

Nowe rekombinowane białka o przedłużonym działaniu w leczeniu chorych na hemofilię na podstawie wybranych doniesień przedstawionych w czasie 5 Kongresu *European Association for Haemophilia and Allied Disorders* Rzym 22–24 lutego 2012 roku

Magdalena Łętowska

Instytut Hematologii i Transfuzjologii

W ciągu ostatniego pięćdziesięciolecia naturalny przebieg ciężkiej hemofilii uległ ogromnej transformacji związanej z łatwiejszym dostępem do koncentratów czynników krzepnięcia, wprowadzeniem leczenia domowego oraz stosowaniem pierwotnej profilaktyki u dzieci. Dzisiaj oczekiwany czas życia w tej grupie chorych jest zbliżony do wieku populacyjnego, a u chorych na hemofilię obserwujemy takie same choroby, na jakie zapadają osoby w starszym wieku, czyli przede wszystkim choroby układu krążenia i choroby nowotworowe [1–3].

Pierwotna profilaktyka okazała się „złotym standardem” leczenia dzieci z ciężką postacią hemofilii, a wyniki ostatnich badań wykazały, że jest także bardzo skuteczna u dorosłych [4–6]. Oczywiście liczba dorosłych chorych, u których stosuje się profilaktykę pierwotną, jest ograniczona. Ogranicznikiem ten stanowi nadal przede wszystkim dostępność koncentratów czynników krzepnięcia, z uwagi na bardzo wysokie koszty leczenia, ale także konieczność podawania leków wyłącznie drogą dożylną i stosunkowo krótki czas działania leków.

W związku z powyższym ogromne nadzieje wiąże się z grupą nowych cząsteczek, które charakteryzuje przedłużony czas działania w wyniku zastosowania różnych modyfikacji. Cząsteczki te należą do grupy leków biologicznych, wytwarzanych metodami biotechnologicznymi z wykorzystaniem inżynierii genetycznej.

O lekach biologicznych można powiedzieć, że: naśladują funkcje prawidłowych białek ludzkich, wpływają na interakcje pomiędzy różnymi biologicznie czynnymi cząsteczkami oraz wpływają na receptory komórkowe. Należą do nich cząsteczki, które występują w organizmie naturalnie (insulina, erytropoetyna, czynniki wzrostu) lub mogą być substancjami zaprojektowanymi po to, aby wpływać na różne/różnorodne mechanizmy leżące u podłoża chorób (antagoniści interleukin). Główne grupy leków biologicznych to:

- rekombinowane białka ludzkie (prefiks *rh-* lub *rhu-*),
- przeciwciała monoklonalne (sufiks *-mab*),
- białka fuzyjne (sufiks *-cept*).

Przedłużony okres półtrwania i zwiększoną aktywność czynnika krzepnięcia w krążeniu można uzyskać poprzez różne modyfikacje jego cząsteczki. Otrzymujemy wówczas też białka fuzyjne, białka pegylowane oraz białka powstałe po dodaniu reszt kwasu sjałowego do cząsteczki rekombinowanego białka.

Białka fuzyjne

Białka fuzyjne otrzymywane są metodami biotechnologicznymi poprzez fuzję klonowanego obcego genu z fragmentem genu biorcy; otrzymuje się w ten sposób nowe białko o nowych właściwościach

[7, 8]. Modyfikacja cząsteczki czynnika krzepnięcia może być połączona z: fragmentem Fc IgG, cząsteczką albuminy czy XTEN). Białka fuzyjne są stosowane w leczeniu od ponad 20 lat. Przykładem może być etanercept (Enbrel), białko będące połączeniem pozakomórkowej domeny receptora 2 ludzkiego TNF- α (TNFR2/p75) i fragmentu Fc ludzkiej IgG₁, stosowany od 1998 roku w leczeniu między innymi reumatoidalnego zapalenia stawów [9, 10]. Innym przykładem jest alefacept (Amevive), białko złożone z cząsteczki LFA-3 i ludzkiej IgG, od 2003 roku stosowane w leczeniu łuszczycy [11].

Białka pegylowane

Do cząsteczki badanej dołączany jest glikol polietylenowy (PEG, *polyethylene glycol*) o różnej masie cząsteczkowej. Przykładem takiej cząsteczki jest pegfilgrastim, granulocytarny czynnik wzrostu powstały z dołączenia do filgrastimu cząsteczki PEG o masie cząsteczkowej 20 kD czy pegylowana cząsteczka interferonu alfa 2a [12, 13].

