

MUDr. Štefan Vítka, CSc.

V prvním období orgánových transplantací, tj. v „předcyklosporinové éře“, byla udržovací imunosuprese založená na kombinaci **azathioprinu** (purinový antagonist) a relativně vysokých dávek **prednisonu**. Tato kombinace bývá obvykle označována za „konvenční imunosupresi“. Začátkem šedesátých let bylo spektrum imunosupresivních molekul rozšířeno o první biologické látky – tzv. **polyklonální globuliny** (antithymocytární a antilymfocytární), které byly získávány senzibilizací u koní nebo králíků. Od začátku osmdesátých let minulého století, kdy byl do klinické praxe uveden **cyklosporin A**, byly možnosti potransplantační imunosuprese obohaceny o další kalcineurinový inhibitor (CNI) – **tacrolimus** (Prograf, Astellas), se stejným mechanismem účinku, ale s jiným profilem nežádoucích účinků. V devadesátých letech byl azathioprin nahrazen jiným antimetabolitem, **kyselinou mykofenolovou**, která je k dispozici ve formě esteru (mykofenolát mofetil, Cellcept, Roche) nebo sodné soli (mykofenolát sodný, Myfortic, Novartis Pharma).

Imunosupresivní armamentarium obohatily zejména inhibitory proliferčních signálů (známé i jako mTOR inhibitory), **sirolimus** (Rapamune, Wyeth) a jeho derivát **everolimus** (Certican, Novartis), které jsou na rozdíl od CNI téměř prosty nežádoucích nefrotoxicích účinků. K polyklonálním globulinům přibýly (a záhy byly opuštěny) monoklonální protilátky proti T-receptoru lymfocytů (**OKT3**, později i **OKT4**) a zejména monoklonální **protilátce proti receptoru IL2** (daclizumab a basiliximab).

Kromě „úspěšných molekul“ byl konec minulého století poznamenán i některými selháními: do řádného klinického testování nepostoupil inhibitor metabolismu purinů – **deoxyspergualin**, pro podezření z nefrotoxicity bylo u nemocných po transplantaci ledviny předčasně pozastaveno klinické zkoušení **FTY720** (antagonista sfingosin 1-fosfatázy), ze zcela jedinečným mechanismem účinku. Do dalších fází klinického zkoušení nepostoupil ani derivát leflunomidu – **FK778** (inhibitor syntézy pyrimidinů), protože nevykazoval požadovanou účinnost a jeho antivirové účinky nebyly klinicky potvrzeny. Selhaly i monoklonální protilátky **anti-CD154** a **anti-IL15**. Další látkou, která nepostoupila do další fáze klinického zkoušení u nemocných s psoriázou, byl i inhibitor fosfatázy purinových nukleotidů – **R3421** (původně BCX4208).

Začátek nového tisíciletí nepřinesl – na rozdíl od devadesátých let – téměř žádné nové molekuly, které by byly specificky indikovány pro orgánové transplantace. Nedostatek je patrný nahlédnutím do registru klinických studií www.clinicaltrials.gov. Z celkového počtu asi 800 probíhajících klinických „transplantačních“ studií je testováno jenom několik málo nových molekul (belatacept, AEB071, CP690,550, ISA247). Toto období lze charakterizovat hledáním správných dávek imunosupresiv, které pro klinické použití již schválily FDA nebo jiné regulační autority. Typickým příkladem takového úsilí je minimalizace imunosuprese, jak byla testována v rámci studie SYMFONIE, a nové kombinace známých imunosupresivních látek (sirolimus/tacrolimus, sirolimus/MMF, certican/tacrolimus). Mnoho látek prokázalo svou účinnost v jiných indikacích než v transplantologii (rituximab, alemtuzumab).

Malé molekuly

Za „malé molekuly“ jsou označovány neproteinové látky, které obvykle atakují intracelulární receptory. V současné době jsou v klinických studiích II. a III. fáze u nemocných po transplantaci ledviny testovány tři nízkomolekulární látky: ISA247 (Isotechnika), AEB071 (Novartis) a CP690,550 (Pfizer).

