

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmakologie a toxikologie

MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY V NÁDOROVÉ TERAPII

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc.PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Hradec Králové 2010

Jana Vondráčková

„Tímto bych chtěla poděkovat Doc.PharmDr. Františkovi Štaudovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a odborné konzultace. Taktéž bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu při mém studiu a hlavně mé sestře Tereze za psychickou pomoc při realizaci této práce.“

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Obsah:

OBSAH	4
ZKRATKY	6
1. ÚVOD	10
2. CÍLENÁ TERAPIE	10
3. HISTORIE	10
4. STRUKTURA A FUNKCE LIDSKÝCH PROTILÁTEK	14
5. VÝROBA MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK – GENETICKÉ INŽENÝRSTVÍ	15
6. MECHANISMUS ÚČINKU MOAB	17
6.1. ZABÍJENÍ NÁDOROVÝCH BUNĚK AKTIVACÍ IMUNITNÍHO SYSTÉMU.....	17
6.2. INHIBICE SIGNÁLU TRANSDUKCE.....	18
7. KLASIFIKACE MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK	19
7.1. NEKONJUGOVANÉ PROTILÁTKY.....	19
7.2. KONJUGOVANÉ PROTILÁTKY.....	19
8. CÍLE PŮSOBENÍ MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK	20
8.1. ANTIGEN CD20.....	20
8.1.1. <i>Nekonjugované anti-CD20 protilátky</i>	20
8.1.1.1. Rituximab.....	20
8.1.1.2. Veltuzumab - humanizovaná anti-CD20 monoklonální protilátka: IMMU-106 (hA20).....	20
8.1.2. <i>Radioimunoterapie používaná u protilátek anti-CD20</i>	20
8.2. ANTIGEN CD22.....	21
8.2.1. <i>Nekonjugované anti-CD22 protilátky</i>	21
8.2.2. <i>Konjugované protilátky anti-CD22</i>	22
8.3. ANTIGEN CD80.....	22
8.4. ANTIGEN CD52.....	23
8.5. ANTIGEN CD2.....	23
8.6. ANTIGEN CD30.....	24
8.7. ANTIGEN CD40.....	24
8.8. TRAIL A JEHO RECEPTORY.....	24
8.9. BAFF, APRIL A JEJICH RECEPTORY.....	25
8.10. VEGF (VASKULÁRNÍ ENDOTELIÁLNÍ FAKTOR).....	25
8.11. EGFR – RECEPTOR PRO EPIDERMÁLNÍ RŮSTOVÝ FAKTOR.....	28
8.11.1. <i>Struktura a funkce EGFR</i>	28
8.11.1.1. Ligandy.....	29
8.11.1.2. EGFR a signální transdukce.....	29
8.11.2. <i>Buněčné účinky aktivace EGFR</i>	29
8.11.2.1. Proliferace.....	29
8.11.2.2. Další biologické účinky.....	30
8.11.3. <i>Inhibice EGFR</i>	30
8.11.4. <i>Prognostický a prediktivní význam EGFR</i>	32
9. PŘEHLED MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK	35
10. RITUXIMAB	38
10.1. MECHANISMUS ÚČINKU.....	39
10.2. INDIKACE.....	40
10.3. NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY.....	40
11. TRASTUZUMAB	41
11.1. MECHANISMUS ÚČINKU.....	41
11.2. INDIKACE.....	41
11.3. NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY.....	42
12. CETUXIMAB	42

12.1. MECHANISMUS ÚČINKU	42
12.2. INDIKACE.....	43
12.3. NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY	43
13. ALEMTUZUMAB.....	44
13.1. MECHANISMUS ÚČINKU	44
13.2. INDIKACE.....	44
13.3. NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY	44
14. BEVACIZUMAB.....	45
14.1. MECHANISMUS ÚČINKU	45
14.2. INDIKACE.....	46
14.3. NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY	46
15. ZÁVĚR	47
ABSTRAKT	48
ABSTRACT	49
LITERATURA	50

Zkratky:

5-FU 5-fluoruracyl

A

ADCC antibody dependent cellular cytotoxicity, cytotoxicita závislá na buňkách
AIHA autoimunitní hemolytická anémie
ALCL anaplastický velkobuněčný lymfom
AMK aminokyselina
AML akutní myeloidní leukémie
APRIL proliferation-inducing ligand
ATP adenosin trifosfát

B

BAFF aktivační faktor B-buněk
BAX BCL2-associated X protein, proapoptický protein
BCL2 B-CLL and lymphoma, antiapoptický protein
BCMA B-cell maturation antigen

C

C komplement
CDC complement dependent cytotoxicity, cytotoxicita závislá na komplementu
CDCC complement depending cellular toxicity
CDR complement determining regions
CEA carcinoembryonic antigen
CHOP cyklofosfamid, hydroxydaunorubicin, vinkristin, prednison
CLL chronická lymfatická leukémie
CMV cytomegalovirová infekce
CNS centrální nervový systém
CR kompletní remise
CTLA4 cytotoxický T-lymfocyt A4

D

DLBCL difúzní velkobuněčný B-lymfom

E

EGF	endoteliální růstový faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
ER	epratuzumab plus rituximab
ERBB	erythroblastosis B

F

FDA	The US Food and Drug Administration
FL	folikulární lymfom

G

G-CSF	granulocyte colony stimulating factor, faktor stimulující kolonie granulocytů
GDP	guanosindifosfát
GM-CSF	granulocyte – macrophage colony – stimulating factor
GTP	guanosintrifosfát

H

HAMA	human antimouse antibody
HB-EGF	heparin – binding EGF
HER	human epidermal (growth factor) receptor
HL	Hodgkinský lymfom
HLA	human leukocyte antigen, lidské leukocytární antigeny
HRS	Hodgkinský a Reed-Sternbergův lymfom

I

IGF	insulin-like growth factor, růstový faktor podobný inzulinu
IL	interleukin
ITP	idiopatická trombocytopenická purpura

J

JNK	jun N-terminální kináza
JNKK	JNK aktivovaná kináza

M

MAC	membrane attack komplex
MALT	mucosa associated lymphoma tissue
MAPK	mitogen activated proteinkinase, mitogeny aktivovaná protein kináza
mCRC	metastatický kolorektální karcinom
MoAb	monoklonální protilátky
mTOR	mammalian target of rapamycin
MVD	microvessel density

N

NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NHL	non-Hodgkin lymphoma, nehodgkinské lymfomy
NK	natural killer
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic

O

ORR	celková léčebná odpověď
OR	overall response rate

P

PI3K	phosphatidylinositol-3-kinasa
PKB	proteinkináza B
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PGF	placenta growth factor

R

RANKL	receptor activator for nuclear factor κ B ligand, ligand pro receptor aktivující nukleární faktor κ B
RR	relativní riziko

S

SCCHN	spinocelulární karcinom hlavy a krku
-------	--------------------------------------

T

TACI	transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor
TGF- α	transforming growth factor alfa
TNF	tumor necrosis factor
T-PLL	T-prolymfatická leukémie
TRAIL	TNF – related apoptosis – inducing ligand

V

VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor
VGF	vaccinia virus growth factor

1. Úvod

Monoklonální protilátky jsou produkovány pouze jedním klonem B-lymfocytů, a tudíž vykazují stejnou antigenní specifitu. Díky tomu mají schopnost se vázat na epitopy konkrétních povrchových nádorových antigenů nebo solubilních proteinů. ([Klener et al., 2009](#))

Monoklonální protilátky jsou uplatňovány jak v diagnostice, tak v terapii celé řady onemocnění. Kromě jejich použití v onkologii a transplantační medicíně nelze opomenout jejich úlohu v léčbě autoimunitních chorob ([Sobotková et al., 2008](#)).

V této práci se budu zabývat použitím monoklonálních protilátek v nádorové terapii.

2. Cílená terapie

V posledních desetiletích, díky nutnosti lepšího porozumění přeměny normální buňky v buňku nádorovou, vedlo badatele k vývoji nových léků nazývaných cílená terapie – targeted therapy.

Termín cílená terapie poukazuje na léky, které se selektivně zaměřují na specifické molekulární dráhy, které jsou zapojeny do rozvoje nádorů nebo jejich progresu. I když tradiční cytotoxická chemoterapie demonstruje nějaký stupeň selektivity tím, že se zaměřuje na nádorové buňky, není běžně považována za cílenou terapii. Je méně selektivní a ovlivňuje dráhy, které jsou běžné jak pro nádorové buňky, tak i pro buňky normální. Ale ve skutečnosti rozdíl mezi více běžnou chemoterapií a terapií cílenou se zdá být spíše strojený, neboť obě mohou ovlivňovat normální signální dráhy, což může způsobit systematickou toxicitu ([Sledge, 2005](#)).

3. Historie

Myšlenka existence séra s aktivitou proti patogenům a toxinům se datuje již koncem 19. století, kdy Behring objevil, že smrtelnému účinku podáním velkého množství tetanového toxinu králíkům lze předcházet imunizací zvířat sérem získaného z jiných králíků, kteří již dříve byli léčeni podáním minimálně neletální dávky toxinu. Behring správně usoudil, že sérum musí obsahovat anti-toxin se specifickou aktivitou proti tetanu ([Behring, 1890](#)).

Zatímco séroterapie k léčbě tetanu a záškrtu byla vyvinuta v následujících letech, jeden z Behringových kolegů, Ehrlich, na přelomu století jako první připustil možnost použití séroterapie k léčbě nádorového onemocnění ([Ehrlich, 1900](#)).

V roce 1968 byla Porterem ([Porter, 1967](#)) a Edelmanem a kolektivem charakterizována struktura předpokládaného anti-toxinu ([Edelman et al., 1968](#)) jako imunoglobulinu, který má dnes všeobecně známou strukturu písmene Y. Jen o něco málo později, v roce 1975, Kohler a Milstein zveřejnili výsledky jejich práce popisující produkci hybridomové buněčné linie schopné produkovat monoklonální protilátky (MoAbs): polyklonální protilátky jsou u zvířat produkovány opakovanou imunizací cílenými antigeny; protilátky produkovány B-lymfocyty jsou poté izolovány a díky hybridizaci s myší myelomovou buněčnou linií se stávají nesmrtelnými ([Kohler et al., 1975](#)).

V roce 1983 průkopníci výzkumu monoklonálních látek věřili, že začala nová éra nádorové terapie a že je poprvé v činnosti skutečná specifická a cílená terapie používající hybridomovou technologii k produkci monoklonálních protilátek se znamenitou specifitou. Z klinických studií na zvířatech bylo také zřejmé, že monoklonální protilátky by mohly být prostředkem, který by přinesl do klinické praxe imunokonjugativní terapii vznikající konjugací monoklonální protilátky s léky, toxiny nebo radioizotopy. Využívá specifitu monoklonální protilátky k dopravení látky se zdokonalenou usmrcující schopností přímo do nádorových buněk. Takto začala éra terapie monoklonálními látkami, stejně jako imunokonjugativní terapie.

Ačkoliv tu bylo obrovské pozdvižení i skepticismus kvůli novému možnému způsobu léčby (použití formy biologické terapie s význačnou specifitou u pacientů s pokročilým stádiem rakoviny), byly tu také problémy a omezení. Jak představuje **tabulka 1**, myší monoklonální protilátky měly toxické projevy, které sekundárně vedly ve většině případů k interakcím s cílovým antigenem ([Dillman et al., 1986](#)). Nicméně jejich hlavní omezení byla imunogenita. Myší proteiny jsou vysoce imunogenní, a proto se brzy zjistilo, že se může pacientovi s rakovinou podat jen několik málo infuzí s těmito cizími proteiny kvůli rozvoji HAMA (human antimouse antibody) ([Dillman, 1990](#)).

Další zřejmý problém rychle nastal, když některý z antigenů nacházející se na povrchu nádorových buněk moduloval z povrchu buňky do cirkulace po připojení protilátky. Modulace může být také důsledkem internalizace komplexu. Bylo zjištěno, že toto může představovat terapeutickou výhodu použitím protilátky jako nosiče, aby osvojení toxické komponenty z imunokonjugátu ho dělalo potenciálně více terapeuticky aktivním.

V roce 1983 bylo identifikováno jen málo antigenů nacházejících se pouze na nádorových buňkách a proběhlo hodně debat o specifitě těchto antigenů. Spousta antigenů, pro které byly monoklonální protilátky zhotoveny, byly antigeny embryonální nebo antigeny vyskytující se na nádorových i normálních buňkách. I když byla specifita protilátek na antigen výtečná, specifita pro protilátky a imunokonjugáty na rakovinu nebyla absolutní.

Jedna docela jasná výjimka se vyskytla na začátku 80. let 20. století, když Miller a kolektiv ([Miller et al., 1982](#)) vyvinuli monoklonální protilátku na idiotyp z buněk B-lymfomů. První pacient, kterému byla tato anti-idiotypová protilátka podána, měl kompletní odpověď na terapii a jeho lymfom přešel do celkové remise, která trvala roky. Jako přímý výsledek těchto dřívějších studií anti-idiotypových protilátek je zde řada idiotypových vakcín, které jsou ve III. fázi studií na pacientech s nízkým stupněm folikulárního lymfomu (FL) ([Hurvitz et al., 2005](#)). Tyto anti-idiotypové vakcíny budou pravděpodobně první opravdovou na míru dělanou protinádorovou vakcínou schválenou k terapeutickému použití.

Tab. 1 Ve studiích zjištěné toxické účinky monoklonálních protilátek ([Oldham et al., 2008](#)).

Teplota
Zimnice
Zarudnutí
Přecitlivělost
Kopřivka
Vyrážka
Nauzea/zvracení
Bronchospasmus*
Dyspnoe
Hypotenze/tachykardie
Anafylaxe
Sérová nemoc
Zvýšení kreatininu
Bolest hlavy

**Pulmonální toxicita (dyspnoe, bronchospasmus, etc.) byla nejčastěji zpozorována s cirkulací antigenů v průběhu MoAb infúze.*

Hlavním omezením terapie myšími monoklonálními protilátkami byla imunogenita myších proteinů; škála investigátorů předpokládala, aby terapie monoklonálními protilátkami byla opravdu úspěšná, bude nezbytné použití lidských nebo humanizovaných protilátek. Již před 25 lety bylo známo, že poločas rozpadu myších monoklonálních protilátek v krevní cirkulaci je krátký, a kvůli tomu HAMA přišla s každou infúzí myších monoklonálních protilátek rychleji. Předchozí studie lidských imunoglobulinů dokázala jeho o mnoho delší poločas rozpadu. Předvídala, že jednou lidské a humanizované protilátky budou dostupné a že terapeutická účinnost monoklonálních protilátek a jejich imunokonjugátů může být značně zdokonalena ([Oldham, 1983](#)).

O 25 let později byl v tomto oboru učiněn významný pokrok. FDA (The US Food and Drug Administration) schválila 21 monoklonálních protilátek a z toho šest

přímo pro nádorovou terapii (**tab. 2**). Tento mezník se datuje na listopad 1997, kdy se rituximab stal první monoklonální protilátkou schválenou pro nádorovou terapii ([Dillman, 1997](#)).

