

## Toczniove zapalenie nerek: nowe spojrzenie na patogenezę oraz przesłanki leczenia czynnikami biologicznymi

Oktawia MAZANOWSKA

Marian KLINGER

Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Akademii Medycznej we Wrocławiu  
Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Marian Klinger

### Słowa kluczowe:

- toczniowe zapalenie nerek
- patogeniza
- terapia biologiczna
- usuwanie i hamowanie proliferacji limfocytów B
- przeciwciała wobec mediatorów reakcji zapalnej

### Key words:

- lupus nephritis
- pathogenesis
- elimination and inhibition of B-lymphocytes proliferation
- antibodies against inflammatory mediators

Opracowanie przedstawia nowe dane na temat patogenyzy toczniowego zapalenia nerek pod kątem przesłanek do prowadzenia terapii czynnikami biologicznymi. Omówiono wyniki pierwszych prób klinicznych z zastosowaniem przeciwciał wobec limfocytów B (rituksimab, epratuzumab), blokady kostymulacji (abatacept, belatacept), hamowania rozplemu limfocytów B (belimubab), blokowania wiązania dwuniciowego DNA przez immunoglobulinowe receptory limfocytów B (abetimus) oraz specyficznego neutralizacji poszczególnych mediatorów reakcji zapalnej. (NEFROL. DIAL. POL. 2008, 12, 119-123)

## Lupus nephritis: new insights into pathogenesis and premises for biologic therapy

The new data on lupus nephritis pathogenesis are presented in the context of possible biologic therapy implementation. The results of the first clinical trials are reviewed concerning the administration of anti-B-cell antibodies (rituximab, epratuzumab), costimulation blockade (abatacept, belatacept), inhibition of B-cell proliferation (belimubab), prevention of double stranded DNA binding by B-lymphocyte immunoglobulin receptors (abetimus), and specific neutralization of the particular inflammatory mediators. (NEPHROL. DIAL. POL. 2008, 12, 119-123)

### Wstęp

Toczeń trzewny układowy jest ogólnoustrojową chorobą autoimmunologiczną, charakteryzującą się utratą tolerancji na własne antygeny i produkcją autooprzeciwciał, tworzących kompleksy immunologiczne (KI), które odkładają się w różnych narządach i wywołują zapalenie. Toczniowe zapalenie nerek (TZN) jest główną przyczyną chorobowości i śmiertelności w przebiegu tocznia. Chociaż kortykosteroidy, cyklofosfamid i mykofenolan mofetilu poprawiły skuteczność leczenia TZN, to jednak nie usunęły zjawisk nawrotowości choroby i oporności najcięższych przypadków na stosowaną terapię. Ograniczenia dotychczasowej terapii oraz poszerzenie wiedzy o patogenyzie tocznia stwarzają przesłanki do nowych prób klinicznych, w tym z użyciem czynników biologicznych.

W rozwoju tocznia trzewnego biorą udział zarówno uwarunkowania genetyczne, jak i oddziaływania środowiskowe i hormonalne. Rolę predyspozycji genetycznej potwierdza częstsze rodzinne występowanie chorób autoimmunologicznych; u bliźniąt monozygotycznych toczni występuje w 25-30%, a u bliźniąt dwujajowych w ok. 5% przypadków. Z drugiej jednak strony krewni 1-stopnia mogą mieć obecne przeciwciała przeciwjądrowe i przez całe życie nie rozwinąć objawowego tocznia. Wykazano że obecność antygenów zgodności tkanekowej HLA DR3 w toczniu zwiększa relatywne ryzyko wystąpienia choroby 5,8-krotnie, a znacząca przewaga chorujących ko-

biet (ok. 9:1) wskazuje na modyfikującą rolę środowiska hormonalnego estrogenów.

Patogeniza tocznia trzewnego łączy w sobie nieprawidłowe mechanizmy odpowiedzi wrodzonej i nabytej (adaptacyjnej). Elementy odpowiedzi immunologicznej, w tym mechanizmy komórkowe i humoralne, współdziałają ze sobą przy zaburzonych mechanizmach hamujących. Nie jest dokładnie wyjaśniona przyczyna nadreaktywności limfocytów B z następującą nadmierną poliklonalną produkcją przeciwciał. Prawdopodobnie wzrost syntezy IgG u pacjentów z toczniem może reprezentować niespecyficzną, zaburzoną odpowiedź nieprawidłowo funkcjonujących limfocytów B, wywołaną przez pomocnicze limfocyty T (T helper). Zjawiska te tworzą samowzbudzający się mechanizm, łączący dwie funkcje limfocytów B: z jednej strony jako komórek produkujących przeciwciała, a z drugiej strony jako komórek prezentujących antygen limfocytom T.

### Nowe spojrzenie na patogenezę tocznia trzewnego układowego

W patogenyzie tocznia trzewnego biorą udział równocześnie dwa typy odpowiedzi immunologicznej: wrodzona (*innate*) – obejmująca niespecyficzną odpowiedź na obecne antygeny oraz nabyta, inaczej adaptacyjna (*adaptive*) – występująca w odpowiedzi na specyficzne antygeny i wymagająca wcześniejszego kontaktu z antygenem.

