

Kladribin – mechanismus účinku

prof. MUDr. Eva Kubala Havrdová, CSc.

Neurologická klinika a Centrum klinických neurověd, 1. LF UK a VFN, Praha

Kladribin představuje novou možnost léčby roztroušené sklerózy (RS). Mechanismus účinku je odvozen od pozorování deficitu enzymu adenosin deaminázy u těžkého kombinovaného imunodeficitu. Kladribin působí neúplnou depleci aktivovaných i klidových T- i B- lymfocytů s repopulací, která vytváří dlouhodobou změnu funkce imunitního systému včetně změny cytokinové produkce. Pokud efekt této indukční terapie srovnáme s alemtuzumabem, pozorujeme rozdíl v repopulaci B-lymfocytů, které se u pacientů léčených kladribinem nedostávají nad původní hodnoty jako u alemtuzumabu. To může vysvětlit nepřítomnost sekundárních autoimunit.

Klíčová slova: kladribin, roztroušená skleróza, T- a B-lymfocyty.

Cladribine – mechanism of action

Cladribine represents a novel possibility of multiple sclerosis treatment. Mechanism of action is derived from observation of adenosin deaminase deficiency in severe combined immunodeficit. Cladribine exerts incomplete depletion of both activated and resting T- and B- lymphocytes, with repopulation which induces long-term shift in immune system function including change in cytokine production. When this effect is compared with alemtuzumab we observe difference in repopulation of B lymphocytes which do not jump above baseline values in patients treated with cladribine. This may explain no occurrence of secondary autoimmunities.

Key words: cladribine, multiple sclerosis, T- and B- lymphocytes.

Historie

Ernest Beutler a Dennis A. Carson studovali deficit enzymu adenosin deaminázy (ADA) u autosomálně recesivní metabolické poruchy odpovědné za 15 % těžkých kombinovaných imunodeficitů s výskytem <1 na 100 000 živě narozených jedinců.

ADA je klíčový enzym purinového metabolismu, u člověka má primární funkci při vývoji a udržování imunitního systému. Chybění ADA vede ke kumulaci deoxyadenosinu (dA), což jednak inhibuje ribonukleotid reduktázu a znemožňuje syntézu DNA, a jednak vede ke zvýšení S-adenosylhomocysteinu (přímý prekurzor homocysteinu). Obě substance jsou toxické pro nezralé lymfocyty. Vyvíjející se lymfocyty jsou jedny z mitoticky nejaktivnějších buněk, proto jsou na tuto situaci velmi citlivé.

Beutler a Carson si uvědomili, že lék, který by inhiboval ADA, by mohl být výhodný pro léčbu lymfomů. Carson syntetizoval kladribin, který se pak testoval v 80. letech 20. století ve Scrippsově Výzkumném Institutu v Kalifornii a vedl k téměř 90% remisi u pacientů s leukemií z vlasatých buněk, proto byl FDA registrován pro toto onemocnění v r. 1993 jako orphan drug. Beutler, který měl sestru nemocnou roztroušenou sklerózou (RS), začal spolu se zkušeným neurologem Jackem C. Sipeem, přednostou neurologie Scripps Clinic téhož institutu, zkoušet kladribin pro jeho imunosupresivní účinky u RS. V roce 1994 byly publikovány pozitivní výsledky u chronicko-progresivní RS (Sipe et al., 1994; Beutler et al., 1996), v roce 1997 byla podána žádost o registraci FDA, ta však doporučila žádost stáhnout pro nedostatek dat. Šlo o roční

dvojitě slepou studii u 48 pacientů s intravenózním kladribinem v porovnání s placebem. Byly zde i varovné nežádoucí účinky: u čtyř pacientů anémie, u jedné pacientky dřeňový útlum, který se do šesti měsíců upravil, a několik pacientů mělo trombocytopenii.

O testování orální formy kladribinu u RS se uvažovalo od r. 2000.

