

Ocrelizumab účinně tlumí poškozující zánět u nemocných s roztroušenou sklerózou mozkomíšní a neovlivňuje významně protektivní imunitu

prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.

Ústav klinické imunologie a alergologie, LF UK a FN Hradec Králové

Roztroušená skleróza mozkomíšní (RS) je imunopatologická neurodegenerativní nemoc, v jejíž patofyziologii byla až donedávna zdůrazňována klíčová úloha abnormálně polarizovaných subsetů Th1 a Th17 T lymfocytů. B lymfocytární systém nebyl v RS považován za podstatnou složku poškozujícího zánětu. Nyní je experimentálně doloženo a potvrzeno výsledky klinických studií, že B lymfocyty jsou naopak velmi podstatnou součástí imunopatogeneze RS. Biologika, která cílí na molekulu CD20, specificky vyjádřenou na zralých B lymfocytech, prokázala vynikající účinnost v léčbě RS. Výhodou této léčby je její dobrý bezpečnostní profil. Protektivní složky imunity jsou terapií antiCD20 ovlivněny minimálně a je zachována nejen tvorba ochranných protilátek, ale i obnova B lymfocytárního systému. Terapie antiCD20 ocrelizumabem, který je schválen pro léčbu RS, vede k měřitelnému snížení počtu B lymfocytů v periferní krvi, kterého lze využít jako zprostředkovaný biomarker účinnosti. V klinické praxi jsou hledány další laboratorní parametry, které by mohly být využity jak pro zhodnocení účinku terapie ocrelizumabem, tak pro identifikaci rizikových situací.

Klíčová slova: roztroušená skleróza, B lymfocyty, molekula CD20, biologická terapie, ocrelizumab, počet B lymfocytů, účinnost, bezpečnost.

Ocrelizumab is dampening the harm inflammation in patients with multiple sclerosis with little impact on protective immunity

Multiple sclerosis (MS) is immunopathological neurodegenerative disease in which the key role was up to recently gained to the abnormally polarized Th1 and Th17 subsets of T cells. The participation of B cell system has been for long time almost neglected. Recently, it has been evidenced both experimentally and clinically that B cells are an integral part of the immunopathogenesis of MS. Biological therapy targeting the molecule CD20 specifically expressed on mature B cells clearly demonstrated that this previous assumption was wrong as an excellent clinical response is achieved by this therapy with favourite safety profile. Protective components of immunity, such as production of antibodies and renewal of B cells are preserved. Administration of antiCD20 ocrelizumab is followed by significant decrease in the number of peripheral blood B cells. The drop in B cell count in blood serves as a surrogate biomarker of clinical efficacy of ocrelizumab therapy of MS.

Key words: multiple sclerosis, B cells, molecule CD20, biological therapy, ocrelizumab, B cells count, efficacy, safety.

B lymfocyty jsou součástí imunopatogeneze roztroušené sklerózy mozkomíšní

Roztroušená skleróza mozkomíšní (RS) je závažné imunopatologické a neurodegenerativní

onemocnění centrální nervové soustavy. Naše populace patří mezi nejpostiženější. Patogeneze RS je popsána pouze z části, přestože toto onemocnění je studováno na nejvyšší úrovni již několik desítek roků. Jedná se jednoznačně o mul-

tifaktoriální onemocnění s určitou genetickou predispozicí, která není příliš výrazná. Z neznámých příčin, pravděpodobně pod vlivem faktorů vnějšího světa, mezi které patří zřejmě některé virové infekce, dochází k prolomení homeosta-



KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA: prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc., jan.krejsek@fnhk.cz
Ústav klinické imunologie a alergologie, LF UK a FN Hradec Králové
Sokolská tř. 581, 500 05 Hradec Králové

Cit. zkr: Neurol. praxi 2020; 21(3): 214–220
Článek přijat redakcí: 2. 8. 2019
Článek přijat k publikaci: 15. 9. 2019

tických regulací imunitní soustavy. Výsledkem je poškozuující zánět, jehož cílem jsou především obalové struktury nervových vláken. Na základě rozsáhlých experimentálních i klinických výzkumů je v současné době obecně přijímáno, že ústřední úlohu v poškozuujícím zánětu u nemocných s RS sehrávají abnormálně funkčně polarizované subtypy T lymfocytů Th1 a Th17, které podle stávajícího konceptu považujeme za klíčovou součást poškozuujícího zánětu. Ztráta homeostatických regulací je charakterizována nižší aktivitou subtypu Treg T lymfocytů (Krejsek et al., 2016). Tento koncept je nepochybně alespoň z části pravdivý. Důkazem jsou účinné léčebné zásahy, používané již cca 20 let k léčbě některých forem roztroušené sklerózy, které jsou založeny především na modulaci T lymfocytární imunity. Bylo překvapením, když před několika lety klinické experimenty prokázaly výbornou účinnost léčebných zásahů zprostředkovaných biologickou terapií cílící na B lymfocyty. Konkrétně se jedná o použití monoklonálních protilátek reagujících s molekulou CD20 B lymfocytů. Tyto nové poznatky přinesly zcela nový vhled na imunopatogenetické mechanismy RS (Greenfield et Hauser, 2018).