Wrodzona odpowiedź immunologiczna obejmuje pierwotne, niespecyficzne mecha-

### Adres do korespondencji:

Dr Oktawia Mazanowska  
Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Akademii Medycznej we Wrocławiu  
50-417 Wrocław, ul. Traugutta 57/58  
Tel.: + 48 71 733 2502; Fax: + 48 71 733 2509  
e-mail: o.mazanowska@gmail.com;  
klinef@centrum.am.pl

nizmy obronne przez zakażeniami wirusowymi i bakteryjnymi, nie wymagające uprzedniego kontaktu komórek immunologicznych z antygenem. Realizowana jest przez mechanizmy wspólne dla całego świata zwierzęcego. Jednym z elementów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej są receptory *Toll-like* (TLR), opisane w 1985 r. przez C. Nüsslein-Volhard jako *Drosophila Toll*; pozwalają one zarodkom muszki *Drosophila* różnicować strukturę cewy nerwowej. W patogenezie tocznia udowodniony udział mają: TLR7, TLR8 oraz TLR9, które wykazują ekspresję głównie na komórkach prezentujących antygen, plazmocytowych komórkach dendrytycznych oraz na limfocytach B, gdzie są zlokalizowane w błonach endosomalnych [27]. TLR7 i TLR9 rozpoznają pojedynczą nić RNA (ssRNA) wirusów oraz bakteryjne i wirusowe demetylowane DNA, jednak ze względu na relatywną wybiórczość działania mogą (w zależności od warunków) być aktywowane przez endogenne ligandy kwasów nukleinowych. Można zaproponować następujący model funkcjonowania TLR w toczniu: DNA albo rybonukleoproteiny pochodzące z nieprawidłowo przetworzonych resztek jądrowych są wiązane do autoprzeciwciał, tworząc kompleksy immunologiczne (KI), poddawane następnie fagocytozie. W kwaśnym środowisku fagolizosomu KI rozpadają się, a uwolnione DNA aktywuje TLR9, podczas gdy RNA aktywuje TLR7. Prowadzi to do zwiększenia produkcji IFN $\alpha$  przez plazmocytowe komórki dendrytyczne, podczas gdy limfocyty B są stymulowane do zwiększonej produkcji Ig, cytokin oraz ekspresji molekuł ko-stymulujących. W ten sposób aktywacja TLR może brać udział w początkowej fazie indukcji wytwarzania autoprzeciwciał przeciwjądrowych [17]. Drugim elementem wrodzonej odpowiedzi immunologicznej jest układ dopełniacza, który bierze udział w obronie organizmu gospodarza przed inwazją mikroorganizmów oraz łączy wrodzoną i nabytą odpowiedź immunologiczną. Układ dopełniacza składa się z ponad 30 białek i może być aktywowany 3 różnymi drogami. Rola układu dopełniacza w patogenezie tocznia trzewnego jest dwójaka. Z jednej strony układ dopełniacza wydaje się mieć ochronny wpływ, a wrodzony homozygotyczny niedobór klasycznej drogi aktywacji dopełniacza jest związany ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia tocznia. Z drugiej strony w zajętych tkankach zachodzi aktywacja dopełniacza przez KI z rozwinięciem zapalenia [5]. Na pograniczu wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej znajdują się również chemokiny, ponieważ wszystkie komórki wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, w tym niedojrzałe i dojrzałe komórki dendrytyczne oraz nieaktywowane i aktywowane limfocyty wykazują ekspresję receptorów dla chemokin, w związku z czym są zdolne do migracji, chemotaksji i naciekania tkanek objętych zapaleniem [30]. Bardzo ważną rolę w toczniu odgrywa IFN $\alpha$  [4]. Wykazano, że mononukleary krwi obwodowej chorych na tocznię wykazują ekspresję genów podobną do profilu spotykane w warunkach ekspozycji zdrowych komórek na IFN $\alpha$  *in vitro* („*interferon signature*”). Głównym źródłem IFN $\gamma$  są plazmocytowe komórki dendrytyczne, które wykazują ekspresję

TLR7 i TLR9 i mogą być aktywowane przez odpowiednie DNA i RNA. Niektóre objawy kliniczne występujące w toczniu, takie jak: uczucie zmęczenia, gorączka i bóle mięśniowe mogą być wynikiem bezpośredniego działania IFN $\alpha$  [4].

W nerkach wszystkie typy komórek własnych i naciekających mogą produkować chemokiny po stymulacji czynnikami prozapalnymi tj.: KI, aktywowany dopełniacz, wolne rodniki tlenowe, cytokiny prozapalne (TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IL-1), angiotensyna I oraz lipopolisacharydy ścian komórek bakteryjnych. W modelach zwierzęcych TZN blokada wybranych chemokin i receptorów dla chemokin ma potencjalne znaczenie terapeutyczne [30].