Mechanismus účinku na molekulární úrovni

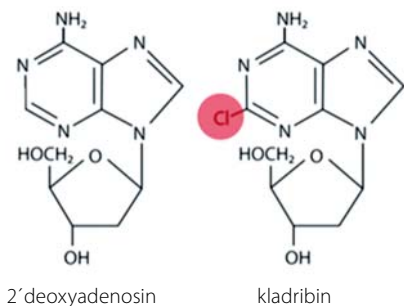
Kladribin je analogem purinového nukleosidu dA, je jeho antimetabolitem a liší se přidáním jednoho atomu chloru na purinový kruh (obrázek 1). To kladribin činí rezistentním vůči hlavnímu degradačnímu enzymu – ADA a prodlužuje dobu jeho setrvávání v intracelulárním prostoru.



KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA: prof. MUDr. Eva Kubala Havrdová, CSc., ehavr@lf1.cuni.cz
Neurologická klinika a Centrum klinických neurověd, 1. LF UK a VFN
Kateřinská 30, 120 00 Praha 2

Cit. zkr.: Neurol. praxi 2017; 18(6): suppl F
Článek přijat redakcí: 27. 8. 2017
Článek přijat k publikaci: 15. 10. 2017

Obr. 1. Molekula deoxyadenosinu a kladribinu

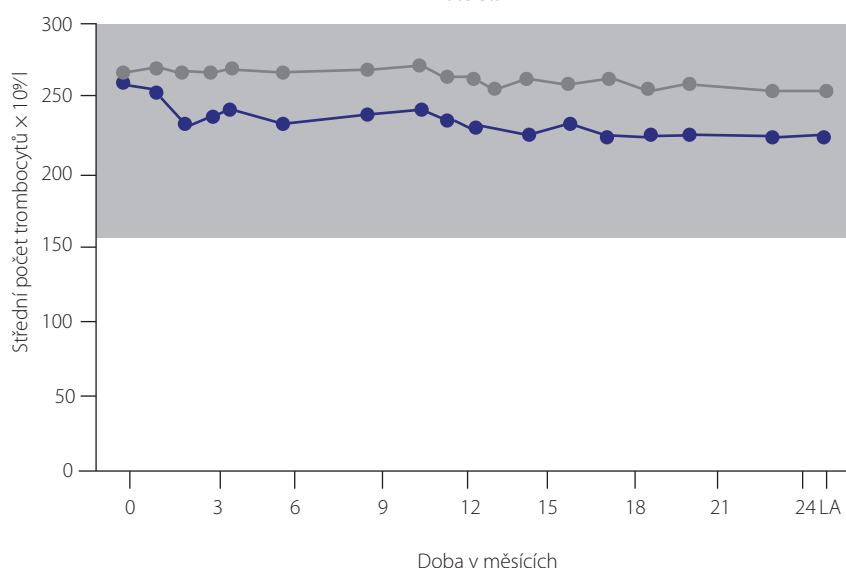
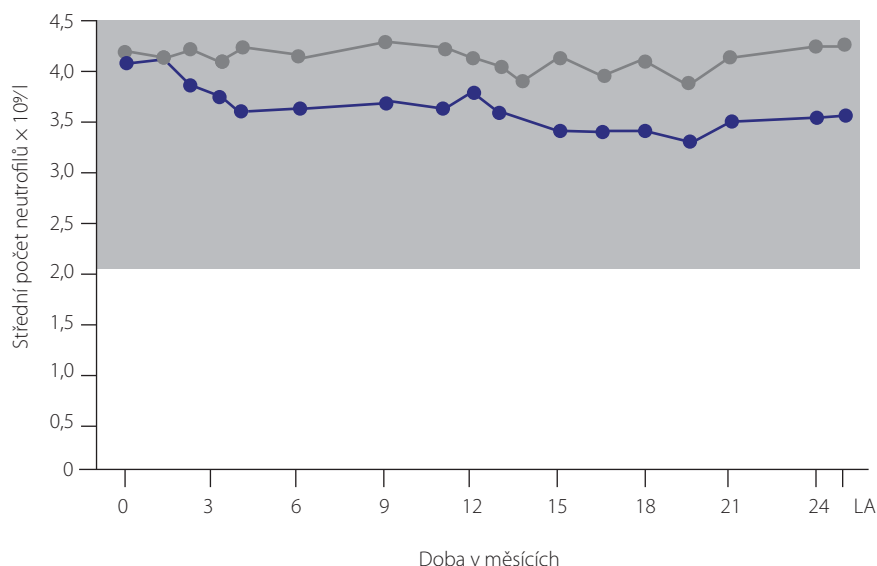
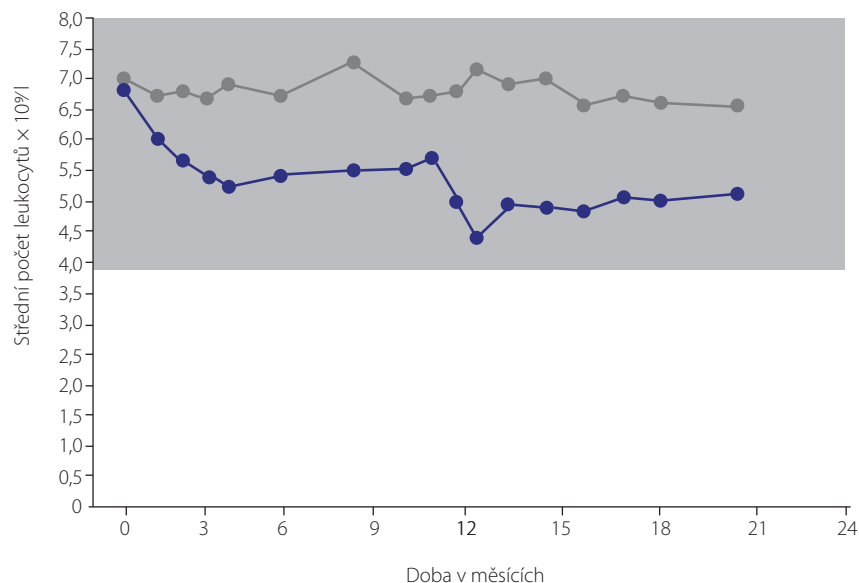


