

BIOLOŠKA ZDRAVILA PRI MULTIPLI SKLEROZI

BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS IN THE TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS

AVTOR / AUTHOR:

Prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

*Fakulteta za farmacijo UL, Aškerčeva 7, 1000
Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: borut.strukelj@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Multipla skleroza (MS) je avtoimunska bolezen centralnega živčnega sistema zaradi tvorbe avtoprotiteles, ki poškodujejo mielinsko ovojnico. Posledica je moten prenos živčnega signala, ki se kaže v številnih patofizioloških motnjah. Večina bolnikov izkazuje MS v obliki zaporednih poslabšanj in izboljšanj, nekateri pa imajo progresivno obliko bolezni (1). Večina avtoimunskih bolezni, vključno z multiplo sklerozo, luskavico, Crohnovo boleznijo in revmatoidnim artritisom je pogojena z aktivacijo Th2 in Th17 imunskega podsistema (2). Celice pomagalke Th-17 izločajo prov-

POVZETEK

Biološka zdravila za zdravljenje multiple skleroze temeljijo na interakcijah med celicami imunskega sistema. Zdravili prvega izbora sta interferon- β in glatiramer acetat, ki pa sta delno učinkovita le v prvi fazi razvoja multiple skleroze tipa RRMS (relapsing-remitting multiple sclerosis). V zadnjem desetletju so v razvoju ali že na tržišču specifične biološke učinkovine z imunosupresivnim delovanjem iz skupine monoklonskih protiteles, kot so že registrirani natalizumab in alemtuzumab, v razvoju pa so še daclizumab, rituksimab, ocrelizumab in ofatumumab. Vzporedno pa raziskovalci preučujejo možnost uporabe matičnih celic, kakor tudi tehnologije RNK interference za zmanjšanje napredovanja oziroma za zdravljenje multiple skleroze.

KLJUČNE BESEDE:

multipla skleroza, biološka zdravila, interferoni, monoklonska protitelesa, mikroRNK

POVZETEK

Therapeutic approaches to multiple sclerosis by means of modern biological medicinal products are based on altering the function of immune system. Interferon- β and glatiramer acetate are basic biologicals in the treatment of RRMS ((relapsing-remitting multiple sclerosis) type of disease. Both biologicals are only partially successful, have important safety limitations and are effective in the earlier stages. Beside, monoclonal antibodies, such as natalizumab, alemtuzumab, daclizumab, rituximab, ocrelizumab and ofatumumab that act as specific and potent biological immunosuppressive agents may offer considerable advantages over other biological and non-biological medicines. And finally, novel alternative methods, such as stem cell therapy or RNA interference therapy open a new frontier in the battle against the devastating effects of multiple sclerosis.

KLJUČNE BESEDE:

multiple sclerosis, biologicals, interferons, monoclonal antibodies, microRNA

netne citokine IL-17, ki vplivajo na prekomerno izločanje ostalih provnetnih citokinov (IL-23, IL-12, IL-1 β , IL-22...), kar je osnova za razvoj in uporabo terapevtskih monoklonskih protiteles proti nadizraženim provnetnim citokinom,

kakor tudi za razvoj novih, alternativnih zdravilnih učinkovinah, ki jih uvrščamo med proteine ali molekule DNA. Še vedno pa sta osnovni biološki zdravili izbora za zmanjševanje pogostosti in intenzitete zagonov interferon- β in glatiramer acetat.

2 INTERFERON-B IN MULTIPLA SKLEROZA

Trenutno pravega zdravila, ki bi popolnoma preprečil razvoj multiple skleroze še ni, največkrat uporabljeno biološko zdravilo pa je interferon beta. Imunomodulatorno delovanje interferonov sta leta 1957 odkrila Isaacs in Lindenmann (3). V letih 1980-82 so poskušali zdraviti multiplo sklerozo z izoliranimi in prečiščenimi mešanici interferonov- α in mešanico naravnih interferonov- β , ki so se pokazali kot najuspešnejši pri upočasnitvi napredovanja MS. Z razvojem tehnologije rekombinantne DNA pa so pridobili sistem za izdelavo rekombinantnih interferonov, ki so kvalitativno in kvantitativno superiornejši od naravnih, predvsem pa so z vidika varnosti in preprečevanja prenosa ko-izoliranih patogenov, bistveno varnejši. Leta 1993 so v terapijo RRMS in progresivne MS uvedli prvi rekombinantni interferon- β 1b, ki je sestavljen iz 165 aminokislin in ni glikoziliran, saj je proizveden v ekspresijskem sistemu *Escherichia coli* (*E. coli*). Strukturno se interferon- β 1a in interferon- β 1b razlikujeta le v eni aminokislini (Preglednica 1). Za namen registracije je bilo v klinično študijo vključenih 372 bolnikov, ki so prejeli placebo oziroma 50 ali 250 μ g interferona- β 1b subkutano vsak drug dan, v obdobju dveh let. Tisti bolniki, ki so prejeli interferon- β 1b, so izkazovali signifikantno manj napadov MS, ki tudi niso bili tako intenzivni (4,5).

