

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

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** o povrchové Ig nebo rozpustné
4. zralé **paměťové B sekrece jen rozpustné Ig.**
5. **B2, B1buňky a další klony B buněk**

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

Nutná účast Th lymfocytů (MHC II - CD4Th)

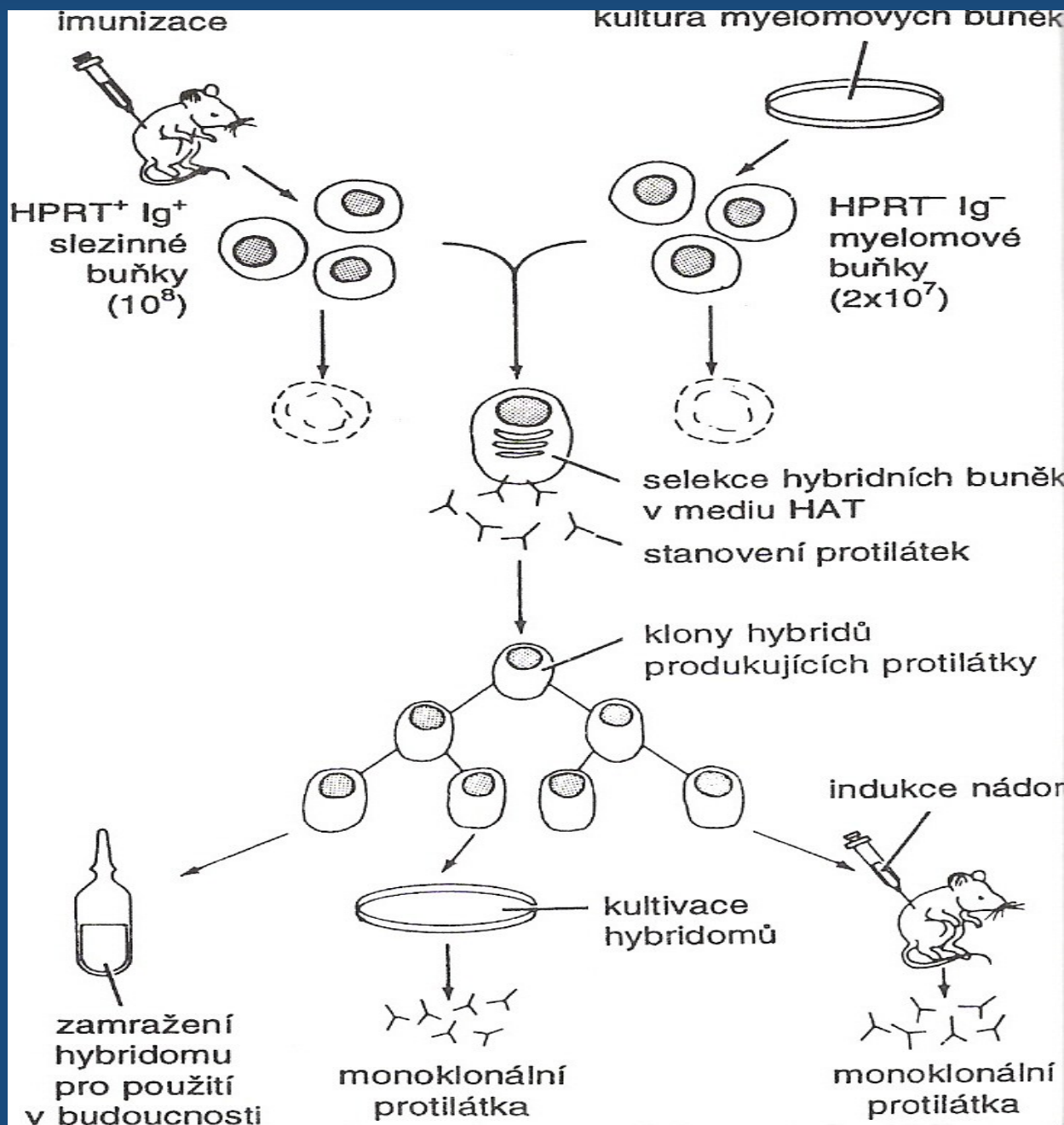
1. proces dozrávání afinity
2. přepínání syntézy Ab z jedné třídy do druhé
3. vznik plazmatických a paměťových buněk

MAbs v klinické praxi

- Přesně mířené proti povrchovým či membránovým molekulám a antigenům, zásah do transdukčních kaskád (přenos informace do jádra)
- Samostatná nebo kombinovaná léčba (imunosupresiva)
- Transplantace, alergie, infekce, autoimunita, nádorová onemocnění
- První MAb schválena 2002
- Dnes schváleno přes 20 produktů, GENETECH obrat 5,4 mld dolarů
- Přes 200 MAbs v klinických studiích