Kladribin je proléčivo (prodrug) a pro mechanismus jeho účinku je podstatných těchto pět kroků:

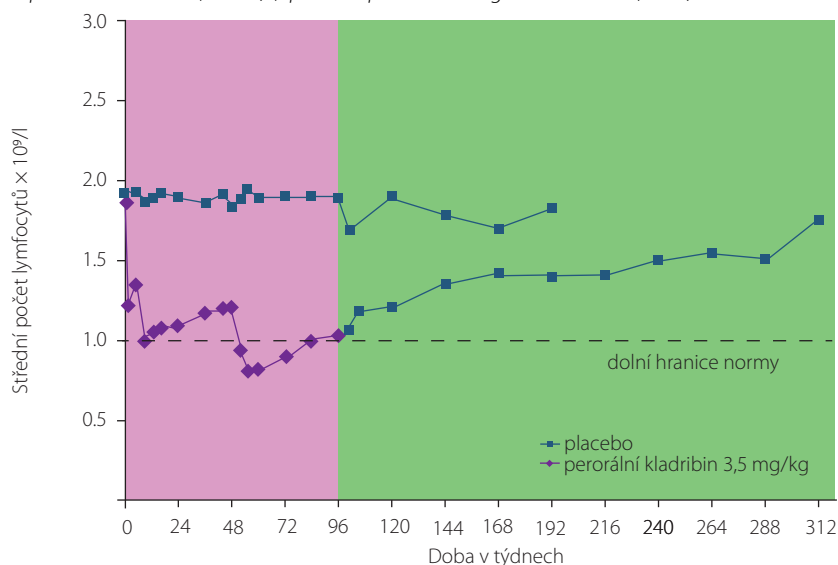
- Vstup do buňky cestou nukleosidového transportního systému.
- Intracelulární akumulace díky rezistenci k ADA.
- Následná fosforylace kladribinu na jeho aktivní trifosfátovou formu, 2 chlorodeoxyadenosin trifosfát (Cd ATP), specifickými kinázami (především deoxycitidinkinázou, DCK). Této fosforylace je zvlášť účinně dosaženo v lymfocytech v důsledku jejich konstitučně vysoké hladiny deoxycitidinkinázy (DCK) a relativně nízké hladiny fosfatázy 5' nukleotidázy (5' NT), která Cd ATP inaktivuje. Vysoký poměr DCK ku 5' NT preferuje akumulaci Cd ATP, což činí lymfocyty zvlášť náchylnými k buněčné smrti. V důsledku nižšího poměru DCK/5' NT jsou další buňky odvozené z kostní dřeně méně postižené než lymfocyty. DCK je enzym odpovědný za míru konverze proléčiva kladribinu na jeho aktivní trifosfátovou formu, což vede k selektivní depleci dělících se a nedělících se lymfocytů (Leist et Weissert, 2011).
- V dělících se buňkách Cd-ATP inhibuje ribonukleotid reduktázu, enzym, který katalyzuje tvorbu deoxyribonukleotidů z ribonukleotidů. Deoxyribonukleotidy jsou pak použity k syntéze vlastní DNA. Dále Cd-ATP inhibuje enzym DNA polymerázu, která katalyzuje polymeraci řetězce DNA. Cd-ATP soutěží s deoxyadenosin trifosfátem o inkorporaci do DNA.
- U klidových lymfocytů Cd-ATP poškozuje mitochondriální membránu deplecí ATP, takže Cytochrom C uniká do cytoplazmy. Cd-ATP může také způsobit apoptózu závislou a nezávislou na kaspáze prostřednictvím uvolnění cytochromu C a faktoru indukujícího apoptózu do cytosolu nedělících se buněk (Sigal et al., 2010).

