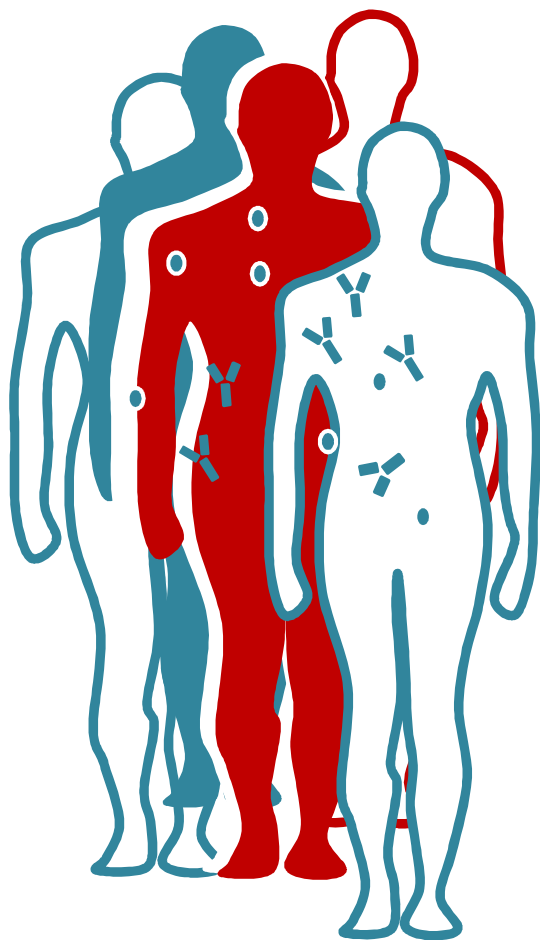


# **biologická liečba**

## **v teórii a praxi V.**



Zborník recenzovaných príspevkov

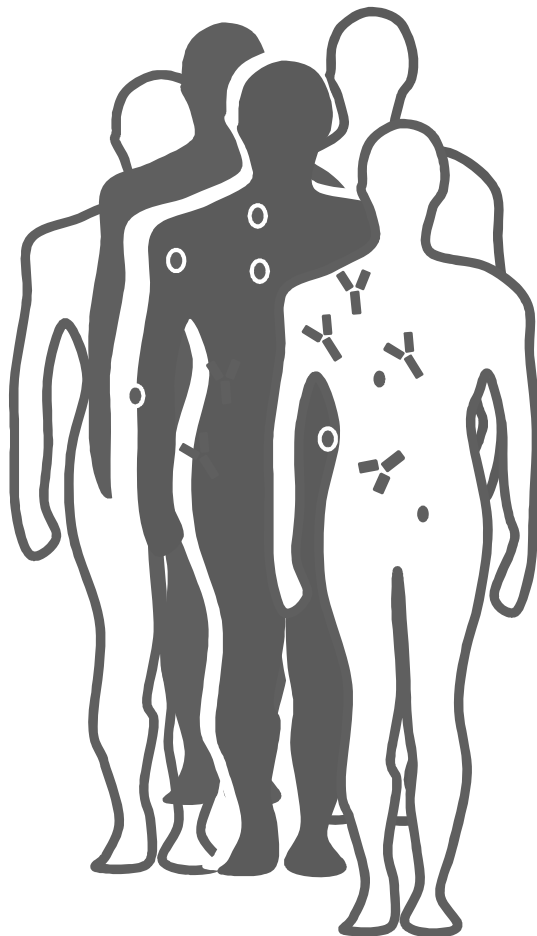
September 2019

**Slovenská imunologická spoločnosť SAV**

**Neuroimunologický ústav Slovenskej akadémie vied**

# **biologická liečba**

**v teórii a praxi V.**



Zborník recenzovaných príspevkov  
Bratislava, Dúbravská cesta 9  
25. september 2019



SLOVENSKÁ  
IMUNOLOGICKÁ  
SPOLOČNOSŤ



### ***Organizátori***

Slovenská imunologická spoločnosť – Slovenská akadémia vied  
Neuroimunologický ústav – Slovenská akadémia vied

### ***Odborný výbor:***

prof. MUDr. Milan BUC, DrSc.

doc. RNDr. Peter FILIPČÍK, CSc.

RNDr. Martin ČENTE, PhD.

doc. MUDr. Martin HRUBIŠKO, PhD., m. prof.

MUDr. Slavomír URBANČEK, PhD.

doc. Mgr. Ivana SHAWKATOVÁ, PhD.

doc. MUDr. Peter PRUŽINEC, CSc., m. prof.

MUDr. Radovan KOŠTURIAK, PhD.

MUDr. Marta SOBOTKOVÁ

prof. MUDr. Zdenka ULČOVÁ-GALLLOÁ, DrSc.

prof. MUDr. Miloš JESEŇÁK, PhD., MSc., MBA, MHA

## OBSAH

<b>Nové biologiká v dermatológii</b> <i>Mária Šimaljaková</i> .....	6
<b>Nanoprotiľátky proti IL17A/F: nová biologická liečba psoriázy</b> <i>Danka Švecová</i> .....	14
<b>Psoriáza ako autozápalová choroba a možnosti jej biologickej liečby</b> <i>Juraj Javor, Milan Buc, Mária Bucová</i> .....	21
<b>Biologická liečba systémového lupus erythematosus u dospelých a detí</b> <i>Kristína Klučková</i> .....	32
<b>Súčasný pohľad na biologickú liečbu nádorov</b> <i>Vladimíra Ďurmanová, Milan Buc</i> .....	46
<b>Traumatické poškodenie mozgu u hráčov ľadového hokeja – identifikácia molekulových markerov a dráh</b> <i>Tóth I., Parničan S., Mátyásová K., Babindáková N., Porubská S., Čente M., Filipčík P.</i> .....	60
<b>Aktuálne možnosti biologickej liečby bronchiálnej astmy</b> <i>Martin Hrubíško</i> .....	69
<b>Anti-IL5 liečba astmy a ďalších eozinofilových chorôb</b> <i>Luděk Hochmuth</i> .....	73
<b>Biologická liečba ako perspektíva v manažmente hereditárneho angioedému</b> <i>Miloš Jeseňák, Katarína Hrubíšková, Peter Bánovčín</i> .....	79
<b>Mechanizmy pôsobenia regulačných lymfocytov a možnosti ich využitia v liečbe autoimunitných chorôb</b> <i>Milan Buc</i> .....	86
<b>Sledovanie dynamiky T-regulačných lymfocytov v periférnej krvi u tehotných žien s poruchou plodnosti na imunointervenčnej liečbe</b> <i>Žaneta Dzurillová, M. Dzurilla</i> .....	95

## NOVÉ BIOLOGIKÁ V DERMATOLÓGIÍ

Šimaljaková M.

1. Dermatovenerologická klinika LF UK a UNB Bratislava

**Súhrn.** Psoriáza, je chronické imunitne mediované zápalové kožné ochorenie, postihujúce 2 až 4 % populácie. Lepšie pochopenie kľúčovej úlohy IL-17 a IL-23 v jej patogenéze psoriázy viedla k vývoju cielej terapii proti týmto cytokínom. Patogenéza psoriázy a pustulózne psoriázy nie je identická. Funkčná aktivácia IL-36R je viac asociovaná s patogenézou generalizovanej pustulárnej psoriázy, tvorbou pustúl a ložiskovej psoriázy a s palmoplantárnou pustulózou v porovnaní s ložiskovou psoriázou. Atopická dermatitída je chronické, svrbivé, imunitne mediované zápalové ochorenie, charakterizované Th2-imunitnou odpoveďou a môže byť asociovaná so systémovým zápalom. Dupilumab je monoklonová protilátka, ktorá inhibuje signalizáciu IL-4 a IL-13 blokádou alfa-podjednotky, ktorú oba cytokíny zdieľajú.

**Kľúčové slová:** psoriasis vulgaris, pustulárna psoriáza, dermatitis atopica, ixekizumab, guselkumab, rizankizumab, dupilumab

**Summary.** Psoriasis is a chronic, immune mediated, inflammatory skin disease, estimated to affect between 2% – 4% of the general population. A better understanding of the pathogenesis of psoriasis has since allowed the development of several highly effective biological therapies. The increased understanding of the significant role of IL-17 and IL-23 in the pathogenesis of psoriasis has led to the development of drugs targeting these cytokines. The pathogenesis of plaque psoriasis and pustular psoriasis does not completely overlap. The “functional activation of IL-36R” is likely to be more closely associated with pathogenesis in generalized pustular psoriasis, pustule formation of plaque psoriasis and palmoplantar pustulosis than with plaque psoriasis. Atopic dermatitis (AD) is a chronic, pruritic immune-mediated inflammatory dermatosis characterized by Th2 immune response and may be associated with systemic inflammation. Dupilumab a monoclonal antibody that inhibits IL-4 and IL-13 signaling through blockade of the shared IL-4 $\alpha$  subunit. Blockade of IL-4/13 is effective in reducing Th2 response.

**Key words:** psoriasis vulgaris, pustular psoriasis, dermatitis atopica, ixekizumab, guselkumab, rizankizumab, dupilumab

## Úvod

Nové poznatky v patogenéze niektorých kožných ochorení ako psoriáza, atopická dermatitída, a generalizovaná pustulózná psoriáza viedli k objaveniu ich cielenejšej liečby. Biologická liečba patrí v súčasnosti k najúčinnnejšej a podľa dnešných poznatkov aj k najbezpečnejšej liečbe, ktorá významne potláča klinické prejavy ochorení a výrazne zlepšuje kvalitu života pacientov.

## Psoriasis

Psoriáza patrí medzi T-bunkami mediovanú, imunitne podmienenú chorobu, ktorá je provokovaná endogénnymi a exogénnymi faktormi. Cytokínová dysregulácia a iniciácia produkcie kaskády cytokínov vedie k zápalovej odpovedi. Dôkazom imunopatogenetického mechanizmu psoriázy je prítomnosť T-lymfocytov v perivaskulárnych infiltrátoch a v epiderme psoriatických ložísk a ich redukcia po imunosupresívnej liečbe. Poznatok, že základom psoriatickej odpovede je prepojenie prirodzenej a adaptívnej imunity viedol k dôkladnejšiemu objasneniu zápalovej podstaty psoriázy (1). Aktivované dendritové bunky produkujú rad prozápalových cytokínov vrátane TNF a IL-23. IL-23 pomáha diferencovať naivné Th-lymfocyty do Th17-subpopulácie, ktorá produkuje ďalšie prozápalové cytokíny IL-17A, IL-17F, IL-6, TNF a iné (2). Tieto cytokíny indukujú, prostredníctvom IL-20 a oxidu dusíka, zmeny keratinocytov a cievneho zásobenia kože (3). Keratinocyty nie sú pasívnymi bunkami, ako sa kedysi myslelo, ale odpovedajú na uvedené zápalové signály produkciou chemokínov, cytokínov a antimikrobiálnych peptidov s následným influxom neutrofilov a ďalších zápalových buniek do kože (4).

IL-17A aktivuje a priťahuje neutrofile do ložiska psoriázy a zároveň inhibuje ich apoptózu, podmieňuje angiogénu a expresiu ďalších zápalových cytokínov (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6) a priamo aktivuje keratinocyty (5).

## Ixekizumab

Ixekizumab, humanizovaná IgG4 monoklonová protilátka, sa selektívne viaže a neutralizuje IL-17A homodiméry a IL-17A/IL-17F heterodiméry a je indikovaná na liečbu pacientov so stredne závažnou až závažnou ložiskovou psoriázou.

V pilotných štúdiách bolo histologickou a molekulovou analýzou dokázané, že inhibícia IL-17A ovplyvňuje akantózu a hyperkeratózu epidermálnych buniek, významne redukuje množstvo Th17-lymfocytov, ktoré produkujú prozápalové cytokíny IL-17A, IL-17F, IL-21 a IL-22 (6). Po 6 týždňoch podávania ixekizumabu, biopsia kože potvrdila skoro fyziologický nález (7).

Účinnosť ixekizumabu bola porovnávaná s etanerceptom v klinických štúdiách UNCOVER 1-3. Ixekizumab v 12. týždni liečby psoriázy dosiahol PASI 90 u 61 – 71 % pacientov a PASI 100 u 31 – 41 % pacientov v porovnaní s 5 – 7 % liečenými etanerceptom (8).

Signifikantne výraznejšie zlepšenie klinického obrazu sa dosiahlo aj u ťažko liečiteľných foriem psoriázy, ktoré sa udržalo až do 60. týždňa liečby (9).

Bezpečnosť ixekizumabu bola preukázaná bez ohľadu na vek, pohlavie, rasu, telesnú hmotnosť, iniciálnu závažnosť PASI, umiestnenie ložiska, súčasnú psoriatickú artritídu a predchádzajúcu biologickú liečbu. Ixekizumab bol účinný u pacientov doteraz neliečených systémovou liečbou, doteraz neliečených biologickou liečbou, u pacientov, ktorí podstúpili anti-TNF liečbu a aj u pacientov, u ktorých táto zlyhala.

Vo vzťahu k infekciám v klinických štúdiách sa vyskytlo viac kvasinkových infekcií u pacientov liečených ixekizumabom v porovnaní s etanerceptom, resp. placebom, ale infekcie neboli invazívne, ani časté a dobre odpovedali na liečbu (10,11).

Počas 60 týždňov klinického skúšania ixekizumabu sa u 7 pacientov vyvinula ulcerózna kolitída a pri Crohnovej chorobe, kým pacienti ktorí brali placebo, uvedené komplikácie nevyvinuli (12).

Medzi nové biologiká indikované na liečbu stredne ťažkej až ťažkej ložiskovej psoriázy patria **guselkumab**, plne humánna monoklonová IgG1 protilátka a **rizankizumab**, humanizovaná monoklonová IgG1. Obe sa selektívne viažu s vysokou afinitou na p19-podjednotku IL-23 a tak bránia IL-23 väzbe na svoj receptor čím obmedzujú tvorbu a uvoľňovanie prozápalových cytokínov, napr. IL-17A a chemokínov. Guselkumab aj rizankizumab sú indikované na liečbu stredne ťažkej až ťažkej ložiskovej psoriázy. V klinickej štúdii vykázali vyššiu účinnosť ako ustekinumab, ktorý sa viaže na podjednotku p40 a inhibuje súčasne aj IL-12 aj IL-23. Blokovanie p40-podjednotky redukuje nielen Th17-bunky, ale aj Th1-bunkovú populáciu, ktorá je dôležitá pre udržanie intracelulárnej imunity hostiteľa, ale má len limitovanú úlohu v rozvoji psoriázy. Výhodou blokovania p19-podjednotky IL-23, je inhibícia vývoja patogénnych Th17 lymfocytov zapojených v patogenéze psoriázy (13).

V klinickej štúdii X-PLORE guselkumab dosiahol v 16. týždni liečby v porovnaní s adalimumabom signifikantne vyššie skóre PGA 0 alebo 1. Dlhodobá účinnosť bola sledovaná v štúdii Voyage 2. Počas 100 týždňov sledovania si IGA 0/1 (Investigator Global Assessment) udržalo 84 % pacientov liečených guselkumabom. V klinickej štúdii Voyage 1 odpoveď PASI 90 dosiahlo, a počas 100-týždňového sledovania si udržalo, 82,1 % pacientov a PASI 100 52,1 % pacientov. V klinickej štúdii VOYAGE 1 (14) a VOYAGE 2 bol porovnávaný guselkumab s adalimumabom a placebom. Nežiaduce účinky a závažné nežiaduce účinky boli porovnateľné naprieč všetkými štúdiami aj počas 48-týždňového sledovania. Najčastejším nežiadúcim účinkom bola nazofaryngitída, bolesti hlavy a zápal horných dýchacích ciest (14). Niekoľko ( $\leq 4$  %) pacientov z uvedeného dôvodu prerušilo liečbu. Incidencia vážnych infekcií a kandidóza bola minimálna a nebolo hlásené žiadne zápalové ochorenie čreva. Výskyt malignít a MACE bol nižší ak 1 % vo všetkých skupinách. Bol hlásený jeden suicidálny pokus u pacienta užívajúceho adalimumab. V štúdii VOYAGE 2 bola zistená vyššia náchylnosť k pocitu strachu ako v porovnávacích skupinách (15).

V štúdii NAVIGATE, v ktorej boli zaradení pacienti s nedostačujúcou klinickou

odpoveďou na ustekinumab, bol zistený o niečo častejší výskyt nežiadúcich účinkov (64,4 % vs. 55,6 %). Podiel malignít, vážnych infekcií a MACE bol nízky. Neboli potvrdené oportúnne infekcie, aktívna tbc ani Crohnova choroba (16).

Rizankizumab je humanizovaná monoklonová protilátka triedy IgG1, ktorá sa selektívne viaže s vysokou afinitou na podjednotku p19 humánneho cytokínu IL-23. Je produkovaný v ovariálnych bunkách čínskeho škrečka pomocou technológie rekombinantnej DNA (1-3).

V klinických skúšaníach UltIMMa-1 a UltIMMa-2 rizankizumab preukázal väčšiu účinnosť v porovnaní s placebom a ustekinumabom v liečbe strednej ťažkej až ťažkej chronickej ložiskovej psoriázy u dospelých pacientov (17). Naprieč obomi štúdiami bol rizankizumab konzistentne nadradený placebo aj ustekinumabu s vyššími hodnotami trvalého vyčistenia kože s rizankizumabom v 52. týždni (17).

Bezpečnostný profil rizankizumabu bol konzistentný s predchádzajúcimi klinickými skúšaniami. Výsledky zo skúšaní preukázali klinický potenciál rizankizumabu na dosiahnutie trvalo udržateľného vymiznutia kožných lézií u pacientov so psoriázou (17).

Rizankizumab preukázal väčšiu účinnosť aj v porovnaní s adalimumabom. Klinické skúšanie splnilo svoje ko-primárne koncové ukazovatele – sPGA 0/1 (rizankizumab vs. adalimumab, 84 % vs. 60 %;  $p < 0.001$ ) a PASI90 (rizankizumab vs. adalimumab, 72 % vs 47 %;  $p < 0.001$ ) v 16. týždni. Všetky sekundárne koncové ukazovatele klinického skúšania takisto dosiahli štatisticky významné výsledky s  $P$  hodnotou  $< 0.001$  (18).

Časť B klinického skúšania IMMvent preukázala trvalý vplyv rizankizumabu na udržateľnosť čistej kože (na základe PASI90 a PASI100) do 44. týždňa (rizankizumab vs. adalimumab, 66% a 40% vs 21% a 7%;  $p < 0.001$ ). Bezpečnostný profil bol konzistentný s predošlými štúdiami v programe klinických skúšaní rizankizumabu. Klinické skúšanie IMMvent demonštruje sľubné výsledky pre pacientov so stredne ťažkou až ťažkou psoriázou, vďaka zlepšeniu miery vyčistenia kožných prejavov

Bezpečnostný profil rizankizumabu bol konzistentný s pozorovaniami z predošlých klinických skúšaní, neboli pozorované žiadne neočakávané bezpečnostné signály.

Cielenejšia terapia zápalu u pacientov so psoriázou, vedie k výraznejšiemu potlačeniu klinických prejavov choroby a tým podstatne zlepšuje kvalitu života pacienta.

Pri zavedení prvých biologík do liečby psoriázy bolo cieľom dosiahnuť v 12. týždni liečby PASI 75, v súčasnosti, vo svetle nových poznatkov a nových preparátov, sa PASI 90 stáva novým štandardom pre liečebný cieľ psoriázy (19).

### **Psoriasis pustulosa**

Patogenéza *psoriasis vulgaris* a *psoriasis pustulosa* nie je úplne identická čoho dôkazom je rozdielna odpoveď na liečbu biologikami. *Psoriasis pustulosa generalisata* (von Zumbusch) je akútne ochorenie s výraznými celkovými príznakmi. V etiopatogenéze sa pripisuje významná úloha akútnej infekcii dýchacích ciest, niektorým liekom, hormonálnym zmenám sprevádzajúcim graviditu, hormonálnej antikoncepcii alebo



rýchlemu ukončeniu liečby kortikosteroidmi. V klinickom obraze vznikajú početné sterilné drobné pustulky na rozsiahlych erytematóznych ložiskách. Z celkových príznakov býva zvýšená teplota, hnačky, artralgie, slabosť a malátnosť. V ťažkých prípadoch vzniká sepsa.

V patogenéze generalizovanej aj lokalizovanej pustulóznejs psoriázy sa v zvýšenej miere uplatňuje aktivovaný IL-36 receptor. V klinických štúdiách sa v súčasnosti zisťuje účinnosť **inhibítora IL-36R** v liečbe tohto ochorenia. Poškodenie kože a následne keratinocytov vedie k uvoľňovaniu dvojvláknovej RNK a katelicidínu, ktoré aktivujú okolité keratinocyty k produkcii rodiny cytokínov IL-36. Zároveň aktivácia mitochondriálneho antivírusového signalizujúceho proteínu v okolitých keratinocytoch vedie k uvoľneniu INF- $\beta$ . Väzba IL-36 na receptor IL-36R zvyšuje produkciu rôznych chemokínov a zhromažďuje neutrofile, T- a dentritové bunky ako aj monocyty. Antagonista IL-36 receptora kompetitívne inhibuje IL-36R (20).

Expresia IL-1 $\beta$ , IL-36alfa a IL-36gama je u generalizovanej pustulóznejs psoriázy výrazne vyššia ako pri ložiskovej psoriáze. Pri ložiskovej psoriáze sa patogenéza choroby pohybuje prevažne na osi Th17/Th1, ku ktorej sa viažu IL-17A, IL-22, IL-23p19, IFN- $\gamma$  a IL-18 (21). Obe tieto cesty sú v blízkom vzťahu a vzájomným pôsobením vytvárajú a uzatvárajú zápalovú slučku, ktorá podmieňuje vznik ložiskovej aj pustulóznejs psoriázy. Aj keď agonistické aktivity IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  a IL-36 $\gamma$  alebo IL-36 sú nejasné, súčasný výskum podporuje význam IL-36 $\gamma$  a IL-36 $\alpha$  v psoriatickom zápale. Biologická dôležitosť jednotlivých izoforiem IL-36R agonistov si vyžaduje ďalší výskum.

### Atopická dermatitída

Kľúčový faktor v etiológii atopickej dermatitídy (AD) ja imunitná dysfunkcia. Vznik kožných lézií sprevádza zvýšená systémová Th2 odpoveď a aj kombinácia Th2 a Th1 odpovede. Imunologické charakteristiky kože bez lézií aj s léziami sa líšia od kože zdravých jedincov a aj v koži bez lézií pretrváva subklinický zápal.

Imunitná dysregulácia zvyšuje hyperreaktivitu kože na vonkajšie spúšťače akútnej fázy ochorenia (flare). Na etiológii sa podieľa aj genetika, dysfunkcia kožnej bariéry a mikroflóra kože (22).

Súčasná vedomosť ukazuje, že dominantnú úlohu pri AD hrajú Th2 lymfocyty s produkciou asociovaných cytokínov IL-4 a IL-13 (23, 24). Nadprodukcia IL-4 a IL-13 pri AD bráni zvýšenej produkcii antimikrobiálnych peptidov, prebieha reakcia na baktériové a vírusové podnety v koži, čo ďalej vedie k poškodeniu kožnej bariéry a exacerbácii zápalu.

Pacienti so stredne ťažkou až ťažkou AD často trpia recidivami ochorenia a lokálna ani celková dostupná terapia nie je dostačujúca. Novou možnosťou cielenej liečby môže byť **dupilumab**, plne humánna monoklonová IgG4 protilátka, ktorá sa viaže na alfa-subjednotku IL-4 receptora a tak inhibuje IL-4 aj IL-13. Tieto cytokíny sú primárne produkované Th2 bunkami, ktoré sú centrálné v patogenéze atopickej dermatitídy.

Dupilumab signifikantne redukuje chemokín TARC (thymus a activation-regulated

chemokine; CCL17) (25), špecifický biomarker aktivity AD (26) a redukuje gény, ktoré sú vo vzťahu k AD (27).

Pri hodnotení účinku liečby bol dupilumab kladne hodnotený v zmysle pruritu, spánku, kvality života a depresie. Účinnosť dupilumabu bola hodnotená v klinických štúdiách na podklade merania Eczema Area and Severity Index (EASI), Investigator's Global Assessment (IGA; 0–4 scale) score, PROs pruritu a health-related quality of life (HRQoL) (25, 28, 29).

Vo fáze III klinickej štúdie (SOLO 1 a SOLO 2) v 16. týždni 38 % pacientov dosiahlo IGA 0 až 1, EASI-75 dosiahlo 51 % resp. 52 % pacientov. Rovnako signifikantne sa znížil pruritus a zlepšila sa kvalita života pacientov (27). Ešte lepšie výsledky boli dosiahnuté aj v štúdiu CHRONOS, ktoré boli hodnotené v 52. týždni liečby (29).

V štúdiu CHRONOS najčastejšími nežiaducimi účinkami liečby dupilumabom bola nazofaryngitída, bolesti hlavy a reakcia v mieste vpichu (22). Bol zistený aj vyšší výskyt konjunktivitídy v porovnaní s placebom, ktorý nekoreloval s výskytom konjunktivitídy u pacientov s astmou a s polypmi v nose liečených dupilumabom.

Dupilumab je indikovaný u dospelých pacientov so stredne závažnou až závažnou atopickou dermatitídou, refraktérnou na celkovú liečbu. Podáva sa v indukčnej dávke 600 mg v s.c. injekcii a pokračuje sa každé 2 týždne 300 mg s.c. Môže sa kombinovať s lokálnou liečbou (28).

## Literatúra

1. Nestle F, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med*. 2009;361:496-509.
2. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol*. 2006 Jan;27(1):17-23.
3. Wolk K et al.: The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: a novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol*. 2009 Dec;39(12):3570-81.
4. Blumberg H et al. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell*. 2001 Jan 12;104(1):9-19.
5. Rizzo HL et al. IL-23-mediated psoriasis-like epidermal hyperplasia is dependent on IL-17A. *J Immunol*. 2011 Feb 1;186(3):1495-502.
6. Hueber, W., et al; Psoriasis Study Group; Rheumatoid Arthritis Study Group; Uveitis Study Group. Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci. Transl. Med*. 2010, 2, 52-72.
7. Lonnberg AS, Zachariae C, Skov L. Targeting of interleukin-17 in the treatment of psoriasis. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2014 7:251–9.
8. Armstrong AW et al. Effect of Ixekizumab treatment on work productivity for patients with moderate-to-severe plaque psoriasis: analysis of results from 3 randomized phase 3 clinical trials. *JAMA Dermatol*. 2016 Jun 1;152(6):661-9.
9. Langley RG et al. Improvement of scalp and nail lesions with ixekizumab in a phase 2 trial in patients with chronic plaque psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015 Sep;29(9):1763–70.

10. Wolk K et al.: The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: a novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol.* 2009 Dec;39(12):3570-81.
11. Blumberg H et al. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell.* 2001 Jan 12;104(1):9-19.
12. Gordon KB, et al. Phase 3 Trials of Ixekizumab in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. *N Engl J Med.* 2016 Jul 28;375(4):345-56.
13. Zeena N. et al. A Review of Guselkumab, an IL-23 Inhibitor, for Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis, *Skin Therapy Letter.* 2017;22(2)
14. Blauvelt A, Papp KA, Griffiths CE *et al.* Efficacy and safety of guselkumab, an anti-interleukin-23 monoclonal antibody, compared with adalimumab for the continuous treatment of patients with moderate to severe psoriasis: results from the phase III, double-blinded, placebo- and active comparator-controlled VOYAGE 1 trial. *J Am Acad Dermatol* 2017; **76**: 405-417.
15. Gordon KB, Armstrong AW, Han C *et al.* Anxiety and depression in patients with moderate-to-severe psoriasis and comparison of change from baseline after treatment with guselkumab vs. adalimumab: results from the Phase 3 VOYAGE 2 study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2018; **32**: 1940-1949.
16. Langley RG, Tsai TF, Flavin S *et al.* Efficacy and safety of guselkumab in patients with psoriasis who have an inadequate response to ustekinumab: results of the randomized, double-blind, phase 3 NAVIGATE trial. *Br J Dermatol* 2018; **178**: 114-123.
17. Gordon KB, Strober B, Lebwohl M, et al. Efficacy and Safety of Rizankizumab: Results from Two Double-Blind, Placebo- and Ustekinumab-Controlled, Phase 3 Trials in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. American Academy of Dermatology Annual Meeting, 16-20 February, San Diego, CA, United States 2018.
18. AbbVie. Rizankizumab MSL summary. Data on file. 2018.
19. Papp, M. Gooderham, et al. Efficacy and Safety of Rizankizumab, an IL-23 Inhibitor, in Patients with Moderate-to-Severe Chronic Plaque Psoriasis: 16-Week Results from the Phase 3 IMMhance Trial. Presented at the Psoriasis: from Gene to Clinic Meeting, London, United Kingdom 2017
20. Kazuhisa F., et al.: Highlighting Interleukin-36 Signalling in Plaque Psoriasis and Pustular Psoriasis. *Acta Derm Venereol* 2018; 98: 5–13
21. Zhang LJ et al. Antimicrobial peptide LL37 and MAVS signaling drive interferon- $\beta$  production by epidermal keratinocytes during skin injury. *Immunity* 2016; 45: 119–130.
22. Boguniewicz M, Leung DYM. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev.* 2011;242(1):233–246.
23. Brunner PM, Guttman-Yassky E, Leung DYM. The immunology of atopic dermatitis and its reversibility with broad-spectrum and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(Suppl 4):S65–S76.
24. Bullens DM, Kasran A, Peng X, Lorré K, Ceuppens JL. Clinical and experimental immunology: effects of anti-IL-4 receptor monoclonal antibody on in vitro T cell cytokine levels: IL-4 production by T cells from non-atopic donors. *Clin Exp Immunol.* 1998;113(3):320–326.
25. Beck LA, Thaci D, Hamilton JD, et al. Dupilumab treatment in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 2014;371(2):130–139.

26. Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, et al. Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107(3):535–541.
27. Simpson EL, Bieber T, Guttman-Yassky E, et al. Two phase 3 trials of dupilumab versus placebo in atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 2016;375(24):2335–2348.
28. DUPIXENT® [package insert]. Tarrytown, NY: Regeneron Pharmaceuticals; 2017.
29. Blauvelt A, de Bruin-Weller M, Gooderham M, et al. Long-term management of moderate-to-severe atopic dermatitis with dupilumab and concomitant topical corticosteroids (LIBERTY AD CHRONOS): a 1-year, randomised, double-blinded, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2017;389(10086):2287–2303.

Adresa:

Prof. MUDr. Mária Šimaljaková, CSC  
Dermatovenerologická klinika LF UK a UN Bratislava  
Mickiewiczova 13  
813 69 Bratislava  
Mail: maria.simaljakova@sm.nb.sk

## **NANOPROTILÁTKY PROTI IL17A/F: NOVÁ BIOLOGICKÁ LIEČBA PSORIÁZY**

**Švecová Danka**

*Dermatovenerologická klinika LFUK v Bratislave*

### **Abstrakt**

Nanomedicína používa nanotechnológiu, ktorá sa zaoberá nanočasticami. Tieto častice majú rozmer 0,1 – 100 nm ( $10^{-9}$ ). Používajú sa v nanodiagnostike, nanofarmakológii, regeneratívnej nanomedicíne, v nových implantátoch a známi sú aj terapeutickí nanoboti. Pracujú v biologických systémov na molekulovej úrovni. Nanofarmakológia sa zaoberá distribúciou liečiv a iných látok v tele pacienta. Pomocou nanotechnológie dochádza k cielenému uvoľneniu liečiva do chorého tkaniva. Mnoho liečiv využíva nanočastice ako svoje nosiče, napríklad antibiotiká, antivirotiká, antiparazitiká, cytotatiká, vitamíny, proteíny a peptidy, enzýmy a hormóny. Nanotechnológie v medicíne už zaujali svoje stále miesto a posúvajú úroveň nášho poznania na vyšší stupeň. Prvá nanoprotilátka, ktorá sa používa na liečbu psoriázy je odvodená od ťažkého reťazca ťavích protilátok, ktoré sú stabilné a funkčne plnohodnotné. Nanoprotilátky vďaka svojim miniatúrnym rozmerom rýchlejšie penetrujú do chorého tkaniva, v dôsledku čoho majú rýchlejší nástup účinku. V multicentrickej randomizovanej, dvojito zaslepenej placebom kontrolovanej štúdií vykazali vynikajúci liečebný účinok a bezpečnostný profil v liečbe miernej až ťažkej psoriázy plakového typu.

**Kľúčové slová:** nanoprotilátky, nanomedicína, IL-17 A/F, psoriáza

### **Summary**

Nanomedicine uses nanotechnology proceeding with nanoparticles. These particles are nanometric in size ( $10^{-9}$ m) having 0.1 – 100 nm. Nanoparticles can be used in various modalities as in nanodiagnosics, reconstruction of damaged tissue and to control biologic systems at molecule level. Nanopharmacology proceeds distribution of drugs and other substances in patient's body. Nanotechnology facilitates target release of drug into damaged tissue. Lot of drugs trade on nanoparticles as their carriers, for example, antibiotics, antivirotics, antiparasite drugs, cytostatics, vitamins, proteins and peptides, enzymes and hormones. Nanotechnology proposes regular place in medicine and shares our knowledge to higher level. The first nanobody used to treat psoriasis is derived from heavy chain only camel antibody which are stable and fully functional. Nanobody having miniatur size may faster penetrate to affected tissue and may rapidly evoke efficacy of the drug. Multicentric, randomized, double-blind placebo-controlled study showed excellent therapeutic efficacy and safety profil in treatment of mild to severe plaque psoriasis.

**Key words:** nanobody, nanomedicine, IL-17 A/F, psoriasis

## Úvod

Nanočastice sú nanometrických rozmerov ( $10^{-9}$  m), dosahujú veľkosť od 1 do 100 nanometrov. Majú veľký povrch, zvýšenú reaktivnosť a väčšiu životnosť, čo im umožňuje uskutočniť rozsiahly transport v prostredí, čím môžu ovplyvniť biologické systémy v interakciách s bunkovým materiálom (1).

Nanotechnológie sa využívajú v mnohých odvetviach vrátane medicíny. Môžu sa používať na monitorovanie, rekonštrukciu poškodených tkanív, kontrolu humánnych biologických systémov na molekulovej úrovni. Nanofarmakológia sa zaoberá cieľným uvoľňaním liečiva do chorého tkaniva. K tomu je potrebné prepraviť dostatočnú dávku liečiva do lézie vhodnými prenášačmi. Mnoho liečiv využíva nanočastice ako svoje nosiče, napríklad antibiotiká, antivirotiká, antiparazitiká, cytostatiká, vitamíny, proteíny a peptidy, enzýmy a hormóny. Liečivo je rozpustené, enkapsulované alebo pripravené do matrix nanočastice. Biodegradačné polymerické nanočastice sú schopné kontrolovane uvoľňovať liečivo do cieľového orgánu alebo tkaniva (2). Nanočastice nesú a na svojom povrchu rozpoznávacie elementy, ktoré sú priťahované špecifickými receptormi na povrchu buniek cieľových tkanív, miesta účinku liečiva. Nanočastica zvolená pre konkrétne liečivo musí byť dostatočne veľká, stabilná a biokompatibilná, čo znamená netoxická v krvnej cirkulácii za fyziologických podmienok. Musí byť zabezpečené kontrolované uvoľňovanie liečiva v terapeutickom rozmedzí. Proces uvoľňovania musí mať možnosť načasovania a môže ho naštartovať napríklad zmena tvaru a konformácie nanočastice v dôsledku priaznivej interakcie s cieľovým povrchom, zmenou pH, teploty, alebo prítomnosťou nejakej analytickej látky, napr. glukózy (3). Farmakologické údaje o toxicite nanočastíc sú sporadické a limitované. Toxicita je najväčšie riziko pri používaní nanočastíc, nakoľko môžu viesť k periférnej tkanivovej retencii a následnej toxicite. Ideálny nanoliek je netoxický, stabilný, neaktivuje imunitný systém, je schopný presného zmerania a schopný preniesť liečivo priamo do cieľovej bunky. Umožňuje podanie nižšej terapeutickkej dávky pri rovnakej klinickej účinnosti ako štandardná terapia a významne redukuje vedľajšie účinky liekov.

Nanoprotiľátky predstavujú novú liečebnú modalitu, ktorá musí spĺňať veľmi prísne kritéria.

Jedná sa o novú triedu protiľátok odvonú od ťažkého reťazca protiľátok, pochádzajúcich z čeľadi ťavovité (*Camelidae*). Boli objavené v 90-tych rokoch ako prirodzené protiľátky, pozostávajúce len z ťažkého reťazca, ktorý tvoria segmenty CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> a VH z celkovou hmotnosťou 90 kDa, nazývajú sa „Heavy-chain antibodies“ (HcAbs) (4, 5) (obr.1). Sú oveľa menšie ako monoklonálne protiľátky, nakoľko majú veľkosť 12-15 kDa, čo je 1/10 veľkosti monoklonálnych protiľátok. Sú to protiľátky s plnohodnotne vyvinutými vlastnosťami, napr. schopnosťou viazať antigény rovnako ako klasické protiľátky. Ich sekvenčná homológia je porovnateľná s humanizovanými a humánnymi monoklonálnymi protiľátkami. Ľahko sa produkujú v rozličných prokaryotických a eukaryotických expresných systémoch, napr. *E. coli* a *Pichia pastoris* a tiež v transgénnych rastlinách, a to *Nicotiana tabacum* a *Nicotiana benthamiana*, ale aj v kvasinkách

a bunkách cicavcov pomocou zakódovaných jednotlivých génov (6). Dajú sa vytvoriť vo vysokej koncentrácii a pri nízkej viskozite. Vďaka svojim vlastnostiam rýchlo penetrujú do chorého tkaniva a tým navodzujú rýchly účinok liečiva. Majú nízku aktivitu voči zdravým bunkám. Navyše tzv. „kotviace“ nanoprotilátky umožňujú lokálnu liečbu určitých tkanív, napr. kíbov alebo očí, pričom dochádza k vysokej koncentrácii liečiva v chorom tkanive a k minimálnej celkovej expozícii. Pomocou naviazania sa humánneho sérového albumínu sa zvyšuje polčas života terapeutickkej molekuly, vďaka čomu sa môže pripraviť nanoprotilátka s rôznym polčasom života od málo hodín až po viac ako 3 týždne. Tento spôsob úpravy polčasu prežitia je jediný pre nanoprotilátky. Sú tiež schopné rozpoznávať neštandardné kryptické epitopy, ktoré sú ukryté alebo ochránené pred konvenčnými protilátkami. Nanoprotilátky sú schopné sa viazať na viaceré ciele jednou terapeutickou molekulou vďaka stavebnému bloku, ktorý pozostáva až zo 7 súčastí a môže sa tiež kombinovať s inou proteínovou doménou alebo inou molekulou lieku (7). Jednotlivé stavebné bloky sa spolu spájajú pomocou glycinových a serínových väzieb, ktoré majú flexibilnú dĺžku. Multišpecifické nanoprotilátky sa viažu na odlišné ciele, bišpecifické na dva ciele, multivalentné sa viažu na identické ciele a bi-paratopické na odlišné epitopy toho istého cieľu. Medzi ich ďalšie vlastnosti patrí ľahká solubilita a termostabilita.

Nanoprotilátky majú široké použitie v medicíne, a to v diagnostike, napr. pri detekcii aterosklerotických lézií (8) alebo patogénov v tele hostiteľa, okrem iného na dôkaz HIV vyvolávateľa (9), ale aj diagnostiku rakoviny prsníka pomocou expresie receptora pre rastový faktor (EGFR), a pre monitorovanie aktivity dendritických buniek počas zápalu (10, 11,12). Využíva sa tu označenie diagnostických nanoprotilátok pomocou rádioizotopov a fluorescencie. Nanoprotilátky majú svoju budúcnosť pri použití diagnostických metód predovšetkým v mikrobiológii, onkológii a imunológii. Ďalšie ich využitie je v terapii. Nanoprotilátky inhibujúce vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF) sa využili v liečbe rakoviny (13). Dajú sa použiť na neutralizáciu toxínov *Corynebacterium diphtheriae* (14). Technologická príprava nanoprotilátok na terapeutické použitie umožňuje viaceré spôsoby aplikácie vrátane intravenózne a subkutánnej, ktoré sú jedinými možnými spôsobmi podania u konvenčných protilátok, navyše u nanoprotilátok je možná aj perorálna aplikácia pre lokálnu liečbu v čreve, inhalácia priamo do respiračného traktu a okulárna aplikácia (7).

