

Ovplyvnenie kostnej resorpcie inhibíciou rank ligandu denosumabom

J. Rovenský, P. Masaryk, S. Blažičková

Súhrn

V práci je uvedený prehľad o cielej liečbe postmenopauzálnej osteoporózy inhibíciou RANKL. Objav troch signálnych proteínov RANK/RANKL/OPG napomohol aj k odhaleniu patogenézy nielen postmenopauzálnej osteoporózy, ale aj pri takých chorobných stavoch, ako je osteoporóza vyvolaná glukokortikoidmi, hyperparatyreóza, infekcie parodontu a malígne choroby (napríklad pri myelóme, osteolytických metastázach a vrodených ochoreniach skeletu). Nové liečivo denosumab sa viaže na RANKL a inhibuje resorpciu kostí. Preparát pôsobí v celom tele a má význam na zníženie redukcie výskytu vertebrálnych fraktúr, redukuje výskyt nonvertebrálnych fraktúr, redukuje riziko fraktúr proximálneho femuru. Je efektívnejší voči referenčnému bisfosfonátu a má rýchlu odpoveď na liečbu. Výhodou je aj bezpečnosť dlhodobej liečby.

Kľúčové slová

RANK/RANKL/OPG – denosumab – liečba postmenopauzálnej osteoporózy

Summary

The effect of rank ligand inhibition by denosumab on bone resorption. This paper provides an overview of targeted treatment of postmenopausal osteoporosis by RANKL inhibition. Identification of the three signal proteins, RANK/RANKL/OPG, helped to elucidate the pathogenesis not only of postmenopausal osteoporosis, but also other pathological conditions, such as glucocorticoid-induced osteoporosis, hyperparathyroidism, periodontium infections and malignant diseases (e.g. myeloma, osteolytic metastases and congenital skeletal diseases). Denosumab is a novel agent that binds to RANKL and inhibits bone resorption. This formulation acts in the entire body and plays an important role in decreasing occurrence of vertebral fractures, reduces occurrence of non-vertebral fractures and reduces a risk of proximal femur fractures. Compared to reference bisphosphonate, denosumab is more effective and provides a rapid treatment response. The safety of long-term administration is also convenient.

Keywords

RANK/RANKL/OPG – denosumab – postmenopausal osteoporosis treatment

Od polovice 90. rokov minulého storočia prebiehal intenzívny výskum lokálnej tkanivovej regulácie kostného obratu. Ako prelomovým sa ukázal objav troch signálnych proteínov:

1. Jednalo sa o RANKL (Receptor Aktivator Nuclear faktor KappaB Ligand), ktorý sa syntetizuje v osteoblastoch. RANKL je členom superrodiny tumor nekrotizujúceho faktora. RANKL sa skladá z 317 aminokyselín a je produkovaný v periférnych lymfatických uzlinách a bunkami kostnej drene, týmusu, sleziny, Payerských plakoch, mozgu, srdca, kože, kostrových svalov, obličiek, pečene, pľúc a tkaniva mliečnej žľazy [1,2]. Bunky, ktoré produkujú RANKL, zahŕňujú bunky osteoblastickej línie, stromálne bunky kostnej drene,

synoviálne bunky, aktivované T-lymfocyty, B-lymfocyty, fibroblasty, endoteliálne bunky, chondrocyty a epiteliálne bunky prsnej žľazy [2–4]. Na expresiu RANKL vplyvajú hormóny, rastové faktory, peptidy a cytokíny [5].

RANKL má rozhodujúcu úlohu v osteoklastogenéze, v diferenciácii a aktivácii osteoklastov, tiež apoptózy osteoklastov [1]. Aktivita RANKL sa odohráva prostredníctvom jeho väzby na RANK. Skutočne je známe, že väzbou RANKL na RANK sa odohráva prvý krok vo vývoji osteoklastogenézy. OPG súťaží o väzbu na RANK s RANKL. Inhibícia väzby RANKL na RANK pomocou OPG môže potom spôsobiť potlačenie kostnej resorpcie a správnu kostnú formáciu. Porušenie RANKL a OPG rovnováhy je

základným bodom v patogenéze niekoľkých chorôb kostí spojených so vzostupom kostnej resorpcie.