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



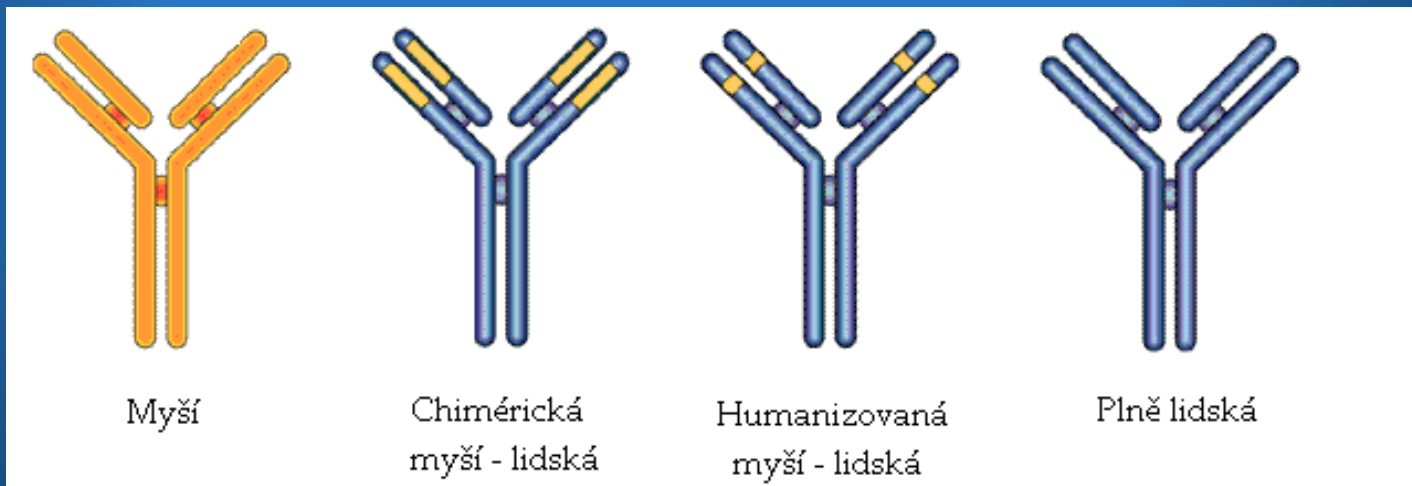
Vlastnosti: Hypoxantin
phosphoribosyl
transferáza-, Ig-

Proces hybridizace:

1. fúze – fúzogeny (inakt. Virus, PEG)
2. Tři linie buněk, Hybridní buňky
3. Médium **HAT** (hypox, aminopt thy (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 – HAMA, zábrana vazby na Ag – anafylaxe, sér. nemoc
- Tvorba rekombinantních MAbs



**70%-
lidská
složka**

**90%-
lidská
složka**

Tvorba rekombinantních Mabs

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 části úseků genů myšího Ig, které kódují hypervariabilní domény CDR
5. Náhrada CDR části lidského Ig
6. Vložení genů kódující humanizovanou Mab do savčí buňky, ve které jsou syntetizovány

XENOMOUSE – genet. informace myši nese lidské geny pro tvorbu Ab, první lidské Ab produkované pomocí myší schválená k léčbě

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- α)
- ***Omalizumab (Xolair[®])***
 - humanizovaná MAb proti doméně IgE (blokace), která pak není schopna vazby na B lymfocyty a inhibuje tvorbu nových IgE
 - brání degranulaci efektorových buněk (žírné b.) a uvolňování mediátorů (histamin atd) alergické reakce, snižuje aktivaci zánětlivých buněk
 - léčba astmatu, která odolává kortikosteroidům

Autoimunitní onemocnění

- ***Adalimumab (Humira®)***
- ***Infliximab (Remicade®)***
 - MAbs proti TNF- α , vazba na membránový receptor nebo na jeho část molekuly
 - léčba revmatoidní artritidy, Crohnovy choroby, úspěšné navození remise a snížení chirurgických zákroků
- ***Natalizumab (Tysabri®)***
 - MAb proti α 4-integrinu (zabránění migrace lymf nesoucí autoim. Ab, 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 spp.*
- *Mycobacterium tuberculosis*