ISA247 je perorální semisyntetický strukturální analog cyklosporinu A, u něhož byl modifikován první aminokyselinový zbytek molekuly. Je účinnější než cyklosporin A při *in vitro* testech nebo *in vivo* při heterotopické transplantaci srdce. Experimentální práce prokazují, že ISA247 nemá nefro-

toxické účinky. Vysoká účinnost této látky a absence nefrotoxicity předurčila ISA247 k zahájení klinického zkoušení u nemocných s těžkou formou psoriázy a po transplantaci ledviny. Celkem 334 nemocných po transplantaci ledviny dostávalo v rámci II. fáze šestiměsíčního klinického zkoušení tři různé dávky ISA247 (0,4 mg, 0,6 mg nebo 0,8 mg/kg), přičemž kontrolní skupina byla léčena tacrolimem. Imunosuprese spočívala v indukci anti-IL2r protilátky, v udržovací fázi byli pacienti léčeni ISA247, MMF a steroidy. Incidence akutních rejekcí se v porovnávaných skupinách pohybovala v rozmezí 2,3–10,7 %, v kontrolní skupině léčené tacrolimem činila 5,8 %. Renální funkce byly srovnatelné ve všech porovnávaných skupinách. Proto mohla ISA247 postoupit do III. fáze klinického testování (Gaber et al., 2008).

Inhibitory Janusové kinázy (CP-690550). Janusová kináza (JAK = Just Another Kinase) je cytoplasmatická tyrosin-kináza, která se podílí na přenosu signálů celé řady receptorů běžných cytokinů. V porovnání s jinými členy JAK rodiny představuje JAK3 atraktivní cíl pro imunosupresiva. V současné době probíhá druhá fáze klinického zkoušení, ve které jsou podávány dvě různé dávky JAK3, přičemž kontrolní rameno je léčeno cyklosporinem A. První výsledky této studie byly publikovány v loňském roce (van Gurp, 2008).

Inhibitor PKC (AEB071). Různé izoformy fosfokinázy C (PKC) hrají klíčovou roli při přenosu signálu z aktivovaného T-receptoru nebo receptoru CD28 dále do nitra buňky. **AEB071** je novou nízkomolekulární látkou pro perorální podání, která inhibuje fosfokinázu C, a tím i časnou aktivaci T-receptoru. Mechanismus účinku AEB je tedy zcela odlišný od mechanismu účinku kalcineurinových inhibitorů nebo mTOR inhibitorů. Imunosupresivní vlastnosti AEB se projevují inhibicí klasické i nové izoformy PKC. Preklinické studie potvrdily, že monoterapie AEB nebo jeho kombinace s adjuvantními imunosupresivy prodlužuje přežívání štěpů po heterotopické transplantaci srdce i přežívání ledvinových alloštěpů ve zvířecím modelu (Bruns et al., 2006).

V poslední době byly zahájeny tři klinické studie II. fáze, ve kterých byl AEB kombinován s různými imunosupresivními látkami. V první z nich byl v iniciační fázi podáván spolu s kortikoidy a tacrolimem, který byl po třech měsících vysazen. Další studie byla od začátku bez kalcineurinových inhibitorů a AEB byl podáván s mykofenolátem sodným. Tyto studie musely být předčasně ukončeny, protože jejich explorativní ramena měla vyšší incidenci akutních rejekcí, než bylo akceptováno. Ve třetí studii je AEB podáván v dávce 600 mg denně v kombinaci s kortikoidy a everolimem, který je udržován v terapeutickém rozmezí 4–8 ng/ml. Nevelká skupina nemocných, kteří jsou tímto režimem v IKEM léčeni, má v prvním roce výbornou funkci štěpu a z nežádoucích účinků je pozoruhodná jenom ostipace.