2. RANK (Receptor Aktivator Nuclear Faktor KappaB), ktorý je vlastným receptorom RANKL, je prítomný na osteoklastoch a tiež ich prekursoroch, pričom má schopnosť aktivovať intracelulárny nukleárny faktor kappaB, ktorý stimuluje transkripciu proteínov génov, ktoré majú schopnosť regulovať diferenciáciu a dozrievanie buniek (obr. 1).

3. Osteoprotegerín (OPG) je členom receptorovej veľkorodiny tumor nekrotizujúceho faktora (TNF). Molekulu tvorí glykoproteín skladajúci sa zo 401 aminokyselín. OPG sa viaže na RANKL

a zablokovaním RANKL inhibuje diferenciáciu osteoklastových prekursorov na zrelé osteoklasty, aktivitu osteoklastov a zvyšuje ich apoptózu. Tvorbu OPG stimulujú estrogény, 1, 25 (OH)₂ D₃, TNF-α, IL-1 a TGF-β a inhibujú glukokortikoidy, parathormón a PGE₂. S postupujúcim vekom sa znižuje pool osteoprogenitorov, zatiaľ čo pool progenitorov osteoklastov narastá, a tým sa rovnováha medzi osteoformáciou a resorpciou, potrebná na udržanie kostnej hmoty, stráca. Osteoblasty regulujú aktivitu osteoklastov prostredníctvom expresie RANKL a cez OPG. Ukázalo sa, že osteoblasty starších zvierat majú väčší sklon indukovať osteoklastogenézu ako osteoblasty mladých zvierat a že tieto zmeny sú spojené so zvýšenou expresiou RANKL a zníženou expresiou OPG. OPG je teda prirodzený receptor pre RANKL a silný inhibítor osteoklastogenézy. Kostná remodelácia je vlastne regulovaná pomerom medzi RANKL a OPG, pričom pri prevahe RANKL prevláda aktivácia osteoklastov – osteoresorpcia, pri prevahe OPG znížením aktivácie osteoklastov je resorpcia kosti inhibovaná.

Objav troch signálnych proteínov RANK/RANKL/OPG pomohol odhaleniu patogenézy niektorých metabolických ochorení kostí:

1. postmenopauzálna osteoporóza – pri ktorej dochádza k zvýšenej expresii RANKL v stromálnych bunkách a T-lymfocytoch a k zvýšenej citlivosti RANK v osteoklastoch,

2. osteoporóza vyvolaná glukokortikoidmi – pri ktorej býva zvýšená expresia RANKL a inhibícia sekrécie OPG v osteoblastoch,

3. hyperparatyreóza – zvýšená expresia RANKL a inhibícia sekrécie OPG v osteoblastoch.

Pri reumatoidnej artritíde býva tiež zvýšená expresia RANKL v aktivovaných T-lymfocytoch a synoviálnych bunkách. Vznikajú erózie v marginálnej kosti a dochádza k vzniku juxtaartikulárnej osteoporózy. Ďalej sa ukázala aj pri iných nozologických jednotkách zvýšená

expresia RANKL v aktivovaných T-lymfocytoch, alebo v iných bunkách, jedná sa o:

1. infekcie periodontu (zvýšená expresia RANKL v aktivovaných T-lymfocytoch),

2. malígne choroby (kostné ochorenie pri myelóme – zvýšená expresia RANKL a inhibícia sekrécie OPG v preosteoblastoch, produkcia RANKL myelómovými bunkami a degradácia OPG v lyzozómoch),

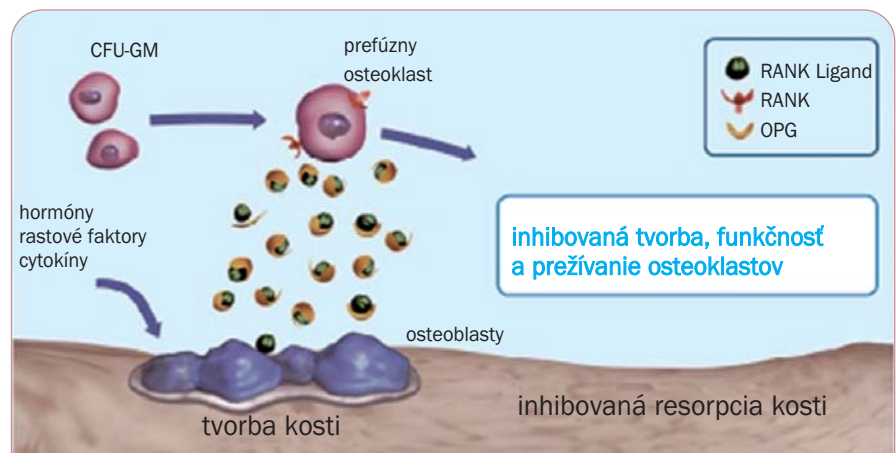
3. osteolytické kostné metastázy a humorálna hyperkalciémia pri malígnite – aj v týchto prípadoch dochádza k zvýšenej expresii RANKL nádorovými bunkami.