**Cieľ práce:** predkladáme prvú klinickú štúdiu o účinku nanoprotilátok proti IL-17A/F v liečbe miernej až ťažkej psoriázy plakového typu.

### **Materiál a metodika**

V našej práci predkladáme stručné výsledky multicentrickej, randomizovanej, dvojitě-zaslepanej, placebom kontrolovanej štúdie, fáze 1 u dospelých pacientov s miernou až ťažkou psoriázou plakového typu, v časovom období august 2014 – august 2015. Klinická štúdia sa uskutočnila v 4 štátoch EU ( SR, ČR, Poľsko, Maďarsko). Nano-

protilátka proti IL-17A/F sa podávala subkutánne v dávkach 30, 60, 120 alebo 240 mg každé 2 týždne, po dobu 6 týždňov. Pacienti boli sledovaní ďalších 6 týždňov.

Inklúzne kritéria zahrňovali chronickú psoriázu plakového typu trvajúcu viac ako 6 mesiacov, BSA  $\geq 10\%$ , PASI  $\geq 12$ , PGA  $\geq 3$ .

Medzi exklúzne kritéria patrili psoriáza indukovaná liekmi, klinická exacerbácia počas 4 týždňov pred randomizáciou, predchádzajúca biologická liečba, liečba imunosupresívnymi liekmi, včítane kortikosteroidov, fototerapia a silné lokálne kortikosteroidy.

Zisťovala sa bezpečnosť liečby, jej tolerovanie, imunogenicita, farmakokinetika a farmakodynamika a účinnosť nanoprotilátky anti-IL-17A/F.

Do klinickej štúdie bolo zaradených 44 pacientov, z toho 38 liečbu ukončilo. V klinickej štúdii bolo 35 mužov a 6 žien, priemerný vek 45,1 roka. Pacienti boli rozdelení do 4 skupín (30 mg, n=8), 60 mg (n=8), 120 mg (n=8), 240 mg (n=9) a placebo skupina (n=8).

## Výsledky

Zistili sme rýchly nástup účinku liečby sledovaným liekom, a to už 8. deň po aplikovaní dávky vo všetkých štyroch kohortách. V 43. deň (6. týždeň) priemerné PASI skóre dosahovalo 16% z bazálnej hodnoty pri dávke 30 mg, 10% pri dávke 60 mg, 10% pri dávke 120 mg, 12% pri dávke 240 mg vs. 77 % v skupine placebo. V deň 85. (12. týždeň) žiaden pacient v skupine placebo ne získal PASI 75, 90 alebo 100. Vo všetkých kohortách bol pomer PASI 75, 90, a 100 priamo úmerný dávke lieku. PASI 75 získalo 100% pacientov na dávke 120 mg a 240 mg. PASI 90 získalo 88% na dávke 120 mg a 100% pacientov na dávke 240 mg. PASI 100 získalo 56% pacientov na dávke 240 mg a 50% pacientov na dávke 120 mg (graf. 1). Všetky dávky boli dobre tolerované. Nežiadúce účinky, ktoré sa vyskytli počas liečby sledovaným liekom boli mierne a prechodné. Incidencia nežiadúcich účinkov nebola závislá na dávke. Dvaja pacienti prerušili liečbu, a to jeden pre lokálnu reakciu v mieste aplikácie subkutánnej injekcie a jeden pre zvýšené hepatálne testy. Najčastejším nežiadúcim účinkom bolo svrbenie tela (4 pacienti, 12%) a bolesť hlavy (3 pacienti, 9%), ostatné nežiadúce účinky sa vyskytli len sporadicky u jedného alebo dvoch pacientov (nazofaryngitída, ospalosť, bronchitída, artralgia, etc.) Lokálna tolerancia v mieste aplikácie subkutánnej injekcie bola hodnotená u všetkých pacientov ako vyhovujúca. Výnimkou bol jeden pacient, ktorý pre silný opuch a začervenaie v mieste aplikácie injekcie prerušil svoju účasť v klinickej štúdii. Desať pacientov s aktívnou látkou a jeden s placebom pociťovali minimálnu bolesť v mieste aplikovania lieku. Nezistil sa vzťah medzi lokálnou toleranciou a objemom dávky lieku. Nezistili sa žiadne významné zmeny v laboratórnych parametroch, ani vo vitálnych funkciách, včítane ekg a telesnej hmotnosti.



## Diskusia

Predkladáme výsledky prvej klinickej štúdie o účinnosti a bezpečnosti nanoprotilátok v dermatológii. Nanoprotilátky IL17A/F sme použili na liečbu pacientov s miernou až ťažkou psoriázou plakového typu. Najvyššia dávka 240 mg vykázala najvyšší liečebný účinok; všetci pacienti získali PASI 75 a PASI 90 a 56% pacientov PASI 100 v 85. deň (12 týždňov) liečby. Výsledky sme prezentovali na kongrese Americkej Akadémie Dermatológie v roku 2017 (15) a publikovali v JAAD v roku 2019 (16).

Liečba protilátkami proti IL-17 A/F vykázala vyššie zlepšenie PASI skóre v porovnaní s literárnymi údajmi iných antagonistov IL-17 secukinumabom, ixekizumabom a brodalumabom. U týchto monoklonálnych protilátok PASI 75 dosiahlo 77-90% pacientov, PASI 90 zistili u 54-71% pacientov a PASI 100 u 40- 44% pacientov (17, 18, 19). Bimekizumab a NI-1401 sú bišpecifické monoklonálne protilátky proti IL-17F a IL-17A dosiahli PASI 100 približne u 87% pacientov, ktorých liečili najvyššou dávkou na 8. týždeň liečby (20). V našej klinickej štúdii sme zaznamenali podobnú incidenciu nežiadúcich účinkov u pacientov liečených s nanoprotilátkami proti IL-17A/F ako u skupiny pacientov liečených placebom, pričom najčastejšie nežiadúce účinky boli podobné ako u ostatných antagonistov IL-17 v liečbe psoriázy (17, 18, 19). Vyšší podiel účinnosti nanoprotilátok proti IL17 A/F závisí od širšieho zásahu nanoprotilátky proti IL-17 A/F, pretože blokujú IL-17A a IL-17F, čím zabezpečujú vyššiu protizápalovú účinnosť ako blokovanie len samotného IL-17A. Táto formula má navyše trivalentnú účinnosť, nakoľko neutralizuje homodiméry IL-17A, IL-17F a tiež heterodimér IL-17A/F. Albumín, ktorý predlžuje polčas života nanoprotilátok prispieva k lepšej účinnosti lieku ako aj malá veľkosť molekuly (40kDa), ktorá má potenciálne lepšiu penetráciu do chorého tkaniva ako konvenčné monoklonálne protilátky, používané v liečbe psoriázy.

## Záver

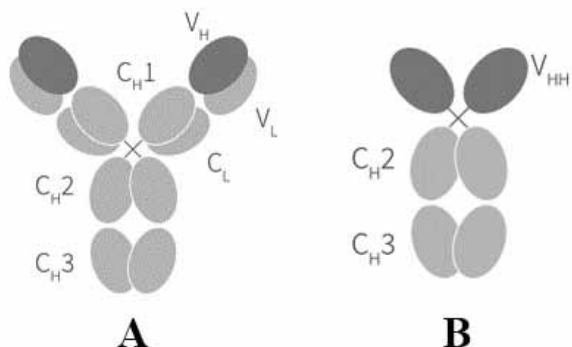
Nanotechnológie v medicíne už zaujali svoje stále miesto a posúvajú úroveň nášho poznania na vyšší stupeň. Nanoprotilátky proti IL17A/F sú prvými nanoprotilátkami použitými v dermatológii a vykázali výborný liečebný účinok a bezpečnostný profil v liečbe miernej až ťažkej psoriázy plakového typu. Ich fyzikálne vlastnosti umožňujú dobrý prienik do chorého tkaniva a rýchly nástup účinku.

## Literatúra

1. Nel A, Xia T, Meng H et al. Nanomaterial toxicity testing in the 21 st century: use of a predictive toxicological approach and high throughput screening. *Acc Chem Res.* 2013; 46 (3): 607-621.
2. Langer R. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. *Acc Chem Res.* 2000; 33:94:101.
3. Farokhzad OC, Langer R. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006; 58(14): 1456-1459.
4. Davies J, Riechmann L. Single antibody domains as small recognition units: design and in vitro antigen selection of camelized, human VH domains with improved protein stability. *Protein Eng.* 1996, 9: 531-537.

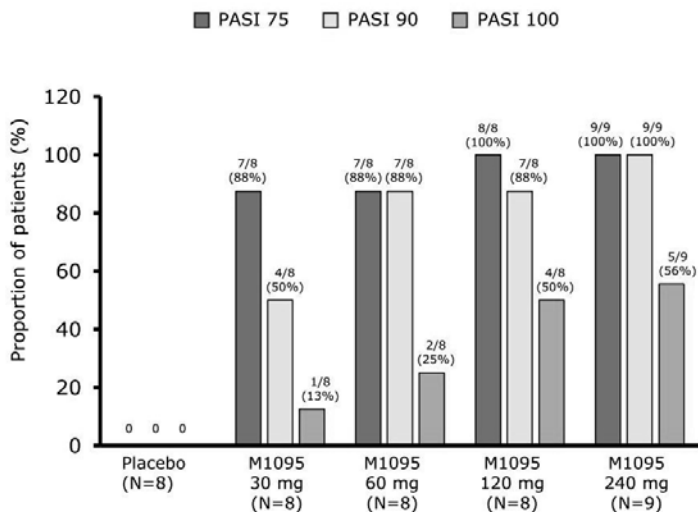
5. Ghahroudi MA, Desmyter A, Wyns L et al. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.* 1997; 414: 521-526.
6. Čomor Ľ, Bhide K, Kaňová E et al. Nanoprotilátky a ich využitie v medicíne a výskume. *Slov Lek.* 2016; 26 (3- 4): 56-64.
7. Ablynx: Nanobodies competitive features; 2017. <http://www.ablynx.com/technology-innovation/nanobodiescompetitive-teaftures>. Accessed April 7, 2017.
8. Briosat A, Hernot S, Toczek J et al. Nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for the nuclear imaging of atherosclerotic lesions. *Circ Res.* 2012; 110:927-937.
9. Helma J, Schmidhals, K, Lux V et al. Direct and dynamic detection of HIV-1 in living cells. *Plos One* . 2012; 7: e50026.
10. Huang L, Gainkam LO, Cavelliers V, et al. SPECT imaging with 99mTc-labeled EGFR-specific nanobody for in vivo monitoring of EGFR expressions. *Mol Imaging Biol.* 2008, 10: 167-175.
11. Vaneycken I, Devoogdt N, Van Gassen N et al. Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. *FASEB J.* 2011; 25:2433-2446.
12. De Groeve K, Deschacht N, De Koninck C, et al. Nanobodies as tools for in vivo imaging of specific immune cell types. *J Nucl Med.* 2010; 51: 782-789.
13. Behdami M, Zeinali S, Karimipour M, et al. Expression, purification and characterization of a diabody againsts the most important angiogenesis cell receptor: vascular endothelial growth factor receptor 2. *Adv Biomed Res.* 2012, 1: 34.
14. Shaker GH. Evaluation of antidiphtheria toxin nanobodies. *Nanotechnol Sci Appl.* 2010; 3:29-35.
15. Svecova D, Krueger J, Sverdlov O, et al. Safety and efficacy of multiple ascending doses of subcutaneous M1095, an anti-interleukin-17A/F bispecific nanobody, in patients with moderate- to-severe psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 2017; 6 (Suppl.1): AB224.
16. Svecova D, Lubell MW, Casset-Semanaz F, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 1 study of multiple ascending doses of subcutaneous M1095, an anti-interleukin 17A/F nanobody, in moderate-to- severe psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 2019; 81:196-203.
17. Blauvelt A, Reich K, Mehlis S. Secukinumab demonstrates greater sustained improvements in daily activities and personal relationships than ustekinumab in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis: 52-weeks results from the CLEAR study. *J Eur Acad Dermatol Venerol.* 2017; 31:1693-1699.
18. Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, et al. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N J Med.* 2012;366:1190-1199.
19. Papp KA, Leonardi C, Menter A, et al. Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med.* 2012;266:1181-1189.
20. Papp KA, Merola JF, Gottlieb AB, et al. Dual neutralization of both interleukin 17A and interleukin 17F with bimekizumab in patients with psoriasis: results from BE ABLE 1, a 12-week randomized, double-blinded, placebo-controlled phase 2b trial. *J Am Acad Dermatol.* 2018;79:277-286.e210.

prof. MUDr. Danka Švecová, PhD.  
Dermatovenerologická klinika LFUK a UNB Staré mesto  
Mickiewiczova 13, 813 69 Bratislava  
danka.svecova@fmed.uniba.sk



Obrázok č. 1 – Klasická protilátka a nanoprotiľátka

- A Klasická protilátka obsahuje ľahké aj ťažké reťazce.  
 B nanoprotiľátka je odvodená od ťažkého reťazca protilátky pochádzajúcej od čeľade ťavovité *Camelidae*.



Graf č. 1 – Pomer pacientov s PASI 75, 90 a 100 v 85.deň (týždeň 12) pri rôznych dávkach nanoprotiľátky proti IL-17A/F.

## PSORIÁZA AKO AUTOZÁPALOVÁ CHOROBA

Javor J., Buc M., Bucová M.

*Imunologický ústav, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave*

### Súhrn

Deregulovaný zápalový proces zohráva významnú úlohu pri rozvoji chronickej plakovej psoriázy a je hlavným patogenetickým mechanizmom pri vzniku zriedkavých pustulárnych foriem choroby. Kľúčovými hráčmi v tomto procese sú aj cytokíny IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-12/23, IL-17A a najmä IL-36. Príčinou ich nadmernej aktivity alebo tvorby môžu byť u niektorých pacientov s generalizovanou alebo lokalizovanou pustulárnou psoriázou mutácie v génoch, ktoré kódujú molekuly podieľajúce sa na inhibícii pôsobenia IL-36 (IL-36Ra) alebo na vnútrobunkovej zápalovej signalizácii (CARD14, AP1S3). Poznatky o patologickej úlohe zápalových cytokínov pri vzniku pustulárnych foriem psoriázy našli svoje uplatnenie aj v biologickej liečbe pomocou monoklonových protilátok, ktoré neutralizujú pôsobenie IL-12/23, IL-17A, TNF či IL-1 $\beta$ . Ako nádejné sa ukazujú aj monoklonové protilátky proti receptoru pre interleukín 36, ktoré už majú úspešne za sebou prvú fázu klinických skúšok a momentálne sa testuje ich dlhodobá účinnosť, bezpečnosť a tolerovateľnosť.

**Kľúčové slová:** autozápalová choroba, biologická liečba, interleukín 36, monoklonové protilátky, pustulárna psoriáza, spesolimab

### Summary

The dysregulated inflammatory process plays an important role in the development of chronic plaque psoriasis and is a major pathogenetic mechanism behind rare pustular forms of the disease. The key players in this process include cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-12/23, IL-17A and especially IL-36. In some patients with generalized or localized pustular psoriasis, mutations in genes that encode molecules involved in inhibiting IL-36 (IL-36Ra) or intracellular inflammatory signaling (CARD14, AP1S3) may be the cause of excessive cytokine activity or production. Knowledge of the pathological role of inflammatory cytokines in the development of pustular forms of psoriasis has also found its application in biological therapy with monoclonal antibodies that neutralize the action of IL-12/23, IL-17A, TNF or IL-1 $\beta$ . Other promising agents include monoclonal antibodies against the interleukin 36 receptor, which have already successfully completed the first phase of clinical trials and are currently being tested for their long-term efficacy, safety and tolerability.

**Key words:** autoinflammatory disease, biological therapy, interleukin 36, monoclonal antibodies, pustular psoriasis, spesolimab

## Úvod

Autoimunitné choroby sú prototypom patologických stavov, pri ktorých imunitný systém pacienta cielene napáda vlastné tkanivá v dôsledku straty schopnosti buniek adaptívnej zložky imunity tolerovať vlastné antigény. V posledných rokoch sa postupne rozširujú naše poznatky aj o ďalšej skupine imunitne podmienených chorôb s prívlastkom „auto“. Tieto tzv. autozápalové choroby sa líšia od autoimunitných tým, že rozhodujúcu úlohu v ich patogenéze zohrávajú mechanizmy prirodzenej imunity v podobe abnormálnej aktivácie zápalového procesu bez prítomnosti zjavného spúšťača, akým je napr. infekcia. Hranica medzi oboma skupinami chorôb však nie je ani zďaleka jednoznačná a v mnohých prípadoch sa na vzniku konkrétnej choroby podieľajú autoimunitné aj autozápalové mechanizmy spoločne.<sup>1</sup> Jedným z príkladov takýchto patologických stavov je aj psoriáza, čo je chronická zápalová choroba kože vyznačujúca sa abnormálnou diferenciáciou a proliferáciou keratinocytov a infiltráciou postihnutej kože rôznymi populáciami leukocytov v dôsledku aktivácie mechanizmov adaptívnej a prirodzenej imunity.<sup>2</sup> Psoriáza je vo svojej podstate heterogénna skupina patologických stavov, u ktorých sa podiel autoimunitných a autozápalových procesov na ich rozvoji líši v závislosti od klinického podtypu choroby.<sup>1,3</sup> Najčastejšou formou choroby je **chronická plaková psoriáza (*psoriasis vulgaris* – PV)**, ktorá postihuje približne 2 – 4 % kaukazoidnej populácie a prejavuje sa tvorbou charakteristických vyvýšených a dobre ohraničených ložísk zapálenej kože so striebřistým ošupovaním. V patogenéze tejto formy psoriázy dominuje autoimunitný proces vznikajúci na podklade komplexnej interakcie množstva genetických a environmentálnych faktorov. Rozpoznanie autoantigénov exprimovaných najmä na keratinocytoch a následná aktivácia autoreaktívnych T-lymfocytov (Th17, Th22, Th1, Tc), ale aj prirodzených lymfoidných buniek (ILC), NKT-lymfocytov a ďalších buniek imunitného systému vedú k tvorbe viacerých cytokínov, ktoré pôsobia priamo na keratinocyty a zodpovedajú za vznik zápalu a charakteristických zmien v *epidermis* a *dermis*.<sup>4-6</sup> Poznatky o rozhodujúcej úlohe imunitného systému pri rozvoji plakovej psoriázy našli svoje uplatnenie aj v liečbe, pretože jej neoddeliteľnou súčasťou sa stali biologické liečivá (monoklonové protilátky a fúzne proteíny) neutralizujúce pôsobenie kľúčových cytokínov IL-12/23, TNF a IL-17A.<sup>4</sup> Na opačnom konci psoriatického spektra sa nachádza **pustulárna psoriáza (PP)** a jej subtypy, ktoré sa v mnohých ohľadoch výrazne líšia od klasickej plakovej psoriázy.<sup>6</sup>

### Klasifikácia a základné prejavy subtypov pustulárnej psoriázy

Klinicky najzávažnejšou formou psoriázy je **generalizovaná pustulárna psoriáza (GPP)**, čo je vzácna multisystémová choroba charakterizovaná tvorbou sterilných subkorneálnych pustúl na erytematóznom podklade, ktoré postihujú rozsiahle plochy kože.<sup>7-9</sup> Prevalencia GPP v kaukazoidných populáciách je približne 1 až 2 pacientov na milión obyvateľov, pričom o niečo častejšie sa vyskytuje u žien ako u mužov.<sup>5,7,10</sup> U dvoch tretín pacientov sa stretávame s akútnym rekurentným priebehom charakterizovaným náhlym vznikom erytematóznych plakov s difúznym výsevom plúzgierov

veľkosti špendlíkovej hlavičky, ktoré môžu splyvať do rozsiahlych, hnisom vyplnených ložísk, označovaných aj ako „jazera hnisu“. Postihnuté môžu byť aj nechty, jazyk a sliznica oči a úst.<sup>5,11,12</sup> Pri tomto subtype GPP, známom aj ako **von Zumbuschova choroba**, je postihnutá koža citlivá až bolestivá na dotyk a kožné prejavy bývajú sprevádzané systémovými prejavmi zápalu, ako je vysoká horúčka, triaška, bolesť hlavy, schvátanosť, nauzea a nechutenstvo.<sup>12</sup> V najťažších prípadoch sa môžu objaviť aj život ohrozujúce infekčné, zápalové, metabolické, hemodynamické a termoregulačné poruchy a komplikácie v dôsledku narušenia epidermovej bariéry, ako napr. sepsa, akútne renálne zlyhanie, akútne kongestívne zlyhanie srdca či syndróm akútnej respiračnej tiesne. K ďalším prejavom a komplikáciám patria artralgia, myalgia, intersticiálna pneumonitída, uveitída, tetánia, delírium, príznaky podráždenia tráviaceho traktu a cholestatická žltáčka v dôsledku neutrofilovej cholangitídy.<sup>5,7,9,11,12</sup> Akútna GPP vzniká prevažne v 3. až 5. dekáde života, ale môže sa objaviť aj v detskom či dokonca dojčenskom veku.<sup>5,9,10,13</sup> **Juvenilná GPP** máva často miernejší priebeh so spontánnym odznením prejavov, dlhodobou remisiou a prejavmi pripomínajúcimi **anulárnu GPP**, čo je subakútna forma choroby charakterizovaná chýbajúcimi alebo len miernymi systémovými prejavmi zápalu a progredujúcimi erytematóznymi ložiskami s tvorbou pustúl na ich okrajoch.<sup>5,12</sup> Akútny priebeh so systémovými prejavmi má aj GPP vznikajúca počas tehotenstva, známa aj pod názvom **impetigo herpetiformis (IH)**, ktorá sa spája so zvýšeným rizikom insuficiencie placenty, predčasného pôrodu, potratu či fetálnych abnormalít. **Lokalizované formy pustulárnej psoriázy** zahŕňajú **palmoplantárnu pustulárnu psoriázu (PPP)** charakterizovanú výsevom pustúl na dlaniach a chodidlách, a **acrodermatitis continua (AC)**, čo je extrémne vzácna forma choroby vyznačujúca sa tvorbou pustúl na prstoch rúk a nôh a na nechtoch lôžkach.<sup>7,14,15</sup>

V histopatologickom obraze GPP a lokalizovaných foriem pustulárnej psoriázy dominujú známky intenzívnej zápalovej odpovede s výraznou infiltráciou papilárnej dermy a epidermy neutrofilmi, ktoré vytvárajú charakteristické subkorneálne spongiformné (Kogojove) pustuly. Prítomné bývajú aj Munroove mikroabscesy, papilárny a epidermový edém, hyperplázia suprapapilárnych kapilár, perivaskulárna infiltrácia dermy mononukleárnymi leukocytmi a známky abnormalnej proliferácie a diferenciácie keratinocytov, ako je akantóza, hyperkeratóza, parakeratóza a redukcia *stratum granulosum*. U PPP zvyčajne pozorujeme prítomnosť eozinofilov a mastocytov vo vrchnej časti dermy.<sup>7,9,12</sup> V laboratórnom obraze GPP možno pozorovať známky systémového zápalu, ako je zvýšená sedimentácia erytrocytov, zvýšené hladiny C-reaktívneho proteínu a leukocytóza s neutrofiliiou, ďalej hypoalbuminémiu, hypokalciémiu či hypofosfatémiu, prípadne aj abnormálne výsledky pečeneňových a renálnych testov a zmeny v lipidovom profile.<sup>7,12</sup>

### **Etiopatogenéza pustulárnej psoriázy**

Etiopatogenéza pustulárnej psoriázy zostáva aj napriek značným pokrokom dosiahnutým v poslednej dekáde stále nedostatočne objasnená. Približne v polovici prí-

padov GPP a AC a u menej ako pätiny pacientov s PPP sa stretávame aj s prejavmi chronickej plakovej psoriázy, čo naznačuje, že niektoré imunopatogenetické mechanizmy sú spoločné pre rôzne formy a subtypy choroby.<sup>5,7,9,10</sup> Väčšina prípadov GPP je idiopatická, u niektorých pacientov je však možné vystopovať faktory, ktoré spúšťajú ataky choroby alebo exacerbujú jej priebeh. Tieto zahŕňajú vírusové, baktériové a mykotické infekcie (cytomegalovírus, Epstein-Barr vírus, varicella-zoster vírus, streptokoky), lieky (aspirín, sulfónamidy, lítium, propranolol, ramipril, amoxycilín, penicilín, fenylbutazón, terbinafín, interferón-alfa, morfín a iné), vakcíny (BCG, H1N1), psychoemočný stres, UV-žiarenie, menštruáciu, hormonálne a iné zmeny počas tehotenstva a hypokalciémiu. Z terapeutického hľadiska je tiež zaujímavá spojitosť medzi vznikom akútnej GPP a náhlym ukončením systémovej liečby kortikosteroidmi alebo cyklosporínom či paradoxný vplyv inhibítorov TNF a ustekinumabu na indukciu choroby u niektorých pacientov.<sup>5,7,9,12,16</sup> K faktorom, ktoré zvyšujú riziko vzniku PPP, zaraďujeme fajčenie, ženské pohlavie, mechanickú traumou, stres, precitlivosť na kovy (nikel, kobalt), infekcie (tonzilitída, gingivitída, periodontitída, sínusitída) a niektoré lieky, vrátane paradoxného vplyvu inhibítorov TNF.<sup>7,10</sup> Na vzniku AC sa zase podieľajú lokalizované traumy a infekcie distálnych článkov prstov.<sup>7</sup>

Podobne ako pri chronickej plakovej psoriáze aj pri GPP sa dá pozorovať zvýšená expresia cytokínov IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-23, TNF, IL-8, IL-36 a IFN- $\gamma$ , pričom u druhej menovanej formy choroby je zjavná výraznejšia úloha mechanizmov prirodzenej imunity sprostredkovaných cytokínmi IL-1 $\beta$  a IL-36.<sup>2,5,17</sup> V imunopatogenéze GPP, ale aj lokálnych foriem pustulárnej psoriázy, zohráva rozhodujúcu úlohu autozápalový proces s abnormálnou aktiváciou pro-zápalových signalizačných kaskád.<sup>17</sup> Dnes je už jasné, že kľúčovými hráčmi pri vzniku choroby sú samotné keratinocyty. Hoci ich primárnou funkciou je vytvárať mechanickú bariéru proti agensom z vonkajšieho prostredia, o nič menší význam nemá ani ich úloha pri obranných reakciách prirodzenej imunity a rozvoji zápalu. Pre tieto účely keratinocyty exprimujú viaceré vzorkové receptory, ktoré dokážu zachytiť prítomnosť ligandov pochádzajúcich z patogénnych mikroorganizmov a poškodených buniek, ako aj receptory pre cytokíny produkované bunkami imunitného systému (napr. IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-22, TNF, IFN- $\gamma$ , a pod.).<sup>18</sup> Výsledkom stimulácie vzorkových a cytokínových receptorov je okrem indukcie tvorby antimikrobiálnych peptidov (katelicidínov,  $\beta$ -defenzínov, S100 proteínov) aj aktivácia signalizačných dráh zodpovedných za indukciu tvorby pro-zápalových cytokínov a chemokínov (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-36, IL-8, CXCL1, CXCL2, CXCL10, CCL2, CCL20). Tieto sú potrebné pre spustenie a udržiavanie lokálnej (a prípadne i systémovej) zápalovej reakcie a prísun leukocytov do postihnutého ložiska.<sup>2,18</sup>

Jednými z kľúčových cytokínov produkovaných keratinocytmi, fibroblastmi, endotelovými bunkami, makrofágmi, lymfocytmi, Langerhansovými bunkami a dendritovými bunkami v koži v odpovedi na rôzne exo- aj endogénne stresové a zápalové signály sú **interleukín 36** (IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  a IL-36 $\gamma$ ). Všetky tri formy IL-36 sú členmi IL-1 cytokínovej rodiny a podobne ako jej najznámejší člen IL-1 $\beta$  sa syntetizujú ako

prekursorové proteíny s minimálnou funkčnou aktivitou, ktoré sa na svoju premenu na plne aktívnu biologickú formu musia rozštiepiť pôsobením špecifických proteáz.<sup>2,19</sup> V prípade IL-36 sa tak deje v extracelulárnom priestore pôsobením proteáz produkovaných neutrofilmi (elastáza, proteáza, katepsín S a G) alebo samotnými keratinocytmi (katepsín S). Aktívne formy IL-36 sa následne viažu na receptor IL-36R (IL-1Rrp2) v membránach terčových buniek, pričom môžu pôsobiť autokrinne (na keratinocyty, ktoré ich vytvorili) a parakrinne (na iné keratinocyty, makrofágy a dendritové bunky v okolí).<sup>18</sup> Väzba IL-36 na ich receptor vedie k jeho heterodimerizácii s akcesórnym proteínom receptora pre IL-1 (IL-1RAcP) a k následnej indukcii špecifických vnútrobunkových signalizačných dráh sprostredkovaných NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) a MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Tieto sú priamo zodpovedné za indukciu expsie génov pre viaceré zápalové cytokíny, chemokíny a rastové faktory.<sup>2,19–21</sup> Pod ich vplyvom, ako aj pod vplyvom samotného IL-36, migrujú do ložiska neutrofilny, monocyty, dendritové bunky a lymfocyty a dochádza k ich aktivácii. Neutrofilny zodpovedajú za vznik mikroabscesov, pustúl a tvorbu IL-17A, zatiaľ čo makrofágy a dendritové bunky tvoria cytokíny (IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, IL-36) a chemokíny, ktoré sa podieľajú na ďalšej amplifikácii zápalového procesu. Na ňom sa do určitej miery zúčastňujú aj aktivované pomocné T lymfocyty (Th17, Th22, Th1),  $\gamma\delta$  T-lymfocyty a prirodzené lymfoidné bunky (ILC3), ktoré vznikajú pod vplyvom IL-12, IL-23, IL-1 $\beta$  a IL-36 tvorených aktivovanými dendritovými bunkami, makrofágmi a keratinocytmi. Cytokíny IL-17A, IL-22 a IFN- $\gamma$  sa ako produkty aktivovaných T, ILC-buniek, neutrofilov a mastocytov následne viažu na svoje receptory v membráne keratinocytov a spolu s IL-36 navodzujú ich nadmernú proliferáciu, abnormálnu diferenciáciu a ďalšiu tvorbu zápalových cytokínov, vrátane samotného IL-36, čím sa vytvára akýsi bludný kruh.<sup>2,5,19,22,23</sup> Väzba IL-36 na svoje receptory na endotelových bunkách a fibroblastoch tiež prispieva k angiogenéze a transmigrácii leukocytov do postihnutej kože.<sup>2</sup> Pôsobenie IL-36 je regulované ďalšími dvoma členmi IL-1 rodiny, ktorí sa dokážu viazať na rovnaký receptor IL-36R, a to prirodzeným antagonistom **IL-36Ra** a **IL-38**. Ich väzba na IL-36R vedie k potlačeniu horeuvedených pro-zápalových signalizačných dráh. Bez dostatočného protizápalového pôsobenia IL-36Ra alebo pri poruchách regulácie vnútrobunkových signalizačných dráh sa cytokíny IL-36 vymykajú spod kontroly a ich schopnosť zvyšovať tvorbu zápalových cytokínov sa stáva hlavným mechanizmom zodpovedným za vznik GPP a iných foriem pustulárnej psoriázy.<sup>2</sup>

Významnú úlohu pri vzniku abnormalít v signalizácii sprostredkovanej IL-36 a tak aj pri vzniku pustulárnej psoriázy zohrávajú určité genetické faktory, pričom ich identitu sa čiastočne podarilo odhaliť až v poslednom desaťročí. Nadmerná a nekontrolovaná aktivita IL-36 sa u 21 – 82 % pacientov s familiárnou aj sporadickou GPP spája s tzv. *loss-of-function* mutáciami v géne **IL36RN** pre prirodzeného antagonistu receptora IL-36 (IL-36Ra).<sup>5,6,10,24–28</sup> Ide väčšinou o bodové mutácie, ktoré sa nachádzajú najmä v kódujúcich oblastiach génu a vedú k čiastočnej (hypomorfné mutácie) alebo úplnej (amorfne mutácie) strate tvorby alebo funkcie IL-36Ra. V dôsledku toho



dochádza k nedostatočnej regulácii signalizácie sprostredkovanej IL-36 a následnej zvýšenej tvorbe pro-zápalových cytokínov a chemokínov v keratinocytoch a makrofágoch.<sup>11,24,27</sup> Dedičnosť choroby je autozómovo-recesívna, pričom u väčšiny pacientov sa stretávame s homozygotnými mutáciami (t. j. rovnakými mutáciami na oboch chromozómoch). Za menšiu časť prípadov zodpovedajú tzv. zložené heterozygotné mutácie, kedy postihnutý jedinec má na každom z páru chromozómov inú mutáciu.<sup>29</sup> GPP spôsobenú genetickými defektami *IL36RN* s jasnou monogénovou dedičnosťou označujeme ako syndróm **DITRA (deficiency of interleukin-36 receptor antagonist)**, ktorý podľa najnovšej klasifikácie IUIS zaraďujeme medzi tzv. autozápalové choroby.<sup>30</sup> V niektorých prípadoch sa podarilo identifikovať aj pacientov s mutáciou *IL36RN* len na jednom chromozóme, ale aj zdravých jedincov s homozygotnými či zloženými heterozygotnými mutáciami. To naznačuje, že choroba môže mať aj oligogénový základ (t. j. pacienti budú mať ešte ďalšiu mutáciu v inom géne alebo génoch), prípadne budú k jej vzniku potrebné aj epigenetické a environmentálne faktory.<sup>10,11,27,31</sup> Geneticky podmienená deficiencia IL-36Ra sa spája so významne skorším nástupom GPP (niekedy už v rannom detstve a adolescencii), pričom sa dá pozorovať tzv. efekt dávky, t. j. homozygoti a zlození heterozygoti zväčša vyvíjajú chorobu skôr ako heterozygoti a tí zase skôr ako pacienti bez mutácií v *IL36RN*.<sup>9,10,27</sup> Hoci sa s mutáciami v *IL36RN* najčastejšie stretávame u pacientov s GPP, postupne pribúdajú aj poznatky o ich úlohe pri vzniku lokalizovaných foriem pustulárnej psoriázy, najmä AC.<sup>10,11,27</sup>

U pacientov s GPP sa častejšie ako v bežnej populácii vyskytujú aj heterozygotné mutácie v géne **CARD14**, ktorý kóduje molekulu *caspase recruitment domain-containing protein 14*. CARD14 patrí do rodiny proteínov pôsobiacich ako akési molekulové „lešenia“ potrebné pre zostavovanie cytoplazmových multiproteínových komplexov, ktoré sú súčasťou vnútrobunkových signalizačných kaskád. Komplex vznikajúci za pomoci CARD14 pôsobí v keratinocytoch ako pozitívny regulátor apoptózy a pro-zápalovej signalizácie sprostredkovanej NF-κB.<sup>9</sup> *Gain-of-function* (hypermorfne) mutácie v *CARD14* géne spôsobujú abnormálne zvýšenú aktivitu CARD14 a teda aj nadmernú aktivitu NF-κB v keratinocytoch. Keďže tento transkripčný faktor sa podieľa na expresii viacerých zápalových cytokínov a chemokínov (vrátane TNF, IL-36 a IL-8) ako aj modulácii diferenciácie a proliferácie keratinocytov, geneticky podmienená porucha pôsobenia CARD14 takto vedie k indukcii zápalovej reakcie a ďalších patologických zmien pozorovaných pri GPP.<sup>3,9,29</sup> Deficienciu CARD14 tiež zaraďujeme medzi monogénové autozápalové choroby a označujeme názvom **CAMPS (CARD14-mediated psoriasis)**.<sup>30</sup> Okrem generalizovanej formy choroby sa môžeme s mutáciami v *CARD14* stretnúť aj u niektorých pacientov s PPP a *pityriasis rubra pilaris*, ale aj u zriedkavej formy plakovej psoriázy s autozómovo-dominantnou formou dedičnosti.<sup>11</sup> Tretí gén, pri ktorom sa našli mutácie spájajúce sa so vznikom GPP, AC a PPP, je **AP1S3**. Kóduje adaptorový proteín *AP-1 complex subunit s1C*, ktorý je súčasťou komplexu podieľajúceho sa v keratinocytoch na cytoplazmovom transporte proteínov z Golgiho aparátu do endozómov. *Loss-of-function* mutácie v *AP1S3* vedú k abnormalitám v transporte

vzorkového receptora TLR3, poruchám autofagocytózy a zvýšenej aktivácii NF- $\kappa$ B a transkripcii génu pre IL-36 $\alpha$ .<sup>11,32,33</sup> Nedávne pomerne rozsiahle štúdie ukázali, že celkový vplyv *AP1S3* a *CARD14* mutácií na vznik GPP je v porovnaní s *IL36RN* mutáciami menej významný.<sup>10,27</sup>

### Biologická liečba pustulárnej psoriázy

Liečbu pustulárnych foriem psoriázy sťažujú naše pretrvávajúce medzery v poznatkoch o ich etiológii a imunopatogenéze a najmä nedostatok kvalitných objektívnych údajov týkajúcich sa účinnosti jednotlivých preparátov. Voľba liečebného postupu by mala každopádne reflektovať stupeň závažnosti choroby a prítomnosť prípadných komplikácií. V liečbe akútnej GPP sa ako prípravky prvej línie uplatňujú retinoid acitretín, cyklosporín A, metotrexát a inhibítor TNF infliximab.<sup>7,9,34</sup> Naopak, použitie systémových kortikosteroidov sa z dôvodu rizika exacerbácie choroby pri ich vysadení príliš neodporúča. Ako druholínové liečivá pripadajú do úvahy adalimumab, etanercept a lokálne kortikosteroidy, retinoidy, tacrolimus a PUVA fototerapia.<sup>7,9,34</sup> Liečba GPP v detskom veku sa podobá tej u dospelých pacientov, pričom ako liečivá prvej línie figurujú acitretín, cyklosporín A, metotrexát a etanercept. V druhej línii do úvahy pripadajú adalimumab, infliximab a UVB fototerapia.<sup>7,9</sup> Keďže pri rozvoji choroby zohrávajú centrálnu úlohu narušené mechanizmy prirodzenej imunity s nadmernou aktiváciou zápalovej kaskády, v *off-label* liečbe GPP sa používajú aj ďalšie biologické liečivá pôsobiace proti zápalovým cytokínom IL-1 $\beta$  (anakinra, canakinumab, gevokizumab), IL-6 (tocilizumab), IL-17A/IL-17RA (secukinumab, ixekizumab, brodalumab) a IL-12/23 (ustekinumab).<sup>7,9</sup> Nedávne štúdie, ktoré analyzovali dostupnú literatúru o cielenej biologickej liečbe GPP a vyhodnocovali jej účinnosť ukázali, že biologické preparáty sa môžu skutočne efektívne používať v liečbe GPP v dospelom veku<sup>5</sup> aj u detí s DITRA.<sup>28</sup> Je zaujímavé, že v oboch vekových skupinách sa ako najúčinnnejšie javili monoklonové protilátky anti-IL-12/23 a anti-IL-17, kým naopak inhibítory IL-1 sa ukazovali ako menej efektívne.<sup>5,28</sup> V liečbe impetigo herpetiformis sa najčastejšie používajú systémové kortikosteroidy, cyklosporín A a infliximab spolu s lokálnymi kortikosteroidmi a retinoidom kalcipotriénom. Po pôrode prichádza do úvahy aj UVB a PUVA fototerapia.<sup>7,9</sup>

V liečbe lokálnych foriem pustulárnej psoriázy sú k dispozícii lokálne kortikosteroidy, prípadne kalcipotrién či kalcipotriol, tacrolimus, PUVA fototerapia a fotodynamická liečba. V prípade, ak nedôjde k remisii choroby, treba pristúpiť k systémovej liečbe acitretínom, cyklosporínom, blokátormi TNF alebo ustekinumabom. Ďalšie systémové liečivá potenciálne použiteľné u pacientov s PPP zahŕňajú inhibítory IL-17, IL-6 a IL-1 $\beta$ , kým v prípade AC zase pripadajú do úvahy kortikosteroidy, metotrexát a rôzne typy fototerapie.<sup>7,9</sup>

Vzhľadom na svoju kľúčovú úlohu pri indukcii patologických zmien pri pustulárnej psoriáze sa stali IL-36, resp. ich receptor IL-36R atraktívnymi terčmi pre biologickú liečbu monoklonovými protilátkami.<sup>2</sup> Prvé fázy klinických skúšok s dvoma takýmito preparátmi už priniesli sľubné výsledky. **Spesolimab (BI 655130)** je humanizovaná

monoklonová protilátka proti IL-36R, ktorá sa v klinickej štúdií fázy 1 na overenie konceptu aplikovala intravenózne 7 pacientom s GPP v jedinej dávke 10 mg/kg.<sup>35</sup> Závažnosť choroby (tvorba pustúl, erytému a ošupovanie lézií) sa na začiatku štúdie u každého z pacientov kvantifikovala pomocou tzv. *Generalized Pustular Psoriasis Physician Global Assessment* (GPPGA) skóre v stupnici od 0 do 4, pričom priemerné skóre u pacientov bolo 3 (stredne závažná choroba). Po prvom týždni od podania monoklonovej protilátky dosiahlo skóre 0 alebo 1 (čistá alebo takmer čistá koža) päť pacientov a po 4 týždňoch všetci siedmi. Pacienti sa hodnotili aj pomocou *Generalized Pustular Psoriasis Area and Severity Index* (GPPASI) skóre v stupnici od 0 po 72, pričom do konca prvého týždňa došlo k jeho zlepšeniu v priemere o 59 % a po 4 týždňoch o 80 %. Efekt liečby pretrvával aj po 20 týždňoch, pričom nezávisel od prítomnosti mutácií v *IL36RN*. U žiadneho z pacientov sa neobjavili závažnejšie vedľajšie účinky liečby.<sup>35</sup> Spesolimab sa ako perspektívny preparát pre liečbu GPP momentálne testuje v multicentrickej, dvojito zaslepenej, randomizovanej, placebom kontrolovanej štúdií fázy 2, ktorá vyhodnocuje účinnosť, bezpečnosť a tolerovateľnosť jednorazovej intravenózne dávky liečiva u pacientov s GPP,<sup>36</sup> a v *open-label*, nerandomizovanej štúdií fázy 3 vyhodnocujúcej jeho dlhodobú bezpečnosť a účinnosť pri i.v./s.c. aplikácii každých 6 resp. 12 týždňov.<sup>37</sup> Ďalšou možnou indikáciou pre spesolimab je PPP; momentálne prebieha multicentrická, dvojito zaslepená, randomizovaná, placebom kontrolovaná štúdia fázy 2b, ktorej cieľom je vyhodnotiť účinnosť a bezpečnosť pri rôznych subkutánnych dávkach liečiva.<sup>38</sup> **ANB019** je ďalšia humanizovaná monoklonová protilátka proti IL-36R, ktorej účinnosť a bezpečnosť pri subkutánnej aplikácii každé 4 týždne sa aktuálne testuje v dvoch štúdiách s pacientami s GPP,<sup>39</sup> resp. PPP.<sup>40</sup> Ďalším spôsobom inhibície IL-36 by mohlo byť použitie nízkomolekulových inhibítorov neutrofilových a keratinocytových proteáz (katepsínov S a G, elastázy, proteinázy 3), ktoré sú potrebné na premenu IL-36 na jeho bioaktívne formy. Vo fáze predklinických skúšok sa ako sľubné ukázali viaceré takéto látky, ktoré by perspektívne pripadali do úvahy ako lokálne preparáty pre liečbu lokalizovaných foriem PP či plakovej psoriázy, pri ktorej sú hladiny IL-36 tiež zvýšené a podieľajú sa na rozvoji zápalového procesu.<sup>6,41</sup>

## Záver

Zápalový proces, ktorý sa vymkol spod kontroly, zohráva významnú úlohu pri rozvoji chronickej plakovej psoriázy a je dokonca hlavným patogenetickým mechanizmom pri vzniku pustulárnych foriem choroby. Poznatky o úlohe zápalových cytokínov v tomto procese našli svoje uplatnenie aj v biologickej liečbe týchto zriedkavých podtypov psoriázy, pričom ako najúčinnnejšie sa ukazujú monoklonové protilátky neutralizujúce pôsobenie cytokínov IL-12/IL-23, IL-17A a TNF. Identifikácia IL-36 a geneticky podmienenej deficiencie receptorového antagonistu IL-36Ra ako kľúčových faktorov pri rozvoji pustulárnych foriem psoriázy viedla k vývoju nových biologík a nízkomolekulových preparátov, ktoré by sa v prípade úspešného absolvovania klinických skúšok mohli v nasledujúcich rokoch stať základom novej cielenej liečby pustulárnych foriem psoriázy.

