

Kan man nulstille et immunsystem?

Kostimulationsblokada: eksperimentelle studier til opnåelse af tolerance ved transplantation

STATUSARTIKEL

Eske Kvanner Aasvang & Martin Egfford

Til og med år 2000 var der i Danmark udført mere end 4.000 nyretransplantationer og ca. 1.500 patienter levede i 2000 med en velfungerende donornyre. Men omkring 250 patienter står konstant på venteliste.

Man har opnået store fremskridt inden for kortidsoverlevelsen, og i dag har 90% af de nyretransplanterede en velfungerende donornyre efter et år. Derimod er langtidsoverlevelsen ikke blevet forbedret væsentligt gennem de seneste 15 år, med en tiårsoverlevelse på ca. 50%. Ydermere har de i dag anvendte behandlinger bivirkninger, især som følge af overimmunosuppression, med opportunistiske infektioner og cancer til følge.

Igennem de seneste 20-30 år har man i et stigende antal eksperimentelle forsøg vist, at der findes metoder til at opnå tolerance over for det transplanterede organ, samtidig med at kroppens øvrige polyklonale reaktivitet bevares. I denne artikel vil de centrale eksperimenter og fund blive beskrevet.

Thymus T-celle-selektion og T-celle-aktivering

T-celler spiller en vigtig rolle ved organafstødning. Under deres modning i thymus bliver T-cellerne udsat for selektion således at de perifere T-celler bliver i stand til at koble sig på major histocompatibility complex-molekyler (MHC), og at de først bliver i stand til at blive aktiveret, hvis de udsættes for et ikke-selv-peptid, et såkaldt allo-peptid.

Kroppens T-celler undersøger konstant alle MHC'er for mulige bundne antigener. Antigenpræsenterende celler (APC) optager frie antigener og præsenterer dem via MHC for T-celle-receptoren (TCR). Interaktionen mellem TCR og MHC har tidligere været anset for at være T-cellens endeligt aktiverende signal. Denne opfattelse må med vores nuværende viden siges at være en grov forenkling.

Kostimulation – basale immunologiske studier

Man observerede i 1970'erne, at T-celler, der blandes med celler, der tydeligt er anderledes, ikke altid bliver aktiveret.

Hvis man udsatte T-celler for antigen bundet til isolerede MHC-proteiner, ville T-cellerne overgå til en anergisk tilstand, hvorfra de ikke kunne aktiveres igen. Der skal således tilsyneladende mere til end blot genkendelsen af et peptid før T-cellen aktiveres. Denne observation førte til to-signalhypotesen (kostimulationshypotesen) for aktiveringen af T-celler (1): For at en T-celle kan aktiveres, er det nødvendigt med yderligere signaler ud over signal 1, der er bindingen mellem TCR og MHC, kaldet kostimulatoriske signaler.

I 1980'erne fandt man den første kostimulatoriske receptor: CD28 (2). Når et CD28 monoklonalt antistof (mAB) kombineres med et mAB mod regionen CD3 på TCR (anti-CD3 mAB får T-cellen til at »tro« at den er koblet sammen med et MHC), medfører det T-celle-aktivering. Efterfølgende blev to CD28-ligander på APC'er fundet, nu kaldet CD80 og CD86 (CD80/86).

I 1987 klonede Brunet *et al* (3) receptoren CTLA4, nu CD152, på T-cellen. CD152 bandt sig også til CD80/86, endog med større affinitet end CD28, men funktionen af CD152 kendte man ikke.

Ved at splejse den ekstracellulære del af CD152 sammen med den konstante region på et IgG1 hos mennesker, dannede man et kimerisk molekyle, kaldet CTLA4-ig, der kunne anvendes til studiet af CD152's binding til CD80/86.

CTLA4-ig hos mennesker bandt sig heldigvis effektivt til muse-CD80/86, og kostimulationshypotesen kunne afprøves.

