

## TRATAMENTUL CU RITUXIMAB ÎN EPIDERMOLIZA BULOASĂ DOBÂNDITĂ: EFICIENȚĂ CLINICĂ, EFECTUL ASUPRA FACTORULUI DE ACTIVARE A CELULELOR B

### TREATMENT WITH RITUXIMAB IN EPIDERMOLYSIS BULLOSA ACQUISITA: CLINICAL RESPONSE, EFFECT ON B-CELL ACTIVATING FACTOR

A. BAICAN\*, M.T. CHIRIAC\*\*, CORINA BAICAN\*, RODICA COSGAREA\*,  
VICTORINA MACOVEI\*, C. SITARU\*\*\*

Cluj-Napoca

#### Rezumat

Factorul de activare a celulei B (BAFF), membru al familiei TNF, reglează supraviețuirea și proliferarea celulelor B. Am investigat răspunsul clinic, modificările nivelelor BAFF și titrului autoanticorpilor circulanți, timp de 1 an, într-un caz de epidermoliză buloasă dobândită (EBA) severă tratată cu rituximab. Diagnosticul de EBA a fost confirmat prin examen histologic, imunfluorescență directă, imunfluorescență indirectă pe piele clivată și imunoblot. După 4 perfuzii de Rituximab (375 mg/m<sup>2</sup>) administrate la interval de o săptămână, pacientul a prezentat o remisie parțială a leziunilor cutaneo-mucoase. Răspunsul clinic a fost însoțit de o creștere intensă a nivelelor circulatorii a BAFF și o reducere importantă a anticorpilor IgG serici. Creșterea valorilor BAFF după tratamentul cu Rituximab poate avea efecte de stimulare a producției de anticorpi de către plasmocitele antigen-specifice. Ca urmare, pentru a prelungi perioada de remisie clinică ar putea fi luată în considerare administrarea unui antagonist al BAFF.

**Cuvinte cheie:** epidermoliza buloasă dobândită, rituximab, factor de activare a celulei B, autoimunitate.

#### Summary

The B-cell activating factor (BAFF), a member of the TNF family, regulates the survival and proliferation of B cells. Here we investigated clinical response, changes in BAFF levels and titers of circulating antibodies in a Rituximab-treated case of severe epidermolysis bullosa acquisita (EBA) within 1 year. The diagnosis of EBA was confirmed with routine histology, direct immunofluorescence, indirect immunofluorescence using salt-split skin and immunoblotting. After the 4 weekly infusion of Rituximab (375 mg/m<sup>2</sup>) the patient had a partial remission of the skin and mucous membrane lesions. The clinical response was accompanied by a strong elevation of circulating levels of BAFF and an important reduction in serum IgG autoantibodies. The increase in BAFF levels after Rituximab therapy could have promoting effects on antibody production by long-lived antigen-specific plasma cells. Therefore, a BAFF-antagonist treatment could be considered to prolong the period of clinical remission.

**Key words:** epidermolysis bullosa acquisita, rituximab, B-cell activating factor, autoimmunity.

DermatoVenerol. (Buc.), 55: 119-125

\* Clinica de Dermatologie, Universitatea de Medicină și Farmacie "Tuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, Romania.

\*\* Institutul de Biologie Experimentală Interdisciplinară, Universitatea Babes-Bolyai, Cluj-Napoca, Romania.

\*\*\* Departamentul de Dermatologie, Universitatea din Freiburg, Germania.

## Introducere

Epidermoliza buloasă dobândită (EBA) este o boală caracterizată clinic prin vezicule și bule pe piele și mucoase, histologic prin clivaj sub-epidermic, iar imunologic prin autoanticorpi împotriva collagenului de tip VII, un component major al fibrilelor de ancorare din joncțiunea dermo-epidermică [1]. Răspunsul terapeutic la pacienții cu EBA este redus, mai ales în varianta mecano-buloasă. Întrucât boala este foarte rară, nu există studii clinice terapeutice. S-au raportat rezultate cu ciclosporină, colchicină, dapsonă, corticosteroizi, imunglobuline administrate intravenos, plasmafereză și fotoforeză. [2-7]. Recent, administrarea de rituximab, un anticorp monoclonal anti-CD20, a indus o remisie parțială a leziunilor cutanate (vindecare peste 50% din leziuni) în 7 cazuri de EBA rezistente la tratamentele convenționale [8-12]. Prin depleția importantă de limfocite B, rituximabul poate avea un impact major asupra factorilor de creștere și supraviețuire a limfocitelor B, cum ar fi factorul de activare a celulelor B (BAFF). În cazul prezentat am urmărit eficiența terapeutică, variațiile titrului de anticorpi din circulație împotriva collagenului de tip VII și modificările nivelului seric a BAFF, timp de un an după administrarea de rituximab.

