

ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY VYBRANÝCH IMUNOSUPRESIV

David Suchý¹, Ilona Komzáková², Milan Grundmann²

¹Oddělení klinické farmakologie, FN Plzeň

²Ústav klinické farmakologie FNŠP a Zdravotně sociální fakulta Ostravské univerzity, Ostrava

Imunosupresivní terapie je stále se rozvíjející kapitolou imunofarmakologie s tendencí k stálému hledání optimální léčebné modality. Používá se heterogenní skupina látek s různým stupněm selektivity. Cílem článku je poskytnout základní charakteristiky některých používaných látek.

Klíčová slova: imunosuprese, transplantace, rejekce, autoimunita, imunosupresní léčba.

BASIC CHARACTERISTICS OF SELECTED IMMUNOSUPPRESSANTS

Immunosuppressive therapy is still developing part of immunopharmacology. Optimum therapeutic modalities are to be sought. Heterogenous group of drugs with different grade of selectivity is used. The goal of this article is provide a basic overview about some of these drugs.

Key words: immunosuppression, transplantation, rejection, autoimmunity, immunosuppressive therapy.

Imunosupresiva jsou chemicky různorodé látky působící na rozdílných stupních rozvoje imunitní reakce, přičemž inhibují účinněji primární než sekundární fáze imunitní odpovědi. Cílem imunosupresivní léčby je zejména přerušování nežádoucí aktivace T a B lymfocytů, které jsou hlavními nositeli imunitní odpovědi na cizí antigeny. Naopak buňky zodpovědné za nespecifickou imunitní odpověď jako polymorfonukleáry, monocyty/makrofágy a NK („natural killer“) buňky by měly být imunosupresí potlačeny co nejméně.

Výrazný rozvoj imunosupresivní terapie je těsně spojen s oborem transplantologie. Imunosupresivní léčba po transplantacích má zpočátku minimalizovat riziko akutní rejekce a následného vulnerabilního období, v pozdějších fázích pak udržovací imunosupresivní léčba působí profylakticky antirejekčně. Imunosupresiva jsou dále používána u poruch imunity způsobených patologickou reaktivitou na vnitřní antigeny, tedy u autoimunitních onemocnění, a u některých závažných projevů alergie. Nezanedbatelné je využití imunosupresiv v hematologické a v kardiologické (sirolimus, abciximab), či široké použití monoklonálních protilátek v diagnostice. Na druhé straně imunosupresivní léčbu provází celé spektrum nežádoucích účinků. Výrazná inhibice T a B lymfocytů je spojena s možným rozvojem virových, mykotických a protozoárních onemocnění a s vyšším výskytem malignit, zejména lymfoproliferací (tzv. toxicita spojená s imunosupresním účinkem). Imunosupresní léčbu provází také celá řada nežádoucích účinků neimunitního původu. Tak například nežádoucí účinky kalcineurinových inhibitorů zahrnují hypertenzi, hyperlipidemii a nefrotoxicitu, společně s kortikosteroidy i diabetogenní účinek, většina antiproliferativních látek je do určité mí-

ry hepatotoxická, podávání rapamycinu vede u 20 % pacientů k trombocytopenii atd.

Imunosupresiva dnes představují dynamicky se rozvíjející heterogenní skupinu léčiv, kde vývoj směřuje k substancím s maximální selektivitou účinku. Ta je někdy vyjadřována indexem imunitní účinnosti (ISE), který vyjadřuje relativní účinnost inhibice T a B lymfocytů v poměru k ovlivnění složek nespecifické imunity.

Kortikosteroidy (CS)

Patří mezi nejméně selektivní imunosupresiva, neboť působí na všechny fáze zánětlivé odpovědi. Cílovými buňkami u účinku CS jsou hlavně pomocné T lymfocyty a buňky monocyto/makrofágového systému. CS zabraňují proliferaci T lymfocytů, produkci cytokinů, snižují expresi adhezivních molekul. Ovlivnění B buněk je zpravidla podstatně menší (1, 2, 23).

Působení CS není ještě zcela objasněno. CS difundují do nitra buněk, kde působí přes cytoplazmatické receptory v cytosolu a vytvářejí kortikoid-receptorové komplexy. Po navázání CS na receptor dochází k difuzi tohoto komplexu do buněčného jádra a vážou se na jadernou DNA, se kterou vytvářejí komplexy zvané glucocorticoid response elements - GREs. Výsledkem této interakce je indukce nebo inhibice genové transkripce interakcí s promotorovou částí cílových genů.

Glukokortikoidy ovlivňují produkci transkripčních faktorů, například nukleárního faktoru κB (NFκB). Ten se váže na regulační jednotky mnoha genů, kódujících geny pro cytokiny, chemokiny, proteiny akutní fáze, leukoadhezivní molekuly a spouští tak jejich transkripci (1, 23).

Následkem blokady těchto faktorů dochází k inhibici produkce řady cytokinů (zejména

IL1, TNF, IL2) a jejich receptorů (IL-2 R). Léčba kortikoidy vede ke snížené akumulaci neutrofilů v místě zánětu, glukokortikoidy snižují uvolňování histaminu a serotoninu z žírných buněk a bazofilních leukocytů. Důsledkem inhibice fosfolipázy A2 a následně produkce prostaglandinů a leukotrienů je výrazný protizánětlivý účinek (1, 2).

Mezi jednotlivými zástupci CS jsou různé rozdíly, liší se vlivem na metabolismus sodíku a draslíku, rozvojem svalové slabosti, účinky na CNS, ovlivněním chuti k jídlu a dalšími.

CS se po perorálním podání rychle vstřebávají, maximální koncentrace v krvi dosahují za jednu hodinu po podání. Po vazbě na albumin se metabolizují v játrech.

Protizánětlivých účinků kortikosteroidů na všechny fáze zánětlivé reakce se mnohostranně využívá v léčbě systémových či orgánových autoimunit, alergických a zánětlivých chorob a v transplantologii, kde jsou k antirejekční a udržovací léčbě. Dávkování CS v transplantologii zpravidla začíná podáním vysokých dávek (500–1 000 mg i. v.) perioperačně, na tuto léčbu postupně navazuje podávání nižších dávek perorálně, nejčastěji prednisonu 50–30 mg denně. Během 3–6 měsíců následuje přechod na udržovací dávky, které se pohybují okolo 10 mg prednisonu denně v jedné ranní dávce, aby nebyl výrazněji narušen normální diurnální rytmus hypotalamo-hypofyzární osy (2, 23).