Diabetiske mus modtog Langerhansske øer fra mennesker via transplantation under nyrekapslen og fik CTLA4-ig som eneste immunosupprimerende behandling. Musene afstødte aldrig disse øer. Ved at binde sig til CD80/CD86 forhindrede CTLA4-ig T-celle-aktivering via CD28 receptoren (4).

Blokering af CD80/86:CD28-signalet medførte antigen-specifik tolerance. Man kunne fjerne nyrene, der indeholdt de humane Langerhansske øer, og når man efterfølgende transplanterede øer fra den samme donor, afstødte musene ikke disse. Øer fra en anden menneskedonor blev derimod afstødt på normal vis.

Efterfølgende forsøg med blokade af CD80/86:CD28 hos primater var ikke succesfulde. En årsag til denne manglende effektivitet blev afsløret i 1995. Ud over CD80/86:CD28-blokaden blokerer CTLA4-ig også for CD80/86:CD152, da CTLA4-ig jo er dannet ud fra CD152.

CD152's funktion var ukendt, men det viste sig, at CD152-knockoutmus døde af massiv multiorgan-lymfocytinfiltration. Blokerer man CD28-receptoren hos disse mus, forhindres lymfocytinfiltrationen.

Man stod nu med følgende kostimulatoriske teorier: 1) CD80/86:CD28-interaktionen er nødvendig for T-celle-ak-

Forkortelser

MHC: Major histocompatibility complex
TCR: T-celle-receptor
APC: Antigenpræsenterende celle
mAB: Monoklonalt antistof