4. vrodené ochorenia skeletu (juvenilná forma Pagetovej choroby – idopa-

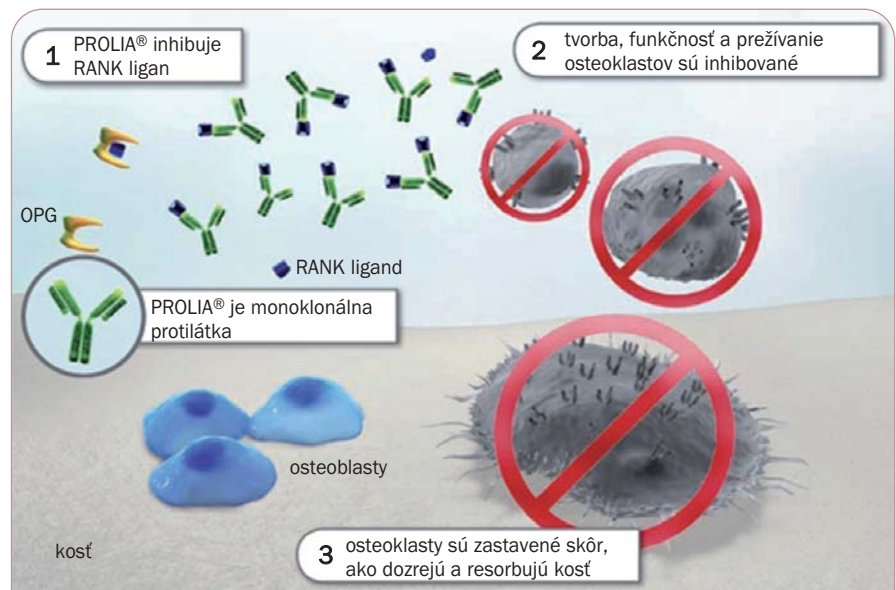
tická hyperfosfatázia – kde hrá úlohu inaktivačná mutácia OPG génu), napokon je familiárna Pagetova choroba a skeletálna hyperfosfatázia, kde dochádza k aktívnej mutácii RANK génu [6].

V rámci terapeutického využitia systému RANK/RANKL/OPG sú tieto možnosti: blokáda ligandu RANKL, ovplyvnenie receptora RANK, ďalej je tu možnosť stimulácie endogénnej produkcie OPG, podávanie OPG [6].

Vyššie uvedené poznatky umožnili objaviť nové liečivo – denosumab (Prolia®), ktorý sa viaže na RANKL a inhibuje resorpciu kosti. Osteoblast je ústredná bunka nielen pre novotvorbu kosti, ale aj pre jej resorpciu, pretože



Obr. 1. Mechanizmus účinku systému RANKL/RANKL.



Obr. 2. Účinok denosumabu na kostnú resorpciu.

osteoblasty tvoria RANKL, ktorý prostredníctvom osteoklastov resorpciu zvyšuje. Cenný je poznatok, že OPG naviazaním na RANKL tiež resorpciu redukuje. Denosumab sa viaže na RANKL podobným spôsobom ako OPG. Jedná sa o monoklonálnu protilátku IgG2 izotypu s vysokou afinitou a špecifitou pre ľudský RANKL, pričom nebola zistená väzba na TNF- α , TNF- β , TRAIL a CD40 ligand. U preparátu denosumab sa v klinických štúdiách nezistili neutralizujúce protilátky (obr. 2).