## Literatúra

1. Liang Y, Sarkar MK, Tsoi LC et al. Psoriasis: a mixed autoimmune and autoinflammatory disease. *Curr Opin Immunol* 2017; 49: 1-8. Capon F. IL36RN mutations in generalized pustular psoriasis: just the tip of the iceberg? *J Invest Dermatol* 2013; 133(11): 2503-2504.
2. Madonna S, Girolomoni G, Dinarello CA et al. The Significance of IL-36 Hyperactivation and IL-36R Targeting in Psoriasis. *Int J Mol Sci* 2019; 20(13): pii: E3318.
3. Akiyama M, Takeichi T, McGrath JA et al. Autoinflammatory keratinization diseases: An emerging concept encompassing various inflammatory keratinization disorders of the skin. *J Dermatol Sci* 2018; 90(2): 105-111.
4. Hawkes JE, Chan TC, Krueger JG. Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 140(3): 645-653.
5. Boehner A, Navarini AA, Eyerich K. Generalized pustular psoriasis - a model disease for specific targeted immunotherapy, systematic review. *Exp Dermatol* 2018; 27(10): 1067-1077.
6. Furue K, Yamamura K, Tsuji G et al. Highlighting Interleukin-36 Signalling in Plaque Psoriasis and Pustular Psoriasis. *Acta Derm Venereol* 2018; 98(1): 5-13.
7. Benjegerdes KE, Hyde K, Kivelevitch D et al. Pustular psoriasis: pathophysiology and current treatment perspectives. *Psoriasis (Auckl)* 2016; 6: 131-144.
8. Navarini AA, Burden AD, Capon F et al. European consensus statement on phenotypes of pustular psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2017; 31(11): 1792-1799.
9. Hoegler KM, John AM, Handler MZ et al. Generalized pustular psoriasis: a review and update on treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2018; 32(10): 1645-1651.
10. Twelves S, Mostafa A, Dand N et al. Clinical and genetic differences between pustular psoriasis subtypes. *J Allergy Clin Immunol* 2019; 143(3): 1021-1026.
11. Bachelez H. Pustular psoriasis and related pustular skin diseases. *Br J Dermatol* 2018; 178(3): 614-618.
12. Ly K, Beck KM, Smith MP et al. Diagnosis and screening of patients with generalized pustular psoriasis. *Psoriasis (Auckl)* 2019; 9: 37-42.
13. Popadic S, Nikolic M. Pustular psoriasis in childhood and adolescence: a 20-year single-center experience. *Pediatr Dermatol* 2014; 31(5): 575-579.
14. Sehgal VN, Verma P, Sharma S et al. Acrodermatitis continua of Hallopeau: evolution of treatment options. *Int J Dermatol* 2011; 50(10): 1195-1211.
15. Misiak-Galazka M, Wolska H, Rudnicka L. What do we know about palmoplantar pustulosis? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2017; 31(1): 38-44.
16. Choon SE, Lai NM, Mohammad NA et al. Clinical profile, morbidity, and outcome of adult-onset generalized pustular psoriasis: analysis of 102 cases seen in a tertiary hospital in Johor, Malaysia. *Int J Dermatol* 2014; 53(6): 676-684.
17. Johnston A, Xing X, Wolterink L et al. IL-1 and IL-36 are dominant cytokines in generalized pustular psoriasis. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 140(1): 109-120.

18. Bassoy EY, Towne JE, Gabay C. Regulation and function of interleukin-36 cytokines. *Immunol Rev* 2018; 281(1): 169-178.
19. Walsh PT, Fallon PG. The emergence of the IL-36 cytokine family as novel targets for inflammatory diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2018; 1417(1): 23-34.
20. Dietrich D, Gabay C. Inflammation: IL-36 has proinflammatory effects in skin but not in joints. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10(11): 639-640.
21. Dietrich D, Martin P, Flacher V et al. Interleukin-36 potently stimulates human M2 macrophages, Langerhans cells and keratinocytes to produce pro-inflammatory cytokines. *Cytokine* 2016; 84: 88-98.
22. Kakeda M, Schlapbach C, Danelon G et al. Innate immune cells express IL-17A/F in acute generalized exanthematous pustulosis and generalized pustular psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2014; 306(10): 933-938.
23. Arakawa A, Vollmer S, Besgen P et al. Unopposed IL-36 Activity Promotes Clonal CD4+ T-Cell Responses with IL-17A Production in Generalized Pustular Psoriasis. *J Invest Dermatol* 2018; 138(6): 1338-1347.
24. Marrakchi S, Guigue P, Renshaw BR et al. Interleukin-36-receptor antagonist deficiency and generalized pustular psoriasis. *N Engl J Med* 2011; 365(7): 620-628.
25. Onoufriadis A, Simpson MA, Pink AE et al. Mutations in IL36RN/IL1F5 are associated with the severe episodic inflammatory skin disease known as generalized pustular psoriasis. *Am J Hum Genet* 2011; 89(3): 432-437.
26. Hussain S, Berki DM, Choon SE et al. IL36RN mutations define a severe autoinflammatory phenotype of generalized pustular psoriasis. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135(4): 1067-1070.e9.
27. Mössner R, Wilsmann-Theis D, Oji V et al. The genetic basis for most patients with pustular skin disease remains elusive. *Br J Dermatol* 2018; 178(3): 740-748.
28. Hospach T, Glowatzki F, Blankenburg F et al. Scoping review of biological treatment of deficiency of interleukin-36 receptor antagonist (DITRA) in children and adolescents. *Pediatr Rheumatol Online J* 2019; 17(1): 37.
29. Sugiura K. The genetic background of generalized pustular psoriasis: IL36RN mutations and CARD14 gain-of-function variants. *J Dermatol Sci* 2014; 74(3): 187-192.
30. Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol* 2018; 38(1): 96-128.
31. Capon F. IL36RN mutations in generalized pustular psoriasis: just the tip of the iceberg? *J Invest Dermatol* 2013; 133(11): 2503-2504.
32. Setta-Kaffetzi N, Simpson MA, Navarini AA et al. AP1S3 mutations are associated with pustular psoriasis and impaired Toll-like receptor 3 trafficking. *Am J Hum Genet* 2014; 94(5): 790-797.
33. Mahil SK, Twelves S, Farkas K et al. AP1S3 Mutations Cause Skin Autoinflammation by Disrupting Keratinocyte Autophagy and Up-Regulating IL-36 Production. *J Invest Dermatol* 2016; 136(11): 2251-2259.

34. Robinson A, Van Voorhees AS, Hsu S et al. Treatment of pustular psoriasis: from the Medical Board of the National Psoriasis Foundation. *J Am Acad Dermatol* 2012; 67(2): 279-288.
35. Bachelez H, Choon SE, Marrakchi S et al. Inhibition of the Interleukin-36 Pathway for the Treatment of Generalized Pustular Psoriasis. *N Engl J Med*. 2019; 380(10): 981-983.
36. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03782792>
37. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03886246>
38. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04015518>
39. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03619902>
40. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03633396>
41. Sullivan GP, Henry CM, Clancy DM et al. Suppressing IL-36-driven inflammation using peptide pseudosubstrates for neutrophil proteases. *Cell Death Dis* 2018; 9(3): 378.

Adresa:

MUDr. Juraj Javor, PhD.

Imunologický ústav LFUK

Odborárske nám 14

813 72 Bratislava

Mail: [juraj.javor@fmed.uniba.sk](mailto:juraj.javor@fmed.uniba.sk)

## BIOLOGICKÁ LIEČBA SYSTÉMOVÉHO LUPUS ERYTHEMATOSUS

Klučková Kristína  
Imunologický ústav LF UK, Bratislava

### Abstrakt

Systémový *lupus erythematosus* (SLE) je chronická autoimunitná choroba, charakterizovaná dysreguláciou imunity a stratou tolerancie k autoantigénom. Doterajšia liečba viedla k výraznému zlepšeniu prežívania pacientov aj k zlepšeniu kvality života, avšak používanie liekov je spojené s vysokou toxicitou a množstvom nežiaducich účinkov. Je snaha o používanie liečiv, ktoré majú selektívny mechanizmus účinku. Článok prináša prehľad doteraz ukončených a vyhodnotených štúdií s rôznymi biologickými liečivami, ktoré ovplyvňujú patofyziológiu choroby. Jediným schváleným biologickým liekom je od r. 1955 belimumab. Zdá sa, že niektoré biologiká sú účinné u úzkej skupiny pacientov s presne definovanými klinickými a imunologickými kritériami. Počet klinických štúdií na liečbu SLE sa zvyšuje a tým rastie predpoklad, že výskum autoimunitných chorôb nakoniec povedie k efektívnej liečbe SLE.

**Kľúčové slová:** autoprotílátky, B-lymfocyty, belimumab, systémový *lupus erythematosus*

### Summary

Systemic *lupus erythematosus* (SLE) is a chronic autoimmune disease, which is characterized by immune dysregulation and the loss of tolerance to autoantigens. Advances in treatment over the last decades, have improved life expectancy of SLE sufferers. Unfortunately, in many cases effective management of SLE is still related to severe drug-induced toxicity and adverse events. There is a need for implementation of drugs with a better and selective mode of action. This article reviews the current biological therapies being tested in the treatment of SLE. A range of different biologic agents have been proposed and subjected to clinical trials. Belimumab is the only targeted therapy approved for the treatment of SLE since 1955. To the best of the current knowledge, some biotherapies can at most be used in narrow subsets of patients in terms of clinical and immunological features. There has been a significant increase in the number of clinical trials conducted using innovative methods of treatment in patients with SLE in recent years. It remains to be hoped that the extremely dynamic development of research in autoimmune diseases will finally allow an effective treatment of SLE.

**Key words:** systemic *lupus erythematosus*, autoantibodies, biological treatment, B-lymphocytes

## 1. Úvod

Systémový lupus erythematosus (SLE) je chronická autoimunitná choroba, charakterizovaná produkciou viacerých autoprotílátok, depozíciou imunokomplexov a poškodením orgánov ako sú obličky, koža, srdce, pľúca, CNS, kĺby a aj bunky hematopoézy. Poškodenie je spôsobené dysreguláciou imunity a stratou tolerancie k telu vlastným antigénom. Terajšie liečebné režimy viedli k zlepšeniu prežívania pacientov so SLE, ale ich používanie je spojené s vysokou toxicitou a množstvom nežiaducich účinkov. Výskum v oblasti SLE vedie k lepšiemu pochopeniu patofyziológie vzniku tejto choroby a tým k zavádzaniu nových cielených liekov. Je snaha o používanie liečiv, ktoré majú selektívny mechanizmus účinku, a tým menej nežiaducich účinkov.

## 2. Biologické liečivá ovplyvňujúce B-lymfocyty

Zvýšená aktivita B-lymfocytov sa dokázala tak na zvieracích modeloch ako aj u ľudí (1, 2). SLE je charakterizovaný abnormálnou aktiváciou a diferenciaciou B-buniek, takže je znížená eliminácia autoreaktívnych B-lymfocytov (3). Táto zvýšená aktivácia vedie k polyklonovej hypergamaglobulinémii a produkcii autoprotílátok, ktoré pôsobia proti nerozpustným (históny, natívna DNA) aj solubilným nukleárnym antigénom. Úloha B-lymfocytov pri SLE nie je len produkcia autoprotílátok, ale aj ich schopnosť prezentovať autoantigény T-lymfocytom cez B-bunkové receptory a sekréciu cytokínov, takže je dôležitý ich vplyv na aktivitu dendritových buniek (4, 5).

Proteín BlyS (stimulátor B-lymfocytov), tiež nazývaný BAFF (B cell-activating factor) patrí do superrodiny ligandov TNF (faktor nekrotizujúci nádory) (6, 7). Je to solubilný membránový proteín, ktorý produkujú monocyty, neutrofilny, T-lymfocyty aj dendritové bunky (8). BlyS sa viaže len na receptory na povrchu B-buniek. Doteraz sa opísali 3 typy receptorov pre BlyS: BR3 (BlyS receptor 3), TACI (transmembrane activator-1 and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor) a BCMA (B cell maturation antigen). Na BR3 sa viaže len BlyS, na TACI a BCMA sa môžu tiež viazať APRIL (a proliferation-inducing ligand). BlyS má dôležitú úlohu v diferenciacii, aktivácii a prežívaní B-lymfocytov (9). Zvýšená koncentrácia BlyS ovplyvňuje prežívanie B-lymfocytov, ktoré produkujú autoprotílátky, inhibíciou ich apoptózy (10). Cielená liečba blokujúca BlyS znižuje počet CD20<sup>+</sup> lymfocytov a krátkožijúcich plazmatických buniek aj titer anti-dsDNA protílátok v sérach od pacientov so SLE. Táto liečba neovplyvňuje počet dlhožijúcich plazmatických buniek ani pamäťových buniek (11). Objasnenie dôležitej úlohy tejto molekuly v patogenéze SLE viedlo k vývoju liečiv zameraných na blokovanie BlyS, ich účinok sa zdá sľubný aj v klinických štúdiách.

**Belimumab** je prvý a jediný liek, ktorý bol registrovaný v liečbe SLE, od roku 1955 (12). Belimumab v intravenózne forme, podávaný v dávke 10 mg/kg v dňoch 0, 14 a 28 a potom každých 28 dní bol schválený organizáciami FDA (Food and Drug Administration) a EMA (European Medicines Agency) (13, 14). Belimumab je indikovaný u dospelých so séropozitívnym SLE, s aktívnym kožným a kĺbovým postihnutím, ktorí



neodpovedajú na štandardnú liečbu; vylúčení sú pacienti s lupusovou nefritídou (LN) a postihnutím centrálnej nervovej sústavy (CNS) (15).

Belimumab je ľudská IgG1 $\lambda$  monoklonová protilátka schopná viazať solubilný BlyS receptor a tým bráni prežívaniu B-lymfocytov. Tiež blokuje ich diferenciáciu na plazmatické bunky, ktoré produkujú protilátky. BAFF blokujúca liečba belimumabom dosiahla primárny koncový bod v dvoch klinických štúdiách fázy III na viac ako 1 600 pacientoch (16, 17). Aj *post hoc* analýzy preukázali signifikantný benefit pri liečbe belimumabom, najmä u pacientov s aktívnejšou chorobou, liečených vyššími dávkami kortikosteroidov, pri prítomnosti anti-dsDNA protilátok a nízkych koncentráciách C3 a C4 zložiek komplementu (18). Už predchádzajúce štúdie fázy I a II ukázali sľubné výsledky. Vo fáze II bolo zahrnutých 449 pacientov, ktorí dostávali liek v dávke 1, 4 a 10 mg/kg versus placebo; obe skupiny pridaním k štandardnej liečbe v dňoch 0, 14 a 28 a následne každých 28 dní po dobu 52 týždňov. Skupina pacientov so sérologicky aktívnou chorobou, t. j. potvrdenými antinukleárnymi alebo anti-dsDNA protilátkami, bola analyzovaná zvlášť, týchto pacientov bolo 71,5 %. U týchto pacientov bol dokázaný štatisticky významný pokles SELENA-SLEDAI (Safety of Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment-Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) skóre, zníženie PGA (Physician Global Assessment) skóre a zlepšenie kvality života. V štúdiu tiež potvrdili depléciu CD20<sup>+</sup> buniek o 60 – 70 % a zníženie počtu naivných a aktivovaných B-lymfocytov a plazmacytoïdných dendritových buniek. Štúdia tiež preukázala zníženie titra anti-dsDNA protilátok o 29 % a zníženie hladiny celkových protilátok. Počet nežiaducich vedľajších účinkov, vrátane závažných, bol podobný v skupine dostávajúcej aj liek aj placebo (19).

Fázy III klinických štúdií (BLISS-52 a BLISS-76) sú založené na podobnom protokole podávania, ale štúdie prebehli v rôznych geografických oblastiach. Pacienti so séropozitívnym SLE boli randomizovaní do 3 skupín: placebo, skupina dostávajúca belimumab v dávke 1 mg/kg, alebo v dávke 10 mg/kg. Liek dostávali v dňoch 0, 14 a 28 a následne každých 28 dní. Štúdie dosiahli svoj primárny koncový bod, t. j. percento pacientov, ktorí dosiahli SRI-4 (Systemic Lupus Erythematosus Responder Index 4) bolo signifikantne vyššie v skupine dostávajúcej belimumab v dávke 10 mg/kg versus placebo (58% vs. 44 % v štúdiu BLISS-52 a 43 % vs. 34 % v BLISS-76). Signifikantne vyššie percento pacientov liečených belimumabom vykazovalo zlepšenie muskuloskeletálnych a mukokutánnych symptómov (20). Belimumab takisto preukázal zlepšenie imunitných ukazovateľov choroby ako redukciu koncentrácie imunoglobulínov, zvýšenie zložiek komplementu, zníženie tvorby autoprotilátok aj zlepšenie kvality života a zníženie únavy (21). V štúdiu „BLISS-52 study“ bolo možné znížovanie dávky kortikosteroidov o 50 % u signifikantne vyššieho percenta pacientov pri liečbe belimumabom v dávke 10 mg/kg. Tento efekt ale nepotvrdila štúdia BLISS-76. Navyše ďalšia štúdia s belimumabom preukázala, že jeho podávanie subkutánne v dávke 200 mg každých 7 dní v kombinácii so štandardnou liečbou u pacientov, ktorí mali SELENA-SLEDAI skóre  $\geq 8$  spôsobilo SRI-4 odpoveď v 52. týždni signifikantne vyššiu v skupine s liečivom

v porovnaní s placebom (65 % a 47 %). Pacienti liečení belimumabom mali o 62 % nižšie riziko exacerbácie v porovnaní s placebom. Oba režimy, t. j. belimumab podávaný intravenózne aj subkutánne v kombinácii so štandardnými liečebnými režimami, boli účinné v liečbe aktívneho SLE a neboli spojené s výskytom závažných nežiaducich reakcií (22). Napriek pomerne vysokej cene liečby, farmakoekonomické štúdie vykonané v Grécku, Španielsku a Taliansku preukázali, že liečba je finančne výhodná. Štandardy schválené panelom európskych expertov a publikované r. 2017 odporúčajú použitie belimumabu v liečbe rezistentného a na terapii kortikoidmi závislého SLE, ak nie je prítomné renálne alebo CNS postihnutie alebo závažná autoimunitná trombocytopenia (23). Častou indikáciou na pridanie belimumabu je aj progresia a pretrvávanie pozitívity imunitných markerov choroby. Experti odporúčajú, aby bol účinok belimumabu revidovaný najskôr po 16 týždňoch liečby. Ak nie je prítomný efekt liečby po 6 mesiacoch podávania, je to indikácia na ukončenie liečby (23).

**Tabalumab** je plne humanizovaná IgG4 monoklonová protilátka, ktorá neutralizuje solubilnú aj membránovo-viazanú formu BAFF, ale neviaže sa na APRIL (24). Táto biologická látka bola skúmaná vo fáze III randomizovanej dvojito zaslepanej placebo-kontrolovanej štúdií v trvaní 52 týždňov u pacientov s aktívnym SLE, neboli zaradení pacienti so závažným renálnym a neuropsychickým postihnutím. Prvá štúdia (ILLUMINATE-1) zaradila 1 164 pacientov s miernou až ťažkou formou SLE (SELENA-SLEDAI skóre  $\geq 6$  bodov). V 52-týždni, percento pacientov, ktorí dosiahli primárny koncový bod, teda SRI-5, nebolo signifikantne vyššie u skupiny dostávajúcej liek vs. placebo. Sekundárne koncové body tiež neboli dosiahnuté. Napriek tomu mal tabalumab výrazný vplyv na imunitné parametre aktivity choroby; zníženie anti-dsDNA protilátok, zvýšenie C3 a C4 zložiek komplementu, zníženie absolútneho počtu B-lymfocytov, koncentrácie imunoglobulínov (Ig) a BAFF proteínu. Frekvencia vedľajších účinkov a mortalita sa nelíšila v podskupinách dostávajúcich liek a placebo (25, 26).

Druhá štúdia (ILLUMINATE-2) zaradila 1 124 pacientov s aktívnym SLE. Primárny koncový bod (dosiahnutie SRI-5) sa dosiahol v 52. týždni v podskupine dostávajúcej 120 mg každé 2 týždne (38 % vs. 28 % v skupine liečiva resp. placebo;  $p = 0,002$ ). Žiadny sekundárny koncový bod splnený nebol. V *post hoc* analýzach, kde hodnotili odpoveď na liečbu podobnými kritériami ako vo fáze III štúdie s belimumabom (napr. SRI-4 namiesto SRI-5), štatisticky signifikantne lepšie obstála skupina liečená tabalumabom v porovnaní s placebom (26). Ďalšie štúdie s tabalumabom sa doteraz neuskutočnili.

**Blisibimod** je proteín zložený zo štyroch domén viažucich BAFF, na ktoré je pripojený N-terminálny Fc-fragment ľudského IgG1. Táto látka je teda BAFF inhibítor; podáva sa subkutánne. V dvojito zaslepanej placebo-kontrolovanej štúdií (PEARL-SC), randomizovali 547 pacientov so sérologicky aktívnym SLE, SELENA-SLEDAI skóre  $\geq 6$  bodov do 3 skupín s rôznym dávkovaním lieku. V 24. týždni, pacienti s najvyššími dávkami lieku mali signifikantne vyššiu SRI-5 odpoveď ako pri podávaní placebo. Blisibimod taktiež zlepšil hladiny biomarkerov choroby: zníženie anti-dsDNA protilátok,

zvýšenie C3 a C4 zložiek a zníženie počtov B-buniek. Liek navyše pacienti dobre tolerovali v každej dávke (27).

Ďalšia multicentrická randomizovaná placebo-kontrolovaná štúdia (CHABLIS-SC1) však nespĺnila primárne ani sekundárne koncové body. Pokračovaním bola štúdia CHABLIS7.5 (alebo CHABLIS-SC2), ale tá bola predčasne ukončená (28).

**Atacicept** (TACI-Ig) je plne humanizovaný proteín, ktorý neutralizuje BAFF aj APRIL. Je to inhibítor solubilnej aj membránovo-viazanej formy BAFF. Placebom kontrolovaná štúdia fázy Ib u pacientov so SLE ukázala biologickú účinnosť lieku, potvrdenú znížením počtu B-buniek a znížením hladiny imunoglobulínov (29). Následne prebehla 52 týždňov trvajúca štúdia II/III (podávanie 150 mg s.c. dvakrát týždenne počas 4 týždňov, následne jedenkrát týždenne), dvojito-zaslepená, randomizovaná, placebo-kontrolovaná, u pacientov s aktívnou lupusovou nefritídou, ktorí dostávali zároveň vysoké dávky kortikosteroidov a mykofenolátmofetilu (MMF). Štúdiu museli však predčasne ukončiť, pretože došlo k závažnému poklesu hladín IgG a výskytu vážnych infekcií (30).

Ďalšia dvojito zaslepená randomizovaná štúdia s ataciceptom fázy II/III sa robila na 461 pacientoch. Primárny koncový bod ale nebol dosiahnutý, navyše pri vyššom dávkovaní ataciceptu došlo k závažným nežiaducim účinkom (31). Oproti tomu, 24 týždňová placebo kontrolovaná fáza IIb štúdie ADDRESS II, u pacientov s aktívnym SLE (SLEDAI-2K skóre  $\geq 6$  bodov) nepotvrdila vyšší výskyt závažných nežiaducich účinkov pri oboch dávkach ataciceptu ani v porovnaní s placebom. Percento odpovedí na liečbu vyjadrené ako SRI-4 bolo vyššie v skupine s liečivom v porovnaní s placebom. Zaujímavé bolo, že pacienti s vyššou aktivitou choroby pri začiatku liečby (SLEDAI-2K skóre  $\geq 10$  bodov) neprofitovali z tejto liečby (32).

*Post hoc* analýzy potvrdili vzťah medzi dávkou lieku a redukciou koncentrácie imunoglobulínov a frekvenciou exacerbácií SLE. Potvrdila sa aj vstupná hypotéza, že pacienti so zvýšeným BlyS a APRIL odpovedali na liečbu lepšie, čo bolo dokumentované znížením frekvencie vzplanutí choroby (33).

### 3. Biologické liečivá navodzujúce imunitnú toleranciu (tolerogény)

**Abetimus** (abetimus sodium alebo LJP-394) je syntetická látka, ktorú tvoria molekuly podobné deoxynukleotidom. Táto látka pripomína telu vlastné imunokomplexy obsahujúce dsDNA. Má schopnosť viazať sa na antigénový receptor v membránach B-lymfocytov. To ovplyvňuje intracelulárnu transmisiu signálu a spôsobí anergiu alebo apoptózu týchto buniek. Ďalej sa navodí B-bunková tolerancia na vlastné antigény, ktoré pochádzajú z natívnej DNA – preto sa liečba nazýva tolerogénna. Účinok abetimu na zníženie anti-dsDNA protilátok pretrváva dlho po podaní, aj keď už nie je prítomný v cirkulácii (34).

Efekt lieku dokázala randomizovaná dvojito zaslepená placebo-kontrolovaná

štúdia fázy II/III u pacientov s lupusovou nefritídou, ale fáza III u pacientov s anti-dsDNA protilátkami efekt lieku nepotvrdila (35). Napriek tomu, tento liek znižuje koncentrácie anti-dsDNA protilátok, zvyšuje C3 zložku komplementu a je dobre tolerovaný. Nasledovala ďalšia dvojito-zaslepená randomizovaná placebom-kontrolovaná štúdia ASPEN, kde sa použili vyššie dávky lieku u pacientov s vysokým rizikom vzplanutia lupusovej nefritídy. Bola však predčasne ukončená, pretože predbežné výsledky nepreukázali benefit používania tejto molekuly (36).

#### **4. Biologické liečivá cielene pôsobiace na povrchové antigény B-lymfocytov**

**Rituximab (RTX)** je chimérová monoklonová protilátka, ktorá sa viaže selektívne na CD20 transmembránový antigén prítomný na povrchu B-lymfocytov (od pre-B buniek až po pamäťové B-lymfocyty). To vedie k zastaveniu bunkového cyklu a k apoptóze. Dôsledkom toho je zníženie produkcie patologických autoprotilátok: anti-dsDNA a antinukleozómych. Dochádza k deplícii zrelých B-lymfocytov, ale nie plazmatických buniek. Opakované podanie RTX môže spôsobiť hypogamaglobulinémiu (37).

Prvé sľubné výsledky o účinnosti RTX pri SLE prišli v roku 2002. V nasledujúcich štúdiách sa jeho efekt preukázal u pacientov so SLE a lupusovou nefritídou, s kĺbovými a mukokutánnymi symptómami, serozitídou, cytopéniami a pri postihnutí CNS. Dve veľké štúdie u pacientov bez renálneho SLE (EXPLORER, fáza II/III) a s renálnym SLE (LUNAR, fáza III) nepreukázali ich najdôležitejšie primárne koncové body (38,39). Výsledky týchto štúdií nepreukázali signifikantný benefit používania rituximabu v liečbe SLE, napriek tomu sa stále používa pri „off-label“ indikácii na potlačenie symptómov rezistentných na liečbu (napr. lupusová nefritída). U pacientov s lupusovou nefritídou sa často podáva v kombinácii s inými imunosupresívami, ako je cyklofosamid, MMF, azatioprin alebo metotrexát (40). Dáta z French AutoImmunity and Rituximab registry, kde bolo hodnotených 136 pacientov liečených RTX ukázali odpoveď u 71 % pacientov pri hodnotení SELENA-SLEDAI skóre; kĺbové, mukokutánne, renálne a hematologické zlepšenie bolo zaznamenané u 72 %, 70 %, 74 % a 88 % pacientov (respectively sa používa v angličtine). Zaujímavé je, že monoterapia RTX sa vo výsledku významne nelíšila od kombinácie s inými imunosupresívami (41).

Štúdia na pediatrickej populácii preukázala účinnosť RTX bez súčasného denného podávania kortikoidov u pacientov s lupusovou nefritídou (42).

Deplécia B-lymfocytov po anti-CD20 terapii je individuálna. Fenomén horšej odpovede sa vyskytuje u pacientov, u ktorých dochádza k rýchlej obnove populácie pamäťových buniek a plazmablastov. Vyššia vstupná hladina BLYS a objavenie sa RTX-neutralizujúcich protilátok sú spojené s horšou klinickou odpoveďou. Vzhľadom na to, že sa pomerne často vyskytuje zvýšenie hladiny BLYS po terapii RTX, v roku 2018 začala štúdia, kde sa po začiatkovej liečbe RTX + cyklofosamid aplikuje aj belimumab, prebieha u pacientov s lupusovou nefritídou (štúdia CALIBRATE) (43).

RTX ako chimérová protilátka môže spôsobovať hypersenzitívne reakcie, ktoré sa vyskytnú u 10 – 15 % liečených pacientov. Ďalšia podstatná komplikácia po podávaní RTX je objavenie sa antichimérových protilátok (HACAs), avšak ich presný klinický význam nie je ešte objasnený (44).

**Ocrelizumab** je plne humanizovaná anti-CD20 monoklonová protilátka, ktorá má menšiu imunogénnosť a lepšiu tolerabilitu. Dve klinické štúdie fázy III boli ukončené. Štúdia BEGIN zahŕňala pacientov bez renálneho postihnutia a bola predčasne ukončená kvôli nízkej odpovedi na liečbu. Štúdia BELONG zahrnula aj pacientov s renálnym postihnutím. Tiež bola ukončená skoro, vzhľadom na výskyt závažných infekcií. Štúdia nepreukázala ani signifikantné zlepšenie renálneho nálezu u skupiny dostávajúcej ocrelizumab (45, 46).

**Ofatumumab** je plne humánna IgG1 $\kappa$  monoklonová protilátka, ktorá viaže jedinečný epitop na CD20 molekule. Ofatumumab bol často používaný v *off-label* indikácii pri SLE, najmä u pacientov s hypersenzitivitou na RTX (47). Štúdie s týmto liekom zatiaľ neprebehli.

**Obinutuzumab** je nová plne humanizovaná IgG1 monoklonová protilátka proti CD20, ktorá sa používa pri liečbe chronickej lymfocytárnej leukémie. Práve prebieha fáza II klinickej štúdie, kde sú zaradení pacienti s lupusovou nefritídou (48).

**Epratuzumab** je humanizovaná anti-CD22 monoklonová protilátka. Prebehli štúdie až po fázu III, ale primárne ani sekundárne koncové body sa nedosiahli, a preto sa epratuzumab v liečbe SLE už nepoužíva (49).

## 5. Biologické liečivá blokujúce interferón

Interferóny typu I hrajú v patogeneze SLE veľmi dôležitú úlohu. Po väzbe na svoj receptor IFNAR (type I IFN- $\alpha/\beta/\omega$  receptor), vzniknuté signály indukujú transkripciu početných génov. Blokáda IFNAR môže takto utlmiť patologicky prebiehajúcu imunitnú odpoveď (50). IFN- $\alpha$  *produkovaný plazmacytoidnými dendritovými bunkami je dôležitý v patogeneze SLE. Jeho produkciu indukujú imunokomplexy, ktoré pozostávajú z DNA/RNA-obsahujúcich autoantigénov, tie sú prostredníctvom Fc $\gamma$ R internalizované, čo následne spustí sa aktiváciu TLR-7 (Toll-like receptor) a TLR-9. IFN- $\alpha$  spúšťa tvorbu dendritových buniek, aktiváciu T-lymfocytov a produkciu autoprotilátok B-lymfocytmi. Zvýšené hladiny IFN- $\alpha$  a od neho závislých cytokínov, a tiež expresia IFN-regulovaných génov korelujú so sérologickou aktivitou choroby, ako napr. s hladinou anti-dsDNA autoprotilátok, zložkami komplementu a hladinou IL-10 (51).*

**Rontalizumab** je humánna monoklonová IgG1 protilátka, ktorá neutralizuje všetky známe subtypy IFN- $\alpha$ , ale neviaže sa na IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\epsilon$  ani IFN- $\kappa$ . Prebehli štúdie po fázu II, ale nepreukázala sa terapeuticky vyššia účinnosť v porovnaní s placebom (52).

**Sifalimumab** je plne humanizovaná IgG1 $\kappa$  monoklonová protilátka, ktorá viaže a neutralizuje všetkých 13 známych podtypov IFN- $\alpha$ . Fáza II klinickej štúdie potvrdila

účinnosť lieku na 431 pacientoch. Hodnotená bola po 52 týždňoch percentuálne ako zlepšenie SRI-4, pričom bola signifikantne lepšia odpoveď v skupine, kde bol podávaný liek oproti placebo (59.8% vs. 45.4%;  $p = 0,03$ ). Zaujímavé je, že štúdia nepotvrdila vplyv lieku na imunitné markery choroby (53). Napriek týmto výsledkom, sa vo vývoji tohto lieku ďalej nepokračuje.

**Anifrolumab** je plne humanizovaná IgG1 $\kappa$  monoklonová protilátka, ktorá blokuje účinok IFN typu I. Štúdia fázy IIb zahŕňala pacientov bez renálneho postihnutia. Dosiahla primárne aj sekundárne koncové body, hodnotila sa SRI-4 odpoveď a signifikantne lepšie boli výsledky v skupine dostávajúcej liek (34.3 % vs. 17.6 %;  $p = 0,01$ ) (54). Liek pacienti dobre tolerujú; plánujú sa ďalšie štúdie fázy II a III.

## 6. Biologické liečivá ovplyvňujúce cytokíny a komplement

Úloha TNF pri SLE je kontroverzná. Na jednej strane boli nájdené zvýšené hladiny tohto cytokínu v sére a renálnej biopsii pri aktívnej chorobe, na druhej strane pri podávaní

TNF-antagonistov môžu vznikať okrem antinukleárných protilátok a aj iné prejavy choroby (55). Z uvedených dôvodov sa anti TNF-biologiká v liečbe SLE neodporúčajú.

**Tocilizumab** je humanizovaná IgG1 monoklonová protilátka, ktorá viaže solubilné aj membránovo-viazané receptory pre IL-6. Predpokladá sa, že IL-6 môže byť pri SLE hlavnou stimulačnou látkou pre B-lymfocyty, vedúcou k produkcii autoprotílátok. Zvýšené hladiny tohto cytokínu v sére od pacientov, pri renálnej a kožnej biopsii korelovali s aktivitou choroby a titrom anti-dsDNA protilátok (56). Zatiaľ prebehla fáza I klinickej štúdie a potvrdená bola účinnosť lieku (57).

**Sirukumab** sa priamo viaže na IL-6. Štúdie prebehli po fázu II, ale nepreukázali bezpečnosť a účinnosť lieku, pretože až 48 % pacientov malo nežiaduce účinky (58).

**Interleukín 2** má dôležitú úlohu v aktivácii a stimulácii proliferácie T-lymfocytov. U pacientov s SLE sú hladiny tohto cytokínu znížené. V malej štúdií na 38 pacientoch bol preukázaný efekt malých dávok podávaného IL-2. Tieto výsledky sa musia potvrdiť ďalšími štúdiami.

V patogenéze SLE hrá nemalú úlohu aj komplement, najmä jeho zložky, ktoré sú zodpovedné za odstraňovanie imunokomplexov. Jeho aktivácia je spojená so vzplanutím choroby a priamo zodpovedá za tkanivové poškodenie najmä pri lupusovej nefritíde. **Eculizumab** je humanizovaná monoklonová protilátka, ktorá sa viaže na C5 zložku komplementu, a tým bráni jej štiepeniu na C5a a C5b a ďalšej tvorbe komplexu C5b-9. Takže táto molekula bráni aj konzumpcii zložiek C1 – C4. Eculizumab je registrovaný v liečbe paroxyzmálnej nočnej hemoglobínúrie a hemolyticko-uremického syndrómu. Sľubné výsledky na zvieracích modeloch viedli k fáze I štúdie SLE-pacientov, ale blokáda komplementu sa zaznamenala len pri vyšších dávkach lieku a len prvé dni liečby (59).

## 7. Biologické liečivá blokujúce kostimulačné molekuly

**Ruplizumab** je humanizovaná monoklonová protilátka proti ligandu CD40 (CD40L), ktorá svojou väzbou bráni aktivácii T-lymfocytov a od nej závislú aktiváciu B-lymfocytov. Klinická štúdia u pacientov s lupusovou nefritídou bola predčasne ukončená, vzhľadom na závažné nežiaduce účinky (60).

**Dapirolizumab** je nová anti-CD40L protilátka, ktorá obsahuje pegylovaný Fab-fragment a neobsahuje Fc časť. Fáza I klinickej štúdie preukázala účinnosť lieku bez vážnych nežiaducich účinkov (61). Momentálne prebieha zaradovanie pacientov do fázy II štúdie.