Rekombinantni interferon β 1a im. je proizveden v sesalskih celicah CHO in je bil prvič registriran za zdravljenje RRMS leta 1996. V klinični študiji, ki jo je predlagatelj za pridobitev dovoljenja predložil Evropski agenciji za zdravila EMA, je sodeloval 301 bolnik, ki so do začetka študije izkusili vsaj dva zagona v predhodnih treh letih. V študiji so bolniki prejeli 30 μ g interferona β 1a oziroma placebo intramuskularno, enkrat tedensko, v obdobju dveh let (6). Tudi interferon β 1a im. je izkazoval statistično značilne znake izboljšanja, primerjalno s placebom. Prav tako je tudi interferon- β 1a sc., izdelan v sesalčjem ekspresijskem sistemu CHO, le da se injicira subkutano (7). Začetne klinične študije, ki so bile nujne za pridobitev dovoljenja za promet, so izkazovale približno 1/3 manj pogostosti in intenzitete zagonov v primerjavi s placebom pri RRMS obliki multiple skleroze, kasnejše klinične študije pa izkazujejo manjšo uspešnost delovanja interferonov- β pri progresivni obliki MS (8).

Uporaba interferonov- β je varna, neželeni učinki so predvsem lokalni, kjer prihaja do vnetnih procesov na mestu uboda, proti vsem rekombinantnim interferonom nastajajo specifična protitelesa, od sistemsko izraženih neželenih učinkov pa se omenja predvsem gripi podobno stanje, z bolečinami v sklepih in kosteh ter limfopenija in porast jetrnih encimov. Približno 40% bolnikov na zdravljenje z interferoni- β ne odgovori (9).

2.1 FARMAKOGENOMIKA INTERFERONA-B

Opažanja, da je največ bolnikov z MS v skandinavskih državah in severni Ameriki, kjer je incidenca 1-2 na 1000, kažejo na vpliv genov v razvoju MS, čeprav seveda MS ne moremo šteti med klasične genske bolezni. Prav tako okoli 40 % bolnikov ne reagira na posamezni tip bioloških zdra-

Preglednica 1: Primerjava različnih interferonov- β za zdravljenje MS
Table 1: Comparison of different interferons- β for treatment of MS

	Interferon- β 1a sc.	Interferon- β 1a im.	Interferon- β 1b
podvrsta	Beta 1a	Beta 1a	Beta 1b
ekspresijski sistem	CHO	CHO	<i>E. coli</i>
število aminokislin	166	166	165
glikozilacija	1-N veriga	1-N veriga	ni glikozilacije
način vnosa	SC	IM	SC
tedenski odmerek	66 (132 μ g)	30 μ g	875 μ g

vil, kar dodatno potrjuje, da je od genotipa bolnika odvisen potek bolezni in primernost zdravljenja. Z namenom odkritja genskih polimorfizmov so raziskovalci pregledali številne gene, povezane s humanim levkocitnim antigenskim (HLA) lokusom v več obširnih genomskih študijah (GWAS), (10, 11). Na osnovi hitrega sekveniranja z sekvenatorji DNA druge generacije so pregledali čez 140 tarčnih genov pri bolnikih z MS, ki so prejeli različne vrste interferonov (12). Našli so veliko genskih polimorfizmov (SNP), po ponovni analizi in potrditvi pa so izpostavili predvsem polimorfizme v genih, ki kodirajo za hialuronanski proteoglikanski protein (*HAPLN1*), za kolagen tip XXV (*COL25A1*), za kalpastatin (*CAST*), za nevronski PAS domenski protein 3 (*NPAS3*) in za gen, ki kodira glipikan 5 (*GPC5*). Protein GPC5 je proteoglikan, ki je vpleten v signalizacijske poti v ekstracelularnem matriksu. Glipikani sodelujejo pri razvoju in delovanju nevronov. Cenit s sodelavci je nedvoumno dokazal povezavo med GPC5 SNP polimorfizmom in neodzivnostjo na interferon- β (13).