Bezpečnosť a antiresorpčný účinok denosumabu sa sledoval v 1. fáze klinického skúšania u skupiny 49 žien, ktoré boli rozdelené do 5 skupín po 6 osobách a dostávali dávky 0,01; 0,03; 0,1; 0,3 a 1 mg/kg v jednotlivej dávke. 7 pacientkám sa podávala dávka 3 mg/kg a 12 ženám placebo. Výsledky ukázali, že jednorazová aplikácia denosumabu má za následok rýchly pokles markerov kostnej resorpcie (močové NTx) – v priebehu 12 hodín sa zistil pokles až o 84 % podľa výšky aplikovanej dávky a po šiestich mesiacoch sa tento pokles udržal na 81% hladine oproti placebo, kde sa zistil pokles o 10 %. Sérové NTx pokleslo o 56 % v skupine liečenej denosumabom, naproti tomu u placebo sa zvýšilo o 2 %. Alkalická fosfatáza sa nemenila a parathormón sa zo začiatku zvýšil trojnásobne po 4 dňoch u skupiny liečenej 3 mg/kg, po mesiaci začal klesať, ale oproti východiskovej hodnote zostal mierne zvýšený.

V medzinárodnej randomizovanej, placebom kontrolovanej klinickej štúdií fázy 2 sa denosumab podával 412 postmenopauzálnym ženám v trojmesačných intervaloch v dávkach 6, 14 alebo 30 mg, alebo v šesťmesačných intervaloch v dávkach 14, 60, 100, alebo 210 mg subkutánne po dobu 24 mesiacov. Pri denosumabe sa dokázalo zvýšenie kostného minerálu v chrbtici od 3,0 do 6,75 % oproti 4,6 % u ALN a stratou 0,8 % u placebo. Najzaujímavejším výsledkom terapie denosumabom bol nárast kostnej denzity v distálnej tretine predlaktia, kde nárast bol 0,4 až 1,3 % pri porovnaní s poklesom 0,5 % u alendronátu a 2,0 % u placebo.

Maximálna redukcia markerov kostnej resorpcie sa zistila po treťom dni podávania denosumabu, pričom je potrebné zdôrazniť, že dĺžka supresie bola závislá na podanej dávke.

Výsledky ukázali preukazný vplyv na zníženie kostnej resorpcie a zvýšenie denzity kostného minerálu.

Ďalej sa vykonala multicentrická, placebom kontrolovaná štúdia FREEDOM u 7 808 žien po menopauze s T-skóre < -2,5 v oblasti driekovej chrbtice alebo proximálneho femuru a nie < -4,0 v ktorejkoľvek oblasti, ktorej primárnym cieľom bol výskyt nových vertebrálnych zlomenín počas 36 mesiacov. Výsledkom štúdie bolo zníženie relatívneho rizika vzniku novej vertebrálnej fraktúry o 68 %, nevertebrálnej fraktúry o 20 % a fraktúry femuru o 40 %. O kvalite preparátu svedčí skutočnosť, že denosumab má schopnosť zvýšiť kostnú denzitu i v miestach s prevahou kortikálnej kosti.

Preparát denosumab však bude mať význam aj v onkologických indikáciách a v liečbe osteoporózy pri zápalových reumatických chorobách [8].

Strata kostnej hmoty je typickým znakom pre zápalové reumatické choroby, ako je reumatoidná artritída (RA) a psoriatická artritída (PsA), na druhej strane charakteristickým znakom pre spondyloartrópatie najmä ankylozujúcu spondylitídu (u AS je nadmerná tvorba kostnej hmoty). Strata kostnej hmoty pri RA je dôsledok chronického zápalu a môže sa prezentovať systémovou osteoporózou alebo lokalizovanou osteoporózou v podobe tvorby kostných erózií. Osteoklasty sú zodpovedné za vývoj erózií marginálnej kosti, je známe, že funkcia osteoklastov sa aktivuje už v priebehu niekoľkých dní zápalového procesu [9]. Ukázalo sa, že RANKL hrá v etiológii vývoja kostných erózií významnú úlohu. V prácach Redlicha et al, Pettita et al, ako aj Li et al [10–12] sa zistilo u zvieracích modelov experimentálnych artritíd, že ak sa genetickou modifikáciou u týchto modelov nachádzal RANKL, nedošlo k vývoju erózií, napriek tomu, že zápalové zmeny v kĺboch boli prítomné. Ďalšie práce u ľudí ukázali, že pomer

RANKL/OPG signalizuje významnú úlohu pri vývoji zápalu v synoviálnom kĺbe a periartikulárnej kostnej deštrukcii pri RA [13]. Ďalšie štúdie potom ukázali, že v zapálenej synoviálnej membráne sa syntetizuje RANKL hlavne v synoviálnych fibroblastoch a aktivovaných T-bunkách synoviálneho tkaniva [14,15].