Již desítky let je známo, že v likvoru nemocných s RS je možné detekovat tzv. oligoklonální proužky imunoglobulinů. Průkaz těchto oligoklonálních imunoglobulinů v likvoru je považován za dobrý pomocný diagnostický marker u nemocných s RS. Jejich přítomnost v likvoru a další nálezy, např. v transkriptu B lymfocytů v kompartmentu CNS, jasně ukazují na intratélální syntézu těchto protilátek. Přes dlouholeté úsilí nebyly nalezeny interpretačně významné terče těchto oligoklonálních protilátek. Většina z nich reaguje s různými strukturami CNS. To je interpretováno, buď jako epifenomén, který ukazuje na imunitní odpověď na poškozené struktury mozku, nebo je přítomnost těchto protilátek vykládána jako jeden z mechanismů, jakými se imunitní systém podílí na „úklidu“ v kompartmentu CNS. Nyní by bylo chybné tvrdit, že protilátková aktivita v CNS u nemocných s RS je pouhý epifenomén. Jsou jasné důkazy, že autoprotílátky se vážou na strukturní prvky v mozku, např. myelinové pochvy, oligodendrocyty, astrocyty. Byla prokázána kolokalizace protilátek a aktivovaných složek komplementového systému a také cytotoxických buněk. Oba tyto mechanismy jsou prokazatelně zapo-

jeny do efektorových fází poškozuujícího zánětu u nemocných s RS (Deisenhammer et al., 2019).

Je pravděpodobné, že aktivní zapojení B lymfocytů do poškozuujícího zánětu u nemocných s RS je komplexnější a B lymfocyty se nepochybně podílejí i na iniciačních fázích poškozuujícího zánětu. B lymfocyty totiž prokazatelně slouží jako mimořádně efektivní buňky, které jsou schopny identifikovat vzory DAMP/PAMP (Damage Associated Molecular Patterns/Pathogen Associated Molecular Patterns), internalizovat je a nitrobuňčně zpracovat. Vzniklé antigenní peptidy prezentují v kontextu molekul HLA T lymfocytárnímu systému. Mohou se tedy jednoznačně podílet na aktivaci, klonální expanzi a funkční polarizaci autoreaktivních T lymfocytů ve strukturách CNS. B lymfocyty jsou vydatným zdrojem prozánětlivých cytokinů, např. TNF α a chemokinů. Jejich prostřednictvím jsou zapojeny do samotné buněčné organizace poškozuujícího zánětu u nemocných s RS. Poskytují také růstové faktory a antiapoptotické podněty nutné pro přežívání imunitních buněk, které jsou součástí poškozuujícího zánětu u nemocných s RS (Arnett, 2019).

U pacientů s nejzávažnější formou RS, primárně progresivní, byly post mortem prokázány zorganizované tzv. terciární lymfatické struktury na meningách. Terciární lymfatické struktury jsou místem lokální odpovědi B lymfocytů na antigenní podněty. V těchto strukturách jsou přítomny folikulární dendritické buňky a také folikulární T lymfocyty Tfh, poskytující neúčinnější regulační podporu B lymfocytům stimulovaným antigenem. B lymfocyty v nich po antigenní stimulaci klonálně expandují a terminálně se diferencují do buněk, které tvoří imunoglobuliny. Absolutní důkazy o zapojení B lymfocytů do patogeneze RS získáváme z klinicky prokazaného pozitivního efektu biologické terapie rituximabem a nově ocrelizumabem. Obě biologika cílí na molekulu CD20 specificky vyjádřenou na zralých B lymfocytech. Klinický efekt u nemocných s RS vykazuje také biologikum alemtuzumab rozpoznávající molekulu CD52 vyjádřenou na řadě buněčných elementů imunitní soustavy, včetně B lymfocytů. Alemtuzumab však má v porovnání s ocrelizumabem výrazně rizikový profil (Gelfand et al., 2017; Dubey et al., 2017).

Diferenciace B lymfocytů

B lymfocyty patří k nejlépe prozkoumaným buněčným elementům imunitní soustavy. Množství poznatků, které o nich byly z různých

