

# Využití

---

**monoklonálních protilátek v praxi**

---

- 
- B – lymfocyty diferenciace B lymfocytů a tvorba protilátek
  - Základní poznatky o MP
  - Současné možnosti využití MP –  
transplantace, alergie, autoimunita, infekční onemocnění
  - Nádorová onemocnění a léčba MP

## • Základní poznatky o MP

---

- Polykl. Ab x Monokl. Ab (Mabs)
- se tvoří v průběhu imunitních odpovědí jsou tvořeny početnými B lymfocyty, tvorba heterogenních protilátek různých tříd a podtříd namířené proti různým antigenním determinantám
- Jsou produktem jediného klonu B lymfocytů, naprosto homogenní a reagují proti stejným antigenním determinantám
- Laboratoř – antiséra, heterogenita-komplikace pro imunochem.testy – nízkoafinitní Ab, zkřížená reaktivita

# Protilátková imunita

---

- **Diferenciace B lymfocytů a tvorba protilátek**
- vyvíjejí z kmenových buněk v kostní dřeni.
- vývoje je několikastupňový proces
- tři fáze: **1.** vyžívání B lymfocytu v kostní dřeni **2.** cirkulace B lymfocytů lymfatickými tkáněmi, dokud se nesečkají s antigenním podmětém **3. terminální fáze** - diferenciace v plazmatické buňky produkující protilátky, paměťová buňka- zajišťuje rychlou sekundární odpověď na opětovné setkání s antigenem.
- **Mechanismy působení protilátek**
- Neutralizace mikroorganismů, opsonizace-označení pro fagocyty, aktivace kl. cesty komplementu – opět opsonizace a rozvoj zánětlivé reakce s následnou lyzí buňky.

## B – LYMFOCYTY

**Vývoj:** v kostní dřeni, charakteristický znak při dozrávání je proces přeskupování Ig genů.

**Vyvíjí se:** 1. podle genetické informace 2. v integraci s dalšími regulačními faktory (nutná je přítomnost stromálních buněk) 3. později vlivem vnějších Ag podnětů

**hlavním úkolem je:** produkce rozpustných protilátek-Ig (**s charakteristickou strukturou vazebného místa a s charakteristickou specifitou pro Ag-unikátní Ig**), představuje řadu zrácích stadií

**další charakteristické molekuly:** CD19, CD20, CD22, CD 32, CD 40, CD 81, MHC II atd.

## Rozlišujeme:

1. nezralé membránový IgM
2. zralé **naivní buňky** membránový **IgM, IgD** v membráně
3. zralé **plazmatické buňky** rozpustné nebo povrchové Ig
4. zralé **paměťové B** sekrece jen rozpustné Ig,
5. B2, B1buňky

**Cirkulace:** zralé **naivní** - k. dřeň, sek. lymfatické orgány (slezina a lymfatické uzliny, mandle), setkání s Ag se a reakce spec. receptorem –proliferace, diferenciaci, **plaz. B** a **paměť. B.**

Nutná účast Th lymfocytů

1. proces dozrávání afinity
2. přepínání syntézy Ab z jedné třídy do druhé
3. vznik plazmatických a paměťových buněk

# MAbs v klinické praxi

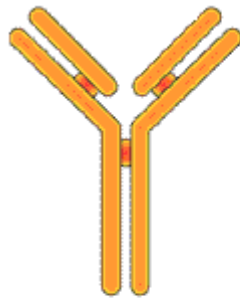
---

- Přesně mířené proti povrchovým či membránovým molekulám a antigenům
- Samostatná nebo kombinovaná léčba
- Transplantace, alergie, infekce, autoimunita, nádorová onemocnění
  
- První MAb schválena 2002
- Dnes schváleno přes 20 produktů
- Přes 200 MAbs v klinických studiích