Tab. 2 Monoklonální protilátky schválené FDA pro nádorovou terapii ([Oldham et al., 2008](#)).

Název	Typ	Cíl	Klinické použití
Rituximab	chimérická	CD20	NHL
trastuzumab	humanizovaná	Erb B2	C. prsu
bevacizumab	humanizovaná	VEGF	Kolorektální c.
alemtuzumab	humanizovaná	CD52	CLL
Cetuximab	chimérická	EGFR	Kolorektální c.
panitumumab	Lidská	EGFR	Kolorektální c.

Zkratky: NHL – non-Hodgkinův lymfom, VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor, CLL – chronická lymfatická leukémie, EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor

4. Struktura a funkce lidských protilátek

Imunoglobuliny nebo protilátky jsou molekuly ve tvaru písmene Y s molekulovou hmotností okolo 150kDa. Skládají se ze čtyř kovalentně vázaných částí, a to ze dvou lehkých řetězců a dvou těžkých řetězců. Oba typy řetězců mají konstantní část, která se nachází na totéž místě u všech imunoglobulinů stejného isotypu, a jedinou variabilní část obsahující místo pro vazbu antigenu a umístěnou na dvou krátkých ramenech molekuly.

Fab fragment (antibody binding) může být papainem odštěpen od Fc fragmentu (crystalline) (**obr. 1**).

Fab fragment obsahuje variabilní domény, které se samy o sobě skládají ze tří hypervariabilních aminokyselin uspořádaných v sekvenci, která je odpovědná za specifitu protilátky (CDR – complementarity determining regions).

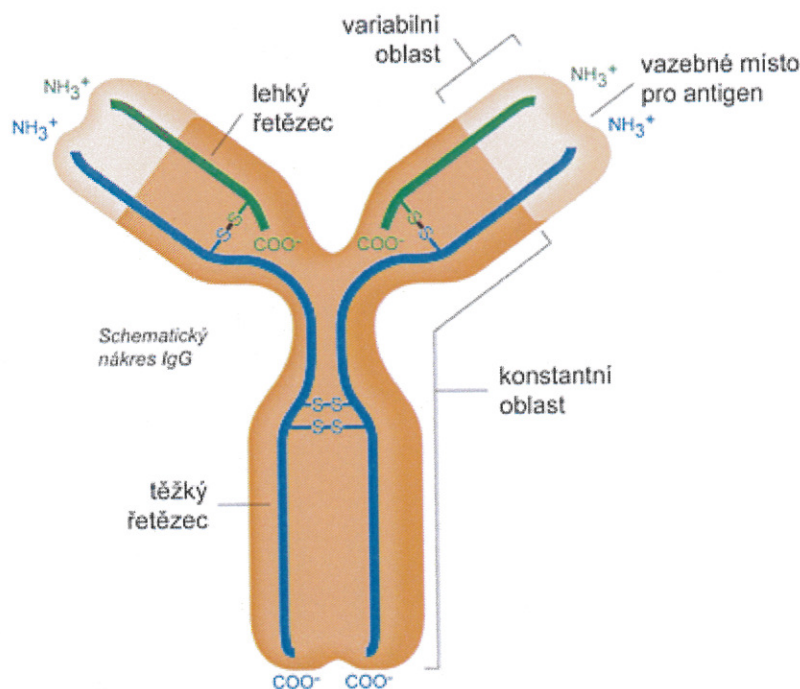
Fc fragment obsahuje pouze konstantní část ze dvou těžkých řetězců, která určuje isotyp protilátky (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) a slouží jako vazebné místo pro komplement a leukocyty.

Cirkulující protilátky chrání hostitelský organismus dvěma způsoby:

- přímou vazbou a neutralizací toxinů

- aktivací imunitní odpovědi, především dvěma cestami:
 - vazbou a aktivací komplementu C1q na Fc fragmentu a následnou formací komplexu, který rozkládá cílovou buňku (CDC – complement dependent cytotoxicity = komplementem zprostředkovaná toxicita)
 - iniciací celulární odpovědi (ADCC – antibody dependent cellular cytotoxicity) vyskytující se na receptorech, na které se váže Fc fragment (CD16, CD32 a CD64) na přirozených buněčných zabijácích, kterými jsou monocyty a makrofágy, kteří zabíjí cílenou buňku opsonizací.

Různé isotypy a podtřídy imunoglobulinů mají schopnost aktivovat různou odpověď: zatímco lidské IgM protilátky téměř výhradně aktivují komplement, IgG isotypy (především podtřídy IgG1 a IgG3) vedou k silné CDC.



Obr. 1 Struktura imunoglobulinu (Kodíček, 2007).

5. Výroba monoklonálních protilátek – genetické inženýrství

Myší monoklonální protilátky původně trpěly dvěma hlavními nedostatky. Jejich původ hlodavce vedl k jejich rozpoznání hostitelským imunitním systémem a vyvinula se HAMA. HAMA nejen, že vedla k eliminaci a inaktivaci myších protilátek po opakovaném podání, ale také vedla k alergickým reakcím, které mnohdy vyústily až v anafylaktický šok, což velmi omezovalo možnost opakovaného podání těchto látek.

V důsledku rozdílů mezi myším a lidským imunitním systémem myší Fc fragment narušoval možnost vyvolání CDC a ADCC, což omezilo terapeutické možnosti.

Aby se překonaly tyto problémy, byly původní myší molekuly postupně konstruovány s cílem minimalizace imunogenity.

Jak již bylo zmíněno výše, myší monoklonální protilátky indukovaly silnou imunitní odpověď na cizí myší globuliny, což omezovalo jejich použití. Genetické inženýrství umožnilo vývoj humanizovaných protilátek, a tudíž zvýšilo jejich terapeutickou účinnost ([Stocchi et al., 1998](#)).

V prvním kroku byly konstantní domény myších molekul nahrazeny jejich vlastním lidským protějškem vedoucím k látkám, které se nazývají chimérické protilátky ([Osborn et al., 2003](#)). Chimérické protilátky jsou ze 65 – 90% lidské a sestávají se z myších variabilních částí, které umožňují rozeznání antigenu ([Stocchi et al., 1998](#)). Lidská genová sekvence byla brána z kappa lehkého řetězce a IgG1 těžkého řetězce. Podtřída IgG1 byla vybrána jako nejvíce efektivní v aktivaci komplementu a cytotoxických efektorových buněk.

Jako další výhodou nahrazení přibližně dvou až tří molekul lidského proteinu bylo, že výsledná molekula měla sníženou imunogenitu, což umožnilo prodloužení poločasu rozpadu a opakovanou aplikaci.

Další rafinací této strategie byly zkonstruovány humanizované protilátky přenesením myší CDR do lidských protilátek s výslednou molekulou, která byla z cca 95% lidského původu. Všechny schválené monoklonální protilátky používané v dnešní době v protinádorové léčbě jsou buď chimérické nebo humanizované.

Další vývoj vedl k produkci plně humánních protilátek. Jelikož lidé nemohou být vakcinováni k produkci protilátek proti vlastním antigenům, byly vyvinuty jiné metody včetně přenesení imunoglobulinů do myší, které mohly být následně vakcinovány, což vedlo k produkci lidských protilátek (the HuMab MouseTM) nebo úplné obcházení potřeby imunizace produkcí protilátek v knihovnách ([Osborn et al., 2003](#)).

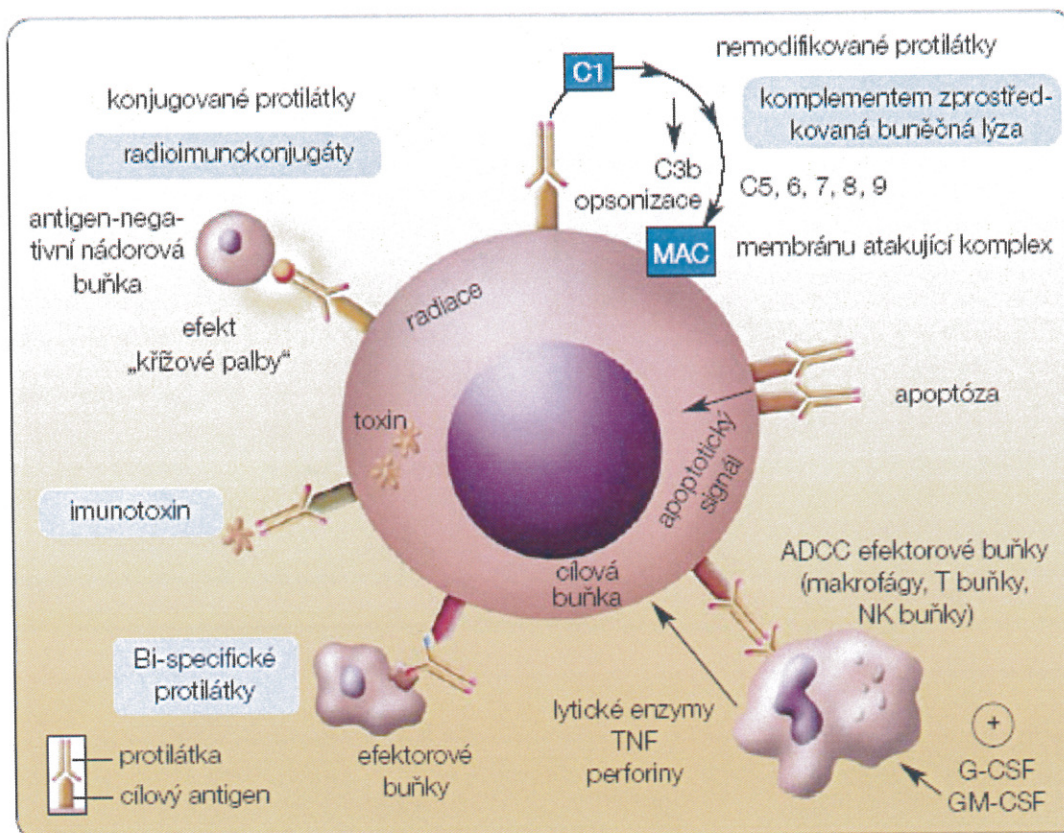
Pro zlepšení penetrace do rozsáhlého nevasculizovaného nádoru, především do solidních nádorů, byly konstruovány malé fragmenty protilátek. Jednořetězcová variabilní Fv část se skládá jen z jedné variabilní domény těžkého řetězce a z jedné variabilní domény řetězce lehkého, které jsou kovalentně navázány krátkou peptidovou vazbou. Tyto fragmenty mohou být použity k dopravení radioizotopů nebo léků do

nádoru. Byly také navrženy protilátky, které váží dvěma rameny různé antigeny, a tudíž mají schopnost vázat dva různé antigeny. Jedno rameno se váže na nádorové buňky a druhým atrahují efektorové buňky. Tato struktura zvyšuje ADCC tím, že aktivuje pomocné buňky imunitního systému hostitele (T-lymfocyty, makrofágy a NK-buňky) ([Scott et al., 2001](#)).

6. Mechanismus účinku MoAb

6.1. Zabíjení nádorových buněk aktivací imunitního systému

Fc fragment je důležitý spouštěč imunitního systému (**obr. 2**). CDC se projeví po tom, co se komplement naváže na Fc fragment protilátky, který se navázal na cílovou buňku. Výsledkem je lýza buňky a přitažení efektorových buněk k nádorovým buňkám. ADCC se vyskytuje, když IgG, které je napojeno na cílovou buňku, rozpozná pomocí Fc fragmentu receptory na efektorových buňkách. To vyústí k lýze zprostředkované buňkou nebo fagocytóze tumorových buněk. Trastuzumab, rituximab a alemtuzumab působí částí těchto mechanismů.



Obr.2 Schéma účinku monoklonálních protilátek (Adam et al., 2005).

(ADCC = antibody dependent cell-mediated cytotoxicity; C = komplement, G-CSF = granulocyte colony stimulating factor, GM-CSF = granulocyte – macrophage colony – stimulating factor, MAC = membrane attack komplex, NK = natural killer, TNF = tumor necrosis factor)

6.2. Inhibice signálu transdukce

Navázání monoklonálních protilátek na receptory růstových faktorů tumorových buněk blokuje navázání endogenních ligandů, které vede k inhibici fosforylace receptorů pro protein s tyrozinkinázovou aktivitou a inhibici downstream proteinů. Monoklonální protilátky, které působí tímto mechanismem, jsou: trastuzumab (anti-ERBB2), cetuximab (anti-EGFR) a bevacizumab, který blokuje angiogenezi navázáním se a vyčleněním ligandu z receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR) (Kreitman, 1999).

7. Klasifikace monoklonálních protilátek

7.1. Nekonjugované protilátky

Protilátky, které způsobují smrt nádorových buněk prostřednictvím aktivace efektorových buněk mechanismy ADCC, CDC, blokem interakcí mezi receptorem a ligandem nebo indukci apoptózy.

7.2. Konjugované protilátky

Některé protilátky nezpůsobují buněčnou smrt samy o sobě, ale místo toho slouží k dopravení radioizotopů, toxinů, enzymů nebo cytostatik do tumoru. Specifické zacílení cytotoxických látek do nádorových buněk má potenciál k dosažení jejich vysoké koncentrace v místě nádoru, a to bez vedlejších účinků, které jsou při systémovém podání limitovány dávkou.

Radioimunokonjugáty selektivně dopraví radiaci do místa nádoru. Vysoko energetické radionuklidy, které vyzařují β částice, jako jsou ytrium-90 a jod-131, jsou rutinně vybírány k terapeutické aplikaci. Jejich cytotoxicita závisí na farmakokinetice protilátky, lokalizaci a zadržování radionuklidu. Zdravé tkáně, především kostní dřeň, jsou kvůli silné emisní energii také poškozovány. Tímto mechanismem zabíjejí nádorové buňky ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan (anti-CD20) a ^{131}I -tositumomab (anti-CD20).

Rostlinné a bakteriální toxiny (jako jsou ricin, difterický toxin nebo pseudomonádový toxin) mohou být připojeny přímo na monoklonální protilátky. Po navázání se a internalizaci v buňkách toxiny přerušují syntézu proteinů již v nízkých koncentracích. Ale tyto toxiny také u lidí vyvolávají silnou imunitní odpověď, která limituje jejich opakované podání ([Kreitman, 1999](#)).

Přímo na monoklonální protilátky mohou být také navázány léky jako jsou doxorubicin a kalicheamicin. Dopravení kalicheamicinu zprostředkované protilátkou umožňuje klinické použití této vysoce účinné látky, která by jinak byla příliš toxická na to, aby se mohla použít k systematickému podání.

Monoklonální protilátky mají synergické působení k chemoterapii a radioterapii. Současné a budoucí studie monoklonálních protilátek s biologickou léčbou by mohly také ukázat synergické působení s vylepšenými výsledky ([Rayzman et al., 2002](#)).