Tyto procesy vedou k redukcí počtu autoagresivních T- a B-lymfocytů.

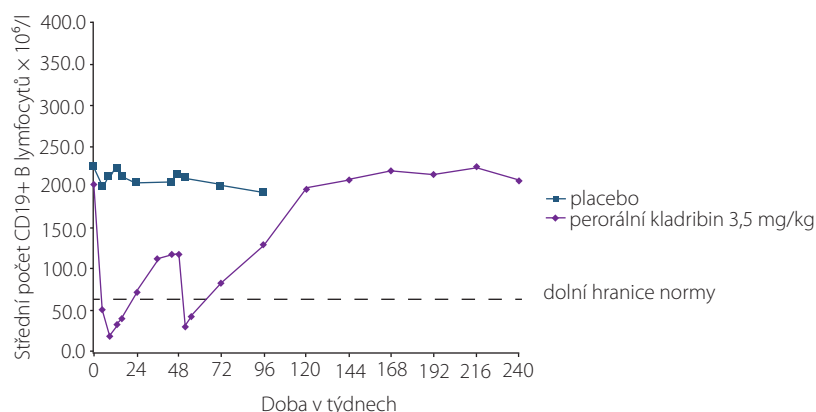
Obr. 2. Vývoj celkového počtu leukocytů, neutrofilů a trombocytů u pacientů na placebo a perorálním kladribinu 3,5 mg/kg (upraveno podle Giovannoni et al., 2010; Baker et al., 2017)



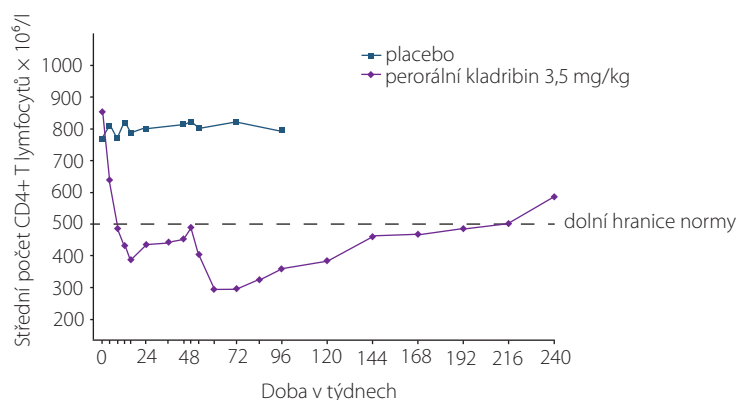
Obr. 3. Vývoj celkového počtu lymfocytů u pacientů léčených dávkou perorálního kladribinu 3,5 mg/kg v prvních dvou letech studie CLARITY (fialově) a během navazujícího dlouhodobého sledování bez dalšího podání kladribinu (zelená) (upraveno podle Soelberg-Sørensen et al., 2016)