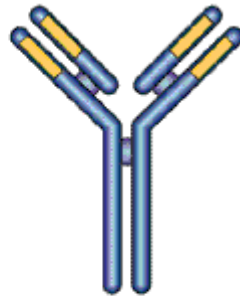
# Humanizace protilátek

---

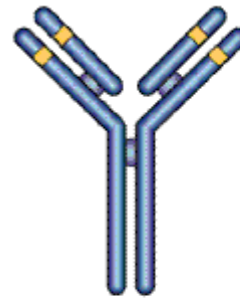
- Komplikace – tvorba anti-myších protilátek
- Tvorba rekombinantních MAbs



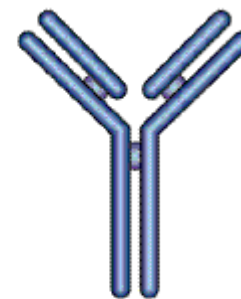
Myší



Chimérická  
myší - lidská



Humanizovaná  
myší - lidská



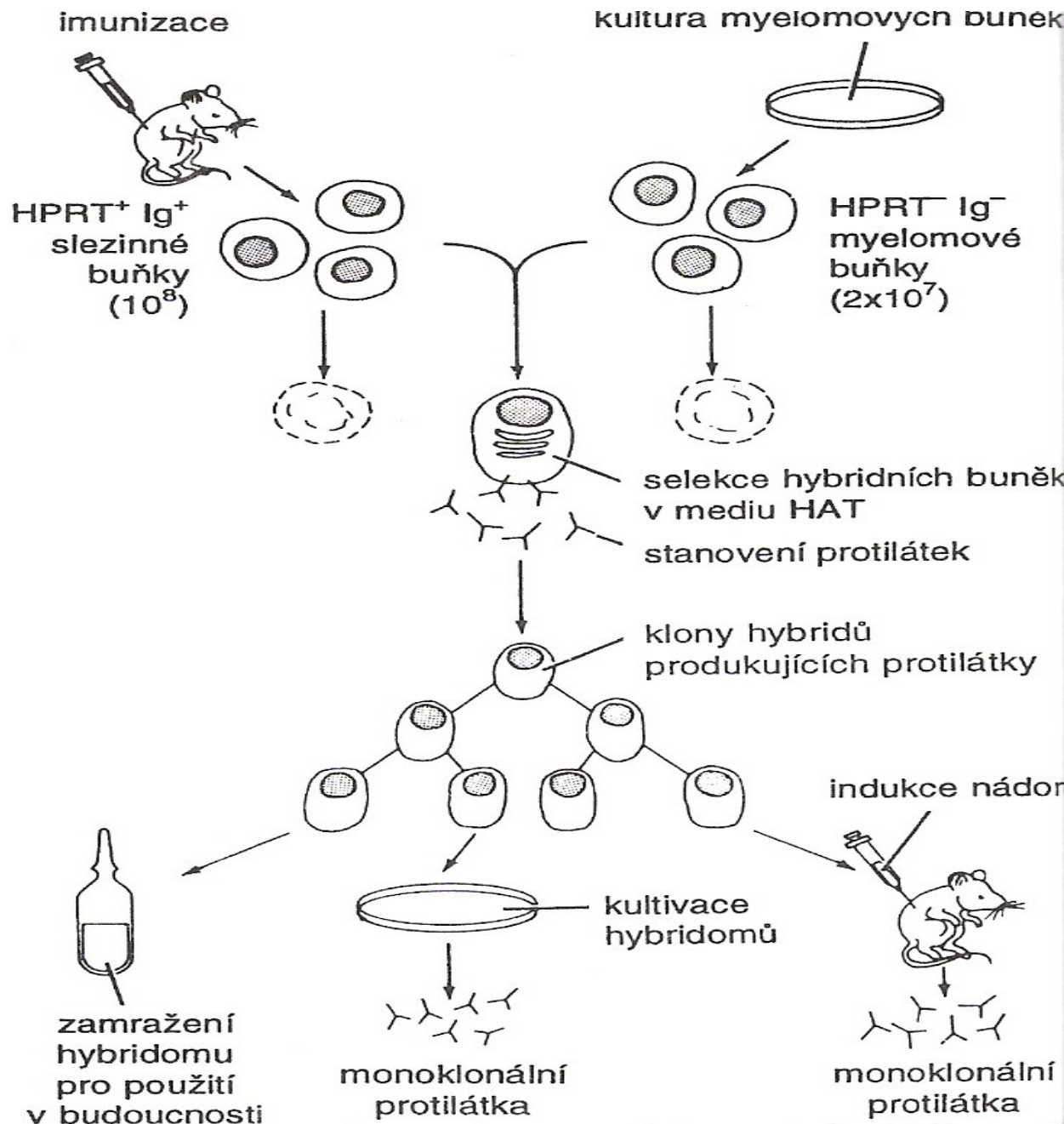
Plně lidská



# Monoklonální protilátky (MAbs)

---

- Produkt jediného klonu B lymfocytů
- Objev MAbs – Milstein & Köhler (1975)
- 1984 Nobelova cena, tzv. hybridomová technologii přípravy MAbs, při které dochází k fúzi B lymfocytů, získaných z myši imunizovaných vyžadovaným antigenem s nádorovými buňkami.
- Hybridomová technologie přípravy MAbs
  - myší lymfocyty imunizované antigenem
  - + nádorové buňky
  - > HYBRIDOM produkující MAbs



Vlastnosti: Hypoxan  
tin phosphoribozyl  
transferáza-, Ig-

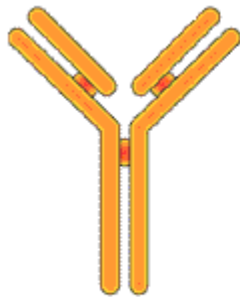
Proces  
hybridizace:

1. fúze – fúzogeny  
(inakt. Virus,  
PEG)
2. Tři linie buněk,  
Hybridní buňky
3. Médium HAT  
(hypoxantin,  
aminopterin-  
(inhibice  
syntézy purinů  
a pyrimidinů),  
thymidin)
4. Vyšetření na  
tvorbu Ab
5. zamražení

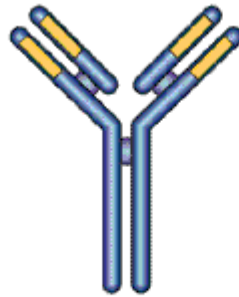
# Humanizace protilátek

---