ohledů získány, je ohromné. Studium B lymfocytů má celou řadu praktických výstupů směrem do klinické medicíny, diagnostické praxe a ovlivňuje zdraví lidí obecně. Zde se zaměříme pouze na stručné ozřejmení diferenciace B lymfocytů. B lymfocyty se vyvíjejí v primárních orgánech krvetvorby, kterým po narození zůstává kostní dřeň. Jejich vývoj probíhá z kmenové buňky krvetvorby. Pro sledování diferenciálních procesů leukocytů je velmi výhodné a vysoce specifické stanovovat membránové nebo nitrobuňčné molekuly pomocí monoklonálních protilátek s vyhodnocením průtokovou cytometrií. Pro tyto účely byla vytvořena závazná nomenklatura leukocytárních znaků, kterou označujeme jako CD klasifikace. Každé molekule v ní přísluší určité pořadové číslo. Přiřazení znaku CD značí, že o této molekule víme prakticky vše. Kmenová buňka krvetvorby exprimuje znak CD34. Z ní se na základě aktuálních potřeb člověka vyvíjejí všechny větve krvetvorby. Na nejnižší diferenciální úrovni se od sebe odděluje lymfoidní a myeloidní vývojová větev. V rámci lymfoidní vývojové větve potom probíhá vývoj v oddělených větvích, které dávají vznik T lymfocytům a B lymfocytům. Zatímco vývoj T lymfocytů probíhá v thymu, vývoj B lymfocytů se celý uskutečňuje v kostní dřeni. Velmi brzy v průběhu diferenciace exprimují prekursor B lymfocytů membránový znak CD19, který je specifický pro B lymfocytární větev. V postupných dalších krocích, které probíhají bez přítomnosti antigenu, dochází ke komplexním změnám vyžádávajícího B lymfocytu. To se odráží na jeho imunobiologických vlastnostech. Postupně ztrácí znaky nezralosti a získává další B lymfocytární znaky, které si podrží až do stadia zralého B lymfocytu. Z těchto znaků můžeme zdůraznit především molekulu CD20, která bude předmětem bližší informace dále. Připomínáme však, že zralé B lymfocyty nesou řadu dalších specifických znaků pro B lymfocyty, jakými je např. již zmíněná molekula CD19 a dále CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40 a další. Podstatné pro vývoj B lymfocytů je uskutečnění tzv. přeskupení genových segmentů, které kódují receptory pro antigen na B lymfocytech. Úspěšné přeskupení genových segmentů vede k vyjádření receptoru pro antigen BcR na povrchu B lymfocytu. Přítomnost receptorů BcR definuje zralý B lymfocyt. Na této úrovni končí na antigenu nezávislý vývoj B lymfocytů, který vede k vytvoření

ohromného repertoáru různých B lymfocytů s různými specifitami receptorů BcR, kterými budou rozpoznávat rozmanité antigenní podněty. Základní repertoár B lymfocytů, podobně jako T lymfocytů, také zahrnuje autoreaktivní klony. Ty jsou následně v komplikovaných selekčních krocích za fyziologických podmínek likvidovány. U imunopatologických nemocí, v jejichž patologii jsou zapojeny B lymfocyty, platí, že tyto selekční procesy nejsou účinné. V repertoáru B lymfocytů jsou zachovány autoreaktivní B lymfocyty. Tak tomu je zřejmě i v RS.

Další vývoj probíhá pouze u těch B lymfocytů, které prostřednictvím BcR rozpoznaly antigen, obdržely všechny další nutné podněty od kooperujících buněk, především od T lymfocytu subsetů T_H1 a T_H2. Výsledkem je klonální expanze antigenem stimulovaných B lymfocytů, somatická mutace, izotypové přepnutí a jejich další diferenciace, na jejímž konci je vznik plazmatických buněk. K těmto procesům stimulovaným antigenem dochází v sekundárních lymfatických orgánech, především lymfatických uzlinách, slezině a jistě také v lymfoidní tkáni spojené se sliznicemi. V průběhu této terminální diferenciace se proměňují imunobiologické vlastnosti B lymfocytů, které můžeme sledovat např. změnou membránových molekul. Velmi zjednodušeně lze konstatovat, že pan B lymfocytární znaky vyjádřené na zralých B lymfocyttech, včetně CD20, jsou postupně ztraceny a na plně diferencovaných plazmatických buňkách se již tyto membránové struktury nevyskytují. Naopak, plazmatické buňky získávají jinou membránovou výbavu, která je pro ně typická, např. exprimují molekuly CD38 a CD138. K primární protilátkové odpovědi dochází i v terciálních lymfatických strukturách imunitní soustavy lokalizovaných u nemocných s RS na meningách (Rahmanzadeh et al., 2018; Lehmann-Horn et al., 2017).

Molekula CD20, ideální terč biologické terapie cílící na B lymfocyty

Molekula CD20 je vyjádřena v průběhu diferenciace B lymfocytů již na nezralých stadiích. Expres molekuly CD20 se v průběhu vyžívání zvyšuje a dosahuje nejvyšší denzity na úrovni zralého plně imunokompetentního B lymfocytu. Nevyskytuje se ani na kmenových buňkách krvetvorby, ani na plazmatických buňkách.

Molekula CD20 je membránový fosfoprotein, který čtyřikrát prochází cytoplazmatickou membránou B lymfocytu. Patří strukturně mezi tzv. tetraspanové molekuly. Její přesná fyziologická úloha není známa. Nejsou známy ani ligandy této molekuly. Předpokládá se účast CD20 v aktivaci B lymfocytů, pravděpodobně v souvislosti s hospodařením buňky s vápníkem. Membránová exprese molekuly CD20 je stabilní. Nedochází k jejímu uvolňování do tělních tekutin v podobě solubilních forem, tak jak tomu je velmi běžné u jiných membránových molekul leukocytů. Vyskytuje se rovněž na nádorově změněných buňkách B lymfocytárního původu, tj. buněčných elementech B lymfoproliferativního onemocnění charakteru B-NHL nebo CLL. Právě B lymfocytární lymfoproliferativní onemocnění byla již v roce 1997 první klinickou indikací pro využití terapie antiCD20. S touto formou terapie hematologických onemocnění byla získána obrovská klinická zkušenost (Salles et al., 2017). Indikační šíře biologické terapie antiCD20 byla postupně rozšiřována do léčby imunopatologických stavů. Jmenovat můžeme imunopatologie s převažující autoprotilátkovou aktivitou, jakými jsou revmatoidní artritida, systémový lupus a některé typy vaskulitid. V neurologické indikaci je to např. myasthenia gravis a neuromyelitis optica. Ve všech těchto indikacích je používána chimérická monoklonální protilátka antiCD20 označovaná jako rituximab. Jejich aplikace vede v léčeném člověku ke tvorbě xenoreaktivity charakterizované především tvorbou antichimérických protilátek (HACA – Human AntiChimeric Antibodies), jejichž přítomnost může být příčinou závažnějších nežádoucích účinků terapie a může být také důvodem pro snížení účinnosti léčby (Du et al., 2017).

