

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 nesetkají s antigenním podmětem **3. terminální fáze** - diferenciaci 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

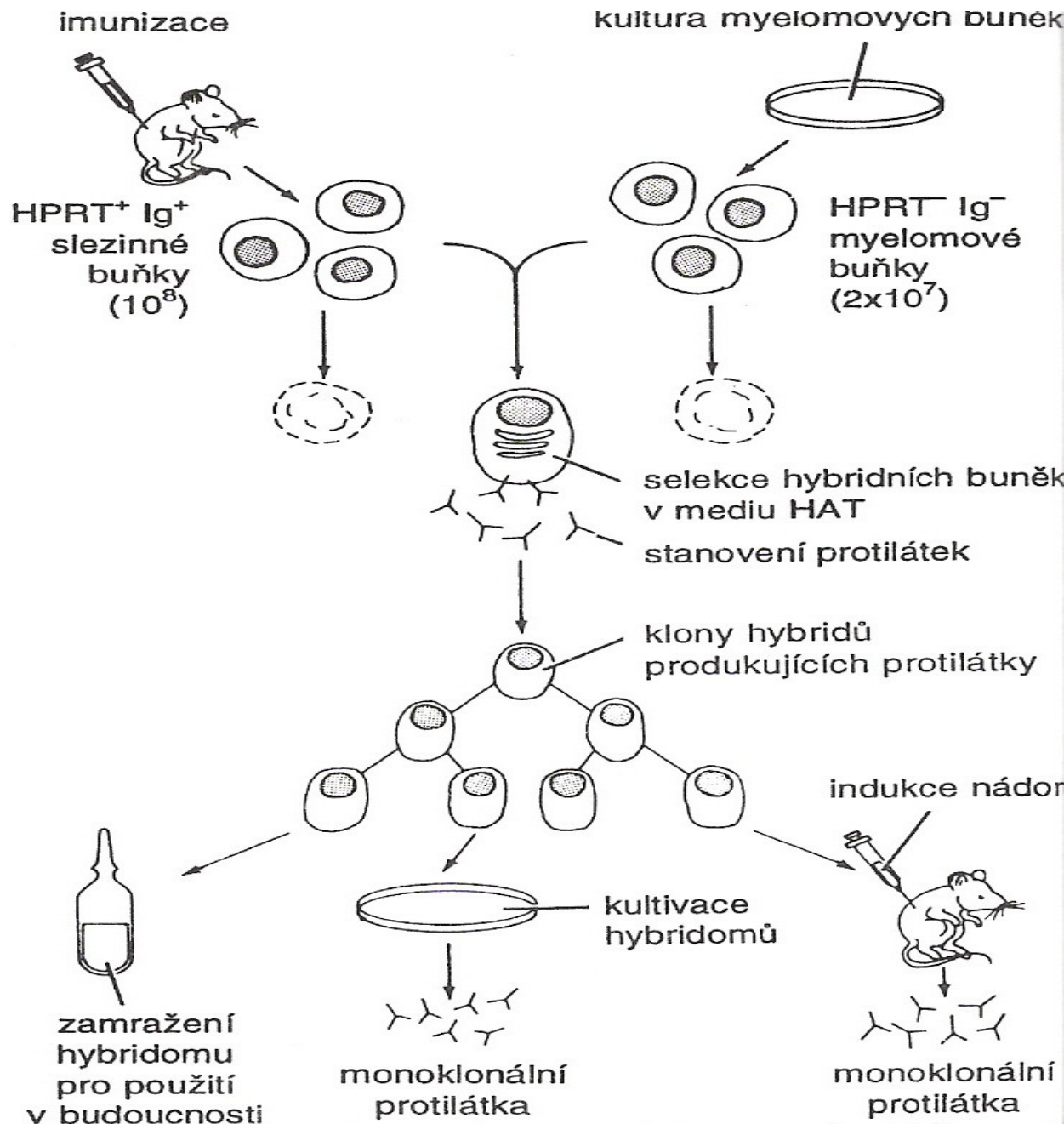
MAbs v klinické praxi

- 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

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



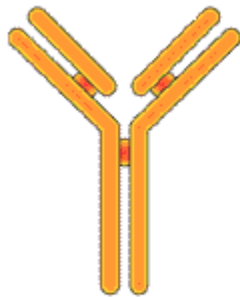
Vlastnosti: Hypoxan
tin phosphoribozyl
transferáza-, Ig-