- Tímto způsobem - získání myších Ab
- V lidském organismu – tvorba anti-myších protilátek
- Tvorba rekombinantních MAbs

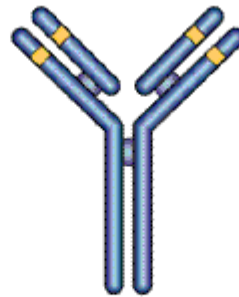


Myší



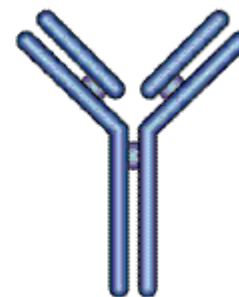
Chimérická  
myší - lidská

**70%-  
lidská  
složka**



Humanizovaná  
myší - lidská

**90%-  
lidská  
složka**



Plně lidská

# Tvorba rekombinantních Mabs

- Tvorba do 3 týdnů HAMA Ab
- Znemožňují vazbu na Ag, anafylaxe, sérová nemoc

## Humanizace Ab-propojení hybridomové a rekombinantní technologie

1. Získání myší Ab pomocí hybridomové teorie
2. Příprava RNA z hybridomové linie
3. Z ní reverzní transkripcí cDNA
4. Pomocí PCR amplifikace úseků genů myšího Ig, které kódují hypervariabilní domény CDR
5. Náhrada CDR lidského Ig
6. Vložení genů kódující humanizovanou Mab do savčí buňky, ve které jsou syntetizovány

# MAbs v klinické praxi

---

- Přesně mířené proti povrchovým či membránovým molekulám a antigenům, zasahují do transdukčních kaskád
- Samostatná nebo kombinovaná léčba (imunosupresiva)
- Transplantace, alergie, infekce, autoimunita, nádorová onemocnění
- První MAb schválena 2002
- Dnes schváleno přes 20 produktů
- Přes 200 MAbs v klinických studiích

