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 zracích 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, diferenciace, 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

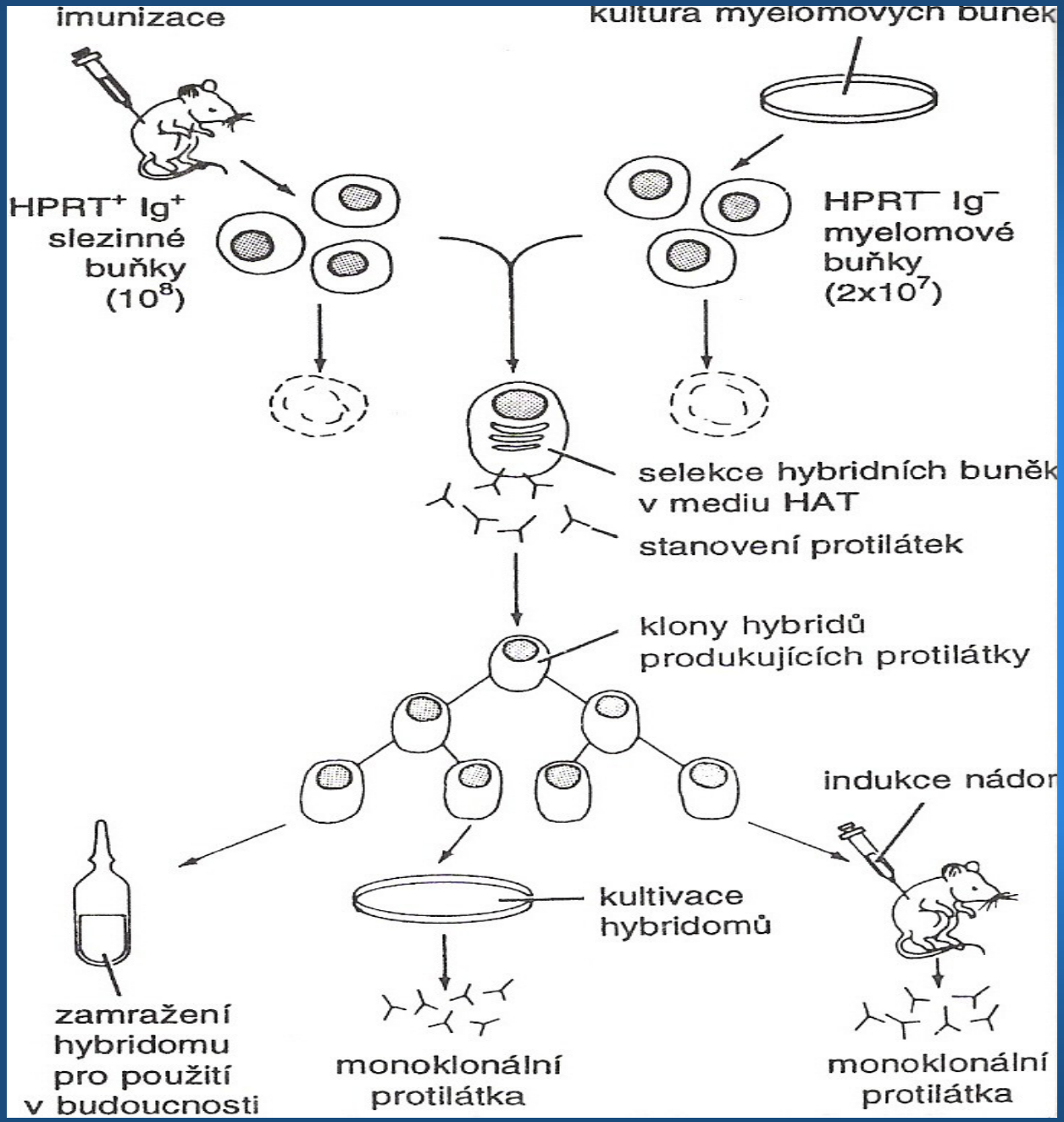
Monoklonální protilátky (MAbs)

