



# Entdeckung neuer Immunsuppressiva mittels Lymphozytenkultur

Bernhard Ryffel, Gaetane Woerly, Gabriele Hofmann, Jacqueline Arnold, Brigitte Greiner und Brian M.J. Foxwell

Sandoz Pharma AG, 4002 Basel und Sunley Research Center, London

## Zusammenfassung

Die medikamentöse Hemmung einer Immunantwort hat die Organtransplantation in der Klinik ermöglicht. Bei der immunologischen Abstossungsreaktion stehen aktivierte Lymphozyten im Vordergrund. Einfache in vitro-Testmodelle zur Erfassung von chemischen oder biologischen Substanzen stehen zur Verfügung, welche die immunologische Aktivierung von Lymphozyten hemmen. Lymphozyten werden aus menschlichem Blut gewonnen und in Mikrokulturen mit Mitogenen stimuliert. Diese in vitro-Systeme gestatten die Erfassung hemmender Effekt von Wirkstoffen auf die Proliferation von Lymphozyten, Transkription (Boten RNS) und Expression lymphozytenspezifischer Proteine. Diese Technik gestattete die Identifizierung neuartiger Immunsuppressiva mit verschiedenen Angriffspunkten: Cyclosporin und FK 506, welche die Transkription von Lymphokin-Genen hemmen, sowie Rapamycin, das die Transduktion des mitogenen Lymphokin-Signals hemmt.

## Summary: Discovery of novel immunosuppressants in vitro

Treatment with immunosuppressants has opened today's possibilities of clinical organ transplantation. Allograft rejection is mainly mediated by activated lymphocytes. Simple in vitro models are available to detect new drugs with immunosuppressant activity. Peripheral blood lymphocytes are activated by antigens or mitogens and cultured in the presence or absence of test compounds. The endpoints of these cultures include cell proliferation, gene activation (mRNA) and protein expression. These methods allow the identification of novel immunosuppressants, and the determination of the mode of action, eg. inhibitors of transcription, (cyclosporine and FK 506) or inhibitors of lymphokine signal transduction (rapamycin).

## Einleitung

Der Ersatz eines irreversibel geschädigten Organes wurde durch grosse Fortschritte in der Transplantationschirurgie ermöglicht. Die erfolgreiche Transplantation war jedoch regelmässig gefolgt von einer immunologischen Abstossung. Die Wechselbeziehung zwischen Fremdorgan und körpereigenem Immunsystem ist in Abb. 1 dargestellt: Vereinfacht kann eine afferente Phase (Erkennung des Alloantigens), eine zentrale Phase (Differenzierung und Reifung immunkompetenter Zellen) sowie eine efferente