3 GLATIRAMER ACETAT

Glatiramer acetat je poleg interferona β zdravilo prvega izbora za zmanjševanje zagonov pri MS. Glatiramer acetat (GA) znižuje število in intenziteta zagonov. Sestavljen je iz standardizirane mešanice peptidov, velikih od 40 do 100 aminokislilin z randomiziranim zaporedjem in s sledečo aminokislinsko sestavo: glutaminska kislina : lizin : alanin : tirozin 1,5 : 3,6 : 4,6 : 1,0 (14, 15). Prvotno so raziskovalci poskusili uporabiti osnovno mešanico peptidov, ki ima podobno sestavo kot bazični mielinski protein z namenom indukcije eksperimentalnega avtoimunskega encefalomyelitisa (EAE) pri živalskih modelih z multiplo sklerozo, preseučeni pa so opazili, da se stanje encefalomyelitisa izboljšuje, zato so mešanico po intenzivnih kliničnih študijah uspeli pred dobrim desetletjem registrirati kot zdravilo. GA se po subkutani aplikaciji hitro absorbira, prehaja v limfne vozličke, kjer modulira imunski odziv. Pri več kot polovica bolnikov, ki prejema GA, se sčasoma pojavijo protitelesa proti peptidom, a doslej še ni bilo natančno ugotovljeno, ali nastajajoča protitelesa kakorkoli vplivajo na potek bolezni, vsekakor pa zmanjšujejo razpoložljiv odmerek GA. Prav tako ni znan mehanizem delovanja GA, predpostavljajo pa, da naj bi peptidi služili kot ligandi, ki oponašajo mielinske antigene in na ta način vzpostavili lokalno imunsko tole-

rancu, kar naj bi zmanjševalo nastanek specifičnih avtoprotiteles proti mielinu, po drugi strani pa opažajo, da GA aktivira nastanek Th1 imunskega odziva in zmanjšuje Th2 odziv (16,17).

4 MONOKLONSKA PROTITELESA ZA ZDRAVLJENJE MS

4.1 NATALIZUMAB

Natalizumab je prvo registrirano rekombinantno monoklonsko protitelo (mAb) za zmanjševanje napredovanja multiple skleroze tipa RRMS, ki se na interferonsko zdravljenje ne odzivajo. Spada med humanizirana mAb, ki se vežejo na humani α -4 integrin, ki je izražen na površini limfocitov in monocitov. α -4 integrin tvori heterodimerne komplekse z β -1 in β -7 integrinom, na kar se veže žilni endotelni adhezijski dejavnik 1 (VCAM-1), ki je ključni dejavnik za prenos limfocitov preko hematoencefalne bariere, kar vodi v večje vnetne procese in poslabšanje multiple skleroze. Natalizumab deluje kot zaviralec vezave α -4 integrina z VCAM-1 proto-receptorskim sistemom na endoteljskih celicah, kar vodi do preprečitve migracije limfocitov v centralni živčni sistem. V tretji fazi kliničnih študij so izvedli dve zelo obširni študiji z vključitvijo 942 bolnikov (študija AFFIRM) in 1171 bolnikov (študija SENTINEL, ob dodatku interferona- β), kjer so bolnikom enkrat mesečno dajali 300 mg natalizumaba v obdobju 116 tednov. Obe študiji sta nedvoumno pokazali učinkovitost natalizumaba v vseh merjenih parametrih, v obliki monoterapije, kakor tudi kot dodatek interferonu- β . Proizvajalec natalizumaba je pridobil dovoljenje za prometa leta 2004, le tri mesece po vstopu na trg pa je bila uporaba začasno umaknjena, saj so ugotovili tri primere progresivne multifokalne leukoencefalopatije, ki se običajno konča s smrtnim izidom. Leta 2006 je proizvajalec natalizumab ponovno vrnil na trg, a se sedaj lahko predpisuje le kot monoterapijo, saj so bili primeri levkoencefalopatije povezani s sočasno uporabo interferona- β . Do leta 2014 je bilo za beleženih nekaj čez 320 primerov levkoencefalopatije, a tako FDA kot EMA menita, da koristnost zdravila prevlada nad tveganjem.