Proces
hybridizace:

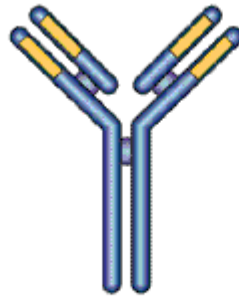
1. fúze – fúzogeny
(inakt. Virus,
PEG)
2. Tři linie buněk,
Hybridní buňky
3. Médium HAT
(hypoxantin,
aminopterin-
(inhibice
syntézy purinů
a pyrimidinů),
thymidin)
4. Vyšetření na
tvorbu Ab
5. zamražení

Humanizace protilátek

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

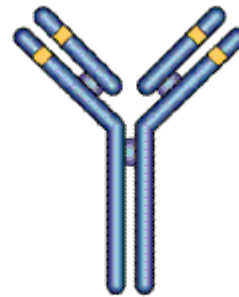


Myší



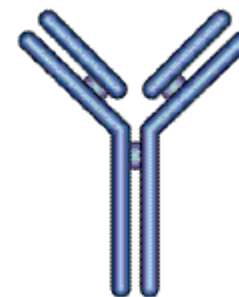
Chimérická
myší - lidská

**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- α)
- ***Omalizumab (Xolair[®])***
 - 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- α , vazba na membránový receptor nebo na jeho molekulu
 - léčba revmatoidní artritidy, Crohnovy choroby
- ***Natalizumab* (Tysabri®)**
 - MAb proti α 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

antrax a *Clostridioides difficile*, *Ebola* – snížení úmrtnosti

Klinické studie

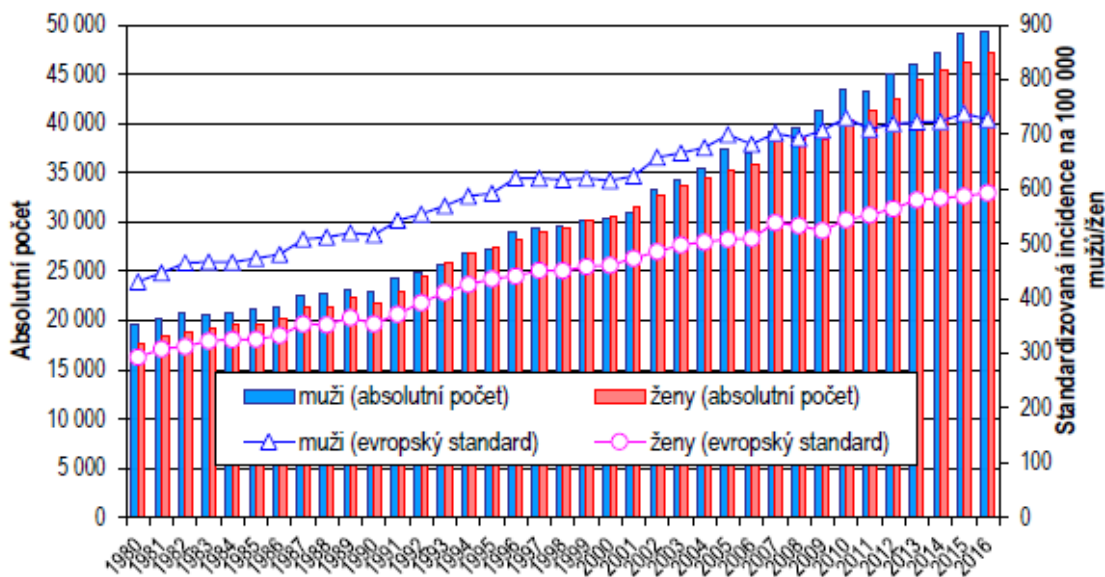
- *Listeria monocytogenes*
- *Salmonella spp.*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- COVID-19

Hlavním cílem neutralizujících monoklonálních protilátek je vrcholová část povrchového glykoproteinu (i různé části tohoto proteinu) viru COVID-19, který během infekce umožňuje vstup virů do hostitelských buněk, a to navázáním na angiotensin-konvertující enzymový receptor 2 (ACE 2).