# Transplantace

---

- Léčba akutních rejekcí
- ***Muromonab – CD3 (Orthoclone OKT3)***
  - myší MAb proti CD3 znaku T lymfocytů
  - 20% redukce počtu cirkulujících T lymfocytů
- ***Daclizumab (Zenapax®)***  
***Basiliximab (Simulect®)***
  - chimérizované MAbs proti receptoru pro IL-2 na aktivovaných T lymfocytů

# Alergie

---

- Cíl – produkty alergické reakce (IgE, IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$ )
- ***Omalizumab (Xolair<sup>®</sup>)***
  - humanizovaná MAb proti doméně IgE, která není schopna vazby na B lymfocyty a inhibuje tvorbu nových IgE
  - brání degranulaci efektorových buněk a uvolňování mediátorů alergické reakce, snižuje aktivaci zánětlivých buněk
  - léčba astmatu, která odolává kortikosteroidům

# Autoimunitní onemocnění

---

- ***Adalimumab*** (Humira®)
- ***Infliximab*** (Remicade®)
  - MAbs proti TNF- $\alpha$ , vazba na membránový receptor nebo na jeho molekulu
  - léčba revmatoidní artritidy, Crohnovy choroby
- ***Natalizumab*** (Tysabri®)
  - MAb proti  $\alpha$ 4-integrinu (inhibice migrace leukocytů do CNS i do střeva) v léčbě roztroušené sklerózy mozkomíšní (rozpad myelinových pochev obalující nervová vlákna),
  - studie na léčbu Crohnovy choroby