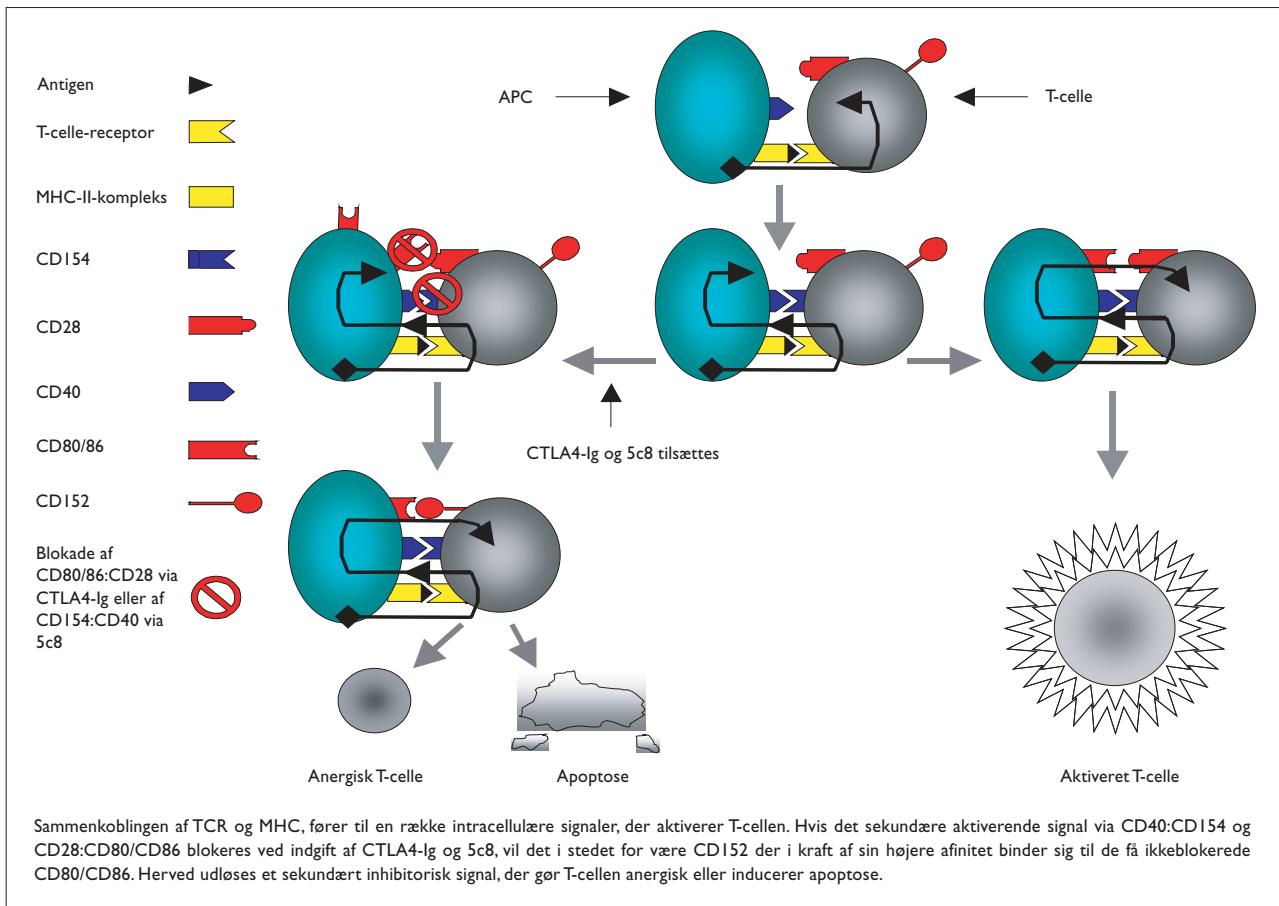


Fig. 1. Blokade af CD80/86:CD28 og CD154:CD40.

tivering, 2) CD80/86:CD152-interaktionen syntes at være nødvendig for nedreguleringen af T-celle-aktivering.

Da både CD28 og CD152 binder sig til CD80/86, vil CTLA4-ig, der binder sig til CD80/86, indirekte forhindre T-celle-aktivering eller T-celle-nedregulering.

Sideløbende med blokeringen/stimuleringen af CD28, undersøgte man receptor/ligand-komplekset CD40:CD154. En af grundene til, at man rettede opmærksomheden mod CD40:CD154, var, at nyregrafter i forbindelse kronisk afstødning udtrykker signifikant større mængder CD154 på aktiverede T-celler og signifikant højere ekspresion af CD40 på glomerulus og tubulært endotel.

CD40 udtrykkes på overfladen af B-celler såvel som APC'ere. Det vil sige med stort set samme fordeling som MHC-II.

Parker *et al* (5) fandt, at et antistof mod CD154 kan inducere langtidsoverlevelse af Langerhanske øer i gnavere. CD154 bliver primært udtrykt på aktiverede CD4+T-celler, og interaktionen mellem T-cellsens CD154 og APC'ens CD40 (CD154:CD40), medfører en opregulering af CD80/86 på APC'en (Fig. 1). Man indgav ikkeaktiverede splenocytter, der kun formidler det første signal mellem MHC-klasse II og TCR, da de ikke udtrykker CD80/86 i større grad. Man hæmmede evt. opregulering af CD80/86 via CD154:CD40-interaktionen, ved at indgive et anti-CD154. Forsøget viste, at CD154:CD40-interaktionen er essentiel for aktivering af

T-cellen, men er afhængig MHC-klasse II- og TCR-interaktionen, da mus der blev udsat for ovennævnte behandling accepterede deres graft permanent, mens mus, der alene fik anti-CD154, klarede sig mindre godt.

Larsen *et al* testede blokering af CD154 i den strengere hudallograftmodel. Larsen *et al* ræsonnerede, at hvis effektiviteten af anti-CD154 skyldtes hæmningen af CD80/86-ekspressionen, så måtte en kombinationsterapi med anti-CD154 for at undgå nye CD80/86-molekyler i at blive udtrykt og CTLA4-ig for at blokere dem, der måtte være udtrykt, være særlig effektiv. Denne kombination viste sig at være effektiv, og hudgrafterne blev accepteret i lang tid (6).

Larsen *et al* viste desuden, at ciclosporin hæmmede effektiviteten af anti-CD154 og CTLA4-ig. Dette skyldes bl.a., at ciclosporin blokerer førstesignalet via TCR. Dette signal er nødvendigt, for at en senere blokering af de kostimulatoriske signaler kan inducere anergi. For første gang kunne man ikke blot addere et immunosuppressivt stof til transplantationsbehandlingen. En oversigt over signalerne ses i Fig. 1 og Fig. 2.