**Abatacept** (CTLA4-Ig) je rekombinantný proteín, ktorý obsahuje extracelulárnu doménu ľudského CTLA-4 (T-lymphocyte-associated antigen 4) a modifikovaný Fc-fragment ľudského IgG1. Abatacept má schopnosť viazať sa a blokovať CD80 alebo CD86 s vyššou afinitou ako CD28 a tým selektívne blokuje kľúčový kostimulačný signál potrebný na aktiváciu CD28<sup>+</sup> T-buniek. Štúdie na zvieratách so SLE ukázali pomalší rozvoj autoimunitných procesov a zníženie mortality tým, že liek znižuje množstvo autoreaktívnych B-lymfocytov, redukuje tvorbu autoprotilátok a znižuje závažnosť lupusovej nefritídy (62).

V randomizovanej dvojito-zaslepanej placebom-kontrolovannej štúdií fázy II nebol dosiahnutý primárny ani sekundárny koncový bod; tiež bol vyšší výskyt závažných nežiaducich účinkov (63). V ďalšej multicentrickej štúdií fázy II/III bol efekt skúmaný u pacientov s lupusovou nefritídou. Pri hodnotení v 52. týždni liečby sa primárny koncový bod štúdie tiež nedosiahol (64).

Ako prospešná sa zdá kombinácia abataceptu a cyklofosfamidu. Prebehla fáza II randomizovanej, dvojito-zaslepanej placebom-kontrolovannej štúdie u 134 pacientov s lupusovou nefritídou (ACCESS). Výsledky štúdie nespĺnili primárny ani sekundárny koncový bod, ale asi polovica pacientov, ktorí dosiahli kompletnú renálnu remisiu nepotrebovala ďalšie imunosupresívne lieky v týždni 24 a odpoveď pretrvávala aj v 52. týždni. Pacienti liečbu dobre tolerovali (65). Prebieha fáza III randomizovanej, dvojito-zaslepanej, placebom-kontrolovannej štúdie (66).

## 8. Súhrn

Výsledky doterajších štúdií nie sú veľmi povzbudivé. Jediným schváleným biologickým liekom je doteraz belimumab. Zdá sa, že niektoré biologiká sú účinné u úzkej skupiny pacientov s presne definovanými klinickými a imunitnými kritériami.

SLE je choroba s vážnou prognózou a často život ohrozujúcimi komplikáciami. Preto je zaradenie pacientov s ťažkým priebehom často komplikované. Uprednostňovaní sú pacienti s ľahším priebehom choroby. Ďalším problémom zaradenia do štúdií je heterogénnosť klinických príznakov, je takmer nemožné vytvoriť homogénne skupiny pacientov.

Tiež existuje niekoľko hodnotiacich systémov na aktivitu choroby a tým na liečebnú odpoveď. Je potrebné zjednotenie, aby bolo možné jasne vyhodnotiť výsledky štúdií.

Napriek týmto prekážkam treba konštatovať, že počet klinických štúdií na liečbu SLE sa zvyšuje a tým rastie predpoklad, že bazálny výskum autoimunitných chorôb nakoniec povedie k efektívnej liečbe SLE.

## 9. Literatúra

1. Izui S., McConahey P. J., Dixon F. J. Increased spontaneous polyclonal activation of B lymphocytes in mice with spontaneous autoimmune disease. *J Immunol.* 1978;121(6):2213–2219.
2. Klinman D. M., Steinberg A. D. Systemic autoimmune disease arises from polyclonal B cell activation. *J Exp Med.* 1987;165(6):1755–1760. doi: 10.1084/jem.165.6.1755.
3. Davidson A., Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med.* 2001;345(5):340–350.
4. Mok C. C., Lau C. S. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol.* 2003;56(7):481–490. doi: 10.1136/jcp.56.7.481.
5. Ganguly D., Haak S., Sisirak V., Reizis B. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(8):566–577. doi: 10.1038/nri3477.
6. Baker K. P., Edwards B. M., Main S. H., et al. Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator. *Arthritis & Rheumatology.* 2003;48:3253–3265.
7. Schneider P., MacKay F., Steiner V., et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med.* 1999;189:1747–1756.
8. Nardelli B., Belvedere O., Roschke V., et al. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood.* 2001;97(1):198–204. doi: 10.1182/blood.v97.1.198.
9. Do R. K., Hatada E., Lee H., et al. Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. *J Exp Med.* 2000;192(7):953–964. doi: 10.1084/jem.192.7.953.
10. Szmyrka-Kaczmarek M., Wiland P. Belimumab - new treatment opportunities in systemic lupus erythematosus. *Reumatologia.* 2012;50(4):349–361.
11. Levine M. H., Haberman A. M., Sant'Angelo D. B., et al. A B-cell receptor-specific selection step governs immature to mature B cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(6):2743–2748. doi: 10.1073/pnas.050552997.
12. Dubey A. K., Handu S. S., Dubey S., et al. Belimumab: first targeted biological treatment for systemic lupus erythematosus. *J Pharmacol Pharmacother.* 2011;2(4):317–319. doi: 10.4103/0976-500X.85930.
13. National Institute for Health and Care Excellence (NICE) *Belimumab for Treating Active Autoantibody-Positive Systemic Lupus Erythematosus.* UK: 2016. Technology appraisal guidance - TA397
14. Chiche L., Jourde N., Thomas G., et al. New treatment options for lupus - a focus on belimumab. *Ther Clin Risk Manag.* 2012;8:33–43.
15. *GlaxoSmithKline.: Benlysta Prescribing Information.* Maryland, MD, USA: 2017.
16. Navarra S. V., Guzman R. M., Gallacher A. E., et al. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet.* 2011;377(9767):721–731. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61354-2.



17. Furie R., Petri M., Zamani O., et al. A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology*. 2011;63(12):3918–3930.
18. Merrill J. T., Shanahan W. R., Scheinberg M., Kalunian K. C., Wofsy D., Martin R. S. Phase III trial results with blisibimod, a selective inhibitor of B-cell activating factor, in subjects with systemic lupus erythematosus (SLE): results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(6):883–889. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-213032.
19. Wallace D. J., Stohl W., Furie R. A., et al. A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology*. 2009;61(9):1168–1178.
20. Manzi S., Sánchez-Guerrero J., Merrill J. T., et al. Effects of belimumab, a B lymphocyte stimulator-specific inhibitor, on disease activity across multiple organ domains in patients with systemic lupus erythematosus: combined results from two phase III trials. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(11):1833–1838. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200831.
21. Strand V., Levy R. A., Cervera R., et al. Improvements in health-related quality of life with belimumab, a B-lymphocyte stimulator-specific inhibitor, in patients with autoantibody-positive systemic lupus erythematosus from the randomised controlled BLISS trials. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(5):838–844. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202865.
22. Lee Y. H., Song G. G. Comparative efficacy and safety of intravenous or subcutaneous belimumab in combination with standard therapy in patients with active systemic lupus erythematosus: a Bayesian network meta-analysis of randomized controlled trials. *Lupus*. 2017;27(1):112–119. doi: 10.1177/0961203317713143.
23. Kleinmann J. F., Tubach F., Le Guern V., et al. International and multidisciplinary expert recommendations for the use of biologics in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2017;16:650–657.
24. Manetta J., Bina H., Ryan P., et al. Generation and characterization of tabalumab, a human monoclonal antibody that neutralizes both soluble and membrane-bound B-cell activating factor. *J Inflamm Res*. 2014;7:121–131.
25. Isenberg D. A., Petri M., Kalunian K. Efficacy and safety of subcutaneous tabalumab in patients with systemic lupus erythematosus: results from ILLUMINATE-1, a 52-week, phase III, multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(2):323–331. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-207653.
26. Merrill J. T., Van Vollenhoven R. F., Buyon J. P., et al. Efficacy and safety of subcutaneous tabalumab, a monoclonal antibody to B-cell activating factor, in patients with systemic lupus erythematosus: Results from ILLUMINATE-2, a 52-week, phase III, multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(2):332–340.
27. Furie R. A., Leon G., Thomas M., et al. A phase 2, randomised, placebo-controlled clinical trial of blisibimod, an inhibitor of B cell activating factor, in patients with moderate-to-severe systemic lupus erythematosus, the PEARL-SC study. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(9):1667–1675. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-205144.
28. Lenert A., Niewold T., Lenert P. Spotlight on blisibimod and its potential in the treatment of systemic lupus erythematosus: evidence to date. *Drug Devel Ther*. 2017;11:747–757. doi: 10.2147/DDDT.S114552.
29. Dall’Era M., Chakravarty E., Wallace D., et al. Reduced B lymphocyte and immunoglobulin

- levels after atacept treatment in patients with systemic lupus erythematosus: results of a multicenter, phase Ib, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating trial. *Arthritis & Rheumatology*. 2007;56(12):4142–4150. doi: 10.1002/art.23047.
30. Ginzler E. M., Wax S., Rajeswaran A., et al. Atacept in combination with MMF and corticosteroids in lupus nephritis: results of a prematurely terminated trial. *Arthritis Research & Therapy*. 2012;14, article R33(1)
  31. Isenberg D., Gordon C., Licu D., Copt S., Rossi C. P., Wofsy D. Efficacy and safety of atacept for prevention of flares in patients with moderate-to-severe systemic lupus erythematosus (SLE): 52-week data (APRIL-SLE randomised trial) *Ann Rheum Dis*. 2015;74(11):2006–2015. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-205067
  32. Merrill J. T., Wallace D. J., Wax S., et al. Efficacy and safety of atacept in patients with systemic lupus erythematosus: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-arm, phase iib study. *Arthritis & Rheumatology*. 2018;70(2):266–276. doi: 10.1002/art.40360.
  33. Gordon C., Wofsy D., Wax S., Li Y., Pena Rossi C., Isenberg D. Post hoc analysis of the phase II/III APRIL-SLE study: association between response to atacept and serum biomarkers including BlyS and APRIL. *Arthritis & Rheumatology*. 2017;69(1):122–130. doi: 10.1002/art.39809.
  34. Cardiel M. H. Abetimus sodium: a new therapy for delaying the time to, and reducing the incidence of, renal flare and/or major systemic lupus erythematosus flares in patients with systemic lupus erythematosus who have a history of renal disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2005;14(1):77–88. doi: 10.1517/13543784.14.1.77.
  35. Cardiel M. H., Tumlin J. A., Furie R. A., Wallace D. J., Joh T., Linnik M. D. Abetimus sodium for renal flare in systemic lupus erythematosus: results of a randomized, controlled phase III trial. *Arthritis & Rheumatology*. 2008;58(8):2470–2480. doi: 10.1002/art.23673.
  36. Horowitz D. M., Furie R. A. Abetimus sodium: a medication for the prevention of lupus nephritis flares. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10(9):1501–1507.
  37. Gottenberg J.-E., Ravaud P., Bardin T., et al. Risk factors for severe infections in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab in the autoimmunity and rituximab registry. *Arthritis & Rheumatology*. 2010;62(9):2625–2632.
  38. Merrill J. T., Neuwelt C. M., Wallace D. J., et al. Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis & Rheumatology*. 2010;62(1):222–233. doi: 10.1002/art.27233.
  39. Rovin B. H., Furie R., Latinis K., et al. Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus nephritis assessment with rituximab study. *Arthritis & Rheumatology*. 2012;64(4):1215–1226. doi: 10.1002/art.34359.
  40. Palmer S. C., Tunnicliffe D. J., Singh-Grewal D., et al. Induction and maintenance immunosuppression treatment of proliferative lupus nephritis: a network meta-analysis of randomized trials. *Am J Kidney Dis*. 2017;70(3):324–336.
  41. Terrier B., Amoura Z., Ravaud P., et al. Safety and efficacy of rituximab in systemic lupus erythematosus: results from 136 patients from the French autoimmunity and rituximab registry. *Arthritis & Rheumatology*. 2010;62(8):2458–2466. doi: 10.1002/art.27541.
  42. Hogan J., Godron A., Baudouin V., et al. Combination therapy of rituximab and mycophenolate mofetil in childhood lupus nephritis. *Pediatr Nephrol*. 2018;33(1):111–116.

43. ClinicalTrials.gov. Rituximab and Belimumab for Lupus Nephritis (CALIBRATE) NCT02260934, 2014, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02260934>.
44. Patel S. V., Khan D. A. Adverse reactions to biologic therapy. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2017;37(2):397–412. doi: 10.1016/j.iac.2017.01.012.
45. Reddy V., Jayne D., Close D., Isenberg D. B-cell depletion in SLE: clinical and trial experience with rituximab and ocrelizumab and implications for study design. *Arthr Res Ther.* 2013;15(1)
46. Mysler E. F., Spindler A. J., Guzman R., et al. Efficacy and safety of ocrelizumab in active proliferative lupus nephritis: results from a randomized, double-blind, phase III study. *Arthritis & Rheumatology.* 2013;65(9):2368–2379.
47. Masoud S., McAdoo S. P., Bedi R., Cairns T. D., Lightstone L. Ofatumumab for B cell depletion in patients with systemic lupus erythematosus who are allergic to rituximab. *Rheumatology.* 2018;57(7):1156–1161.
48. ClinicalTrials.gov. A Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Obinutuzumab Compared With Placebo in Participants With Lupus Nephritis (LN) NCT02550652, 2015 , <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02550652>.
49. Clowse M. E., Wallace D. J., Furie R. A., et al. Efficacy and safety of epratuzumab in moderately to severely active systemic lupus erythematosus: results from two phase III randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Arthritis & Rheumatology.* 2017;69(2):362–375.
50. Lichtman E. I., Helfgott S. M., Krieger M. A. Emerging therapies for systemic lupus erythematosus: focus on targeting interferon- $\alpha$  *Clin Immunol.* 2012;143(3):210–221.
51. Bauer J. W., Petri M., Batliwalla F. M., et al. Interferon-regulated chemokines as biomarkers of systemic lupus erythematosus disease activity: a validation study. *Arthritis & Rheumatology.* 2009;60(10):3098–3107.
52. Kalunian K. C., Merrill J. T., Maciuga R., et al. A Phase II study of the efficacy and safety of rontalizumab (rhuMab interferon- $\alpha$ ) in patients with systemic lupus erythematosus (ROSE) *Ann Rheum Dis.* 2016;75(1):196–202. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206090.
53. Khamashta M., Merrill J. T., Werth V. P., et al. Sifalimumab, an anti-interferon- $\alpha$  monoclonal antibody, in moderate to severe systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(11):1909–1916. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208562.
54. Morehouse C., Chang L., Wang L. W., et al. Target modulation of a type I interferon (IFN) gene signature with sifalimumab or anifrolumab in SLE patients in two open label phase 2 Japanese trials. *Arthritis & Rheumatology.* 2014;(66, article S313)
55. Richez C., Schaeffer T., Dumoulin C., Dehais J., Moreau J.-F., Blanco P. Myeloid dendritic cells correlate with clinical response whereas plasmacytoid dendritic cells impact auto-antibody development in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab. *Arthr Res Ther.* 2009;11, article R100(3)
56. Chun H. Y., Chung J. W., Kim H. A., et al. Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus Erythematosus. *J Clin Immunol.* 2007;27(5):461–466. doi: 10.1007/s10875-007-9104-0
57. Illei G. G., Shirota Y., Yarburo C. H., et al. Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis & Rheumatology.* 2010;62(2):542–552. doi: 10.1002/art.27221.

58. Rovin B. H., van Vollenhoven R. F., Aranow C., et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of treatment with sirukumab (CNTO 136) in patients with active lupus nephritis. *Arthritis & Rheumatology*. 2016;68(9):2174–2183. doi: 10.1002/art.39722.
59. Rother R. P., Mojcik C. F., McCroskery E. W. Inhibition of terminal complement: a novel therapeutic approach for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2004;13(5):328–334. doi: 10.1191/0961203303lu1021oa.
60. Sidiropoulos P. I., Boumpas D. T. Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2004;13(5):391–397. doi: 10.1191/0961203304lu1032oa.
61. Chamberlain C., Colman P. J., Ranger A. M., et al. Repeated administration of dapirolizumab pegol in a randomised phase I study is well tolerated and accompanied by improvements in several composite measures of systemic lupus erythematosus disease activity and changes in whole blood transcriptomic profiles. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(5):1837–1844.
62. Finck B. K., Linsley P. S., Wofsy D. Treatment of murine lupus with CTLA4lg. *Science*. 1994;265(5176):1225–1227. doi: 10.1126/science.7520604.
63. Merrill J. T., Burgos-Vargas R., Westhovens R., et al. The efficacy and safety of abatacept in patients with non-life-threatening manifestations of systemic lupus erythematosus: results of a twelve-month, multicenter, exploratory, phase IIb, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatology*. 2010;62(10):3077–3087. doi: 10.1002/art.27601.
64. Furie R., Nicholls K., Cheng T.-T., et al. Efficacy and safety of abatacept in lupus nephritis: a twelve-month, randomized, double-blind study. *Arthritis & Rheumatology*. 2014; 66(2): 379–389. doi: 10.1002/art.38260.
65. Houssiau F. A., Vasconcelos C., D’Cruz D., et al. Immunosuppressive therapy in lupus nephritis: the euro-Lupus Nephritis Trial, a randomized trial of low-dose versus high-dose intravenous cyclophosphamide. *Arthritis & Rheumatology*. 2002;46(8):2121–2131. doi: 10.1002/art.10461.
66. ClinicalTrials.gov. Efficacy and Safety Study of Abatacept to Treat Lupus Nephritis. NCT01714817, 2012, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01714817>.

Adresa:

MUDr. Kristína Klučková

Imunologický ústav LFUK

Odborárske námestie 14

813 72 Bratislava

Mail: kristina.kluckova@fmed.uniba.sk

## SÚČASNÝ POHĽAD NA IMUNOTERAPIU NÁDOROV

Đurmanová V., Buc M.

Imunologický ústav LF UK, Bratislava

### Abstrakt

Imunoterapia nádorov, ktorej cieľom je aktivovať efektorové mechanizmy imunitného systému, dosiahla v poslednom desaťročí významné úspechy. Rozvoj imunoterapie sa začal pred viac ako 40 rokmi, kedy bola u pacientov s nádorom močového mechúra aplikovaná BCG vakcína. Odvtedy sa do klinickej praxe zaviedli viaceré efektívne terapeutické postupy založené na aktivácii imunitného systému pacienta s nádorovým procesom. Súčasné možnosti imunoterapie nádorov zahŕňajú aplikáciu monoklonových protilátok (mAb), inhibítory imunitných kontrolných bodov, vakcináciu a bunkovú terapiu využívajúcu modifikované T-lymfocyty exprimujúce chimérový antigénový receptor (CAR). Významný pokrok v imunoterapii nádorov zaznamenala aplikácia inhibítorov imunitných kontrolných bodov. mAb proti inhibičným receptorom CTLA-4 a PD-1 na T-lymfocytoch a PD-L1 na bunkách nádoru spôsobujú aktiváciu T-bunkovej imunitnej odpovede a následné zničenie nádorovej bunky. Inhibícia CTLA-4 (ipilimumab) sa používa v liečbe malígneho melanómu kože a blokáda PD-1/PD-L1 (pembrolizumab, nivolumab, alectuzumab, durvalumab) v liečbe malígneho melanómu kože, nemalobunkového karcinómu pľúc, Hodgkinovho lymfómu, karcinómu hlavy a krku, karcinómu močového mechúra a hepatocelulárneho karcinómu. Ďalšiu stratégiu v terapii nádorov predstavuje vakcinácia. Sipuleucel-T je jediná terapeutická vakcína schválená pre liečbu pacientov s karcinómom prostaty. Vakcínu tvoria dendritové bunky pacienta stimulované *ex vivo* fúznym proteínom PAP (prostatická kyselá fosfatáza) a GM-CSF. Medián celkového prežívania (OS – overall survival) u pacientov po aplikácii vakcíny bol 25,8 mesiaca vs. 21,7 v skupine s placebom. Imunoterapia CAR T-lymfocytmi predstavuje ďalšiu perspektívnu možnosť v liečbe nádorov. T-lymfocyty s modifikovaným CAR receptorom sú pripravené metódami molekulárnej biológie *in vitro* a obsahujú extracelulárnu časť, ktorá je tvorená variabilnými doménami protilátky pre daný antigén, transmembránovú časť a intracelulárnu signálnu časť. Intracelulárna časť receptora môže obsahovať signálne domény pre aktiváciu T-lymfocytov (napr. zeta reťazec CD3-molekuly), ako aj domény kostimulačných receptorov (napr. CD28, 4–1BB). Postupne bolo vyvinutých niekoľko generácií CAR T-lymfocytov. Štvrtá generácia CAR T-lymfocytov umožňuje odstraňovanie nádorových buniek pomocou cytokínov (TRUCK). CAR T-lymfocyty sa používajú v liečbe akútnej lymfoblastovej leukémie (TISAGENLECLEUCEL, cieľový antigén je CD19) a v liečbe pacientov s veľkobunkovým lymfómom B-lymfocytového pôvodu (AXICABTAGENE CILOLEUCEL; cieľový antigén je CD19). Budúcnosť liečby nádorov je v personalizovanej liečbe, ktorá zahŕňa kombinované prístupy terapie, ako napr. chemoterapiu a cieľnú imunoterapiu. Vyhodnotenie optimálnych kombinácií a načasovania terapie je významným cieľom klinickej praxe v budúcnosti.

## Úvod

Imunitný systém predstavuje komplexný systém, ktorý je schopný rozpoznať a odstrániť z nášho organizmu cudzorodé antigény vrátane antigénov nádorových buniek. Koncept imunitného dohľadu nad rozvojom rakoviny (cancer immune surveillance) bol navrhnutý v sedemdesiatych rokoch Burnetom a Thomasom [1]. Opísali, že imunitný systém je schopný rozpoznať špecifické nádorové antigény a aktivovať cytotoxické mechanizmy vrátane CD8<sup>+</sup> T lymfocytov. Táto imunitná odpoveď však môže zlyhať, čo vedie k rozvoju nádorového procesu. Koncept imunitného dohľadu nad rozvojom rakoviny bol doplnený o ďalšie poznatky a vznikla teória imunoeditácie nádorov (cancer immunoediting theory), ktorá lepšie vysvetľuje vzťahy medzi nádorom a imunitným systémom. Táto teória pozostáva z troch „E“ fáz: fáza eliminácie (elimination), fáza rovnováhy (equilibrium) a fáza úniku (escape). Vo fáze eliminácie sú antigény nádoru rozpoznávané mechanizmami prirodzenej aj získanej imunity. Včasnú odstránenie nádoru zabezpečujú mechanizmy prirodzenej imunity, ako napr. NK-bunky, makrofágy, NKT-bunky a LAK-bunky. K mechanizmom adaptívnej imunitnej odpovede voči nádorom patrí aktivácia cytotoxických CD8<sup>+</sup> T-lymfocytov, tvorba protilátok proti špecifickým antigénom a ADCC-reakcia (protilátkami sprostredkovaná bunková cytotoxicita) a  $\gamma\delta$  T-lymfocyty. Cytokíny produkované prevažne T-lymfocytmi (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF) sa tiež významne podieľajú na odstránení nádoru. Pravdepodobne aktivácia získanej T-bunkovej imunitnej odpovede vedie ku konečnej eliminácii nádorových buniek. Vo fáze rovnováhy sú v ekvivalentnom množstve nádorové bunky a bunky imunitného systému. V tomto štádiu možno nájsť tzv. okultný alebo klinicky tichý nádor. Fáza rovnováhy býva najdlhšia a môže trvať aj niekoľko rokov. Počas tejto fázy vznikajú zmeny v nádorových bunkách, ktoré aktivujú imunosupresívne mikroprostredie (cancer immunoediting). V poslednej fáze úniku nádorové bunky nie sú rozpoznávané imunitným systémom a nastáva rozvoj nádorového procesu. Analýza imunosupresívnych mechanizmov v mikroprostredí nádorov významne napomohla k pokrokom v imunoterapii [2, 3].

## Súčasnú možnosti imunoterapie

Imunoterapia nádorov, ktorej cieľom je aktivovať efektorové mechanizmy imunitného systému, dosiahla v poslednom desaťročí významný pokrok. Rozvoj imunoterapie sa začal pred viac ako 40 rokmi, kedy bola u pacientov s nádorom močového mechúra aplikovaná BCG vakcína. Odvtedy boli do klinickej praxe zavedené viaceré efektívne terapeutické postupy založené na aktivácii imunitného systému pacienta s nádorovým procesom. Súčasnú možnosti imunoterapie nádorov zahŕňajú aplikáciu monoklonových protilátok (mAb), inhibítory imunitných kontrolných bodov, vakcináciu a bunkovú terapiu využívajúcu modifikované T-lymfocyty exprimujúce chimérový antigénový receptor (CAR).

### **Monoklonové protilátky v liečbe nádorov**

Terapia mAb je najviac využívanou imunoterapiou súčasnosti. Podávanie mAb je súčasťou pasívnej imunoterapie a zakladá sa na rozpoznávaní antigénov na povrchu nádorových buniek. Monoklonové protilátky po väzbe na terčovú molekulu buď priamo inhibujú jej funkciu alebo sa aktivujú cytotoxické imunitné mechanizmy (napr. komplement, ADCC reakcia), ktoré priamo navodia deštrukciu terčovej bunky. Účinok mAb sa zvyšuje ich spojením s rádioizotopmi, toxickými molekulami, či protinádorovými liekmi.

Monoklonové protilátky majú v liečbe nádorov nespochybniteľné miesto. Z klinickej praxe je známe, že mAb podporujú remisiu, t. j. predlžujú čas do progresie choroby a zvyšujú tak celkové prežívanie pacientov. V súčasnosti sa v liečbe používa viac ako 75 mAb zacielených na rozličné antigény nádorov a viac ako 570 IgG, resp. ich konjugátov je v klinickej fáze I alebo II. V protinádorovej liečbe sa najčastejšie využívajú nasledujúce mAb: rituximab a ofatumumab (mAb proti CD20) schválená v liečbe chronickej lymfocytovej leukémie (CLL) a non-Hodgkinovho lymfómu, trastuzumab (mAb proti HER/neu) schválená v liečbe karcinómu prsníka, alemtuzumab (mAb proti CD52) schválená v liečbe CLL, gemtuzumab ozogamycin (mAb proti CD33 značená kalicheamicínom) schválená v liečbe AML (akútne myeloidná leukémia), cetuximab a panitumumab (mAb proti EGFR) schválená v liečbe kolorektálneho karcinómu, karcinómu hlavy a krku a bevacizumab (mAb proti VEGF) schválená v liečbe kolorektálneho karcinómu [4].

### **Inhibícia imunitných kontrolných bodov (checkpoints)**

Funkčná blokáda inhibičných receptorov CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated antigen) a PD-1 (programmed cell death protein 1) priniesla v imunoterapii nádorov prelomové výsledky. CTLA-4 a PD-1 sa nachádzajú v membráne T-lymfocytov a po ich interakcii s ligandmi B7 (CD80) a PD-L1 (programmed death-ligand 1) na bunkách prezentujúcich antigén inhibujú T-bunkovú imunitnú odpoveď. Týmto spôsobom si imunitný systém reguluje odpoveď na antigény a zabraňuje autoimunitným procesom [5]. Skúmaním mikroprostredia nádoru sa zistilo, že prevládajú T-lymfocyty so zvýšenou expresiou inhibičných receptorov vrátane PD-1 a zníženou expresiou cytokínov ako sú IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF a rovnako perforínov a granzýmov [6]. V roku 2011 boli publikované výsledky klinickej štúdie fázy III MDX010-20, ktorá dokázala vplyv anti-CTLA-4 protilátky ipilimumabu na predĺženie celkového prežívania u pacientov s metastatickým melanómom (median OS bol 10 mesiacov u imunizovaných vs. 6,4 mesiaca u kontrol) [7]. Úspešnosť klinických štúdií po aplikácii blokátorov CTLA-4 a PD-1 viedla k ich zavedeniu do praxe. V súčasnosti sú v klinickej praxi schválené dve základné skupiny monoklonových protilátok proti imunitným kontrolným bodom (checkpoint inhibitors). Do prvej skupiny patrí inhibítor CTLA-4 receptora, ipilimumab. Ipilimumab je humánna mAb izotypu IgG1 proti CTLA-4 na zreloch T-lymfocytoch, ktorú roku 2011 schválil regulačným úrad FDA v USA na liečbu metastatického melanómu a od

roku 2015 v adjuvantnej liečbe vysokorizikového melanómu. Do druhej skupiny patria blokátory PD-1 receptora pembrolizumab a nivolumab a blokátory PD-L1 ligandu atezolizumab, durvalumab a avelumab [8, 9, 10]. Nivolumab (humánna mAb izotypu IgG4 proti PD-1) je schválený v liečbe melanómu, nemalobunkového karcinómu pľúc, renálneho karcinómu, karcinómu močového mechúra, epidermoidného karcinómu hlavy a krku, Hodgkinovho lymfómu, hepatocelárneho karcinómu a metastatického kolorektálneho adenokarcinómu s MSI (microsatellite instability) pozitívnym nálezom. Pembrolizumab je blokátor PD-1 receptora (humanizovaná mAb izotypu IgG4 proti PD-1), ktorý bol schválený v roku 2014 v liečbe malígneho melanómu, neskôr v liečbe karcinómu hlavy a krku, v liečbe Hodgkinovho lymfómu, uroteliálneho karcinómu, v liečbe adenokarcinómu žalúdka s expresiou PD-L1 a iných tumorov s MSI pozitívnym nálezom alebo s deficitom „mismatch repair“. Atezolizumab je plne humanizovaná protilátka izotypu IgG1 proti PD-L1 ligandu, ktorá je od roku 2016 schválená FDA v liečbe metastatického uroteliálneho karcinómu a metastatického nemalobunkového karcinómu pľúc po zlyhaní prvej línie liečby na báze platiny. Durvalumab (humánna mAb izotypu IgG1k proti PD-L1 ligandu) sa používa v liečbe metastatického uroteliálneho karcinómu a Avelumab (humánna mAb izotypu IgG1λ proti PD-L1 ligandu) v liečbe metastatického karcinómu z Merkelových buniek a metastatického uroteliálneho karcinómu [11]. Ďalšie terapeutické stratégie sú založené na kombinovanej aplikácii blokátorov imunitných kontrolných bodov. Na základe výsledkov klinickej štúdie CHECKMATE 067 FDA v januári 2016 schválila kombinovanú imunoterapiu ipilimumab + nivolumab v 1. línii u pacientov s metastatickým melanómom. Terapia viedla k zvýšenej miere celkového prežívania počas 3 rokov u pacientov s kombinovanou stratégiou liečby (58 % kombinovaná terapia vs. 34 % monoterapia). Nevýhodou kombinovanej imunoterapie sú však jej zvýšené toxické účinky. Tieto zahŕňajú diareu, kolitídu, hepatitídu, kožné vyrážky a rôzne endokrinopatie [12]. V liečbe nemalobunkového karcinómu pľúc sa skúšajú kombinované terapie založené na inhibícii viacerých kontrolných bodov, napr. nivolumab a ipilimumab, alebo chemoterapia na báze cis-platiny v kombinácii s anti-PD-1 pembrolizumab, resp. anti-PD-L1 atezolizumab a anti-VEGF bevacizumab.

### **Adoptívna terapia CAR T-lymfocytmi**

Adoptívna terapia lymfocytmi predstavuje ďalšiu z možných stratégií v liečbe nádorov. Počiatočné klinické skúšky využili v liečbe TIL-bunky (tumor-infiltrating lymphocytes), ktoré boli izolované z nádoru pacienta, kultivované *in vitro* a následne spätne aplikované pacientovi. Aplikácia TIL buniek dosahovala sľubné výsledky najmä v liečbe melanómu [13]. Ťažkosti spojené s izoláciou a expanziou TIL buniek *in vitro* a ich rôznorodá efektívnosť viedli k vývoju nových metód adoptívnej terapie.

Imunoterapia CAR T-lymfocytmi predstavuje novú perspektívnu formu adoptívnej terapie nádorov. CAR T-lymfocyty sú geneticky modifikované T-lymfocyty, ktoré exprimujú povrchový receptor CAR (chimérový antigénový receptor), špecificky roz-



poznávajúci nádorový antigén. Technológia prípravy CAR T-lymfocytov bola vytvorená približne pred 20 rokmi a neustále sa zdokonaľuje [14]. Postupne bolo vyvinutých niekoľko generácií CAR T-lymfocytov a v súčasnosti bola pripravená už štvrtá generácia [15]. Vo všeobecnosti CAR T-lymfocyty exprimujú receptor, ktorý sa skladá z extracelulárnej časti, transmembránovej časti a intracelulárnej signálnej časti, ktorá aktivuje cytotoxickú odpoveď [16]. Extracelulárna väzbová doména obsahuje variabilné oblasti  $V_H$  a  $V_L$  monoklonovej protilátky špecifické k danému antigénu (tzv. scFv, single chain variable fragment). Niektoré CAR obsahujú tzv. extracelulárny spacer, ktorý spája scFv s transmembránovou a cytoplazmovou signálnou doménou. Intracelulárnu časť tvorí aktivačná doména reťazca CD3 $\zeta$  z T-bunkového receptora (TCR), buď samostatne alebo v spojení s doménami kostimulačných receptorov (napr. CD28, 4–1BB, OX40). Prvá generácia receptorov CAR obsahovala len intracelulárnu doménu reťazca CD3 $\zeta$ , ktorá je hlavným prenášačom signálu z TCR. Druhá generácia obsahuje navyše ďalšiu doménu z rôznych kostimulačných receptorov (napr. CD28, 4–1BB /CD137/), ktorá zosilňuje signalizáciu T-lymfocytov. Tretiu generáciu CARov tvoria viaceré signalizačné domény (CD3 $\zeta$ /CD28/4–1BB, CD3 $\zeta$ /CD28/OX40 atď.), ktoré ďalej zvyšujú aktivitu CAR T-lymfocytov. Napokon štvrtá generácia CAR T-lymfocytov označovaná ako TRUCK (T cells redirected for universal cytokine killing) obsahuje vektor kódujúci sekvenciu pre cytokín (napr. IL-12), ktorý sa po väzbe CAR na svoj antigén uvoľňuje z bunky do prostredia a podporuje protinádorovú odpoveď [15]. Štruktúra CAR receptorov sa môže meniť v závislosti od typu nádorových antigénov, resp. subpopulácie T-lymfocytov, ktoré exprimujú CAR. Výhodou CAR receptora je to, že rozpoznáva antigén spôsobom, ktorý je nezávislý od imunitnej reštrikcie pomocou HLA molekúl.

Východiskovým materiálom pre genetickú modifikáciu sú T-lymfocyty izolované od pacienta leukaferézou. Príprava CAR T-lymfocytov je založená na ich transfekcii/transdukcii pomocou retrovírusového vektora alebo transpozozá. Po genetickej manipulácii *in vitro* sú T-lymfocyty kultivované v prostredí IL-2 a kostimulačných signálov (napr. anti-CD3/CD28 protilátky), ktoré umožnia ich expanziu. Pripravené CAR T-lymfocyty sa po komplexnej kontrole kvality uchovávajú kryokonzerváciou a sú vhodné ku klinickej aplikácii. CAR T-lymfocyty po intravenózne aplikácii pacientovi proliferujú a môžu dlhodobo prežívať (mesiace až roky) [17].

V súčasnosti sa v klinickej praxi používajú CAR T-lymfocyty, ktoré špecificky rozpoznávajú antigén CD19. CD19 sa nachádza na B-lymfocytoch, a preto je špecifickým cieľovým antigénom v liečbe hematologických malignít ako napr. akútne B-lymfoblastová leukémia (B-ALL), chronická lymfocytová leukémia (CLL), a non-Hodgkinové lymfómy B pôvodu (B-NHL). FDA schválil 2 modifikácie CAR T-lymfocytov v liečbe hematologických malignít: TISAGENLECLEUCEL (Kymriah™) sa používa v liečbe pacientov starších ako 25 rokov trpiacich na B-ALL a AXICABTAGENE CIOLEUCEL (Yescarta™) je určený pre liečbu dospelých pacientov s veľkobunkovým lymfómom B-lymfocytového pôvodu. Liečba CAR T-lymfocytmi proti CD19 dosiahla mieru celkového prežívania 40 % – 60 % pri agresívnych lymfómoch a 60 % – 90 % pri B-ALL [18, 19].

Medzi komplikácie liečby CAR T-lymfocytmi patrí zvýšené riziko toxicity spôsobené syndrómom z uvoľnenia veľkého množstva cytokínov (cytokine release syndrome, CRS). Symptómy CRS sú u väčšiny pacientov mierne vo forme vysokej horúčky a myalgie. U niektorých pacientov sa však môže vyvinúť ťažký inflamačný syndróm s hypotenziou, koagulopatiou a pľúcny edémom vedúcim až k multiorgánovému zlyhaniu, ktoré vyžaduje resuscitáciu [20].

V súčasnej dobe prebieha vo svete viac než 50 klinických štúdií testujúcich ďalšie varianty CAR T-lymfocytov, ktoré sa venujú liečbe nielen hematologických malignít, ale i solídnych nádorov ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). V liečbe hematologických malignít sa testujú CAR T-lymfocyty namierené proti CD30 pri Hodgkinovom lymfóme [21], proti CD123 pri AML [22], proti CD22 pri B-ALL a napokon proti BCMA (B cell maturation antigen) pri viacpočetnom myelóme [23]. Pri solídnych nádoroch liečba pomocou CAR T-lymfocytov zatiaľ úspešná nebola. Jedným z problémov je nájdenie cieľového antigénu na konštrukciu CAR. Ako možné antigény pre liečbu prichádzajú do úvahy napr. gangliosid GD2 pri neuroblastóme [24], ľudský receptor 2 pre epidermálny rastový faktor (HER2) pri HER2-positívnom sarkóme [25], mezotelín pri mezoteliálnom sarkóme [26], EGFR pri nádoroch hlavy a krku a malobunkovom karcinóme pľúc [27], PSMA pri karcinóme prostaty [28] a CAIX pri karcinóme obličiek [29].

Ďalší vývoj CAR T-lymfocytov smeruje k využitiu nových cieľových antigénov a signálnych domén, ktoré môžu rozšíriť oblasť aplikácie tejto terapie a zvýšiť jej účinnosť. Ďalšie výskumy sú zamerané na zlepšenie migrácie T-lymfocytov do miesta nádoru (napr. transfekciou génov pre CXCR2, CCR4), predĺženie ich perzistencie (selekcia subtypov CAR T-lymfocytov, aktivácia tvorby IL-12, IL-15), prekonanie imunopresívneho prostredia nádoru (supresia Treg-lymfocytov a indolamíndeaminízy /IDO/, TRUCK CAR IL-12, chimérové „switch“ receptory PD-1 – CD28). U niektorých pacientov bude vhodná kombinácia viacerých stratégií liečby, napr. mAb proti PD-1, CTLA-4 a imunoterapia CAR T-lymfocytmi [15].

### **Vakcinácia**

Aktívna imunizácia predstavuje ďalšiu perspektívnu stratégiu v liečbe nádorov. I napriek dlhoročnému výskumu je využitie protinádorových vakcín v praxi limitované. Na prípravu úspešnej protinádorovej vakcíny je dôležitá správna kombinácia rôznych faktorov, ktoré zahŕňajú typ nádorových antigénov, typ adjuvansu, resp. optimálnu cestu a načasovanie imunizácie [6]. Vakcína tvorená atenuovaným kmeňom BCG (TheraCys, Tice) je prvá terapeutická vakcína, ktorá bola schválená úradom FDA v roku 1990 na liečbu karcinómu močového mechúra. Klinická štúdia fázy III poukázala u 45 % imunizovaných pacientov na 5-ročné prežívanie bez relapsu v porovnaní s 18 % pacientov liečených doxorubicinom [30]. Terapeutický účinok vakcíny bol potvrdený metaanalýzou, ktorá poukázala na zníženie rizika progresie choroby o 27 % po BCG vakcinácii [31].

Ako protinádorové vakcíny sa ďalej testovali celobunkové vakcíny, nádorové proteíny (natívne alebo rekombinantné), dendritové bunky stimulované nádorovými

antigénmi, onkolytické vírusy a DNA/ RNA plazmidy exprimujúce nádorové antigény. Celobunkové vakcíny sú tvorené širokým spektrom nádorových proteínov a delíme ich na autológne a alogénne. Podanie celobunkových vakcín si vyžaduje prítomnosť adjuvansu, napr. GM-CSF alebo BCG. Prvá celobunková protinádorová vakcína pripravená ožiareními sa klinicky testovala už v roku 1978 [32]. Odtedy bolo pripravených viacero autológnych a alogénnych vakcín, ale žiadna nenašla využitie v klinickej praxi [33]. Ako ďalšie protinádorové vakcíny boli testované nádorové antigény, natívne alebo rekombinantné. Boli pripravené a testované nádorovo-asociované antigény (TAA), ako napr. CEA, AFP, p53, MUC-1 (mucin-1), EGFR, VEGF a nádorovo-špecifické antigény (TSA), ako napr. PAP (prostatická kyslá fosfatáza), PSA (prostatický špecifický antigén), MART-1 (melanómový antigén rozpoznávaný T bunkami) a MAGE-1 (s melanómom asociovaný antigén 1) [34].