## Prezentare de caz

O pacientă în vârstă de 51 de ani s-a prezentat cu leziuni cutanate buloase și eroziuni pe mucoasa bucală, care au debutat în urmă cu 6 ani. Antecedentele familiale nu au relevat un istoric de boli buloase. Leziunile au debutat progresiv în zonele de traumatisme minore repetate. La examinarea pacientei s-au observat vezicule, bule, eroziuni, cruste pe fețele laterale ale gâtului, axile, coate, genunchi, mâini și picioare cu pierderea completă a unghiilor (fig. 1a, 1b). La nivelul cavității orale au fost prezente eroziuni extinse, dureroase, cu disfagie atât la alimente solide cât și lichide, ceea ce în timp a contribuit la o pierdere importantă în greutate. Unele leziuni s-au vindecat în evoluție prin cicatrici cu hiposau hiperpigmentație, iar la nivelul scalpului cu zone extinse de alopecie cicatricială. Examenul histopatologic a evidențiat prezența bulei sub-epidermice și un infiltrat limfohistiocitar redus la

## Introduction

Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) is a disease characterized clinically by blisters and bubbles on the skin and mucus, histologically by subepidermic cleavage and immunologically by autoantibodies against type VII collagen, a major component of fibriles anchoring from dermo-epidermal junction [1]. Therapeutic response on patients with EBA is low, especially in mechanical-bullosa version. Since the disease is very rare, there are no therapeutic clinical studies. There have been reported results with cyclosporine, colchicine, dapsone, corticosteroids, intravenous immunoglobuline, plasmapheresis and photophoresis. [2. 7]. Recently, the rituximab administration, an anti-CD20 monoclonal antibody, has induced a partial remission of skin lesions (over 50% of lesions healed) in 7 cases of EBA resistant to conventional treatments [8–12]. The significant depletion of B lymphocytes consists in the fact that the rituximab can have a major impact on growth factors and B cell lymphocytes survival, such as B-cells activating factor (BAFF). In the presented case, we track the therapeutic effectiveness, the antibody titer variations in movement against the type VII collagen and changes in serum levels of BAFF, for one year after rituximab administration.

## Case report

A 51 year patient presented with bullous skin lesions and erosions on the oral mucosa, which had started 6 years before. Family histories have not revealed a bullous disease history. Injuries have gradually started in repeated minor trauma areas. At the patient examination there were observed blisters, bubbles, erosions, crusts on the lateral sides of the neck, armpits, elbows, knees, hands and feet with a complete loss of nails (Fig. 1a, 1b). In the oral cavity were presented painful extensive erosions, with dysphagia at both solid and liquid food, which has contributed to a significant loss of weight in time. Some lesions were healed by evolving through scars with hypo- or hyperpigmentation, and at the scalp level with large areas of scar alopecia. The histopathological examination has revealed the presence of subepidermic bubbles and a reduced

nivelul dermului papilar. Imunfluorescența directă a arătat un depozit liniar de-a lungul membranei bazale de IgG și fracțiunea C<sub>3</sub> a complementului, iar imunfluorescența indirectă pe piele clivată a demonstrat legarea anticorpilor circulanți pe versantul dermic (fig. 1c, 1d). Imunoblottul realizat cu o formă recombinantă a domeniilor non colagenoase 1 și 2 conectate cu un

limfocitar infiltrat la nivelul dermului papilar. Imunfluorescența directă a arătat un depozit liniar de-a lungul membranei bazale de IgG și fracțiunea C<sub>3</sub> a complementului, iar imunfluorescența indirectă pe piele clivată a demonstrat legarea anticorpilor circulanți pe versantul dermic (Fig. 1c, 1d). The Immunoblot achieved with a recombinant form of the non