W nabytej (adaptacyjnej) odpowiedzi immunologicznej biorą udział komórki immunologiczne, które wymagają wcześniejszej aktywacji dla funkcjonowania. Rola prawidłowych limfocytów B nie ogranicza się do produkcji przeciwciał skierowanych wobec obcych (ale nie swoich) antygenów; funkcjonują one jako komórki prezentujące antygen (antigen presenting cells - APCs), jako regulatory dla limfocytów T i komórek dendrytycznych oraz makrofagów i biorą udział w lokalnym nacieku komórkowym [11]. W celu zapobiegania niekorzystnej prezentacji autoantygenów limfocytom T oraz produkcji autoprzeciwciał organizm eliminuje lub neutralizuje autoreaktywne limfocyty B poprzez wywołanie zjawiska tolerancji. Proces nabywania tolerancji może odbywać się w czasie powstawania limfocytów B (tolerancja centralna), kiedy niedojrzałe limfocyty B po napotkaniu autoantygenu zdolnego do polączenia z receptorem, są albo eliminowane poprzez delecję klonalną, albo stają się niereaktywne (anergia) lub struktura receptorów ulega zmianie, co eliminuje ich wrażliwość na własne antygeny. Mimo mechanizmów centralnej tolerancji część autoreaktywnych limfocytów B unika delecji lub anergii. Stąd istnieją mechanizmy (tolerancja obwodowa) z usunięciem autoreaktywnych limfocytów B i T z krążenia poprzez mechanizmy apoptozy. Zaburzenia procesu apoptozy mogą prowadzić do przetrwania części autoreaktywnych komórek, które mogą ulegać aktywacji i prowadzić do „przełamania” tolerancji na własne antygeny. Indukcja tolerancji wymaga ograniczenia bodźców aktywacyjnych dla limfocyty tylko do jednego sygnału wywołanego przez antygen, zwanego „sygnałem 1”. W momencie wystąpienia „sygnału 2” sygnał tolerogenny przemienia się w sygnał aktywujący, rozpoczynając odpowiedź autoimmunologiczną [11,18]. „Sygnał 2” typowo jest używany z molekuł ko-stymulujących, wykazujących ekspresję na aktywowanych APC i limfocytach [18]. Głównymi ko-stymulatorami współdziałania limfocytów T i B są molekuly CD40/CD40L i B7/CD28. Limfocyty T współpracują z limfocytami B w produkcji przeciwciał, regulują odpowiedź limfocytów B, modulują funkcje limfocytów pomocniczych (*T helper*) oraz funkcje efektorowe, tj. naciek zapalny w nerkach, gdzie działają na komórki śródmiąższu bezpośrednio poprzez cytotosycyzność komórkową i pośrednio poprzez aktywację i rekrutację makrofagów i komórek *natural killer* (NK) lub przez nadmierną produkcję cytokin (IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ ,

TGF $\beta$ , IL-4, IL-17). Dodatkowo, patogeny lub mitogeny mogą wysłać sygnały pobudzające receptory *Toll* na limfocytach B i APCs [18]. W momencie stymulacji przez antygen część limfocytów B przekształca się w komórki plazmatyczne, wydzielające Ig, które są charakterystyczne dla odpowiedzi humoralnej [7]. Wytwarzanie przeciwciał o dużej swoistości tworzy skomplikowaną sieć interakcji pomiędzy limfocytami T, komórkami dendrytycznymi, limfocytami B oraz komórkami plazmatycznymi [10,23]. Inne limfocyty B migrują do grudek chłonnych, gdzie w centrum rozmnażania przechodzą intensywną proliferację i różnicują się albo w komórki plazmatyczne albo długoożyjące komórki pamięci [7]. Z drugiej strony, kiedy limfocyty B funkcjonują jako APCs – to wtedy prezentują przetworzony antygen limfocytom T poprzez MHC klasy II, a dzięki odpowiedniej ko-stymulacji, prowadzą do aktywacji limfocytów T, uwolnienia prozapalnych cytokin (IL-10, TNF $\alpha$ , IL-6) oraz związków stymulujących dojrzewanie i przeżycie limfocytów B (BlyS/BAFF) [7, 29].