8. Cíle působení monoklonálních protilátek

8.1. Antigen CD20

CD20 je transmembránový protein a je exprimován v celém vývoji B-buněk, vyskytuje se jak na pre-B lymfocytech, tak na zralých B-lymfocytech. Jeho funkce není dosud zcela jasná, i když je známo, že je spojená s aktivací B-lymfocytů, regulací jejich růstu a řízením transportu vápníku ([Uchida et al., 2004](#)). Pozoruhodné je, že význačné rysy CD20, které vedly ke klinickému rozvoji cílené terapie, jsou vysoce exprimovány na B-buněčných lymfomech. Pozoruhodná je stejně tak skutečnost, že není rychle modulován, vylučován nebo skryt ([Cragg et al., 2005](#)).

8.1.1. Nekonjugované anti-CD20 protilátky

8.1.1.1. Rituximab

Viz kapitola 10.

8.1.1.2. Veltuzumab - humanizovaná anti-CD20 monoklonální protilátka: IMMU-106 (hA20)

I když měl rituximab hluboký vliv na léčbu B-buněčného NHL, předpokládá se, že myší komponenta chimérické protilátky přispívá k prodloužení doby podání infúze a k infúzním reakcím. Toto popohnalo vývoj humanizované protilátky anti-CD20. IMMU-106 neboli hA20 má více než 90% humanizovanou strukturu. Byla provedena studie na 20 pacientech s relabovaným indolentním nebo středně agresivním B-buněčným NHL. Infúzní reakce se vyskytla u 25% pacientů, ale byla mírnějšího průběhu a doba podání infúze byla podstatně kratší než u rituximabu, kdy průměrný čas první infúze trval něco málo přes 3 hodiny. A navíc test na HAMA byl negativní. Kompletní remise bylo dosaženo ve všech stupních velikosti dávky, dokonce u tří ze sedmi pacientů v dávce 120mg/m² ([Morschhauser et al., 2005](#)). Tato data jsou velmi povzbudivá. Dokonce ukázala i pozitivní odpověď na léčbu, takže je velmi pravděpodobné, že to povede ke zkoušení veltuzumabu v přední linii jak v monoterapii, tak v kombinaci s chemoterapií.

8.1.2. Radioimunoterapie používaná u protilátek anti-CD20

Na základě úspěšného klinického použití rituximabu byly anti-CD20 protilátky kombinovány s radioizotopy yttria (⁹⁰Y) a jodu (¹³¹I), ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan a ¹³¹I-

tositumomab s cílem potenciálního vylepšení jejich terapeutické účinnosti ([Levene et al., 2005](#)). Když byly tyto radioimunokonjugáty podány pacientovi infúzí, cirkulovaly, dokud se nenašly na buňky CD20+, které povolily radiaci prostřednictvím radioaktivních izotopů. A kromě toho dráha radioizotopů prodloužila účinek „křížové palby“, která nejspíš umožňuje vyzařované radiaci penetrovat do rozlehlého a řídké vaskularizovaného nádoru. Schválení ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetanu a ¹³¹I-tositumomabu mělo významný pozitivní efekt na dlouhodobý management folikulárního lymfomu. To umožnilo rozšířit škálu potenciálně úspěšných terapií relabovaného FL a nabídnout výtečnou reakci a trvání léčebného účinku spíše jednoduchou, ale elegantní léčebnou strategií ([Levene et al., 2005](#)).

8.2. Antigen CD22

CD22 se vyskytuje pouze na zralých B-lymfocytech. Více než v 90% je exprimován u NHL - u DLBCL (difúzní velkobuněčný B-lymfom) a u FL (folikulární lymfom). Předpokládá se, že jeho funkce je někde v průběhu aktivace B-buněk, ale není ještě kompletně definována. In vivo bylo prokázáno, že myší B-lymfocyty s chybějícím CD22 mají kratší životnost a je u nich zvýšená apoptóza. Když se na CD22 naváže jeho přirozený ligand nebo protilátka, poskytne pro-apoptický signál do B NHL buněk ([Sato et al., 1998](#)).

8.2.1. Nekonjugované anti-CD22 protilátky

Humanizovaná IgG1 monoklonální protilátka epratuzumab se váže na třetí extracelulární doménu antigenu CD22. Po navázání je komplex receptor/antigen rychle internalizován ([Shih et al., 1994](#), [Carnahan et al., 2003](#)). Na rozdíl od rituximabu, který je k B-lymfocytům toxický, epratuzumab se jeví tak, že moduluje aktivaci a signalizování B-buněk.

Ve studiích in vivo zahrnoval mechanismus účinku ADCC, CD22 fosforylaci a šíření inhibice ([Carnahan et al., 2007](#)). Epratuzumab byl hodnocen u dospělých pacientů s indolentním a agresivním B-buněčným NHL ([Leonard et al., 2005](#)). Byla zpozorována příznivá odpověď na léčbu včetně 43% celkové odpovědi na samotnou terapii epratuzumabem v dávkování 360 mg/m² u pacientů s opakujícím se FL ([Leonard et al., 2003](#)).

Dvě poslední studie podpořily myšlenku kombinace epratuzumabu s rituximabem (ER) nebo ER plus CHOP (ER-CHOP). ER byl hodnocen u 23 pacientů

s relabovaným nebo refrakterním NHL s indolentní nebo středně agresivní B-buněčnou NHL histologií. Výsledkem bylo zvýšení CR (kompletní remise) u indolentních lymfomů a RR (relativní riziko) u DLBCL v porovnání se samotným rituximabem ([Leonard et al., 2005](#)).

8.2.2 Konjugované protilátky anti-CD22

Klinické studie zkoumaly výsledky léčby radiokonjugátem ^{90}Y -epratuzumabem. V této studii tři ze šesti pacientů dostávali infúzi jednou za týden po 2-4 týdny, u dvou z těchto pacientů se objevila hematologická toxicita limitovaná dávkou. Tato léčba ukázala vysokou RR u pacientů s indolentním i agresivním lymfomem ([Linden et al., 2005](#)).

Další protilátka anti-CD22, která se těší velkému zájmu v klinických studiích, je inotuzumab ozogamicin (CMC-544). Tato protilátka je specificky cílená na antigen CD22, ale také konjugovaná s kalicheamicinem, což je antibiotikum s protinádorovým účinkem ([McCarron et al., 2005](#)).

Kalicheamicin byl zavedený jako efektivní strategie v léčbě akutní myeloidní leukémie (AML) s protilátkou anti-CD33 gemtuzumab ozogamicin. Jeho účinek je dán navázáním se na DNA a následným rozlomením dvoušroubovice DNA. Kalicheamicin konjugovaný s m5/44 (myší anti-CD22 monoklonální protilátka) byl účinný na modely B-buněčných lymfomů in vitro i in vivo a byl dokonce uznán jako více účinný než konjugace kalicheamicinu a rituximabu ([DiJoseph et al., 2004](#)).

8.3. Antigen CD80

CD80 je membránově vázaný antigen zapojující se do regulace T-lymfocytů ([Schultze et al., 1996](#)). U zdravých jedinců se CD80 vyskytuje na povrchu aktivovaných B-buněk, dendritických buněk a T-buněk jen mizivě ([Vyth-Dreese et al., 1995](#)). Ale na rozdíl od toho je CD80 exprimován u spousty lymfoidních malignit zahrnující například FL nebo Hodgkiský lymfom (HL) ([Dorfman et al., 1997](#), [Vooijs et al., 1997](#)). V porovnání s výskytem CD20 je CD80 většinou exprimován s nižší hustotou. Díky poněkud omezené expresi byl CD80 později identifikován jako potenciální cíl v léčbě lymfatických malignit. Preklinické studie prokázaly, že protilátky anti-CD80 mohou inhibovat proliferaci lymfomových buněk a indukovat ADCC ([Plumas et al., 1995](#)).

Galiximab je IgG1- λ anti-CD80 monoklonální protilátka s lidskou konstantní částí a variabilní částí primáta (*cynomolgus macaque*) ([Younes et al., 2003](#)). Účinek galiximabu v monoterapii byl vyzkoušen v multicentrické studii na pacientech s relabovaným nebo refrakterním B-buněčným folikulárním lymfomem. Průběh terapie byl bezpečný bez výskytu vážných vedlejších účinků a žádnému z pacientů se nevytvořily protilátky proti galiximabu.

V porovnání s rituximabem má galiximab delší poločas rozpadu, který je podobný protilátce anti-CD22 epratuzumabu, jež je v rozmezí mezi 2-4 týdny. I když byla ORR (celková léčebná odpověď) jen 11%, u 49% pacientů bylo prokázáno zmenšení velikosti nádoru. Zajímavé je, že u některých pacientů došlo k opoždění účinku a jeden pacient dosáhl CR až 1 rok po začátku terapie. Dva pacienti zůstali ve studii po 22 a 24,4 měsíců bez progresu ([Czuczman et al., 2005](#)).

8.4. Antigen CD52

CD52 je glykopeptid buněčného povrchu o velikosti 21-28kDa vyskytující se prakticky na všech lidských lymfocytech, monocytech, makrofázích a malé podskupině granulocytů. Nevyskytuje se na erytrocytech, krevních destičkách nebo na kmenových buňkách kostní dřeně. Je exprimován na všech maligních buňkách CLL a indolentních B-NHL ([Hale et al., 1985](#); [Salisbury, 1994](#)). Alemtuzumab je humanizovaná monoklonální protilátka namířená proti antigenu CD52 (viz kapitola 13) ([Wierda et al., 2005](#)).

8.5. Antigen CD2

CD2 je transmembránový glykoprotein, který hraje důležitou roli ve funkci T-lymfocytů a NK-buněk. CD2 má dvojí funkci, jako adhesivní molekula a jako co-stimulativní molekula prostřednictvím účinku svého ligandu CD58. CD2 antigen je tak dobrým cílem pro léčbu T-lymfomů ([King et al., 1996](#)).

Siplizumab je humanizovaná IgG1k monoklonální protilátka, která se váže na lidský antigen CD2. Preklinické studie ukázaly, že siplizumab zabíjí cílové buňky prostřednictvím ADCC. Léčba myši zaměřená na zralé lidské T-lymfomové/leukemické buňky siplizumabem výrazně prodloužila jejich dobu přežití a vedla k ubývání T a NK-buněk ([Zhang et al., 2003](#)).

Tyto protilátky jsou nyní zkoušeny v léčbě T-buněčné leukémie a periferních T-lymfomů ([Fanale et al., 2007](#)).

8.6. Antigen CD30

U zdravých jedinců je exprese CD30 omezena pouze na malý počet aktivovaných B a T-lymfocytů. CD30 se nachází na maligních buňkách Hodgkinského a Reed-Sternbergova (HRS) lymfomu a anaplastického velkobuněčného lymfomu (ALCL).

Mezi anti-CD30 protilátky patří chimérická protilátka SGN-30 a plně lidská monoklonální protilátka Iratumomab ([Cervený et al., 2004](#), [Ansell et al., 2004](#)).

8.7. Antigen CD40

CD40 se nachází na normálních B-lymfocytech, monocytech a dendritických buňkách a navíc také na několika typech epiteliálních a endoteliálních buněk. Nachází se na B a T-lymfocytech, HRS buňkách a na několika typech ostatních nádorů.

Na aktivovaných T-lymfocytech se převážně nachází CD40L. CD40L má rozličné fyziologické funkce zahrnující přípravu dendritických buněk k aktivaci cytotoxických T-lymfocytů CD8+, selekci a sebeobnovu B-buněk a zapojení imunoglobulinových izotypů. Na aktivovaných B-lymfocytech, NK-buňkách, monocytech, basofilech, eosinofilech, dendritických buňkách, krevních destičkách a endoteliálních buňkách a buňkách hladké svaloviny se CD40L vyskytuje zřídka. sCD40L (soluble CD40L) byl objeven v séru pacientů s lymfomou, CLL, autoimunitním onemocněním a esenciální trombocytémií ([van Kooten et al., 2000](#)).

Úloha sCD40L byla již kompletně zjištěna. Předběžná data ukázala, že vysoký výskyt sCD40L je nezávislým rizikovým faktorem pro špatnou prognózu u mnohočetného myelomu a akutní myeloidní leukémie, ale ne pro lymfom z plášťových buněk ([Hock et al., 2006](#)). Protilátky proti antigenu CD40 jsou SGN-40 a HCD122 ([Law et al., 2005](#)).

8.8. TRAIL a jeho receptory

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)/Apo2 je smrtící protein, který patří do rodiny TNF. Má čtyři výhradní receptory: TRAIL-R1 (DR4), -R2 (DR5, KILLER, TRICK2), -R3 (DcR1, TRID, LIT) a -R4 (DcR2 TRUNDD) ([Bhardwaj et al., 2003](#)). TRAIL-R1 a -R2 jsou smrtící receptory, zatímco TRAIL-R3 a -R4 se velmi často nazývají decoy receptory (odlákání pozornosti) ([Degli-Esposti, 1999](#)).

TRAIL přednostně zabíjí nádorové buňky, zatímco k normálním tkáním je šetrný, což ho dělá potenciálně užitečným v protinádorové terapii. Na normálních tkáních se obvykle death receptory TRAIL-R1 a -R2 nevyskytují, tudíž jsou chráněny před apoptózou indukovanou TRAIL. Ale na rozdíl od normálních tkání se receptory TRAIL-R1 a -R2 nachází na mnoha tumorech, a proto jsou citlivější k TRAIL indukované apoptóze. V podstatě spouštění TRAIL smrtících receptorů TRAIL proteinem nebo agonistickými protilátkami přivodilo u různých nádorů buněčnou smrt ([Pukac et al., 2005](#)).

Mapatumumab (anti-TRAIL-R1) a lexatumumab (anti-TRAIL-R2) jsou plně lidské anti-TRAIL monoklonální protilátky ([Klener et al., 2009](#)).

8.9. BAFF, APRIL a jejich receptory

BAFF (aktivační faktor B-buněk, znám také jako BlyS, TALL-1, ZANK, zTNF4 nebo TNFS 13B) se vyskytuje na makrofázích, monocytech a dendritických buňkách, ale nenachází se na nezhooubných B a T-lymfocytech ([Schneider et al., 2003](#)).

BAFF se váže na tři receptory, které se přednostně vyskytují na B-buňkách: BAFF-R (BR-3); TACI (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor) a BCMA (B-cell maturation antigen) ([Mackay et al., 2003](#)). Tyto tři receptory se téměř výhradně vyskytují na B-lymfocytech, i když kopie TACI byla zpozorována i na T-lymfocytech. BAFF je důležitý faktor jak pro benigní i maligní B-lymfocyty ([Schneider et al., 2003](#)).