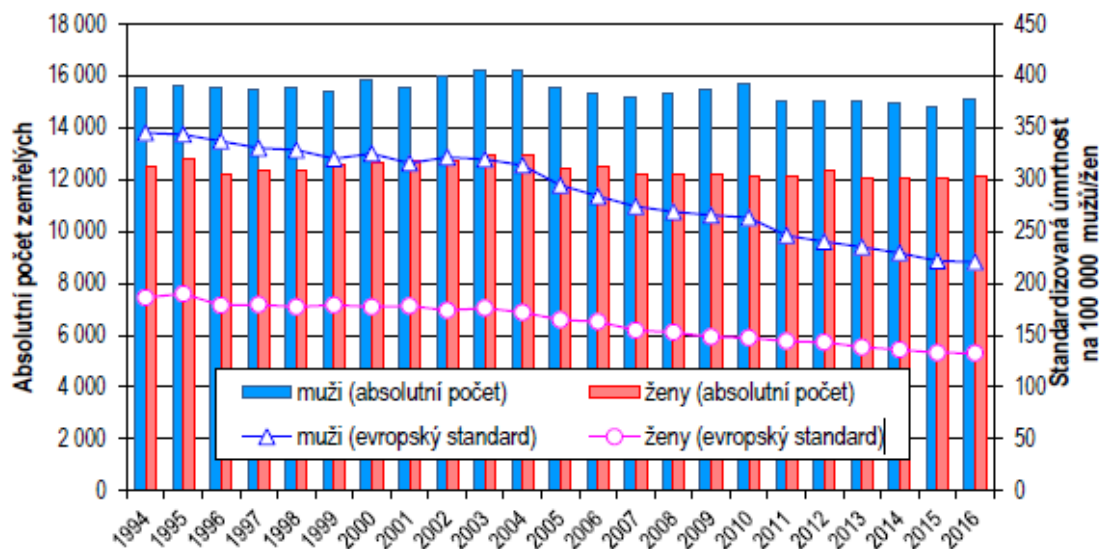
Nádory v ČR

- 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.

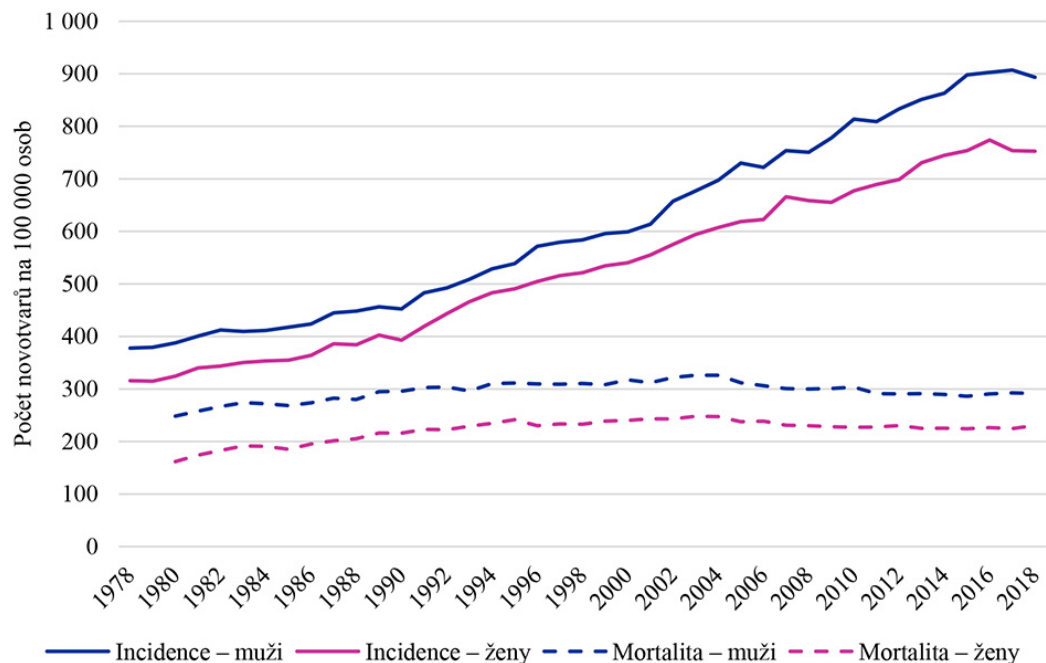
Graf I. Vývoj incidence ZN a novotvarů in situ u mužů a žen (1980–2016)