Proto byly postupně vyvíjeny humanizované protilátky antiCD20, např. ocrelizumab, obinutuzumab a další, či humánní protilátky antiCD20, např. ofatumumab. Změn v konstrukci monoklonálních protilátek, které jsou žádoucí s ohledem na klinické aplikace, není dosahováno pouze výše uvedeným procesem, na jehož vrcholu je teoreticky plně humánní protilátka. Bylo prokázáno v in vitro experimentech i v klinických studiích, že srovnatelné a možná i výhodnější vlastnosti získávají monoklonální protilátky na základě manipulace se složením aminokyselin v tzv. pantové oblasti a manipulací s glykosylací v Fc části molekuly. Glykosylace je proces, kdy je

protein záměrně upravován vazbou cukerných struktur, které mohou významným způsobem ovlivňovat jeho vlastnosti. Pantová oblast je část těžkého řetězce imunoglobulinů, kde se rozvírá k Fab části a je klíčová pro sterické (prostorové) uspořádání molekuly, která určuje vazebné vlastnosti protilátky s antigenními epitopy. Vhodnou úpravou cukerných zbytků na Fc části jsou cíleně ovlivněny interakce protilátky navázané na antigen s receptory pro Fc část IgG na cytotoxických buňkách, fagocytujících buňkách a také určují aktivaci komplementu. Zatím nejdále pokročila v tomto ohledu „optimalizace“ biologika antiCD20, ocrelizumabu (Yang et al., 2018).

Výše uvedené modifikace monoklonálních protilátek mění významným způsobem imunobiologické vlastnosti protilátek reagujících s molekulou CD20 B lymfocytů. Monoklonální protilátky antiCD20 lze v současné době rozdělit do dvou tříd. Do I. třídy je zařazen např. rituximab. Do II. třídy zařazujeme humanizované protilátky ocrelizumab a obinutuzumab a také plně humánní ofatumumab. Výhodou protilátek antiCD20 řazených do II. třídy je v porovnání s I. třídou protilátek snížený pohyb molekul CD20 v buněčné membráně zprostředkovaný lipidovými rafty. Mají zvýšenou schopnost indukovat cytotoxickou aktivitu závislou na protilátce (ADCC). Naopak, je snížena vazba podjednotky C1q na navázanou protilátku. To snižuje komplementem zprostředkovanou cytotoxicitu. Protilátky II. třídy obecně efektivněji stimulují apoptózu B lymfocytů. Zapojují se také do zatím málo poznaného mechanismu usmrcování cílových buněk jinými mechanismy, než je apoptóza. Ten je označen jako mechanismus DCD (Direct Cell Death).

Ocrelizumab je humanizovaná protilátka podtřídy IgG1, která se váže stejně jako rituximab na velkou extracelulární smyčku molekuly CD20. Vazebný epitop je však odlišný od epitopu, který rozpoznává rituximab. V porovnání s rituximabem vazba ocrelizumabu vede k silnější depleci B lymfocytů cestou ADCC. Aktivace komplementu je prostřednictvím této protilátky daleko slabší. To by mohlo být výhodou, protože při aktivaci komplementového systému vznikají prozánětlivé působky, které by mohly být součástí nežádoucích vedlejších účinků aplikace ocrelizumabu. Opakovaná léčebná aplikace ocrelizumabu vede rovněž k odpovědi na tuto protilátku. Odpověď je v porovnání s rituxima-

bem mnohem slabší, protože humanizovaná protilátka ocrelizumab neindukuje tak výraznou xenoreaktivitu. Přesto se vytváří protilátky, které označujeme jako protilátky HAA (Human AntiHumanized Antibodies). Jejich tvorba je však podstatně nižší v porovnání s tvorbou protilátek HACA po expozici rituximabu (Sorensen et al., 2016).

Léčba ocrelizumabem ovlivňuje měřitelné parametry imunity v periferní krvi

Aplikace ocrelizumabu nemocných s RS vede k rozsáhlým změnám parametrů imunitního systému. Na zvířecím modelu EAE byly podány detailní důkazy, jak se imunitní systém jeho vlivem proměňuje v periferní krvi, sekundárních lymfatických orgánech (uzliny, slezina) a jak je ovlivněna kostní dřeň. Byly rovněž popsány dopady na tvorbu protilátek. U nemocných s RS léčených ocrelizumabem máme k dispozici z pochopitelných důvodů prakticky pouze informace o změnách v periferní krvi. Pro lékaře, kteří obecně spojují obranné reakce především s přítomností protilátek a zprostředkovaně s přítomností B lymfocytů v periferní krvi, může být závažnější skutečnost, že léčba ocrelizumabem s krátkým odstupem po aplikaci prakticky vede k eliminaci B lymfocytů v periferní krvi. Tento fakt byl opakovaně doložen řadou klinických sledování. V nich však bylo také doloženo, že deplece, či výrazné snížení počtu B lymfocytů v periferní krvi nemocných s RS léčených ocrelizumabem, mohou být použity jako zástupný biomarker účinnosti terapie (Klotz et al., 2019). Deplece či výrazné snížení počtu B lymfocytů v periferní krvi totiž zřetelně koreluje s klinickými parametry, jakými jsou EDSS, ARR (Annual Relapse Rate), a také aktivitou nemoci sledovanou pomocí MRI. Ve všech těchto ukazatelích lze doložit pozitivní vliv léčby ocrelizumabem v závislosti na snížení počtu B lymfocytů v periferní krvi (Ellrichmann et al., 2019).