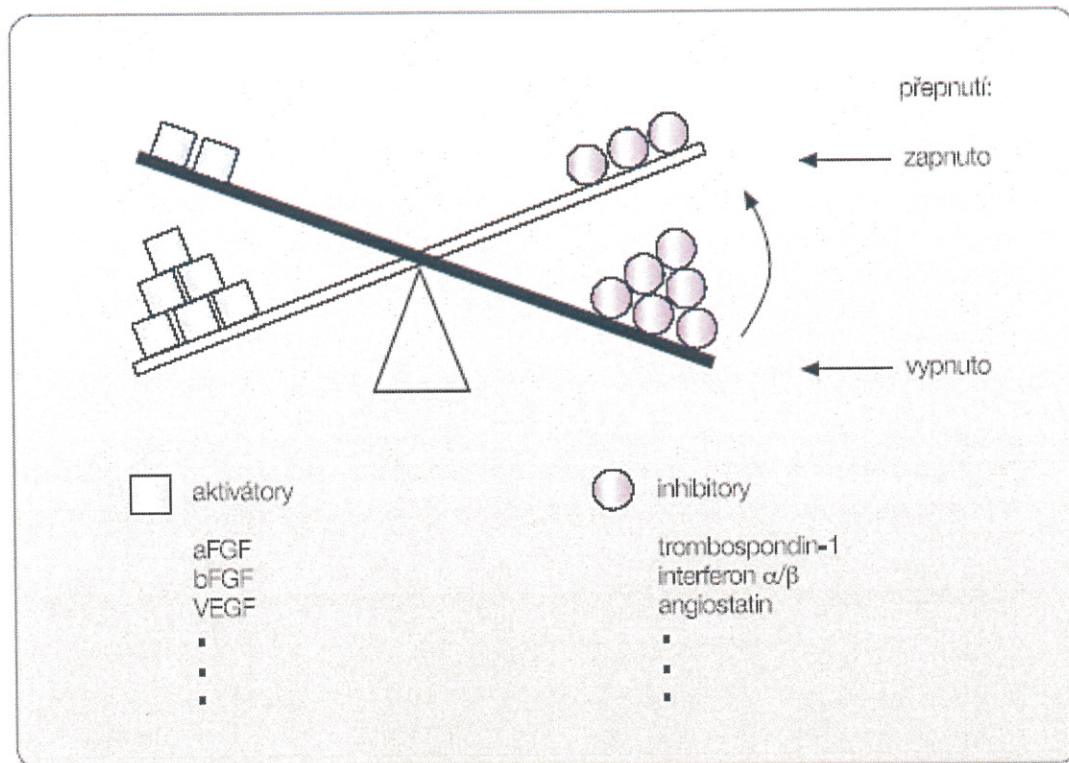
APRIL je vyměšovací protein vyskytující se na monocytech, makrofázích, dendritických buňkách a T-lymfocytech ([Medema et al., 2003](#)). APRIL se váže na TACI a BCMA receptory.

Neregulovaný výskyt BAFF a APRIL byl zpozorován u pacientů s různými NHL malignitami ([Novak et al., 2002](#)).

8.10. VEGF (vaskulární endoteliální faktor)

Angiogeneze je novotvorba cév, která se podílí na regeneraci zranění, novotvorbě tkání (např. menstruace), na zánětlivých procesech a nádorovém růstu ([Folkman, 2007](#)). Angiogeneze je kaskádovitý proces, který zahrnuje vasodilataci, zvyšuje vaskulární permeabilitu, endoteliální buněčnou proliferaci a migraci, která vyúsťuje k novotvorbě kapilár nebo jejich rozšíření. Nedostatečná perfúze nádorových

tkání a hypoxie stimuluje novotvorbu cév. Tento proces je regulován množstvím růstových faktorů a receptorů zahrnující VEGF a jejich receptory VEGFR (Olsson et al., 2006). Hypotéza rovnováhy faktorů je znázorněna na **obrázku 3**.



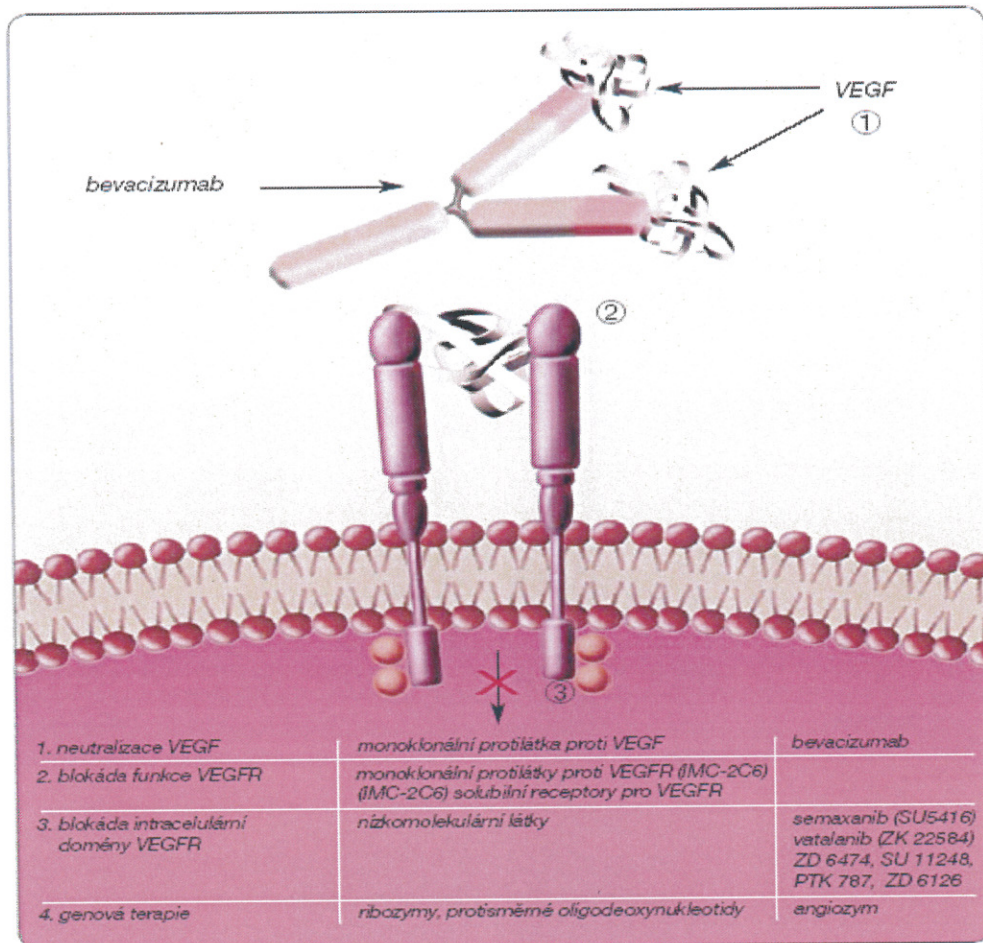
Obr.3 Zapnutí angiogeneze – hypotéza rovnováhy – zapnutí angiogeneze je regulováno mezi jejími aktivátory a inhibitory. Převaha inhibitorů angiogenezi vypíná, převaha aktivátorů ji zapíná (Adam et al., 2005).

Rodina VEGF se skládá ze šesti růstových faktorů (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E a PGF - placental growth factor) a tří receptorů, VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) a VEGFR-3 (Flt-4). Tyto tři receptory jsou transmembránové tyrozinkinázy, které se přednostně nachází na endoteliálních buňkách.

Aktivace VEGFR-2 prostřednictvím jeho ligandů způsobí zvýšení permeability kapilár a zvýšení migrace a proliferace endoteliálních buněk, který je dělá hlavním cílem terapie (Rosen, 2002). Zvýšená exprese VEGF u solidních nádorů je spojena s horší prognózou (Sledge, 2002). Jako důsledek vysoké exprese VEGF je vaskularizace nádoru chaotická a abnormální.

Inhibicí VEGF v tumoru může být indukována normalizace těchto cév, z čehož vyplývá možnost potenciálního snížení kapacity cév a intersticiálního tlaku v nádoru, který umožňuje snadnější přívod kyslíku a cytostatik do nádoru ([Willett et al., 2004](#)).

Bylo prokázáno, že antiangiogenní terapie by mohla být neefektivnější u mikrometastatického onemocnění a že léčba anti-VEGF může neúčinněji inhibovat nádorový růst na počátku angiogenního procesu ([Li et al., 2000](#)) (viz obr. 4).



Obr. 4 Angiogenní faktory uvolňované z nádorových buněk ([Adam et al., 2005](#)).

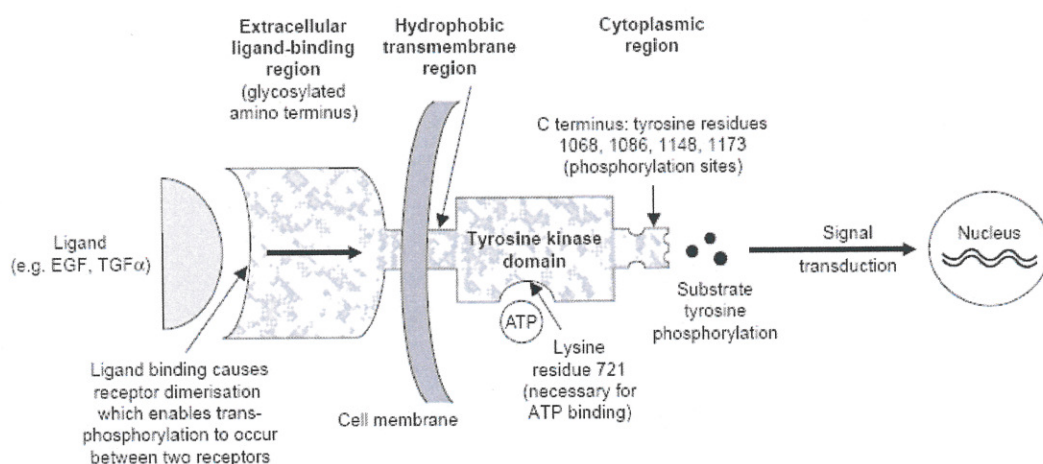
Monoklonální protilátka anti-VEGF bevacizumab bude probrána níže (viz kapitola 14).

8.11. EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor

8.11.1. Struktura a funkce EGFR

EGFR je transmembránový glykoprotein o velikosti 170kDa, který má intracelulární doménu, jež po navázání ligandu zprostředkovává prostřednictvím tyrozinkinázové aktivity přenos signálu do buňky. Nachází se na mnoha typech buněk kromě hematopoetických (Velu, 1990).

Jak je znázorněno na **obrázku 5**, EGFR se skládá ze tří hlavních částí: N-terminální extracelulární doména, hydrofobní transmembránová doména a C-terminální intracelulární doména, která zahrnuje tyrozinkinázovou doménu. Extracelulární doména je místo pro navázání různých polypeptidických růstových faktorů, zejména EGF a TGF- α (Velu, 1990; Hernández-Sotomayor et al., 1992).



Obr.5: Struktura a funkce EGFR. Tři hlavní domény EGFR jsou: 1) N-terminální extracelulární doména (621 AMK); 2) hydrofobní transmembránová doména (23 AMK); 3) C-terminální cytoplazmatická doména (542 AMK), která zahrnuje tyrozinkinázovou doménu (cca 250 AMK). Poslední 721.aminokyselinou je lysin, na který se váže ATP poskytující fosfát pro fosforylaci tyrozinu. Hlavní místa fosforylace jsou lokalizována na C-konci (např. tyrozinové zbytky 1068, 1086, 1148, 1173). Stimulace EGFR tyrozinkinázy navázáním ligandu (TGF- α nebo EGF) na receptor vede k jeho transfosforylaci a fosforylaci tyrozinových zbytků z různých buněčných substrátů. Důsledkem signálních drah jsou aktivovány takové extracelulární signály, které jsou transdukovány k intracelulární odpovědi (Todderud et al., 1989; Velu, 1990; Hernández-Sotomayor et al., 1992), (Raymond et al., 2000).

8.11.1.1. Ligandy

EGFR je znám jako receptor pro EGF a TGF- α , ale není specifický jen pro tyto ligandy, nýbrž i pro amfiregulin, β -cellulin, HB-EGF (heparin-binding EGF), epiregulin a VGF(vaccinia virus growth factor) se také váží na EGFR ([Fry, 1999](#)).

Nejrozšířenějším ligandem vyskytujícím se v lidských tkáních je TGF- α . TGF- α je produkován jak normálními, tak maligními buňkami a lokálně účinkuje prostřednictvím parakrinního, autokrinního a juxtakrinního systému. EGF se nachází téměř ve všech tělních tekutinách při normálních fyziologických podmínkách; je syntetizován v ledvinách a slinných žlázách a zdá se, že funguje hlavně prostřednictvím endokrinního systému.

Kromě mitogenní aktivity mají TGF- α a EGF další jiné aktivity, kterými jsou stimulace metabolismu kyseliny arachidonové, indukce kostní resorpce a hyperkalcémie, kontrakční aktivita na hladkou svalovinu cév a inhibice sekrece žaludeční kyseliny ([Velu, 1990](#)). Zvýšená exprese nebo mutace EGFR hraje zásadní roli ve vývoji a progresi nádorů ([Davies et al., 1996](#)).

8.11.1.2. EGFR a signální transdukce

Po navázání ligandu na extracelulární doménu EGFR nastává dimerizace receptoru a intracelulární tyrozinkináza je aktivována. Výsledkem je navázání ATP na tyrozinkinázovou doménu. Toto vede k receptorové autofosforylaci a transfosforylaci. Autofosforylace receptoru včlení fosfát do některých C-terminálních tyrozinových zbytků, které se stanou dokovacími místy pro Src homology 2 (SH2) ([Hernández-Sotomayor, 1992](#)).

Rodina EGFR má schopnost poskytovat obrovskou signální rozmanitost ve své kinázové aktivitě, která je závislá na selektivitě ligandu, vazebných místech pro signální proteiny, které jsou aktivovány, a vnitřní substrátové specifitě ([Fry, 1999](#)).

8.11.2. Buněčné účinky aktivace EGFR

8.11.2.1. Proliferace

Tyrozinkinázová aktivita EGFR představuje efektorovou funkci a jeho nezbytnost pro signální transdukci vyvolávající biologickou odpověď cílenou buňkou. Mezi různými reakcemi, které zvyšují sílu vazby ligandu na EGFR, byla mitogenní

reakce značně studována od buněčné proliferace, u které je evidentní, že je to cesta, kterou EGFR může přispět k maligní transformaci.

Buňky se mohou stát maligními díky endogenní produkci růstových faktorů, které účinkují prostřednictvím autokrinního systému. Ačkoliv k dosažení maligní transformace musí být EGFR vysoce exprimován v závislosti na přítomnosti aktivačních ligandů, normální buněčná exprese EGFR nepodstupuje signalizaci závislou na přítomnosti daného růstového faktoru (ligand-dependent signaling). Nicméně kontinuální expozice ligandu může vést k hyperproliferaci. To se může vyskytnout díky neplánované autokrinní syntéze ligandu premaligními buňkami nebo abnormální distribucí EGFR ([Davies et al., 1996](#)).