U systémových autoimunitních onemocnění většinou vystačíme s udržovacími dávkami 5–20 mg/prednisonu (nebo ekvipotentní dávka jiného CS) denně, v případě exacerbace onemocnění se podává pulzní léčba metylprednisonem 500–1 000 mg/den intravenózně.

Používání vyšších dávek spolu s nutností dlouhodobé aplikace vede k častějšímu

rozvoji nežádoucích účinků (žaludeční vředy, hypertenze, poruchy lipidového a glycidového metabolismu, osteoporóza). Některé nežádoucí účinky se mohou objevit již po krátké době podávání. Proto je pro možnost redukce dávky kortikoidu vhodná kombinovaná terapie s dalším imunosupresivem.

Antiproliferativní látky

Azathioprin (AZA) je tiopurinový derivát. Podstatou jeho účinku je ovlivnění funkce B lymfocytů s následnou redukcí produkce γ globulinů a cytokinů. Snižuje citlivost B lymfocytů k signálům z T buněk, omezuje populaci NK buněk a snižuje jejich aktivitu, ovlivňuje i cytotoxicitu závislou na protilátkách (3, 4, 6, 13, 23). Po p. o. podání je velmi rychle resorbován, jeho biologická dostupnost se pohybuje okolo 50 %, distribuce v tkáních je rovnoměrná. V buňkách je přeměňován na 6-merkaptopurin, který proniká velmi rychle buněčnými membránami, a dále je konvertován na 6-thioinosinát a 6-thioimocovou kyselinu. Klíčovým enzymem metabolismu merkaptopurinu je xantinoxidáza. Její inhibice allopurinolem vede k inhibici oxidace s následnou kumulací látky a možností rozvoje nežádoucích účinků (3, 4, 6). Pokud se nelze současněmu podání obou léků vyhnout, je třeba dávku AZA redukovat až o 75 %. Druhou metabolickou cestou je metylace cestou tiopurinmetyltransferázy. Hladina enzymu je determinována geneticky, při vrozené deficienci tohoto enzymu je pacient rovněž ohrožen intoxikací a rozvojem nežádoucích účinků.

V transplantologii je AZA stále častěji nahrazován mykofenolát mofetilem (23), trvá jeho využití v léčbě autoimunitních onemocnění jako systémový lupus, revmatoidní artritida, vaskulitidy, ITP a další.

Akutní toxicita AZA se zpravidla manifestuje nauzeou a zvracením nebo i supresí kostní dřeně. Mezi další nežádoucí účinky patří leukopenie, megaloblastická anémie, zvýšené riziko rozvoje infekčního onemocnění a méně často hepatotoxicita, trombocytopenie, pankreatitida nebo pneumonitida. Emetogenní vliv se manifestuje při vyšších dávkách. Obvyklé dávkování léku je 1,5–2,5 mg/kg/den (3, 4, 6). Později jsou dávky upravovány podle známek myelotoxicity, tak, aby počet leukocytů v periferní krvi neklesl pod hranici 4 000/mm³ (3, 13, 23).

V případě výrazné leukopenie musí být jeho podávání zastaveno.

Cyklofosfamid patří mezi oxazofosforiny, což jsou alkylační látky, které byly připraveny jako netoxické transportní formy alkyllderivátů. Mechanizmem účinku je alkylace DNA v proliferujících, ale i neproliferujících buňkách. Z hlediska ovlivnění buněčného cyklu patří mezi fázově nespecifické látky (3). Tlumí jak

imunitu buněčnou, tak i protilátkovou, ale toxicita je vyšší ve vztahu k B buňkám. Místem jeho aktivace jsou játra. Tam dochází v mikrozomech k přeměně cyklofosfamidů na 4-hydroxycyklofosfamid, jenž se dále přeměňuje na aldofosfamid. Ten je hydroxylován na konečný aktivní produkt fosforamid-N-yperit a vedlejší produkt akrolein. Biologická dostupnost se pohybuje v závislosti na dávce v rozmezí 74–97 %. Po nitrožilním podání dochází k rychlé distribuci do tkání, biologický poločas se udává 0,5–8,5 hod. Rychlost metabolismu cyklofosfamidů může být ovlivněna stimulací nebo inhibicí mikrozomálních enzymů. Cyklofosfamid je substrátem enzymu CYP 2C19 a CYP 3A4. Mateřská látka i metabolit jsou vylučovány ledvinami (3, 4, 5).

Cyklofosfamid je ve větších dávkách užíván k supresi lymfoidní složky imunity u pacientů indikovaných k transplantaci kostní dřeně, v malých dávkách je používán v terapii revmatických chorob, vaskulitid a ITP.

Z nežádoucích účinků jsou nejvýznamnější pancytopenie, kardiotoxicita a hemoragická cystitida (akrolein). Dávkování se liší podle indikace a podle kombinace, ve které je cyklofosfamid použit. Nízké dávky 100–200 mg denně per os se používají v léčbě chronické lymfatické leukemie (3). V dávkách 2 mg/kg hmotnosti perorálně je běžnou součástí léčebného režimu u systémového lupusu a vaskulitid nebo je použit formou pulzu 1× měsíčně. V předtransplantačních režimech se používají vysoké dávky 1,5–2 g/m² denně spolu s mesnou k prevenci urotoxicity (4, 13).

Metotrexát (MTX) a jeho metabolity kompetitivně inhibují enzym dihydrofolátreduktázu. To vede k nedostatku redukováného folátu a tím i k inhibici proliferace buněk. Metotrexát snižuje produkci řady cytokinů, zejména IL1, TNF α , IL6 a IL8.

Biologická dostupnost MTX po p. o. podání je okolo 65 %. Je nerozpustný v tucích a k průchodu biologickými membránami potřebuje přenašeč. Aktivně je transportován do buněk, kde vytváří polyglutamáty, které jsou silnými inhibitory dihydrofolátreduktázy. V játrech je MTX oxidován na 7-hydroxymetotrexát a na různé, biologicky málo aktivní pteridiny. Vylučuje se ledvinami, asi 6 % se vyloučí játry. V ledvinách je vylučován glomerulární filtrací i tubulární sekrecí. Ve vysokých dávkách je používán k chemoterapii nádorů, v nízkých dávkách k terapii revmatických onemocnění a těžších forem psoriázy. V revmatologii byla účinnost MTX potvrzena řadou prospektivních studií, účinná se jeví i kombinace s ostatními antirevmatiky (sulfasalazin, zlato) (3, 7).