### Czynniki biologiczne w leczeniu toczniowego zapalenia nerek

Zajęcie nerek w przebiegu tocznia rumieniowatego trzewnego prowadzi w swoich najcięższych rozplemowych postaciach do rozwoju schyłkowej niewydolności nerek u 25% chorych i odpowiada za 4-krotny wzrost śmiertelności w porównaniu z populacją ogólną [6,20,21,28]. Poznanie ograniczeń dotychczasowej terapii oraz poszerzenie wiedzy o patofizjologii TZN zwiększyło zainteresowanie nowymi sposobami leczenia. W tych innowacyjnych podejściach terapeutycznych leki ukierunkowane są selektywnie przeciwko określonym elementom odpowiedzi immunologicznej. Obejmują one działania usuwające limfocyty B, blokadę ko-stymulacji, blokadę stymulacji limfocytów B, leczenie przeciwi-cytokinowe oraz blokadę układu dopełniacza. Limfocyty B są usuwane z krążenia przeciwciałami monoklonalnymi, skierowanymi wobec specyficznych markerów powierzchniowych, a patogenne przeciwciała są wiązane i usuwane przez preparaty wiążące dsDNA. Uzyskano związki blokujące wybiórczo zjawiska ko-stymulacji pomiędzy limfocytami T i B (koniecznej do aktywacji limfocytów B i produkcji przeciwciał) oraz blokujące stymulację limfocytów B. Wstępne wyniki badań są zachęcające, ale brak jest na razie dużych badań kontrolowanych [7]. Nowe metody leczenia tocznia trzewnego przy pomocy czynników biologicznych znajdują się w różnych fazach prób klinicznych; część z nich została już zarejestrowana do leczenia rozrostowych chorób hematologicznych lub/i reumatoidalnego zapalenia stawów [16]. Działają one wybiórczo na określone elementy odpowiedzi immunologicznej wywołując [16]:

1. deplecję limfocytów B: przeciwciałami anty-CD20 (rituksimab) i anty-CD22 (epratuzumab);
2. blokadę ko-stymulacji: przeciwciałami anty-CD154 (BG9588 – ruplizumab) i CTLA4lg (abatacept, belatacept);
3. blokadę stymulacji limfocytów B: przeciwciałami anty-CD40L (IDEC131) i przeciwciałami anty BlyS (belimumab);
4. usunięcie z krążenia przeciwciał anty-

dsDNA: LPJ394 (abetimus),

5. hamowanie działania cytokin: przeciwciało anty-TNF $\alpha$  (infliksimab) i rekombinowane białko receptora dla TNF $\alpha$  (etanercept), przeciwciało przeciwko receptorowi dla IL-1 (anakinra), przeciwciało anty-IL-10 (B-N10), przeciwciało anty IL-6 oraz przeciwciało anty-INF $\alpha$ ,

6. zmniejszenie aktywacji układu dopełniacza – przeciwciała anty-C5a (eculizumab, pexelizumab), rozpuszczalny receptor dla dopełniacza – sCR1 [5],

7. działanie skierowane wobec idiotypów anty-DNA – edratide (TV-4710) peptyd komplementarny wobec regionu wiążącego antygen ludzkich przeciwciał anty ds-DNA [16, 26].

### **Deplecja limfocytów B - przeciwciała anty-CD20 (rituksimab, okrelizumab) i anty-CD22 (epratuzumab)**

Rituksimab jest chimerowym monoklonalnym przeciwciałem przeciwko antygenowi CD20 na niedojrzałych (pre-B cells) i dojrzałych limfocytach B; inne komórki, tj. komórki macierzyste, komórki pro-B i komórki plazmatyczne nie wykazują ekspresji CD20 i w związku z tym nie są wrażliwe na działanie rituksimabu. Lek został zarejestrowany przez FDA do leczenia chłoniaków z linii limfocytów B. Nie ma ustalonego schematu podawania rituksimabu i przy stosowaniu tej samej dawki 375 mg/m<sup>2</sup> – proponowane są wlewy co 4 tygodnie lub co tydzień (łącznie 4 tygodnie); alternatywny sposób to podanie dwukrotne w odstępach 2. tygodniowych po 1000 mg. Rituksimab po kilku dniach wywołuje głęboką deplecję limfocytów B (nawet poniżej 5  $\mu$ l<sup>-1</sup>), która trwa około 6 miesięcy, a nawet ponad 1 rok. Nie ma dokładnych wytycznych, kiedy należy podać kolejną dawkę, szczególnie że trwałe efekty może wystąpić już po 1-szej dawce. Należy rozważyć monitorowanie liczby limfocytów B i od tego uzależnić podanie kolejnej dawki, szczególnie, że rituksimab nie wykazuje efektu terapeutycznego, jeżeli nie wywoła deplecji limfocytów B [18], a na leczenie rituksimabem odpowiadają pacjenci z niską podstawową ilością komórek CD19. Leczenie rituksimabem prowadzone jest albo w monoterapii, albo w połączeniu z kortykosteroidami i cyklofosfamidem. Większość prób klinicznych, przeprowadzonych na niewielkich grupach pacjentów, obejmowała leczenie indukujące remisję (a nie podtrzymujące). Część pacjentów reaguje na leczenie zmniejszeniem aktywności choroby (z obniżeniem białkomoczu i miana przeciwciał anty-dsDNA), a objawy uboczne są niewielkie. Jednak inni pacjenci nie wykazują korzystnego efektu, lub odpowiadają tylko częściowo. Podanie rituksimabu wiąże się z ryzykiem wyindukowania przeciwciał (*human antichimeric autoantibodies* – HACA), które zmniejszają efekt działania leku. Wśród powikłań polekowych opisywane są śmiertelne przypadki postępującej wieloogniskowej leukoencefalopatii (*progressive multifocal leukoencephalopathy*). Ostre reakcje niepożądane na wlew rituksimabu można minimalizować podając wcześniej acetaminophen, anty-histaminiki i steroidy [17]. Leczenie rituksimabem, do czasu uzyskania wyników kontrolowanych prób z randomizacją, powinno być ograniczone do

wybranych przypadków [9].