Obr. 4. Vývoj počtu CD19+ B-lymfocytů u pacientů léčených dávkou perorálního kladribinu 3,5 mg/kg v prvních dvou letech studie CLARITY a během navazujícího dlouhodobého sledování bez dalšího podání kladribinu (upraveno podle Baker et al., 2017 a doplněno o údaje z MSGAN, Multiple Sclerosis Global Adviser Network)



Obr. 5. Vývoj počtu CD4+ T-lymfocytů u pacientů léčených dávkou perorálního kladribinu 3,5 mg/kg v prvním dvou letech studie CLARITY a během navazujícího dlouhodobého sledování bez dalšího podání kladribinu (upraveno podle Baker et al., 2017 a doplněno o údaje z MSGAN, Multiple Sclerosis Global Adviser Network)



Efekt na buňky imunitního systému

Významný pokles celkového počtu leukocytů po podání každého pulzu kladribinu

přetrvává po celou dobu léčebného roku. Kladribin způsobuje přednostní depleci lymfocytů, tedy hlavní buněčné složky získané imunity, a má minimální a pouze přechodný

vliv na buňky imunity vrozené – monocyty, neutrofile, NK buňky a trombocyty (obrázek 2), což umožňuje zachování funkce imunitního systému (Giovannoni et al., 2010; Rieckmann et al., 2009).

U většiny jednotlivých imunitních buněk závisí úroveň jejich deplece na dávce. Doporučená dávka perorálního kladribinu v léčbě RS je celkově 3,5 mg/kg tělesné hmotnosti rozdělena do dvou pulzů podaných začátkem prvního a druhého roku léčby. Jeden pulz představuje deset dní podávání kladribinu v jedné denní dávce, a to prvních pět dní prvního měsíce a prvních pět dní druhého měsíce léčebného roku.

Z elementů bílé krevní řady došlo podle očekávání k nejvýraznější depleci u lymfocytů. Jejich celkový počet byl významně snížen po prvním pulzu na polovinu s následným mírným obnovením a opětovným výrazným poklesem při podání dalšího pulzu (obrázek 3)

Nejvýraznější deplece nastala v populaci CD19+ B-lymfocytů s rapidním poklesem střední hodnoty o 85–90 % a rychlou obnovou na úroveň spodní hranice normy do šesti měsíců od zahájení léčby. Podobný průběh byl sledován i ve druhém léčebném roce (obrázek 4), jejich počet nedosahuje během dvou let původní hodnoty (od 48. týdne je však v mezích normy). To je důležité pro pochopení možných nežádoucích účinků ve srovnání s jinými léky.

Méně výrazný pokles – cca o 45 % v prvním a o 60 % ve druhém roce – byl pozorován u pomocných CD4+ T-lymfocytů. Jejich počet se po roce upravuje k dolní hranici normy a je opět snížen druhým pulzem. Průměrné počty však neklesají pod 300 buněk/μl v prvním roce a pod 200 buněk/μl ve druhém roce, v týdnu 96 jsou okolo 300 buněk/μl (obrázek 5).

Obdobná, avšak ještě méně výrazná deplece o cca 30 % a 40 % v prvním, resp. ve druhém roce byla popsána i pro supresorové/cytotoxické CD8+ T-lymfocyty.

Je však nutno zdůraznit, že míra snížení počtu lymfocytů nekoreluje s eventuálním výskytem relapsu.

Vliv na cytokiny

Krátká expozice mononukleárních buněk periferní krve kladribinu nevedla ke ztrátě schopnosti proliferace přeživších buněk in vitro. Byla

však zjištěna přetrvávající změna cytokinové produkce se zvýšeným uvolňováním interleukinu 4 a 5 a lehce i interleukinu 10. Zdá se tedy, že dochází k dlouhodobému posunu směrem k protizánětlivému profilu cytokinové produkce, což může být zodpovědné za část imunomodulačního efektu kladribinu u RS (Korsen et al., 2015).