8.11.2.2. Další biologické účinky

Různorodost jiných biologických reakcí ústících z aktivace EGFR jsou také důležité pro tumorovou progresi zahrnující účinky na buněčnou motilitu, adhezi, invazi, sebeobnovu a angiogenezi. Buněčný pohyb iniciovaný EGFR (např. podpora motility nádorových buněk, adheze a invaze) vyžaduje tyrozinkinázovou aktivitu a transfosforylaci a zdá se být různě regulována mitogenními signály.

Modifikace stimulovaná EGF u adheze různých maligních buněk pomáhá při jejich transmigraci do extravaskulárních prostorů. Zdá se, že EGF i amfiredulin modulují metastázování buněk u rakoviny prsu a exprese EGFR se ukazuje jako důležitý faktor metastáz u rakoviny žaludku a tlustého střeva ([Woodburn, 1999](#)).

TGF- α podporuje expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), což zvyšuje permeabilitu cévních buněk a co-exprese EGFR a TGF- α jeví silnou korelaci s MVD (microvessel density) u invazivních nádorů ([de Jong et al., 1998](#)).

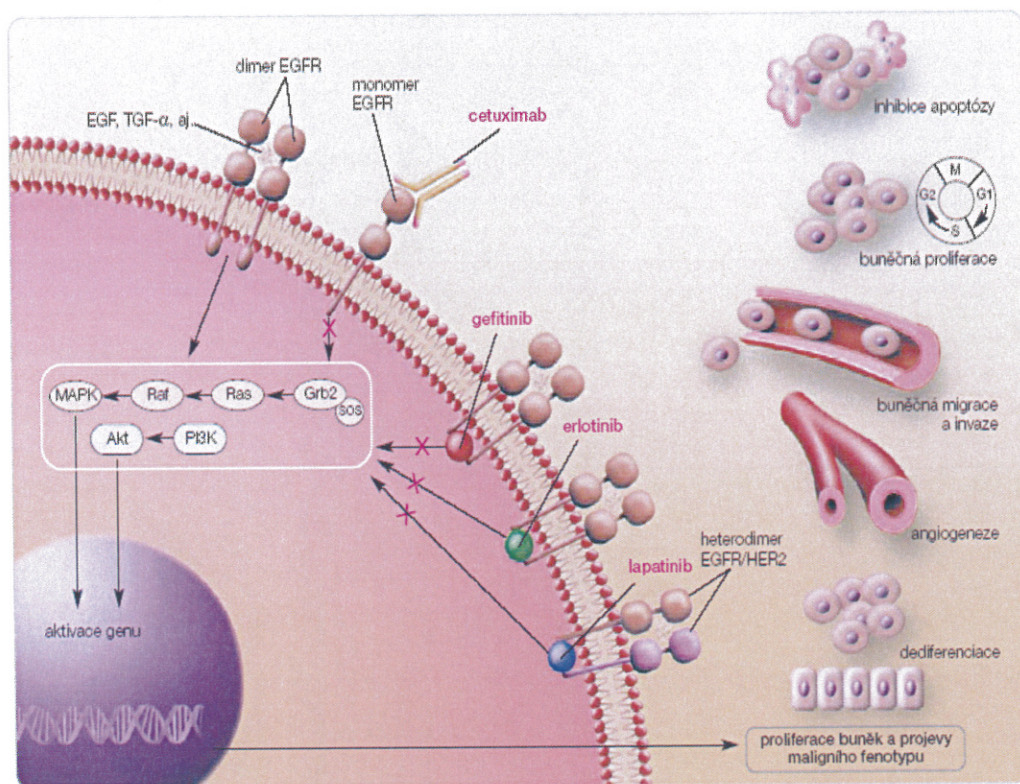
Vliv na buněčnou sebeobnovu dokazuje nález, že EGF je při zvýšené expresi EGFR antiapoptický ([Kulik et al., 1997](#)).

8.11.3. Inhibice EGFR

Přestože byl zaznamenán velký pokrok v protinádorové léčbě, mnoho typů solidních nádorů stále zůstávaly rezistentní ke konvenční léčbě. V posledních letech byl vysoký zájem o vývoj nových terapeutických látek, které jsou specificky cíleny na růstové faktory a jsou v nádorových buňkách neregulovány. Tyto cílené látky mohou nabídnout alternativní léčbu pro pacienty, kteří jsou ke standardní chemoterapii citliví

nebo odolní. Ke zvýšení léčebného účinku a snížení dávek může být cílená terapie a standardní terapie použita v kombinaci díky jejich jedinečnému mechanickému účinku a profilu toxicity, které se zpravidla nepřekrývají.

Látky cílené proti členům rodiny receptorů pro epidermální růstový faktor EGFR 1 a EGFR 2 ukázaly slibný terapeutický účinek. První látka schválená v roce 1998 FDA byl trastuzumab (Herceptin) pro léčbu HER-2 (ErbB-2) – pozitivní rakoviny prsu. O několik let později dostaly povolení další tři specifické látky anti-EGFR (EGFR1/ErbB-1), kterými byly cetuximab (Erbix), pro léčbu metastatického kolorektálního karcinomu (mCRC) a spinocelulárního karcinomu hlavy a krku (SCCHN), erlotinib (Tarceva), pro pokročilou nebo metastickou rakovinu pankreatu a nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) a gefitinib (Ureasa), pro pokročilý nebo metastatický NSCLC ([Glaccone et al., 2004](#); [Herbst et al., 2004](#); [Thatcher et al., 2005](#)) (obr. 6).



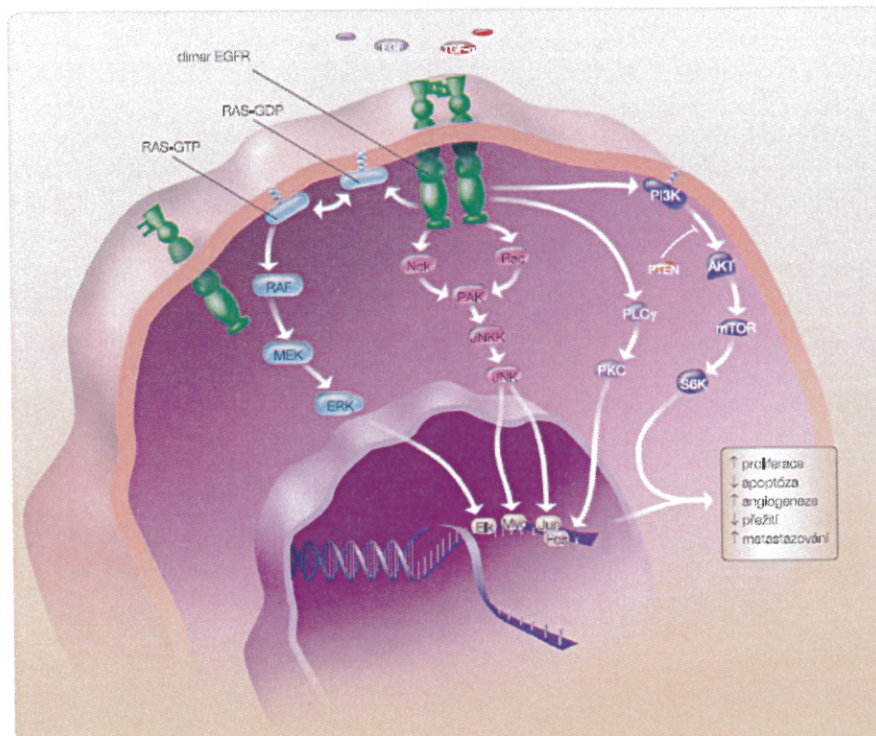
Obr.6 Schematické znázornění mechanismu účinku inhibitorů receptoru pro EGFR – EGFR je aktivován některým z růstových faktorů, nejčastěji EGF a TGF- α . EGFR se skládá z extracelulární části odpovědné za vazbu ligandu, transmembránové části a cytoplazmatické části, která má tyrozin kinázovou aktivitu. Po navázání ligandu (EGF, TGF- α aj.) na receptor následuje jeho homodimerizace (v případě vazby dvou EGFR) nebo heterodimerizace (v případě vazby s jiným receptorem z téže rodiny) a autofosforylace. Tím je zahájena signální kaskáda, ve které je řadou navazujících fosforylací přenesen signál až do jádra, kde se projeví aktivací transkripce cílových genů. Následně dochází k proliferaci buněk i k jiným projevům maligního fenotypu. Cetuximab kompetitivně inhibuje vazbu endogenního ligandu (EGF, TGF- α) na EGFR. Inhibitory blokující tyrozin kinázovou aktivitu (gefitinib, erlotinib, lapatinib) se kompetitivně vážou na vazebné místo pro makroergní fosfát ATP na cytoplazmatické doméně receptoru. Tím dojde k zablokování fosforylace a přenosu signálu. Lapatinib se vyznačuje od gefitinibu a erlotinibu duální aktivitou a je schopen současně blokovat receptory EGFR i HER2. Grb-2- growth factor receptor-bound protein 2 (adaptorový protein 2 pro receptor růstového faktoru; PI3 – phosphatidylinositol-3-kinasa; MAPK-mitogen activated protein kinase (mitogeny aktivovaná proteinkináza; Akt (PKB) – proteinkináza B) (Neuwirthová et al., 2007).

8.11.4. Prognostický a prediktivní význam EGFR

Aktivace EGFR podporuje proces zodpovědný za nádorový růst a progresi zahrnující proliferaci, zranění, angiogenezi, invazi, metastázování a inhibici apoptózy (obr. 7).

Navíc exprese EGFR byla zjištěna v různém rozsahu u široké škály solidních tumorů (tab. 3). Ačkoliv prognostický význam exprese EGFR zůstává nejasný u

rakoviny žaludku, prsu, endometria, kolorektálního karcinomu a relativně nízkého prognostického významu u NSCLC, retrospektivní přezkoumání studií EGFR ukázalo, že stupeň exprese EGFR je vysoce prediktivní u pacientů s rakovinou hlavy a krku, vaječníků, děložního čípku, močového měchýře a jícnu (Nicholson et al., 2001).



Obr.7 Schéma receptoru pro EGFR a souvisejících signálních drah. EGF – epidermální růstový faktor, TGF- α – transformující růstový faktor α , GDP – guanosindifosfát, GTP – guanosintrifosfát, JNK – jun N-terminální kináza, JNKK – JNK aktivovaná kináza, PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza, PTEN – phosphatase and tensin homolog, mTOR – mammalian target of rapamycin (Němeček et al., 2008).

Tab.3 Exprese EGFR je běžnou součástí lidských nádorů ([Adam et al., 2005](#)).

Typ nádoru	Četnost nádorových buněk s expresí EGFR
Kolorektální karcinom	25 – 77%
Karcinom hlavy a krku	95 – 100%
Karcinom prostaty	65%
Karcinom pankreatu	3 – 89%
Karcinom plic	40 – 80%
Karcinom ledvin	50 – 90%
Karcinom prsu	14 – 91%
Karcinom jícnu	43 – 89%
Karcinom vaječníků	35 – 70%
Karcinom čípku děložního	90%
Karcinom močového měchýře	31 – 48%
Gliomy	40 – 63%

9. Přehled monoklonálních protilátek

V následujícím přehledu budou uvedeny protilátky, které jsou v nádorové terapii používány nebo se jeví perspektivně (tab. 4 – 6) ([Klener et al., 2009](#)).

Tab. 4 Čistě lidské (mumab), čistě myší (momab) a bispecifické/trifunkční monoklonální protilátky. Protilátky registrované a používané v České republice jsou zvýrazněny.

Čistě lidské protilátky	Obchodní přípravek	Cílová struktura
panitumumab	Vectibix	EGFR/ERBB1/HER1
ofatumumab	-	CD20
zanolimumab	HuMaxCD4	CD4
iratumumab	-	CD30
ipilimumab	-	CTLA4
adecatumumab	-	EpCAM(CD326)
denosumab	Prolia	RANKL
mapatumumab	-	DR4/TRAILR1
lexatumumab	-	DR5/TRAILR2
figitumumab	-	IGF1R
Čistě myší protilátky	Obchodní přípravek	Cílová struktura
ibritumomab (90Yt)	Zavalin	CD20
tositumomab	Bexxar	CD20
bectumomab	LymphoScan	CD22
abagovomab	-	CA-125
erogovomab	Ovarex	CA-125
pentumomab	Theragyn	MUC1
Bispecifické/trifunkční protilátky	Obchodní přípravek	Cílová struktura
catumaxomab	Remova	CD3, EpCAM
ertumaxomab	Rexomun	CD3, ERBB2/HER2/NEU

Tab. 5 Chimérické monoklonální protilátky. Protilátky registrované v České republice jsou zvýrazněny.

Protilátka	Obchodní přípravek	Cílová struktura
rituximab	MabThera	CD20
galiximab	Primatized	CD80
lumiliximab	Lucid	CD23
brentuximab vedotin (SGN-35)	-	CD30*
basiliximab	Simulect	CD25
cetuximab	Erbitux	EGFR/ERBB1/HER1
volociximab	-	α 5- β 1 integrin
81C6(¹³¹ I)	Neuradiab	Tenascin

*) protilátka konjugovaná s monometylauristatinem E

Tab. 6 Humanizované MoAb. Registrované v ČR jsou zvýrazněny.