Kostimulationens betydning hos nonhumane primater

Flere forskergrupper har efterfølgende ført de kostimulatoriske forsøg et skridt videre ved at udføre dem på primater (7). Effektiviteten af et humant anti-CD154 mAb (hu5C8) og

Kostimulation

Kostimulation er en specifik immunologisk term der siger, at for at aktivere en T-celle er det nødvendigt med flere og formentlig serielle receptor/ligandsignaler

MHC-II og T-celle-receptoren (TCR)

Efter at have optaget og bundet antigen, interagerer MHC-II med TCR, hvilket medfører opregulering af CD 154 på T-celle-overfladen

CD154 og CD40

Interaktionen mellem CD154 på T-cellen og CD40 på APC'en, resulterer i opreguleringen af CD80/86 på APC'en

CD80/86 og CD28

CD80/86 på APC'en interagerer med CD 28 på T-cellen, hvilket medfører T-celle-aktivering. De efterfølgende intracellulære signaler er ukendte, ligesom de intracellulære signaler, der medfører opreguleringen af de forskellige kostimulatoriske komponenter

CD80/86 og CD152

Ud over CD28 besidder T-cellen en anden CD80/86-receptor, CD152. CD152 har en langt højere affinitet for CD80/86 end CD28, men er udtryk i mindre grad. Når CD152 bindes til CD80/86, medfører dette apoptose eller anergi af T-cellen (se Fig. 1)

Fig. 2. Definitioner:

anti-CD80/86 (CTLA4-ig) er blevet testet alene eller i kombination på allografttransplanterede rhesusaber. De dyr, der fik CTLA4-ig og hu5C8 i kombination i 28 dage, havde velfungerende grefter i mere end 9 mdr., men ikke uendeligt. Hverken CTLA4-ig eller hu5C8 havde vedvarende effekt, når de blev givet alene. Dyr, der fik hu5C8 i 14 dage, havde velfungerende grefter i 100 dage, og et enkelt dyr, der fik hu5C8 i 28 dage, bevarede graftfunktionen i to år. Dette førte til et forsøg, hvor alene hu5C8 blev testet (8). Dyrene fik hu5C8 umiddelbart inden transplantationen, hyppigt i en periode efter og siden hver 28. dag. Dyrene havde velfungerende grefter efter 510 dage, og der var ingen tegn på infektion eller malignitet.

En vigtig pointe fra disse forsøg er, at det potentielt aktiverende CTLA4-ig ikke er nødvendigt for at opnå tolerance.

At kostimulatorisk blokering med anti-CD154 er en effektiv måde til at forebygge afstødning hos primater, er også blevet bevist i forskellige forsøg udført af *Kenyon et al* (9).

Som ved forsøgene med renale allografter, var anti-CD154 i stand til at forhindre afstødning af de Langerhansske øer. Som ved de murine forsøg blev tredjepartsgrafter afstødt, mens nye øer fra den originale donor blev accepteret.

Prækliniske forsøg med**kostimulatorisk blokerende stoffer hos mennesker**

Denne sum af ny viden om aktivering af T-celler, sammenholdt med opdagelsen og skabelsen af stoffer, der blokerer kostimulatoriske signaler, har dannet basis for to forsøg med mennesker (10). Af frygt for at anti-CD80/86-midler ikke alene blokerer CD80/86:CD28-interaktionen, men ved et uheld også blokerer CD80/86:CD152-interaktionen og

derved stimulerer et immunrespons i stedet for at forhindre et, har man ikke anvendt CTLA4-ig. Den samme tvetydighed havde man ikke mistanke om ved anti-CD154-terapien, der i dyreforsøg havde vist sig at være sikker og effektiv. Man testede anti-CD154 i kliniske protokoller (ikke offentliggjort), for at se om man kunne påvirke forløbet ved transplantation af nyrer og Langerhansske øer og ved autoimmune sygdomme såsom systemisk lupus erythematosus, idiopatisk trombocytopenisk purpura. Desværre og overraskende medførte anti-CD154-midlet fra den ene af to producenter forskellige tromboemboliske komplikationer, og man måtte stoppe de forsøg, hvori dette produkt indgik. Anti-CD154 fra den anden producent har ikke vist de samme komplikationer, og man formoder og håber, at bivirkningerne ved det førstnævnte præparat ikke skyldes anti-CD154, men urenheder i produktet.