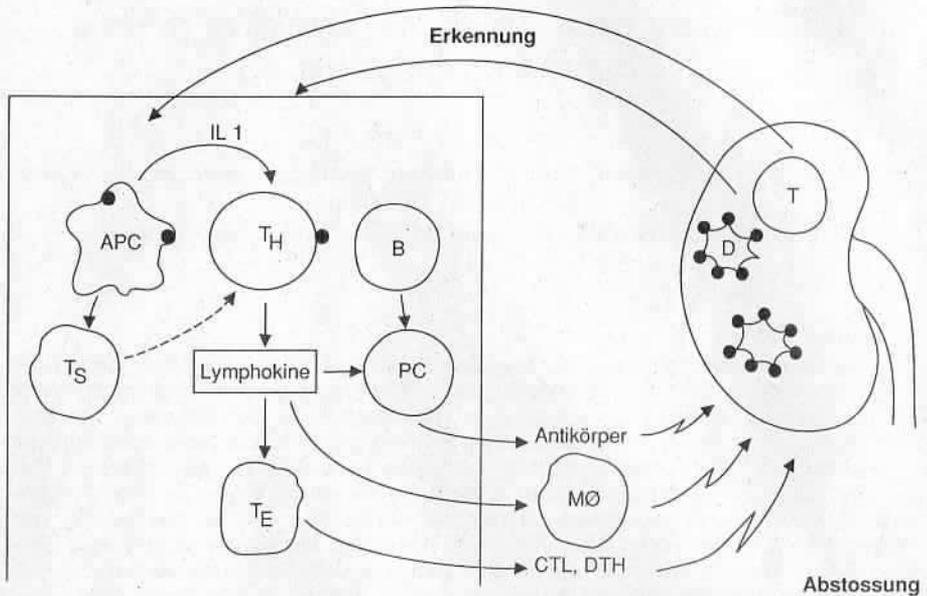


Abb. 1 Zelluläre Ereignisse des Immunsystems, die zur Abstoßungsreaktion führen (D = dendritische Zelle, TH = T-Helfer-Zelle, TS = T-Suppressor-Zelle, APC = antigenpräsentierende Zelle, B bzw. PC = B-Lymphozyten bzw. Plasmazelle, TE = T-Effektor-Zelle, MØ = Makrophag)

Phase (Effektorphase der Abstoßung) unterschieden werden. Die genetische Differenz zwischen Spender und Empfänger führt zur Immunreaktion des Empfängers. Auf den dendritischen Zellen exprimierte Fremdantigene aktivieren Makrophagen (APC) und T-Helfer-Lymphozyten (TH), die eine Reihe von Lymphokinen, speziell den T-Zell Wachstumsfaktor Interleukin 2 freisetzen. Diese Faktoren führen zur Proliferation antigenreaktiver Zellen, Differenzierung und Reifung von Effektorzellen. Humorale (Antikörper) und zelluläre Mechanismen, speziell zytotoxische T-Zellen und aktivierte Makrophagen führen zur immunologischen Abstoßungsreaktion. Mit der Entwicklung von immunsuppressiven Medikamenten sind in den letzten Jahren grosse Erfolge im Bereich der Transplantation zu verzeichnen.

Die ersten immunsuppressiven Wirkstoffe umfassten die Purinanaloge Azathioprin und 6-Mercaptopurin, sowie Glukokortikosteroide. Die Entdeckung von Cyclosporin (Sandimmun) ermöglichte neue Anwendungen in der Organtransplantation, spez. auch Leber-, Herz- und Lungen-Transplantation.

## Entdeckung von Cyclosporin

Cyclosporin wurde im Rahmen eines allgemeinen immunologischen Screenings entdeckt (1). Es handelt sich um ein niedermolekulares, zyklisches Peptid, das aus elf Aminosäuren besteht (Abb. 2). J.F Borel charakterisierte die immunsuppressiven Eigenschaften von Cyclosporin in

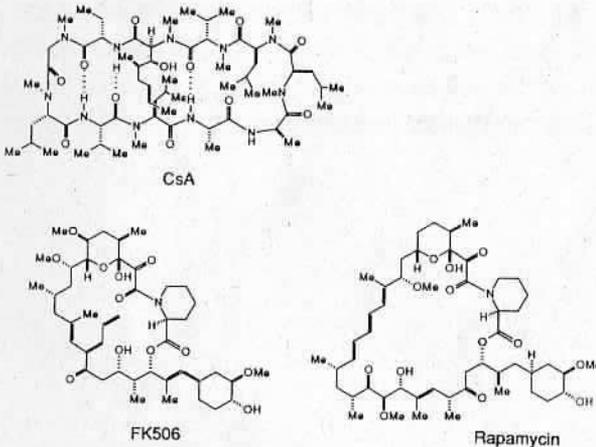


Abb. 2 Struktur von Cyclosporin (CsA), und der Makrolide FK 506 sowie Rapamycin.

zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Modellen (2,3). Neben der grossen Bedeutung von Cyclosporin in der klinischen Organtransplantation hat dieses Peptid viel zum Verständnis der T-Lymphozytenaktivierung beigetragen. Stimulation von Lymphozyten am T-Zellrezeptor führt zur Synthese von Interleukin2 und Expression dessen Rezeptors an der Zelloberfläche. Interleukin2, welches an den Rezeptor bindet, stellt das mitogene Signal dar, das zur Proliferation des antigenreaktiven Zellklons führt.