- Produkt jediného klonu B lymfocytů
- Objev MAbs – Milstein & Köhler (1975)
- 1984 Nobelova cena, tzv. hybridomová technologii přípravy MAbs, při které dochází k fůzi B lymfocytů, získaných z myší imunizovaných vyžadovaným antigenem s nádorovými buňkami.
- Hybridomová technologie přípravy MAbs

  - myší lymfocyty imunizované antigenem

  \+ nádorové buňky

  ≥ HYBRIDOM produkující MAbs



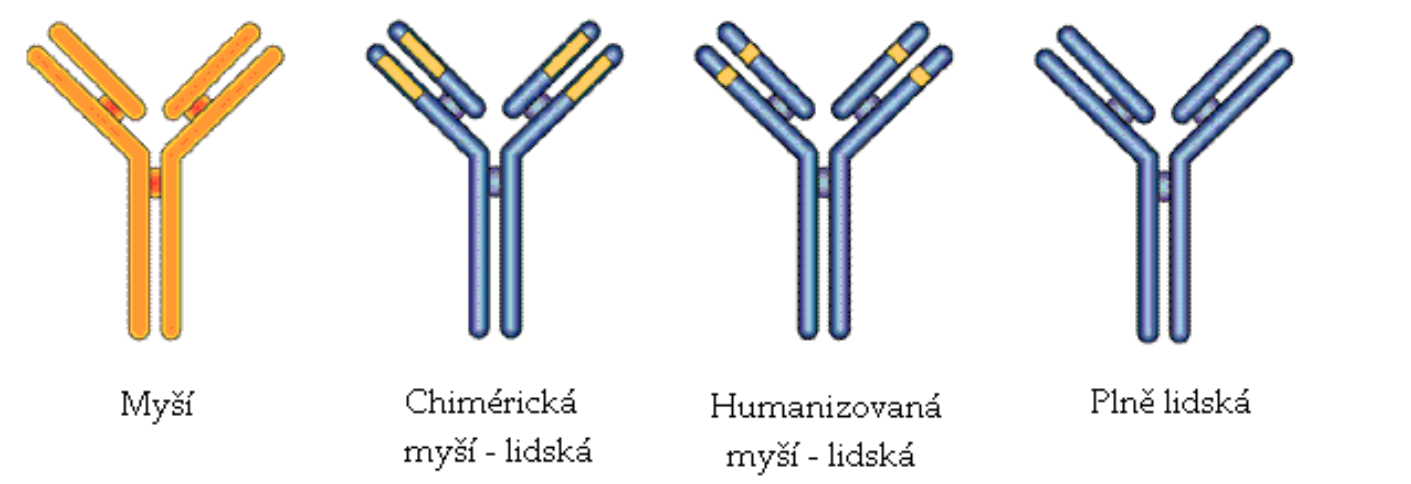
Vlastnosti:Hypoxantin phosphoribozyl transferáza-, Ig-

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 schválené k léčbě

Transplantace

- Léčba akutních rejekcí
- ***Muromonab – CD3*** **(Orthoclone OKT3)**
  - myší MAb proti CD3 znaku T lymfocytů
  - 20% redukce počtu cirkulujícíchT 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, která pak není schopna vazby na B lymfocyty a inhibuje tvorbu nových IgE

  - brání degranulaci efektorových buněk 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 molekulu