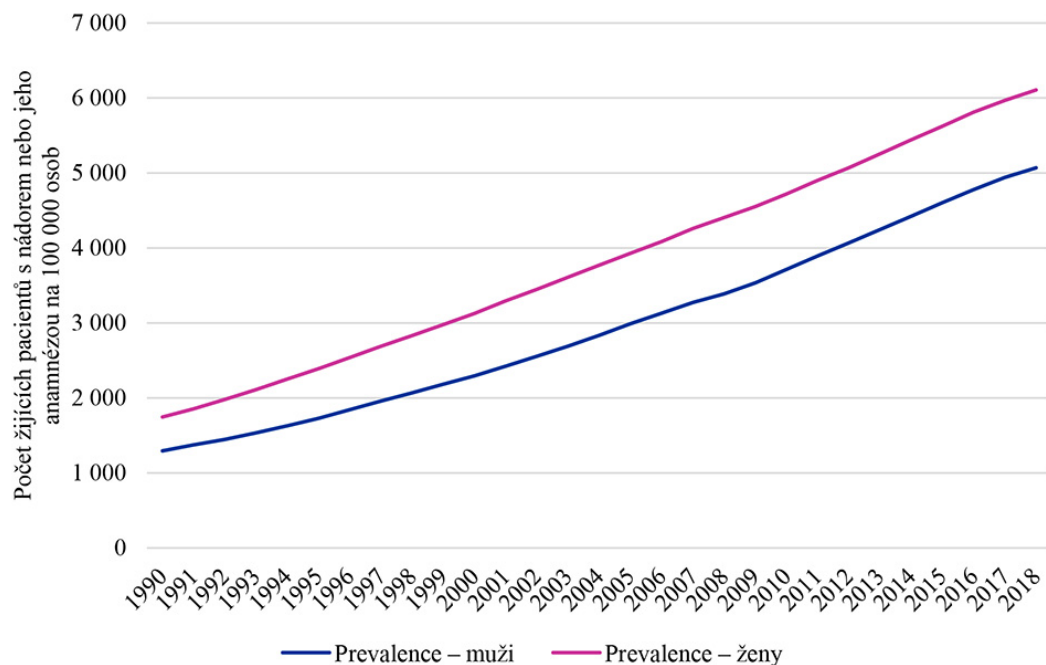
Graf II. Vývoj úmrtnosti na ZN u mužů a žen (1994–2016)



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.



V mezinárodním srovnání stojí Česká republika v incidenci zhoubných nádorů (ZN) v Evropě na 16.–17. místě