Biologické látky¹

Nové biologické látky zcela změnily vžitý názor, který doposud panoval v transplantační medicíně. Tradiční představa je, že se protilátky podávají jako indukční zásah v perioperačním období s cílem vyvolat nespecifickou depleci T-lymfocytů pomocí OKT3, polyklonálních preparátů nebo recentněji i alemtuzumabem, anebo nedeplečními monoklonálními protilátkami zacílenými proti receptoru interleukinu 2. Nová generace netoxických biologických látek byla vyvinuta pro udržovací imunosupresi. Dlouhodobá biologická léčba je možná díky tomu, že byla zdokonalena „humanizace“ protilátek, a proto jejich dlouhodobá imunogenicita téměř vymizela. Typickým reprezentantem této změny je belatacept a další dvě protilátky patřící do této skupiny – efalizumab, humanizovaná anti-LFA1, a alefacept (Amevive) fúzní protein LFA3-Ig.

Blokáda kostimulace – belatacept. Kostimulace neboli druhý signál je kritická pro trvalou aktivaci naivních T-lymfocytů. CD28/B7 je velmi důležitá

¹ Důležité je porozumět používané terminologii: všechny monoklonální protilátky končí příponou „-mab“; fúzní proteiny pak příponou „-cept“. Např. „-ximab“ ukazuje na chimerickou monoklonální protilátku, „-zumab“ odkazuje na humanizovanou protilátku, „-cept“ odkazuje na fúzi receptoru s Fc částí lidského IgG1. Písmena, která předchází příponu „-mab“ znamenají u = lidský (human), o = myší (mouse), a = krys (rat), e = kreččí (hamster), i = primát, xi = chimerický.

signální cesta v četných modelech transplantace nebo autoimunity. Pro léčbu revmatoidní artritidy byl schválen **abatacept**, fúzní protein CTLA4-Ig, který je kompetitivním antagonistou CD28. **Belatacept**, který byl speciálně vyvinut pro transplantace, je abataceptem druhé generace, protože má větší afinitu k receptoru CD86. Terapeutická účinnost abataceptu i belataceptu je podmiňována vazbou na ligand CD80/CD86. V současnosti probíhají dvě klinické studie III. fáze, v nichž se belatacept podává po transplantaci příjemcům marginálních ledvin (do druhé studie byli zařazeni nemocní s ledvinou od standardních dárců nebo od žijících dárců). Pacienti nedostávají žádné kalceinurinové inhibitory, udržovací imunoprese spočívá v podávání MMF a kortikoidů a v intravenózní infuzi belataceptu každé čtyři týdny. V IKEM dosáhli první nemocní přežití 24 měsíců. Další dvě studie byly provedeny u nemocných, kteří byli po transplantaci léčeni CNI a konvertováni na belatacept, a studie, v nichž jsou po indukci thymoglobulinem steroidy rychle z imunoprese odstraněny. Jiný přístup spočívá v kombinaci belataceptu se sirolimem s cílem navození tolerance. V jiné probíhající studii se kombinuje belatacept s alemtuzumab. Belatacept je testován rovněž u nemocných po transplantaci jater.

Další kostimulační blokátory. Neúspěch s protilátkou anti-CD154 (vyvolávala tromboembolické komplikace) podnítil zájem o další CD-40 specifické monoklonální protilátky. Nejpozoruhodnější z nich je **4D11**, která je ve svém důsledku plně lidskou protilátkou. U primátů významně oddaluje rejekci štěpu, takže může být v nejbližší budoucnosti podrobena klinickým zkouškám. Další protilátky, včetně monoklonální protilátky proti molekule B7, v experimentálních modelech transplantací selhaly. Teoreticky by byla nejideálnější imunopresi blokáda receptorů CD28 – nicméně tato blokáda způsobuje cytokinovou „bouři“ a celé spektrum nežádoucích účinků. Bezpečnou i dostatečně účinnou se zdála být protilátka anti-CD28 – FK734 (Astellas), musela však být z klinického zkoušení stažena pro nežádoucí účinky.