Podávání vysokých dávek MTX (> 1–33 g/m²) může být spojeno s rizikem akutní blokády re-

nálních tubulů. Mezi další toxické účinky léku patří kožní změny, mukozitidy a hepatitida. Z hematologických změn se někdy objevuje leukopenie, trombocytopenie a megaloblastická anémie. Plicní toxicita metotrexátu je nezávislá na dávce, může vést ke vzniku tzv. metotrexátové plicce s teplotami, dušností, kašlem a postižením plicního intersticia. Po vysazení léku často dochází ke spontánní regresi až úplné úpravě změn (3).

Mezi látky, které mohou zvyšovat toxicitu MTXu, patří salicyláty a ostatní nesteroidní antirevmatika, která se silně vážají na plazmatické proteiny, především albumin, a vytěsňují z této vazby MTX.

Dávkování: průměrná dávka v parenterálním podání je 20–50 mg/m², střední dávka je 500 mg až 1 g/m² a vysoká 1–10 g/m² týdně (3, 4, 7).

Mykofenolát mofetil (MMF) je ester kyseliny mykofenolové syntetizovaný s cílem zvýšit biologickou dostupnost kyseliny mykofenolové (MPA), která je vlastní účinnou látkou. Základem jeho účinku je narušení syntézy nukleotidů cestou inhibice enzymu inosinmonofosfát dehydrogenázy (IMDPH), který facilituje konverzi inosinmonofosfátu (IMP) na xantozinmonofosfát. Inhibice IMP dehydrogenázy vede k depleci guanidinových nukleotidů a tím i k potlačení syntézy DNA. Primárně dochází k ovlivnění lymfoidní řady, která je závislá na de novo syntéze purinů. Mykofenolát mofetil stejně jako AZA potlačuje proliferaci lymfocytů a tvorbu protilátek B buňkami, jeho efekt ve srovnání s AZA je více specifický (8, 10, 23). Dalším důsledkem inhibice IMDPH je inhibice glykosylace proteinů adhezivních molekul s následným omezením kumulace lymfocytů a monocytů v místě zánětu či ve tkáni postižené rejekcí. Prokázán byl i antiproliferativní efekt MMF na fibroblasty, endoteliální buňky a buňky hladkého svalstva (10).

Po perorálním i parenterálním podání je MMF rychle a kompletně metabolizován jaterními esterázami na aktivní metabolit MPA s dvojrucholovým průběhem křivky plazmatických koncentrací. MPA podléhá následně v játrech glukuronidaci za vzniku farmakologicky inaktivního MPAG. Ten je po vyloučení do žluče rozložen a uvolněná MPA opět neabsorbována (enterohepatální oběh). Poločas MMF je asi 18 hodin (8, 23).

MMF je v transplantologii standardně používán k profylaxi a terapii rejekce transplantovaných tkání. U pacientů po transplantaci ledvin snižuje terapie mykofenolátem během prvního roku po transplantaci incidenci akutních rejekcí o 50–60 %, zlepšuje krátkodobou i dlouhodobou funkci transplantovaných orgánů a snižuje mortalitu nemocných. MMF je účinnější v profylaxi akutních rejekcí než AZA

u nemocných po transplantaci jater, srdce, nebo kombinované transplantaci ledvin, pankreatu a plic (8, 9, 23).

MMF byl dále využit s různým úspěchem v léčbě celé řady onemocnění. MMF například signifikantně zlepšoval klinické i laboratorní parametry pacientů s revmatoidní artritidou, špatně reagující na konvenční chorobu modifikující léky (9, 10). Podání MMF je účinné v léčbě nefritidy provázející systémový lupus erythematosus i v léčbě těžkých forem vaskulitid. K dispozici jsou i nejednoznačné údaje o použití MMF v léčbě Crohnovy choroby a psoriázy (9).

Podává se 1–1,5 g 2× denně, úvodní dávku se doporučuje podat co nejdříve po transplantaci, dávkování se neřídí plazmatickými koncentracemi, ale nežádoucími účinky (5, 7, 9). Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří gastrointestinální projevy – nejčastěji se manifestují jako průjemy, nauzea, zvracení. Myelotoxicita je srovnatelná s AZA, je popisován vyšší výskyt oportunních infekcí. MMF není na rozdíl od AZA hepatotoxický, v porovnání s CNI není neurotoxický ani neurotoxicý. Současné podávání MMF s cyklosporinem nebo tacrolimem neovlivňuje plazmatické koncentrace těchto CNI. Při současné léčbě MMF s cyklosporinem koncentrace MPA klesá (20).

Kalcineurinové inhibitory

Cyklosporin A (CsA) cyklický peptid, izolovaný z vláken houby *Tolypocladium inflatum* Gams. CsA má téměř selektivní účinek na T lymfocyty. Spolu s takrolimem patří do skupiny tzv. kalcineurinových inhibitorů (CNI) (11). CsA specificky interaguje s cytoplazmatickým proteinem cyklofilinem. Komplex cyklosporin-cyklofilin pak inhibuje fosfatázu kalcineurin a následně dochází k zablokování defosforylace a transportu nukleárního faktoru aktivovaných T lymfocytů (NFAT) do jádra. Tímto je znemožněna tvorba cytokinů pomocnými T buňkami, které jsou nezbytné pro aktivaci cytotoxických T lymfocytů a jejich následnou diferenciaci. Z tohoto pohledu se jedná zejména o IL-2 a interferon γ (4, 6, 11). Inhibice produkce IL-4 a IL-5 ovlivní funkce i v dalších buněčných populacích. Chemotaktická a fagocytární aktivita neutrofilů není CsA ovlivněna. Z pohledu nežádoucích účinků CsA je důležitá jeho schopnost indukovat produkci TGF- β stimulujícího fibroblasty (16).