  - léčba revmatoidní artritidy, Crohnovy choroby

- ***Natalizumab*** **(Tysabri®)**

  - MAb proti α4-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

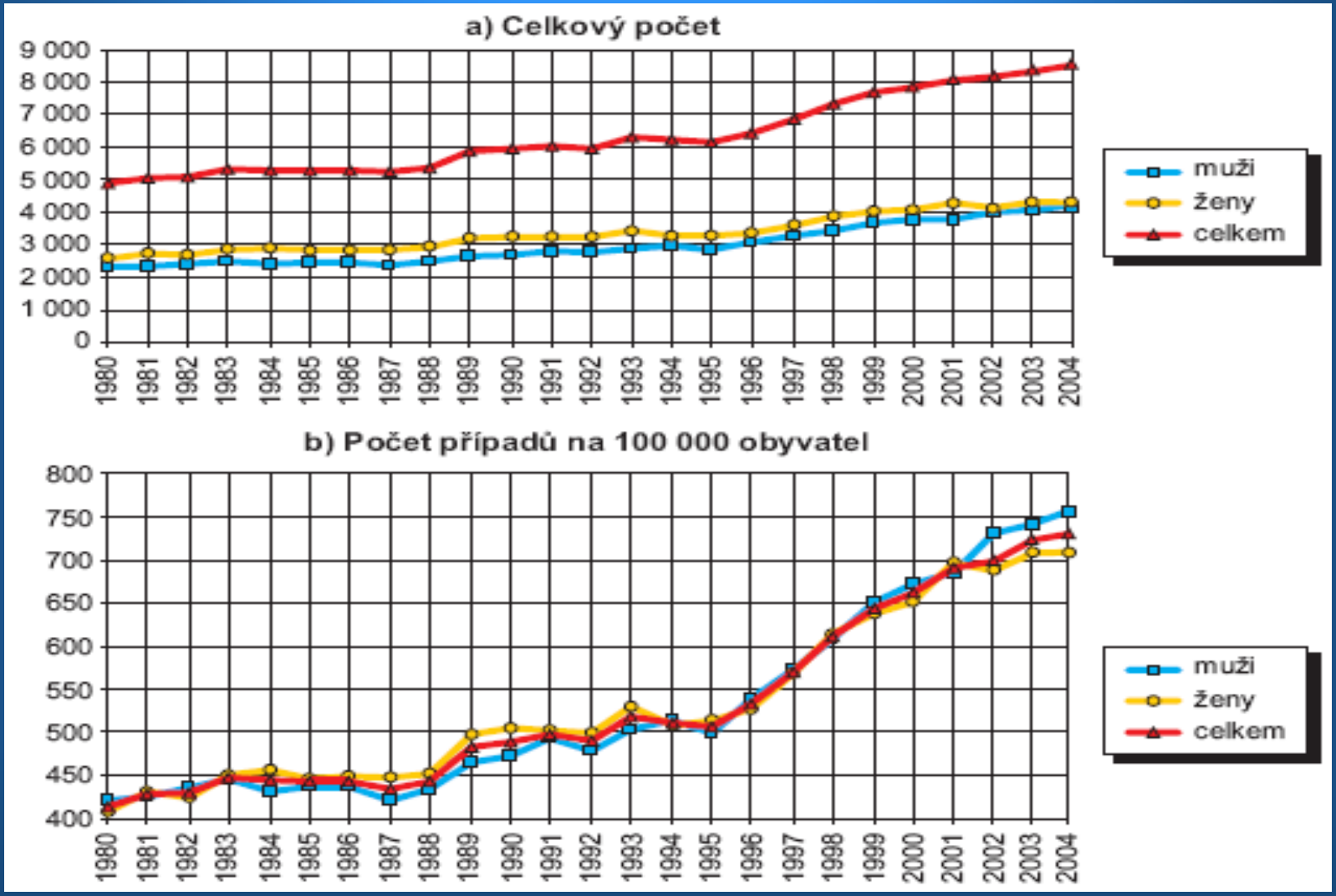
***Pavilizumab* (Synagis®)**

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

Klinické studie

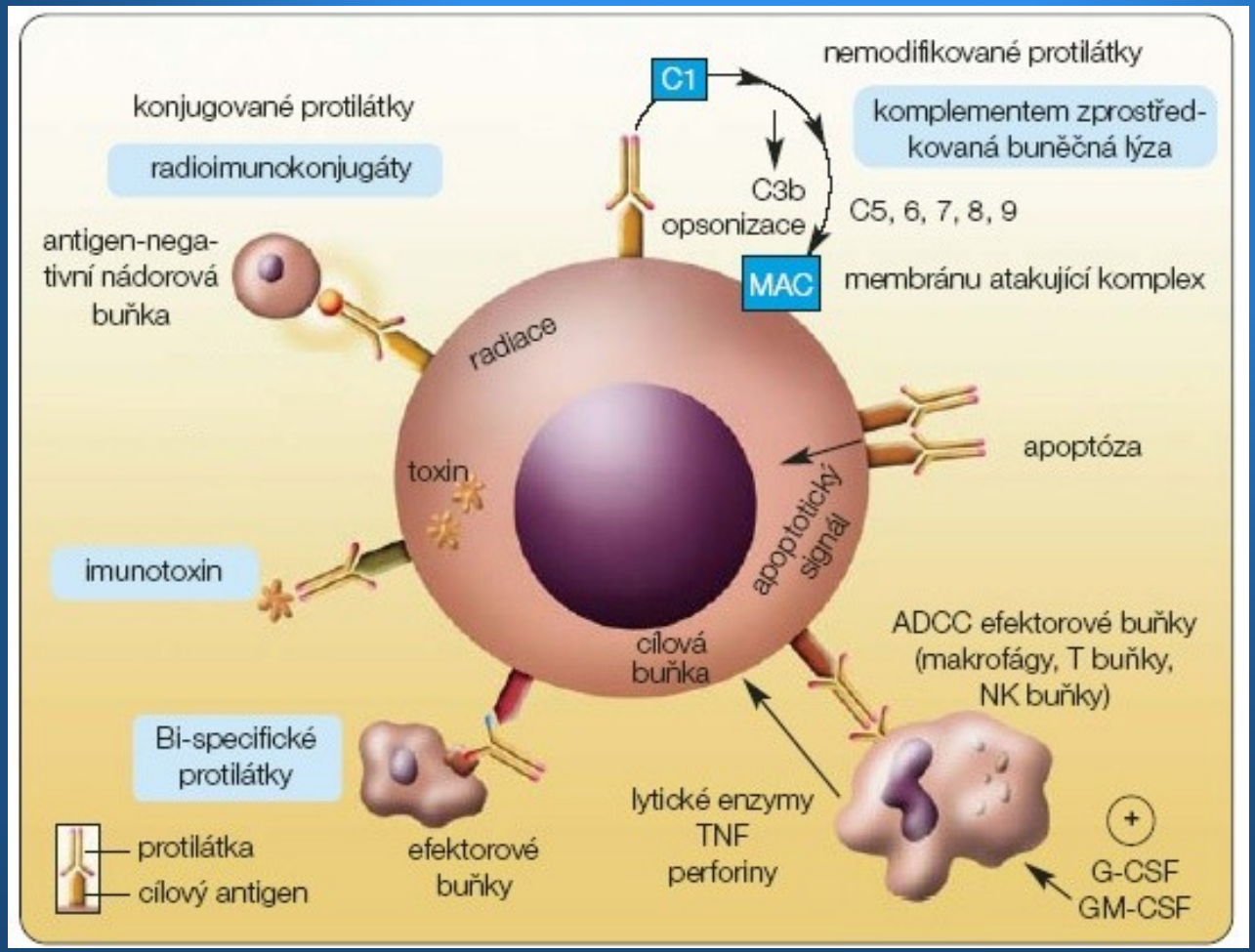