Výrazné snížení, či dokonce úplná deplece B lymfocytů v periferní krvi pacientů s RS léčených ocrelizumabem musí být hodnocena v kontextu širších znalostí, jako jsou kvantitativní poměry zastoupení B lymfocytů v různých tělních kompartmentech. Je doloženo, že v periferní krvi se nachází pouze několik procent populace B lymfocytů, se kterou pracuje imunitní systém člověka. Drtivá většina B lymfocytů je

lokalizována v sekundárních lymfoidních orgánech, tj. uzlinách, slezině a především v lymfatické tkáni spojené se sliznicemi. U člověka nejsou údaje, jak léčba ocrelizumabem ovlivňuje takto kompartmentalizované B lymfocyty. Protože se jedná o velkou biomolekulu, nedochází s největší pravděpodobností k průniku ocrelizumabu do lymfatických orgánů a zde přítomné B lymfocyty zřejmě přímo nebudou významněji ovlivňovány. Intravenózní aplikace ocrelizumabu bude působit po omezenou dobu, protože imunoglobuliny mají relativně krátký poločas rozpadu. Z toho lze dovodit, že i B lymfocyty, které přirozeně regulované podle momentálních potřeb organismu vstupují do cévního řečiště ze sekundárních lymfatických orgánů, budou ovlivněny pouze po přechodnou dobu. Ocrelizumab jistě nebude deplečně působit po celý interval mezi jednotlivými aplikacemi. V sekundárních lymfatických orgánech, zvláště slezině, jsou k dispozici rychle mobilizovatelné zralé B lymfocyty, které v případě infekčního podnětu zajistí dostatečnou úroveň protekce. V dlouhodobém horizontu je podstatné, že zůstává zachována kapacita časných vývojových stadií krvetvorby, včetně kmenových buněk. Z nich je zajišťována průběžná obnova B lymfopoézy. V porovnání s rychlou mobilizací imunokompetentních B lymfocytů ze sekundárních lymfatických orgánů, kterou lze odhadnout na hodiny, nejvýše dny, bude obnova plné kompetence B lymfocytárního systému z časných stadií krvetvorby podstatně pomalejší, v řádu měsíců (Bittner et al., 2017).

Ke sledování počtu B lymfocytů a dalších imunocytů v periferní krvi je využívána průtoková cytometrie. Tato metoda je mimořádně efektivní, reprodukcibilní a je vhodná k rutinnímu monitorování hladin B lymfocytů v periferní krvi. Samozřejmě musí být B lymfocyty stanoveny pomocí monoklonálních protilátek rozpoznávajících jiný znak B lymfocytů, nejčastěji molekulu CD19. Při průkazu s použitím protilátky antiCD20 bychom totiž získali falešně negativní výsledky, protože molekula CD20 na B lymfocytech pacientů léčených ocrelizumabem je obsazena léčebnou protilátkou a diagnostická protilátka se již nemůže navázat. Deplece B lymfocytů ocrelizumabem a jinými biologiky antiCD20 ovlivňuje zprostředkovaně také počty a funkce T lymfocytů. Dochází obecně k lymfopenii. Specificky se snižuje zastoupení pomocných CD4+ T lymfocytů a recipročně je zvýšen podíl

cytotoxických CD8+ T lymfocytů. Tyto početní abnormality v T lymfocytární větvi se však v průběhu léčby ocrelizumabem s odstupem několika měsíců normalizují (Ellrichmann et al., 2019).

V relativních a zvláště absolutních počtech B lymfocytů v periferní krvi lidí jsou mimořádně velké individuální rozdíly. Pro monitorování dopadu terapie ocrelizumabem je tedy nevhodné výsledky porovnávat s kontrolními soubory zdravých lidí. Jedinou cestou je soustavné monitorování jednotlivých pacientů, které umožní sledovat dynamiku deplece B lymfocytů po aplikaci ocrelizumabu a také obnovu B lymfocytárního systému v čase. Více informací v této oblasti máme z použití rituximabu, který byl podáván v různých studiích v různých dávkách a v různých časových schématech. Zjednodušeně lze říci, že vyšší dávkování biologika antiCD20 vede k hlubší depleci B lymfocytů a následná obnova je opožděna. Aplikace ocrelizumabu je v porovnání s rituximabem časově jiná a v nižší dávce. Začíná indukční aplikací intravenózně 2 × 300 mg s následnou aplikací 600 mg ocrelizumabu každých 24 týdnů. Zatím nejsou k dispozici podrobnější informace, jak aplikace ocrelizumabu ovlivňuje počty B lymfocytů v periferní krvi a jaká je dynamika obnovy B lymfocytárního systému. Lze s velkou jistotou odhadovat, že budou podobné změnám po aplikaci rituximabu.