Das *in vitro*-Testmodell der Zellaktivierung ist einfach: Lymphozyten werden aus dem menschlichen Blut gewonnen und in Mikrokulturen mit verschiedenen Liganden (Antigen, Antikörper gegen den T-Zellrezeptor, Mitogene) stimuliert. Der Effekt eines Wirkstoffes wird anhand der Veränderung von verschiedenen Messgrössen erfasst: Hemmung der Zellvermehrung, der Transkription von Boten-RNS oder der Expression von lymphozytenspezifischen Proteinen. Cyclosporin hemmt die Zellproliferation nach Stimulation dosisabhängig. Diese Hemmung ist reversibel; ein

toxischer Effekt wird erst im 10  $\mu$ M Bereich beobachtet (4). Der Effekt von Cyclosporin auf die Expression von Interleukin2 und dessen Rezeptor wurden eingehend untersucht. Cyclosporin hemmt die Interleukin2-Synthese im 1-10 nM Bereich (Abb.3A). Die Hemmung der Interleukin2-Synthese erfolgt auf der Ebene der Transkription der Boten-RNS (Abb.3B; 5,6). Aufgrund der Tatsache, dass exogenes Interleukin2 die Cyclosporinbedingte Hemmung der Zellvermehrung nicht vollständig aufheben kann, muss angenommen werden, dass auch die Bildung des Rezeptors beeinträchtigt ist. Wir konnten in unserem Labor zeigen, dass Cyclosporin in der Tat die Expression der beiden Interleukin2-Rezeptorproteine im ähnlichen