Białka powstałe po dodaniu reszt kwasu sjałowego do cząsteczki rekombinowanego białka (usjałowanie)

Od stopnia usjałowania rekombinowanych glikoprotein o działaniu farmakologicznym zależy ich przydatność w leczeniu, np. pozbawiona reszt sjałowych erytropoetyna traci zdolność stymulacji erytrocytów [14].

Jak wspomniano wcześniej, niektóre z rekombinowanych modyfikowanych cząsteczek białkowych, takich np. jak białka fuzyjne zostały zarejestrowane i znalazły zastosowanie w leczeniu, inne zaś są w trakcie badań klinicznych.

W odróżnieniu od obecnie stosowanych koncentratów czynników krzepnięcia białka krzepnięcia, modyfikowane genetycznie lub chemicznie, mogą powodować występowanie różnic w interpretacji wyników badań układu krzepnięcia. Na wynik pomiaru aktywności czynnika krzepnięcia może mieć wpływ rodzaj modyfikacji cząsteczki, zastosowana metoda badania, rodzaj odczynników używanych do oceny parametrów leku bądź monitorowania jego stosowania w praktyce klinicznej.

Dumont i wsp. przeprowadzili badania, które miały na celu sprawdzenie, czy stężenie w osoczu fuzyjnych białek: rFVIIIIFc i rFIXFc można oznaczać przy użyciu stosowanych obecnie metod laboratoryjnych. Badania przeprowadzono w laboratoriach

hemostazy Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej, Kanady i Europy. Do próbek osocza hemofilowego dodawano rFVIIIIFc i rFIXFc w dawkach 5, 20 i 80 j.m./dl. Próbki kontrolne przygotowano, dodając do osocza hemofilowego odpowiednie ilości rekombinowanych czynników VIII i IX tj. Advate (Baxter) i Benefis (Pfizer). W wyniku przeprowadzonych badań autorzy stwierdzili, że zarówno odczynniki, jak i standardy WHO obecnie stosowane w metodzie jednostopniowej i metodzie chromogennej, można wykorzystywać w laboratoriach do oceny rFVIIIIFc i rFIXFc [15, 16].

W czasopiśmie medycznych coraz częściej publikowane są wyniki badań klinicznych przeprowadzonych z udziałem chorych na wrodzone skazy krwotoczne, którym podaje się nowe rekombinowane białka o przedłużonym działaniu.

W styczniu 2012 roku w *Blood* ukazała się praca Powella i wsp. przedstawiająca wyniki badania klinicznego fazy I/II, w którym oceniono parametry farmakokinetyczne oraz bezpieczeństwo rFVIIIIFc w porównaniu z Advate, rekombinowanym czynnikiem VIII [17]. Do wielośrodkowego, otwartego, krzyżowego, z eskalacją dawki badania zakwalifikowano 16 chorych z hemofilią A w wieku powyżej 12. rż., którym podano pojedynczą dawkę 25 lub 65 j.m./kg Advate a następnie, po okresie wymycia (okres *wash-out*), odpowiednią dawkę rFVIIIIFc. U 11 z 16 chorych wystąpiły łagodne objawy uboczne, z czego tylko jeden związany był z podaniem leku. Nie obserwowano ciężkich objawów ubocznych. U żadnego z chorych nie stwierdzono obecności inhibitora.

Badania farmakokinetyczne wykazały 1,54–1,70 raza dłuższy okres półtrwania ($t_{1/2}$) rFVIIIIFc w porównaniu z rFVIII, 1,49–1,56 raza dłuższy klirens (27 h v. 17 h). Oba leki wykazywały podobny, zależny od dawki wzrost stężenia leku po jego podaniu i podobny odzysk. Autorzy wykazali także bardzo wysoką korelację aktywności rFVIIIIFc oznaczanej dwoma metodami: jednostopniową i chromogenną [18].

W niniejszej pracy zaledwie zasygnalizowano problem otrzymywania nowych rekombinowanych modyfikowanych białek jak również przedstawiono wybrane informacje dotyczące aktualnego stanu wiedzy o tych cząsteczkach. Być może w niedalekiej przyszłości cząsteczki te znajdą zastosowanie w leczeniu chorych z wrodzonymi niedoborami czynników krzepnięcia.