Rekombinantné vektory exprimujúce nádorové antigény sú ďalšou stratégiou protinádorovej terapie. Medzi najčastejšie vektory patria poxvírusy, adenovírusy a vírus vakcínie [34]. V klinickej štúdií fázy II u pacientov s metastázujúcim kastrofčne rezistentným karcinómom prostaty bol testovaný rekombinantný vírus vakcínie exprimujúci PSA (vakcína PROSTVAC) kombinovaný s TRICOM-vektorom pre kostimulačné molekuly CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA3), a CD80 (B7.1). Napriek úspešným výsledkom fázy II pokračujúca fáza III neprinesla požadovanú efektivitu liečby [35]. Podobne bol testovaný rekombinantný vírus vakcínie exprimujúci ľudský 5T4 (MVA-h5T4, TroVax) u pacientov s kolorektálnym a obličkovým karcinómom a karcinómom prostaty [36].

Priprava DNA vakcín tvorených samotným plazmidom začala už v 90-tych rokoch a pokračuje dodnes. V súčasnej dobe prebieha vo svete viac než 48 klinických štúdií testujúcich rôzne formy DNA plazmidov exprimujúcich špecifické antigény rôznych solídnych nádorov, najmä prsníka, maternice, prostaty, kože a hematologických malignít ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Väčšina prebiehajúcich alebo ukončených klinických štúdií poukázala len na mierne nežiadúce účinky po DNA imunizácii, ale najmä na zvýšenú tvorbu CD8<sup>+</sup> T-lymfocytov rozpoznávajúcich špecifické antigény nádorov kódovaných DNA vakcínou. Niektoré výsledky klinického testovania DNA vakcín sú uvedené nižšie. V klinickej štúdií fázy II bola testovaná bezpečnosť a efektivita DNA vakcíny VGX-3100, kódujúca proteíny E6 a E7 HPV16 a 17 (NCT01304524). DNA vakcína bola podaná intramuskulárne elektroporáciou v 3 dávkach (1., 4., 12. týždeň) ženám s cervikálnymi intraepitelovými neopláziami stupňa II/III. Vakcínu pacientky dobre tolerovali a na základe histopatologických a imunologických analýz sa ukázala zvýšená účinnosť u 50 % liečených žien [37]. V súčasnosti prebiehajú 2 klinické štúdie fázy III po podaní DNA vakcíny VGX-3100 (NCT03185013 and NCT03721978). V nasledujúcej klinickej štúdií fázy I/II bol testovaný plazmid pVAXrcPSAv531 exprimujúci neskrátený PSA proteín (NCT00859729). Plazmid bol intradermálne podaný elektroporáciou pacientom s relapsujúcim karcinómom prostaty, ktorí boli liečení rádioterapiou a hormonálnou terapiou. Vakcína bola dobre tolerovaná a aktivovala špecifickú bunkovú aj protilátkovú imunitnú odpoveď [38].

Ďalšie klinické výsledky štúdie I poukázali na účinnosť DNA vakcíny pING-MAM-A kódujúcej proteín mammaglobin-A (MAM-A), ktorý sa exprimuje u 80 % pacientiek s karcinómom prsníka. Vakcína bola podaná intramuskulárne v 3 dávkach na 1., 4. a 8. týždeň pacientkam s metastázujúcim karcinómom prsníka (NCT00807781). Vakcína bola dobre tolerovaná a preukázala nasledovné pozitívne účinky: a) zvýšená tvorba CD8<sup>+</sup> T-lymfocytov voči MAM-A, b) znížená hladina Treg-lymfocytov a následne IL-10, c) zvýšenie percenta prežívania bez progresie (PFS) v období 6 mesiacov (53 % imunizovaných vs. 33 % kontrola,  $p = 0,011$ ) [39, 40]. Ďalšia DNA vakcína V930, ktorá exprimovala HER2/CEA bola testovaná u pacientov s rôznymi HER2<sup>+</sup>/CEA<sup>+</sup> solidnými tumormi stupňa II – IV ( $n=33$ ). Vakcína bola podaná i.m. elektoporáciou v 5 dávkach každých 14 dní. Klinická štúdia fázy I poukázala na aktiváciu bunkovej aj protilátkovej imunitnej odpovede, avšak zvýšená bunková odpoveď voči cieľovým antigénom sa nepozorovala [41]. Sľubné výsledky klinickej fázy II zaznamenala DNA vakcína exprimujúca PAP podaná intradermálne spolu s GM-CSF pacientom s karcinómom prostaty ( $n = 17$ , NCT00849121). U 50 % pacientov sa aktivovala tvorba CD8<sup>+</sup> T-lymfocytov špecifických voči PAP a u 70 % pacientov sa nezistila tvorba metastáz po roku od vakcinácie ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

V posledných 2 rokoch sa začínajú vo väčšej miere testovať tzv. personalizované DNA-vakcíny, ktoré exprimujú okrem známych nádorových antigénov aj tzv. neoantigény. V klinickej štúdií fázy I bola testovaná DNA vakcína kódujúca fragment scFv pacienta naviazaného na fragment C tetanického toxínu. Vakcína bola podaná pacientom s mnohopočetným myelómom v 6 dávkach i.m. po chemoterapii alebo transplantácii kostnej drene. Výsledky ukázali, že 84 % pacientov aktivovalo zvýšenú tvorbu bunkovej imunitnej odpovede a u 64 % sa zvýšil medián celkového prežívania pri sledovaní do 85,6 mesiaca [42]. V súčasnosti sú v klinickom testovaní fázy I/II dve personalizované DNA vakcíny u pacientiek s karcinómom prsníka (NCT02348320 a NCT03199040), personalizovaná DNA vakcína v kombinácii s terapiou inhibítorov kontrolných bodov u pacientov s karcinómom prostaty (NCT03532217), personalizovaná DNA vakcína v kombinácii s chemoterapiou u pacientov s karcinómom pankreasu (NCT03122106) a personalizovaná DNA vakcína v kombinácii s terapiou inhibítorov kontrolných bodov u pacientov s karcinómom obličiek (NCT03598816).

Onkolytické vírusy patria medzi ďalšie prístupy v protinádorovej liečbe najmä solídnych tumorov. Výhodou aplikácie onkolytických vírusov je, že priamo lyzujú nádorové bunky bez nutnosti poškodenia zdravého tkaniva. Okrem priamej lýzy nádorového tkaniva onkolytické vírusy aktivujú prirodzené a získané imunitné mechanizmy protinádorovej imunity, ktoré prispievajú k ďalšej eliminácii nádoru. Medzi vírusy s onkolytickým potenciálom patria adenovírusy, vírus vakcínie, herpetické vírusy a retrovírusy. V klinickej praxi sa začali v protinádorovej liečbe používať geneticky modifikované herpetické vírusy [43]. T-VEC (talimogene laherparepvec, CA, USA) je atenuovaný HSV-1 vírus (kmeň JS1) s deléciou v géne ICP34.5 (faktor neurovirulencie), ICP47 (inhibuje prezentáciu antigénov) a zvýšenou expresiou US11 (zvyšuje replikáciu HSV-1). Súčas-

ťou atenuovaného vírusu je sekvencia kódujúca GM-CSF [44]. T-VEC bol ako jediný schválený FDA v roku 2015 v terapii pacientov s neresekovateľným progredujúcim melanómom kože bez odpovede na konvenčnú liečbu. Vakcína sa podáva injekčne priamo do nádoru na 1. deň, 4. týždeň a každé 2 týždne po dobu najmenej 6 mesiacov. Výsledky klinickej štúdie fázy III poukázali na predĺženie mediánu celkového prežívania u pacientov o 4,4 mesiaca (medián OS po aplikácii vakcíny bol 23,3 mesiaca vs. 18,9 u skupiny s podaným GM-CSF) [45]. V súčasnosti sa T-VEC vakcína testuje v liečbe iných druhov melanómov a ďalších druhov solídnych nádorov ako napr. karcinómu pankreasu, prsníka, hrubého čreva, konečníka a metastatického skvamózneho karcinómu hlavy a krku [46]. Perspektívou je podávanie T-VEC vakcíny v kombinácii s inými druhmi imunoterapie rôznych druhov nádorov. Prebiehajú nasledujúce klinické štúdie fázy II: T-VEC v kombinácii s pembrolizumabom (mAb proti PD-1) u pacientov s metastatickým sarkómom (n=26, NCT03069378) a T-VEC v kombinácii s nivolumabom (mAb proti PD-1) u pacientov s lymfómami a nádorov kože iných ako melanómov (n=68, NCT02978625).

Vakcinácia dendritovými bunkami (DC) predstavuje ďalšiu sľubnú stratégiu v liečbe nádorov. Dendritové bunky patria medzi významné bunky protinádorovej imunity. Ako profesionálne bunky prezentujúce antigén dokážu prezentovať nádorový antigén a aktivovať aj CD4<sup>+</sup> aj CD8<sup>+</sup> T-bunkovú imunitnú odpoveď. Dendritové bunky sa začali využívať v experimentálnej liečbe nádorov pred viac ako 20 rokmi, odvtedy došlo k viacerým technickým pokrokom pri ich príprave. V liečbe sa využívajú najmä dendritové bunky pripravené maturáciou monocytov a iných DC prekursorov (PBMC) *in vitro* izolovaných od pacienta leukaferézou. Prekursori DC sú najprv kultivované v prítomnosti GM-CSF a IL-4 za vzniku nezrelých DC po dobu 2 – 5 dní. Po aktivácii DC nádorovými antigénmi (24. – 48. hod.) a ich maturácii v prítomnosti LPS alebo IFN- $\gamma$  sa takto pripravené DC aplikujú pacientovi rôznymi cestami (intradermálne, subkutánne, intravenózne, intranodálne) [47]. Prvou a doteraz jedinou terapeutickou vakcínou využívajúcou dendritové bunky je od roku 2010 Sipuleucel-T. Vakcína sa používa v liečbe pokročilého metastatického karcinómu prostaty. Dendritové bunky pacienta pripravené z prekursorov sú stimulované *in vitro* fúznym proteínom PAP. Výsledky klinickej štúdie fázy III poukázali na predĺženie mediánu celkového prežívania u pacientov o 4,1 mesiaca (medián OS po aplikácii vakcíny bol 25,8 mesiaca vs. 21,7 u skupiny s placebo) a zníženie relatívneho rizika úmrtia o 22% ( $p=0,02$ ) [48].

V súčasnosti sú v klinickom testovaní fázy I, II a III viaceré DC vakcíny v liečbe rôznych druhov nádorov, ktoré sa líšia výberom nádorového antigénu (napr. lyzáty nádorových buniek, nádorovo-špecifické antigény a neoantigény). Výsledky týchto testovaní sú podrobne zhrnuté v článku Mastelic-Gavillet et al., 2019 [49]. V klinickom testovaní fázy III je vakcína DCVax-L. Testuje sa u pacientov s novodiagnostikovaným glioblastómom, ktorí podstúpili liečbu chemoterapiou a rádioterapiou (NCT00045968). DC-bunky pacienta pripravené z prekursorov sú stimulované autológnym lyzátom buniek nádoru. Vakcína sa podáva intradermálne 6-krát v prvom roku liečby a 2-krát ročne

v ďalšom roku liečby. Klinické skúšky poukázali na predĺženie celkového prežívania u pacientov o 8,1 mesiaca (medián OS po aplikácii vakcíny bol 23,1 mesiaca vs 15-17 mesiacov u skupiny s placebom) [50].

V súčasnosti sa vyvíja druhá generácia DC vakcín obsahujúca subpopulácie DC-buniek izolovaných priamo z krvi pacienta (CD11c<sup>+</sup> mDC a CD123<sup>+</sup> pDC). Zistilo sa, že tieto subpopulácie aktivujú efektívnejšiu imunitnú odpoveď v porovnaní s prekursor-mi DC buniek [51]. Výsledky klinickej štúdie fázy I poukázali na imunogénnosť a toleranciu DC vakcín druhej generácie u pacientov s metastatickým melanómom [52], karcinómom prostaty [53] a ALL [54].

## Záver

Stav imunitného systému má rozhodujúcu úlohu v obrane organizmu proti vzniku a rozvoju nádorového procesu. Detailnejšie poznanie protinádorových imunitných mechanizmov prinieslo významné pokroky v prevencii a liečbe onkologických chorôb. Imunoterapia sa v súčasnosti stáva popri chirurgickej liečbe, rádioterapii a chemoterapii plnohodnotnou liečebnou metódou s veľkou perspektívou. Nové možnosti imunoterapie zahŕňajú inhibíciu imunitných kontrolných bodov (CTLA-4, PD-1, PD-L1), vakcináciu (DC-vakcíny) a adoptívnu bunkovú terapiu využívajúcu modifikované CAR T-bunky. Heterogenita mikroprostredia nádorov poukazuje na to, že budúcnosť liečby nádorov bude spočívať v personalizovanej terapii. Znamená kombináciu viacerých stratégií protinádorovej terapie „ušitú“ na mieru pacienta. V súčasnosti prebiehajú viaceré klinické štúdie, ktoré vyhodnocujú rôzne spôsoby imunoterapie, ich kombináciu s inými liečebnými postupmi a optimálne možnosti načasovania. Sľubné výsledky zaznamenala protinádorová terapia využívajúca inhibíciu imunitných kontrolných bodov CTLA-4 a PD-1 v kombinácii s rádioterapiou, chemoterapiou alebo DC vakcínami. Ďalšia stratégia v liečbe nádorov bude zameraná na identifikáciu neoantigénov pacienta metódou sekvenovania exozómov. Poznanie biomarkerov nádorového prostredia umožní zvoliť optimálnu kombináciu terapie, čo predstavuje významný cieľ klinickej praxe v budúcnosti.

## Literatúra

- [1] Burnet M: Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1957, 1(5022): 779-786.
- [2] Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ: New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 2014, 27: 16-25.
- [3] Bucova M, Kluckova K, Buc M: Mechanizmy imunitného systému v boji proti nádorom a príčiny ich zlyhania. *Onkológia (Bratisl)* 2018, 13(2): 87-93.
- [4] Strohl WR: Current progress in innovative engineered antibodies. *Protein Cell* 2018, 9(1): 86-120.
- [5] Buchbinder EI, Desai A: CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol* 2016, 39(1): 98-106.

[6] Muenst S, Laubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S: The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *J Intern Med* 2016, 279(6): 541-562.

[7] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC *et al*: Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010, 363(8): 711-723.

[8] McDermott DF, Atkins MB: PD-1 as a potential target in cancer therapy. *Cancer Med* 2013, 2(5): 662-673.

[9] Barbee MS, Ogunniyi A, Horvat TZ, Dang TO: Current status and future directions of the immune checkpoint inhibitors ipilimumab, pembrolizumab, and nivolumab in oncology. *Ann Pharmacother* 2015, 49(8): 907-937.

[10] Swart M, Verbrugge I, Beltman JB: Combination Approaches with Immune-Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Front Oncol* 2016, 6: 233.

[11] Stenehjem DD, Tran D, Nkrumah MA, Gupta S: PD1/PDL1 inhibitors for the treatment of advanced urothelial bladder cancer. *Onco Targets Ther* 2018, 11: 5973-5989.

[12] Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Wagstaff J, Schadendorf D, Ferrucci PF *et al*: Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 2017, 377(14): 1345-1356.

[13] Hawkins RE, Gilham DE, Debets R, Eshhar Z, Taylor N, Abken H, Schumacher TN, Consortium A: Development of adoptive cell therapy for cancer: a clinical perspective. *Hum Gene Ther* 2010, 21(6): 665-672.

[14] Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG: Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90(2): 720-724.

[15] Dai H, Wang Y, Lu X, Han W: Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *J Natl Cancer Inst* 2016, 108(7).

[16] Jena B, Moyes JS, Huls H, Cooper LJ: Driving CAR-based T-cell therapy to success. *Curr Hematol Malig Rep* 2014, 9(1): 50-56.

[17] Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, Hale GA, Rousseau A, Smith CA, Bollard CM, Liu H, Wu MF, Rochester RJ *et al*: Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* 2010, 115(5): 925-935.

[18] Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, Bader P, Verneris MR, Stefanski HE, Myers GD *et al*: Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2018, 378(5): 439-448.

[19] Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, Miklos DB, Lekakis LJ, Oluwole OO, Lin Y, Braunschweig I, Hill BT, Timmerman JM *et al*: Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol* 2019, 20(1): 31-42.

[20] Maude SL, Barrett D, Teachey DT, Grupp SA: Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies. *Cancer J* 2014, 20(2): 119-122.

[21] Wang X, Xiao Q, Wang Z, Feng WL: CAR-T therapy for leukemia: progress and challenges. *Transl Res* 2017, 182: 135-144.

[22] Gill S, Tasian SK, Ruella M, Shestova O, Li Y, Porter DL, Carroll M, Danet-Desnoyers G, Scholler J, Grupp SA *et al*: Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloblast using chimeric antigen receptor-modified T cells. *Blood* 2014, 123(15): 2343-2354.

- [23] Raje N, Hege K, Kochenderfer JN: Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy in Multiple Myeloma. Reply. *N Engl J Med* 2019, 381(3): e6.
- [24] Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Diouf O, Liu E *et al*: Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* 2011, 118(23): 6050-6056.
- [25] Ahmed N, Brawley VS, Hegde M, Robertson C, Ghazi A, Gerken C, Liu E, Dakhova O, Ashoori A, Corder A *et al*: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) -Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J Clin Oncol* 2015, 33(15): 1688-1696.
- [26] Beatty GL, O'Hara MH, Lacey SF, Torigian DA, Nazimuddin F, Chen F, Kulikovskaya IM, Soulen MC, McGarvey M, Nelson AM *et al*: Activity of Mesothelin-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells Against Pancreatic Carcinoma Metastases in a Phase 1 Trial. *Gastroenterology* 2018, 155(1): 29-32.
- [27] Zeltsman M, Dozier J, McGee E, Ngai D, Adusumilli PS: CAR T-cell therapy for lung cancer and malignant pleural mesothelioma. *Transl Res* 2017, 187: 1-10.
- [28] Junghans RP, Ma Q, Rathore R, Gomes EM, Bais AJ, Lo AS, Abedi M, Davies RA, Cabral HJ, Al-Homsi AS *et al*: Phase I Trial of Anti-PSMA Designer CAR-T Cells in Prostate Cancer: Possible Role for Interacting Interleukin 2-T Cell Pharmacodynamics as a Determinant of Clinical Response. *Prostate* 2016, 76(14): 1257-1270.
- [29] Lamers CH, Klaver Y, Gratama JW, Sleijfer S, Debets R: Treatment of metastatic renal cell carcinoma (mRCC) with CAIX CAR-engineered T-cells-a completed study overview. *Biochem Soc Trans* 2016, 44(3): 951-959.
- [30] Lamm DL, Blumenstein BA, Crawford ED, Montie JE, Scardino P, Grossman HB, Stanisc TH, Smith JA, Jr., Sullivan J, Sarosdy MF *et al*: A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacille Calmette-Guerin for transitional-cell carcinoma of the bladder. *N Engl J Med* 1991, 325(17): 1205-1209.
- [31] Sylvester RJ, van der MA, Lamm DL: Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 2002, 168(5): 1964-1970.
- [32] Hanna MG, Jr., Peters LC: Specific immunotherapy of established visceral micrometastases by BCG-tumor cell vaccine alone or as an adjunct to surgery. *Cancer* 1978, 42(6): 2613-2625.
- [33] Guo C, Manjili MH, Subjeck JR, Sarkar D, Fisher PB, Wang XY: Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. *Adv Cancer Res* 2013, 119: 421-475.
- [34] Schlom J, Hodge JW, Palena C, Tsang KY, Jochems C, Greiner JW, Farsaci B, Madan RA, Heery CR, Gulley JL: Therapeutic cancer vaccines. *Adv Cancer Res* 2014, 121: 67-124.
- [35] Gulley JL, Borre M, Vogelzang NJ, Ng S, Agarwal N, Parker CC, Pook DW, Rathenborg P, Flaig TW, Carles J *et al*: Phase III Trial of PROSTVAC in Asymptomatic or Minimally Symptomatic Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Clin Oncol* 2019, 37(13): 1051-1061.
- [36] Harrop R, Shingler W, Kelleher M, de Belin J, Treasure P: Cross-trial analysis of immunologic and clinical data resulting from phase I and II trials of MVA-5T4 (TroVax) in colorectal, renal, and prostate cancer patients. *J Immunother* 2010, 33(9): 999-1005.
- [37] Trimble CL, Morrow MP, Kraynyak KA, Shen X, Dallas M, Yan J, Edwards L, Parker RL, Denny L, Giffear M *et al*: Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical



intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet* 2015, 386(10008): 2078-2088.

[38] Eriksson F, Totterman T, Maltais AK, Pisa P, Yachnin J: DNA vaccine coding for the rhesus prostate specific antigen delivered by intradermal electroporation in patients with relapsed prostate cancer. *Vaccine* 2013, 31(37): 3843-3848.

[39] Tiriveedhi V, Fleming TP, Goedegebuure PS, Naughton M, Ma C, Lockhart C, Gao F, Gillanders WE, Mohanakumar T: Mammaglobin-A cDNA vaccination of breast cancer patients induces antigen-specific cytotoxic CD4+ICOShi T cells. *Breast Cancer Res Treat* 2013, 138(1): 109-118.

[40] Tiriveedhi V, Tucker N, Herndon J, Li L, Sturmoski M, Ellis M, Ma C, Naughton M, Lockhart AC, Gao F *et al*: Safety and preliminary evidence of biologic efficacy of a mammaglobin-a DNA vaccine in patients with stable metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2014, 20(23): 5964-5975.

[41] Diaz CM, Chiappori A, Aurisicchio L, Bagchi A, Clark J, Dubey S, Fridman A, Fabregas JC, Marshall J, Scarselli E *et al*: Phase 1 studies of the safety and immunogenicity of electroporated HER2/CEA DNA vaccine followed by adenoviral boost immunization in patients with solid tumors. *J Transl Med* 2013, 11: 62.

[42] McCann KJ, Godeseth R, Chudley L, Mander A, Di Genova G, Lloyd-Evans P, Kerr JP, Malykh VB, Jenner MW, Orchard KH *et al*: Idiotypic DNA vaccination for the treatment of multiple myeloma: safety and immunogenicity in a phase I clinical study. *Cancer Immunol Immunother* 2015, 64(8): 1021-1032.

[43] Howells A, Marelli G, Lemoine NR, Wang Y: Oncolytic Viruses-Interaction of Virus and Tumor Cells in the Battle to Eliminate Cancer. *Front Oncol* 2017, 7: 195.

[44] Hu JC, Coffin RS, Davis CJ, Graham NJ, Groves N, Guest PJ, Harrington KJ, James ND, Love CA, McNeish I *et al*: A phase I study of OncoVEXGM-CSF, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* 2006, 12(22): 6737-6747.

[45] Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, Delman KA, Spitler LE, Puzanov I, Agarwala SS *et al*: Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol* 2015, 33(25): 2780-2788.

[46] Raman SS, Hecht JR, Chan E: Talimogene laherparepvec: review of its mechanism of action and clinical efficacy and safety. *Immunotherapy* 2019, 11(8): 705-723.

[47] Dhodapkar MV, Steinman RM, Sapp M, Desai H, Fossella C, Krasovskiy J, Donahoe SM, Dunbar PR, Cerundolo V, Nixon DF *et al*: Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest* 1999, 104(2): 173-180.

[48] Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB *et al*: Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2010, 363(5): 411-422.

[49] Mastelic-Gavillet B, Balint K, Boudousquie C, Gannon PO, Kandalafi LE: Personalized Dendritic Cell Vaccines-Recent Breakthroughs and Encouraging Clinical Results. *Front Immunol* 2019, 10: 766.

[50] Liau LM, Ashkan K, Tran DD, Campian JL, Trusheim JE, Cobbs CS, Heth JA, Salacz M, Taylor S, D'Andre SD *et al*: First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *J Transl Med* 2018, 16(1): 142.

[51] Robbins SH, Walzer T, Dembele D, Thibault C, Defays A, Bessou G, Xu H, Vivier E, Sellars

M, Pierre P *et al*: Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol* 2008, 9(1): R17.

[52] Tel J, Aarntzen EH, Baba T, Schreibelt G, Schulte BM, Benitez-Ribas D, Boerman OC, Croockewit S, Oyen WJ, van Rossum M *et al*: Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients. *Cancer Res* 2013, 73(3): 1063-1075.

[53] Prue RL, Vari F, Radford KJ, Tong H, Hardy MY, D'Rozario R, Waterhouse NJ, Rossetti T, Coleman R, Tracey C *et al*: A phase I clinical trial of CD1c (BDCA-1)+ dendritic cells pulsed with HLA-A\*0201 peptides for immunotherapy of metastatic hormone refractory prostate cancer. *J Immunother* 2015, 38(2): 71-76.

[54] Hsu JL, Bryant CE, Papadimitriou MS, Kong B, Gasiorowski RE, Orellana D, McGuire HM, Groth BFS, Joshua DE, Ho PJ *et al*: A blood dendritic cell vaccine for acute myeloid leukemia expands anti-tumor T cell responses at remission. *Oncoimmunology* 2018, 7(4): e1419114.

Adresa:

Doc. RNDr. Vladimíra Ďurmanová, PhD.

Imunologický ústav LF UK

Odborárske nám. 14

813 72 Bratislava

Mail: vladimira.durmanova@fmed.uniba.sk

## TRAUMATICKÉ POŠKODENIE MOZGU U HRÁČOV ĽADOVÉHO HOKEJA IDENTIFIKÁCIA MOLEKULOVÝCH MARKEROV A DRÁH

Tóth I.<sup>1</sup>, Parničan S.<sup>1</sup>, Mátyássová K.<sup>2</sup>, Babindáková N.<sup>2</sup>, Porubská S.<sup>2</sup>,  
Čente M.<sup>2</sup>, Filipčík P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakulta telesnej výchovy a športu UK, Bratislava

<sup>2</sup>Neuroimunologický ústav, Slovenská akadémia vied, Bratislava

### Abstrakt

Úrazy hlavy a krku často vedú k traumatickému poškodeniu mozgu (TPM), ktoré môže mať chronické a dlhotrvajúce následky. K najvážnejším dôsledkom mierneho, ale predovšetkým opakovaného TPM patria neuro-psychiatrické prípadne neurodegeneračné choroby, ktoré dodnes ešte nie sú liečiteľné. Aj napriek existujúcim vážnym rizikám sa pacient po TPM vracia do bežného života na základe subjektívneho posúdenia svojho zdravotného stavu. Pomocou psychologických a kognitívnych testov, obrazovej analýzy a neurologického vyšetrenia je síce možné identifikovať poškodenie centrálného nervového systému, avšak tie nie sú spoľahlivé pre stanovenie času ukončenia liečby a určenie bezpečného návratu do bežného života. Pre tento účel by boli najvhodnejšie molekulové biomarkery, ktoré je možné presne kvantifikovať, a to najlepšie v periférnej krvi, plazme alebo iných mimo-bunkových tekutinách. Takéto ideálne biomarkery však doposiaľ neexistujú. Preto je cieľom experimentálneho výskumu nájsť spoľahlivé a objektívne merateľné molekulové markery pre vylúčenie rizika predčasného ukončenia liečby TPM.

Veľmi významnou skupinou populácie vystavenej zvýšenému riziku TPM sú hráči kontaktných športov, napríklad ľadového hokeja. Je to jeden z najrýchlejších kolektívnych športov na svete. Otrasy mozgu sú pri ňom časté a vznikajú hlavne vtedy, keď hráč nečaká fyzický kontakt, keď nie je pripravený na súboj, alebo sa už svalovo uvoľnil napríklad po prihrávke alebo po strele. K úrazom hlavy a následnému TPM však v ľadovom hokeji dochádza pravidelne a početnosť úrazov počas sezóny je na základe štatistických údajov predvídateľná. Hokejisti sú ideálnou skupinou ľudskej populácie, v rámci ktorej je možné identifikovať panel molekulových biomarkerov pre sledovanie priebehu liečby po úraze hlavy a stanovenie času bezpečného návratu do hry. Molekulová analýza periférnej krvi povedie nielen k návrhu diagnostického testu aj pre pacientov všeobecnej populácie, ale aj k pochopeniu mechanizmov indukovaných úrazom. Poznatky získané analýzou krvi hokejistov budú mimoriadne cenné nielen pre hráčov samotných, ich hráčsku kariéru, ale nájdu všeobecné uplatnenie v bežnej populácii pri diagnostike pacientov po úrazoch hlavy a krku.

### Kľúčové slová:

traumatické poškodenie mozgu, ľadový hokej, biomarkery, miRNA, signálne dráhy

## Summary

The impact on the head and neck can often lead to traumatic brain injury (TBI), which can have chronic and long-term consequences. Neuro-psychiatric or neuro-degenerative diseases are among the most serious consequences of mild (single or repeated) TBI, which are not yet treatable. Despite the serious risks involved, the patient returns to normal life after TBI based on a subjective assessment of his / her health conditions. Although psychological and cognitive tests as well as neuroimaging and neurological examination can identify central nervous system damage, they are not reliable in determining the time of treatment termination and determining a safe return to normal life. Molecular biomarkers that can be accurately identified and quantified are most suitable for this purpose, preferably in peripheral blood, plasma or other non-cellular fluids. However, such ideal biomarkers do not yet exist. Therefore, the major aim of experimental research of many laboratories is to find reliable and objectively measurable molecular markers to avoid the risk of premature discontinuation of TBI therapy. A very important group of the human population exposed to an increased risk of TBI are contact sports players, such as ice hockey players. It is one of the fastest team sports in the world. Concussion of the brain is frequent and occurs mainly when the player does not expect a physical encounter, when he is not ready to fight, or has already relaxed muscularly in a specific part of game. Head injuries and subsequent TBI occur regularly and predictably in ice hockey. Hockey players are therefore an ideal group of the human population in which a panel of molecular biomarkers can be identified to monitor the course of treatment after head trauma and determine the safe return time to the game. Molecular analysis of peripheral blood can lead not only to the design of a diagnostic test for patients of the general population, but also to an understanding of the mechanisms initiated by a head injury. The knowledge gained by hockey players' blood analysis will be extremely valuable not only for the players themselves, their sport career, but will find an application in the general population, in the diagnosis of patients after head and neck injuries.

### Key words:

traumatic brain injury, ice hockey, biomarkers, miRNA, signalling pathways

## Úvod

**Úrazy hlavy a krku sú primárnou príčinou traumatického poškodenia mozgu.** TPM sa prejavuje veľmi širokým spektrom príznakov a vo všeobecnej ľudskej populácii predstavuje veľmi vážny zdravotný problém. Podľa štatistik postihuje v celosvetovom meradle 3-4 milióny ľudí ročne, pričom jeho presná biochemická diagnostika a určenie stupňa poškodenia je stále nepresné a málo spoľahlivé (Phillips, S. a Woessner, D. 2015; Kulbe, J.R. a Geddes, J.W. 2016). Aj keď všetky dôsledky akútneho alebo opakovaného TPM nie sú doposiaľ presne popísané, je známe, že indukuje celú sériu neuro-

logických konsekvencií sprostredkovanú hlavne neurozápalom zahŕňajúcim aktiváciu CNS-rezidentných, gliových, imunitne aktívnych buniek ako aj aktiváciu periférnych zložiek imunitného systému (Ling et al. 2015). Dôležité je, že nielen opakované, ale aj jednorazové a mierne traumatické poškodenie mozgu (mTPM) môže viesť k chronickej degenerácii CNS.

Špeciálnou skupinou ľudskej populácie v rámci ktorej sa TPM vyskytuje často a predvídateľne sú športovci hrajúci kontaktné športy ako sú napríklad futbal, hokej, box a mnohé ďalšie. U hráčov ľadového hokeja ide o sporadický športový úraz, ktorý sa vyskytuje v priebehu sezóny pomerne často. Vážne ohrozuje zdravotný stav hráča a na dlhší čas ho eliminuje z tréningov i zápasov. Býva to spravidla niekoľko týždňov až mesiacov. Počas liečby prechádza hráč rôznymi fázami, pričom u každého hráča prebieha liečba individuálne. Zranený hráč sa cíti počas rekonvalescencie subjektívne celkom dobre, to však býva častokrát klamlivé. Väčšinou si nereálne nahovára predčasné zlepšenie svojho zdravotného stavu a túži po čo najskoršom návrate na ľad. Jeho následné pokračovanie v zápasovom alebo v tréningovom procese býva podmienené subjektívne, pretože okrem neuro-kognitívnych testov neexistujú ďalšie spoľahlivé a objektívne merateľné parametre. Preto sa po zlepšení zdravotného stavu hráča vykonávajú tzv. skúšobné fázy fyzického návratu do tréningového procesu. Je to však metóda „pokús–omyl“, ktorá môže mať vážny vplyv na neskorší športový výkon i celkový zdravotný stav hráča.

Zo štatistík a osobných údajov hokejových trénerov je známe, že v jednej sezóne (čo predstavuje približne 55-60 zápasov za 7-8 mesiacov), dochádza v jednom mužstve (20-22 hokejistov) k vážnym zraneniam hlavy a krku asi 3-4 krát. Ide o poranenia, pri ktorých je nutné po podaní prvej pomoci odviešť hráča zdravotnou záchrannou službou do nemocnice, kde mu je poskytnuté ďalšie ošetrovanie s následným špecifickým diagnostickým vyšetrením zahŕňajúcim o. i. CT. Zranený ostáva na pozorovaní a dĺžka liečby býva 2-3 dni až 1-3 týždne. Pre návrat do tréningového procesu je potrebné, aby špecifické znaky úrazu pominuli a hráčovi nehrozili nepriaznivé dôsledky, spôsobené predčasným návratom na ľad. Aj napriek intenzívnemu výskumu dodnes neexistuje spoľahlivý diagnostický test pre spoľahlivé určenie času pre bezpečný návrat do hry (Zetterberg, H. a Blennow, K. 2015).

Hokejisti sú ideálnou skupinou ľudskej populácie, v rámci ktorej je možné identifikovať panel molekulových biomarkerov pre sledovanie priebehu liečby TPM a stanovenie času bezpečného návratu do bežného života, resp. do hry, čo je dôležité hlavne preto, že opakovaný úraz ešte nedoliečeného hráča predstavuje riziko trvalého poškodenia mozgu.

### **Ľadový hokej – kontaktný šport s častým výskytom úrazov hlavy**

V ľadovom hokeji sa často vyskytujú prípady kedy hokejisti mávajú vo svojej športovej kariére viacero otrasov mozgu, a to v rôznych ligových fázach súťaže (základná časť, nadstavba, play-out a play-off). Obzvlášť kritické prípady traumatických poško-

dení hlavy a krku bývajú hlavne tie opakované, ale zvláštnu pozornosť si zaslúžia aj postoje hráčov k vlastným zraneniam a úrazom, a to najmä v závere súťaží (počas play-off). Vtedy hráči z dôvodu súťaživosti, vonkajšej i vnútornej rivality, majú silné tendencie hrať za každú cenu a nastúpiť do zápasu čo najskôr. Je známy prípad, že v sezóne 2018-2019, sa obranca finálového mužstva najvyššej slovenskej hokejovej súťaže mužov **po otrase mozgu pokúšal vrátiť na ľad, aj keď na to objektívne nebol pripravený. Podľa rozhovoru pre tlač sa hráč vyjadril nasledovne: „Aj ja som patril k hráčom, ktorí mali zdravotné problémy, konkrétne otras mozgu. Začalo sa to už v 5. semifinálovom zápase. Snažil som sa to prekonať, preto som nenastúpil do šiesteho. V siedmom som síce hral, no počas neho som odstúpil. Aj neskôr som to ešte skúšal, ale nebolo to dobré. Ak by sa to nestalo v play-off, ale v základnej časti, tak by som určite mal dlhšiu pauzu. Nemali sme však až taký široký káder, navyše som chcel mužstvu čo najviac pomôcť.” (teraz.sk, 2019).**

Veľmi nebezpečný býva súperov tvrdý fyzický nájazd s nakorčuľovaním v tzv. „mŕtvom uhle“. Ide o uhol nájazdu agresívneho hráča na protihráča, v ktorom ho protihráč v zornom periférnom uhle vôbec nevidí a neočakáva žiaden súboj. Po takomto nedovolenom zákroku súpera hráč neovládane a nekoordinovane padá na tvrdú ľadovú plochu či inú prekážku. Po náraze a páde býva najhorší protipohyb hlavy a krku vzhľadom na pád a úder o ľad či plexisklo s mantinelom a mantinel. V podstate ide o akčný a reakčný nekontrolovaný pohyb samotnej hlavy hokejistu, hoci je chránená v hokejovej prilbe. Takto vzniká otras mozgu v dutine lebečnej. Týmto mechanizmom vznikajú vážne traumatické zmeny v mozgu. Známy slovenský športový lekár popisuje takéto situácie na príklade boxerov nasledovne: „Vinou úderov sa mozog, obúchava o vnútornú stenu lebečnej kosti, vzniká zakrvácanie, ktoré sa následkom viacerých úderov kumuluje, prasknutím cievy sa rozširuje a ak narazí na nejaký väčší oddiel mozgu, spôsobí narušenie dôležitých životných funkcií” (Malovič P., 2019).

### **Špecifiká traumatického poškodenia mozgu**

Je pozoruhodné že v prípade jednorazového TPM sa väčšina (približne 70-80%) pacientov spontánne uzdraví. Ak dôjde k opakovanému úrazu, možné komplikácie veľmi výrazne narastajú a väčšina pacientov môže začať trpieť vážnymi poruchami centrálného nervového systému. Bežne sa to stáva v prípadoch úrazov hlavy nielen u kontaktných športovcov, ale aj pri určitých formách násillia.

V súčasnosti nemáme k dispozícii molekulové markery, pomocou ktorých by bolo možné objektívne, špecificky a dostatočne citlivo identifikovať pacienta v riziku potenciálnych komplikácií nasledujúcich po TPM. Chýba aj efektívna terapia TPM a spoľahlivé posúdenie rizikového stavu pacienta. Preto je veľmi dôležité zamerať experimentálny výskum na vývoj metódy pre stratifikáciu pacientov po traumatickom poškodení mozgu a identifikáciu molekulových markerov, ako aj potenciálnych terapeutických cieľov pre personalizovanú liečbu a prevenciu neurodegenerácie indukovanej traumatickým poškodením mozgu.

Cieľovým tkanivom pre analýzy na posúdenie zdravotného stavu pacientov môže byť mozgovomiešna tekutina, ale aj periférna krv, prípadne iné mimotelové tekutiny - teda v ľahko dostupný zdroj biologického materiálu. Je známe, že do krvi sa z mozgu vyplavuje množstvo biomakromolekúl, ktoré by mohli slúžiť nielen diagnosticky, ale aj prognosticky. Je to veľmi významné, keďže je to popri neuro-kognitívnom vyšetrení jediným možným signálom, ktorý po TPM máme k dispozícii. Potenciál molekulovej analýzy plazmy pacientov po TPM je v tom, že umožní identifikovať molekulové dráhy, ktoré vedú k dvom diametrálne odlišným stavom, a to **(1) na jednej strane k mechanizmom vedúcim k spontánnemu uzdraveniu po TPM** a na druhej strane k **(2) molekulovým procesom typickým pre najrannejšiu fázu neuropatie**. Je zrejmé, že kombináciou dát z týchto dvoch tak odlišných stavov bude možné nielen navrhnúť stratifikáciu pacientov po TPM, ale porozumieť vývoju neuropatológie a v dlhodobom horizonte navrhnúť efektívnu terapeutickú stratégiu pre pacientov po TPM.

### **Molekulové mechanizmy vedúce k neuropatii**

Je všeobecne známe, že konverzia proteínov z fyziologickej na patologickú formu je jedným zo základných molekulových mechanizmov podmieňujúcich vznik a progresiu závažných ochorení centrálného nervového systému (CNS). Porucha v proteostáze nervových buniek môže byť podmienená geneticky, avšak vo viac ako 90% prípadoch je to vplyvom prostredia, a to prostredníctvom celého spektra rizikových faktorov. Ak organizmus pomocou reparačných mechanizmov nedokáže proteostázu opätovne nastoliť, dochádza k chorobným prejavom. Dodnes nie je známe kedy, kde presne, a akým spôsobom dochádza k patogénnej konverzii pôvodne solubilných neuroproteínov na vysokomolekulové nerozpustné proteínové agregáty. Preto choroby CNS ako napríklad demencia a neurodegenerácie rôznych typov, nielen že sú neliečiteľné, ale ani ich dostatočne presná diferenciálna *ante-mortem* diagnostika nie je doposiaľ možná (Fransquet P.D. et al. 2017; Sheikh-Bahaei N. et al. 2017).