Ďalej sa ukázalo, že pri aktívnej forme RA sa nachádzajú vysoké hladiny RANKL v synoviálnom tkanive pri porovnaní s nízkou aktivitou RA. Crotti et al a Haynes et al [16,17] poukázali na vzťah medzi expresiou RANKL a kostnou resorpciou. V ďalších prácach sa postupne potvrdilo, že u pacientov s RA sérová hladina RANKL pozitívne korelovala s cirkulujúcimi markermi kostnej resorpcie a zistila sa inverzná korelácia s poklesom BMD v bedrovom kĺbe. Pomer RANKL : OPG poukazoval na možnosť vývoja deštruktívneho procesu v synoviálnom kĺbe pri RA [18].

Nádorové choroby sú skupinou chorôb, kde sa predpokladá zvýšená účasť RANKL v patogenéze zvýšenej resorpcie kosti spojenej s osteolytickými léziami, ktoré sa klinicky manifestujú silnými bolesťami kostí, hyperkalciémiou, kompresiou alebo patologickými fraktúrami (napr. karcinóm prostaty, prsnej žľazy, pľúc, menej často obličiek, štítnej žľazy a malígnym melanóm). V týchto prípadoch sa tiež zistila zvýšená osteoklastická aktivita. Zvýšenie osteoklastogenézy je sekundárne spojené s uvoľnením početných cytokínov a rastových faktorov vrátane PTH-rP, IL-1, IL-6, IL-11 a TNF- α , čo je spojené s opätovne zvýšenou expresiou RANKL [19]. Ďalej sa zistilo, že niektoré nádorové bunky priamo majú schopnosť sekrécie RANKL [20]. U solídnych nádorov (rakoviny prsníka, pľúc a prostaty) sa zistila vysoká hladina RANKL a OPG u pacientov s metastázami do kostí, tieto výsledky naznačili významnú úlohu RANKL/OPG pri malígnych kostných chorobách [21].

Aspekt významnej úlohy zvýšenej hladiny RANKL sa ukázal tiež pri mnohopočetnom myelóme, deštruktívny účinok ochorenia na kosť je všeobecne známy a je spojený s nadmernou kost-

nou resorpciou, poklesom osteoformácie – tento proces je riadený vysokou aktivitou osteoklastov. V práci Farrugia et al [22] sa jednoznačne potvrdila zvýšená aktivita myelómových buniek spojená so zvýšenou expresivitou RANKL a ich deštručnou aktivitou na kosť. Vyššie uvedené práce jednoznačne potvrdzujú ústrednú úlohu RANKL, ktorá je spojená s prehnanou aktivitou osteoklastov v kostnej resorpcii, a tak sa dotvára patogenéza myelómovej kostnej choroby.

VÝZNAM RANKL PRI ĎALŠÍCH CHOROBÁCH

Úloha RANKL nie je zďaleka vyčerpaná, ďalšie práce poukazujú na skutočnosť, že RANKL/OPG systém môže sa podieľať na kostnej remodelácii napríklad pri hojení zlomenín, aseptickom uvoľnení totálnej náhrady kĺbov – aj v týchto prípadoch môže hrať významnú úlohu aktivácia RANK/RANKL systému. Makrofágy a fibroblasty v periprostetickom tkanive môžu mať na povrchu RANKL [23], napokon je tu možnosť úlohy RANKL pri vývoji cievnych kalcifikácií a tiež kalcifikácií aortálnych chlopní, defektoch mliečnej žľazy a vzácnych genetických chorôb [24,25].

VÝZNAM INHIBÍCIE RANKL

Preparát denosumab pôsobí v celom skelete a má významný vplyv na redukcii výskytu vertebrálnych fraktúr, redukuje výskyt non-vertebrálnych fraktúr, redukuje riziko fraktúr proximálneho femuru, je efektívnejší voči referenčnému bisfosfonátu, má rýchlu odpoveď na liečbu (markery o 1 mesiac BMD v priebehu 6 – 12 mesiacov). Dávkovací režim je vynikajúci raz za 6 mesiacov. Výhodou je aj bezpečnosť dlhodobej liečby [26].