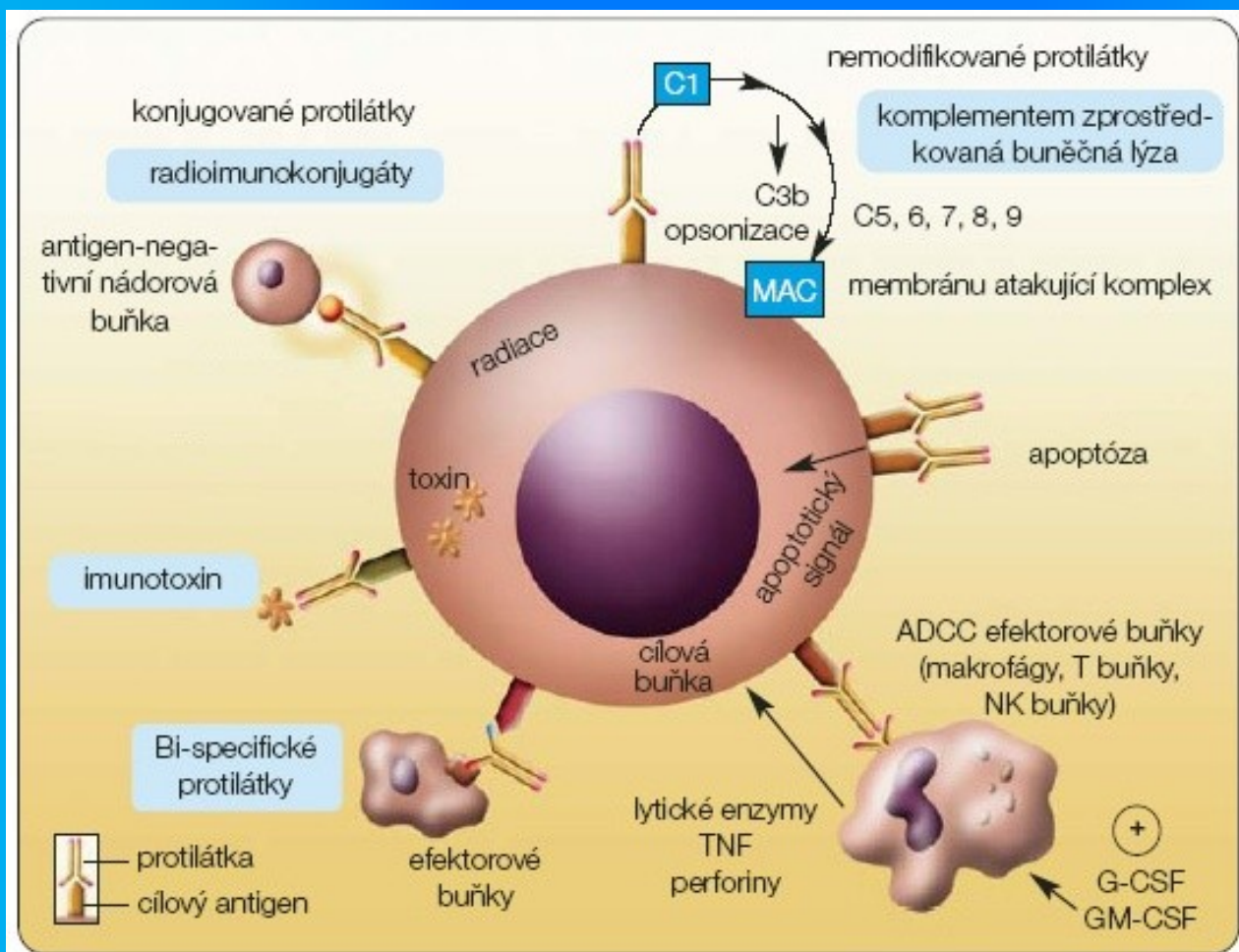


K 31. 12. 2018 žilo v ČR 594 637 osob s tímto onemocněním, což je 5 596 na 100 000 osob.

Ve srovnání s předchozím rokem tak vzrostl počet žijících osob s těmito onemocněními o 2,8 %.