Existujú dva hlavné dôvody, prečo doteraz nemáme k dispozícii ani liečivá, ani spoľahlivé a včasné biomarkery vážnych porúch a chorôb CNS. Prvým je skutočnosť, že výsledky získané v animálnych experimentálnych modeloch nie sú vždy dobre translatovateľné na človeka (Wendler A. and Wehling M. 2017; Li C. and Götz J. 2017). Mnohé terapie CNS sú veľmi efektívne na myšiach alebo iných experimentálnych zvieratách, avšak na ľuďoch zlyhávajú. Sú známe mnohé príklady z oblasti liečby neuropsychiatrických chorôb, kedy molekula s veľmi dobrým bezpečnostným profilom a veľmi dobrou efektivitou vo zvieratách, nielenže nefungovala u ľudí, ale mala aj mnohé nežiadúce účinky a klinické testy museli byť zastavené (prehľad: Liu YH et al. 2015). Druhým, pochopiteľným, dôvodom je nedostupnosť ľudského mozgového tkaniva. Pracovať s ľudským materiálom je možné až po pomerne dlhom čase *post-mortem*. Pritom de-gradačné procesy rýchlo postupujú a radikálne menia vlastnosti tkaniva a biomolekúl, čo sťažuje interpretáciu výsledkov.

Neinvazívnych možností výskumu CNS je veľmi málo a odhliadnuc od zobrazovacích techník, nezostáva pre experimentálnu (napr. molekulárne-biologickú a bioche-

mickú) analýzu veľa dostupných zdrojov: cerebrospinálna tekutina, plazma, sliny a iné telesné tekutiny. Keďže mnohé neuropsychiatrické ochorenia sa vyvíjajú pomaly a postupne celé roky alebo desaťročia, nie je prakticky reálne skúmať u človeka etiopatogénu týchto chorôb ako takú, pomocou extracelulárnych tekutín a tkanív. Nevieme dopredu povedať kto a kedy začne trpieť neuropatiou. Vývoj neuropatie je veľmi pomalý a nenápadný. Práve preto, je dôležité zamerať sa najmä na akútne stavy po TPM.

Traumatické poškodenie mozgu (TPM) je veľmi vzácnou výnimkou, ktorá poskytuje neurobiológom dostupný experimentálny materiál aj pre *ante-mortem* štúdium molekulových mechanizmov prebiehajúcich v CNS.

V skutočnosti patrí TPM k najväznejším rizikovým faktorom viacerých typov neuropatií, včítane chronických neurodegeneračných chorôb. Je známe, že TPM spôsobuje tzv. „poranením indukovanú neurodegeneráciu“ (Washington, P.M. et al. 2016; Johnson, V.E. et al. 2017), ale predovšetkým spôsobuje chronickú traumatickú encefalopatiu (CTE), neurodegeneračné ochorenie, ktoré bolo iba nedávno, na začiatku 21. storočia popísané ako nová klinicko-patologická jednotka, diagnostikovaná u hráčov amerického futbalu a profesionálnych zápasníkov (Omalu, B.I. et al. 2005; 2010). Takmer desať rokov bolo toto ochorenie, vznikajúce po úraze hlavy, popisované veľmi nejasne. Národný ústav pre výskum neurologických chorôb (NINDS) nakoniec v roku 2015 stanovil jeho presnú neuropatologickú definíciu (McKee, A.C. et al. 2016). Okrem hráčov amerického futbalu a profesionálnych zápasníkov bola CTE diagnostikovaná aj u hráčov baseballu, rugby, u vojakov z povolania a hokejistov, avšak výlučne iba post-mortem (McKee, A.C. et al. 2014). Nedávno publikované údaje ukazujú že CTE je neuropatologicky diagnostikovaná až u 87% vyšetrovaných hráčov amerického futbalu rôznych kategórií, pričom až v 99% prípadoch, ak sa jednalo o profesionálov americkej NFL (110 zo 111 testovaných prípadov) (Mez J. et al. 2017).

Pomocou novodobých nástrojov systémovej biológie bolo experimentálne potvrdené, že zmeny v parenchýme mozgu po TPM sa vo významnej miere odrážajú aj na periférii. Výsledky komplexného štúdia u zvierat s TPM (transkripčná aktivácia, epigenomický program, signálne dráhy) ukazujú, že zmeny v hipokampe indukované experimentálnym traumatickým poškodením mozgu sú vysoko homologické so zmenami pozorovanými v periférnych lymfocytoch (Meng Q. et al. 2017; Kulbe, J.R. and Geddes, J.W., 2016).

Keďže TPM spúšťa neurodegeneráciu, sú periférne tkanivá vzácnym zdrojom informácií pre poznanie molekulových mechanizmov prebiehajúcich v čase tesne po indukcii, a teda odrážajú počiatočnú fázu neuropatie (Redell, J.B. et al. 2010). Je to experimentálna situácia (a súčasne aj fáza zdravotného stavu pacienta s TPM), ktorá umožňuje cielene analyzovať dostupné ľudské tkanivá a extracelulárne tekutiny (napríklad periférne krvné mononukleárne bunky, krvnú plazmu, sliny a ďalšie), a súčasne aj odôvodnene predpokladať resp. extrapolovať na priebeh patologických dejov v mozgu, v tkanive pre takúto analýzu nedostupnom (Pasinetti, G.M. et al. 2010; Meng Q. et al. 2017).



Je zaujímavé, že CTE je tauopatiou, ktorá sa v niektorých zásadných znakoch podobá na Alzheimerovu chorobu, progresívnu supranukleárnu obrnu, amyotrofickú laterálnu sklerózu a niektoré ďalšie neurodegeneračné choroby. Vyznačuje sa tým, že mozog jedincov postihnutých CTE obsahuje neurofibrilárne kľbká (NFT), pozostávajúce z patologicky posttranslačne modifikovaného proteínu tau. Je známe, že denzita NFT priamo úmerne koreluje s intelektuálnym poklesom u pacientov s AD (Braak, H. a DelTredicci, K. 2012). V neurónoch CNS u pacientov s TBI, teda dochádza k molekulovému prešmyku fyziologickej formy s mikrotubulami asociovaného proteínu tau na patologickú nerozpustnú formu. Táto forma tau pôsobí intracelulárne ako „seed“, v cytoplazme neurónov dochádza k akumulácii takto modifikovaného tau proteínu, k tvorbe vysokomolekulových proteínových agregátov a konečným dôsledkom je apoptóza a následne smrť neurónov, aktivácia mikroglie, silný neurozápal a následný úbytok tkaniva CNS, typický pre všetky neurodegeneračné choroby.

Tau proteín v jeho agregovanej forme je možné degradovať proteazómom iba čiastočne (Opattová, A. et al. 2013). Dokonca ani autofago-lyzozómová eliminácia vysokomolekulových proteínových agregátov nie je efektívna, a teda agregovaný tau proteín (ale aj jeho monoméne post-translačne modifikované formy) sa z poškodených neurónov uvoľňuje do extracelulárneho priestoru. Je to exozomálne determinovaný proces. Jedna z ciest extracelulárneho tau vedie aj do neurónov nachádzajúcich sa v blízkosti, čím sa patologický proces šíri z neurónu na neurón (Clavaguera, F. et al. 2014). Okrem toho je známe, že patologická forma tau je secernovaná (ešte stále) živými neurónmi, a to exocytózou. Dostáva sa do cerebrospinálnej tekutiny a odtiaľ do krvného obehu (Avila, J. et al. 2014). Deje sa tak aj po TPM a je snahou viacerých pracovísk využiť meranie plazmatických hladín tau proteínu a iných neuroproteínov ako sú napríklad neurofilament-L, S100B, GFAP, NSE a UCH-L1 ako periférnych biomarkerov poškodenia mozgu (Zetterberg, H. a Blennow, K. 2015; Gill J. et al. 2017; Mondello S et al. 2017; Thelin E.P. et al. 2017).

Napriek tomu, že proces patogenézy neurodegenerácie je v hrubých črtách už popísaný, nepoznáme detaily molekulových mechanizmov, ktoré k nemu vedú. Je známe, že tento proces je aktívny a môže byť spustený traumatickým poškodením mozgu. Je veľmi pravdepodobné, že kritickú úlohu v tomto procese zohrávajú malé nekódujúce RNA.

### **Malé nekódujúce RNA - kľúčom k poznaniu molekulových mechanizmov indukovaných traumatickým poškodením mozgu**

Malé nekódujúce molekuly RNA (miRNA) sú veľmi bohatým zdrojom informácií. Regulujú expresiu mnohých génov a patria medzi epigenetické faktory ovplyvňujúce patogenézu mnohých chorôb. Okrem vyššie spomenutých neuroproteínov, sú sľubnými kandidátmi na periférne markery traumatického poškodenia mozgu. Sú to 21-23 bázových párov dlhé RNA, ktoré sa viažu na 3'-neprekladanú oblasť génov a vedú k degradácii mRNA cieľových génov. Ich existencia bola objavená koncom 20 storočia

(Lee et al. 1993). Na základe sekvenčnej homológie dokážu viazať mediátorovú RNA, označiť ju pre degradáciu, a tak inhibovať syntézu proteínov. MiRNA sú transportované medzi bunkami pomocou exozómov, ektozómov alebo ako súčasť lipoproteínových komplexov. Väzba s lipoproteínmi a enkapsulácia vo vezikulách chráni miRNA pred degradáciou, čím sú takto stabilizované a prirodzene sa šíria v extracelulárnom prostredí. Ich regulačná funkcia súčasne poukazuje na signálne dráhy, ktoré sa zapájajú v procese patogenézy mnohých ochorení, včítane neurodegeneračných.

Zmenený profil expresie miRNA bol pozorovaný počas viacerých patologických stavov, vrátane chronických neurologických ochorení (Leidinger, P. et al. 2013; Grasso, M. et al. 2014). Rovnako ako neurodegeneračné zmeny, aj TPM spôsobuje dereguláciu hladín miRNA (Jin X. F. et al. 2013; Lei, P. et al. 2009). U pacientov s ťažkou formou TPM boli v sére zaznamenané zvýšené hladiny miR-93, miR-191 a miR-499 (Yang, T. et al. 2016). Okrem toho bol nameraný signifikantný nárast v expresii miR-16 a miR-92a v plazme ľudí po TPM (Redell, J.B. et al. 2010). Doterajšie výsledky naznačujú, že profily niektorých miRNA sú asociované s neurologickými prejavmi TPM a naznačujú tak potenciál panelu miRNA byť výhodným markerom traumatického poškodenia mozgu.

Doterajšie štúdie o TPM a miRNA sa nezaoberali hľadaním signálnych ciest, ktoré sú deregulovanými účinkom narušených hladín miRNA, ale ostávajú na úrovni návrhu špecifických miRNA ako biomarkerov pre TPM. Myslíme si že identifikácia deregulovaných miRNA, je nevyhnutným, ale len prvým krokom v tomto výskume. Podstatná je identifikácia signálnych dráh a molekulových mechanizmov indukovaných TPM. Samozrejme nevyhnutnou súčasťou výskumu je ich validácia. Napriek tomu, že v literatúre je doposiaľ len veľmi málo údajov o deregulácii génovej expresie ako následku TPM, je reálne predpokladať, že spojením optimálneho experimentálneho modelu (plazma hokejistov po úraze hlavy), presnej spofahlivej kvantifikácie miRNA (prípadne aj neuroproteínov) a relevantnej aplikácii najmodernejších bioinformatických postupov, bude možné pochopiť molekulové mechanizmy prešmyku neuronálnych proteínov z fyziologickej formy na patologickú. Otvára sa tým šanca lepšie poznať etiopatogenézu neurodegeneračných ochorení a možnosť vypracovať návrh stratégií pre terapeutické ovplyvnenie neuropatogenézy v jej najskorších fázach, kedy má terapeutická intervencia najväčšiu šancu na úspech.

#### Literatúra:

1. Phillips, S. a Woessner, D. Prim Care. 2015 Jun; 42(2): 243-8.
2. Kulbe, J.R. a Geddes, J.W. Exp Neurol. 2016 Jan; 275 Pt 3:334-52
3. Zetterberg, H. a Blennow, K. Mol Cell Neurosci. 2015 May; 66(Pt B): 99-102
4. <https://www.teraz.sk/tipsportliga/hokej-tl-pupak/390969-clanok.html>
5. <https://sport.aktuality.sk/c/417758/sportovy-lekar-pavel-malovic-reaguje-na-smrt-patrick-day-box-by-zakazal-dennik-sport/>
6. Fransquet PD, Lacaze P, Saffery R, McNeil J, Woods R, Ryan J. Alzheimers Dement. 2017 Nov 8. pii: S1552-5260(17)33791-3
7. Sheikh-Bahaei N., Sajjadi SA, Pierce AL. Curr Treat Options Neurol. 2017 Nov 14; 19(12): 46.

8. Wendler A. and Wehling M. *J Transl Med.* 2017 Nov 3; 15(1): 226.
9. Li C. and Götz J. *Nat Rev Drug Discov.* 2017 Dec; 16(12): 863-883.
10. Liu YH et al. , Wang YR, Xiang Y, Zhou HD, Giunta B, Mañucat-Tan NB, Tan J, Zhou XF, Wang YJ. *Mol Neurobiol.* 2015 Feb; 51(1): 1-7.
11. Washington,P.M., Villapol S, Burns MP. *Exp Neurol.* 2016 Jan; 275 Pt3: 381-8.
12. Johnson, V.E. , Stewart W., Smith D.H. *Brain Pathol.* 2012 Mar; 22(2): 142-9.
13. Omalu BI, DeKosky ST, Minster RL, Kamboh MI, Hamilton RL, Wecht CH. *Neurosurgery.* 2005 Jul;57(1):128-34.
14. Omalu BI, Fitzsimmons RP, Hammers J, Bailes J. *J Forensic Nurs.* 2010 Fall;6(3):130-6.
15. McKee, AC, Cairns NJ, Dickson DW, Folkerth RD, Keene CD, Litvan I, Perl DP, Stein TD, Vonsattel JP, Stewart W, Tripodis Y, Cray JF, Bieniek KF, Dams-O'Connor K, Alvarez VE, Gordon WA; TBI/CTE group. *Acta Neuropathol.* 2016 Jan;131(1):75-86.
16. McKee AC, Daneshvar DH, Alvarez VE, Stein TD. *Acta Neuropathol.* 2014 Jan;127(1):29-51.
17. Mez J., Daneshvar D.H., Kiernan P.T., Abdolmohammadi B., Alvarez V.E., Huber B.R., Allosco M.L., Solomon T.M., Nowinski C.J., McHale L., Cormier K.A., Kubilus C.A., Martin B.M., Murphy L., Baugh C.M., Montenegro P.H., Chaisson C.E., Tripodis Y., Kowall N.W., Weuve J., McClean M.D., Cantu R.C., Goldstein L.E., Katz D.I., Stern R.A., Stein T.D., McKee A.C. *JAMA.* 2017 Jul 25;318(4):360-370. doi: 10.1001/jama.2017.8334.
18. Kulbe, J.R., Geddes JW. *Exp Neurol.* 2016 Jan; 275 Pt 3:334-52.
19. Redell JB, Moore AN, Ward NH 3rd, Hergenroeder GW, Dash PK.. 2010 Dec; 27(12):2147-56.
20. Pasinetti, GM, Fivecoat H, Ho L. *Psychiatr Clin North Am.* 2010 Dec; 33(4):905-13.
21. Opattová, A, Filipčík P, Cente M, Novak M. *J Alzheimers Dis.* 2013;33(2):339-48.
22. Clavaguera, F., Hench, J., Lavenir, I. et al. *Acta Neuropathol.* 2014, 127: 299.
23. Zetterberg, H. a H, Blennow K. *Mol Cell Neurosci.* 2015 May; 66(Pt B): 99-102.
24. Gill J. Merchant-Borna K, Jeromin A, Livingston W, Bazarian J. 2017 Feb 7;88(6):595-602.
25. Mondello S, Sorinola A, Czeiter E, Vámos Z, Amrein K, Synnot A, Donoghue EL, Sándor J, Wang KKW, Diaz-Arrastia R, Steyerberg EW, Menon D, Maas A, Buki A. Blood-Based Protein Biomarkers for the Management of Traumatic Brain Injuries in Adults Presenting with Mild Head Injury to Emergency Departments: A Living Systematic Review and Meta-Analysis. *J Neurotrauma.* 2017 Oct 12.
26. Thelin EP, Nelson DW, Bellander BM. A review of the clinical utility of serum S100B protein levels in the assessment of traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Wien).* 2017 Feb;159(2):209-225.
27. Lee, R. C.; Feinbaum, R. L.; Ambros, V. (1993). "The C. Elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14". *Cell.* 75 (5): 843–854.
28. Ambros V. *Cell.* 2001 Dec 28;107(7):823-6.
29. Leidinger P, Backes C, Deutscher S, Schmitt K, Mueller SC, Frese K, Haas J, Ruprecht K, Paul F, Stähler C, Lang CJ, Meder B, Bartfai T, Meese E, Keller A. *Genome Biol.* 2013 Jul 29;14(7): R78.
30. Grasso M, Piscopo P, Confaloni A, Denti MA. 2014 May 23; 19(5): 6891-910.
31. Jin XF, Wu N, Wang L, Li J. *Cell Mol Neurobiol.* 2013 Jul; 33(5): 601-13.
32. Lei P, Li Y, Chen X, Yang S, Zhang J. *M. Brain Res.* 2009 Aug 11; 1284: 191-201.
33. Yang T, Song J, Bu X, Wang C, Wu J, Cai J, Wan S, Fan C, Zhang C, Wang J. *J Neurochem.* 2016 Apr; 137(1): 122-9.
34. Redell JB, Moore AN, Ward NH 3rd, Hergenroeder GW, Dash PK. 2010 Dec; 27(12): 2147-56.

PodĎakovanie: Tento príspevok vznikol vĎaka podpore grantu VEGA č. 2/0076/18

## AKTUÁLNE MOŽNOSTI BIOLOGICKEJ LIEČBY BRONCHIÁLNEJ ASTMY

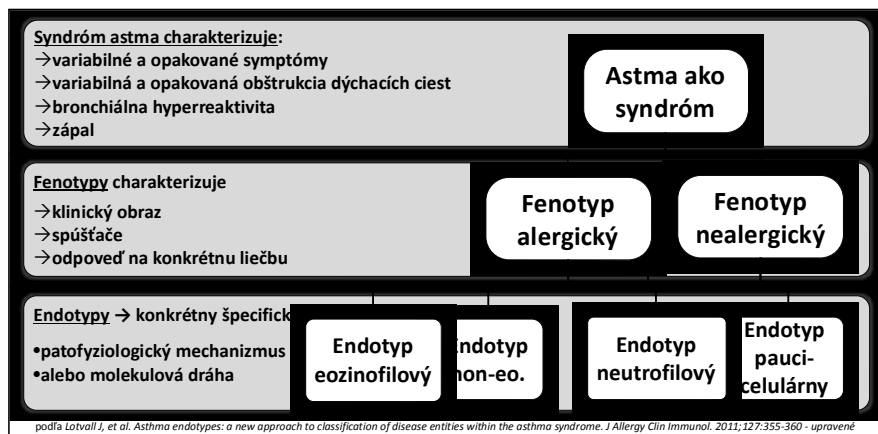
**Hrubiško Martin**

*Onkologický ústav sv. Alžbety a Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava*

Astma je chronickou, zväčša celoživotnou chorobou. Konvenčnou farmakologickou liečbou sa darí dosiahnuť kontrolu nad priebehom choroby u väčšiny pacientov. Liekmi prvej voľby sú inhalačné kortikosteroidy, menšia časť pacientov odpovedá na blokátory leukotriénových receptorov, u ťažších pacientov používame fixnú kombináciu inhalačných kortikosteroidov s dlho-účinkujúcimi beta-2 adrenergikami, či už v režime pevne stanovenej dávky, alebo v režime podľa potreby. Podrobne sa aktuálnymi prístupmi k liečbe zaoberajú smernice GINA <sup>(1)</sup>. Približne 5 % pacientov však ostáva nekontrolovaných (pretrvávajú symptómy aj sklon k exacerbácii) napriek plne vyťaženej liečbe. Systémové kortikosteroidy sa v súčasnosti odporúčajú iba ako záchranná liečba, nie však ako prvá voľba v prípade ťažkej, na štandardnú liečbu refraktérnej astmy. Ich dlhodobé podávanie nie je pre potenciál nežiaducich účinkov vhodné. V prípade nekontrolovanej astmy treba v prvom rade zhodnotiť spoluprácu pacienta, t.j. jeho adhérenciu k liečbe a režimovým opatreniam. V prípade, že je liečba plne vyťažená, adhérenca k nej optimálna a choroba napriek tomu ostáva nekontrolovaná, zvažujeme biologickú liečbu <sup>(1)</sup>.

Základným predpokladom budúcej účinnosti biologickej liečby astmy je jej fenotypizácia a zhodnotenie konkrétneho endotypu (obrázok 1). Hovorí sa o liečbe šitej na mieru. Nie je to fráza, skutočne, ak sa správne posúdi endotyp choroby (t.j. prevládajúci imunologický patomechanizmus) a podľa neho sa zvolí adekvátny typ biologika, je predpoklad, že aj pacient s najťažšou formou astmy môže žiť plnohodnotný život bez obmedzení <sup>(1-2)</sup>. Z vlastnej praxe môžeme uviesť príklad, kedy sme pred rokmi prevzali do starostlivosti 38 ročnú učiteľku s nekontrolovanou astmou, neschopnou vykonávať svoju profesiu, s podaným návrhom na invalidný dôchodok. Po zhodnotení typu astmy sme indikovali anti-IgE liečbu, ktorej účinkom sa choroba celkom stabilizovala, návrh na invaliditu sa zrušil a pacientka aj vo svojich aktuálnych 51 rokoch pracuje na plný úväzok, žije život bez obmedzení.

Prvým biologikom zavedeným do rutínnej praxe sa pred takmer 15 rokmi stal omalizumab – monoklonová anti-IgE protilátka viažuca IgE molekuly tak, že sa tieto nemôžu naviazať na príslušné receptory. Následkom opakovaného podávania sa postupne zníži hladina cirkulujúcich IgE protilátok, dôjde k de-expressii vysoko-afinitných receptorov pre IgE protilátky, klesá syntéza IgE a obmedzí sa aktivácia mastocytov aj eozinofilných granulocytov. Vzhľadom k mechanizmu účinku je táto liečba efektívna u astmatikov s alergickou, dominantne IgE protilátkami sprostredkovanou formou choroby <sup>(3)</sup>. Preto je okrem závažnosti choroby a vyťaženej konvenčnej liečby podmienkou indikácie hladina celkového IgE nad 75 IU/ml a dôkaz špecifických IgE voči celoročným alergénom <sup>(4)</sup>. Perspektívne sa však táto indikácia omalizumabu pri astme



Obr. 1. Astma ako syndróm, hierarchia fenotypov a endotypov (podľa <sup>(2)</sup>).

pravdepodobne rozšíri o jej perzistujúcu formu ktorá sa kombinuje s chronickou rinosinuitídou s nosovými polypmi. Pri tejto forme astmy sa síce zvyčajne nedokážu špecifické IgE protilátky voči environmentálnym inhalačným alergénom, zistila sa však lokálna tvorba IgE proti stafylokokovým superantigénom. Predbežné výsledky zo štúdií sú veľmi sľubné - omalizumabom sa podarilo navodiť nie iba stabilizáciu astmy, ale zlepšil sa aj stav rinosinuitídy a pozorovalo sa znižovanie až vymiznutie polyppov <sup>(5)</sup>.

Pri niektorých formách astmy so závažným priebehom sa však nedokáže IgE sprostredkovaný mechanizmus. Častým endotypom astmy je tzv. eozinofilová astma, ktorá môže ale aj nemusí byť spojená s IgE mechanizmom. V prípade ťažkej perzistujúcej astmy s opakovane potvrdenou eozinofiliou viac ako 0,3 G/L krvi, najmä ak sa zachytí vzostup eozinofilov v súvislosti s exacerbáciou choroby, sa môže zväziť anti-IL-5 liečba. Je všeobecne známe, že interleukín IL-5 je pre eozinofily kľúčovým mediátorom. V súčasnosti sú na základe dobrých výsledkov klinických štúdií schválené pre liečbu závažnej eozinofilovej astmy 3 monoklonové protilátky <sup>(6)</sup>. Mepolizumab a reslizumab sú monoklonové protilátky proti IL-5, benralizumab je protilátka blokujúca  $\alpha$ -podjednotku receptora pre IL-5. Najviac pozitívnych skúseností je s mepolizumbom, ktorý je po schválení zdravotnou poisťovňou možné používať až aj na Slovensku. Odpoveď na liečbu rôznymi anti-IL-5 prípravkami je u rôznych pacientov rôzna. Zistilo sa, že je eozinofily nie sú homogénnou populáciou, v súčasnosti rozlišujeme tzv. homeostatické (regulačné) a indukibilné (zápalové) eozinofily <sup>(7-8)</sup>. Keďže IL-5 riadi iba indukibilné eozinofily, monoklonové protilátky proti tomuto cytokínu ako mepolizumab neovplyvňujú rezidenčnú – homeostatickú populáciu eozinofilov <sup>(8-9)</sup>. Naopak, protilátky anti-IL-5R $\alpha$  ako napr. benralizumab spôsobujú depléciu všetkých eozinofilov. Budúcnosť a klinická prax ukážu, ako sú v rôznych klinických situáciách tieto rozdiely medzi jednotlivými prípravkami proti pôsobeniu IL-5 významné.

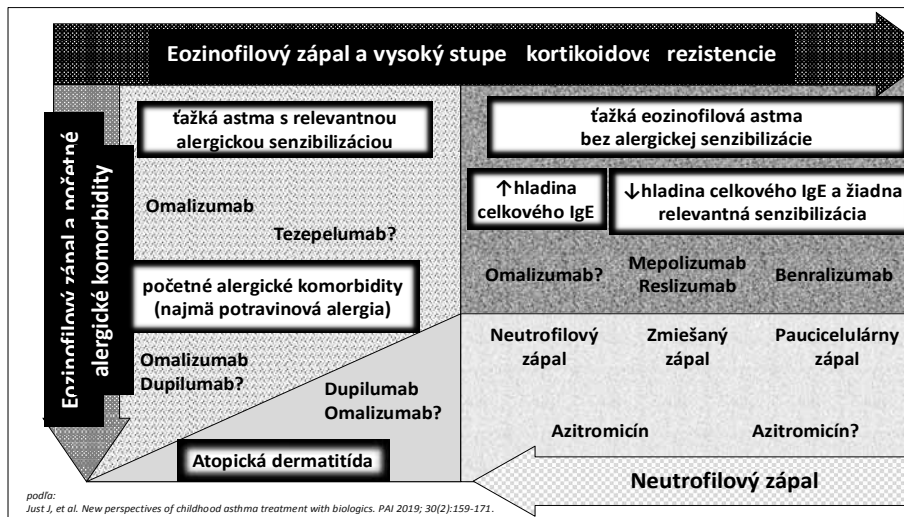
Okrem IgE protilátok a IL-5 sa pri astme, resp. pri Th2 type zápalu významne uplatňujú aj cytokíny IL-4 a IL-13. Dupilumab je monoklonová protilátka proti spoločnej alfa-subjednotke receptora pre IL-4 a IL-13, čím blokuje účinnosť oboch týchto cytokínov. Pôvodne bol dupilumab vyvinutý na liečbu atopickej dermatitídy, ďalšie štúdie však ukázali, že môže byť účinnou voľbou endotypu astmy pri ktorom zohrávajú uvedené cytokíny kľúčovú úlohu. Ide najmä o pacientov vyžadujúcich dlhodobé podávanie systémových kortikosteroidov (tzv. kortikodependentná astma), nezávisle na alergickom (IgE) mechanizme. Niektoré štúdie u pacientov rezistentných na štandardnú liečbu astmy ukazovali, že aj pri dupilumabe účinnosť závisí od miery eozinofilového zápalu (účinnosť iba pri počte eozinofilov  $>300/\mu\text{L}$ ), iné štúdie však ukázali účinnosť aj u pacientov s počtom eozinofilov  $<300/\mu\text{L}$  <sup>(10-11)</sup>.

Všetky vyššie uvedené biofarmaceutiká zo skupiny monoklonových protilátok nie sú určené na liečbu akútnej exacerbácie astmy, sú účinné pri dlhodobom podávaní - a to najmä z pohľadu významnej redukcie exacerbácií. Vo väčšine prípadov umožnia redukcii dávok podávanej štandardnej farmakoterapie; pri správnom výbere v prvom rade umožňujú u väčšiny pacientov významne redukovat' alebo aj celkom vysadiť systémovú kortikosteroidovú liečbu. Potešujúce je, že bezpečnosť uvedených monoklonových protilátok sa ukazuje aj v dlhodobom časovom horizonte (viacročné podávanie) ako veľmi dobrá. Najviac skúseností je s omalizumabom, ktorý niektorí pacienti užívajú bez pozorovateľných nežiaducich účinkov už 15 rokov.

Vo vývoji, resp. v prvých fázach klinického skúšania sú aj liečivá zasahujúce ďalšie cytokíny a chemokíny ktoré sa patologicky uplatňujú pri niektorých formách astmy. Skúšajú sa monoklonové protilátky zamerané proti IL-17, IL-33 a cytokínu TSLP, a tiež biofarmaceutiká z oblasti malých molekúl blokujúce (antagonisty) chemokíny CCR3, CCR4 a CXCR2. Blízka budúcnosť ukáže, ktoré z týchto farmák sa dostanú reálne aj do klinickej praxe. Okrem kritéria dostatočnej účinnosti je samozrejmom podmienkou klinického využitia aj ich bezpečnosť. Tá ostáva nateraz pri viacerých z nich otáznou. Okrem biofarmaceutík (monoklonové protilátky, malé molekuly) sa môžu pri niektorých formách astmy uplatniť aj „klasické farmaká“ v novej indikácii, napr. azolové antimykotiká alebo imunomodulačne pôsobiaci makrolid azitromycín. Schematicky pozíciu možných terapeutických modalít v liečbe jednotlivých endotypov astmy znázorňuje obrázok 2<sup>(12)</sup>.

## Literatúra

1. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2019. Available from: [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org)
2. Lotvall J, Akdis CA, Bacharier LD, et al. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2011; 127:355-360.
3. Fahy JV, Fleming HE, Wong HH, et al. The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1828-34.
4. Súhrn charakteristických vlastností lieku (SPC) Xolair plv iol. <https://www.adc.sk/databazy/produkty/spc/xolair-878113.html>



Obr. 2 Miesto rôznych modalít liečby astmy podľa endotypov (podľa 12, upravené)

5. Gevaert P, Calus L, Van Zele T, et al. Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 13+ (1): 110-6.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2012.07.047.
6. Fajt NL, Wenzel SE. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: The next steps toward personalized care. *Clinical reviews in allergy and immunology. J Allergy Clin Immunol* 2015; 135 (2): 299-310; quiz 311. doi: 10.1016/j.jaci.2014.12.1871.
7. Mesnil C, Raulier S, Paulissen G, et al. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J Clin Invest.* 2016;126(9):3279-3295. <https://doi.org/10.1172/JCI85664>.
8. Abdala-Valencia H, Coden ME, Chiarella SE, et al. Shaping eosinophil identity in the tissue contexts of development, homeostasis, and disease. *J Leukoc Biol.* 2018; 104(1): 95–108. doi:10.1002/JLB.1MR1117-442RR.
9. Mesnil C, Raulier S, Paulissen G, et al. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J Clin Invest* 2016; 126(9):3279-95. doi: 10.1172/JCI85664.
10. Nair P, Pizzichini MM, Kjarsgaard M, et al. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. *N Engl J Med* 2009; 360: 985-93.
11. Biologic-Based Asthma Treatment Gaining Momentum. *Medscape*. May 19, 2015; American Thoracic Society (ATS) 2015 International Conference: Abstract A6362. Presented May 18, 2015.
12. Just J, Deschildre A, Lejeune S, Amat F. New perspectives of childhood asthma treatment with biologics. *PAI* 2019; 30(2):159-171.

## ANTI-IL5 LIEČBA ASTMY A ĎALŠÍCH EOZINOFILOVÝCH CHORÔB

Hochmuth Luděk

*II. Interná klinika, ambulancia alergológie a klinickej imunológie,  
FNsP F. D. Roosevelta, Banská Bystrica*

### Súhrn

Ťažká eozinofilová astma predstavuje špecifický fenotyp prieduškovej astmy často s nedostatočnou odpoveďou na liečbu. Lieky zo skupiny biologických preparátov ovplyvňujúcich mechanizmus sprostredkovaný interleukínom-5 a eozinofilmi sú určene práve pre tento fenotyp astmy. Práca popisuje mechanizmus ich účinku a klinické skúsenosti s ich použitím.

### Kľúčové slová

Ťažká eozinofilová astma, interleukín-5, eozinofily, biologická liečba, mepolizumab

### Summary

Severe eosinophilic asthma is a specific phenotype of bronchial asthma often with inadequate response to treatment. Drugs from the family of biological agents affecting the mechanism mediated by interleukin-5 and eosinophils are specifically designed for this asthma phenotype. The work describes the mechanism of their effects and clinical experience with their use.

### Key words

Severe eosinophilic asthma, interleukin-5, eosinophils, biological therapy, mepolizumab

### Úvod

Zavedenie biologickej liečby omalizumabom do klinickej praxe v roku 2005 otvorilo novú etapu v liečbe ťažkej prieduškovej astmy (1). Omalizumab (monoklonová humanizovaná protilátka IgG1 *kappa*) sa viaže na voľný imunoglobulín E (IgE) a bráni väzbe IgE na FcεRI (vysokoafinitný receptor pre IgE), čím znižuje množstvo voľného IgE, ktoré je k dispozícii na spustenie alergickej kaskády. Liečba omalizumabom je indikovaná pre pacientov s ťažkou astmou sprostredkovanou IgE s prítomnosťou precitlivenosti na celoročný alergén a ďalšími doplňujúcimi kritériami. Táto liečba pomohla mnohým pacientom s dovtedy ťažko ovplyvniteľnou astmou. Indikácia liečby omalizumabom sa od roku 2014 rozšírila o chronickú spontánnu urtikáriu (2).

Ostáva však kohorta pacientov s ťažko ovplyvniteľným priebehom astmy napriek maximálne vyťaženej liečbe. Výskum pokračuje a v príprave je celý rad prípravkov zo skupiny biologík určených pre túto skupinu pacientov. Viaceré z týchto liečív však nie



sú všeobecne účinné, efektívnosť liečby sa dosahuje len u určitých špecifických podskupín pacientov s ťažkou astmou. Otázkou je presné definovanie týchto podskupín s určením diagnostických, indikačných a monitorovacích kritérií liečby (3). Medzi biologiká patria aj prípravky pôsobiace na mechanizmus sprostredkovaný cez IL-5 a eozinofily. Indikáciou týchto liekov je ťažká refraktérna eozinofilová astma.

### Eozinofilová astma

Súčasný poznatok potvrdzuje, že priedušková astma nie je jednotnou chorobou. Ide skôr o skupinu ochorení s podobnými klinickými prejavmi, ktoré môžu byť spôsobené rôznymi patologickými mechanizmami. Súbor klinických prejavov, ktorými sa choroba prezentuje, sa označuje ako fenotyp, pri definovaní spoločného patomechanizmu klinickej jednotky sa používa výraz endotyp (4).

Medzi najvýraznejšie definované fenotypy astmy patrí eozinofilová astma (5). Tento podtyp astmy je charakterizovaný zvýšeným počtom eozinofilov v bronchiálnych biopsiách a v spúte napriek pravidelnej liečbe inhalačnými kortikosteroidmi. Častejšie si vyžaduje liečbu systémovými kortikosteroidmi. Odhaduje sa, že kritériá eozinofilového fenotypu astmy napĺňa asi 5% pacientov (6). Častejšie sa vyskytuje u astmy s neskorším vznikom než pri detskej astme. Klinický priebeh býva horší oproti neeozinofilovej astme. Napriek predpokladu alergie pri eozinofílii práve pri tejto astme sa menej často potvrdzuje alergická senzibilizácia. Medzi ďalšie črty tohto fenotypu patrí prítomnosť nosovej polypózy a aspirínová senzitivita (Tab.)(7). Úloha eozinofilov v patogenéze choroby však prirodzene nie je limitovaná len na tento fenotyp, hranice medzi rôznymi fenotypmi astmy navyše nie sú ostré a nemenné.

Tab. Klinické charakteristiky eozinofilovej astmy

Vznik astmy v dospelosti Rovnaké rozloženie medzi pohlaviami Menej alergií na bežné alergény Zvýšený počet eozinofilov v periférnej krvi Zvýšené riziko ťažkých exacerbácií Normálna alebo mierne zvýšená hladina IgE Znížené FEV1, perzistujúca obštrukcia dýchacích ciest Air trapping a dynamická hyperinflácia Chronická rinosínusitída s nosovými polypmi Aspirínová senzitivita Dobrá odpoveď na systémové kortikosteroidy Dobrá odpoveď na liečbu anti-IL5
--

Podľa Groot et al (7)

**Eozinofilový zápal dýchacích ciest** môže byť spôsobený dvoma odlišnými mechanizmami. Alergén špecifické Th2 lymfocyty pod vplyvom antigén prezentujúcich dendritových buniek produkujú IL-4, IL-5 a IL-13, ktoré vedú k eozinofilovému zápalu dýchacích ciest. Pri nealergickej eozinofilovej astme pôsobením polutantov, mikróbov a ďalších nealergických podnetov dochádza v epiteli dýchacích ciest k uvoľneniu cytokínov (IL-33, IL-25 a TSLP), ktoré aktivujú vrodene lymfoidné bunky (innate lymphoid cells – ILC). Aktivované ILC2 produkujú veľké množstvo IL-5 a IL-13, ktoré vedú k eozinofilii, hypersekrécii hlienu a hyperreaktivity dýchacích ciest (8). Práve druhý typ zápalu sa významnejšie podieľa na vzniku ťažkej eozinofilovej astmy.

### **Eozinofily a interleukín-5 pri astme**

Eozinofily hrajú dôležitú úlohu pri chronických zápalových procesoch u alergikov (9). Bežne nie sú prítomné v zdravých pľúcach, ich prítomnosť sa zachytáva pri niektorých patologických stavoch (10). IL-5 je hlavným cytokínom, ktorý podporuje vývoj eozinofilov v kostnej dreni, spôsobuje ich extravazáciu, sekréciu, aktiváciu a inhibíciou apoptózy predlžuje ich prežívanie v tkanivách (3). Eozinofily uvoľňujú mediátory (bázické granulóne proteíny, lipidové mediátory, cytokíny a chemokíny), ktoré sa podieľajú na zápale dýchacích ciest a remodelácii pľúcneho tkaniva. Ich dôsledkom sú klinické prejavy astmy. Snaha o terapeutické ovplyvnenie eozinofilov v pľúcach pri astme viedla k vývoju anti-IL-5 monoklonových protilátok.

### **Eozinofily v periférnej krvi a v spúte**

Počet eozinofilov v periférnej krvi je dôležitým parametrom pri indikácii anti-IL5 liečby. Interpretácia počtu eozinofilov má však určité úskalia (11). Môže byť ovplyvnený viacerými okolnosťami, ktoré je potrebné brať do úvahy – aktuálny stav organizmu pri vyšetrení (stav relatívneho zdravia, prítomnosť infekcie, zápalu a iné), prítomnosť komorbidít (systémové ochorenie, závažné celkové ochorenie, možnosť prítomnosti parazitov a ďalšie) a aktuálna liečba (systémové kortikosteroidy), ktoré môžu výrazne ovplyvniť výsledok vyšetrenia.

Dôležitou otázkou je vzťah počtu eozinofilov v periférnej krvi a v pľúcnom parenchýme. Eozinofily v spúte sa považujú za spoľahlivý biomarker eozinofilového zápalu, ktorý koreluje s eozinofiliou v pľúcnom tkanive. Vyšetrenie periférnej krvi je však, pochopiteľne, jednoduchšie, dostupnejšie a pre pacienta menej zaťažujúce než vyšetrenie eozinofilov v indukovanom spúte. Ako objektívnym a v klinických štúdiách potvrdeným prediktorom klinickej efektivity anti-IL5 liečby je absolútny počet eozinofilov v periférnej krvi.