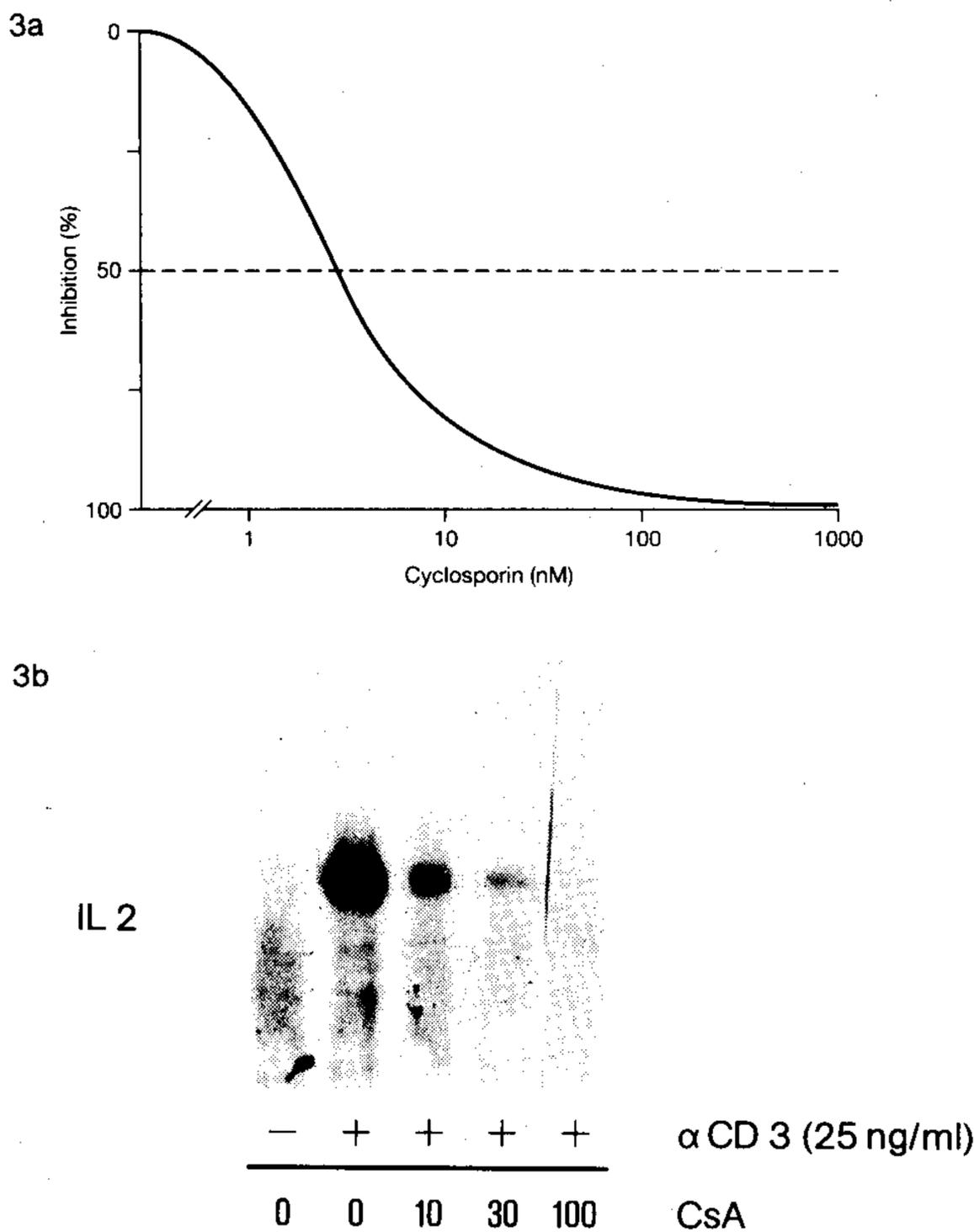


Abb. 3 Effekt von Cyclosporin auf die Interleukin2-Synthese an mitogen stimulierten menschlichen Blut-Lymphozyten (Stimulation mit anti-CD3 Antikörper):

3a): Interleukin2-Freisetzung im zellfreien Ueberstand, gemessen mit biologischem Assay (Proliferation von HT2 Zellen)

3b): Hemmung der Boten-RNS (Northern Blot, Hybridisation mit IL-2 Probe).

Neben diesen Effekten auf die Transkription von Interleukin2 und dessen Rezeptor hemmt Cyclosporin die Expression einer Reihe anderer Cytokine und Rezeptorproteine (3,5,7).

### Weitere Transkriptionshemmer

Die Mechanismen, die zur spezifischen Hemmung der Transkription von Interleukin2 führen, werden von verschiedenen Gruppen intensiv untersucht. Es scheint, dass Cyclosporin die Bildung von nuklearen Faktoren, die für die Regulation der Interleukin2-Genexpression notwendig sind, hemmt (8). Ein weiterer Pilzextrakt mit Makrolidstruktur, FK 506 (Abb.2), hemmt in ähnlicher Weise die Transkription von Interleukin2 (9,17).

Das strukturverwandte Rapamycin hat dagegen keinen Effekt auf die Transkription von Interleukin2, hemmt dagegen das Interleukin2-abhängige Wachstum (9).

Die Tatsache, dass Cyclosporine und FK 506 die Interleukin2-Transkription hemmen, stellte uns vor die Frage, ob beide Immunsuppressiva über den gleichen Rezeptor wirken.

