfel,T., Hohlfeld,R., and Meinl,E. (2008). Natalizumab disproportionately increases circulating pre-B and B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 71, 1350-1354.

Havla,J., Gerdes,L.A., **Meinl,I.**, Krumbholz,M., Faber,H., Weber,F., Pellkofer,H.L., Hohlfeld,R., and Kumpfel,T. (2011). De-escalation from natalizumab in multiple sclerosis: recurrence of disease activity despite switching to glatiramer acetate. *J. Neurol.* 258,1665-1669

Kongressbeiträge

M. Krumholz, **I. Meinl**, T. Kämpfel, R. Hohlfeld, E. Meinl.

Natalizumab disproportionately increases circulating pre-B and B-cells in multiple sclerosis.

9th International Congress of Neuroimmunology, Fort Worth, Texas, 26.10.-30.10.2008

I. Meinl, R. Hohlfeld, T. Kämpfel

Manifestation einer Rheumatoiden Arthritis bei einem Patienten mit Multipler Sklerose nach Beginn der Natalizumabtherapie: Erfolgreiche Behandlung mit Rituximab

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN), Neurowoche, Mannheim, 21.-25.9.2010

I. Meinl, J. Havla, R. Hohlfeld, T. Kämpfel

Treatment with Natalizumab: Stabilization of disease in severely affected patients with relapsing-remitting multiple sclerosis

26th Congress of the European committee for treatment and research in multiple sclerosis (ECTRIMS), Gothenburg, Sweden, 13-16 October 2010

9 Danksagung

Meiner Doktormutter **Frau PD Dr. Tania Kümpfel** gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des spannenden Themas, für die intensive Betreuung und die konstruktive Kritik bei der Ausarbeitung meiner Dissertation.

Meinem Betreuer für den experimentellen Teil meiner Doktorarbeit **Herrn Dr. Markus Krumbholz** danke ich für die ausgezeichnete Einführung in die experimentellen Arbeitstechniken, für die statistische Auswertung der Daten und generell für die nicht zu übertreffende Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Reinhard Hohlfeld, Direktor des Institutes für klinische Neuroimmunologie der LMU München, danke ich für interessante Diskussionen und für seine stets freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Meinem Ehemann **Herrn Prof. Edgar Meinel**, meinen Kindern **Hanna und Lorenz** sowie **Marvin Lausmann** danke ich für die emotionale Unterstützung und Hilfe bei technischen Problemen mit dem Computer.

Herrn Dr. Manfred Wick danke ich für die Durchführung der Durchflusszytometrie und für hilfreiche Diskussionen.

Meinen Kolleg/Innen **Frau Sabine Pitter, Herrn Robert Bittner, Frau Angelika Bamberger, Frau Dr. Lisa Gerdes, Frau Dr. Hannah Pellkofer, Frau Dr. Elisabeth Schuh und Herrn Dr. Joachim Havla** danke ich für das freundschaftliche und hilfsbereite Arbeitsklima.

10 Lebenslauf

Ingrid Meinel (geb. Romann)

Institut für Klinische Neuroimmunologie

Klinikum der Universität München

Marchioninstr. 15

81377 München

- 5.5.1962 geboren in Mannheim
- 1968-1972 Grundschule in Dörnigheim
- 1972-1974 Förderstufe der Dietrich-Bonhoeffer-Schule Dörnigheim
- 1974-1981 Gymnasium Hohe Landesschule Hanau
- 2.6.1981 Abitur
- 1981-1988 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
- 17.5.1988 Ärztliche Prüfung
- 10.6.1988 Approbation als Ärztin
- 5.8./6.8.1988 standesamtliche/kirchliche Trauung mit Edgar Meinel in Würzburg
Ökumenischen Zentrum in Würzburg-Lengfeld
- 15.1.1989-
- 31.7.1990 Tätigkeit als Assistenzärztin in der Abteilung für Neurologie und
Neuropsychologie der Fachklinik Enzensberg in Hopfen a. See/Füssen
Chefarzt Dr. M. Prosiegel
- 26.8.1990 Geburt der Tochter Hanna
- 17.1.1992 Geburt des Sohnes Lorenz
- 1.10.2006 Beginn der Tätigkeit als Assistenzärztin im Institut für
klinische Neuroimmunologie an der LMU München
Direktor Prof. Dr. R. Hohlfeld