Léčba biologiky antiCD20 u nemocných s RS neovlivňuje, až na vzácné výjimky, významně hladiny protilátek v periferní krvi. Je to logickým důsledkem skutečnosti, že diferenciální mezistupně B lymfocytů po antigenní stimulaci a především plazmatické buňky, které jsou terminálním diferenciálním stadiem B lymfocytů aktivovaných antigenem, nenesou znak CD20. Léčba ocrelizumabem tedy nemůže mít z principu vliv na aktivity plazmatických buněk, které protilátky tvoří. Pro hladiny protilátek v krvi, především třídy IgG, platí stejné jako pro počty B lymfocytů. I zde je obrovská interindividuální variabilita. Normální hladiny IgG dospělých v naší klinické imunologické laboratoři jsou v rozmezí 7,30–19,50 g/l. Z vlastních zkušeností z péče o pacienty s primární imunodeficiencí CVID, která je charakterizována především výrazně sníženou schopností tvorby protilátek IgG víme, že klinické projevy lze čekat až při hladinách < 1–2 g/l. Z uvedeného je zřejmé, že se u pacientů léčených ocrelizumabem nemusíme obávat negativních dopadů na protektivní protilátkovou

specifickou imunitu. To nakonec jasně dokládají i data získaná ze sledování velkých souborů pacientů s RS léčených ocrelizumabem. Nebyly zaznamenány život ohrožující infekční komplikace. Ojedinelé případy takových komplikací byly popsány u nemocných, kteří byli převedeni z léčby natalizumabem na ocrelizumab a jsou s jistotou v souvislosti s touto předchozí rizikovou terapií. Léčba ocrelizumabem je považována za bezpečnou i v kontextu možnosti rozvoje nádorového bujení (Klotz et al., 2019).

Indikaci této léčby musí předcházet co nejpodrobnější vyhodnocení imunokompetence pacienta. Je známo z klinických zkušeností u nemocných s revmatoidní artritidou, u kterých byla léčba rituximabem nasazena po léčbě metotrexátem, že v tomto terénu jsou nežádoucí účinky ve smyslu oslabené imunity daleko častější a závažnější. V současné době nemáme k dispozici údaje a klinické zkušenosti, jak předchozí terapie nemocných s RS různými léčebnými modalitami ovlivní imunitní systém po nasazení ocrelizumabu. Lze očekávat, že tyto klinické zkušenosti budou postupně shromážděny a vyhodnoceny. Před zahájením léčby ocrelizumabem je doporučováno stanovit hladiny základních tříd imunoglobulinů a také specifických protilátek proti infekčním agens, které jsou kontrolovány aktivní imunizací. Pokud jsou nedostatečné, je doporučeno očkovat. U nemocných již léčených ocrelizumabem je kontraindikováno očkování živými vakcínami. To může být aktuální u pacientů s RS, např. v prevenci exotických infekcí, které je prováděno před cestou do rizikových oblastí. Očkování jinými typy vakcín není kontraindikováno. Lze však očekávat, že v porovnání se zdravými lidmi nebude dosažena odpověď optimální.

Vynikající bezpečnostní profil ocrelizumabu především ve smyslu zachování protektivní imunity můžeme vysvětlit i skutečností, že zralé B lymfocyty, exprimující CD20, se dále člení na různé funkční podtypy, které v současnosti můžeme dokonce rutinně laboratorně stanovit průtokovou cytometrií. Vhodně zvolené kombinace znaků, konkrétně CD27, povrchového IgD, případně IgM, vyjádřených na subsetech B lymfocytů, definují CD27-/IgD+ B lymfocyty, které jsou považovány za nestimulované antigenem (naive). Subset B lymfocytů, který je cD27+/IgD+, je označován jako paměťové nepřepnuté B lymfocyty a subset CD27+/IgD – je označován

jako paměťové přepnuté B lymfocyty. Termínem přepnutí rozumíme schopnost B lymfocytů tvořit protilátky jiné třídy než pouze IgM. Toto izotypové přepnutí je regulováno interakcemi B lymfocytů se subsetem T lymfocytů Th2 zprostředkovaných především IL-4 a membránovými interakcemi CD40/CD40L (van der Burg et al., 2019). Z dosavadních údajů můžeme odvodit, že žádoucím efektem působení ocrelizumabu je deplece subsetu paměťových přepnutých B lymfocytů. Navíc bylo prokázáno, že právě tento subset B lymfocytů je perzistentně infikován *y*-herpes virem HHV-4, tj. EBV. Můžeme přinejmenším spekulovat, že odstranění této infikované populace B lymfocytů ocrelizumabem může také přispět dobrému klinickému efektu, protože chronická (latentní) infekce virem EBV sehrává s velkou pravděpodobností významnou úlohu v patogenezi RS (Baker et al., 2017).