Napríklad klinická štúdia DREAM porovnávala hodnotu eozinofilov v spúte a v periférnej krvi ako bazálny parameter v korelácii s klinickým stavom (počtom exacerbácií astmy). Oba parametre slúžili ako indikačné kritérium liečby. Pozoruhodné je, že pokles hodnoty eozinofilov pri liečbe bol zaznamenaný v periférnej krvi, ale nie v spúte. Vyšetrenie počtu eozinofilov v periférnej krvi sa javí ako primeraný parameter pre indikáciu a laboratórne monitorovanie liečby mepolizumabom (12).

### **Anti-IL5 liečba v klinickej praxi**

V súčasnosti sú do klinickej praxe na liečbu ťažkej eozinofilovej astmy uvedené tri liečivá pôsobiace anti-IL5 mechanizmom: mepolizumab, reslizumab a benralizumab (13). Nasledujúci text sa venuje prevažne mepolizumabu, s ktorým má autor už aj osobnú praktickú skúsenosť v liečbe konkrétnej pacientky s ťažkou eozinofilovou astmou.

**Mepolizumab** je humanizovaná monoklonová protilátka IgG1 *kappa*, ktorá s vysokou afinitou a špecifickosťou pôsobí na IL-5 (14). IL-5 je proinflamačný cytokín produkovaný T-lymfocytmi, mastocytmi a eozinofilmi. Je hlavným cytokínom zodpovedným za rast, diferenciaciu, hromadenie, aktiváciu a prežívanie eozinofilov, ktoré hrajú kľúčovú rolu pri určitých typoch astmy (eozinofilová astma)(15).

Mepolizumab inhibuje biologickú aktivitu IL-5 blokovaním väzby IL-5 na alfa reťazec receptorového komplexu pre IL-5, ktorý je exprimovaný na povrchu eozinofilov. Dochádza k inhibícii signalizácie IL-5 a tým k zníženiu produkcie eozinofilov a skráteniu ich prežívania. Potlačenie eozinofilového zápalu, ktorý sa odzrkadľuje redukciou počtu eozinofilov v krvi a v spúte, vedie k stabilizácii astmy. K poklesu dochádza už v priebehu 48 hodín od podania lieku, konzistentné zníženie bolo zaznamenané v štvrtom týždni liečby a udržiavalo sa počas celej liečby (16). Ani pri dlhodobom podávaní nedochádza ku kompletnej deplícii eozinofilov. Po ukončení liečby sa v priebehu troch mesiacov hodnoty eozinofilov v krvi a v spúte vracajú na hodnoty pred liečbu nasledované stratou kontroly a exacerbáciami astmy (16).

### **Klinická účinnosť mepolizumabu**

Prvé správy o efektívnosti mepolizumabu u pacientov so stredne ťažkou a ťažkou astmou, ktorí boli vyberaní na základe klinických a fyziologických charakteristík bez zohľadnenia eozinofilového zápalu dýchacích ciest, priniesli rozporné výsledky. Pri liečbe špecifického fenotypu ťažkej eozinofilovej astmy sa však ukázala klinická účinnosť liečby. Liek sa podáva subkutánne raz za štyri týždne.

### **Zhrnutie výsledkov z klinických štúdií liečby mepolizumabom**

Liečbou pacientov s ťažkou eozinofilovou astmou mepolizumabom sa dosiahlo

- zníženie počtu exacerbácií astmy,
- zníženie použitia orálnych kortikosteroidov,
- zlepšenie pľúcnych funkcií,
- zlepšenie kontroly astmy,
- zlepšenie kvality života,
- pokles eozinofilov v krvi,
- pri pokračujúcej dlhodobej liečbe sa udržiavala účinnosť mepolizumabu počas 4,5 roka (3, 17, 18)

### Ďalšie preparáty pôsobiace anti-IL5 mechanizmom (13)

Podobný mechanizmus účinku ako mepolizumab má **reslizumab** – humanizovaná monoklonová protilátka IgG4 *kappa*. Neutralizuje cirkulujúci IL-5 blokovaním jeho väzby na eozinofily. Podáva sa raz za štyri týždne intravenózne.

**Benralizumab** (humanizovaná monoklonová protilátka IgG1 *kappa*) má duálny mechanizmus neutralizácie účinku IL-5, ktorým sa líši od predošlých dvoch liekov. Viaže sa selektívne a s vysokou afinitou na alfa reťazec svojho receptora v membránach eozinofilov a mastocytov. Blokuje tak ich aktiváciu a skracuje prežívanie. Väzbou na receptor súčasne umožní svoje rozpoznanie NK-bunkami, ktoré majú pre Fc-fragment IgG receptor (FcγRIIIa = CD16a), čím sa aktivujú a mechanizmom cytotoxicity závislej od protilátky (ADCC) navodia v terčových bunkách apoptózu, čím dochádza k zníženiu ich počtu (19). Podáva sa subkutánne raz za osem týždňov.

### Ďalšie potenciálne indikácie anti-IL5 liečby

Medzi potenciálne indikácie anti-IL5 liečby by mohli patriť ďalšie choroby z okruhu **eozinofilových stavov**: hypereozinofilové syndrómy, eozinofilová ezofagitída a ďalšie eozinofilové choroby tráviaceho traktu, Churg-Straussovej syndróm a niektoré typy atopickej dermatitídy (20). Tieto diagnózy však zatiaľ ešte nie sú schválenou indikáciou liečby.

### Záver

V posledných rokoch pribúdajú poznatky o tom, že astma je heterogénnym ochorením s odlišnými fenotypmi u rôznych pacientov. Jednými z týchto fenotypov sú ťažká alergická a ťažká eozinofilová astma. Možnosti liečby ťažkej refraktérnej alergickej astmy s nedostatočným efektom základnej liečby predstavujú systémové kortikosteroidy a anti-IgE liečba omalizumabom. Novú možnosť biologickej liečby určenej pre špecifickú podskupinu ťažkej astmy – ťažkú eozinofilovú astmu – predstavujú prípravky s anti-IL5 mechanizmom účinku. V súčasnosti sú už niektoré liečivá uvedené do klinickej praxe, skúmajú sa ďalšie lieky a liečebné postupy vrátane rozšírenia indikácie liečby o ďalšie hypereozinofilové choroby a stavy.

### Literatúra

1. Humbert M, Beasley R, Ayres J, et al. Benefits of omalizumab as add-on therapy in patients with severe persistent asthma who are inadequately controlled despite best available therapy (GINA 2002 step 4 treatment): INNOVATE. *Allergy* 2005; 60(3):309-16.
2. Zuberbier T, Aberer W, Asero R, et al. The EAACI/GA<sup>2</sup>LEN/EDF/WAO Guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria: the 2013 revision and update. *Allergy* 2014;69:868–87.
3. McCracken JL, Triplett JW, Calhoun WJ. Biologic Therapy in the Management of Asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2016; 16(4):375-382.
4. Chung KF. Asthma phenotyping: a necessity for improved therapeutic precision and new targeted therapies. *J Int Med* 2016; 279:192-204.

5. Pavord ID. Eosinophilic Phenotypes of Airway Disease. *Ann Am Thorac Soc.* 2013;10 Suppl:S143-9.
6. Hekking PP, Wenner RR, Amelink M, et al. The prevalence of severe refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135:896-902.
7. Groot JC, Brinke AT, Bel EHD. Management of the patient with eosinophilic asthma: a new era begins. *ERJ Open Res* 2015 May; 1(1):00024-2015.
8. Brusselle GG, Maes T, Bracke KR. Eosinophils in the spotlight: eosinophilic airway inflammation in nonallergic asthma. *Nat Med* 2013; 19:977-979.
9. Berek C. Eosinophils: important players in humoral immunity. *Clin Exper Immunol* 2015; 183:57-64.
10. Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. *Respir Res* 2001; 2:150-156.
11. Brezina M, Hrubíško M. Eozinofil – poznáme ho dobre? *Monitor medicíny SLS* 2016;3-4:1,5-7.
12. Katz LE, Gleich GJ, Hartley BF et al. Blood Eosinophil Count Is a Useful Biomarker to Identify Patients with Severe Eosinophilic Asthma. *Ann Am Thorac Soc* 2014;11(4):531-536.
13. Farne HA, Wilson A, Powell C et al. Anti-IL-5 therapies for asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;9:CD010834.
14. Walsh GM. Mepolizumab-based therapy in asthma: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2015; 15:392-396.
15. Agache I, Strasser DS, Klenk A et al. Serum IL-5 and IL-13 consistently serve as the best predictors for the blood eosinophilia phenotype in adult asthmatics. *Allergy* 2016; 71(8):1192-202.
16. Pouliquen IJ, Kornmann O, Barton SV, Price JA, Ortega HG. Characterization of the relationship between dose and blood eosinophil response following subcutaneous administration of mepolizumab. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2015;53:1015–1027.
17. Lugogo N, Domingo C, Chanez P et al. Long-term Efficacy and Safety of Mepolizumab in Patients With Severe Eosinophilic Asthma: A Multi-center, Open-label, Phase IIIb Study. *Clinical Therapeutics* 2016; 38(9): 2058-2071.
18. Khatri S, Moore W, Gibson PG et al. Assessment of the long-term safety of mepolizumab and durability of clinical response in patients with severe eosinophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143(5):1742-1751.
19. Bagnasco D, Caminati M, Ferrando M et al. Anti-IL-5 and IL-5Ra: Efficacy and Safety of New Therapeutic Strategies in Severe Uncontrolled Asthma. *BioMed Research International* November 2018; Article ID 5698212, 1-8.
20. Abonia P, Putnam PE. Mepolizumab in eosinophilic disorders. *Expert Rev Clin Immunol.* 2011; 7(4):411–417.

## BIOLOGICKÁ LIEČBA AKO PERSPEKTÍVA V MANAŽMENTE HEREDITÁRNEHO ANGIOEDÉMU

Jeseňák M.<sup>1</sup>, Hrubíšková K.<sup>2</sup>, Bánovčin P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centrum pre hereditárny angioedém – Expertízne pracovisko MZ SR pre raritné choroby, Klinika detí a dorastu, Klinika pneumológie a fizeológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Univerzitná nemocnica Martin

<sup>2</sup>Centrum pre hereditárny angioedém, V. Interná klinika, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Univerzitná nemocnica Bratislava – pracovisko Ružinov

**Abstrakt.** Hereditárny angioedém (HAE) predstavuje špecifickú formu vrodenej poruchy komplementu. Klinicky sa prejavuje recidivujúcimi nehistaminergnými angioedémami na koži alebo slizniciach. Manažment HAE pozostáva s dlhodobej profylaktickej liečby, krátkodobej profylaxie pred rizikovými situáciami (operácia, stomatochirurgický zákrok a i.) a zo záchranej liečby akútnych záchvatov. V súčasnosti sa terapeutické ciele zameriavajú na ovplyvnenie tvorby kľúčového mediátora záchvatov angioedému – bradykinínu. V klinickej praxi je k dispozícii inhibítor kalikreínu pre liečbu akútnych záchvatov (ekalantid) ako aj monoklonová protilátka proti kalikreínu – lanadelumab – určená pre dlhodobú profylaxiu. V klinických štúdiách sa potvrdila bezpečnosť ako aj účinnosť tohto prípravku. Skupina antagonistov kalikreínu predstavuje perspektívnu inovatívnu terapeutickú skupinu liekov rozširujúcu doterajšie terapeutické stratégie liečby tohto raritného ochorenia.

**Kľúčové slová:** hereditárny angioedém, bradykinín, kalikreín, dlhodobá profylaxia, lanadelumab, biologická liečba

**Abstract.** Hereditary angioedema (HAE) represents a specific form of inherited complement deficiency. HAE is clinically manifested by recurrent non-histaminergic angioedema of skin and mucosal tissues. Management of HAE consists of long term prophylaxis (LTP), short-term prophylaxis before risk situations (e.g. operation, stomato-surgery etc.) and of rescue treatment of acute attacks. Currently, therapeutic strategies are aimed on the modulation of bradykinin formation – a crucial mediator of angioedema development. In the clinical practice, kallikrein inhibitor for acute treatment, ecallantide, and monoclonal antibody against kallikrein for LTP, lanadelumab, are available. Clinical studies confirmed its safety and efficacy in the management of HAE. Antagonists of kallikrein represent perspective innovative therapeutic group enlarging currently available therapeutic strategies for this rare diseases.

**Key-words:** hereditary angioedema, bradykinin, kallikrein, long-term prophylaxis, lanadelumab, biological therapy

## **Hereditárny angioedém – základná charakteristika choroby**

**Hereditárny angioedém** (HAE) predstavuje špecifickú formu vrodenej poruchy komplementu s odhadovanou incidenciou 1:50 000, čo ho radí medzi zriedkavé choroby. Na rozdiel od klasických imunodeficiencií s pestrými infekčnými klinickými prejavmi sa HAE klinicky prejavuje **recidivujúcimi nehistamínernými angioedémami** na koži alebo slizniciach. Frekvencia záchvatov je značne variabilná, avšak samotné ochorenie negatívne vplyva na kvalitu života postihnutých jedincov vo všetkých oblastiach ich života [1,2].

V súčasnosti rozoznávame najmenej **5 podtypov HAE**, avšak najčastejšie sú prvé dva, ktoré sú spojené s poruchou tvorby alebo funkcie významnej regulačnej molekuly – **C1-inhibítora** (C1-INH) [3]. C1-INH sa podieľa nielen na regulácii komplementového systému, ale pôsobí aj v koagulačnom, kalikreín-bradykinínovom a plazminogén-fibrínovom systéme. Podkladom vzniku angioedémov je **nekontrolovaná nadmerná tvorba bradykinínu**. Nadmerne tvorený bradykinín vedie po väzbe na svoj receptor k extravazácii tekutiny a rozvoju kožných alebo slizničných angioedémov. Obzvlášť nebezpečnými sú laryngeálne záchvaty, ktoré ohrozujú pacienta priamo na živote [2,4].

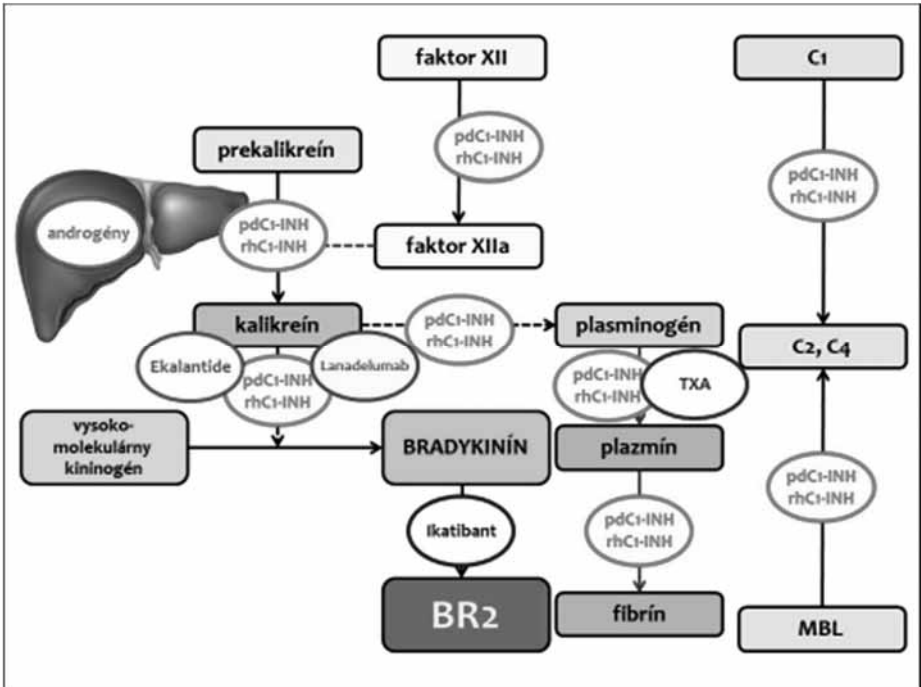
## **Stratégia liečby hereditárneho angioedému**

Manažment HAE pozostáva z:

- *dlhodobej profylaktickej liečby*,
- *krátkodobej profylaxie* pred rizikovými situáciami (operácia, stomatochirurgický zákrok a i.)
- a zo *záchranej liečby akútnych záchvatov* (obr. 1).

Z hľadiska akútnej liečby sa používa intravenózna aplikácia **koncentrátu humánneho plazmatického C1-inhibítora, rekombinantného humánneho C1-INH** či inhibítora kalikreínu – **ekalantidu** (nie je registrovaný v Európe). Inou možnosťou je subkutánna aplikácia antagonistu bradykinínového receptora – **ikatibantu** [2]. Pre krátkodobú profylaxiu sa v súčasnosti odporúča i.v. podanie **koncentrátu humánneho C1-INH**, hoci existujú aj práce s úspešným použitím rekombinantného humánneho C1-INH [5]. Použitie čerstvej zmrazenej plazmy sa dnes neodporúča pre žiadnu z liečebných stratégií HAE.

U časti pacientov je nevyhnutné aplikovať **dlhodobú profylaktickú liečbu**, ktorá pozostáva z pravidelného podávania určitého prípravku s cieľom znížiť frekvenciu záchvatov angioedému. Rozhodnutie pre dlhodobú profylaxiu je vysoko individuálne a závisí od mnohých charakteristík priebehu danej choroby u konkrétneho pacienta. Obvykle je potrebné túto liečbu podávať u **vysokofrekventných pacientov**, pričom do úvahy treba brať nielen **frekvenciu záchvatov**, ale aj ich **závažnosť** (najmä pacienti s laryngeálnymi záchvatmi, anamnézou intubácie), **dopad HAE na kvalitu života, dostupnosť zdravotníckej starostlivosti** ale aj **nedosiahnutie kontroly** nad chorobou napriek aplikácii liečby počas záchvatov HAE. Medzi faktory, ktoré treba brať do úvahy



**Obrázok 1:** Možnosti liečby hereditárneho angioedému podľa mechanizmu účinku.

*Legenda: BR2 – 2. receptor pre bradykinín, MBL – lektín viažuci manózu, pdC1-INH – koncentrát plazmatického ľudského C1-inhibítora, rhC1-INH – rekombinantný ľudský C1-inhibít, TXA – kyselina tranexámová.*

pri zvažovaní dlhodobej profylaxie patrí aj rýchlosť rozvoja záchvatov, anamnéza hospitalizácií v súvislosti s HAE, laryngeálne záchvaty, anamnéza intubácie, vynechané dni v práci či v škole, anxieta čo zásadný vplyv HAE na životný štýl. Jednou z klasických definícií kandidátneho pacienta na dlhodobú profylaxiu je  $\geq 1$  záchvat alebo závažná udalosť v súvislosti s HAE za mesiac alebo  $\geq 5$  dní práceneschopnosti (disability) za mesiac [6]. Zváženie dlhodobej profylaxie je potrebné u každého pacienta opakovane prehodnocovať, a to minimálne však jedenkrát ročne. Aj napriek dlhodobej profylaxii sa však môžu u daného pacienta objaviť záchvaty, a preto je nevyhnutné, aby mal každý pacient zabezpečené aspoň dve dávky lieku pre zvládnutie akútneho záchvatu [2,6,7]. Z tohto hľadiska sa používa ako prvá línia **koncentrát ľudského C1-INH** (intravenózne alebo subkutánne). Táto liečba je bezpečná, nemá interakcie s nijakými inými liekmi. Pacienti by mali byť v prípade takejto liečby očkovaní proti hepatitíde A a B, najmä z hľadiska opakovaných pobytov v zdravotníckom zariadení



a opakovaných invazívnych vstupov do cievneho riečiska. Samotný plazmatický koncentrát C1-INH je z hľadiska prenosu infekčných ochorení absolútne bezpečný. U časti pacientov je potrebné zabezpečiť trvalý venózný vstup (napr. implantovaný centrálny venózný katéter a pod.) [2,7]. Novú možnosť predstavuje koncentrát humánneho C1-INH pre subkutánne podanie, ktorý si môže pacient podávať aj v domácich podmienkach s použitím infúznej pumpy [8]. V druhej línii sú to **atenuované androgény** (napr. danazol), ktoré predstavujú najstaršiu liečebnú možnosť HAE. Z hľadiska obmedzení pre použitie androgénov je to detský a adolescentný vek, ženy vo fertílno-m veku, liekové interakcie (napr. statíny). Pacienti liečení androgénmi by mali raz ročne absolvovať sonografické vyšetrenie pečene a mať pravidelne (minimálne raz za 6 mesiacov) realizované kontrolné laboratórne vyšetrenia (hepatálne enzýmy, moč, krvný obraz). Cieľom je udržať kontrolu nad HAE pri titracii najnižšej účinnej dávky androgénov. Inou možnosťou sú **antifibrinolytiká** (napr. kyselina tranexámová). Spomedzi všetkých nástrojov dlhodobej profylaxie majú najnižšiu účinnosť a sú kontraindikované pri trombofílnych stavoch. Možno ich však použiť aj v detskom veku [2].

Problémy so zaistením venózneho prístupu u niektorých pacientov či nedostačonná účinnosť alebo nežiaduce účinky perorálnych liekov viedli k vývoju novej terapeutickkej skupiny liekov určených na prevenciu záchvatov HAE, ktoré sú založené na **inhibícii kalikreínu**. Touto stratégiou možno znížiť a kontrolovať tvorbu kľúčového mediátora angioedémových záchvatov – bradykinínu. V klinickom skúšaní sú alebo boli viaceré **perorálne inhibítory kalikreínu** (napr. prvogeneračné **avoralstat** – ich účinnosť sa v klinických skúšaní nepotvrdila napriek pozitívnym predklinickým dátam, druhogeneračné – **BXC7353**) pre prevenciu ako aj liečbu akútnych záchvatov HAE, avšak prvým schváleným liekom, ktorý sa dostal do klinickej praxe je monoklonová protilátka (mAb) proti kalikerínu – **lanadelumab** [9,10].

### **Lanadelumab – prvá biologická liečba pre hereditárny angioedém**

Lanadelumab (LAN, DX-2930) je plne humánna monoklonová protilátka triedy IgG1 s ľahkými *kappa*-reťazcami namierená proti plazmatickému kalikreínu, ktorá sa pripravuje pomocou ovariálnych buniek čínskeho škrečka. Viaže sa priamo do aktívneho miesta kalikreínu, čím inhibuje jeho proteolytickú aktivitu, a tým bráni štiepeniu vysoko-molekulového kininogénu (HMWK). V štúdiách vykázal LAN vysokú špecifickosť bez väzby na iné serínové proteázy [11].

Ide o prvú biologickú liečbu oficiálne schválenú pre dlhodobú prevenciu záchvatov HAE u pacientov  $\geq 12$  rokov [12]. Pôvodne sa skúmal aj v liečbe diabetického edému makuly, avšak výskum zastal v predklinickom štádiu. Počas eliminácie LAN je 2 týždne a jeho biologická dostupnosť je okolo 66 % po subkutánnej aplikácii [11]. Dávkovanie LAN je 300 mg s.c. každé 2 týždne do abdominálnej oblasti alebo do ramena či stehna. Ak pacient vykazuje dobrú klinickú odpoveď (definovanú ako absencia HAE ataku 6 mesiacov), možno zvážiť predĺženie intervalu na 4 týždne [9].

### **Predklinické a klinické štúdie s lanadelumabom**

Predklinické skúšanie fázy I v skupine zdravých jedincov potvrdilo silnú kapacitu LAN inhibovať aktivitu plazmatického kalikreínu, pričom inhibícia bola závislá od dávky a intervalov aplikácie. Zaujímavé bolo pozorovanie pretrvávania inhibície po 20 dňoch od aplikácie. Vyššia dávka (3 mg/kg) signifikantne blokovala štiepenie plazmatického vysokomolekulárneho kininogénu až do 28. dňa od aplikácie [13]. Nasledovala **dvojito-zaslepená, placebo kontrolovaná multicentrická štúdia fázy Ib** s HAE-pacientmi, ktorým boli aplikované dve dávky rôznej sily s odstupom 14 dní alebo placebo. Najvýraznejšia inhibícia plazmatickej kalikreínovej aktivity sa zaznamenala pri dávkach 300 a 400 mg, pričom maximálna redukcia aktivity bola na 22. deň. Úroveň štiepenia HMWK dosahoval hodnoty podobné zdravým jedincom. Pacienti v ramene s dávkou 300 mg zostali bez záchvatov v intervale od 5. do 50. dňa v porovnaní s 27 % pacientov liečených placebo [14]. Do **klinickej štúdie fázy III**, nazvanej HELP, boli zaradení pacienti, ktorí mali aspoň 1 HAE-záchvat 4 týždne pred začatím liečby LAN. Skúmali sa dve koncentrácie (150 mg a 300 mg), ktoré sa podávali každé 2 alebo 4 týždne oproti placebo. Všetky dávkovacie režimy v porovnaní s placebo viedli k signifikantnej redukcii záchvatov. Schválená bola následne dávka 300 mg á 2 týždne, ktorá viedla k 87 % redukcii HAE-záchvatov oproti placebo, a to bez ohľadu na predchádzajúcu frekvenciu záchvatov či anamnézu dlhodobej prevencie koncentrátom C1-INH [15-17]. Nasledovala otvorená pokračujúca HELP-štúdia, ktorá mala za cieľ skúmať optimálny dávkovací režim. Autori potvrdili, že 80 % pacientov liečených 300 mg á 2 týždne boli bez záchvatu v čase 4 týždňov od začiatku [18]. Liečba LAN zároveň signifikantne zlepšuje kvalitu života HAE pacientov [19].

Z hľadiska **nežiaducich účinkov** jednotlivé klinické aj predklinické skúšania potvrdili priaznivý bezpečnostný profil LAN. Medzi najčastejšie nežiaduce účinky patrili reakcie v mieste aplikácie, infekcie horných dýchacích ciest, bolesť hlavy, raš alebo myalgie. Aplikácia lieku samotným pacientom nebola asociovaná s vyšším výskytom lokálnych nežiaducich účinkov v porovnaní s aplikáciou zdravotníkom. Menej zriedkavé boli hypersenzitívne reakcie (1 vs. 0 % s placebo) či asymptomatické a prechodné zvýšenie hepatálnych enzýmov. LAN môže mierne predĺžiť aktivovaný parciálny trombolastínový čas, ale bez pozorovania zvýšenej krvácanosti či iných klinických dôsledkov. Výskyt protilátok proti LAN (ADA, *anti-drug antibodies*) bol 12 % v porovnaní s 2 % v placebovej skupine, pričom len časť bola neutralizujúca. Akokoľvek, výskyt ADA nemal negatívny vplyv na farmakokinetiku, farmakodynamiku, účinnosť alebo výskyt nežiaducich účinkov [15,17,18].

## Záver

Lanadelumab predstavuje prvú monoklonovú protilátku v terapeutickej oblasti HAE, pričom rozširuje súčasné dostupné možnosti preventívnej liečby, najmä pre pacientov s vysokou frekvenciou záchvatov napriek konvenčnej liečbe či pri prítomných nežiaducich účinkoch tejto liečby. Obzvlášť atraktívnou je forma aplikácie ako aj jej frekvencia. V klinickom vývoji sú aj ďalšie mAb – napr. proti koagulačnému faktoru XII [20].

## Literatúra:

1. Kuman Tuncel O., Gokmen N.M., Demir E., et al. The impact of hereditary angioedema on quality of life and family planning decisions. *Int J Psychiatry Med* 2019; doi:1177/0091217419837068.
2. Maurer M., Magerl M., Ansotegui I., et al. The international WAO/EAACI guideline for the management of hereditary angioedema – the 2017 revision and update. *WAO J* 2018;11:5.
3. Andrasi N., Veszeli N., Kohalmi K.V., et al. Idiopathic nonhistaminergic acquired angioedema versus hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2018;6:1205-1208.
4. Bova M., De Feo G., Parente R., et al. Hereditary angioedema: heterogeneity of pathogenesis and clinical phenotypes. *Int Arch Allergy Immunol* 2018;175:126-135.
5. Valerieva A., Staevska M., Jesenak M., et al. Recombinant human C1 esterase inhibitor as short-term prophylaxis in patients with hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2019; doi:10.1016/j.jaip.2019.08.011.
6. Bowen T., Cicardi M., Bork K., et al. hereditary angioedema: a current state-of-art review, VII: Canadian Hungarian 2007 International Consensus Algorithm for the Diagnosis, Therapy, and Management of Hereditary Angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008;100:S30-40.
7. Craig T., Busse P., Gower R.G., et al. Long-term prophylaxis therapy in patients with hereditary angioedema with C1 inhibitor deficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2018;121:673-679.
8. Craig T., Lumry W., Cicardi M., et al. Treatment effect of switching from intravenous to subcutaneous C1-inhibitor for prevention of hereditary angioedema attacks: COMPACT subgroup findings. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2019;7:2035-2038.
9. Busse P.J., Farkas H., Banerji A., et al. Lanadelumab for the prophylactic treatment of hereditary angioedema with C1 inhibitor deficiency: a review of preclinical and phase I studies. *BioDrugs* 2019;33:33-43.
10. Farkas H. Hereditary angioedema: examining the landscape of therapies and preclinical therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 2019;23:457-459.
11. Kenniston J.A., Faucette R.R., Martik D., et al. Inhibiting of plasma kallikrein by a highly specific active site locking antibody. *J Biol Chem* 2014;289:23596-23608.
12. Syed Y.Y. Lanadelumab: First global approval. *Drugs* 2018;78:1633-1637.
13. Chyung Y., Vince B., Iarrobino R., et al. A phase 1 study investigating DX-2930 in healthy subjects. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2014;113:460-466.
14. Banerji A., Busse P., Shennak M., et al. Inhibiting plasma kallikrein for hereditary angioedema prophylaxis. *N Engl J Med* 2017;376:717-728.

15. Banerji A., Riedl M.A., Bernstein J.A., et al. Effect of lanadelumab compared with placebo on prevention of hereditary angioedema attacks: a randomized clinical trial. *JAMA* 2018;320:2108-2121.
16. Johnston D.T., Anderson J.T., Schranz J., et al. Efficacy of lanadelumab in patients switching from long-term prophylaxis with C1-inhibitor (C1-INH): results from the phase 3 HELP study. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141(2 Suppl):AB47 [abstract No. 150].
17. Riedl M.A., Tachdjian R., Schranz J., et al. Consistent lanadelumab treatment effect in patients with hereditary angioedema (HAE) regardless of baseline attack frequency in the phase 3 HELP study. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141(2 Suppl):AB47 [abstract No. 151].
18. Riedl M.A., Bernstein J.A., Craig T., et al. An open-label study to evaluate the long-term safety and efficacy of lanadelumab for prevention of attacks in hereditary angioedema: design of the HELP study extension. *Clin Transl Allergy* 2017;7:36.
19. Lumry W.R., Weller K., Magerl M., et al. Lanadelumab markedly improves health-related quality of life in hereditary angioedema patients in the HELP study. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141(Suppl. 2):AB47 [abstract No. 152].
20. Cao H., Biondo M., Lioe H., et al. Antibody-mediated inhibition of FXIIa blocks downstream bradykinin generation. *J Allergy Clin Immunol* 2018;142:1355-1358.

Adresa:

Prof. MUDr. Miloš Jeseňák, PhD., MSc., MBA, MHA

Klinika pneumológie a ftizeológie JFUK

Univerzitná nemocnica Martin

Kollárova 4248/2

036 01 Martin

Mail: jesenak@gmail.com

## MECHANIZMY PÔSOBENIA REGULAČNÝCH LYMFOCYTOV A MOŽNOSTI ICH VYUŽITIA V LIEČBE AUTOIMUNITNÝCH CHORÔB

### MECHANISMS OF ACTION OF REGULATORY LYMPHOCYTES AND POSSIBILITIES OF THEIR USE IN THE TREATMENT OF AUTOIMMUNE DISEASES

**Buc M.**

*Imunologický ústav, Lekárska fakulta UK, Bratislava*

#### **SÚHRN**

Základnou vlastnosťou imunitného systému je jeho schopnosť rozlíšiť vlastné molekuly buniek, tkanív a orgánov od nevlastných, vlastné tolerovať a cudzie likvidovať. V minulosti sme sa zameriavali najmä na rôzne mechanizmy akými imunitný systém rozpozná a zničí vonkajšieho narušiteľa integrity organizmu. Neskôr sa obrátila pozornosť na spôsoby, akým imunitný systém toleruje vlastné antigény, resp. ako reguluje rozsah prebiehajúcich reakcií, aby nevyústili do autoimunitných či alergických procesov. V uvedených procesoch zohrávajú dôležitú úlohu imunosupresívne mechanizmy, medzi ktorými z najvýznamnejších patria tie, ktoré zabezpečujú regulačné T- a B-lymfocyty. Cieľom predkladanej práce je podať aktuálnu informáciu o uvedených bunkách, ktoré zabezpečujú jemnú rovnováhu medzi prozápalovou odpoveďou, ktorá je potrebná na zdanie infekcie a imunosupresívnou odpoveďou, aby sa zabránilo chronickému zápalu a poškodeniu tkaniva. Navyše sa v článku poukazuje na možnosť využitia týchto buniek v liečbe niektorých autoimunitných chorôb.

*Kľúčové slová:* cytokíny, FOXP3, NKT-bunky, regulačné B- a T-lymfocyty, SLE

#### **SUMMARY**

Basic characteristic of the immune system is its ability to distinguish self-molecules of cells, tissues and organs from nonself, to tolerate self and dispose of nonself. In the past, we concentrated on various defence mechanisms by which the immune system recognizes and destroys intruders of our integrity. Later, we started to pay attention to how the immune system tolerates our own antigens or regulates extent of ongoing reactions to prevent induction of autoimmune or allergic processes. Immunosuppressive mechanisms, especially those mediated by regulatory B and T cells, play a paramount role in the aforementioned processes. The aim of this article is to offer a reader a current information on these cells, which secure fine equilibrium between a proinflammatory response responsible for elimination of an infection and an immunosuppressive response, which prevents chronic inflammation and tissue damage. Moreover, the author describes possibilities of Treg cells use in the therapy of some autoimmune diseases.

*Key words:* cytokines, FOXP3, NKT cells, regulatory B- and T-lymphocytes, SLE

Indukcia a udržiavanie imunitnej tolerancie na vlastné a neškodné environmentálne antigény je základným princípom predchádzania vzniku autoimunitných procesov a chronického zápalu. Imunosupresívne mechanizmy sú tiež veľmi dôležité, aby udržali rozsah zápalu na primeranej úrovni. U zdravých osôb sa preto vytvára jemná rovnováha medzi prozápalovou odpoveďou, ktorá je potrebná na zdolanie infekcie a imunosupresívnou odpoveďou, aby sa zabránilo chronickému zápalu a poškodeniu tkaniva. Imunitný systém vyvinul viacero mechanizmov, aby nereagoval na vlastné antigény, či už fyzickou elimináciou autoreaktívnych lymfocytov v týmuse alebo zábranou ich aktivácie na periférii. Práve túto poslednú funkciu imunitného systému zabezpečujú predovšetkým regulačné T- a B-lymfocyty.

**Prirodzené regulačné T-lymfocyty (nTreg)** potláčajú aktivitu T-lymfocytov (tak  $\alpha\beta$  ako aj  $\gamma\delta$ ), B-lymfocytov, NK-, NKT-buniek, dendritových buniek a makrofágov. nTreg-lymfocyty sa vyvíjajú dreni týmusu ako nezávislá, samostatná populácia buniek. Diferenciácia nTreg-lymfocytov si vyžaduje aktiváciu špecifického génu – *FOXP3* (*forkhead box P3*; Xp11.23-q13.3), ktorý kóduje rovnomenný transkripčný faktor a ovplyvňuje aktiváciu alebo represiu viac ako 1 400 génov (1-3). Tento sa však objavuje až v druhej ich fáze diferenciácie. Prvý diferenciálny signál zabezpečuje signalizácia cez antigénový receptor  $\alpha\beta$  T-lymfocytov (TCR), ktorý vedie k expresii CD25 (alfa-reťazec vysokoafinitného receptora pre IL-2) ako aj charakteristických membránových molekúl nTreg-buniek GITR, OX40 a TNFR2; k tvorbe transkripčného faktora FOXP3 však ešte nedochádza. Ten sa objavuje až v druhej fáze, pod vplyvom IL-2 (4, 5). O veľkom biologickom význame *FOXP3* svedčí skutočnosť, že ak dôjde k jeho mutácii (dodnes sa ich opísalo viac než 75) vznikne choroba, ktorá je nezlučiteľná so životom – **IPEX** (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy*) (6, 7).

Treg-lymfocyty predstavujú 5 – 10 %  $CD4^+CD8^-$  tymocytov, v periférii je ich približne 10 % z celej populácie  $CD4^+$ -lymfocytov. Sú to dlho žijúce bunky, ktoré charakterizujú viaceré membránové molekuly. Problémom však je, že nie sú špecifické iba pre nTreg-lymfocyty; typicky majú CD4 a CD25. CD25 však vlastní aj aktivované T-lymfocyty. Neskôr sa ukázalo, že nTreg-lymfocyty majú zníženú expresiu CD127 (alfa-reťazec receptora pre IL-7) (8), ale opäť to nemožno považovať typické len pre nTreg, lebo aj aktivované  $CD4^+$ -lymfocyty majú tendenciu znižovať množstvo tohto antigénu vo svojich membránach.

nTreg-lymfocyty sú prirodzene anergické (t. j. pri *in vitro* stimulácii monoklonovými anti-CD3 protilátkami, fytohemaglutinínom alebo alogénnymi bunkami neproliferujú a neprodukujú ani IL-2). Výrazne však tlmia indukciu imunitnej odpovede. Mechanizmy, akým to robia, sú viaceré; v podstate ich možno rozdeliť do piatich skupín: 1., prostredníctvom inhibičných cytokínov (IL-10, IL-35 a TGF- $\beta$ ), 2., indukciou apoptózy, 3., prostredníctvom indukcie zmien v metabolizme (produkujú indolamín 2, 3-deoxygenázu, ktorá katabolizuje tryptofán, čo je esenciálna aminokyselina potrebná na proliferáciu T-lymfocytov a svojimi membránových exonukleázami CD37 a CD39 zabezpečujú v prostredí imunosupresívny adenosín), 4., moduláciou dozrievania alebo funkcie DC a napokon mechanizmom trogocytózy, t. j. odstránením komplexu „HLA-molekula – peptid“ z membrány dendritovej bunky (DC), ktorá takto stratí schopnosť indukovať efektorové bunky (9-11).

Výsledky výskumu ostatných rokov ukazujú, že z týmusu sa na perifériu kontinuálne dostávajú autoreaktívne T-lymfocyty vo väčšej miere ako sme si to doteraz mysleli a prakticky permanentne dochádza k ich aktivácii. Ich diferenciáciu do plne funkčných efektorových buniek blokuje práve nTreg-lymfocyty. Aj migračné dendritové bunky konštantne prinášajú z tkanív a orgánov do lymfatických uzlín autoantigény, ktoré následne rozpoznávajú autoreaktívne T-lymfocyty, ktoré po svojej aktivácii by mohli spustiť autoimunitné procesy. Zabránia im v tom nTreg-lymfocyty, ktoré tiež rozpoznávajú prezentované autoantigény. Navyše ich imunosupresívnu aktivitu zvyšuje IL-2, ktorý produkuje aktivované efektorové T-lymfocyty. Tým dochádza k ich expanzii a vytvoreniu mikroprostredia, ktoré znemožní indukciu autoimunitných procesov. Táto interakcia medzi migračnými DC a efektorovými a regulačnými lymfocytmi na deje na periférii paraktortikálnej oblasti lymfatických uzlín, v zhlukoch oddelených od seba (12, 13). Tento poznatok opäť iba potvrdil naše predchádzajúce vedomosti, že IL-2 nie je hlavným cytokínom potrebným na rozvoj efektorovej imunitnej odpovede ako sme si pôvodne mysleli, ale že ide o cytokín, ktorý zabezpečuje existenciu a aktivitu nTreg-lymfocytov.

Regulačné T-lymfocyty môžu vznikať aj na periférii. Ide o **periférne regulačné T-lymfocyty (pTreg)**, ktoré sa diferencujú z naivných CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov počas imunitnej odpovede (14). Vznikajú najmä v slizničných priestoroch; najlepšie tieto udalosti poznáme v čreve. Ak na naivné CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty pôsobí TGF- $\beta$ , IL-2 a kyselina retinová, ktorú spracovaním vitamínu A produkujú dendritové bunky, diferencujú sa na pTreg-lymfocyty (15). Najnovšie sa zistilo, že tieto môžu vzniknúť aj pod vplyvom IL-33, ktorý sa konštitutívne exprimuje v epitelových bunkách čreva a po ich poškodení sa uvoľňuje do prostredia a pôsobí ako alarmín (16). Po väzbe na svoj receptor, ST2, spolu so signalizáciou, ktorú spúšťa TGF- $\beta$  podporuje aktiváciu transkripčného faktora GATA3, čo je známy transkripčný regulátor *FOXP3*-génu. Navyše IL-33 zvyšuje aj syntézu svojho receptora, zvyšujúc tak pretrvávanie pTreg-lymfocytov v danom mikroprostredí (17).