Piśmiennictwo

1. Larsson S.A. Life expectancy of Swedish haemophiliacs, 1831–1980. Br. J. Haematol. 1985; 59 (4): 593–602.

2. Darby S.C., Kan S.W., Spooner R.J. i wsp. Mortality rates, life expectancy, and causes of death in people with hemophilia A or B in the United Kingdom who were not infected with HIV. *Blood* 2007; 110 (3): 815–25. Epub 2007 Apr 19.
3. Siboni S.M., Mannucci P.M., Gringeri A., Franchini M., Tagliaferri A., Ferretti M., Tradati F.C., Santagostino E., von Mackensen S.; Health status and quality of life of elderly persons with severe hemophilia born before the advent of modern replacement therapy. *J. Thromb. Haemost.* 2009; 7 (5): 780–786. Epub 2009 Feb 12.
4. Walsh C.E., Valentino L.A. Factor VIII prophylaxis for adult patients with severe haemophilia A: results of a US survey of attitudes and practices. *Haemophilia* 2009; 15 (5): 1014–1021. Epub 2009 Jun 1.
5. Astermark J. When to start and when to stop primary prophylaxis in patients with severe haemophilia. *Haemophilia*. 2003; 9 (supl. 1): 32–36; discussion 37.
6. Collins P., Faradi A., Morfini M., Enriquez M.M., Schwartz L. Efficacy and safety of secondary prophylactic vs. on-demand sucrose-formulated recombinant factor VIII treatment in adults with severe hemophilia A: results from a 13-month crossover study. *J. Thromb. Haemost.* 2010; 8 (1): 83–89. Epub 2009 Oct 11.
7. Mekhaieel D.N., Czajkowsky D.M., Andersen J.T. i wsp. Polymeric human Fc-fusion proteins with modified effector functions. *Sci. Rep.* 2011; 1: 124. Epub 2011 Oct 19.
8. Houde D., Berkowitz S.A. Conformational comparability of factor IX-Fc fusion protein, factor IX, and purified Fc fragment in the absence and presence of calcium. *J. Pharm. Sci.* 2012; 101 (5): 1688–700. doi: 10.1002/jps.23064. Epub 2012 Jan 23.
9. Mannik M., Wener M. Treatment of rheumatoid arthritis with a tumor necrosis factor receptor-Fc fusion protein. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337 (21): 1560; author reply 1560-1561.
10. Grijalva C.G., Chen L., Delzell E. i wsp. Initiation of tumor necrosis factor- α antagonists and the risk of hospitalization for infection in patients with autoimmune diseases. *JAMA* 2011; 306 (21): 2331–2339. Epub 2011 Nov 6.
11. Ortleb M., Levitt J.O. Practical use of biologic therapy in dermatology: Some considerations and checklists. *Dermatol. Online J.* 2012; 18 (2): 2.
12. Costa L.J., Kramer C., Hogan K.R. i wsp. Pegfilgrastim- versus filgrastim-based autologous hematopoietic stem cell mobilization in the setting of preemptive use of plerixafor: efficacy and cost analysis. *Transfusion* 2012 Mar 8. doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03579.x.
13. Boþianu A.M., Demian S., Macarie I., Georgescu D., Oltean G., Băþagă S. Acquired haemophilia complicated with gastrointestinal bleeding and spontaneous iliopsoas muscle haematoma in a woman with chronic C hepatitis under treatment with pegylated IFN alpha 2a and ribavirin. *J. Gastrointest. Liver Dis.* 2012; 21 (1): 93–95.
14. Yang W.S., Chang J.W., Han N.J., Park S.K. Darbepoetin alfa suppresses tumor necrosis factor- α -induced endothelin-1 production through antioxidant action in human aortic endothelial cells: role of sialic acid residues. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 50 (10): 1242–1251. Epub 2011 Feb 17.
15. Dumont J.A., Liu T., Low S.C. i wsp. Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. *Blood* 2012; 119 (13): 3024–3030.
16. Powell J.S., Josephson N.C., Quon D. i wsp. Safety and prolonged activity of recombinant factor VIII Fc fusion protein in hemophilia A patients. *Blood* 2012; 119 (13): 3031–3037.
17. Shapiro A.D., Ragni M.V., Valentino L.A. i wsp. Recombinant factor IX-Fc fusion protein (rFIXFc) demonstrates safety and prolonged activity in a phase 1/2a study in hemophilia B patients. *Blood* 2012; 119 (3): 666–672. Epub 2011 Nov 22.
18. Powell J.S., Josephson N.C., Quon D. i wsp. Safety and prolonged activity of recombinant factor VIII Fc fusion protein in hemophilia A patients. *Blood* 2012; 119 (13): 3031–3037. Epub 2012 Jan 5.