Den viden, der præsenteres i denne artikel, er forholdsvis ny og rejser mange spørgsmål, bl.a.: Kan den antiafstødningsmæssige effekt genfindes ved forsøg på mennesker? Kan autoimmune T-celle-sygdomme behandles med kostimulatorisk blokade? Vil disse nye immunosuppressive midler, efterhånden som de testes på flere og i længere tid, prædisponere til særlige opportunistiske infektioner eller udvikling af malignitet? Kan man skabe et stof, der selektivt blokerer CD80/86:CD28-interaktionen uden at blokere CD80/86:CD152-interaktionen. Hvilke intracellulære signaler er forbundet med kostimulation? En bedre forståelse af disse problemstillinger kunne måske føre til udvikling af mere specifikke midler.

Den klonale deletion resulterer i induktion af apoptose i de aktiverede T-celler. Det drejer sig om en proces, der kræver aktiv medvirken fra de involverede APC'er og lymfocytter. Det er her interessant, at nogle af de traditionelle uspecifikke immunosuppressiva, som fx ciclosporin og tacrolimus hæmmer denne proces, mens nogle af de nyere immunosuppressiva herunder mycophenolat mofetil og sirolimus synes at fremme apoptose i lymfocytter. Det er således på nuværende tidspunkt uafklaret, om de traditionelt anvendte uspecifikke immunosuppressiva eventuelt vil kunne understøtte kostimulationsblokade på længere sigt.

Hvis det viser sig, at man kan anvende disse kostimulationsblokerende stoffer sikkert på mennesker, vil man stå med et unikt værktøj. Kroppens egne celler vil ikke længere være i stand til at »se« det transplanterede organ. En sådan udvikling af immunologisk tolerance vil potentielt kunne forlænge graftoverlevelsen betydeligt.

Reprints not available. Correspondence to: *Eske Kvamner Aasvang*, Classensgade 21, 4. tv., DK-2100 København Ø. E-mail: eskeaaasvang@dadlnet.dk

Antaget den 8. november 2002.

H:S Rigshospitalet, Nefrologisk Afdeling P.

Ovenstående artikel hviler på et større litteraturgennemgang end litteraturlisten ti numre. Oplysninger om denne baggrundslitteratur kan fås fra forfatteren.

Litteratur

1. Lafferty KJ, Cunningham AJ. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1975;53:27-42.
2. June CH, Ledbetter JA, Gillespie MM et al. T-cell proliferation involving

- the CD28 pathway is associated with cyclosporine – resistant interleukin 2 gene expression. *Mol Cell Biol* 1987;7:4472-81.
3. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF et al. A new member of the immunoglobulin super family-CTLA-4. *Nature* 1987;328:267-70.
 4. Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR et al. Long term survival of xenogenetic pancreatic islet grafts induced by CTLA4-ig. *Science* 1992;257:789-92.
 5. Parker DC, Greiner DL, Phillips NE et al. Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogenic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:9560-4.
 6. Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ et al. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 1996;381:434-8.
 7. Kirk AD, Harlan DM, Armstrong NN et al. CTLA4-ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8789-94.
 8. Kirk AD, Burckley LC, Batty DS et al. Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in non-human primates. *Nat Med* 1999;5:686-93.
 9. Kenyon NS, Fernandez LA, Lehmann R et al. Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8132-7.
 10. Harlan MD, Kirk AD. Promise of co-stimulatory pathway modifying reagents for transplantation. *Curr Opin Org Transpl* 2000;5:90-5.