CsA je možno aplikovat v perorální i parenterální formě, intravenózní aplikace je vyhrazena zejména k zahájení imunosupresivní léčby. Pro farmakokinetiku p. o. podaného cyklosporinu je charakteristická výrazná variabilita biologické dostupnosti, která se pohybuje v průměru okolo 30 %. Přítomnost potravy ovlivňuje biologickou dostupnost CsA. Jako lipofilní látka je cyklospo-

rin metabolizován v játrech enzymem CYP 3A4. Celkově je dnes známo asi 30 metabolitů cyklosporinu. Za nejvýznamnější jsou z pohledu toxicity a klinického účinku považovány metabolity AM1, AM4N a AM9 (14). Koncentrace metabolitu AM1 v některých případech přesahuje i několikanásobně koncentraci cyklosporinu A (12, 14).

Uvedení CsA na trh v roce 1983 umožnilo obrovský rozmach transplantací medicíny daný výrazným zvýšením účinnosti imunosupresivní terapie. Použití CsA v transplantologii dalo možnost rozvoje srdečních a jaterních transplantací a transplantací plic, které byly v předcyklosporinové éře spíše raritními výkony (6, 11). Zlepšování výsledků orgánových transplantací navíc souviselo i s výrazným snížením výskytu oportunních infekcí a jaterních selhání při použití CsA v kombinované imunosupresivní léčbě. Současně s použitím v transplantologii došlo k pokusům klinicky užít CsA i v léčbě autoimunitních onemocnění. V současné době existuje řada randomizovaných klinických studií dokumentujících jeho použití u psoriázy, revmatoidní artritidy, polymyozitidy a nefritidy při systémovém lupusu (11). Ve fázi klinického zkoušení je účinek CsA na celou řadu dalších onemocnění.

Dávkování cyklosporinu se liší podle indikace. V transplantologii jsou iniciálně podávány dávky okolo 8–10 mg/kg/den s postupným snižováním na 5 mg/kg/den.

Častou komplikací léčby CsA je hypertenze. Objevuje se až u 90 % transplantovaných pacientů. Charakteristický je zvýšený tonus sympatiku a absence nočního poklesu tlaku. Dochází k potenciaci vazokonstrikčního účinku endotelinu 1, v patogenezi hypertenze se uplatňují i snížená syntéza NO, zvýšená produkce tromboxanu a další mechanismy (15, 19). CsA je zejména ve vyšších dávkách nefrotoxický, může vyvolat léze tubulů a při delším podávání hyalinozu arteriol a fibrotické změny v intersticiu. Chronické fibrotické změny se dávají do souvislosti se schopností CsA indukovat tvorbu TGF β s následnou stimulací fibroblastů (16, 17). V souvislosti s toxickým efektem CsA na renální tubuly může dojít k hyperkalémii, hypofosfatémii a hyperurikémii. Cyklosporin signifikantně zvyšuje hladiny celkového cholesterolu a LDL cholesterolu. Mezi metabolické poruchy související s léčbou se řadí poruchy metabolismu glukózy. Z dostupných údajů vyplývá, že výskyt diabetu u nemocných po orgánových transplantacích nepřesahuje 15 %. U pacientů léčených nízkými dávkami se diabetes nevyskytuje (11).

Při jeho užívání se může objevit žaludeční dyskomfort, nauzea, zvracení, hyperplazie dásní, hirsutismus, edémy a další nežádoucí účinky (6, 11, 13).

Jelikož je jaterní metabolismus cyklosporinu A závislý převážně na cytochromu 3A4, je zde nebezpečí lékových interakcí s dalšími látkami, které jsou substráty, induktory či inhibitory CYP 3A4 či event. P glykoproteinu (18). Běžně používané léky, jako erytromycin, ketokonazol, diltiazem a cimetidin mohou výrazně zvýšit plazmatické hladiny CsA. Obdobný efekt vykazuje konzumace grapefruitového džusu. Naopak rifampicin, fenytoin nebo fenobarbital hladiny CsA snižují. Aditivní nefrotoxický efekt se může uplatnit při současném podání cyklosporinu a aminoglykosidů, amfotericinu B, trimetoprim-sulfometaxazolu a nesteroidních antirevmatik. Vzhledem k výrazné variabilitě ve farmakokinetice cyklosporinu je monitorování jeho plazmatických hladin nutností. Vzhledem k malé korelaci hodnot údobních koncentrací (C_0) s AUC se dnes doporučuje měření jeho koncentrace za dvě hodiny po podání (C_2). K stanovení CsA z plné krve je k dispozici několik analytických metod, nej přesnější je stále vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) (11, 14).

Takrolimus (FK 506) podobně jako CyA patří mezi látky s vazbou na imunofilyny. V cytoplazmě buněk obsazuje specifický receptor, v tomto případě na tzv. FK binding protein (FKBP-12, makrofilin). Komplex takrolimus-FKBP-12 se váže na kalcineurin a inhibicí této kinázy brání aktivaci transkripčních faktorů. V důsledku toho nedochází v T buňce k produkci cytokinů, jako např. IL-2, IL-4, interferonu γ a destičkového růstového faktoru (13, 20). Se širším působením takrolimu na molekulární úrovni souvisí i jeho až 100 násobně vyšší účinnost v porovnání s CsA. Takrolimus je do jisté míry schopen potlačovat produkci postrtransplantačních protilátek proti HLA i non HLA antigenům, na rozdíl od cyklosporinu vykazuje výrazný inhibiční účinek na produkci IL-10. Potlačení exprese IL-10 může takrolimus inhibovat infiltraci cytotoxických buněk do štěpu a omezuje tak poškození těchto tkání (20).

Maximální plazmatické koncentrace takrolimu je dosaženo v průměru po třech hodinách po podání, ustáleného stavu zpravidla do tří dnů. Lék se významně váže na erythrocyty, v plazmě je 99 % vázáno na plazmatické proteiny. Takrolimus je široce distribuován, metabolizován je převážně v játrech, hodnoty eliminačního poločasu jsou variabilní.

Imunosuprese takrolimem je spojena s nižším počtem akutních rejekcí a menším počtem těžkých rejekčních epizod v porovnání s terapií CsA, nižší potřebou adjuvantní imunosuprese a celkově lepší prognózou přežívání štěpu. Takrolimus lze podávat parenterálně nebo perorálně. Dávka se pohybuje mezi 25

až 300 µg/kg/den, v závislosti na způsobu aplikace (13, 23).