- *Listeria monocytogenes*
- *Salmonella*
- *Mycobacterium tuberculosis*

Nádorová onemocnění



MAbs v léčbě malignitid

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



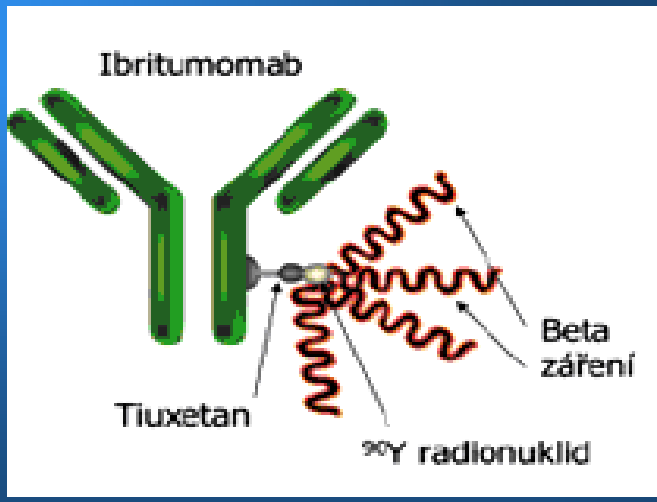
Imunologické mechanismy léčby nádorových b. (varianty)

- **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 ^{90}Yt (Yperit)

a další