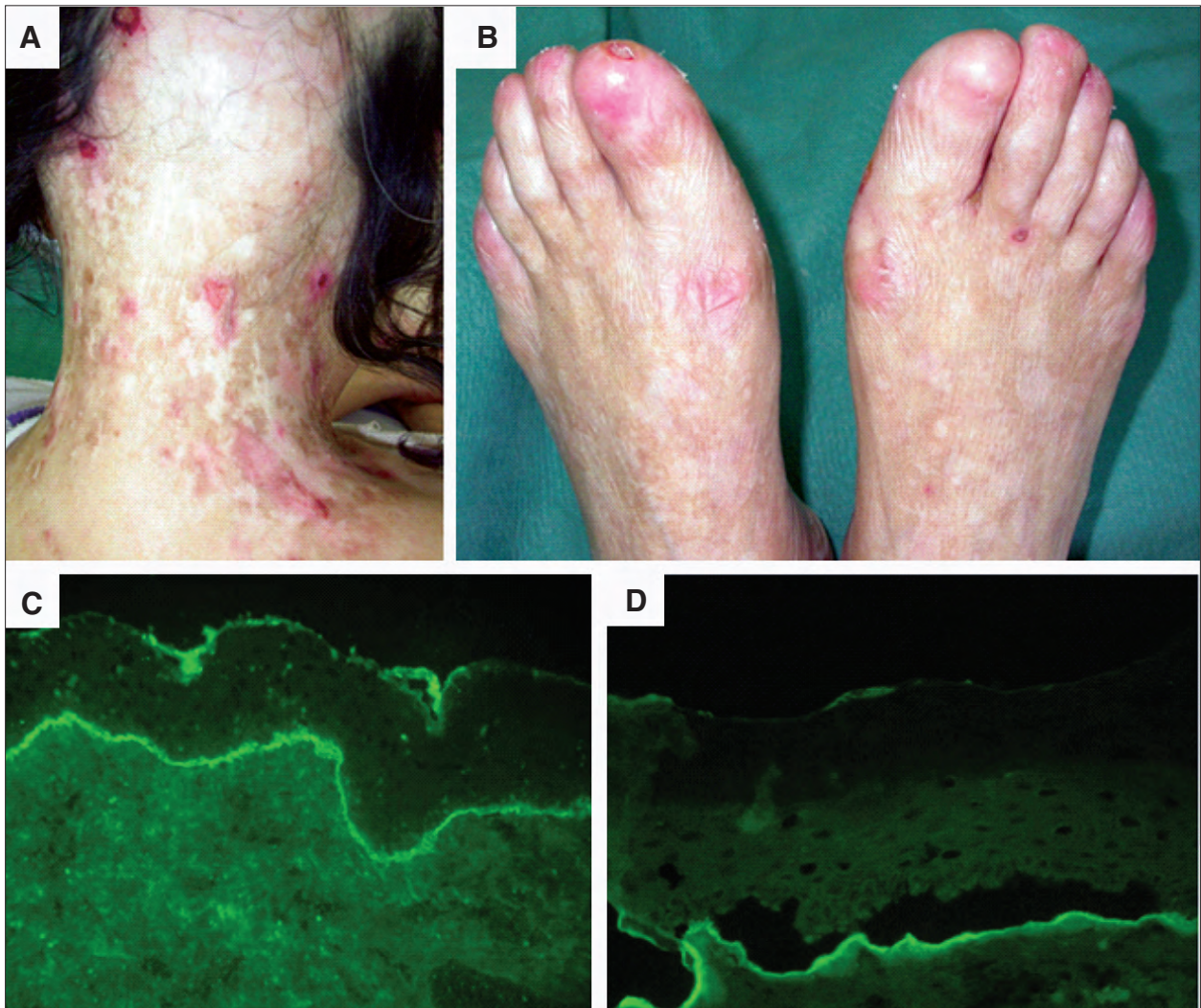


Fig. 1. Aspectul clinic și imunfluorescența pacientei cu epidermoliză buloasă dobândită. (A) Eroziuni, cicatrici și alopecie areata la nivelul scalpului și gâtului. (B) Leziunile la picioare cu pierderea unghiilor. (C) Imunfluorescență directă cu depozit liniar de IgG de-a lungul membranei bazale. (D) Imunfluorescență indirectă pe piele clivată cu depozit fluorescent de IgG pe versantul dermic