Spektrum nežádoucích účinků takrolimu a cyklosporinu se částečně překrývá. Několik prospektivních, randomizovaných studií přineslo důkazy o signifikantně nižším účinku FK 506 na výšku krevního tlaku. Obdobně z pohledu ovlivnění lipidového spektra se léčba takrolimem jeví jako výhodnější, neboť v porovnání s CsA méně zvyšuje hodnoty celkového, LDL cholesterolu a triglyceridů, neovlivňuje HDL cholesterol. Rozdílný účinek CsA a takrolimu na hladiny transformujícího růstového faktoru β (TGF β) je zřejmě vysvětlením jak jeho nižší nefrotoxicity, tak obecně nižší schopnosti indukovat fibrotické změny orgánů a arteriosklerózu (17, 20). Takrolimus na rozdíl od cyklosporinu nezvyšuje hladiny TGF, navíc tlumí transdukcii signálu přes receptor pro TGF β typu 1 (20).

Plazmatické hladiny takrolimu zvyšují látky s inhibičním vlivem na izoenzym CYP 3A4 a ev. intestinální P-glykoprotein. Jedná se o azolová antimykotika, nifedipin, makrolidy, grapefruitový džus. Plazmatické hladiny takrolimu zvyšuje dle dostupné literatury i chloramfenikol. Současné podání cyklosporinu A je kontraindikováno vzhledem k synergickému účinku ve smyslu nefrotoxicity. Stejně riziko hrozí při současném podání aminoglykosidů, vankomycinu či amfotericinu B a nesteroidních antirevmatik (21). Obdobně jako v případě CsA je terapeutické monitorování hladin léčiva z plné krve nutností. Měření údolních (C₀) hladin v tomto případě poskytuje věrohodný marker systémové expozice takrolimem.

Inhibitory mTOR

Sirolimus (rapamycin) je makrolidové antibiotikum, zástupce nové skupiny inhibitorů mTOR – mammalian target of rapamycin (23, 24). Jeho molekula se po průniku do cytoplazmy váže na stejný receptor jako FK 506, tedy na makrofilin. Dále je jeho účinek složitější než v případě takrolimu. Sirolimus působí v pozdější fázi imunitního procesu, blokuje proliferaci lymfocytů indukovanou IL-2. Dochází ke zpomalení až zastavení přechodu buněk z G1 do S fáze buněčného cyklu (23, 24). Sirolimus se po p. o. podání rychle absorbuje, maximální koncentrace u pacientů se stabilizovanou funkcí ledvinového štěpu dosahuje po dvou hodinách. Ustálených plazmatických koncentrací je dosaženo v průměru za 5 až 7 dnů. Lék je metabolizován O-demetylací a hydroxylací enzymem CYP 3A4 a je i substrátem P-glykoproteinu (20, 23).

Sirolimem lze nahradit cyklosporin u pacientů s exacerbací cyklosporinové toxicity. Protože sirolimus a CsA působí v různé fázi aktivace T buněk, jsou jejich účinky syner-

gické a v kombinaci je tedy možno použít významně menších dávek obou léků. Obdobně experimentováno i s použitím kombinace sirolimu- takrolimu. V současné době některé práce popisují příznivý účinek této kombinace na funkci štěpu ledvin u transplantovaných pacientů. Sirolimus je indikován k prevenci rejekce u dospělých nemocných se středním až nízkým rizikem po transplantaci ledviny (13, 23). Doporučuje se jeho podání v kombinaci s CsA a kortikoidy. V současné době jsou navíc k dispozici i výsledky studií, hodnotících použití stentů pokrytých sirolimem v kontextu koronárních intervencí. Dosud jsou známy výsledky studie FIM a RAVEL, kde RAPA vedl k úplnému potlačení vzniku koronární restenózy i ve skupině diabetiků (25).

Metabolismus sirolimu inhibuje cestou enzymu CYP 3A4 CsA. Z této skutečnosti vychází doporučené dávkování sirolimu čtyři hodiny po CsA. Zpomalení metabolismu dilatazemem a ketokonazolem vyžaduje redukcii dávek sirolimu. Naopak induktory CYP 3A4 urychlují jeho metabolismus a vedou k poklesu plazmatických hladin (třezalka tečkovaná, fenytoin, rifampicin).

Sirolimus není na rozdíl od kalcineurinových inhibitorů neurotoický. Nejčastější popisovaný nežádoucí účinek léčby je porucha metabolismu lipidů, způsobená zvýšením koncentrace inhibitoru lipoproteinové lipázy. Poruchou metabolismu lipoproteinů je postiženo až 40 % pacientů léčených sirolimem. Z dosavadních klinických zkušeností vyplývá, že výskyt infekčních komplikací je v porovnání s cyklosporinem vyšší. Poměrně časté a závažné (> 20 % léčených) jsou trombocytopenie a lymfopenie, není přítomen významnější diabetogenní účinek (23).

Dávkování RAPA je závislé na indikaci, skupině nemocných a konkomitantní imunosupresní terapii. U pacientů léčených souběžně sirolimem a cyklosporinem se doporučuje udržovat plazmatická hladina léčiva v rozmezí 4–12 µg/ml, po přerušení terapie cyklosporinem je nová cílová koncentrace sirolimu 12–20 µg/ml. V případě kombinace s takrolimem se terapeutická koncentrace sirolimu pohybuje mezi 5–10 µg/ml a koncentrace tacrolimu 10–15 µg/ml (15). Terapeutické monitorování sirolimu v plné krvi je realizováno metodou HPLC.

Mezi další inhibitory mTOR patří everolimus, jenž byl vyvinut s cílem zlepšit farmakokinetické vlastnosti molekuly RAPA. Mechanismus účinku zůstává stejný, úpravy molekuly vedly k zvýšení biologické dostupnosti po p. o. podání. Perorálně podaný everolimus je rychle absorbován a dosahuje maximální plazmatické koncentrace zhruba za 1,5 hodiny. Ustálených plazmatických koncentrací je dosaženo za 7 dní. Everoli-

mus podléhá jaternímu metabolismu cestou CYP3A4, CYP3A5 a CYP 2C8, je substrátem P glykoproteinu. S ohledem na úzké terapeutické rozmezí je monitorování plazmatické koncentrace léčiva nutností. Z dostupných údajů vyplývá, že everolimus má nižší nefrotoxicitu v porovnání s cyklosporinem. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří hyperlipidémie, vznik oportunních infekcí, trombocytopenie (22). Monoklonální protilátky proti T lymfocytům.