Protilátka	Obchodní přípravek	Cílová struktura
bevacizumab	Avastin	VEGF
ranibizumab	Lucentis	VEGF
trastuzumab	Herceptin	ERBB2/HER2/NEU
pertuzumab	Omnitarg	ERBB2/HER2/NEU
nimotuzumab	Theraloc	EGFR/ERBB1/HER1
alemtuzumab	MabCampath	CD52
lintuzumab	Zamyl	CD33
dacetuzumab (SGN-40)	-	CD40
epratuzumab	-	CD22
veltuzumab	-	CD20
apolizumab	Remitogen	HLA-DR
milatuzumab	-	CD74
daclizumab	Zenapax	IL2R
tocilizumab	Actemra	IL6R
mepolizumab	Bosatria	IL5
labetuzumab (131I)	-	CEA, CIDE
gentuzumab ozogamicin *)	Mylotarg	CD33
inotuzumab ozogamicin *)	-	CD22
tacatuzumab tetraxetan **) (⁹⁰ Yt)		

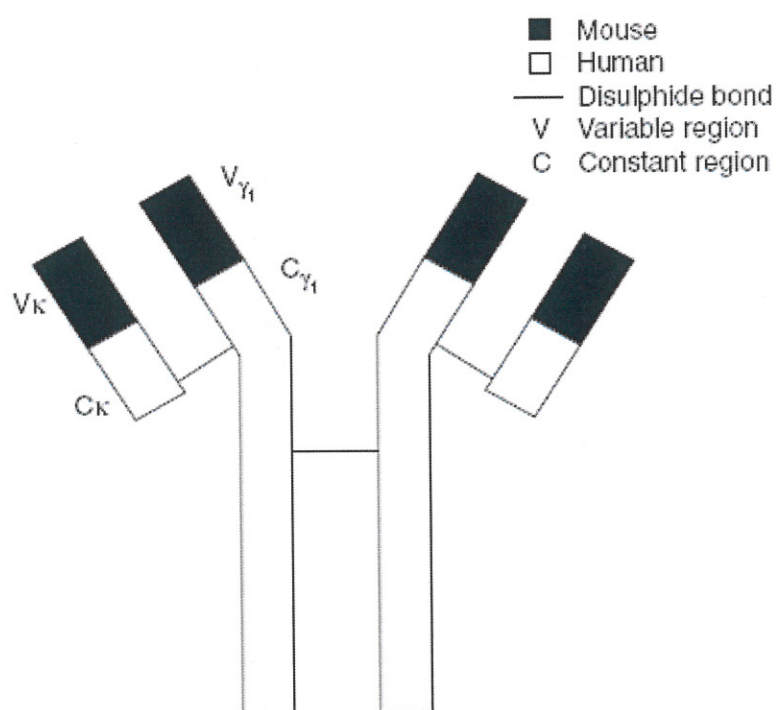
*) protilátky konjugované s kalicheamicinem

**) protilátka konjugovaná s ytriem ⁹⁰Yt

10. Rituximab

Rituximab je chimérická IgG1- κ monoklonální protilátka, která obsahuje myší lehký a těžký řetězec a lidskou konstantní část (**obr. 8**). Rituximab je cílený proti antigenu CD20 vyskytující se na maligních a normálních B-lymfocytech ([Onrust et al., 1999](#)). CD20 je exprimován více jak na 90% B-buňkách NHL ([Demiden et al., 1997](#)), ale s nižší hustotou se vyskytuje na buňkách CLL ([Petryk et al., 2000](#)). Ačkoliv je rituximab cytotoxický jak k normálním, tak i k maligním B-lymfocytům, normální buňky se znovu po terapii obnoví, protože CD20 není exprimován na hematopoetických kmenových buňkách ([Grillo-L'opez et al., 2002](#)).

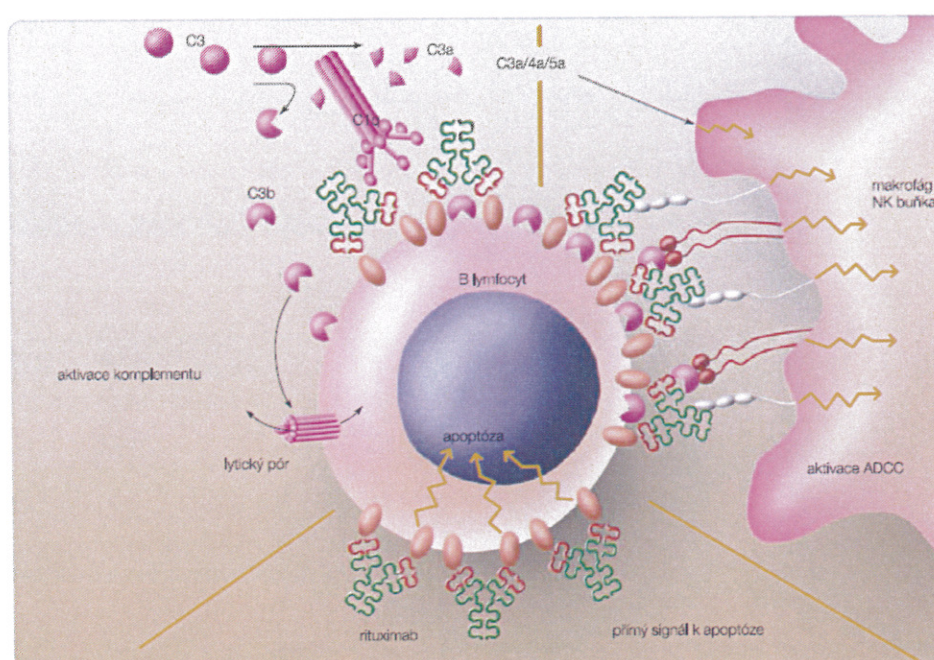
Rituximab způsobí rychlou a výraznou depleci B-lymfocytů v periferní krvi, která trvá asi šest měsíců po standardním podání rituximabu a je následována regenerací lymfopenie 9-12 měsíců po ukončení léčby ([McLaughlin et al., 1998](#)).



Obr. 8 Schéma rituximabu ([Onrust et al., 1999](#)).

10.1. Mechanismus účinku

Mechanismus účinku této anti-CD20 monoklonální protilátky je znázorněn na **obr. 9**. Jeden mechanismus je CDC (complement-dependent cytotoxicity = cytotoxicita závislá na komplementu). Blokované experimenty dokázaly, že inhibitory komplementu CD46, CD55 a CD59 hrají důležitou roli v regulaci anti-CD20 zprostředkovanou CDC ([Golay et al., 2001](#)), CDCC (complement dependent cellular toxicity), ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) ([Flieger et al., 2000](#)) a indukcí apoptózy ([Chow et al., 2002](#)).



Obr. 9 Předpokládaný mechanismus účinku rituximabu. Deplece B buněk je vyvolána jejich lýzou na základě komplement-dependentní cytotoxicity, na základě buněčné toxicity závislé na protilátkách nebo na základě signálem zprostředkované apoptózy. Rituximab může navázáním na CD20 povrchový antigen spustit signální kaskádu vedoucí k apoptóze B-lymfocyty. Po navázání rituximabu na CD20 mohou jeho Fc domény aktivovat komplement. Navázání C1q domény komplementu spouští klasickou cestu aktivace komplementu. Aktivace komplementu vede k uvolnění anafylatoxinů C3a/4a/5a, k opsonizaci B-lymfocytů C3b fragmentem komplementu a k tvorbě lytických párů. Rituximab, anafylatoxiny i opsonizované struktury mohou aktivovat makrofágy a NK buňky (tzn. cytotoxickou reakci závislou na protilátkách, ADCC), které způsobí zánik B-lymfocyty ([Pavelka, 2007](#)).

Rituximab také zvyšuje účinek chemoterapeutik a jiných dalších cílených látek. Má synergický účinek se širokou škálou léčiv včetně těch, které jsou běžně používány k léčbě B-buněčných hematologických malignit ([Chow et al., 2002](#)).

10.2. Indikace

Rituximab je schválen FDA pro léčbu dvou nejčastějších podtypů NHL, kterými jsou folikulární lymfom (FL) a difúzivní velkobuněčný ne Hodgkinův maligní lymfom z B-buněk (DLBCL) ([Rituxan, 2009](#)). Rituximab je zapsaný v NCCN (National Comprehensive Cancer Network) Clinical Practice Guidelines in Oncology a v NCCN Drugs and Biologics Compendium for NHL a jiné B-buněčné malignity, včetně CLL (chronické lymfocytární anémie) ([NCCN – drugs & biologics compendium, 2009](#); [NCCN clinical practice guidelines in oncology, non-Hodgkin's lymphoma, 2009](#)).

V roce 2009 proběhlo 801 klinických studií testujících účinek rituximabu u dalších hematologických malignit, kterými jsou lymfomy z plášťové zóny, primární lymfomy CNS, Waldenstormova choroba, MALT lymfomy, mnohočetný myelom, Hodgkinův lymfom a autoimunitních chorob (ITP – idiopatická trombocytopenická purpura, AIHA – autoimunitní hemolytická anémie) aj. ([Klener et al., 2009](#)).

10.3. Nežádoucí účinky

Terapie rituximabem je spojena s mírnými a snesitelnými nežádoucími účinky. Vzácně byl zaznamenán výskyt HAMA, ale nebyl nijak klinicky významný. Se zvyšujícím se počtem cirkulujících leukemických buněk stoupá riziko nežádoucích účinků kvůli vyplavení cytokinů, jako jsou TNF- α (tumor necrosis faktor- α) a IL-6 (interleukin-6). U většiny pacientů symptomy (horečka, zimnice, vyrážka a nauzea) odezněly celkem rychle při podání vhodné dávky.

Léčbu rituximabem může provázet prudká infúzní reakce, pokud se v periferní krvi objevuje velmi vysoký počet leukocytů ([Winkler et al., 1999](#); [Byrd et al., 1999](#)). Tento stav je komplikován rychlou aglutinací nádorových buněk ([Kunzmann et al., 2001](#)) a/nebo lýzou leukemických buněk ([Jensen et al., 1998](#)) a je s ní spojená vysoká úmrtnost při léčbě. Ale na rozdíl od cytostatik, rituximab není významně hematotoxický, tak může být podáván v monoterapii u pacientů s nízkou zásobou kostní dřeně, u kterých jiné možnosti léčby selhaly ([Schriever et al., 2003](#)).

11. Trastuzumab

Trastuzumab (Herceptin) je humanizovaná IgG1- κ monoklonální protilátka s afinitou k extracelulární doméně HER2. Tato protilátka vykazuje účinek v léčbě HER2-pozitivní metastatické rakoviny prsu ([McKeage et al., 2002](#)). Navíc vykazuje pozitivní účinky v léčbě časného HER2-pozitivního karcinomu prsu po chirurgickém zákroku, chemoterapii (neoadjuvantní nebo adjuvantní) a radioterapii. Klinický přínos trastuzumabu se vyskytuje tam, kde je vysoká exprese HER2 ([Plosker et al., 2006](#)).

Pozitivní HER2 rakovina prsu může být také pozitivní pro receptory estrogenu a progesteronu (ER a PgR), známé jako hormonální receptory (HRs). 11-35% pacientů s ER-pozitivní rakovinou prsu bylo také HER2-pozitivních. Ústřední klinická studie trastuzumabu ukázala, že přibližně 50% pacientů s HER2-pozitivní metastatickou rakovinou prsu bylo také ER-pozitivních ([Jackisch, 2007](#)). U pacientů, kteří byli pozitivní na oba tyto receptory, byl výběr léčby náročný díky dvou možným způsobům terapie: trastuzumab v kombinaci s taxany vs. inhibitor aromatázy v monoterapii ([EMA, 2007](#)).

11.1. Mechanismus účinku

Trastuzumab se váže na extracelulární doménu HER2, což je transmembránový glykoproteinový receptor s vnitřní tyrozin kinázovou aktivitou patřící do rodiny EGFR ([McKeage et al., 2002](#)). Trastuzumab inhibuje buněčnou proliferaci a sebeobnovu u HER2-pozitivních tumorů ([Hudis, 2007](#)). Trastuzumab působí vícero mechanismy zahrnující prevenci štěpení HER2, inhibici angiogeneze, indukci buňkami zprostředkované imunity (ADCC), blok progresu buněčného cyklu přerušením signalizačních kaskád a downregulací receptoru HER2 z buněčného povrchu ([Albanell et al., 2003](#); [Ocana et al., 2006](#)). Trastuzumabem způsobená apoptóza se zdá být také jedním z protinádorového účinku ([Mohsin et al., 2005](#)).

11.2. Indikace

Trastuzumab je indikován v terapii metastatického karcinomu prsu se zvýšenou expresí HER2, ER-pozitivních nádorů prsu, HER2-pozitivních časných karcinomů prsu, po chirurgickém zákroku, chemoterapii a radioterapii. V monoterapii lze použít pouze u pacientek, které byly již léčeny nejméně dvěma chemoterapeutickými režimy, které selhaly. Jinak se trastuzumab používá v kombinaci s taxany, inhibitory aromatáz a

zkouší se kombinace s kapecitabinem, gemcitabinem nebo vinorelbinem ([Klener et al., 2009](#)).

11.3. Nežádoucí účinky

Trastuzumab je spojován s některými závažnými nežádoucími účinky, kterými jsou kardiální toxicita projevující se ventrikulární dysfunkcí, postinfúzní alergická reakce, hypersenzitivní reakce zahrnující anafylaxi a pneumotoxicita ([Herceptin SPC, 2005](#)).

12. Cetuximab

Cetuximab je chimérická IgG1 monoklonální protilátka proti extracelulární doméně receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) ([Bernier, 2006](#)). Stericky inhibuje vazbu endogenního ligandu. Tím zablokuje aktivaci signální kaskády zprostředkované EGFR a díky tomu působí protinádorovým účinkem. Mimo to se zdá, že cetuximab zvyšuje protinádorový účinek chemoterapeutik a radioterapie ([Prewett et al., 2002](#)).

12.1. Mechanismus účinku

Cetuximab má vyšší afinitu k EGFR než EGF nebo TGF- α a působí tak jako jejich kompetitivní inhibitor. Protinádorový účinek cetuximabu je zprostředkován několika mechanismy ([Baselga, 2001](#)). Cetuximab inhibuje progresi buněčného cyklu v G₁ fázi prostřednictvím zvýšení exprese inhibitoru buněčného cyklu p27^{KIP1} ([Huang et al., 1999](#)). Výsledkem je omezení buněčné proliferace ([Baselga, 2001](#)).

Cetuximab také indukce apoptózu nádorových buněk posměněním poměru exprese Bax (proapoptický protein) ku Bcl-2 (antiapoptický protein) ([Huang et al., 1999](#)) a zvýšením exprese apoptických kaspáz ([Baselga, 2001](#)).

Snižuje produkci autokrinních růstových faktorů včetně TGF- α a amfregulinu, angiogenních faktorů spojených s proliferací kapilár zahrnující vaskulární endoteliální faktor (VEGF) ([Ciardiello et al., 1996](#)).

Je také dokázáno, že cetuximab inhibuje invazivitu a metastázování tumorových buněk, nejspíše inhibicí exprese a aktivity molekul, které hrají klíčovou roli v adhezi nádorových buněk, jako je metaloproteináza-9 ([Matsumoto et al., 1998](#)).

12.2. Indikace

Cetuximab je indikován k léčbě EGFR-pozitivního metastatického kolorektálního karcinomu s nemutovaným genem KRAS u buněk nádorové tkáně (cca 60% pacientů), a to v kombinaci s chemoterapií nebo v monoterapii.

Je také indikován k terapii lokálně pokročilých forem spinocelulárního karcinomu hlavy a krku (SCCHN) v kombinaci s chemoterapií nebo s platinovými deriváty ([Klener et al., 2009](#)).

12.3. Nežádoucí účinky

Mezi nejčastější nežádoucí účinky v monoterapii patří kožní příznaky, zejména akneiformní vyrážky (**obr. 10**), astenie, bolesti břicha, nauzea, zvracení a hypersenzitivní reakce ([Cunningham et al., 2003](#)).



Obr. 10 Akneiformní exantém ([Krajsová, 2006](#)).

V kombinaci s irinotekanem se vyskytly hlavně následující nežádoucí reakce, kterými jsou průjemy, astenie, leukocytopenie, vyrážka, neutropenie a hypersenzitivní reakce ([Cunningham et al., 2003](#)).