# Infekční onemocnění

---

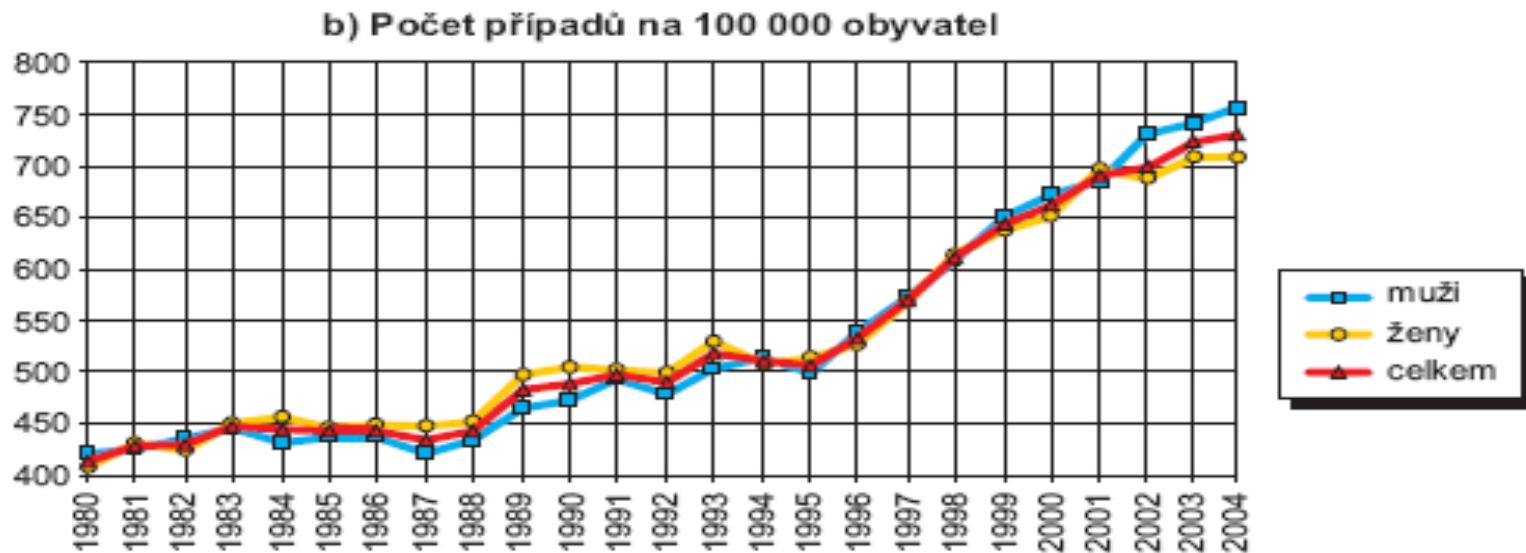
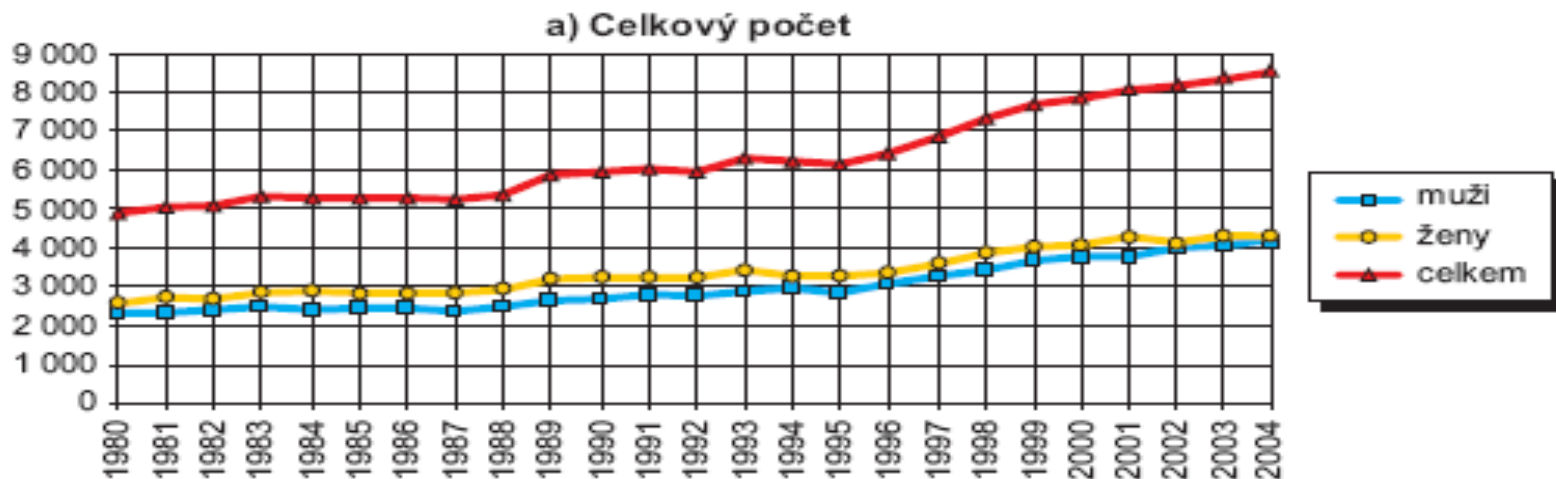
## ***Pavilizumab (Synagis®)***

- léčba respiračního syncytiálního viru
- humánní MAb proti F proteinu, který kóduje splývání membrány viru a vnímavé buňky