Myší protilátky proti CD3 znakům na T lymfocytech jsou používány k léčbě a profylaxi akutních rejekcí. Monoklonální protilátky jsou produktem tzv. hybridomů. Jedná se o populaci buněk vznikající fúzí B lymfocytu a myelomové buňky. Po spojení vzniká hybridní buňka schopná produkovat identické molekuly specifického imunoglobulinu. Rozmnožením této buňky vznikne klon buněk, tzv. hybridom.

Muromonab-CD3 je první terapeuticky používanou monoklonální protilátkou – je používán v klinické praxi již od roku 1987. Jedná se o myší monoklonální protilátku zaměřenou proti diferenciálním znakům lidských T lymfocytů. Protilátka je biochemicky purifikovaný IgG2 imunoglobulin, složený ze dvou řetězců o různé molekulové hmotnosti, který se váže na vnitřní podjednotku CD3 receptoru na povrchu T lymfocytu (TCR) a brání tak navázání buněk předkládajících antigen. Dochází k opsonizaci T buněk a jejich odstranění cestou retikuloendoteliálního systému. Výsledkem je modifikace imunitní odpovědi s poklesem zralých T lymfocytů (CD3 +) i lymfocytů pomocných (CD4+) a cytotoxických (CD8+). CD3 lymfocyty úplně vymizí a objevují se až během týdne po ukončení terapie (23, 26). Muromonab-CD3 je používán při léčbě akutních rejekčních reakcí, které jsou rezistentní na kortikosteroidy nebo profylakticky u nemocných, kteří jsou ve vysokém riziku vzniku rejekce po transplantaci.

Lék vyvolává tvorbu protilátek, přičemž průměrná doba do objevení protilátek je 18–22 dnů, v malém procentu případů i dříve (časné IgG protilátky). Mezi nejvýznamnější nežádoucí účinky se řadí cytokinový syndrom, který je způsoben nadměrným množstvím cytokinů (IL2, TNF α , IFN γ) z rozpadlých lymfocytů, který se projevuje horečkou, třesavkou, dušností, nauzeou, zvracením, průjmem. K reakci zpravidla dochází do šesti hodin od podání injekce a je možno ji zabránit preventivním podáním kortikosteroidů (metylprednisolon 2 $\times$ 250 mg), antihistaminik a antipyretik. Jako rizikové pro vznik cytokinového syndromu jsou považováni pacienti s nestabilní AP nebo krátce po prodělaném IM, s CHOPN, cerebrovaskulárním poškozením a epilepsií (26, 27). Vážnou komplikací léčby je vznik plicního edému, zejména u hyperhydratovaných pacientů.

U pacientů léčených touto anti-CD3 protilátkou bylo pozorováno riziko oportunních infekcí (především cytomegalovirových) a rozvoje nádorových onemocnění, zejména lymfoproliferativních. Podává se 10 dávek po 5 mg přsně i. v., v případě profylaktického užívání jsou účinné i dávky nižší (27).

Monoklonální protilátky proti receptoru pro interleukin-2 (anti-IL2-R).

Jedná se o další generaci monoklonálních protilátek proti receptoru pro interleukin 2, který je kompletně exprimován pouze na aktivovaných T lymfocytech. Na klidových T lymfocytech je receptor pro IL-2 tvořen dvěma řetězci β a γ . Po aktivaci lymfocytů se rychle dotváří další glykoproteinový řetězec označovaný α (CD-25). Celý komplex pak s vysokou afinitou váže IL-2 a následně stimuluje proliferaci T lymfocytů. Jelikož receptor IL-2 není přítomen na klidových buňkách, ale pouze na buňkách aktivovaných, je dosaženo specifitějšího účinku, na rozdíl od anti-CD 3 protilátek, které mají depleční účinek na všechny T lymfocyty (23, 27). Speciálními technologiemi byly vyvinuty chimerické a humanizované protilátky anti-IL2-R. Na rozdíl od anti-CD3 protilátek nevyvolávají tvorbu protilátek a mají minimum nežádoucích účinků (23, 26, 27). Pro profylaxi akutních rejekcí, zejména u transplantací ledviny, byly schváleny basiliximab a daclizumab.

Basiliximab je chimerní monoklonální imunoglobulin, produkovaný rekombinantní DNA technologií, s humánním konstantním fragmentem a myšími variabilními fragmenty. Lidského původu je 75 % protilátky, 25 % myšího. Protilátka je cílena proti alfa řetězci receptoru pro interleukin 2, který se objevuje na povrchu T lymfocytů po jejich aktivaci antigenem. Blokáda receptoru pro IL-2 následně vede k inhibici proliferace T lymfocytů. Blokáda je zachována po dobu 2–4 týdnů. Přípravek je podáván parenterálně, distribuce do jednotlivých tělesných kompartmentů nebyla detailně prozkoumána (23, 26, 27). Indikací je profylaxe akutní rejekce v indukčních režimech u nemocných po transplantaci ledviny v kombinaci s cyklosporinem a kortikoidy. Basiliximab v prvních šesti měsících po transplantaci ledviny snižuje incidenci akutních rejekcí asi na 34 %. Jednoroční přežívání nemocných a štěpů však léčbou basiliximabem ovlivněno nebylo. Po podání basiliximabu nevyvolává příznaky cytokinového syndromu, nebyl zaznamenán zvýšený výskyt infekcí ani lymfoproliferativních onemocnění. Nejsou uváděny ani žádné lékové interakce (23, 26).

Doporučený dávkovací režim jsou dvě dávky po 20 mg před a čtvrtý den po transplantaci.

Obdobnou látkou z hlediska mechanismu účinku je daclizumab. V jeho případě je protilátka z 90 % tvořena lidským IgG₁, myší část představuje pouze 10 % imunoglobulinu, které tvoří jeho variabilní oblast.