Mechanizm działania rituksimabu polega prawdopodobnie na cytolizie zależnej od dopełniacza, indukcji apoptozy i cytotoxicności zależnej od receptora Fc. Nie jest natomiast jasny mechanizm działania w chorobach autoimmunologicznych, szczególnie że komórki plazmatyczne, będące głównym źródłem Ig, nie są usuwane z krążenia. W związku z tym leczenie rituksimabem nie wiąże się ze znaczącym spadkiem poziomu Ig w surowicy, a efekt na stężenie auto-przeciwciał jest zmienny. Być może usunięcie limfocytów B zaburza pierwotnie inne funkcje limfocytów B, takie jak ko-stymulacja limfocytów T i produkcja cytokin.

Opublikowano już wyniki zastosowania w RZS oraz prób klinicznych w toczniu (poprawa u 9 z 21 leczonych [24,25]). Deplecja limfocytów B wystąpiła u 67% pacjentów po 2-iej infuzji (w dawce 375 mg/m<sup>2</sup>) w odstępie 4 tygodni. Dwie trzecie pacjentów, u których wystąpiła całkowita deplecja limfocytów B uzyskała całkowitą remisję po 6 miesiącach, natomiast przy braku deplecji tylko 1/3 osiągnęła remisję całkowitą. W ocenie zaburzeń homeostazy limfocytów B w toczniu uzyskano wyrównanie zaburzeń hematologicznych oraz obniżyła się liczba autoreaktywnych komórek pamięci (VH4.34). Badanie wykazało, że specyficzna deplecja limfocytów B znacząco wyrównuje zaburzenia homeostazy limfocytów B oraz ułatwia uzyskanie tolerancji immunologicznej [2].

Rozpoczynają się także badania kliniczne w toczniu z okrelizumabem, który jest humanizowanym przeciwciałem anty-CD20.

Epratuzumab – jest rekombinowanym humanizowanym monoklonalnym przeciwciałem anty-CD22. CD22 wykazuje ekspresję w cytoplazmie komórek pro-B i pre-B oraz na powierzchni dojrzałych limfocytów B i nie wykazuje ekspresji na komórkach plazmatycznych. W przeciwieństwie do rituksimabu wywołuje tylko częściową deplecję limfocytów B (obniżenie liczby komórek B w krążeniu o 35-40%). W badaniu nierandomizowanym w toczniu wykazał się bezpieczeństwem stosowania i skutecznością, ale grupa nie obejmowała chorych z upośledzoną funkcją nerek [7]. W postępowaniu terapeutycznym zalecane są 4 dawki epratuzumabu po 360 mg/m<sup>2</sup>, podawane dożylnie co 2 tygodnie (15). W małej grupie leczonych 3/4 uzyskało 50% poprawę białkomoczu bezpośrednio po leczeniu, a efekt utrzymywał się u 7 z 9 leczonych po 18 tygodniach.

### **Blokada ko-stymulacji pomiędzy komórkami CD80 i CD86, a limfocytami T CD28 (abatacept) oraz ko-stymulacji CD40/CD40L ( IDEC-131 i BG9588)**

Blokada ko-stymulacji CD80/CD28 i CD86/CD28 hamuje rozwój glomerulopatii w zwierzęcych modelach tocznia [12]. Abatacept (CTLA4-Ig) – jest lekiem blokującym interakcje pomiędzy limfocytami CD80 i CD86 na komórkach prezentujących antygen (APCs), w tym limfocytach B a molekułą CD28 na limfocytach T, co wywołuje zjawisko tolerancji z powodu braku „2 sygnału” [7]. Blokada dotyczy molekuly CD28, obecnej na limfocytach T i rozpoznającej następujące ligandy na APCs: B7-1(CD80) lub B7-

2 (CD86). Stymulacja na tej drodze zachodzi pomiędzy dziewiczymi komórkami T a APCs posiadającymi antygen związany z odpowiednim antygenem MHC klasy II.

Abatacept (CTLA-4Ig) jest białkiem łączącym pozakomórkowe CTLA-4 z receptorem Fc IgG1 i zapobiegającym interakcji CD28/B7, która jest „2 sygnałem” dla aktywacji limfocytów T. Wykazano, że w modelu doświadczalnym (myszy spontanicznie rozwijające LED – NZB/W F1) wywołuje przy podawaniu dootrzewnym co 10 dni (wraz z cyklofosfamidem), obniżenie produkcji przeciwciał i znaczącą poprawę białkomoczu oraz przeżycia. Ponadto, nawet w pojedynczej dawce, skutecznie zapobiega rozwojowi TZN u zwierząt doświadczalnych. W przygotowaniu są próby leczenia TZN u ludzi [12-14]. U ludzi zastosowanie znajdują dwa preparaty CTLA4-Ig: abatacept i belatacept.