Fig. 1. The clinical aspects and patient immunofluorescence with gained epidermolysis eruption. (A) Erosions, scars and areata alopecia at the scalp and neck level. (B) Leg Lesions with nail loss. (C) Direct immunofluorescence with linear deposit of IgG along the basal membrane. (D) Indirect immunofluorescence on skin split with fluorescent IgG deposit on the skin side

triplu helix scurt (aa1-1527 și aa2602-2944) din molecula colagenului de tip VII a evidențiat o reactivitate față de acest substrat. Analizele imunologice pentru anticorpi antinucleari, anti-ADN și anti-Ro au fost negative. Pacienta a mai prezentat o anemie hipocromă severă (Hb 8,7 g/l) și o sensibilizare de contact la cobalt și nichel. Tratamentele anterioare cu prednison și dapsonă nu au avut rezultate satisfăcătoare. Datorită severității bolii, refractară la tratamentul standard și anemiei accentuate s-a inițiat tratamentul cu rituximab în doză de 375 mg/m<sup>2</sup>. S-au administrat 4 doze la interval de o săptămână, în perfuzie. S-a realizat o evaluare clinică (utilizând scorul ABSIS) [13], o evaluare a nivelurilor BAFF (Quantikine® Human BAFF/BlyS Immunoassay, R&D Systems) și a titrului autoanticorpilor prin imunfluorescență indirectă. Nivelele circulante ale BAFF au crescut la 3 săptămâni după inițierea tratamentului cu un maxim la 8 săptămâni (creștere de 5 ori de la valoarea inițială), iar apoi a urmat o reducere lentă (creștere de 5 ori la 6 luni) cu tendință de stabilizare la 9 și 12 luni (creștere de 3 ori). Titrul autoanticorpilor circulanți au scăzut de aproximativ 4 ori timp de un an (fig. 2). Am înregistrat de asemenea o remisie clinică parțială, constând în reducerea cu 50% a scorului clinic cutanat și cu 30% a afectării mucoaselor (fig. 3).

collagen 1 and 2 domains connected with a short triple helix (AA1-1527 and 2602-2944) from type VII collagen molecule has showed a reactivity against this substrate. The immunological analysis for antinuclear antibodies, anti-DNA and anti-Ro were negative. The patient has also presented a severe hypochromic anemia (Hb 8.7 g/l) and a contact sensitization to cobalt and nickel. Previous treatment with prednisone and dapsone were not satisfactory. Due to the disease severity, refractory to standard treatment and to the increased anemia an initial treatment with a dose of 375 mg/m<sup>2</sup> rituximab has been started. 4 doses were administered every week in infusion. A clinical assessment was done (using the ABSIS score) [13], an assessment of BAFF levels (Quantikine Human® BAFF/BlyS Immunoassay, R & D Systems) and of autoantibodies titer by indirect immunofluorescence. The circulating levels of BAFF have been increased in 3 weeks after the treatment began with a maximum at 8 weeks (a 5-fold increase from initial value), and then has followed a slow reduction (increase of 5 times in 6 months) with a stabilization trend in 9 and 12 months (3-fold increase). The autoantibodies circulating titre has decreased for about 4 times in a year (Fig. 2). We also recorded a partial clinical remission with a 50% reduction in clinical skin score and 30% of mucosa affecting (Fig. 3).