13. Alemtuzumab

Alemtuzumab je rekombinantní humanizovaná IgG1 monoklonální protilátka namířená proti antigenu CD52, který je exprimován na normálních a neoplastických lymfocytech, monocytech a NK-buňkách ([Gribben et al., 2009](#)). Tato látka je velmi účinná u CLL. U dříve neléčených pacientů může být OR (overall response rate) dosaženo u více než 80% ([Hillmen et al., 2007](#)). Z neznámého důvodu je odpověď na léčbu alemtuzumabem závislá na umístění nádoru: významný účinek byl zpozorován u nádorů v krvi, kostní dřeni a v kůži, zatímco lymfatické uzliny vykazovaly nižší odpověď. Prodloužená terapie (až na 12 týdnů) může být velmi důležitá v dosažení úplné remise, především v kostní dřeni (primární místo u CLL) ([Österborg, 2003](#)).

13.1. Mechanismus účinku

Mechanismus účinku zahrnuje CDC a ADCC. Studie in vitro a in vivo naznačily, že alemtuzumab indukuje apoptózu prostřednictvím dráhy závislé na kaspáze-3 ([Bannerji et al., 2001](#)).

13.2. Indikace

Alemtuzumab je primárně indikován u pacientů s B-buněčnou chronickou lymfatickou leukémií (B-CLL) a T-prolymfocytickou leukémií (T-PLL). Nadějně výsledky byly popsány i u Sézaryho syndromu ([Österborg, 2003](#)).

13.3. Nežádoucí účinky

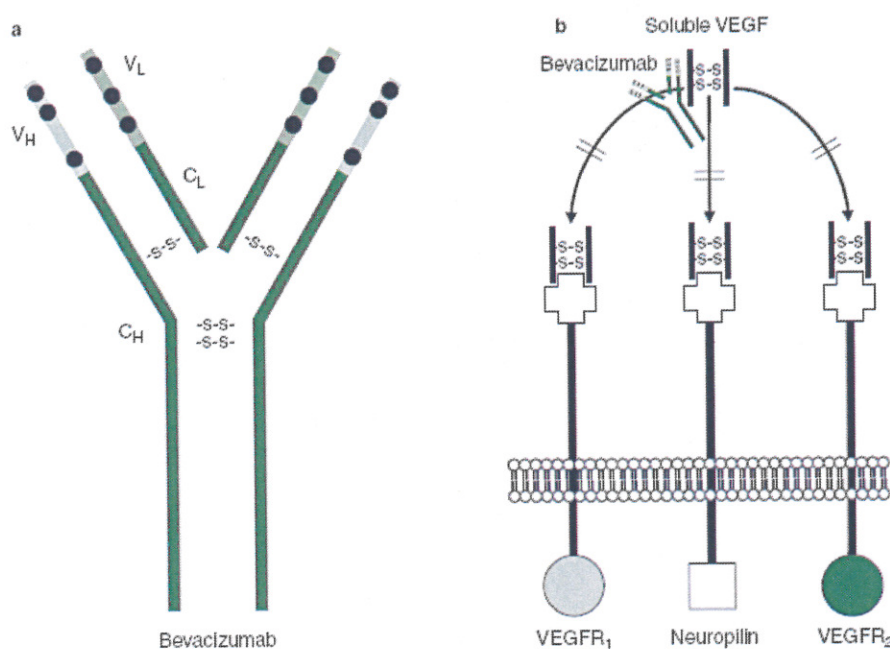
Mezi nežádoucí účinky alemtuzumabu patří akutní infúzní reakce při prvním podání, hematologická toxicita a komplikace infekcí ([Keating et al., 2004](#)).

Alemtuzumab indukuje dalekosáhlou T-lymfopenii, která s kombinací pokročilého onemocnění a předchozí léčby způsobuje zvýšené riziko oportunních a jiných infekcí ([Österborg, 2003](#)). Proto by měly být v průběhu terapie alemtuzumabem preventivně podávány antibakteriální a antivirové látky ([Keating et al., 2004](#)). Cotrimoxazol se podává jako profylaxe proti *Pneumocystis jirovecii* a aciclovir, famciclovir nebo valaciclovir se podávají k profylaxi CMV (cytomegalovirová infekce) ([O'Brien et al., 2008](#)).

14. Bevacizumab

Bevacizumab je rekombinantní humanizovaná IgG1 anti-VEGF monoklonální protilátka, která zamezuje navázání VEGF na svůj receptor a tím inhibuje angiogenezi a růst nádoru ([Avastin, 2007](#)).

Bevacizumab je odvozen od myších monoklonálních protilátek, které jsou humanizovány inkorporací myších VEGF zbytků, které jsou vázány na strukturu lidské IgG ([obr. 11](#)) ([Presta et al., 1997](#)).



Obr. 11 Struktura a mechanismus účinku bevacizumabu. a) Humanizovaná MoAb bevacizumab se skládá ze šesti myších sekvencí vštěpených do základu těžkých a lehkých řetězců, které jsou spojeny disulfidickým můstkem. Lehké a těžké řetězce obsahují variabilní (V_H a V_L) a konstantní (C_H a C_L) části ([Harris, 2004](#)). b) Navázání bevacizumabu na dimer VEGF inhibuje vazbu VEGF na jeho receptory VEGFR1, VEGFR2 a neuropilin ([Lyseng-Williamson et al., 2006](#)), ([Scott, 2007](#)).

14.1. Mechanismus účinku

Bevacizumab (Avastin, [obr. 12](#)) inhibuje VEGF indukovanou proliferaci, migraci a sebeobnovu vaskulárních endoteliálních buněk. Permeabilitu těchto buněk zvyšuje tím, že zabrání navázání VEGF na svůj receptor na povrchu endoteliálních buněk. Např. máme-li bevacizumab o koncentraci přibližně 0.3 a 3 nmol/L, je růst kultury hovězích endoteliálních buněk kapilár inhibován z 50% a 90% ([Presta et al., 1997](#)).

Bevacizumab neindukuje CDC nebo ADCC buněk produkujících VEGF nebo nádorových buněk ([Wang et al., 2004](#)).

Preklinická data také signalizují, že bevacizumab může zlepšit nevykonnost krevního oběhu prostřednictvím dilatace a disorganizace cévního řečiště v tumoru a tím zlepšit perfúzi protinádorových léčiv ([Wildiers et al., 2003](#)).

14.2. Indikace

Bevacizumab je indikován v terapii metastatického karcinomu tlustého střeva v kombinaci s 5-FU (5-fluoruracyl), k primoterapii pacientů s metastatickým karcinomem prsu v kombinaci s paklitaxelem, s interferonem α -2A je indikován k primoterapii pokročilého nebo metastazujícího karcinomu ledviny a v kombinaci s platinovým režimem je indikován k primoterapii neresekabilního pokročilého, metastazujícího nebo rekurentního nemalobuněčného karcinomu plic jiného histologického typu než z dlaždicových buněk.

Bevacizumab je nadále testován v dalších indikacích, kterými jsou: multiformní glioblastom, karcinom pankreatu, B-NHL a různých typů sarkomů ([Klener et al., 2009](#)).

14.3. Nežádoucí účinky

Ačkoliv byly nežádoucí účinky celkem běžně se vyskytující, snesitelnost bevacizumabu byla zpravidla přijatelná. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří nauzea, zvracení a únava vyskytující se téměř ve stejné frekvenci jak u bevacizumabu v kombinaci s paklitaxelem, tak paklitaxelem v monoterapii. Hypertenze, proteinurie, arteriální tromboembolie, hemorrhagie, městnavé srdeční selhání, gastrointestinální perfúze se vyskytovaly více v kombinaci s bevacizumabem než u paklitaxelu v monoterapii ([Avastin, 2007](#)).



Obr. 12 Avastin ([Beaker 's Block, 2009](#)).

15. Závěr

V posledních několika letech byla zkonstruována spousta monoklonálních protilátek. Stále je potřeba prozkoumat nejlepší způsoby, jak naplánovat léčbu monoklonálními protilátkami a kombinovat je s jinými možnými terapiemi k dosažení nejlepšího léčebného výsledku. Monoklonální protilátky vykazují významný přínos v léčbě non-Hodgkinského lymfomu, rakoviny prsu a kolorektálního karcinomu.

Jedním z největších problémů monoklonálních protilátek je jejich velmi vysoká cena. Otázka, jak nejlépe užívat a platit za tuto nákladnou „magickou střelu“, bude muset být adresována farmaceutickému průmyslu, poskytovatelům zdravotní péče a politickým leaderům ([Harris, 2004](#)).

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Jana Vondráčková

Školitel: Doc.PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Název diplomové práce: Monoklonální protilátky v nádorové terapii

Monoklonální protilátky jsou produkovány pouze jedním klonem B-lymfocytů, a tudíž vykazují stejnou antigenní specifitu. Díky tomu mají schopnost se vázat na epitopy konkrétních povrchových nádorových antigenů nebo solubilních proteinů.

Mechanismem účinku monoklonálních protilátek je zabíjení buněk aktivací imunitního systému a inhibice signálu transdukce. Dělí se na protilátky konjugované a nekonjugované.

Mezi nejčastější cíle působení protilátek patří membránové proteiny (např. CD20, CD52, CD22, CD80, CD30, CD40), růstové faktory (VEGF, IL-6), receptory (EGFR, VEGFR), adhezivní molekuly (EpCAM, integriny) a jiné.

Od roku 1997 povolil americký Úřad pro kontrolu léčiv (FDA) jejich klinické použití v nádorové terapii. Jako první byl do klinické praxe zaveden rituximab k léčbě B-NHL.

Monoklonální protilátky jsou uplatňovány jak v diagnostice, tak v terapii celé řady onemocnění. Kromě jejich použití v onkologii a transplantační medicíně nelze opomenout jejich úlohu v léčbě autoimunitních chorob.

Tato práce se zabývá monoklonálními protilátkami v léčbě nádorových onemocnění.

Abstract

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Jana Vondráčková

Supervisor: Doc.PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Title of diploma thesis: Monoclonal antibodies in cancer treatment

Monoclonal antibodies are produced by the only one clone of B-lymphocytes and so they assign the same antigen specificity. That is reason why they have ability to bind to epitops of specific surface cancer antigens or soluble proteins.

Killing cells by activating of immune system and inhibition of transduction signal are mechanism of action of monoclonal antibodies. They are divided up conjugated and unconjugated antibodies.

The most common targets of action are membrane proteins (such as CD20, CD52, CD22, CD80, CD30, CD40), growth factors (VEGF, IL-6), receptors (EGFR, VEGFR), adhesive molecules (EpCAM, integrines) etc.

In 1997, FDA allowed their clinical use in cancer treatment. Rituximab was the first antibody established in clinical practice for treatment of B-NHL.

Monoclonal antibodies are used in diagnosis and in therapy of many types of diseases. They play the important role in transplant medicine, in oncology and in the treatment of autoimmune diseases either.

This thesis deals with monoclonal antibodies in treatment of cancer diseases.

Literatura:

Adam Z, Pour L, Vorlíček R, et al. Cílená léčba v onkologii. *Remedia* 2005; 15 (4-5): 390-404

Albanell J, Codony J, Rovira A, et al. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Adv Exp Med Biol* 2003; 532: 253-68

Ansell SM, Byrd JC, Horwitz SM, et al. Phase I/II, open-label, dose-escalating study of MDX-060 administered weekly for 4 maligweeks in subjects with refractory/relapsed CD30 positive lym phoma [abstract]. *Blood* 2004; 104 (11): 721a

Avastin. Available from URL: <http://beakersblog.files.wordpress.com/.../avastin.jpg>

Bannerji R, Kitada S, Flinn JW, et al. Campath-1H antibody induces transmembrane signalling in vitro and in vivo in patients with CLL and promotes tumor clearance in part through caspase mediated apoptosis [abstract]. *Blood* 2001; 98: 808a

Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy – focus on cetuximab. *Eur J Cancer* 2001; 37 (4): 16-22

Bhardwaj A, Aggarwal BB. Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol* 2003; 23 (5): 317-32

Behring E. Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Deutsche Medicinische Wochenschrift* 1890; 14: 1113–4.

Bernier J. Cetuximab in the treatment of head and neck cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006; 6 (11): 1539-52

Byrd JC, Waselenko JK, Maneatis TJ, et al. Rituximab therapy in hematologic malignancy patients with circulating blood tumor cells: association with increased infusion-related side effects and rapid blood tumor clearance. *J Clin Oncol* 1999; 17 (3): 791-5

Carnahan J, Stein R, Qu Z, et al. Epratuzumab, a CD22-targeting recombinant humanized antibody with a different mode of action from rituximab. *Mol Immunol* 2007; 44: 1331-41, PubMed

Carnahan J, Wang P, Kendall R, et al. Epratuzumab, a humanized monoclonal antibody targeting CD22: Characterization of in vitro properties. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3982-90, PubMed

Cervený CG, Law C-L, McCormick RS, et al. The anti-CD30 monoclonal antibody SGN-30 inhibits Hodgkin's disease growth and sensitizes cells to established chemotherapeutics [abstract]. American Society of Hematology Annual Meeting abstracts. *Blood* 2004; 104: 2639

Chow KU, Sommerlad WD, Boehrer S, et al. Anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8, rituximab) enhances efficacy of cytotoxic drugs on neoplastic lymphocytes in vitro: role of cytokines, complement, and caspases. *Haematologica* 2002; 87 (1): 33-43

Ciardiello F, Damiano V, Bianco R, et al. Antitumour activity of combined blockade of epidermal growth factor receptor and protein kinase A. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88 (23): 1770-6

Committee for Medicinal Products for Human Use. Scientific discussion (of the extension of the indication for the use in combination with an aromatase inhibitor for the treatment of patients with HER2-positive and hormone receptor positive metastatic breast cancer, not previously treated with trastuzumab) [online]. Available from URL: <http://www.emea.europa.eu>, 2007

Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, et al. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun* 2005; 8: 140-74

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab (C225) alone or in combination with irinotecan (CPT-11) in patients with epidermal growth factor receptor positive, irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer [abstract]. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22: 252

Czuczman MS, Thall A, Witzig TE, et al. Phase I/II study of galiximab, an anti-CD80 antibody, for relapsed or refractory follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23 (19): 4390-8

Davies DE, Chamberlin SG. Targeting the epidermal growth factor receptor for therapy of carcinomas. *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 1101-10

Degli-Esposti M. To die or not to die: the quest of the TRAIL receptors. *J Leukoc Biol* 1999; 65 (5): 535-42

de Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, et al. Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: correlations with proliferation and angiogenesis. *J Pathol* 1998; 184: 53-7

Demidem A, Lam T, Alas S, et al. Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer Biother Radiopharm* 1997; 12 (3): 177-86

DiJoseph JF, Armellino DC, Doughter MM, et al. Antibody- targeted chemotherapy with immunoconjugates of calicheamicin: differential anti-tumor activity of conjugated calicheamicin targeted to B-cell lymphoma via B-cell lineage specific molecules CD19, CD20, and CD22 [abstract]. *Blood* 2004; 104 (11): 683a

Dillman RO, Dillman JB, Halpern SE, et al. Toxicities and side effects associated with intravenous infusions of murine monoclonal antibodies. *J Biol Response Mod*, 1986; 5: 73-84

Dillman RO. Human antimouse and antiglobulin responses to monoclonal antibodies. *Antibody Immunocon Radiopharm*, 1990; 3: 1-15

Dillman RO. Magic bullets at last! Finally—approval of a monoclonal antibody for the treatment of cancer!!! *Cancer Biother Radiopharm* 1997; 12: 223-25

Dorfman DM, Schultze JL, Shahsafaei A, et al. In vivo expression of B7-1 and B7-2 by follicular lymphoma cells can prevent induction of T cell anergy but is insufficient to induce significant T cell proliferation. *Blood* 1997; 90: 4297-306

Edelman GM, Gall WE, Waxdal MJ, et al. The dovaleny structure of a human gamma G-immunoglobulin. Part I. Isolation and characterization of the whole molecule, the polypeptide chains, and the tryptic fragments. *Biochemistry* 1968; 7(5): 1950–8.