Anti-adhezivní molekuly. V experimentálních modelech bylo prokázáno, že inhibice LFA-1 vede k supresi imunitní odpovědi a prodlužuje přežívání štěpů. **Efalizumab** je humanizovaná CD11a – specifická IgG1, která byla v roce 2003 schválena pro léčbu psoriázy. V současnosti se vyvíjí její subkutánní forma, která bude testována v udržovací léčbě po orgánových transplantacích. Ve II. fázi klinického zkoušení u nemocných po transplantaci ledviny bylo dosaženo slibných výsledků, nicméně pacienti s vyšší dávkou efalizumabu v kombinaci s cyklosporinem měli vyšší incidenci potransplantačních lymfoproliferací. **Alefacept** je lidský fúzní protein, LFA3-IgG1, který se LFA-3 porcí váže na CD2 T-lymfocyty. V roce 2003 byl schválen pro léčbu těžkých forem psoriázy. V transplantologii byl testován na zvířecím modelu transplantace srdce a v současnosti je testován rámci II. fáze klinického zkoušení v udržovací léčbě nemocných po transplantaci ledviny. Další protilátkou, která byla již schválena pro léčbu Crohnovy choroby a rozstroušené sklerózy, je **natalizumab** (humanizovaný anti-integrin VLA4). Musel však být z klinického použití stažen pro četný výskyt nežádoucích účinků. Jeho využití v transplantaci medicíně je nejasné.

Inhibice komplementu. Podle některých recentních studií se zdá, že zásadní roli při iniciaci a udržování alloimunitní odpovědi hrají i jednotlivé komponenty komplementové kaskády. **Eculizumab** (Alexion), je humanizovaná monoklonální protilátka specificky inhibující C5a, která byla schválena pro léčbu paroxysmální noční hemoglobinurie a v současnosti je testována i u transplantaci u zvířat.

Imunosuprese B-buněk. Dosavadní pokrok v transplantologii byl dosahován především imunopresiv, které inhibovaly imunitní odpovědi na T-lymfocyty. Proto T-buňkami zprostředkovaná akutní rejekce přestala být závažným problémem. Nyní se dostala do popředí pozornosti imunitní odpověď zprostředkovaná B-buňkami (humorální rejekce). **Rituximab**, který je schválen pro léčbu B-buněčných malignit, je nyní „of label“ podáván u nemocných vyžadujících účinnou depleci B-buněk exprimujících CD20. Nutno však podotknout, že protilátky produkující buňky neexprimují znak CD20 a rituximab nemá žádný přímý účinek na tvorbu protilátek. **AME-133** (Eli Lilly) představuje druhou generaci anti-CD20 monoklonálních protilátek, které mají mnohem vyšší afinitu než rituximab. Podobně i humanizované anti-CD20 monoklonální protilátky **ocrelizumab** (Genetech) a **ofatumumab** (Genmab) jsou nyní testovány v klinických studiích u nemocných s revmatoidní artritidou, chronickou lymfoblastickou leukémií a non-hodgkinským

lymfomem. **Epratuzumab** (Immunomedics) je humanizovaná protilátka proti CD22, který je se stoupající intenzitou exprimován na zrajících B-buňkách. Mohla by selektivně inhibovat buňky angažované v produkci protilátek bez toho, aby docházelo k depleci všech B-buněk. **Belimumab** (Human Genome Sciences) je nová BlyS specifická lidská monoklonální protilátka, který byla vyvinuta pro léčbu systémového lupusu a pro další autoimunitní choroby spojené s tvorbou protilátek. **BR3-Fc** (Genentech) je rekombinantní fúzní protein v časných stádiích klinického hodnocení u revmatoidní artritidy. **Bortezomib** (Velcade, Millenium Pharmaceutical) je inhibitor proteasomů, který byl v roce 2005 schválen pro léčbu mnohočetného myelomu. V současnosti je testován u nemocných s dalšími hematologickými malignitami (lymfomy) a u některých karcinomů solidních orgánů (prostaty, plic, mammy a ovarií). Váže se na 26s proteasomový komplex, který hraje úlohu v degradaci nadbytečných proteinů metabolicky aktivních buněk. V současnosti probíhá v Mayo Clinic v Rochesteru monocentrická studie s bortezomibem u nemocných po transplantaci ledviny u protilátkami zprostředkované rejekce.