Blokada stymulacji limfocyta B przez przeciwciało anty-CD40L zmniejsza objawy tocznia u myszy (NZBxNZW)F1. Humanizowane przeciwciała IDEC-131 i BG9588 blokują ko-stymulację CD40/CD40L. W małym badaniu w rozplemowym TZN (klasa IV), u pacjentów z zachowaną funkcją nerek i białkomoczem, stosowano BG9588 w dawce 20 mg/kg 3-krotnie w odstępach 2-tygodniowych, a następnie 4 dawki co miesiąc. Uzyskano obniżenie miana przeciwciał anty-dsDNA i białkomoczu o ok. 50%, ale badanie zostało zakończone przed czasem ze względu na powikłania zakrzepowe [8]. Natomiast badanie z IDEC-131 nie wykazało poprawy przebiegu tocznia [7, 22].

### **Blokada stymulacji limfocytów B: przeciwciało anty-BLyS (belimumab)**

Odmianym sposobem postępowania skierowanego przeciwko limfocytom B jest blokowanie cytokin, koniecznych do funkcjonowania limfocytów B. BlyS (dawniej BAFF), łączy się z 3 różnymi receptorami: BCMA, BAFFR i TACI. U myszy wrażliwych na toczeń oraz u ludzi chorujących na toczeń wykazano nadmierną ekspresję BlyS. Belimumab (LymphoStat-B) jest całkowicie humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym, mogącym wywołać deplecję krążących limfocytów B poprzez hamowanie biologicznej aktywności BlyS/BAFF (*B-lymphocyte stimulator* – BlyS; *B cell Activator Factor*), potrzebną do przekształcania limfocytów B w dojrzałe komórki plazmatyczne. Uważa się, że w niektórych chorobach autoimmunologicznych podwyższone poziomy BlyS biorą udział w wytwarzaniu auto-przeciwciał, a w badaniach przedklinicznych i klinicznych (badania fazy II) wykazano, że zahamowanie BlyS prowadzi do apoptozy autoreaktywnych limfocytów B, może zmniejszyć poziom auto-przeciwciał i ograniczyć aktywność choroby. W próbie klinicznej w aktywnym toczniu (ale bez zajęcia nerek i centralnego układu nerwowego) podawano 3 różne dawki: 1, 4 i 10 mg/kg w dniach: 0, 14, 28 i następnie co 28 dni terapię, uzyskując zmniejszenie aktywności tocznia i poprawę jakości życia [7].

### **Usunięcie przeciwciał anty-dsDNA: abetimus (LPJ394)**

Odmienne podejście w leczeniu tocznia opiera się na próbach modulowania proce-

sów autoimmunologicznych poprzez wpływ na specyficzne antygeny. Abetimus sodium (LPJ 394, riqent) jest cząsteczką zbudowaną z serii połączonych oligonukleotydów; ma 4 epitopy dla dsDNA [7]. Działa poprzez wiązanie krzyżowe z immunoglobulinowym receptorem anty-dsDNA, blokując łączenie przeciwciał dsDNA do miejsca wiązania i prowadząc do uzyskania tolerancji limfocytów B na własne antygeny pochodzące z DNA poprzez proces anergii lub apoptozy [1]. Badania kliniczne III fazy z abetimusem okazały się jednak rozczarowaniem, ponieważ zaostrzenia tocznia wystąpiły u 12% w porównaniu do 16% w grupie otrzymującej placebo [7].

Hamowanie działania cytokin: przeciwciała anty-INF $\alpha$  (MEDI-545), przeciwciała anty-TNF $\alpha$  (infliksimab) i rekombinowane białko receptora dla TNF $\alpha$  (etanercept), przeciwciała przeciwko receptorowi dla IL1 (anakinra), przeciwciała anty-IL10 (B-N10), przeciwciała anty-IL-6.

Blokada działania IFN $\alpha$  w zaostrzeniu tocznia powinna być bardzo skuteczna. Przeciwciała przeciwko ludzkiemu IFN $\alpha$  (MEDI-545) znajduje się w I/II fazy badań klinicznych. Pozytywne wyniki stosowania uzyskano w RZS, chorobie Crohna oraz łuszczycy. Z drugiej strony leczenie może być powikłane rozwojem zespołu tocznio-podobnego, związanego z produkcją autoprzeciwciał, co powoduje, że zastosowanie tego leku w toczniu może być kontrowersyjne.