Z imunologického pohledu vysoce kontroverzní jsou řídce publikované nálezy, že molekula CD20 je vyjádřena také na malé frakci T lymfocytů periferní krve u nemocných s RS. Je dokládáno, že podíl CD20+ T lymfocytů je u nemocných s RS v porovnání se zdravými lidmi v periferní krvi a také v mozkomíšním moku zvýšen. Dostupná publikovaná data jsme se snažili porovnat s vlastními dlouhodobými zkušenostmi, které získáváme průběžně na velkých sériích biologických vzorků nemocných, které analyzujeme osmibarevnou průtokovou cytometrií rozsáhlými panely monoklonálních protilátek pro potřeby hematologického centra s cílem identifikace malignit hematopoetického původu. V klinické imunologii a hematologii není zatím zpochybňováno, že znak CD20 je specifický pro určitou vývojovou etapu B lymfocytů. Exprese molekuly CD20 na jiných liniích krvetvorby nebyla prokázána. Podle našeho názoru by publikovaná data mohla představovat laboratorní artefakt. Pokusíme se provést pilotní studii a analyzovat krev nemocných s RS v podmínkách naší cytometrické laboratoře (Gingele et al., 2019; Holley et al., 2014).

Při léčbě ocrelizumabem nebyly u nemocných s RS zaznamenány případy rozvoje autoimunit, které běžně provází terapii alemtumabem, zahrnující rovněž B lymfocyty. To se jeví být mimořádnou výhodou ocrelizumabu.

Léčba ocrelizumabem není indikována u žen, které plánují těhotenství a je kontrain-

dikována u těhotných. Jde spíše o předběžnou opatrnost. Ocrelizumab je protilátka třídy IgG1 a je tedy teoreticky možný transplacentální přenos prostřednictvím receptoru FcγR. Fyziologicky, s cílem ochrany novorozence, však dochází k přenosu mateřských protilátek třídy IgG1 z matky na plod až na konci těhotenství, cca od 32. týdne. Z této obecné úvahy můžeme implikovat, že by případné těhotenství u ženy léčené ocrelizumabem nemělo být problémem. Těhotenství je jednoduše zjištěné krátce po početí. Při následném přerušení léčby ocrelizumabem zbývá dost času, aby aplikovaný ocrelizumab byl přirozeně eliminován (Sabatino et al., 2019; Gelfand et al., 2017).

Shrnutí

Lze uzavřít, že vynikající účinnost ocrelizumabu, doložená na velkých studiích a potvrzená také běžnou klinickou praxí, je dále umocněna bezpečností této léčby. Zásadní ovlivnění počtu B lymfocytů v periferní krvi, které je typické pro léčbu ocrelizumabem, nemá negativní dopad na protektivní imunitu léčeného pacienta s RS. Vysvětlujeme si to především kompartmentalizací B lymfocytárního systému a faktem, že tato léčba neovlivňuje časná diferenační stadia krvetvorby a nepůsobí negativně na plazmatické buňky, které jsou zdrojem protilátek. Je jisté, že vynikající klinický efekt léčby ocrelizumabem je postaven na ovlivnění složek B lymfocytárního systému pacientů s RS, které jsou přímo zapojeny do poškozujícího zánětu. Z nich zřejmě nejdůležitější budou interakce B lymfocytů s T lymfocytárním systémem. B lymfocyty slouží jako efektivní buňky prezentující antigen autoreaktivním T lymfocytům. Vytváří také podmínky pro jejich abnormální polarizaci do subsetů Th1 a Th17, které jsou podstatnou součástí poškozujícího zánětu u nemocných s RS. Ocrelizumab nepochybně snižuje i tvorbu autoprotilátek, které jsou na začátku několika mechanismů odpovědných za bezprostřední poškození struktur CNS, např. cestou aktivace komplementu, reakcí ADCC a také zesílení fagocytárních funkcí (Greenfield et Hauser, 2018).

Zatím nemáme informace, jak ocrelizumab ovlivňuje populaci regulačních Breg. V jiných imunopatologiích je ztráta homeostatických aktivit Breg typická. Obnova funkce této popu-

INZERCE

lace B lymfocytů, která je vlivem ocrelizumabu pravděpodobná, může přispět k tlumení poškození zánětu (Arientová et Stříž, 2019). Obavy z možnosti dlouhodobého negativního dopadu na fungování B lymfocytů, zvláště na imunitní paměť, nejsou na místě. Naše chápání imunitní paměti se v současnosti rychle proměňuje. Původní představa, že tento fenomén

je postaven pouze na zralých B lymfocytech, již neplatí. Nyní máme jednoznačné důkazy, že podstatná část imunitní paměti v B lymfocytárním systému je zajišťována tzv. plazmatickými paměťovými buňkami (Khodadadi et al., 2019). Ty nemohou být léčbou ocrelizumabem ovlivněny, protože nenesou znak CD20. Je fascinující, jak čistě klinicky orientovaný výzkum

vedoucí k aplikaci ocrelizumabu nemocným s RS, posouvá naše chápání obecných imunobiologických zákonitostí. Je nepochybné, že další poznatky z klinického nasazení ocrelizumabu u nemocných s RS obohatí naše obecné chápání fungování imunitní soustavy jako podstatné součásti obranného i poškození zánětu.