MAbs v léčbě malignitid

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



Imunologické mechanismy léčby nádorových b. (varianty)

- **Nekonjugované MAbs**

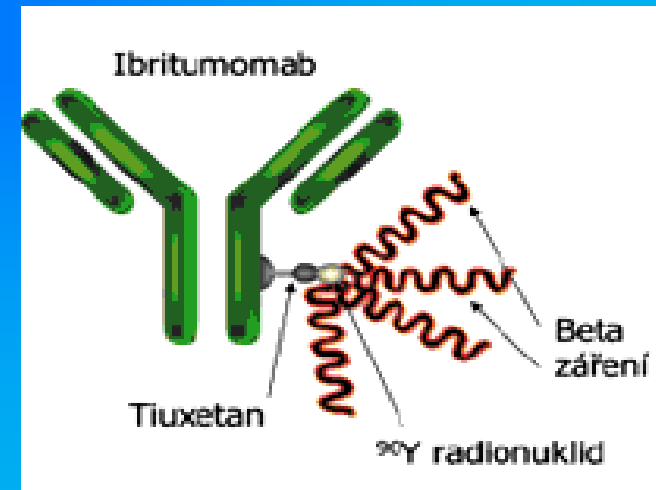
- *Rituximab* (MabThera[®]) - chimérická působící proti povrchovému antigenu (CD20) exprimovaný na více než 90% B lymfocytů u Nonhodgkinského lymfomu (maligní onemocnění vzniklé transformací různých diferenciačních stádií B lymfocytů), chronická lymfatická leukémie

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

- **Konjugované Mabs**, radioimunoterapie

- *Ibritumomab-tiuxetan* (Zevalin[®])

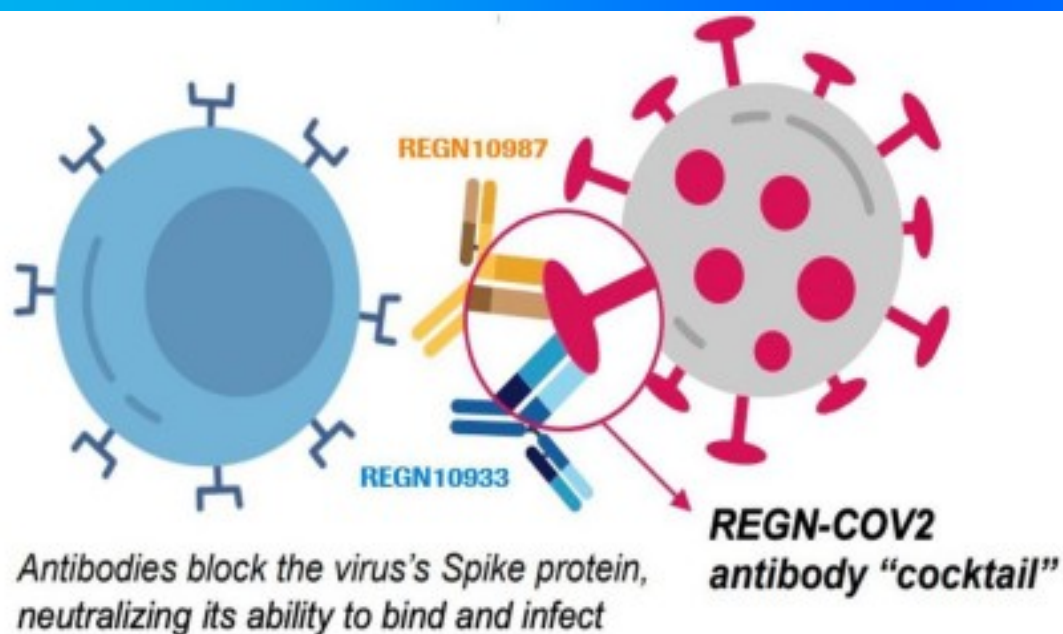
- konjugát s radioizotopem ⁹⁰Yt (Yperit) a další



Bamlanivimab firmy Elli Lilly - monokomponentní přípravek, měl být výhledově výrobcem doplněn o druhou protilátku **etesivimab** (LY-COVOI6), aby lépe odolával novým mutacím

Léčivý přípravek **REGN-COV2** se skládá ze dvou monoklonálních protilátek: **casirivimabu** a **imdevimabu**.

Byly navrženy tak, aby se navázaly na S-protein viru SARS-CoV-2 na jeho dvou různých místech. Tyto monoklonální protilátky by tak navázáním na S-protein měly bránit vstupu viru do buněk lidského těla. Tím by se mělo zastavit množení viru v těle a zamezit nemoci v jejím zhoršení.