Literatúra

- Lacey DL, Timms E, Tan HL et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93(2): 165–176.
- Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ et al. Localization of RANKL (receptor activator of NFkB ligand)

mRNA and protein in skeletal and extraskelatal tissues. *Bone* 1999; 25(5): 525–534.

- Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A et al. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 2003; 111(8): 1221–1230.
- Hofbauer LC, Shui C, Riggs BL et al. Effects of immunosuppressants on receptor activator of NB-kappaB ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280(1): 334–339.
- Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK et al. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15(6): 457–476.
- Spustová V. RANK/RANKL/OPG – regulácia kostného obratu. *Lek Listy* 2010; 20: 4–5.
- Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS et al. A single-dose placebo-controlled study of AMG-162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2004; 19(7): 1059–1066.
- Anandarajah AP, Schwarz EM, Totterman S et al. The effect of etanercept on osteoclast precursor frequency and enhancing bone marrow oedema in patients with psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67(3): 296–301.
- Schett G, Stolina M, Bolon B et al. Analysis of the kinetics of osteoclastogenesis in arthritic rats. *Arthritis Rheum* 2005; 52(10): 3192–3201.
- Redlich K, Hayer S, Ricci R et al. Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. *J Clin Invest* 2002; 110(10): 1419–1427.
- Pettit AR, Ji H, von Stechow D et al. TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol* 2001; 159(5): 1689–1699.
- Li P, Schwarz EM, O'Keefe RJ et al. RANKL signalling is not required for TNF-alpha-mediated increase in CD11 (hi) osteoclast precursors but is essential for mature osteoclast formation in TNF-alpha-mediated inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res* 2004; 19(2): 207–213.
- Kotake S, Udagawa N, Hakoda M et al. Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2001; 44(5): 1003–1012.
- Gravallese EM, Manning C, Tsay A et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum* 2000; 43(2): 250–258.
- Shigeyama Y, Pap T, Kunzler P et al. Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(11): 2523–2530.
- Crotti T, Smith MD, Weedon H et al. Receptor activator NF-kappaB ligand (RANKL) expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, osteoarthritis and from

normal patients: semiquantitative and quantitative analysis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61(12): 1047–1054.

- Haynes DR, Crotti TN, Loric M et al. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. *Rheumatology* 2001; 40(6): 623–630.
- Geusens PP, Landewé RB, Garnero P et al. The ratio of circulating osteoprotegerin to RANKL in early rheumatoid arthritis predicts later joint destruction. *Arthritis Rheum* 2006; 54(6): 1772–1777.
- Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodelling in health and disease. *Endocr Rev* 2008; 29(2): 155–192.
- Guise TA, Kozlow WM, Heras-Herzig A et al. Molecular mechanisms of breast cancer metastases to bone. *Clin Breast Cancer* 2005; 5 (Suppl 2): S46–S53.
- Mountzios G et al. Abnormal bone remodeling process is due to an imbalance in the receptor activator nuclear factor-kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) axis in patients with solid tumors metastatic to the skeleton. *Acta Oncol* 2007; 45(2): 221–229.
- Farrugia AN, Atkins GJ, To LB et al. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression by human myeloma cells mediates osteoclast formation in vitro and correlates with bone destruction in vivo. *Cancer Res* 2003; 63(17): 5438–5445.
- Looney RJ, Schwarz EM, Boyd A et al. Periprosthetic osteolysis: an immunologist's update. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18(1): 80–87.
- Min H, Morony S, Sarosi I et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med* 2000; 192(4): 463–474.
- Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. CLINICAL Review: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(12): 4514–4521.
- Anandarajah AP, Schwarz EM. Anti-RANKL therapy for inflammatory bone disorders: mechanisms and potential clinical applications. *J Cell Biochem* 2006; 97(2): 226–232.

prof. MUDr. Jozef Rovenský, DrSc., FRCP^{1,2}

MUDr. Pavol Masaryk, CSc.¹

doc. Ing. Stanislava Blažičková, PhD.³

¹Národný ústav reumatických chorôb, Piešťany

²Ústav fyzioterapie v Piešťanoch, Univerzita sv. Cyrila a Metóda v Trnave

³Fakulta verejného zdravotníctva, Trnavská univerzita v Trnave
rovensky.jozef@nurch.sk