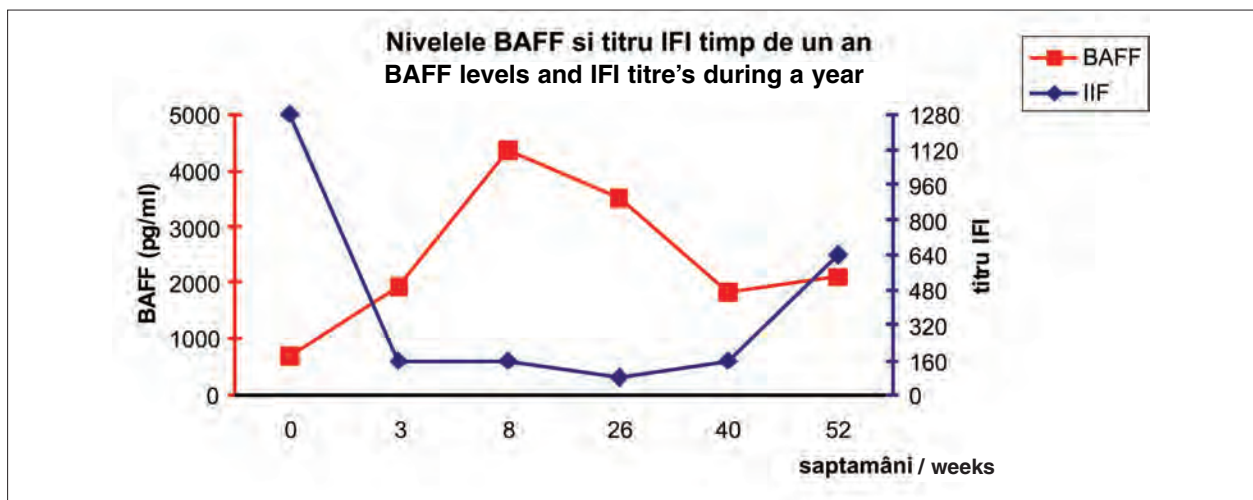


Fig. 2. Variațiile nivelelor serice ale BAFF și titrului de autoanticorpi circulanți IgG prin imunfluorescență indirectă pe durata unui an de la prima doză de rituximab

Fig. 2. Changes in serum levels of BAFF and circulating IgG autoantibodies titer through indirect immunofluorescence over a year after the first rituximab dose

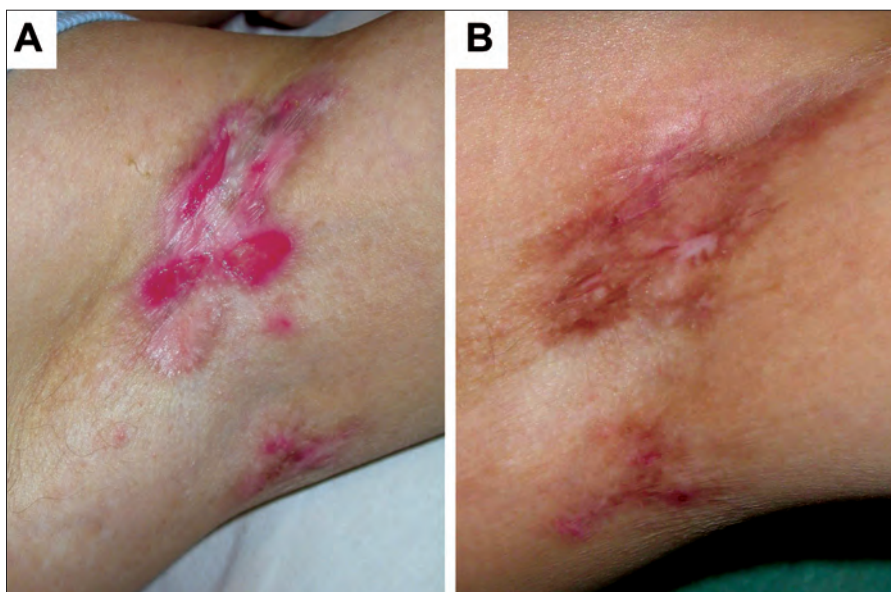


Fig. 3. Eficiența clinică a tratamentului cu rituximab. (A) leziuni axilare înainte de tratament. (B) vindecarea prin cicatrici a leziunilor erozive la 3 luni de la prima doză de rituximab

Fig. 3. The clinical efficacy of rituximab treatment (A). Axillary lesions before treatment (B) healing through erosive lesions scars 3 months after the first rituximab administration

## Discuții

Rituximab este un anticorp monoclonal împotriva CD20, un antigen specific limfocitului B [14]. CD20 este exprimat la nivelul celulelor preB, B imature/mature și celulelor B din limfoame, dar este absent la plasmocite care reprezintă sursa majoră de anticorpi serici. Mecanismele de acțiune posibile sunt: după legarea anticorpilor pe domeniul extracelular al lui CD20 se activează complementul cu liza celulelor țintă; anticorpilor anti-CD20 pot permite citotoxicitatea mediată celular, anticorp-dependentă, ce apare după ce fragmentul Fc al anticorpului este recunoscut de receptorii specifici ai celulelor citotoxice; anticorpilor pot altera abilitatea celulelor B de a răspunde la antigeni sau alți stimuli; anticorpilor anti-CD20 pot iniția moartea celulară programată [15]. Inițial, rituximabul a fost aprobat în tratamentul limfomului non-Hodgkin cu celule B, fiind o terapie promițătoare și pentru alte neoplazii cu celule B. Ulterior, a fost aprobat și în tratamentul artritei reumatoide refractară la inhibitorii de TNF $\alpha$ . Întrucât, din punct de vedere teoretic, orice afecțiune autoimună poate beneficia de tratamentul cu rituximab, s-a administrat cu