Kladribin dále redukuje sekreci prozánětlivých cytokinů a chemokinů myšmi i lidskými dendritickými buňkami a moduluje expresi aktivních markerů CD86 a MHC II. Ve stejné studii kladribin vedl k omezení indukce T-buněk produkujících IFN gama a TNF alfa a naopak zvýšení indukce T-buněk produkujících interleukin 10 (Kraus et al., 2014).

V jedné z prvních studií u chronicko-progresivní RS byl zjištěn 20% pokles množství IL-2 v séru pacientů po podání kladribinu (Janiec, Wajgt et Kondera-Anasz, 2001).

Po kladribinu klesají cirkulující hladiny chemokinů typu RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted) v séru i v likvoru, zatímco prozánětlivý chemokin IL-8 klesá pouze v likvoru (Bartosik-Psujek et al., 2004).

Kapacita migrovat byla kladribinem snížena u monocytů (CD14+) i CD4 a CD8 lymfocytů periferní krve pacientů s RS i zdravých dárců. Jednou z aktivit kladribinu proto může být omezení migrace těchto buněk do CNS a po CNS (Kopadze et al., 2009).

LITERATURA

1. Baker D, Herrod SS, Alvarez-Gonzalez C, Zaleski L, Albor C, Schmierer K. Both cladribine and alemtuzumab may effect MS via B-cell depletion. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2017; 4(4): e360.
2. Bartosik-Psujek H, Belniak E, Mitosek-Szewczyk K, Dobosz B, Stelmasiak Z. Interleukin-8 and RANTES levels in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RR-MS) treated with cladribine. *Acta Neurol Scand.* 2004; 109(6): 390–392.
3. Beutler E, Sipe JC, Romine JS, Koziol JA, McMillan R, Zyffroff J. The treatment of chronic progressive multiple sclerosis with cladribine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1716–1720.
4. De Stefano N, Giorgio A, Battaglini M, De Leucio A, Hicking C, Dangond F, Giovannoni G, Sormani MP. Reduced brain atrophy rates are associated with lower risk of disability progression in patients with relapsing multiple sclerosis treated with cladribine tablets. *Mult Scler.* 2017 Jan 1: 1352458517690269.
5. Giovannoni G, Comi G, Cook S, Rammohan K, Rieckmann P, Soelberg Sørensen P, Vermersch P, Chang P, Hamlett A, Musch B, Greenberg SJ; CLARITY Study Group. A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2010; 362(5): 416–426.
6. Janiec K, Wajgt A, Kondera-Anasz Z. Effect of immuno-

Předpokládaný efekt kladribinu u roztroušené sklerózy

V patogenezi RS byly dlouhá léta zdůrazňovány především T-lymfocyty, až poslední výzkum a klinické studie ukázaly přinejmenším rovnocenný význam B-lymfocytů nejen pro diagnostiku, ale pro vývoj a udržování nemoci. Je proto s výhodou potlačit efektorové T- i B-lymfocyty. Kladribin ukázal schopnost působit na obě tyto populace s vyváženou repopulací. Tento efekt dvou pulzů ve dvou letech je dlouhodobý, je však třeba delších zkušeností a sběru dalších dat, abychom si ověřili, kdy se aktivita nemoci může objevit znovu. Vlivem na patogenní populace lymfocytů vede kladribin k omezení klinické i MR zánětlivé aktivity, což je logicky přeloženo i do zpomalení atrofie CNS. Rozdíl je signifikantní již po šesti měsících léčby a koreluje s oddálením invalidity (De Stefano et al., 2017).

Indukční léčba roztroušené sklerózy – kladribin a alemtuzumab

Masivní deplece lymfocytů nutná při léčbě hematopoetickými kmenovými buňkami vede k omezení aktivity RS, což je jasným důkazem toho, že RS je způsobená aberantním chováním imunitního systému. Léky, které mají schopnost dlouhodobě změnit nastavení imunitního systému pomocí několika indukčních pulzů, jsou alemtuzumab a kladribin. Pokusíme-li se srovnat vliv těchto léků na jednotlivé subpopulace lymfocytů, dojde-