Cytokininové cesty. Cytokiny jsou všudypřítomné komponenty alloimunitní odpovědi. Nejznámějším příkladem této skupiny je protilátka proti **IL2 receptoru**, která je již standardní součástí transplantační medicíny. Mnoho dalších cytokinů bylo zkoumáno z pohledu využití v transplantační medicíně.

Interleukin 6 (IL-6) je produkován různými buňkami, včetně epitelálních buněk tubulárního epitelu. Má prozánětlivé i protizánětlivé vlastnosti. Klíčovou úlohu v regulaci byla identifikace IL-6 solubilního receptoru (sIL-6r), který je schopen stimulovat mnoho buněčných odpovědí. Koncentrace IL-6 je zvýšena v séru i v moči. **Tocilizumab** (Roche) je humanizovaná protilátka proti receptoru IL6, která byla zkoušena v klinických studiích u revmatoidní artritidy (Jones, 2001). Nyní čeká na schválení pro tuto indikaci, ale její využití v transplantologii není jasné. Několik protilátek (infliximab, golimumab a etanercept) bylo vyvinuto s cílem inhibovat či zcela odstranit účinky TNFα. Jejich účinek byl prokázán zejména u zánětlivých střevních onemocnění a revmatoidní artritidy, ale i u jiných autoimunitních chorob. Použity byly rovněž v pilotních klinických studiích v transplantologii. Např. Genz29155 (Genzyme), jehož intracelulární protein není zatím identifikován, inhibuje apoptózu vyvolanou TNFα. V experimentu byl jeho účinek synergický se sirolimem, nikoli však s cyklosporinem A (Weaver et al., 2008).

Závěr

Hlavní hnací silou současného vývoje nových imunopresivních látek je snaha o nalezení molekul, které budou prosty dlouhodobé toxicity. Takové požadavky splňují nejlépe některé monoklonální protilátky, které jsou určeny nikoli pro indukci, ale pro udržovací imunopresi. Z hlediska klinického zkoušení je „nejdále“ belatacept a pak některé „malé molekuly“ – AEB071, C0690,550.

Na klinickém vývoji všech významných imunopresivních látek pro transplantace ledviny, jater i pankreatu se podílel i IKEM. Počátkem devadesátých let to byl generický ekvivalent původní formulace cyklosporinu A – Consupren sol., cps. (Galena), později i jeho mikrodisperse – Equoral, cps., IVAX Pharmaceuticals, a mykofenolát sodný. Z originálních nízkomolekulárních imunopresiv byly v IKEM testovány FK778 a FTY720 a z biologických látek protilátka proti T-receptoru lymfocytů CD3 a CD4 (Exbio). V současné době probíhá v IKEM klinické testování monoklonálních protilátek belataceptu, alemtuzumabu a alefaceptu a malých molekul AEB071, C0690, 550. Ve IV. fázi klinického testování je nová forma tacrolimu s prodlouženým uvolňováním MR4 (Advagraf, Astellas).

Literatura

- Bruns C, Palli C, Beerli C, et al. NVP-AEB071 (AEB), a novel oral inhibitor of early T-cell activation, prolongs rat cardiac allograft survival used alone and in combination with cyclosporine, everolimus or FTY720. Am J Transplant 2006;6:316.
- Gaber AO, Busque DS, Mulgaokar S, et al. ISA247: a phase IIB, multicenter, open label, concentration-controlled trial in de novo renal transplantation. Am J Transplant 2008;8(Suppl 2):336.
- Jones SA., Horoucní S., Topory N. a spol.: The soluble interleukine 6 receptor: mechanisms of production and implication in disease. FASEB Journal 2001; 15: 43
- van Gurp E, Weimar W, Gaston R, et al. Phase 1 dose-escalation study of CP-690 550 in stable renal allograft recipients: preliminary findings of safety, tolerability, effects on lymphocyte subsets and pharmacokinetics. Am J Transplant 2008;8:1711–1718.
- Weaver TA, Chardefidine AH, Leopardi FV, et al. Pre-clinical assessment of Genz-29155, a novel small molecule inhibitor of apoptosis with anti-rejection effects in non-human primates. Am J Transplant 2008;8(Suppl 2):229.