## Discussions

Rituximab is a monoclonal antibody antagonistic to CD20, a specific antigen of B lymphocyte [14]. CD20 is expressed in PREB cells level, B immature/mature and B cells from lymphomas, but is absent from the plasmocites which are the major source of serum antibodies. The possible action mechanisms are: after the antibodies binding on the extracellular domain of CD20 the complement is activated with the target cell lysis; the anti-CD20 antibodies can allow the cellular mediated cytotoxicity, dependent - antibody, which appears after the antibody Fc fragment is recognized by specific receptors of cytotoxic cells; the antibodies can alter the ability of B cells to respond at the antigens or other stimuli; the anti-CD20 antibodies can initiate the programmed cell death [15]. Initially, the rituximab was approved to treat the non-Hodgkin's lymphoma with B-cells, being a promise therapy and for other B-cells malignancies. Later, it was approved in the rheumatoid arthritis treatment refractory to TNF $\alpha$  inhibitors. Whereas, theoretically, any autoimmune affection can benefit from the rituximab treatment, there was administered with favorable effects in: immune purpura

efecte favorabile în: purpură trombocitopenică imună, anemie hemolitică imună, lupus eritematos sistemic, vasculite ANCA-pozitive, crioglobulinemie, dermatoze buloase autoimune și purpură trombocitopenică trombocitică [16]. Dintre dermatozele buloase autoimune, rituximab a fost utilizat mai frecvent în pemfigus. Astfel, în două studii recente realizate pe pacienți cu pemfigus sever s-a obținut o remisie completă a leziunilor în 86%, respectiv 82% [17,18]. În cazul nostru, monitorizat timp de un an, am obținut o remisie parțială a leziunilor cutanate (50%) și a afectării mucoaselor (30%). Titrul autoanticorpilor împotriva colagenului de tip VII s-a corelat cu remisia clinică. Am observat o reducere a titrului de anticorpi de 4 ori. În contrast cu acest efect al rituximabului de reducere a anticorpilor patogeni circulanți, nivelele de IgG totale sau anti-microbiene cum ar fi pentru virusul varicelo-zoster, virusul herpes simplex, toxina tetanică sau capsula de polizaharide a pneumococului rămân nemodificate [17, 19, 20]. Aceste rezultate duc la ipoteza unui efect selectiv pe clone patogene de celule B specifice pentru proteinele țintă din dermatozele buloase autoimune. Interesantă este creșterea spectaculoasă a BAFF imediat după administrarea de rituximab și menținerea valorilor crescute timp de un an. O explicație posibilă ar putea fi datorată diminuării importante a receptorilor BAFF care sunt prezenți în principal pe suprafața celulelor B. În plus, depleția de celule B ar putea induce și o reglare întârziată la nivelul mRNA a BAFF [21]. În plus, BAFF poate stimula și celulele T care vor secreta IFN- $\gamma$ , interleukina 2 și vor crește exprimarea de CD25 [22]. În consecință, pentru a prelungi perioada de remisie clinică după tratamentul cu rituximab ar fi utilă administrarea unui antagonist al BAFF.

Intrat în redacție: 8.12.2009

thrombocytopenic, immune hemolytic anemia, systemic lupus erythematosus, ANCA-positive vasculitis, cryoglobulinemia, bullous autoimmune dermatoses and thrombocytopenic thrombotic purpura [16]. From autoimmune bullous dermatoses, rituximab has been used more frequently in pemphigus. Thus, in the two recent studies on severe pemphigus patients complete remission in 86% and 82% of the lesions was achieved [17,18]. In our case, of one year monitoring, we achieved a partial remission of skin lesions (50%) and on the mucosal damage (30%). The autoantibodies titre against the VII type collagen was correlated with clinical remission. We have observed a 4 times reduction in antibody titre. In contrast with this reduced pathogenic antibodies circulating rituximab effect to the total IgG or antimicrobials levels such as varicella-zoster virus, simplex herpes virus, tetanus toxoid or the pneumococcal polysaccharide capsule remain unchanged [17,19,20]. These results lead to the hypothesis of a selection effect on pathogenic clones of specific B cells for the target proteins in autoimmune bullous dermatoses. Interesting is the immediate dramatic increase of BAFF after rituximab administration and the high level maintaining for a year. A possible explanation may be due to the significant reduction of BAFF receptors which are present mainly on the B-cell surface B. In addition, B cell depletion could induce a delayed adjustment to the MARNE level of BAFF [21]. Additionally, BAFF can also stimulate T cells that will secrete IFN- $\gamma$ , interleukin 2 and will enhance the CD25 expression [22]. Therefore, in order to prolong the clinical remission period after the rituximab treatment the administration of BAFF antagonist would be useful.