me k zajímavým výsledkům. Alemtuzumab vede k rychlé a masivní depleci cirkulujících lymfocytů T i B. Rychlost je odpovědná za nežádoucí účinky spojené s infuzemi. Kromě rychlosti poklesu počtu lymfocytů je další rozdíl oproti kladribinu i v rychlosti repopulace jednotlivých subpopulací. Alemtuzumab vede k rychlé repopulaci B-lymfocytů, které se již od 6. měsíce šplhají nad počty původní, zatímco kladribin způsobuje trvalý pokles B-lymfocytů, které se ani po prvním ani po druhém pulzu nevrátí na základní počty, ačkoli jsou od 6. měsíce po podání již nad dolní hranici normy. Přestřelení počtu B-lymfocytů po podání alemtuzumabu by mohlo hypoteticky vysvětlit zvýšený počet sekundárních autoimunitních onemocnění, která jsou všechna zprostředkována právě protilátkami (Baker et al., 2017). U léčby kladribinem nebyly sekundární autoimunity pozorovány.

Závěr

Kladribin přináší další možnost léčby RS. Svým unikátním mechanismem účinku vede k dlouhodobé změně nastavení abnormálně fungujícího imunitního systému u RS, a to v oblasti T- i B-lymfocytů. Imunologický efekt se v klinických studiích např. projevil vlivem na relapsy, oddálení invalidity, MR parametry i koncept NEDA včetně oddálení atrofie mozkové tkáně. Při zavádění této léčby bude nezbytný sběr dlouhodobých dat, která ukáží místo kladribinu v našem léčebném armamentariu.

Podpořeno projektem MŠMT PROGRES Q27/LF1

- suppressive cladribine treatment on serum leucocytes system in two-year clinical trial in patients with chronic progressive multiple sclerosis. *Med Sci Monit.* 2001; 7(1): 93–98.
7. Kopadze T, Döbert M, Leussink VI, Dehmel T, Kieseier BC. Cladribine impedes in vitro migration of mononuclear cells: a possible implication for treating multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2009; 16(3): 409–412.
 8. Korsen M, Bragado Alonso S, Peix L, Bröker BM, Dressel A. Cladribine exposure results in a sustained modulation of the cytokine response in human peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One.* 2015; 10(6).
 9. Kraus SH, Luessi F, Trinschek B, Lerch S, Hubo M, Poisa-Beiro L, Paterka M, Jonuleit H, Zipp F, Jolivel V. Cladribine exerts an immunomodulatory effect on human and murine dendritic cells. *Int Immunopharmacol.* 2014; 18(2): 347–357.
 10. Leist TP, Weissert R. Cladribine: mode of action and implications for treatment of multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol* 2011; 34: 28–35.
 11. Rieckmann P, Comi G, Cook S, Giovannoni G, Rammohan K, Soelberg Sørensen P, Vermersch P, Chang P, Hamlett A, Viglietta V, Musch B, Greenberg S. Effects of cladribine tablets on peripheral lymphocyte subtypes implicated in multiple

- sclerosis immunopathogenesis: surface marker analysis for a subset of patients from the 96 week, phase III, double-blind, placebo-controlled CLARITY study. *Mult Scler.* 2009; 15: S248–S249. Abstract P816.
12. Sigal DS, Miller HJ, Schram ED, Saven A. Beyond hairy cell: the activity of cladribine in other hematologic malignancies. *Blood.* 2010; 116(16): 2884–96.
 13. Sipe JC, Romine JS, Koziol JA, McMillan R, Zyffroff J, Beutler E. Cladribine in treatment of chronic progressive multiple sclerosis. *Lancet* 1994; 344: 9–13.
 14. Soelberg-Sørensen P, Rieckmann P, Comi G, Cook S, Giovannoni G, Rammohan K, Vermersch P, Bock D, Hamlett A, Fevr T, Musch B, Greenberg S. Effects of cladribine tablets on circulating lymphocyte subsets in the 96-week CLARITY study in relapsing–remitting multiple sclerosis. *ENS* 2010 [P442].
 15. Soelberg-Sørensen P, Dangond F, Hicking C, Giovannoni G. Absolute lymphocyte count recovery in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) treated with cladribine tablets 3.5 mg/kg in CLARITY and CLARITYextension. Presented at European Charcot Foundation (ECF) 2016; November 24–28, 2016; Baveno, Italy.