### Klinické studie

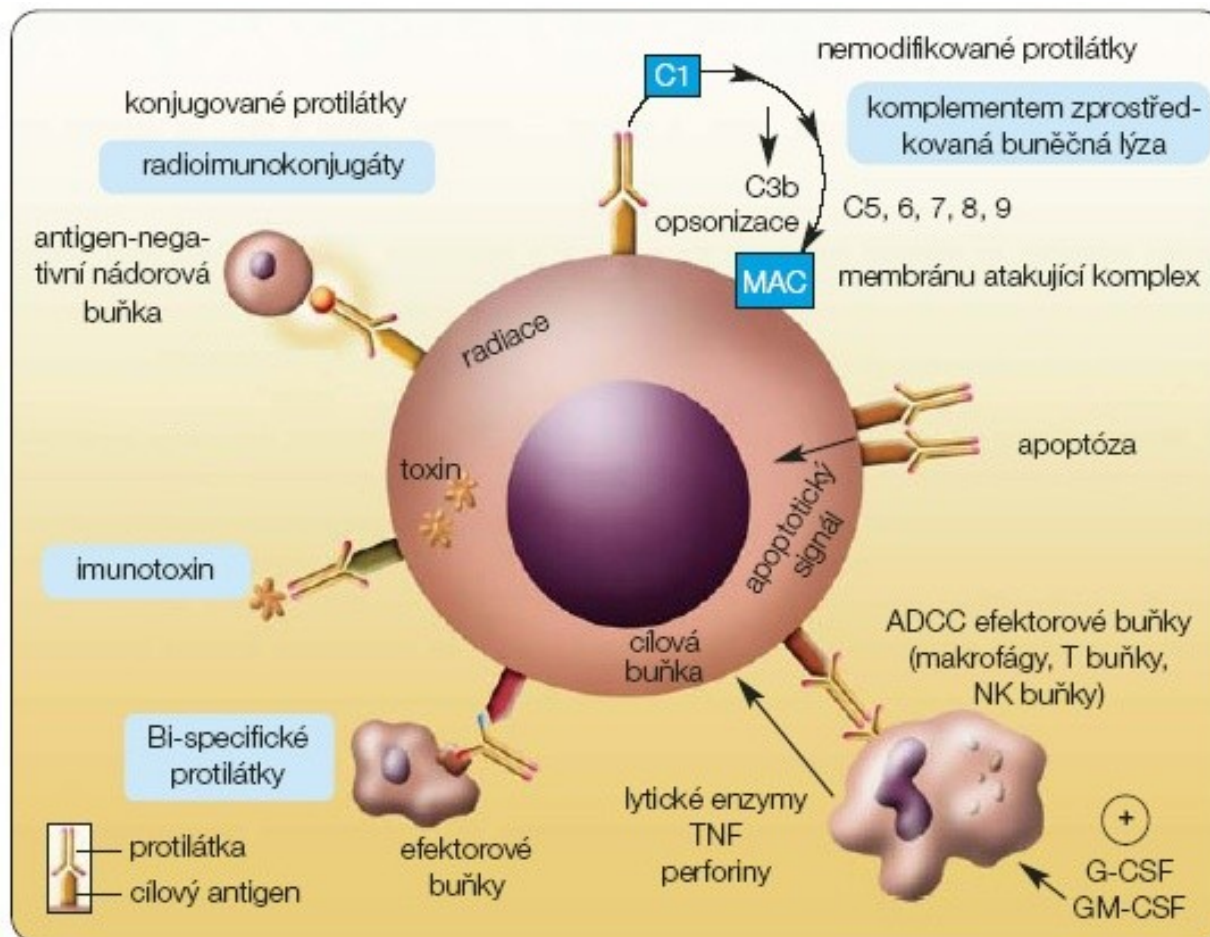
- *Listeria monocytogenes*
- *Salmonella*
- *Mycobacterium tuberculosis*

# Nádorová onemocnění



# MAbs v léčbě malignitid

- Samotné MAbs – nekonjugované
- MAbs v konjugaci – toxin, radioizotop, cytostatikum



- **Nekojugované MAbs**

- *Rituximab* (MabThera<sup>®</sup>) - chimérická působící proti povrchovému antigenu (CD20) exprimovaný na více než 90% B lymfocytů u Nonhodgkinského lymfomu (maligní onemocnění vzniklé transformací různých diferenciačních stádií B lymfocytů), chronická lymfatická leukémie

- *Bevacizumab* (Avastin<sup>®</sup>) – působící na transdukční kaskádu (VEGF vaskulární endoteliální růstový faktor) - inhibice angiogeneze

- **Konjugované Mabs, radioimunoterapie**

- *Ibritumomab-tiuxetan* (Zevalin<sup>®</sup>)

- konjugát s radioizotopem <sup>90</sup>Yt,