Ogłoszono pierwsze korzystne wyniki leczenia w RZS i trwają badania kliniczne II/III fazy z wykorzystaniem przeciwciała anty-TNF $\alpha$  (infliksimab) w TZN [3]. Infliksimab jest chimerowym monoklonalnym przeciwciałem przeciwko TNF $\alpha$ . W rozplemowym TZN (klasa IV) stosowano 4 cotygodniowe wlewy i.v. po 300 mg (lub 3 mg/kg). Leczenie powinno być zarezerwowane dla wybranych przypadków TZN [19]. Drugim lekiem tej grupy jest rozpuszczalny receptor TNF $\alpha$  (etanercept). Objawy uboczne obu leków obejmują nasilenie niewydolności serca, rozwój choroby demielinizacyjnej oraz możliwość wywołania choroby autoimmunologicznej i tworzenia przeciwciał z rozwojem glomerulopatii poprzez odkładające się KI lub toczeń polekowy; istnieje także możliwość zaostrzenia przebiegu tocznia o łagodnym przebiegu. Przeciwciała przeciwko receptorowi IL-6 (tocilizumab), będące obecnie w okresie prób, powoduje usuwanie IL-6, cytokiny o działaniu pro-zapalnym i wywołującym wielorakie efekty immunomodulacyjne, indukujące dojrzewanie komórek plazmatycznych. Proponowane stosowanie tocilizumabu w badaniach klinicznych: wlewy i.v. co 2 tygodnie, w dawce 2 mg/kg lub 8 mg/kg. W badaniach znajduje się także przeciwciała przeciwko receptorowi IL-1 (anty-IL-1R) - anakinra, blokujące działanie prozapalne IL-1.

#### Inne sposoby leczenia tocznia czynnikami biologicznymi

Dożylne preparaty immunoglobulin – IVIG – wpływają hamująco na receptory FcRIIA i FcRIIC i pobudzająco na FcRIIB, neutralizują przeciwciała patogenne, zmniejszają produkcję przeciwciał, wywołują apoptozę limfocytów i monocytów, modulują produkcję cytokin oraz hamują różnicowanie ko-

mórek dendrytycznych. Wskazane są przy zaburzeniach hematologicznych i zajęciu centralnego układu nerwowego oraz w aktywnym toczniu opornym na leczenie [31]. Dawkowanie: 0,4 g/kg/dobę przez 4-7 dni, z powtórzeniem cyklu co miesiąc, przez 6-12 miesięcy.

#### Podsumowanie

Limfocyty B mają kluczowe znaczenie w obronie organizmu przeciwko bakteriom i wirusom; są komórkami prezentującymi antygen (APCs), produkują przeciwciała (Ig) oraz inicjują i regulują procesy zapalne poprzez sekrecję cytokin. W toczniu trzewnym limfocyty B cechują się nadreaktywnością. W związku z tym eliminacja limfocytów B powinna być potencjalnie korzystna. Zastosowanie w długotrwałej eliminacji limfocytów B mają: przeciwciała anty-CD20 (rituksimab), przeciwciała anty-CD22 (epratuzumab) oraz przeciwciała blokujące efekt działania BLYS/BAFF. Celem leczenia jest eliminacja tylko tych limfocytów B, które wykazują nadreaktywność w toczniu, z ochroną prawidłowych limfocytów B. Drugą możliwością terapeutyczną jest wpływ na interakcje międzykomórkowe, tzw. "drugi sygnał", wymagany do aktywacji limfocytów T. Brane są pod uwagę możliwości blokowania sygnału ko-stymulującego, po którym limfocyty B stają się anergiczne i nie podlegają aktywacji. Nie wykazano na razie istotnych korzyści po zablockowaniu ko-stymulacji CD40/CD40L, przy obserwowanym wzroście powikłań sercowych i zakrzepowych. Zainteresowanie budzi zahamowanie interakcji B7-CTLA4 abataceptem (CTLA4Ig), który został zarejestrowany w leczeniu RZS, a obecnie trwają próby kliniczne w toczniu. Blokowanie wytwarzania lub inaktywacja cytokin przeciwciałami antycytokinowymi stanowi następną możliwość wpływu na aktywność tocznia. Dwa przeciwciała blokujące działanie TNF $\alpha$ , o różnym mechanizmie działania, są zarejestrowane w leczeniu RZS, a obecnie badane są w próbach klinicznych w toczniu: infliksimab - chimerowe monoklonalne przeciwciała anty-TNF $\alpha$  oraz etanercept (sTNFR – rozpuszczalny receptor dla TNF $\alpha$ ). W fazie badań klinicznych znajduje się przeciwciała anty-IL-6 – tocilizumab, natomiast przeciwciała anty INF $\gamma$  jest w okresie badań wstępnych (brak badań fazy klinicznej). W leczeniu tocznia bierze się pod uwagę możliwość immunomodulacji specyficznej dla tocznia preparatem edratide (TV-4710), abetimusem (LPJ 394), który łączy się krzyżowo z przeciwciałami anty dsDNA w płynach ustrojowych lub na powierzchni limfocytów B.

Terapia czynnikami biologicznymi skierowanymi wybiórczo na poszczególne mechanizmy biorące udział w patogenezie tocznia oferuje nowe, bardziej specyficzne sposoby leczenia, przy niewielkich objawach ubocznych. Jednak nawet najbardziej celowana terapia może skutkować ciężkimi powikłaniami infekcyjnymi, ponieważ choroby autoimmunologiczne wykorzystują w patogenezie te same mechanizmy, które są używane przez organizm do ochrony przed zakażeniami. Dlatego też u każdego pacjenta trzeba będzie wnikliwie rozważyć potencjalne ryzyko i korzyści przed wdrożeniem leczenia.