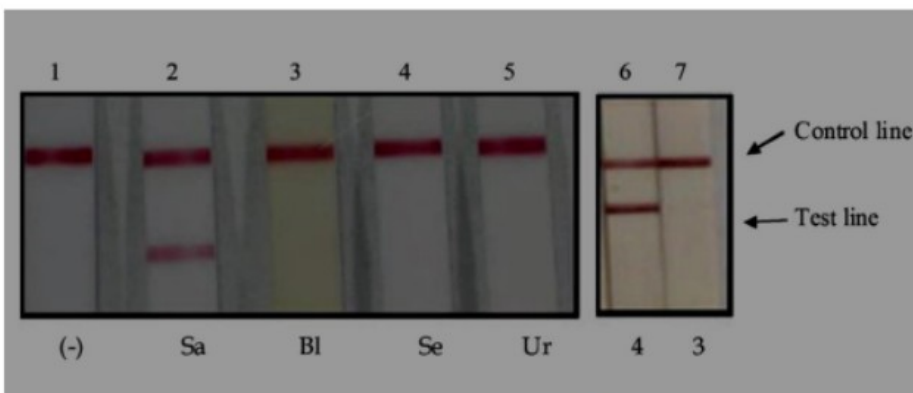


Neutralizační monoklonální protilátky proti viru SARS-CoV-2 slouží k léčbě a postexpoziční profylaxi onemocnění COVID-19. Podání monoklonálních protilátek je určeno pouze pro pacienty, u kterých nebyla prokázána varianta omikron. Na virus SARS-CoV-2 s mutací omikron nejsou monoklonální protilátky dostupné u nás účinné.

MAbs v kriminalistice

zjišťování Ag ve slinách, který má několik výhod oproti metodám založených na enzymové aktivitě. metodou **Rapid stain identification test for saliva** (RSID™-Saliva), test založený na **laterální průtokové imunochromatografii** na proužku. (Merritt&Karn, 1977; Old et al., 2009).

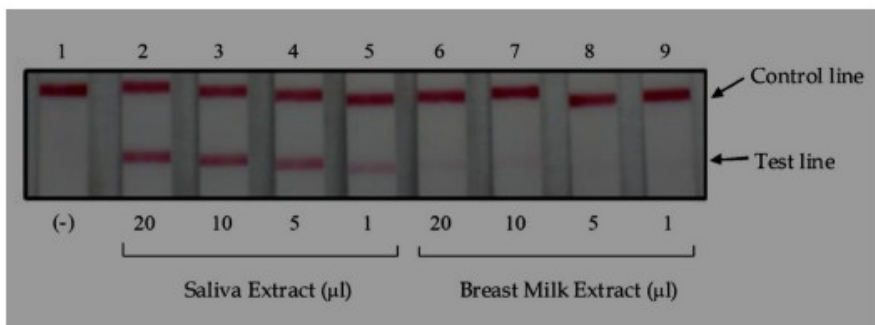
Výhody RSID™-Saliva: vyšší senzitivita, specifická a jednoduché provedení, přesnost, opakovatelnost, snadná proveditelnost, **využití dvou anti-slinných amylásových mAbs k prokázání přítomnosti α -amylázového proteinu** (Gaenssle, 1983), malé mn. slin (1 μ l). Pomocí RSID™-Saliva se testovaly tělní tekutiny jako krev, sperma, moč a sliny. Tekutiny se testovaly individuálně i jako směs. Pozitivně reagovaly pouze vzorky s obsahem slin. Srovnání je znázorněno na obrázku č. 1.



Testování tělních tekutin metodou RSID™-Saliva (Old et al., 2009).