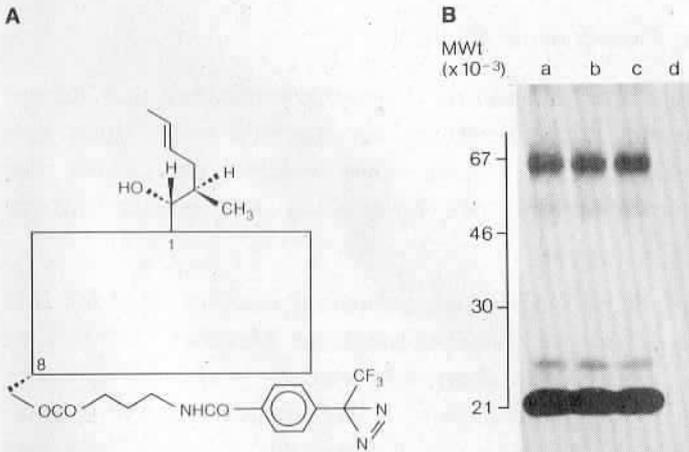


Abb. 4 Photoaffinitätsmarkierung von zellulären Proteinen.

A: Struktur des Photoaffinitätsderivats von Cyclosporin.

B: Photoaffinitätsmarkierung von humanen Lymphozyten mit  $1 \mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -CS-Derivat. Inkubation in Abwesenheit (a) oder in Anwesenheit von  $10$  oder  $100 \mu\text{M}$  FK 506 (b,e) oder  $10 \mu\text{M}$  Cyclosporin (d).



## *Rezeptorproteine, Screening von Strukturanalogen*

Aufgrund von Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Derivat wird Cyclosporin intrazellulär konzentriert (10). Für diese intrazelluläre Anreicherung von Cyclosporin wurde das 18 kD Protein Cyclophilin identifiziert (11). Zur weiteren Charakterisierung der Bindungsproteine verwenden wir derzeit ein photoaktiv markiertes Cyclosporin-Derivat (Abb. 4A). Die kovalent gebundenen und markierten zellulären Rezeptorproteine werden mit Gel-Elektrophorese aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Nebst Cyclophilin (Abb. 4B) binden noch weitere hochmolekulare Proteine spezifisch Cyclosporin, deren Bedeutung heute nur teilweise bekannt ist (14,15). Im weiteren konnten wir zeigen, dass FK 506 die Photomarkierung von Cyclosporin nicht hemmt. Neuere Untersuchungen aus anderen Labors zeigten, dass FK 506 an ein 12 kD Protein, das sogenannte FK Bindungsprotein bindet (12). Interessanterweise wurde für die beiden Bindungsproteine Cyclophilin und FKBP eine gleichartige enzymatische Aktivität gefunden; beide Proteine sind sogenannte cis-/trans-Isomerasen, welche die korrekte Faltung von Proteinen bewirken. Beide Immunosuppressiva hemmen diese Eigenschaft.

## *Vom therapeutischen Prinzip in die Klinik*

Die dargestellten in vitro-Testsysteme - Lymphozytenkultur und Rezeptorassay - gestatten ein breites Screening zur Auswahl von Strukturanalogen und/oder neuartigen Substanzen. Dies bedeutet eine starke Reduktion von Tierversuchen bei der Entdeckung von neuen Immunsuppressiva.

Diese neuen Heilmittel müssen jedoch unbedingt auch in vivo auf ihre Wirksamkeit an verschiedenen tierexperimentellen Modellen; z.B. Organtransplantation an der Ratte, überprüft werden. Auf die in vivo-Pharmakologiestudien folgen zusätzliche Sicherheitsprüfungen mit chronischer Substanzabgabe. Im Falle von Cyclosporin ergaben diese tierexperimentellen Befunde frühzeitig Hinweise auf die substanzbedingte Einschränkung der Nierenfunktion (18,19).



Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass in vitro-Zellkultursysteme einen wesentlichen Beitrag bei der Entdeckung und zum Verständnis von neuartigen Wirksubstanzen zukommt. In vitro-Befunde müssen jedoch von in vivo-Modellen zur Prüfung der Wirksamkeit und der allgemeinen Verträglichkeit vor der klinischen Anwendung gefolgt werden.