4.2 ALEMTUZUMAB

Alemtuzumab, ki je usmerjen proti antigenu CD-52, je humaniziranega izvora in je bil ravnokar (EMA leta 2013, FDA leta 2014) odobren za uporabo pri RRMS obliki multiple

skleroze. Alemtuzumab izkazuje veliko učinkovitost v zmanjševanju vnetnega procesa pri MS, najresnejši neželeni učinek pa je nastanek sekundarnih avtoimunskih bolezni, kot je idiopatska trombocitopenija, tiroidna avtoimska bolezen in večja nagnjenost k okužbi s herpes virusi (18).

5 BIOLOŠKE UČINKOVINE V RAZVOJU

Kljub velikemu napredku pa še vedno nimamo zdravilne učinkovine, ki bi lahko popolnoma pozdravila oziroma ustavila napredovanje multiple skleroze, zato poskušajo raziskovalci najti alternativne učinkovine in poti zdravljenja. Poleg razvoja novih specifičnih monoklonskih protiteles usmerjajo razvoj v iskanje potencialnih molekul na DNK in RNK nivoju, veliko pa si obetajo tudi od uporabe matičnih celic kot modelne celične terapije.

5.1 PROTEINSKE BIOLOŠKE UČINKOVINE

Poleg natalizumaba raziskovalne družbe razvijajo ostala monoklonska protitelesa za zdravljenje MS. Najdlje v razvoju, v zadnji fazi tretje klinične študije je daclizumab, preliminarne uspehe pa izkazuje skupina anti-CD 20 mAb, kot so rituksimab, ocrelizumab in ofatumumab. Daclizumab je humanizirano mAb proti alfa verigi IL-2 receptorja (CD-25), ki je bil prvotno razvit in je registriran za podporo pri alografski presaditvi ledvic. Antigen CD-25 je nadizražen na površini aktiviranih limfocitov T in B, T celic ubijalk in monocitov. Z zaviranjem vezave citokina IL-2 na receptor IL-2R prihaja do obsežnega zmanjšanja delovanja imunskega sistema. Poleg tega naj bi daclizumab zaviral tudi delovanje naravnih celic ubijalk in dendritičnih celic preko CD56, kar dodatno zmanjšuje migracijsko sposobnost nekaterih limfoidnih celic (19). Skupina monoklonskih protiteles, ki so usmerjene proti antigenu CD-20, so himerni rituksimab, ki je sicer registriran za zdravljenje ne-Hodgkinovega limfoma in revmatoidnega artritisa, ocrelizumab uvrščamo med humanizirana protitelesa, medtem, ko je ofatumumab humano monoklonsko protitelo. V drugi fazi kliničnega testiranja so nedavno rituksimab zamenjali za ocrelizumab zaradi manjše verjetnosti nastanka dodatnih protiteles (20).

5.2 VLOGA MIKRO RNK PRI RAZVOJU ALTERNATIVNIH BIOLOŠKIH ZDRAVIL

Odkritje prve mikroRNK (miRNK) leta 1993 je odprlo nov vidik genske regulacije, saj so raziskovalci dokazali, da niso le proteinski genski regulatorji tisti, ki aktivirajo ali utišajo gene, ampak v kompleksni regulaciji sodelujejo tudi majhne, nekodirajoče molekule RNK (21, 22). Od tedaj je bilo odkritih več kot 2600 različnih miRNK, ki sodelujejo pri različnih fizioloških in patofizioloških procesih v organizmu. Čeprav natančni mehanizem delovanja še ni znan, naj bi miRNK neposredno ali posredno utišala translacijo tarčnih proteinov z vezavo na informacijsko RNK (mRNK) in aktivacijo kompleksa ribonukleaz. Molekule miRNK so majhne, od 19-24 nukleotidov dolge enovijačne RNK molekule, ki so vpletene v posttranskripcijski mehanizem nastanka sekundarnih genskih transkriptov (proteinov). Vežejo se na določena konzervativna mesta na tarčni mRNK, kar razpозна ribonukleazni kompleks RNKz III in razgradi mRNK na mestu, kjer se je nanjo vezala miRNK. Tako mRNK ne more služiti kot osnova za sintezo tarčnega proteina na ribosomih in produkt (protein) v celici ne nastaja.