Popis: 1: negativní kontrola, 2: Sa - sliny, 3: Bl - krev, 4: Se - sperma, 5: Ur - moč,
6: směs Sa, Bl, Se, Ur, 7: směs Bl, Se, Ur

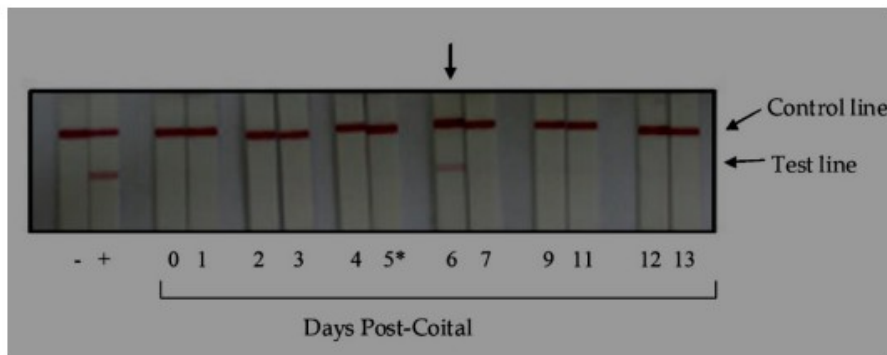
Srovnání reaktivity slin a mateřského mléka



Srovnání reaktivity u slin a mateřského mléka metodou RSID™-Saliva (Old et al., 2009).

Pro soudní lékařství je důležitá možnost identifikace slin u případů sexuálních útoků.

Testu byly podrobeny vaginální výtěry po pohlavním styku ve dnech 0-7, 9 a 11-13, v 0. dnu došlo k pohlavnímu styku, v 5. dnu k orálnímu kontaktu. Kromě 6. dne (po orálním kontaktu z 5. dne), kdy se prokázala přítomnost slin v pozitivním výsledku testu, reagovaly všechny vzorky z ostatních dnů negativně, viz obrázek č. 3. Tyto výsledky ukazují na nepřítomnost křížové reaktivity se spermatem nebo vaginálními tekutinami, potvrzují jednoduchost a specifitu při detekci slin metodou RSID™-Saliva (Old et al., 2009).



Testování extraktů z vaginálního výtěru metodou RSID™-Saliva (Old et al., 2009).

Popis: 5. den - orální kontakt, následující 6. den pozitivní nález

Testování spermatu

Specifický Ag pro prostatu (**PSA, známý také jako p30**) je glykoprotein produkovaný prostatickou žlázou. Je vylučován do seminálního plasmatu a díky tomu je platným markerem pro detekci spermatu jako důkazu v kriminálních případech (Sensabaugh, 1978). Metod pro detekci PSA bylo více, patřily mezi ně např. elektroforéza, raketová imunoelktoforéza, radiální imunodifúze nebo ELISA (Graves et al., 1985; Kamenev et al., 1989; Stowell et al., 1991). Nevýhody: nedosahovaly potřebné citlivosti a byly obtížné a časově náročné, především v případě analýzy to bylo jen několik vzorků týdně. Pro rychlejší screening PSA v séru, které může indikovat rakoviny prostaty, byly vyvinuty různě citlivé **membránové testy** PSA. Výhody: jednoduchost, rychlost, minimální vybavení a snadné vyhodnocení výsledků, senzitivita je srovnatelná s ELISA, která byla nejcitlivější (Hochmeister et al., 1999).

Metoda membránového testu **využívá anti-human PSA mAbs**, které jsou konjugovány se zbarvenými částicemi a mohou se vázat k lidskému PSA. Výsledný komplex Ag-Ab migruje po membráně testovacího zařízení k reaktivní zóně, kde spočívají imobilizované anti-human PSA pAbs. Vzniká „sendvič“ Ab-Ag-Ab. Ten koncentruje barevné částice, následkem toho se utváří linie, která indikuje přítomnost lidského PSA. Nenavázané anti-human PSA mAbs **se stěhují ke kontrolní zóně**, kde jsou imobilizované anti-Ig Abs. Vytváří se komplex, který slouží ke kontrole validity (Hochmeister et al., 1999). Je stejně citlivá jako metoda ELISA, její provedení je jednodušší a nabízí daleko rychlejší výsledky.