Lægemedelomkostninger på intern medicinske afdelinger

En analyse af udgifter for patienter og afdelinger

ORIGINAL MEDDELELSE

Rasmus Rabøl, cand.polit. Anne Kolbye & Stig Ejdrup Andersen

Resumé

Introduktion: Formålet var at opgøre medicinske patienters lægemiddeludgifter, vurdere hvorledes en indlæggelse påvirker disse udgifter og at opgøre afdelingernes besparelsepotentiale ved konsekvent overholdelse af hospitalets rekommandationer.

Materiale og metoder: I alt 113 patienter fra to medicinske afdelinger indgik i undersøgelsen. Alle lægemiddelordinationer blev registreret ved gennemgang af journaler og ved telefoninterview efter udskrivelsen.

Resultater: Patienternes daglige lægemiddeludgifter steg med 11,95 kr. fra indlæggelsen til udskrivelsen (95% CI: 5,41-18,49 kr.), $p = 0,0004$. Ved udeladelse af tidsbegrænsede ordinationer fandtes ingen signifikant forskel. En måned efter udskrivelsen var de daglige lægemiddeludgifter på niveau med udgifterne ved indlæggelsen. Afdelingernes gennemsnitlige lægemiddeludgifter pr. indlæggelse var 302,72 kr. (95% CI: 209,07-396,37 kr.). I alt 31% og 28% af lægemidlerne kunne substitueres med rekommanderede synonyme lægemidler, hvilket indebar en potentiel besparelse på 8,66 kr. (95% CI: 4,61-12,72 kr.) pr. indlæggelse.

Diskussion: Patienternes lægemiddeludgifter stiger signifikant i forbindelse med en indlæggelse, hvilket kan tilskrives ordinationen af tidsbegrænsede behandlinger. Selv om næsten en tredjedel af alle ordinationerne ikke er rekommanderede, medfører konsekvent generisk substitution kun en besparelse på 2,9% af afdelingens lægemiddeludgifter.

Lægemedeludgifterne er stadig stigende (1), fra 10,7 mia. kr. i 1999 eller 5,70 kr. pr. person pr. dag (2), til 12,5 mia. kr. i 2001. Hospitalerne tegner sig for 19% af udgifterne. Forbruget svarer til 944 definerede døgndoser pr. 1.000 personer pr. dag – heraf 4% på hospitalerne. Lægemedeludgifter udgør kun en mindre del af sundhedsvæsenets totale omkostninger, men der er et stigende krav om at tænke på prisen ved ordination af lægemidler.

Lægemedeludgifter er en af de mest synlige sundhedsudgifter for patienter (3). Indlæggelse medfører ofte præparatændringer, og yderligere ændringer foretages i perioden efter udskrivelsen (4-7). I få studier har man fokuseret på ændring i patienters lægemiddeludgifter under indlæggelse, og resultaterne er ikke entydige. I en undersøgelse viste man, at patienternes udgifter blev fordoblet, primært pga. et øget antal lægemidler (8). I andre studier er der enten ikke vist nogen ændring (9), eller vist et fald i udgifterne og i antallet af lægemidler (7, 10).

Selv om lægens vigtigste opgave er at yde en effektiv og sikker behandling, bør hensynet til udgifter og budgetter også indgå i overvejelserne (11). Økonomiske betragtninger har imidlertid lav prioritet, når læger ordinerer lægemidler (12). Der er gjort flere forsøg på at reducere udgifterne, f.eks. udarbejdelse af lister over rekommanderede lægemidler. Ud fra en teoretisk betragtning er der store besparelser knyttet til generisk ordination (13), men denne mulighed udnyttes sjældent optimalt (14).

Undersøgelsens formål er at opgøre de daglige udgifter til lægemidler for medicinske patienter, vurdere hvorledes indlæggelse påvirker disse udgifter og at undersøge muligheden for besparelser på afdelingens lægemiddeludgifter ved konsekvent generisk ordination i henhold til hospitalernes rekommandationer.

Materiale og metoder

Patienter, der blev indlagt på hverdage, blev inkluderet konsekutivt. Af hensyn til undersøgelsens generaliserbarhed