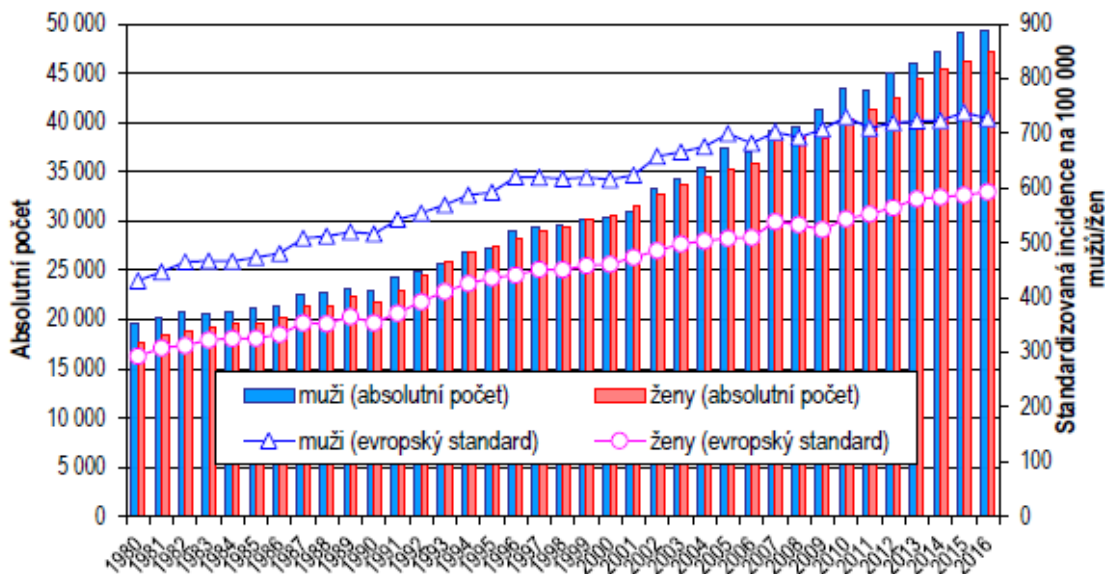
Nádory v ČR

- ČR je ročně průměrně diagnostikováno více než 87 000 pacientů se zhoubným novotvarem. Ročně v souvislosti se zhoubným nádorem umírá
- cca 27 000 pacientů Celkem v ČR žije cca 600 000 osob se zhoubným novotvarem nebo s minulostí tohoto onemocnění
- Počet nádorů každoročně narůstá, avšak mortalita je celkově stabilizovaná a u řady diagnóz začala klesat. Statistika hovoří jasně: každý 3. obyvatel České republiky v průběhu svého života onemocní rakovinou.
- V roce 2017 bylo v České republice nově diagnostikováno 86 819 pacientů se zhoubným novotvarem.
- K 31. prosinci 2017 žilo celkem v České republice 577 373 osob, u kterých bylo v daném roce nebo dříve diagnostikováno onkologické onemocnění. To je jako by onemocněli všichni obyvatelé našeho druhého největšího města Brna a ještě navíc celý Turnov. Tolik onkologicky nemocných mezi námi žije!
- V roce 2017 zemřelo v České republice 27 320 osob v souvislosti se zhoubným novotvarem.

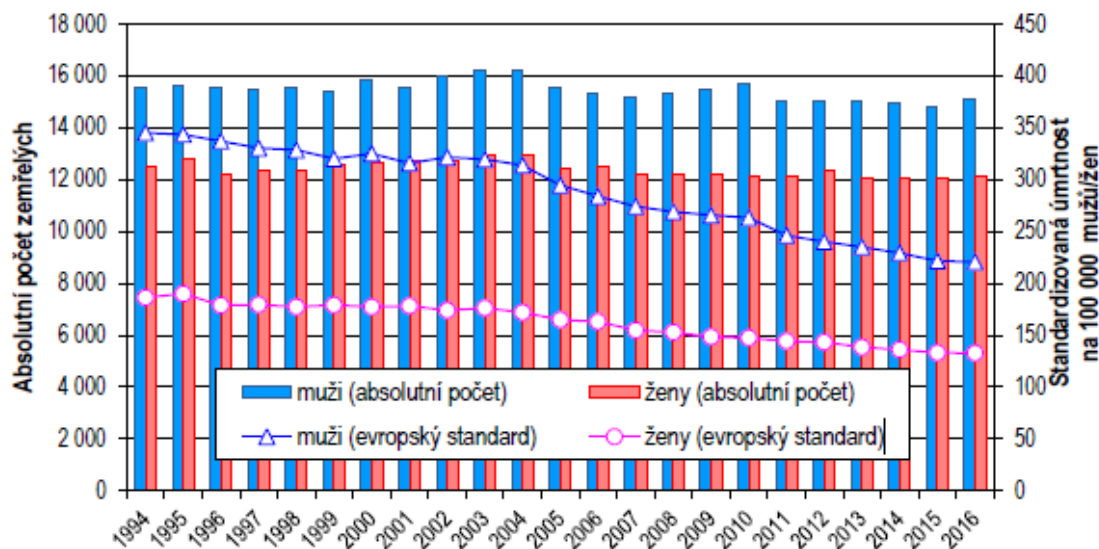
Nádorová onemocnění

5%
obyvate
I
ČR

Graf I. Vývoj incidence ZN a novotvarů in situ u mužů a žen (1980–2016)