Ehrlich P. On immunity with special reference to cell life. *Proc R Soc* 1900; 66: 424–48.

European Medicines Evaluation Agency. Avastin: annex I summary of product characteristics [online]. Available from URL: <http://www.emea.europa.eu> , 2007

Fanale AM. and Younes A. Monoclonal Antibodies in the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma 2007; 343

Fliieger D, Renoth S, Beier I, et al. Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse human monoclonal antibody IDEC-C2B8 in CD20-expressing lymphoma cell lines. *Cell Immunol* 2000; 204: 55-63

Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6(4): 273-86.

Fry DW. Inhibition of the epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinases as an approach to cancer chemotherapy: progression from reversible to irreversible inhibitors. *Pharmacol Ther* 1999; 82 (2-3): 207-18

Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial INTACT 1. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 777-84.

Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, et al. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of Bcell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* 2001; 98 (12): 3383-9

Gribben JG, Hallek M. Rediscovering alemtuzumab: current and emerging therapeutic roles. *Br J Haematol* 2009; 144 (6): 818-31

Grillo-L'opez AJ, Hedrick E, Rashford M, et al. Rituximab: neoongoing and future clinical development. *Semin Oncol* 2002; 29: 105-12

Hagemeister F. Rituximab for the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Drugs* 2010; 70 (3): 261-2

Hale G, Swirsky D, Waldmann H, Chan LC. Reactivity of rat monoclonal antibody CAMPATH-1 with human leukaemia cells and its possible application for autologous bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 1985; 60: 41–8. PubMed

Harris M. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol* 2004; 5 (5): 292-302

Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial INTACT 2. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 785-94.

Hernández-Sotomayor SMT, Carpenter G. Epidermal growth factor receptor: elements of intracellular communication. *J Membr Biol* 1992; 128: 81-9

Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, et al. Alemtuzumab compared with chlorambucil as first line therapy for patients requiring treatment for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2007; 25 (35): 5616-23

Hock BD, McKenzie JL, Patton NW, et al. Circulating levels and clinical significance of soluble CD40 in patients with hematologic malignancies. *Cancer* 2006; 106 (10): 2148-57

Huang SM, Bock JM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1999; 59 (8): 1935-40

Hudis CA. Trastuzumab: mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 2007; 357 (1): 39-51

Hurvitz SA, Timmerman JM. Current status of therapeutic vaccines for non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2005; 17: 432-40

Jackisch C. HER-2-positive metastatic breast cancer: optimizing trastuzumab-based therapy [online]. Available from URL: www.TheOncologist.com , 2007

Jensen M, Winkler U, Manzke O, et al. Rapid tumor lysis in a patient with B-cell chronic lymphocytic leukemia and lymphocytosis treated with an anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC- C2B8, rituximab). *Ann Hematol* 1998; 77 (1-2): 89-91

Keating M, Coutre' S, Rai K, et al. Management guidelines for use of alemtuzumab in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma* 2004; 4 (4): 220-7

King PD, Sadra A, Han A, et al. CD2 signaling in T cells involves tyrosine phosphorylation and activation of the Tec family kinase, EMT/ITK/TSK. *Int Immunol* 1996; 8 (11): 1707-14

Klener P, Klener P jr. Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. 2009; 77 - 84, 163

Kodíček M. Imunoglobuliny. From *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 Available from URL: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=imunoglobuliny

Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256 (5517): 495-7.

- Krajsová I. Kožní projevy cílené léčby nádorů. *Remedia* 2006; 16 (4): 416–20
- Kreitman R. Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 570–78.
- Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 1595-606
- Kunzmann V, Ruediger T, Hallek M, et al. Tumor cell agglutination and not solely cytokine release as mechanism of adverse reactions during anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab) treatment. *Blood* 2001; 98 (6): 1991-2
- Law CL, Gordon KA, Collier J, et al. Preclinical antilymphoma activity of a humanized anti-CD40 monoclonal antibody, SGN-40. *Cancer Res* 2005; 65 (18): 8331-8
- Leonard JP, Coleman M, Ketas JC, et al: Phase I/II trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3051-9, PubMed
- Leonard JP, Coleman M, Ketas J, et al: Combination antibody therapy with epratuzumab and rituximab in relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5044-51, PubMed
- Levene AP, Singh G, Palmieri C. Therapeutic monoclonal antibodies in oncology. *J R Soc Med* 2005; 98 (4): 146-52
- Li CY, Shan S, Huang Q, et al. Initial stages of tumor cell- induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 143-7
- Linden O, Hindorf C, Cavallin-Stahl E, et al. Dose-fractionated radioimmunotherapy in non-Hodgkin's lymphoma using DOTA-conjugated, ⁹⁰Y-radiolabeled, humanized anti-CD22 monoclonal antibody, epratuzumab. *Clin Cancer Res* 2005; 11 (14): 5215-22

Lyseng-Williamson KA, Robinson DM. Bevacizumab: a review of its use in advanced colorectal cancer, breast cancer, and NSCLC. *Am J Cancer* 2006; 5 (1): 43-60

Mackay F, Schneider P, Rennert P, et al. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 231- 64

Matsumoto T, Perrotte P, Bar-Eli M, et al. Blockade of EGF-R signalling with anti-EGF-R monoclonal antibody (Mab) C225 inhibits matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression and invasion of human transitional cell carcinoma (TCC) in vitro and in vivo [abstract]. 89th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 1998 ; New Orleans

McCarron PA, Olwill SA, Marouf WMY, et al. Antibody conjugates and therapeutic strategies. *Mol Interv* 2005; 5 (6): 368-80

McKeage K, Perry CM. Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs* 2002; 62 (1): 209-43

McLaughlin P, Grillo-L'opez AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2825-33

Medema JP, Planelles-Carazo L, Hardenberg G, et al. The uncertain glory of APRIL. *Cell Death Differ* 2003; 10 (10): 1121-5

Miller RA, Maloney DG, Warnke R, et al. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *New England Journal of Medicine* 1982; 306: 517–22 , Medline

Mohsin SK, Weiss HL, Gutierrez MC, et al. Neoadjuvant trastuzumab induces apoptosis in primary breast cancers. *J Clin Oncol* 2005; 23 (11): 2460-8

Morschhauser F, Leonard J, Coiffier B, et al. Initial safety and efficacy results of a second-generation humanized anti-CD20 antibody, IMMU-106 (hA20), in non-Hodgkin's lymphoma [abstract]. *Blood* 2005; 106 (11): 683a

National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology, non-Hodgkin's lymphoma: V.I.2009 [online]. Available from URL: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/nhl.pdf, 2009

National Comprehensive Cancer Network. NCCN – drugs & biologics compendium [online]. Available from URL: http://www.nccn.org/professionals/drug_compendium/content/contents.asp, 2009

Němeček R, Kocáková I. Postavení cetuximabu v léčbě metastatického kolorektálního karcinomu. *Remedia* 2008; 18 (6): 430–437

Neuwirthová J, Mechl Z, Smilek P, et al. Integrace nových biologických přípravků do léčby spinocelulárních karcinomů hlavy a krku. *Remedia* 2007; 17: 181–187

Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2001; 37 (4): 9-15.

Novak AJ, Bram RJ, Kay NE, et al. Aberrant expression of B- lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood* 2002; 100 (8): 2973-9

O'Brien S, Ravandi F, Riehl T, et al. Valganciclovir prevents cytomegalovirus reactivation in patients receiving alemtuzumab-based therapy. *Blood* 2008; 111 (4): 1816-9

Ocana A, Cruz JJ, Pandiella A. Trastuzumab and antiestrogen therapy: focus on mechanisms of action and resistance. *Am J Clin Oncol* 2006; 29 (1): 90-5

Oldham RK, Dillman RO. Monoclonal antibodies in cancer therapy: 25 years of progress. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1775

Oldham RK. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *J Clin Oncol* 1983; 19: 582-90

Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, et al. VEGF receptor signalling: in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7 (5): 359-71.

Onrust SV, Lamb HM, Balfour JA. Rituximab. *Drugs* 1999; 58: 79-88

Osbourn J, Jermutus L, Duncan A. Current methods for the generation of human antibodies for the treatment of autoimmune diseases. *Drug Discov Today* 2003; 8 (18): 845–51.

Österborg A. Alemtuzumab, *Drugs* 2003, 63 (12): 1245-6

Pavelka K. Rituximab v léčbě revmatoidní artritidy. *Remedia* 2007; 17 (5): 440–447

Petryk M, Grossbard ML. Rituximab therapy of B-cell neoplasms. *Clin Lymphoma* 2000; 1 (3): 186-96

Plosker GL, Kearn SJ. Trastuzumab: a review of its use in the management of HER2-positive metastatic and early-stage breast cancer. *Drugs* 2006; 66 (4): 449-75

Plumas J, Chaperot L, Jacob M, et al. Malignant B lymphocytes from non-Hodgkin's lymphoma induce allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses in primary mixed lymphocyte cultures: an important role of co-stimulatory molecules CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) in stimulation by tumor cells. *Eur J Immunol* 1995; 25 (12): 3332-41

Porter RR. The structure of antibodies. The basic pattern of the principal class of molecules that neutralize antigens (foreign substance in the body) is four cross-linked chains. This pattern is modified so that antibodies can fit different antigens. *Sci Am* 1967; 217 (4): 81–7.

Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997; 15; 57 (20): 4593-9

Prewett MC, Hooper AT, Bassi R, et al. Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 2002; 8 (5): 994-1003

Pukac L, Kanakaraj P, Humphreys R, et al. HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 2005; 92 (8): 1430-41

Raymond E, Faivre S, Armand JP. Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase as a Target for Anticancer Therapy. *Drugs* 2000; 60 (1): 15-23

Rayzman V, Scott A. Monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Forum* 2002; 26: 104-08.

Rituxan prescribing information [online]. Available from URL: <http://www.gene.com/gene/products/information/pdf/rituxan-prescribing.pdf>, 2009

Roche Products Ltd.. Herceptin: summary of product characteristics (Annex 1); 2000 Aug 28 [online]. Available from URL: <http://www.emea.eu.int/humandocs/PDFs/EPAR/Herceptin/H-278-PI-en.pdf>, 2005

Rosen LS. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control* 2002; 9 (2 Suppl.): 36-44

Salisbury JR, Rapson NT, Codd JD, Rogers MV, Nethersell AB. Immunohistochemical analysis of CDw52 antigen expression in non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol.* 1994; 47: 313-17, PubMed

Sato S, Tuscano JM, Inaoki M, et al. CD22 negatively and positively regulates signal transduction through the B lymphocyte antigen receptor. *Semin Immunol* 1998; 10 (4): 287-97

Schneider P, Tschopp J. BAFF and the regulation of B cell survival. *Immunol Lett* 2003; 88 (1): 57-62

Schriever F, Huhn D. New Directions in the Diagnosis and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukaemia, *Drugs* 2003; 63 (10): 961

Schultze J, Nadler LM, Gribben JG. B7-mediated costimulation and the immune response. *Blood Rev* 1996; 10 (2): 111-27

Scott AM, Renner C. Tumour antigens recognised by antibodies. In: *Encyclopaedia of life sciences*. London: Nature Publishing Group, Macmillan, 2001; 1–7

Scott LJ. Bevacizumab In The First-Line Treatment Of Metastatic Breast Cancer, *Drugs* 2007, 67 (12): 1793-9

Shih LB, Lu HH, Xuan H, et al. Internalization and intracellular processing of an anti-B-cell lymphoma monoclonal antibody, LL2. *Int J Cancer* 1994; 56: 538-45, PubMed

Sledge GW. Vascular endothelial growth factor in breast cancer: biologic and therapeutic aspects. *Semin Oncol* 2002; 29 (11): 104-10

Sledge GW Jr. What is targeted therapy? *J Clin Oncol*. 2005; 23 (8): 1614-5.

Sobotková M, Bartůňková J. Monoklonální protilátky a další biologická léčiva užívaná v imunosupresivní léčbě. *Remedia* 2008; 18 (5): 356–364

Stocchi L, Nelson H. Diagnostic and therapeutic applications of monoclonal antibodies in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 232–50.

Thatcher N, Chang A, Parikh P, et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet*. 2005; 366: 1527-37.

Todderud G, Carpenter G. Epidermal growth factor: the receptor and its function. *BioFactors* 1989; 2: 11-15

Uchida J, Lee Y, Hasegawa M, et al. Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol* 2004; 16 (1): 119-29

van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000; 67 (1): 2-17

Velu TJ. Structure, function and transforming potential of the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1990; 70: 205-16

Vooijs WC, Otten HG, van Vliet M, et al. B7-1 (CD80) as target for immunotoxin therapy for Hodgkin's disease. *Br J Cancer* 1997; 76 (9): 1163-9

Vyth-Dreese FA, DelleMijn TA, Majoor D, et al. Localization in situ of the co-stimulatory molecules B7.1, B7.2, CD40 and their ligands in normal human lymphoid tissue. *Eur J Immunol* 1995; 25 (11): 3023-9

Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, et al. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis* 2004; 7 (4): 335-45

Wierda WG, Kipps TJ, Keating MJ. Novel immune-based treatment strategies for chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Oncol* 2005; 23 (26): 6325-32

Wildiers H, Guetens G, De Boeck G, et al. Effect of antivascular endothelial growth factor treatment on the intratumoral uptake of CPT-11. *Br J Cancer* 2003; 88: 1979-86

Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 2004; 10: 145-7

Winkler U, Jensen M, Manzke O, et al. Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). *Blood* 1999; 94 (7): 2217-24

Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 1999; 82: 241-50

Younes A, Hariharan K, Allen RS, et al. Initial trials of anti- CD80 monoclonal antibody (galiximab) therapy for patients with relapsed or refractory follicular lymphoma. *Clin Lympho ma* 2003; 3 (4): 257-9

Zhang Z, Zhang M, Ravetch JV, et al. Effective therapy for a murine model of adult T-cell leukemia with the humanized anti-CD2 monoclonal antibody, MEDI-507. *Blood* 2003; 102 (1): 284-8