Received: 8.12.2009

## Bibliografie/Bibliography

1. Sitaru C., Mihai S., Otto C. et al. Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies to type VII collagen. *J Clin Invest* 2005; 115: 870-8.
2. Khatri M.L., Benghazeil M., Shafi M. Epidermolysis bullosa acquisita responsive to cyclosporin therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001; 15: 182-4.
3. Cunningham B.B., Kirchmann T.T.T., Woodley D. Colchicine for epidermolysis bullosa acquisita. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34: 781-4.
4. Hughes A.P., Callen J.P. Epidermolysis bullosa acquisita responsive to dapsone therapy. *J Cutan Med Surg* 2001; 5: 397-9.

5. Meier F., Sönnichsen K., Schaumberg-Lever G. et al. Epidermolysis bullosa acquisita: efficacy of high-dose intravenous immunoglobulins. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29: 334-7.
6. Miller J.L., Stricklin G.P., Fine J.D. et al. Remission of severe epidermolysis bullosa acquisita induced by extracorporeal photochemotherapy. *Br J Dermatol* 1995; 133: 467-71.
7. Remington J., Chen M., Burnett J. et al. Autoimmunity to type VII collagen: epidermolysis bullosa acquisita. *Curr Dir Autoimmun* 2008; 10: 195-205.
8. Schmidt E., Benoit S., Bröcker E.B. et al. Successful adjuvant treatment of recalcitrant epidermolysis bullosa acquisita with anti-CD20 antibody rituximab. *Arch Dermatol* 2006; 142: 147-50.
9. Crichlow S.M., Mortimer N.J., Harman K.E. A successful therapeutic trial of rituximab in the treatment of a patient with recalcitrant, high-titre epidermolysis bullosa acquisita. *Br J Dermatol* 2007; 156: 163-201.
10. Niedermeier A., Eming R., Pfützte M. et al. Clinical response of severe mechanobullous epidermolysis bullosa acquisita to combined treatment with immunoadsorption and rituximab (anti-CD20 monoclonal antibodies). *Arch Dermatol* 2007; 143: 192-8.
11. Mercader P., Rodenas J.M., Peña A. Fatal Pseudomona pneumonia following rituximab therapy in a patient with epidermolysis bullosa acquisita. *JEADV* 2007; 21: 1141-2.
12. Sadler E., Schafleitner B., Lanschuetzer C. et al. Treatment-resistant classical epidermolysis bullosa acquisita responding to rituximab. *Br J Dermatol* 2007; 157: 417-9.
13. Pfützte M., Niedermeier A., Hertl M. et al. Introducing a novel Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) in pemphigus. *Eur J Dermatol* 2007; 17: 4-11.
14. Reff M.E., Carner K., Chambers K.S. et al. Depletion of B cells *in vivo* by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994; 83: 435-5.
15. Tsokos G.C. B cells, be gone – B-cell depletion in the treatment of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004; 350; 25: 2546-8.
16. Sailler F. Rituximab off label use for difficult-to-treat auto-immune diseases : reappraisal of benefits and risks. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2008; 34: 103-10.
17. Joly P., Mouquet H., Roujeau J.C. et al. A single cycle of rituximab for the treatment of severe pemphigus. *N Engl J Med* 2007; 357; 6: 545-52.
18. Ahmed A.R., Spigelman Z., Cavacini L.A. et al. Treatment of pemphigus vulgaris with rituximab and intravenous immune globulin. *N Engl J Med* 2006; 355; 17: 1772-9.
19. Shimanovich I., Nitschke M., Rose C. et al. Treatment of severe pemphigus with protein A immunoadsorption, rituximab and intravenous immunoglobulins. *Br J Dermatol* 2008; 158: 382-8.
20. Mouquet H., Musette P., Gougeon M.L. et al. B-cell depletion immunotherapy in pemphigus effects on cellular and humoral immune responses. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2859-69.
21. Lavie F., Miceli-Richard C., Ittah M. et al. Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment : insights into a new regulating system of BAFF production. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 700-3.
22. Schneider P. The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 282-9.