miRNK se nahajajo v celicah in se izločajo iz celic, najdemo jih v različnih telesnih tekočinah (serumu, cerebrospinalni tekočini, slini, urinu, semenski tekočini). Veliko jih je v eksosomih v limfocitih B, T in dendritičnih celicah in lahko vplivajo na aktivacijo oziroma zaviranje imunskih procesov. Ugotovili so, da limfociti T lahko prenesejo dendritičnim celicam eksosomsko miRNK, verjetno preko nanocevk. Zhang in sodelavci (23) so ugotovili, da se tako v periferni krvi, kot tudi v cerebrospinalni tekočini nahaja povišana koncentracija miR-155 pri bolnikih z multiplo sklerozo (RR-MS) v času ponovnega zagona bolezni. Podobne rezultate so dobili v cerebrospinalni tekočini pri eksperimentalnem mišjem modelu EAE. Z blokado miR-155 s pomočjo protismiselne tehnologije DNK bi lahko preprečili zagon bolezni, kar že testirajo na živalskih modelih z inducirano multiplo sklerozo (24).



6 LITERATURA

1. Sie C, Korn T, Mitsdoerffer M (2014). Th17 cells in the central nervous system autoimmunity. *Experimental Neurology* 262; 18-27.
2. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM et al (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 162; 1-11.
3. Isaacs A, Lindenmann J (1957). Virus interference. *The interferon. Proc R Soc Lond B: Biol Sci* 147; 258-67.
4. Camenga DL, Johnson KP, Alter M et al (1986). Systemic recombinant alpha-2 interferon in relapsing multiple sclerosis. *Arch Neurol* 43; 1239-46.
5. Paty DW, Li DK (1993). Interferon beta 1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis: II MRI analysis results from multicentre double-blind, placebo-controlled study. *Neurology* 43; 662-7.
6. Durelli I, Bongioanni MR, Ferrero B et al (1996). Interferon alpha 2a treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* 47; 123-9.
7. Cohen JA, Cutter GR, Fisher JS et al (2002). Benefits of interferon beta 1a on MSFC progression in secondary progressive MS. *Neurology* 59; 679-87.
8. Kappos I, Polman CH, Freedman MS et al (2006). Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 67; 1242-9.
9. McGraw CA, Lublin FD (2013). Interferon beta and glatiramer acetate therapy. *Neurotherapeutics* 10; 2-18.
10. Tremlett H, Zhao Y, Rieckmann P et al (2010). New perspectives in the natural history of multiple sclerosis. *Neurology* 74; 2004-15.
11. Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S et al (2008). The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet* 9; 516-26.
12. Baranzini SE, Wang J, Gibson RA (2009). Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Human Mol Genet* 18; 767-78.
13. Cenit MDC, Bianco-Kelly F, de las Heras V et al (2009). Glypican 5 is an interferon-beta response gene: a replication study. *Mult Scler* 15; 913-7.
14. Barten LJ, Allington DR, Procacci KA et al (2010). New approaches in the management of multiple sclerosis. *Drug Des Devel Ther* 4; 343-366.
15. Vosoughi R, Freedman MS (2010). Therapy of MS. *Clin Neurol Neurosur* 112; 365-385.
16. Martinelli BF, Rovaris M, Johnson KP et al (2003). Effects of glatiramer acetate on relapse rate and accumulated disability in multiple sclerosis: meta-analysis of three double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trials. *Mult Scler* 9; 349-55.
17. Farina C, Weber MS, Meinl E et al (2005). Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. *Lancet Neurol* 4; 567-75.
18. Pfender N, Martin R (2014). Daclizumab (anti-CD-25) in multiple sclerosis. *Neurology* 262; 44-51
19. Fontoura P (2010). Monoclonal antibody therapy in multiple sclerosis. *mAbs* 2; 670-781
20. Wiendl H, Gross CC (2013). Modulation of IL-2 R alpha with daclizumab for treatment of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 9; 394-404.
21. Lee Y, Ahn C, Han J et al (2003). The nuclear RNase II Drosha initiates micro RNA processing. *Nature* 425; 415-9.
22. Lee RC, Freinbaum RL, Ambros V et al (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75; 843-54.
23. Zhang J, Cheng Y, Cui W et al (2009). Micro-RNA 155 modulates Th1 and Th17 cell differentiation and is associated with multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 266; 56-63.
24. Mestdahl P, Hartmann N, Baeriswyl L et al (2014). Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods* 11; 809-15.