Daclizumab je obdobně jako basiliximab indikován v indukčních režimech. V prvních šesti měsících po transplantaci ledviny snižuje incidenci akutních rejekcí na 28 % resp. na 22 % v závislosti na použité kombinaci ostatních imunosupresiv (CS, CsA nebo CS, CsA, AZA). Při trojkombinaci s MMF se procento akutních rejekcí pohybovalo okolo 12 % (23).

Dávkování je oproti basiliximabu jiné, neboť daclizumab má nižší afinitu k CD-25. Podává se k formou krátkodobé infuze v dávce 1 mg/kg v pěti dávkách po 14denních intervalech (27).

V provedených klinických studiích přípravek nezvyšoval incidenci závažných nežádoucích příhod v porovnání s placebem.

Vzhledem k nejasnému vztahu mezi dávkou a účinkem těchto léků nejsou hladiny daclizumabu ani basiliximabu měřeny.

Alemtuzumab

Je nekonjugovaná, humanizovaná monoklonální protilátka proti antigenu CD52, který je přítomen na povrchu T a B lymfocytů, eosinofilních granulocytů, monocytů a makrofágů (28, 29). Není však přítomen na hematopoetických kmenových buňkách. Po vazbě na buňky exprimující antigen CD 52 dochází k cytolyze buněk a jejich následné apoptóze. Farmakokinetické parametry se liší podle cesty podání. Po i. v. podání byla maximální plazmatická koncentrace (C max) i plocha pod křivkou (AUC) úměrná podané dávce. Plazmatický poločas eliminace byl přibližně 12 dnů. V klinických studiích u nemocných s chronickou B-lymfatickou leukémií (B-CLL), která recidivovala po předchozí léčbě, došlo po nitrožilním podání alemtuzumabu v dávce 30 mg/den třikrát týdně po dobu 12 týdnů v 21–59 % případů k celkové nebo parciální terapeutické odpovědi (28, 29). V kombinaci s fludarabinem došlo k léčebné odpovědi ve více než 80 % případů. Alemtuzumab je používán rovněž jako součást předtransplantační přípravy před transplantací kmenových buněk krvetvorby (BSCT).

Nežádoucí účinky zahrnují iniciální chřipkovité příznaky, které jsou často pozorovány po první infuzi. Tyto lze zvládat premedikací perorálním antihistaminikem a paracetamolem. Kortikosteroidy lze použít k prevenci i léčbě těžkých příhod spojených s podáváním alemtuzumabu. Ke snížení nebezpečí těžkých oportunních infekcí je třeba podávat profylaktickou protinfekční léčbu. Léčba alemtuzumabem se musí v případě těžké infekce dočasně přerušit (29).

Anti TNF alfa monoklonální protilátky

V praxi se nyní začalo široce využívat specifických monoklonálních protilátek proti TNF alfa, jednomu z hlavních prozánětlivých cytokinů.

Monoklonální protilátka infliximab proti TNF alfa (chimerická protilátka která obsahuje 75 % lidského a 25 % myšího proteinu) byla prvním klinicky hodnoceným typem. Léčba infliximabem se osvědčila u pacientů s revmatoidní artritidou (studie ATTRACT) v kombinaci s metotrexátem (31). Výhodou je rychlý a klinicky promptní účinek této kombinace. Infliximab je u těchto pacientů indikován k redukci symptomatologie onemocnění, jestliže odpověď na předchozí léčbu choroby modifikujícími léky není dostatečná. Z pohledu dalšího rozvoje onemocnění je zásadní ovlivnění progresu rtg změn. Infliximab je dále indikován i k léčbě pacientů s ankylozující spondylitidou se závažnými axiálními symptomy, kteří nereagují na konvenční terapii (32).

Zavedení terapie infliximabem do léčby Crohnovy choroby znamenalo výrazný pokrok, ačkoliv blokáda TNF postihuje pouze jeden z faktorů zodpovědných za vznik zánětu (30). Například nemocní s Crohnovou chorobou a s tzv. fenotypem ulcerózní kolitidy (tzn. pozitivitou P-ANCA protilátek) reagují na terapii podstatně hůře (30). Dávkování u revmatoidní artritidy 3 mg/kg ve formě intravenózní infuze v trvání dvou hodin, následováno podáním téže infuze 2. a 6. týden po první infuzi, dále pak každý osmý týden. V léčbě ankylozující spondylitidy je schéma obdobné, jednotlivá dávka je vyšší: 5 mg/kg (32). V terapii Crohnovy choroby je podávána dávka 5 mg/kg, u reagujících pacientů 5 mg/kg 2., 6. týden a pak každý 8. týden, u nereagujících se další podávání nedoporučuje (30).

V současné době je vyvinuta a klinickým zkoušením i nadále prochází i plně humánní monoklonální protilátka D2E7 (adalimumab), schválená pouze k léčbě revmatoidní artritidy. Podává se 40 mg s. c každých 14 dní, souběžná komedikace metotrexátem není nutná (33).

Effekt na symptomatologii onemocnění a rtg progresi revmatoidní artritidy je podobný jako v případě infliximabu.

Jinou cestou blokády TNF je jeho neutralizace solubilním receptorem. Etanercept je takový geneticky manipulovaný solubilní receptor pro TNF alfa. Jedná se o molekulu, která obsahuje dvě extracelulární domény TNF receptoru (TNF-R p75), připojené na Fc část lidského Ig1 (34). Ve dvou multicentrických, placebem kontrolovaných studiích byla prokázána klinická účinnost etanerceptu u refrakterní revmatoidní artritidy, výborný efekt byl dokumentován i v léčbě ankylozující spondylitidy (35).

Etanercept je podáván subkutánně v dávce 25 mg 2x týdně.

Obě zmíněné látky mohou indukovat vznik protilátek proti DNA, indukce systémového lupusu je popisována jen v ojedinělých případech. V případě infliximabu dochází po opakovaném podání k tvorbě lidských protichimrických protilátek, které mohou vyvolávat alergicko-toxické projevy nebo snižovat účinnost léčby. Jako kontraindikace podání infliximabu jsou uváděny závažné infekce jako sepse, abscesy a oportunní infekty (30, 31, 32). Proto je třeba před léčbou u pacientů podrobně monitorovat infekce včetně tuberkulózy. U všech pacientů se doporučuje před zahájením léčby provedení screeningového vyšetření na TBC. U inaktivní formy tuberkulózy je třeba před zahájením léčby infliximabem začít profylaktickou antituberkulózní terapií.