### *Literatur*

1. Borel, J.F., Feurer, C., Gubler, H., Stähelin, H.: Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 1976; 6:468-475.
2. Borel, J.F.: Cyclosporin. *Prog. Allergy* 1986; 38:1-474.
3. Borel, J.F.: Pharmacology of cyclosporin (Sandimmune). *Pharmacol. Reviews* 1989; 41:239-434.
4. Ryffel, B., Foxwell, B., Gee, A., Greiner, B., Woerly, G., Mihatsch, M.J.: Cyclosporin - relationship of side effects to mode of action. *Transplantation* 1988; 46:90S-96S.
5. Foxwell, B., Ryffel, B.: The mechanism of action of cyclosporin. *Cardiology Clinics* 1990; 8:107-117.
6. Foxwell, B., Simon, J., Herrero, J.J., Taylor, D., Woerly, G., Cantrell, D., Ryffel, B.: Anti-CD3 antibody-induced expression of both p55 and p75 chains of the high affinity interleukin-2 receptor on human T lymphocytes is inhibited by cyclosporin A. *Immunology* 1990; 69:104-109.
7. Foxwell, B., Woerly, G., Ryffel, B.: Inhibition of Interleukin 4 receptor expression on human lymphoid cells by cyclosporin. *Eur.J.Immunol.* 1990; 20:1185-1188.
8. Crabtree, G.R.: Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 1989; 243:355-361.
9. Bierer, B.E., Somers, P.K., Wandless, T.J., Burakoff, S.J., Schreiber, S.L.: Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK 506 or rapamycin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1990; 87:9231-9235
10. Ryffel, B., Goetz, U., Heuberger, B.: Cyclosporin receptors on human lymphocytes. *J.Immunol.* 1982; 129:1978-1982.
11. Handschumacher, R., Harding, M., Rice, J., Drugge, R.: Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin. *A. Science* 1984; 226:544-547.
12. Harding, M., Galat, A., Uehling, D., Schreiber, S.: A receptor for the immunosuppressant FK 506 is a cis-trans peptidyl-p prolyl isomerase. *Nature* 1989; 341:758-760.



13. Fischer, G., Wittman-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., Schmid, F.X.: Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* 1989; 336:476-478.
14. Ryffel, B., Woerly, G., Greiner, B., Haendler, B., Mihatsch, M.J., Foxwell, B.M.J.: Distribution of the cyclosporin binding protein cyclophilin in human tissues. *Immunology* 1990; 72:399-404.
15. Foxwell, B., Hiestand, P., Wenger, R., Ryffel, B.: A comparison of cyclosporin binding by cyclophilin and calmodulin and the identification of an novel 45 kD cyclosporin-binding phosphoprotein in Jurkat cells. *Transplantation* 1988; 46:355-405.
16. Foxwell, B., Mackie, A., Ling, V., Ryffel, B.: Identification of the multi-drug resistance related P-glycoprotein as a cyclosporin binding protein. *Mol.Pharmacol.* 1989; 36:543-546.
17. Schreiber, S.L.: Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 1991; 251:283-287.
18. Ryffel, B., Donatsch, P., Madörin, M., Matter, B.E., Rüttimann, G., Schön, H., Stoll, R., Wilson, J.: Toxicological evaluation of cyclosporin A. *Arch.Toxicol.* 1983; 53:107-141.
19. Mihatsch, M.J., Ryffel, B., Gudat, F., Thiel, G.: Cyclosporin nephropathy. *Renal Pathology* (ed. C.C. Tisher and B.M. Brenner) 1988; 2:1555-1586.
20. Ryffel, B.: Cellular activation: Regulation of intracellular events by cyclosporin. *Pharmacol. Reviews* 1989; 41:407-422.

... UND JETZT FRAU KÜMMERLIS  
KOPF AUF DR. KRACHERS  
KÖRPER MIT MEINEN  
P. BEINEN !!