V porovnaní s nTreg-lymfocytmi sú pTreg-bunky menej stabilné a v zápalovom prostredí môžu stratiť schopnosť exprimovať *FOXP3* a naopak získať schopnosť syntetizovať prozápalové cytokíny ako je IFN- $\gamma$  a IL-17 (tab. 1). Tento nedostatok stability možno vysvetliť metylačným stavom CNS2-oblasti (conserved non-coding region 2) v promótorovej oblasti *FOXP3*-génu<sup>1</sup>. Táto oblasť je pri nTreg-bunkách stabilne hypometylovaná aj v zápalovom prostredí kým pri pTreg-bunkách sa demetyluje neúplne (18, 19).

Okrem uvedených subpopulácií s tlmivými funkciami existujú aj ďalšia populácia imunosupresívne pôsobiacich buniek, označovaná ako **Tr1-lymfocyty**. Vzniká pod vplyvom súčasného pôsobenia IL-27 a TGF- $\beta$  na naivné Th-lymfocyty a produkuje predovšetkým IL-10. Okrem toho imunitnú odpoveď tlmia aj tak, že zabíjajú bunky prezentujúce antigén perforínovo-granzýmovým mechanizmom. Okrem CD4, charakterizujú ich špecifické znaky CD49b a LAG-3 (CD223). Tr1-lymfocyty sú *FOXP3*-negatívne, namiesto toho exprimujú viaceré transkripčné faktory typické pre iné subpopulácie T-lymfocytov, napr. c-MAF, AHR a iné (20, 21).

Hlavnou biologickou funkciou Treg-lymfocytov, ako vyplýva z predchádzajúceho textu, je udržanie imunitných a zápalových procesov vo fyziologických hraniciach. Ich chýbanie, alebo porucha funkcie sa zákonite prejaví vývojom autoimunitných chorôb.

1 Metylácia génov spôsobuje ich zníženú transkripciu

Porucha funkcie sa dokázala pri vývoji *diabetes mellitus* prvého typu (22), reumatoidnej artritídy (23, 24), *myastenia gravis* (25), *sclerosis multiplex* (26, 27) a pri iných chorobách. Zníženie ich počtov sa potvrdilo pri m. Crohn a ulceróznej kolitíde (28), Gravesovej chorobe (29) a vaskulitíde vyvolanej vírusom hepatitídy C (30). Pri systérovom *lupus erythematosus* (SLE) perzistentné prozápalové cytokínové prostredie zabraňuje Treg-lymfocytom presadiť svoje imunosupresívne pôsobenie (31, 32).

Znížené počty nTreg-lymfocytov sa pozorujú aj u alergických pacientov, čo spôsobuje zníženú kontrolu aktivácie Th2-lymfocytov (3). Tu sa potvrdzuje aj hygienická hypotéza – nedostatočná aktivácia Th1-lymfocytov spôsobuje aj malú produkciu IL-2 a tým aj zníženú aktivitu nTreg-lymfocytov.

IL-2 má rozhodujúci vplyv na vznik a udržiavanie aktivity nTreg-lymfocytov. Táto skutočnosť viedla k myšlienke využiť IL-2 v liečbe tých chorôb, kde je ich aktivita znížená. IL-2 je však aj silným aktivátorom NK-buniek aj cytotoxických T-lymfocytov, a preto sa pri liečbe musel aplikovať v dávke nedostatočnej na ich aktiváciu, ale súčasne postačujúcej na podporenie funkcie, resp. aj expanzie nTreg-buniek; inými slovami začala sa **nízkodávková liečba IL-2**. Táto liečba sa osvedčila pri liečbe autoimunitného *diabetes mellitus* (T1D), SLE, aterosklerózy a *alopecia areata* (19, 33). V súčasnosti sa odporúča začať 5-dňovú liečbu IL-2 v dávke jeden milión i. u./deň a opakovať ju v dvojtýždňových intervaloch. Úvodná liečba zvyšuje počty nTreg-lymfocytov v periférnej krvi na dvojnásobok a udržiavacie dávky spôsobia, že počty nTreg-lymfocytov sa pohybujú medzi 20 % až 60 % nad základné hodnoty. Počet nTreg-lymfocytov sa zvyšuje a to nielen v periférnej krvi, ale aj v mieste prebiehajúcich autoimunitných procesov (dokázané v bioptických vzorkách pri *alopecia areata*) (33).

Vylepšenou metódou uvedenej terapie je podávanie IL-2 súčasne s monoklonovými protilátkami (mAb) proti nemu. Vytvorili sa humánne mAb proti IL-2. Tieto stabilizujú súčasne podaný humánný IL-2 v takej konformácii, ktorý podporuje expanziu nTreg-lymfocytov. Komplex „mAb – IL-2“ indukoval remisiu T1D v myšom NOD-modeli, redukoval intenzitu patologických procesov pri experimentálnej alergickej encefalitíde a chránil myši pri xenogénnej chorobe štepu proti hostiteľovi (GvH) (34), čo je prísľubom aj pre humánnu medicínu.

Ďalšou možnosťou liečby je **podávanie nTreg-lymfocytov samotných**. Tieto sa izolujú z periférnej krvi pacienta a v *in vitro* podmienkach sa rozmnožia; aktivujú sa monoklonovými protilátkami anti-TCR a anti-CD28 za prítomnosti IL-2, ktorý zabezpečí ich proliferáciu. Obyčajne dôjde k 500 až 2 000-násobnému zvýšeniu ich počtov; následne sa aplikujú pacientovi. Dokázalo sa, že takto rozmnožené Treg-bunky pretrvávajú v organizme pacienta minimálne jeden rok. Prvá fáza úspešných klinických skúšok sa uskutočnila pri liečbe T1D (35).

Namiesto expanzie Treg-lymfocytov z periférnej krvi možno túto urobiť aj z rozmrazenej umbilikálnej krvi. Autori udávajú 211-násobné zrnnoenie buniek počas 18-dňovej kultivácie Treg-buniek s guľôčkami obalenými monoklonovými protilátkami (mAb) anti-CD3 a anti-CD28 v prítomnosti IL-2 (36-38). Ešte väčší výťažok sa získal, keď sa umbilikálne nTreg-lymfocyty *in vitro* kultivovali s umelo vytvorenými APC (aAPC) v prítomnosti mAb anti-CD3 a IL-2. aAPC predstavovali bunky nádorovej línie K562, ktorým sa do genómu vpravil gén pre FcγRI (CD64; vysokoafinitný receptor pre IgG) a gén pre CD86, čo je ligand pre CD28 v membránach Treg-lymfocytov. Pri vzájomnej kultivácii sa



**Tab. 1 – Vlastnosti nTreg a iTreg**

		<b>nTreg</b>	<b>pTreg</b>
<b>Vznik</b>	Tkanivo  Potrebné cytokíny Kostimulácia	Týmus  IL-2 alebo IL-15 CD28	Sekundárne lymfoidné orgány, zápalové tkanivo TGF- $\beta$ , IL-2 CTLA-4
<b>Látky zvyšujúce supresívnu funkciu</b>	RA Rapamycín	Nie Nie	Áno Nie
<b>Špecifickosť</b>		Vlastné antigény	Aloantigény, mikroorganizmy čreva, vlastné antigény uvoľňujúce sa pri zápale
<b>Diferencia na Th17-lymfocyty</b>	IL-6 Antagonisti ALTRA Antagonisti rapamycínu	Áno Áno Ešte nie je známe	Áno Áno Áno
<b>Intracelulárne znaky</b>	FOXP3 HELIOS	Áno Áno	Áno Nie

RA – kyselina retinová

anti-CD3 mAb nadviažu svojim Fc-fragmentom na Fc $\gamma$ RI v membráne aAPC. Pri interakcii aAPC s nTreg lymfocytmi sa tieto aktivujú aj mAb anti-CD3 aj prostredníctvom svojich CD28-molekúl po väzbe na CD86. IL-2 zase zabezpečí ich proliferáciu. Výsledkom bola veľká, až 13 000-násobná expanzia nTreg lymfocytov! Následná aplikácia takto rozmnožených Treg-lymfocytov podstatne znížila výskyt akútnej GvH-reakcie (37, 38).

Liečba autoimunitných chorôb indukovaných Treg-lymfocytmi má však jednu veľkú nevýhodu. Dochádza totiž k rozmnoženiu buniek, ktoré sú polyspecifické, čo znamená, že po aplikácii pacientovi môžu blokovať aj žiaduce imunitné procesy. Východiskom je preto vytvorenie takých iTreg-lymfocytov, ktoré by boli špecifické iba pre dané autoantigény. Tu prichádza na pomoc molekulové inžinierstvo v podobe vytvárania Treg-lymfocytov s chimérovým antigénovým receptorom.

Vytváranie buniek s umelo vytvoreným antigénovým receptorom T-lymfocytov (**CAR** – chimeric antigen receptor) sa datuje do polovice 80. rokov minulého storočia za účelom účinnejšieho boja proti nádorom. Až v súčasnosti sa obracia pozornosť využiť CAR-technológiu aj pre iné oblasti. CAR sú umelo vytvorené receptory, ktoré umožnia T-lymfocytu aktivovať sa hneď po rozpoznaní špecifického antigénu a nečakať na ďalší kostimulačný či polarizačný signál. CAR je syntetická štruktúra. Na gémovej úrovni má variabilné gény pre ťažký ( $V_H$ ) a ľahký reťazec ( $V_L$ ) monoklonových protilátok (scFv – single chain variable fragment) špecifických pre daný autoantigén,

exón pre pántovú oblasť, obvyčajne IgG1-typu, exón pre transmembránový úsek, ktorý môže pochádzať z viacerých transmembránových molekúl, ako CD4, CD8, alebo CD28. Tieto gény sa napoja na gény pre cytoplazmovú časť budúceho receptora, ktorá bude zodpovedať za aktiváciu T-lymfocyty. Tu existujú viaceré variácie. Prvá generácia CAR mala len jeden exón kódujúci aktivačný úsek CD3 dzéta-reťazca, druhá generácia CAR navyše ešte exón determinujúci kostimulačnú molekulu CD28, alebo inú kostimulačnú molekulu (4-1BB, OX40, DAP10) alebo oba (tretia generácia CAR-lymfocytov) (39).

Zmyslom existencie variabilných domén protilátok v konštrukte je nielen väzba daného autoantigénu, ale predovšetkým vyhnutie sa fenoménu imunitnej reštrikcie, ktorý by platil keby v konštrukte boli scFv-domény TCR. Takto vytvorené CAR-receptory možno totiž použiť pre liečbu viacerých pacientov bez ohľadu na ich HLA-molekuly. Aktivačný úsek CD3 dzéta-reťazca plní tú istú úlohu ako aj pri TCR, t. j. ide o úsek, na ktorý sa pripájajú tyrozínkinázy (ITAM – immunoreceptor tyrosine-based activation motif) zodpovedné za aktivačné procesy. Vychádzajúc z dvojsignálového modelu aktivácie T-lymfocytov, nestačí iba rozpoznanie antigénu, ale musí dôjsť aj k signalizácii, ktorá vzniká pri kostimulačných interakciách, typicky CD80 a CD28. A práve tomu slúžia druhý, resp. tretí cytoplazmový úsek CAR-konštruktu (40).

Takto umelo vytvorený CAR-gén sa za pomoci retrovírusových alebo lentivírusových vektorov prenesie do vopred izolovaných a rozmnožených Treg-lymfocytov, ktoré sa následne prenesú príjemcovi. CAR-lymfocyty špecificky rozoznávajú autoantigény, aktivujú sa a presadzujú svoje imunosupresívne pôsobenie. Táto metóda sa odskúšala na viacerých experimentálnych modeloch s pozitívnym efektom (41), čo je príslubom aj pre použitie v humánnej medicíne v najbližšej dobe.

Regulačné T-lymfocyty poznáme už dve desaťročia (7). Nedávno k nim pribudli aj **regulačné B-lymfocyty** (Breg). V čom sa odlišujú od Treg-lymfocytov? Predovšetkým je to ich pôvod. Kým Treg-lymfocyty poznáme prirodzené a indukované, tak pri Breg-lymfocytoch sa zatiaľ nepodarilo zistiť ich špecifický transkripčný faktor, takže vznikajú len ako indukované. Vznikajú v zápalovom prostredí pod vplyvom prozápalových cytokínov, rozpoznaním molekulových vzorov (PAMP) alebo priamo autoantigénov. V podstate každý B-lymfocyt, keď získa patričné signály, sa môže diferencovať na Breg-bunku. Svoju imunosupresívnu aktivitu Breg-lymfocyty uplatňujú kontaktným (exprimujú FASL, PD1L, CTLA4), aj bezkontaktným spôsobom (prostredníctvom syntézy IL-10, IL-35 a TGF- $\beta$ ). Túto svoju schopnosť zvyšujú aj indukciou Treg-lymfocytov priamou kooperáciou s Th0-lymfocytmi za účasti HLA-II a kostimulačných (CD80) molekúl (42-44).

Breg-lymfocyty sú heterogénnou populáciou buniek. Najlepšie preskúmaná subpopulácia sa vyznačuje malou expresiou IgD vo forme antigénového receptora a molekulami CD1d, CD19, CD20, CD24 a CD38. Prekvapením je, že regulačnú funkciu majú aj plazmatické bunky (42, 45). Breg-lymfocyty prezentáciou glykolipidov prostredníctvom svojich CD1d molekúl indukujú aj imunosupresívnu aktivitu NKT-buniek (syntézou IL-10). U pacientov so SLE sú počty NKT-buniek značne znížené práve pre poruchu funkcie Breg-lymfocytov (46). Pri SLE sa pozoroval aj ďalší defekt spojený s Breg-lymfocytmi. SLE charakterizuje o. i. aj zvýšená produkcia IFN- $\alpha$  plazmacytoidnými bunkami (pDC) a zistilo sa, že sú to práve Breg-lymfocyty, ktorých nedostatočná funkcia nedokáže tlmiť ich nadmernú syntézu interferónov (47, 48). Naznačuje to, že

u zdravých osôb existuje spätná väzba medzi Breg-lymfocytmi a pDC, kým u pacientov s SLE nie. Liečba pacientov rituximabom (monoklonové protilátky anti-CD20) viedla k znovuoobjaveniu sa Breg-lymfocytov, obnoveniu funkcie NKT-buniek a k zlepšeniu klinického stavu (47, 48).

### Literatúra

1. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):490-500.
2. Li X, Zheng Y. Regulatory T cell identity: formation and maintenance. *Trends Immunol.* 2015;36(6):344-53.
3. Van Gool F, Nguyen MLT, Mumbach MR, Satpathy AT, Rosenthal WL, Giacometti S, et al. A Mutation in the Transcription Factor Foxp3 Drives T Helper 2 Effector Function in Regulatory T Cells. *Immunity.* 2019;50(2):362-77 e6.
4. Lio CW, Hsieh CS. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity.* 2008;28(1):100-11.
5. Owen DL, Mahmud SA, Sjaastad LE, Williams JB, Spanier JA, Simeonov DR, et al. Thymic regulatory T cells arise via two distinct developmental programs. *Nat Immunol.* 2019;20(2):195-205.
6. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001;27(1):20-1.
7. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-64.
8. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med.* 2006;203(7):1701-11.
9. Akkaya B, Oya Y, Akkaya M, Al Souz J, Holstein AH, Kamenyeva O, et al. Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide-MHC class II from dendritic cells. *Nat Immunol.* 2019;20(2):218-31.
10. Rissiek A, Baumann I, Cuapio A, Mautner A, Kolster M, Arck PC, et al. The expression of CD39 on regulatory T cells is genetically driven and further upregulated at sites of inflammation. *J Autoimmun.* 2015;58:12-20.
11. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 2009;30(5):636-45.
12. Liu Z, Gerner MY, Van Panhuys N, Levine AG, Rudensky AY, Germain RN. Immune homeostasis enforced by co-localized effector and regulatory T cells. *Nature.* 2015;528(7581):225-30.
13. Carrizosa E, Mempel TR. Immunology: In the right place at the right time. *Nature.* 2015;528(7581):205-6.
14. Yadav M, Stephan S, Bluestone JA. Peripherally induced tregs - role in immune homeostasis and autoimmunity. *Front Immunol.* 2013;4:232.
15. Dons EM, Raimondi G, Cooper DK, Thomson AW. Induced regulatory T cells: mechanisms of conversion and suppressive potential. *Hum Immunol.* 2012;73(4):328-34.
16. Manzanillo P, Eidenschenk C, Ouyang W. Deciphering the crosstalk among IL-1 and IL-10

- family cytokines in intestinal immunity. *Trends Immunol.* 2015;36(8):471-8.
17. Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, Frohlich A, Adelman K, Wohlfert EA, et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature.* 2014;513(7519):564-8.
  18. Feng Y, Arvey A, Chinen T, van der Veeken J, Gasteiger G, Rudensky AY. Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the Foxp3 locus. *Cell.* 2014;158(4):749-63.
  19. Wing JB, Tanaka A, Sakaguchi S. Human FOXP3(+) Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer. *Immunity.* 2019;50(2):302-16.
  20. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med.* 2013;19(6):739-46.
  21. Magnani CF, Alberigo G, Bacchetta R, Serafini G, Andreani M, Roncarolo MG, et al. Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. *Eur J Immunol.* 2011;41(6):1652-62.
  22. Visperas A, Vignali DA. Are Regulatory T Cells Defective in Type 1 Diabetes and Can We Fix Them? *J Immunol.* 2016;197(10):3762-70.
  23. Chavele KM, Ehrenstein MR. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett.* 2011;585(23):3603-10.
  24. Li H, Yang D, Tang Z. Bcl2 like protein-12 suppresses Foxp3(+) regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Am J Transl Res.* 2019;11(5):3048-55.
  25. Balandina A, Lecart S, Dartevelle P, Saoudi A, Berrih-Aknin S. Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood.* 2005;105(2):735-41.
  26. Kumar M, Putzki N, Limmroth V, Remus R, Lindemann M, Knop D, et al. CD4+CD25+FoxP3+ T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2006;180(1-2):178-84.
  27. Buc M. Role of regulatory T cells in pathogenesis and biological therapy of multiple sclerosis. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:963748.
  28. Yamada A, Arakaki R, Saito M, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2016;22(7):2195-205.
  29. Mao C, Wang S, Xiao Y, Xu J, Jiang Q, Jin M, et al. Impairment of regulatory capacity of CD4+CD25+ regulatory T cells mediated by dendritic cell polarization and hyperthyroidism in Graves' disease. *J Immunol.* 2011;186(8):4734-43.
  30. Boyer O, Saadoun D, Abriol J, Dodille M, Piette JC, Cacoub P, et al. CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood.* 2004;103(9):3428-30.
  31. Ohl K, Tenbrock K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol.* 2015;45(2):344-55.
  32. Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(12):849-59.
  33. Klatzmann D, Abbas AK. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(5):283-94.
  34. Trotta E, Bessette PH, Silveria SL, Ely LK, Jude KM, Le DT, et al. A human anti-IL-2 antibody that potentiates regulatory T cells by a structure-based mechanism. *Nat Med.* 2018;24(7):1005-14.

35. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med.* 2015;7(315):315ra189.
36. Sharma A, Rudra D. Regulatory T cells as therapeutic targets and mediators. *Int Rev Immunol.* 2019;1-21.
37. Brunstein CG, Miller JS, McKenna DH, Hippen KL, DeFor TE, Sumstad D, et al. Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood.* 2016;127(8):1044-51.
38. Parmar S, Shpall EJ. Treg adoptive therapy: is more better? *Blood.* 2016;127(8):962-3.
39. Dai H, Wang Y, Lu X, Han W. Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(7).
40. Jensen MC, Riddell SR. Design and implementation of adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells. *Immunol Rev.* 2014;257(1):127-44.
41. Wu M, Zhang L, Zhang H, Ning J, Tu S, He Y, et al. CD19 chimeric antigen receptor-redirectioned T cells combined with epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 peptide-derived dendritic cell vaccine in leukemia. *Cytotherapy.* 2019;21(6):659-70.
42. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity.* 2015;42(4):607-12.
43. Ray A, Khalil MI, Pulakanti KL, Burns RT, Gurski CJ, Basu S, et al. Mature IgD(low/-) B cells maintain tolerance by promoting regulatory T cell homeostasis. *Nat Commun.* 2019;10(1):190.
44. Yang M, Rui K, Wang S, Lu L. Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol.* 2013;10(2):122-32.
45. Maravillas-Montero JL, Acevedo-Ochoa E. Human B Regulatory Cells: The New Players in Autoimmune Disease. *Rev Invest Clin.* 2017;69(5):243-6.
46. Oleinika K, Rosser EC, Matei DE, Nistala K, Bosma A, Drozdov I, et al. CD1d-dependent immune suppression mediated by regulatory B cells through modulations of iNKT cells. *Nat Commun.* 2018;9(1):684.
47. Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J Clin Invest.* 2017;127(3):772-9.
48. Menon M, Blair PA, Isenberg DA, Mauri C. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity.* 2016;44(3):683-97.

Adresa:

Prof. MUDr. Milan Buc, DrSc.

Imunologický ústav LFUK

Odborárske nám. 14

813 72 Bratislava

E-mail: milan.buc@fmed.uniba.sk

## SLEDOVANIE DYNAMIKY T- REGULAČNÝCH LYMFOCYTOV V PERIFÉRNEJ KRVI U TEHOTNÝCH ŽIEN S PORUCHOU PLODNOSTI NA IMUNOINTERVENČNEJ LIEČBE

Dzurillová Ž.<sup>1,2</sup>, Dzurilla M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ambulancia reprodukčnej imunológie, Medicentrum Dzurilla, Nitra, SR

<sup>2</sup>Laboratórium klinickej imunológie a alergológie, Medicentrum Dzurilla, Nitra, SR

### Abstrakt

Proces implantácie embrya je spojený s aktiváciou imunitného systému matky a súčasnou indukciou tolerancie plodu na feto-maternálnom rozhraní. Toleranciu otcovských antigénov semialogénneho plodu zo strany imunitného systému matky zabezpečujú okrem iných mechanizmov aj prirodzené regulačné T-lymfocyty (nTreg) a indukované T-regulačné lymfocyty (iTeg) voči paternálnym antigénom. Cieľom našej práce bolo sledovanie dynamiky absolútnych a percentuálnych počtov T-regulačných lymfocytov v periférnej krvi u žien v I., II. a III. trimestri tehotenstva. Tieto ženy mali anamnézu poruchy plodnosti v zmysle sterility a/alebo infertility a zároveň bola u nich aplikovaná imunointervenčná liečba. Boli rozdelené do podskupín podľa typu imunomodulačnej liečby. Taktiež sme sledovali uvedený parameter v rovnakom období v kontrolnej skupine, v ktorej boli zastúpené zdravé tehotné ženy bez akejkoľvek liečby.

Súbor tvorilo 159 pacientiek, z toho 59 otehotnelo spontánne, 68 po embryotransfere a 32 bolo zaradených do kontrolnej skupiny. V skupine žien so spontánnym otehotnením a zdravých žien bol zaznamenaný postupný pokles zastúpenia absolútneho počtu T-regulačných lymfocytov. U žien, ktoré dosiahli tehotenstvo po embryotransfere bol zaznamenaný nárast T-regulačných lymfocytov počas I. trimestra tehotenstva a následne pokles až dokonca gravidity v percentuálnych aj absolútnych počtoch. Najväčšiu dynamiku sme pozorovali v skupine pacientiek so spontánnym otehotnením s podávaním intramuskulárnych alebo intravenózných imunoglobulínov. Tu sme zaznamenali najväčší nárast počas I. trimestra tehotenstva. Kontrolná skupina celkovo vykazovala signifikantne nižšie hladiny T-regulačných lymfocytov v jednotlivých obdobiach oproti ženám s anamnézou poruchy plodnosti.

Na základe našich výsledkov môžeme konštatovať, že diagnostika a liečba na základe zastúpenia T-regulačných lymfocytov nie je vhodná. Možným vysvetlením rozdielu dynamiky T-regulačných lymfocytov v skupine žien so spontánnym otehotnením a otehotnením po embryotransfere je v rozdielnej dobe nasadenia, dávky a formy aplikácie progesterónu. Má pozitívne imunomodulačné účinky počas tehotenstva a podľa najnovších údajov zabraňuje apoptóze T-regulačných lymfocytov. U žien s embryotransferom sa progesterón podáva väčšinou v lokálnej účinnejšej vaginálnej forme, ihneď po embryotransfere t. j. približne 14 dní skôr a v minimálnej dávke 400 mg/deň. V prípade žien so spontánnym otehotnením zahajujeme podávanie neskôr, až po de-

tekcii tehotenstva t. j. po pozitívnom krvnom teste a väčšinou v dávke menej ako 400 mg/deň. Treba však skonštatovať, že napriek rozdielom v dynamike T-regulačných lymfocytov v periférnej krvi v oboch skupinách všetky ženy porodili v termíne a tehotenstvá boli bez prejavov patológie typickej pre preeklamsiu.

## Úvod

Kontrolovaný zápal a primeraná miera aktivácie imunitného systému na feto-maternálnom rozhraní sú esenciálne atribúty pre vznik a bezproblémový priebeh tehotenstva. Adekvátne imunitná odpoveď napomáha pri endometriovej receptivite a selektivite, vzniku a podpore tolerancie semialogénneho plodu, vaskulárnej remodelácii špirálovitých artérií endometria, ktorá je základom pre vývoj dostatočnej placentácie. Perikoncepčná imunitná odpoveď má zásadný vplyv na rast plodu a gestačný vek dieťaťa pri pôrode s ovplyvnením jeho postnatálneho zdravia (Robertson et al. 2016). Pri tolerancii plodu majú nezanedbateľný vplyv regulačné T-lymfocyty, aj prirodzené aj indukované. Všetky uvedené deje sú pod významným vplyvom pohlavných hormónov tvoriacich sa v placentе.

## Regulačné T-lymfocyty na feto-maternálnom rozhraní

Na feto-maternálnom rozhraní u ľudí sú prítomné obidva typy regulačných T-lymfocytov: prirodzené (nTreg) a indukované (iTreg). Je pre nich typické, že majú spoločný transkripčný faktor FOXP3 (Clark 2016) a tvoria až 30 % z celkového počtu T-lymfocytov počas I. trimestra s postupným poklesom (Robertson et al. 2018).

Na vrchole ovulácie pod vplyvom estrogénov sa Treg-lymfocyty zhromažďujú v endometriu z periférnej krvi. Samotná implantácia je zápalový proces, pri ktorom sa produkujú cytokíny IL-1 $\beta$ , IL-11 a LIF (faktor inhibujúci leukémiu). Treg-lymfocyty kontrolujú rovnováhu medzi pro- a antiinflamačnými procesmi a následne prozápalové mikroprostredie ukončujú (Clark 2016). Štúdie preukázali, že deplécia Treg-lymfocytov najviac negatívne ovplyvňuje pre- a peri-implantačné obdobie a nie samotnú placentáciu (Robertson et al. 2018).

Imunosupresívny vplyv Treg-lymfocytov je prezentovaný produkciou IL-10, TGF- $\beta$  a expresiou CTLA-4, CD25 a PD-L1 (Robertson et al. 2018). Neskôr Treg-lymfocyty negatívne vplyvajú na interakcie medzi Th1-lymfocytmi, dendritovými bunkami, makrofágmi a uterinnými NK-bunkami, aby zabránili zvýšenej produkcii Th1-cytokínov – TNF a IFN- $\gamma$  a tým následne aktivácii koagulačnej kaskády (Chen et al. 2013).

## Progesterón a T-regulačné lymfocyty

Syntéza steroidných hormónov ako progesterónu a glukokortikosteroidov narastá počas tehotenstva. Ich hlavná úloha je pri adaptácii imunitného systému ženy na tehotenstvo. Doteraz nebol plne identifikovaný mechanizmus účinku. Jedine sa klinicky pozorovalo, že nízke hladiny progesterónu boli asociované s opakovanou spontánnou

potrácavosťou alebo predčasným pôrodom (Okabe et al. 2014). Samotný progesterón má protizápalové účinky, na fetomaternálnom rozhraní indukuje expanziu T-regulačných lymfocytov. V štúdií publikovanej v tomto roku (Hierweger et al. 2019) autori dokázali, že progesterón sa viaže na glukokortikoidový receptor (GR) a indukuje apoptózu konvenčných T-efektorových lymfocytov, voči čomu sú Treg-lymfocyty refraktérne (Hierweger et al. 2019).

### **T-regulačné lymfocyty počas tehotenstva**

Doposiaľ v renomovaných časopisoch neboli publikované štúdie, ktoré by sledovali dynamiku zastúpenia Treg-lymfocytov v periférnej krvi počas celého tehotenstva u zdravých žien, u žien s rekurentnými spontánnymi abortmi a u žien, ktoré absolvovali embryotransfer. Taktiež zatiaľ neboli uverejnené sledovania dynamiky Treg-lymfocytov v periférnej krvi u žien podľa typu aplikovanej imunomodulačnej liečby. Najpravdepodobnejším dôvodom sú neexistujúce pravidlá indikácie imunointervenčnej liečby, ktoré by akceptovala široká odborná verejnosť. Sú veľké rozdiely v dávke, načasovaní a trvaní liečby medzi jednotlivými centrami a publikovanými štúdiami. Túto skutočnosť dokumentujú metaanalýzy, ktoré sa zaoberajú vyhodnotením efektu liečby intravenóznymi imunoglobulínmi a kortikosteroidmi u žien s poruchou plodnosti. Toto nás priviedlo na myšlienku sledovať dynamiku Treg-lymfocytov v periférnej krvi u tehotných žien a zároveň sledovať koreláciu medzi nárastom Treg-lymfocytov v periférnej krvi a na feto-maternálnom rozhraní počas prvého trimestra s postupným poklesom ku koncu gravidity.

### **Charakteristika súboru**

Súbor tvorilo 159 pacientiek. Vykonali sme u nich odber periférnej krvi v I., II. a III. trimestri. I. trimester je v odbornej literatúre definovaný ako 1. – 13. týždeň tehotenstva, II. trimester ako 14. – 27. týždeň tehotenstva a III. trimester ako 28. – 40. týždeň tehotenstva. Zo sledovaných 159 žien 59 otehotnelo spontánne (37,1 %), po embryotransfere otehotnelo 68 žien (42,8 %). Kontrolnú skupinu tvorilo 32 žien (20,1 %).

V rámci kontrolnej skupiny sme realizovali meranie Treg-lymfocytov v percentách v prvom trimestri 28 pacientkam, v druhom trimestri 32 a v treťom trimestri 27 pacientkam. Hodnoty Treg-lymfocytov v absolútnych hodnotách sme realizovali v prvom trimestri 28 pacientkam, v druhom trimestri 29 a v treťom trimestri 27 pacientkam.

Vytvorili sme tri podskupiny. Prvej skupine sme podávali intravenózne alebo intramuskulárne imunoglobulíny (IVIG + IMIG), druhej skupine kortikosteroidy (KS) a poslednej skupine sme podávali intralipidové emulzie (ILP).

Naším cieľom bolo porovnávať zmenu absolútnych aj percentuálnych Treg-lymfocytov v prvom, druhom a treťom trimestri zvlášť pre skupinu žien, ktoré otehotneli spontánne, a zvlášť pre skupinu žien, ktoré otehotneli po embryotransfere všeobecne a vzhľadom na aplikovanú liečbu, pričom sme sa zamerali na liečbu KS, IMIG + IVIG a ILP.



## Výsledky

Ženy, ktoré otehotneli spontánne, mali priemernú hodnotu Treg-lymfocytov v percentách v prvom trimestri v prvom meraní 7,85 %, v druhom meraní v prvom trimestri sa priemerná hodnota znížila na 7,52 % a v druhom trimestri nastalo ešte zníženie na priemerne 6,76 %, v treťom trimestri sme zaznamenali nárast na 7,73 %, teda hodnota Treg-lymfocytov v treťom trimestri bola nižšia ako pri prvom meraní v prvom trimestri. Pri vyjadrení v absolútnych počtoch bola priemerná hodnota Treg lymfocytov pri prvom meraní  $115,92/\text{mm}^3$ , pri druhom meraní v prvom trimestri hodnota poklesla v priemere na  $93,20/\text{mm}^3$ , v druhom trimestri nastal ďalší pokles na  $86,38/\text{mm}^3$  a v treťom trimestri opätovný pokles na  $85,35/\text{mm}^3$ .

Ženy, ktoré otehotneli po embryotransfere mali priemernú hodnotu Treg lymfocytov v percentách v prvom meraní v prvom trimestri 7,29, v druhom meraní v prvom trimestri nastal nárast na 7,84, v druhom trimestri sme zaznamenali výraznejší pokles na 6,99 a v treťom trimestri opätovný nárast na 7,69. Pri vyjadrení v absolútnych počtoch bola priemerná hodnota Treg-lymfocytov pri prvom meraní v prvom trimestri  $108,93/\text{mm}^3$ , pri druhom meraní v prvom trimestri nastal nárast na  $119,09/\text{mm}^3$ , v druhom trimestri pokles na  $95,45/\text{mm}^3$  a v treťom trimestri pokles na  $94,64/\text{mm}^3$ .

V rámci kontrolnej skupiny sme pri pozorovaní hodnoty Treg-lymfocytov v percentách zistili prvom trimestri v priemere 5,77, v druhom trimestri pokles na 4,75 a v treťom trimestri nárast na 4,96. Pri meraní absolútnych počtov Treg-lymfocytov sme pozorovali v prvom trimestri priemerne  $96,18/\text{mm}^3$ , v druhom trimestri  $89,97/\text{mm}^3$  a v treťom trimestri  $79,59/1 \text{ mm}^3$ .

Výraznejšiu dynamiku počtov Treg-lymfocytov v percentách sme pozorovali v skupine žien so spontánnym otehotnením pri liečbe ILP. Po prvom meraní v prvom trimestri (9,10) nastal pokles pri druhom meraní v prvom trimestri (8,20), v druhom trimestri sme zaznamenali nárast (9,54) a v treťom trimestri pokles (9,20).

Striedanie nárastu a poklesu obsahu Treg-lymfocytov sme namerali aj v skupine žien s otehotnením po embryotransfere s liečbou IMIG + IVIG.

Výraznejšia dynamika v počte Treg-lymfocytov sme pozorovali v skupine pacientiek so spontánnym otehotnením liečených IMIG + IVIG. Oproti prvému meraniu v prvom trimestri (priemerne 10) zaznamenali pokles v druhom meraní v prvom trimestri (9,52), v druhom trimestri nasledoval pokles obsahu Treg-lymfocytov (7,18) a v treťom trimestri nárast v priemere na 8,79.

Nízka dynamika sa prejavila v skupine žien so spontánnym otehotnením s liečbou KS.

Pri sledovaní počtu Treg-lymfocytov v absolútnych hodnotách sme zaznamenali rôzne tendencie vývoja. Postupný pokles počtov Treg-lymfocytov nastal u žien so spontánnym otehotnením s liečbou KS. Pri liečbe IMIG + IVIG ženy so spontánnym otehotnením mali pokles počtu Treg-lymfocytov medzi prvým meraním v prvom trimestri (146,11) a druhým meraním v prvom trimestri (100,14), pri ďalších meraniach bol postupný nárast. Naopak, pri ženách s otehotnením po embryotransfere s liečbou

IMiG + IViG sme zistili opačnú tendenciu, to znamená najskôr nárast počtu Treg-lymfocytov medzi prvým meraním (127,47) a druhým meraním v prvom trimestri (142), potom nasledoval postupný pokles; podobná dynamika sa prejavila aj v skupine žien s otehotnením po embryotransfere s liečbou ILP. Striedanie nárastu a poklesu obsahu Treg-lymfocytov sme zistili v skupine žien po embryotransfere s liečbou KS, išlo najskôr o nárast Treg-lymfocytov medzi prvým meraním (117,05) a druhým meraním (119,67) v prvom trimestri, v druhom trimestri nasledoval pokles (82,55) a v treťom trimestri nárast (86,19). Opačná dynamika nastala v prípade žien so spontánnym otehotnením s liečbou ILP, kde bol v prvom trimestri medzi prvým (104,30) a druhým meraním (80,35) pokles počtov Treg-lymfocytov, v druhom trimestri nárast (111,54) a v treťom trimestri pokles (109,80).

### Diskusia

Koreláciu nárastu Treg-lymfocytov medzi periférnou krvou a fetu-maternálnym rozhraním v I. trimestri sme preukázali jedine v skupine žien, ktoré otehotneli po embryotransfere. Vo všetkých skupinách sme však potvrdili postupný pokles Treg-lymfocytov počas II. a III. trimestra. Kontrolná skupina celkovo vykazovala signifikantne nižšie hladiny T-regulačných lymfocytov v jednotlivých obdobiach oproti ženám s anamnézou poruchy plodnosti.

Možným vysvetlením rozdielu dynamiky T-regulačných lymfocytov v skupine žien so spontánnym otehotnením a otehotnením po embryotransfere je v rozdielnej dobe nasadenia, dávky a formy aplikácie progesterónu, ktorý má pozitívne imunomodulačné účinky počas tehotenstva, indukuje proliferáciu T-regulačných lymfocytov. U žien s embryotransferom sa progesterón podáva väčšinou v lokálnej, účinnejšej, vaginálnej forme, ihneď po embryotransfere a v minimálnej dávke 400 mg/deň. V prípade žien so spontánnym otehotnením sa väčšinou podávanie zaháji neskôr, až po detekcii tehotenstva t. j. po pozitívnom krvnom teste a v dávke menej ako 400mg/deň. Pre potvrdenie týchto záverov by bolo vhodné zrealizovať štúdie zamerané na sledovanie dynamiky Treg-lymfocytov v periférnej krvi v závislosti od rôznej dávky progesterónu.

Na základe našich výsledkov taktiež môžeme konštatovať, že diagnostika a liečba porúch plodnosti na základe zastúpenia T-regulačných lymfocytov periférnej krvi nie je vhodná.

## Literatúra

1. Clark, D. A. (2016). The importance of being a regulatory T cell in pregnancy. *J Reprod Immunol* 116: 60-69.
2. Hierweger, A. M., et al. (2019). Progesterone modulates the T-cell response via glucocorticoid receptor-dependent pathways. *Am J Reprod Immunol* 81(2): e13084.
3. Chen, T., et al. (2013). Self-specific memory regulatory T cells protect embryos at implantation in mice. *J Immunol* 191(5): 2273-2281.
4. Okabe, H., et al. (2014). The effect of progesterone on genes involved in preterm labor. *J Reprod Immunol* 104-105: 80-91.
5. Robertson, S. A., et al. (2018). Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. *J Clin Invest* 128(10): 4224-4235.
6. Robertson, S. A., et al. (2016). Corticosteroid therapy in assisted reproduction - immune suppression is a faulty premise. *Hum Reprod* 31(10): 2164-2173.

Adresa:

MUDr. Ž. Dzurillová

Ambulancia reprodukčnej imunológie

Medicentrum Dzurilla

Fatranská 5A,

949 01 Nitra

Mail: lekari2002@gmail.com

## INDEX AUTOROV

Babindáková N.	60
Bánovčin P.	79
Buc M.	21, 46, 86
Bucová M.	21
Čente M.	60
Đurmanová V.	46
Dzurilla M.	95
Dzurillová Ž.	95
Filipčík P.	60
Hochmuth L.	73
Hrubiško M.	69
Hrubišková K.	79
Javor J.	21
Jeseňák M.	79
Klučková K.	32
Mátyášová K.	60
Parničan S.	60
Porubská S.	60
Šimaljaková M.	6
Švecová D.	14
Tóth I.	60

**Konferencia Slovenskej imunologickej spoločnosti  
a Neuroimunologického ústavu Slovenskej akadémie vied**

## **BIOLOGICKÁ LIEČBA V TEÓRII A PRAXI V.**

Bratislava, Dúbravská cesta 9

25. september 2019

Konferencia bola zorganizovaná v kontexte riešenia projektu grantovej agentúry APVV ako aktivita formálneho a neformálneho vzdelávania (APVV-17-0668).

Zborník recenzovaných príspevkov

Recenzenti: členovia odborného výboru

Vydalo vydavateľstvo AHO5, Dunajská Lužná,  
v novembri 2019 ako svoju 15. publikáciu.

Spoluvydavateľ:  
Neuroimunologický ústav SAV

Editor: Peter Filipčík, Milan Buc  
Grafický návrh obálky: Monika Žilková  
Sadzba: Peter Blaho

ISBN 978-80-971357-9-9

ISBN 978-80-971357-9-9



9 788097 135799