Imunoglobuliny

Jedná se o polyklonální, polyspecifické imunoglobulinové preparáty, používané především k intravenózní substituční terapii u hypogamaglobulinémií.

Aplikace vysokých dávek imunoglobulinů je jednou z alternativ léčby systémových chorob pojiva (systémový lupus, dermatomyozitis, myasthenia gravis, vaskulitidy). Léčba byla úspěšná u idiopatické trombocytopenie u dětí a Kawasakiho choroby. Mechanismus účinku není přesně znám, teoreticky se uplatňuje řada možností. Předpokládá se vazba imunoglobulinů G Fc částí na vazebná místa, resp. Fc receptory (FcR γ) na povrchu leukocytů. Signál z obsazeného FcR γ vede k útlumu činnosti B lymfocytů a inhibici aktivace komplementu. Podává se vysoká dávka γ globulinu: 600–800 mg/kg a den po dobu pěti dnů. Pokud je efekt přechodný, dávka se opakuje za 3–4 týdny. Když nedojde ani po této dávce k terapeutickému úspěchu, není další cyklus léčby léčba indikován (5).

Literatura

1. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cuups TR, Balow JE. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Int Med* 1993; 119: 1198–1208.
2. Barnes PJ, Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroid: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14: 436–441.
3. Kleiner P. Protinádorová chemoterapie. 1.vyd. Praha: Galen 1996.
4. Bartůňková J. Současné možnosti léčebných zásahů do poruch imunity. *Remedia* 1998; 1: 31–37.
5. Lukáš M. Současné možnosti medikamentózní léčby idiopatických střežních zánětů. *Remedia* 1994; 5: 302–313.
6. Špinarová L, Toman J. Pharmacotherapy after heart transplantation. *CorVasa* 2000; 42: 335–340.
7. Pavelka K. Současné postavení metotrexátu v léčbě revmatoidní artritidy. *Čes revmatol* 1995; 3: 16–23.
8. Lipsky JJ. Mycophenolate mofetil. *Lancet* 1996; 348: 1357–1359.
9. Quiroz Y, Herrera-Acosta J, Johnson RJ, Rodríguez-Iturbe B. Mycophenolatemofetil treatment in conditions different from organ transplantation. *Transplant Proceed* 2002; 34(7): 2523–2526.
10. Goldblum R. Therapy of rheumatoid arthritis with mycophenolate mofetil. *Clin Exp Rheumatol* 1993; 11 (Suppl 8): p. S17.
11. Fahr A. Cyclosporin clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 1993; 24/6: 472–495.
12. Martinek V, Matoušovič K, Špatenka J. Objev a využití cyklosporinu v klinické praxi. *Praktický lékař* 2002; 1: 14–20.
13. Reidlichová M, Šenková A, Druga B, Kryštůfek P. Standardná farmakoterapia a liečba komplikácií u pacientov po transplantácii pľúc. *Klin Farmakol Farm* 2003; 17: 177–182.
14. Komzáková I, a kol. Terapeutické monitorování cyklosporinu A. *Čes. slov. Farm.* 2002; 51/4: 159–167.
15. Špinarová L. Hypertenze po transplantaci srdce. *Vnitř Lék.* 1999; 45: 95 55–8.
16. Ficková D, Vlček J, Topinková E. Role P-glykoproteinového transportu v klinicky významných lékových interakcích. *Remedia* 2002; 3: 207–213.
17. Bordur WA, Noble NA. TGF- β in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int.* 1997; 51: 1388–1396.
18. Olyaei AJ, de Maltos AM, Bennet WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: New insight and preventive strategies. *Curr Opin Crit Care* 2001; 7: 384.
19. Mange KC, Cizman B, Joffe M, et al. Arterial hypertension and renal allograft survival. *JAMA* 2000; 283: 633.
20. Maes BD, Vanrenterghem YFCH. Cyclosporine: advantages versus disadvantages vis-à-vis tacrolimus. *Trans Proceed* 2004; 36 (suppl.1): S40–49.
21. Christians U, Jacobsen W, Benet LZ, Lampen A. Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with tacrolimus. *Clin Pharmacokinet.* 2002; 41 (11): 813–851.
22. Kirchner GL, Meier-Wiedebach I, Manns MP. Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clin Pharmacokinet.* 2004; 43 (2): 83–95.
23. Třeška V. Transplantologie pro mediky. Praha: Karolinum 2002.
24. Girman P, Saudek F. Sirolimus (rapamycin) *Remedia* 2002; 5: 290–300.
25. Sousa JE, Costa MA, Abizaid AC, et al. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents. One year angiographic and ultrasound follow up. *Circulation* 2001; 104: 2007–2101.
26. Berard JL, Velez RL, Freeman RB, Tsunoda SM. A review of interleukin-2 receptor antagonists in solid organ transplantation. *Pharmacotherapy* 1999; 19/10: 1127–1137.
27. Breedveld FC. Therapeutic monoclonal antibodies. *Lancet* 2000; 355: 735–740.
28. Xia MQ, Hale G, Walkman H. Efficient complement mediated lysis of cells containing the CAMPATH-1(Cdw 52) antigen. *Mol Immunol* 1993; 30: 1089–1096.
29. Ilex pharmaceuticals. Campath (alemtuzumab) package insert. San Antonio (TX): Ilex Pharmaceuticals, 2002; Jan.
30. Lukáš M. Anticytokinová terapie Crohnovy nemoci a ulcerózní kolitidy. *Remedia* 2000; 5: 331–339.
31. Maini R, et al. Infliximab (chimeric anti tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomized phase III trial. *Lancet* 1999; 354: 1932–1939.
32. Braun J, Brand J, Listing J, et al. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: A randomised, controlled multicenter study. *Lancet*; 2002; 359: 1187–1193.
33. Salfeld J, et al. Generation of fully human anti TNF antibody D2E7. *Arthritis Rheum* 1998; 41(suppl.9): S57.
34. Fox DA. Cytokine blockade as a New Strategy to Treat Rheumatoid Arthritis. Inhibition of Tumor Necrosis Factor. *Arch Intern Med.* 2000; 160: 437–444.
35. Gorman JO, Sachs KE, Davis JE, et al. Treatment of AS by inhibiting TNF α . *Eng J Med.* 2002; 346: 1349–1355.