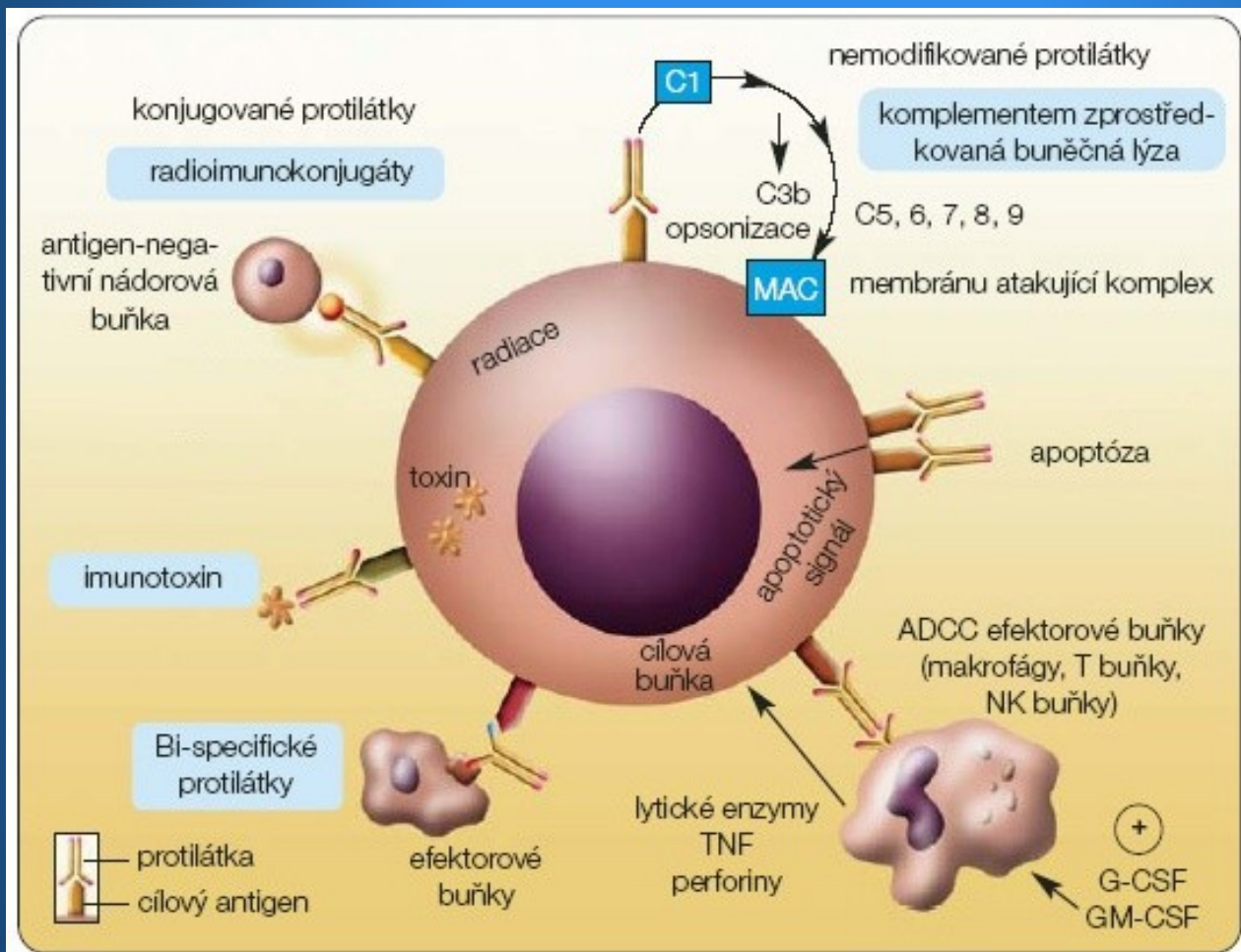
Graf II. Vývoj úmrtnosti na ZN u mužů a žen (1994–2016)



V roce 2016 bylo do Národního onkologického registru ČR (NOR) nově nahlášeno celkem 96 500 případů zhoubných novotvarů (ZN) a novotvarů in situ (dg. C00–C97a D00–D09 dle MKN-10), z toho 49 302 případů u mužů a 47 198 případů u žen.

MAbs v léčbě malignitid

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



Imunologické mechanismy léčby nádorových b. (varianty)

- **Nekonjugované MAbs**

- *Rituximab* (MabThera[®]) - 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[®]) – působící na transdukční kaskádu (VEGF vaskulární endoteliální růstový faktor) - inhibice angiogeneze

- **Konjugované Mabs**, radioimunoterapie

- *Ibritumomab-tiuxetan* (Zevalin[®])

- konjugát s radioizotopem ⁹⁰Yt (Yperit)

- a další