LITERATURA

1. Arientová K, Stříž I. Buňky tlumící imunitu nebo navozující toleranci. *Alergie* 2019; 1: 35–40.
2. Arneth BM. Impact of B cells to the pathophysiology of multiple sclerosis. *Arneth J Neuroinflam* 2019; 16: 128. doi: doi.org/10.1186/s12974-019-1517-1.
3. Baker D, Marta M, Pryce G, Giovannoni G, Schmierer K. Memory B cells are major targets for effective immunotherapy in relapsing multiple sclerosis. *EBioMedicine* 2017; 16: 41–50.
4. Bittner S, Ruck T, Wiendl H, Grauer OM, Meuth SG. Targeting B cells in relapsing-remitting multiple sclerosis: from pathophysiology to optimal clinical management. *Ther Adv Neurol Disord* 2017; 10(1): 51–66.
5. Deisenhammer F, Zetterberg H, Fitzner B, Zetti UK. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Front Immunol* 2019; 10: 726. doi: [10.3389/fimmu.2019.00726](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00726).
6. Dubey D, Forsthuber T, Flanagan EP, Pittock SJ, Stave O. B-cell-targeted therapies in relapsing forms of MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2017; 4: e405. doi: [10.1212/NXI.0000000000000405](https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000405).
7. Du FH, Mills EA, Mao-Draayer Y. Next-generation anti-CD20 monoclonal antibodies in autoimmune disease treatment. *Autoimmun Highlights* 2017; 8: 1–12.
8. Ellrichmann G, Bolz J, Peschke M, Duscha A, Hellwig K, Lee DH, Linker RA, Gold R, Haghighi A. Peripheral CD19+ B-cell counts and infusion intervals as a surrogate for long-term B-cell depleting therapy in multiple sclerosis and neuromyelitis optica/neuromyelitis optica spectrum disorders. *J Neurol* 2019; 266: 57–67.
9. Gelfand JM, Cree BAC, Hauser SL. Ocrelizumab and other CD20+ B-cell-depleting therapies in multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 2017; 14: 835–841.
10. Ginge S, Jacobus TL, Konen FF, Hümmert MW, Sühs KW, Schwenkenbecher P, Ahlbrecht J, Möhn N, Müschen LH, Böning L, Alvermann S, Schmidt RE, Stangel M, Jacobs R, Skripuletz T. Ocrelizumab depletes CD20+ T cells in multiple sclerosis patients. *Cells* 2019; 8:12. doi: [10.3390/cells8010012](https://doi.org/10.3390/cells8010012).
11. Greenfield AL, Hauser SL. B cell therapy for multiple sclerosis: entering an era. *Ann Neurol* 2018; 83(1): 13–26.
12. Holley JE, Bremer E, Kendall AC, de Bruyn M, Helfrich W, Tarr JM, Newcombe J, Gutowski NJ, Eggleton P. CD20+ inflammatory T-cells are present in blood and brain of multiple sclerosis patients and can be selectively targeted for apoptotic elimination. *Multiple Sclerosis Related Disorders* 2014; 3: 650–658.
13. Khodadadi L, Cheng Q, Radbruch A, Hiepe F. The maintenance of memory plasma cells. *Front Immunol* 2019; 10: 721. doi: [10.3389/fimmu.2019.00721](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00721).
14. Klotz L, Havla J, Schwab N, Hohlfield R, Barnett M, Reddel S, Wiendl H. Risks and risk management in modern multiple sclerosis immunotherapeutic treatment. *Ther Adv Neurol Disord* 2019; 12: 1–31.
15. Krejsek J, Andrýs C, Krčmová I. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon 2016: 496 s. <http://www.imunologie-cloveka-krejsek.cz>.
16. Lehmann-Horn K, Kinzel S, Weber MS. Deciphering the role of B cells in multiple sclerosis-towards specific targeting of pathogenic function. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 2048. doi: [10.3390/ijms18102048](https://doi.org/10.3390/ijms18102048).
17. Rahmizadeh R, Weber MS, Brück W, Navardi S, Sahraian MA. B cells in multiple sclerosis therapy-A comprehensive review. *Acta Neurol Scand* 2018; 137: 544–556.
18. Sabatino JJ, Zamvil SS, Hauser SL. B-cell therapies in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2019; 9: a032037.
19. Salles G, Barrett M, Foa R, Maurer J, O'Brien S, Valente N, Wenger M, Maloney DG. Rituximab in B-cell hematologic malignancies: a review of 20 years of clinical experience. *Adv Ther* 2017; 34: 2232–2273.
20. Sorensen PS, Blinkenberg M. The potential role for ocrelizumab in the treatment of multiple sclerosis: current evidence and future prospects. *Ther Adv Neurol Disord* 2016; 9: 44–52.
21. van der Burg M, Kalina T, Perez-Andres M, Vlkova M, Lopez-Granados E, Blanco E, Bonroy C, Sousa AE, Kienzler AK, Wentink M, Mejstrikova E, Šinkorova V, Stuchly J, van Zelm MC, Orfao A, van Dongen JJM. The euroflow PID orientation tube for flow cytometric diagnostic screening of primary immunodeficiencies of the lymphoid system. *Front Immunol* 2019; 10: 246. doi: [10.3389/fimmu.2019.00246](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00246).
22. Yang Ch, Gao X, Gong R. Engineering of Fc fragments with optimized physicochemical properties implying improvement of clinical potentials for Fc-based therapeutics. *Front Immunol* 2018; 8: 1–14.