#### Piśmiennictwo

- Alarcon-Segovia D., Tumlín J.A., Furie R.A. et al.: LJP 394 for the prevention of renal flare in patients with systemic lupus erythematosus: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* 2003, 48, 442.
- Anolik J.H., Barnard J., Cappione A. et al.: Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004, 50, 3580.
- Aringer M., Graniger W.B., Steiner G. et al.: Safety and efficacy of tumor necrosis factor alpha blockade in systemic lupus erythematosus: an open label study. *Arthritis Rheum* 2004, 50, 3161.
- Banchereau J., Pascual V.: Type 1 interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 2006, 25, 383.
- Bao L., Quigg R.J.: Complement in lupus nephritis: the good, the bad, and the unknown. *Semin Nephrol* 2007, 27, 69.
- Bernatsky S., Boivin J.F., Joseph L. et al.: Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006, 54, 2550.
- Bhat P., Radhakrishnan J.: B lymphocytes and lupus nephritis: new insights into pathogenesis and targeted therapies. *Kidney Int* 2008, 73, 261.
- Boumpas D.T., Furie M., Manzi S. et al.: A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis. *Arthritis Rheum* 2003, 48, 719.
- Buhaescu I., Covic A., Deray G.: Treatment of proliferative lupus nephritis - the critical approach. *Semin Arthritis Rheum* 2007, 36, 224.
- Chan O.T., Madaio M.P., Shlomchik M.J.: The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. *Immunol Rev* 1999, 169, 107.
- Clatworthy M., Smith K.G.C.: B cells in glomerulonephritis: focus on lupus nephritis. *Semin Immunopathol* 2007, 29, 337.
- Cunnane G., Chan O.T., Cassafer G. et al.: Prevention of renal damage in murine lupus nephritis by CTLA4-Ig and cyclophosphamide. *Arthritis Rheum* 2004, 50, 1539.
- Daikh D.J., Wofsy D.: Cutting edge: reversal of murine lupus nephritis with CTLA4Ig and cyclophosphamide. *J Immunol* 2001, 166, 2913.
- Davidson A., Diamond B., Wofsy D. et al.: Block and tackle: CTLA4Ig takes on lupus. *Lupus* 2005, 14, 197.
- Dörner T., Kaufmann J., Wegener W.A. et al.: Initial clinical trial of epratuzumab (humanized anti CD22 antibody for immunotherapy of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2006, 8, R74.
- D'Cruz D.P., Khamashta M.A., Hughes G.R.V.: Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 2007, 369, 587.
- Ermann J., Bermas B.L.: The biology behind the new therapies for SLE. *Int J Clin Pract* 2007, 61, 2113.
- Foster M.H.: T cells and B cells in lupus nephritis. *Semin Nephrol* 2007, 27, 47.
- Hayat S.J., Uppal S.S., Narayanan Nampoory M.R. et al.: Safety and efficacy of infliximab in a patient with active WHO class IV lupus nephritis. *Clin Rheumatol* 2007, 26, 873.
- Houssiau F.: Thirty years of cyclophosphamide: assessing the evidence. *Lupus* 2007, 16, 212.
- Illei G.G., Austin H.A., Crane M. et al.: Combination therapy with pulse cyclophosphamide plus pulse methylprednisolone improves long-term renal outcome without adding toxicity in patients with lupus nephritis. *Ann Intern Med* 2001, 135, 248.
- Kalunian K.C., Davis Jr J.C., Merrill J.T. et al.: Treatment of lupus erythematosus by inhibition of T cell costimulation with anti CD154: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2002, 46, 32-51. Kyttaris V.C., Tsakos G.C.: T lymphocytes in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2004, 16, 548.
- Leandro M.J., Cambridge G., Edwards J.C. et al.: B cell depletion in the treatment of patients with systemic lupus erythematosus: a longitudinal analysis of 24 patients. *Rheumatology* 2005, 44, 1542.

24. **Looney R.J., Anolik J.H., Campbell D. et al.:** B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum.* 2004, 50, 2580.
25. **Luger D., Dayan M., Zinger H. et al.:** A peptide based on the complementarity determining region 1 of a human monoclonal autoantibody ameliorates spontaneous and induced lupus manifestations in correlation with cytokine immunomodulation. *J. Clin. Immunol* 2004, 24, 579.
26. **Marshak-Rothstein A.:** Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2006, 6, 825.
27. **Moroni G., Quaglini S., Gallelli B. et al.:** The long-term outcome of 93 patients with proliferative lupus nephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007, 22, 2531.
28. **Shlomchik M.J., Craft J.E., Mamula M.J.:** From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2001, 1, 147.
29. **Vielhauer V., Anders H.-J., Schlondörff D.:** Chemokines and chemokine receptors as therapeutic targets in lupus nephritis. *Semin. Nephrol.* 2007, 27, 81.
30. **Zandman-Goddard G., Levy Y., Shoenfeld Y.:** Intravenous immunoglobulin therapy and systemic lupus erythematosus. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2005, 29, 219.