

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

VYUŽITÍ PROTI LÁTEK A IMUNOKONJUGÁTŮ
VE FARMAKOTERAPII NÁDORŮ

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Hradec Králové 2010

Alena Vaidlová

PROHLÁŠENÍ

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

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Alena Vaidlová

Školitel: Pharm.Dr. Martina Čečková, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití protilátek a imunokonjugátů ve farmakoterapii nádorů.

Tato rešeršní práce přehledně zpracovává možnosti léčby nádorů s využitím protilátek, jejich konjugátů a protilátkových fragmentů. Terapie pomocí protilátek využívá jejich přirozené vazby na nádorovou nebo jinak změněnou buňku. K této vazbě dochází pomocí biomarkerů na povrchu cílových buněk, které protilátka rozpoznává. Po navázání na cílovou buňku se spouští různé mechanismy likvidace poškozené buňky. Pomocí genového inženýrství byly vytvořeny různé typy protilátek a jejich konjugátů, které se liší svými vlastnostmi a hlavně afinitou k různým strukturám, které rozpoznávají. Mezi nekonjugované protilátky patří chimérické, humanizované, čistě lidské nebo čistě myší protilátky. Ke konjugovaným protilátkám se řadí imunokonjugáty, konjugáty s cytostatiky, s enzymy nebo s rostlinnými nebo živočišnými toxiny. Novým fenoménem ve vývoji protilátek je tvorba protilátkových fragmentů. Tyto částice jsou tvořeny pomocí genového inženýrství z částí protilátek a jejich využití do budoucna má velkou perspektivu. Práce shrnuje nejnovější poznatky využití monoklonálních protilátek a imunokonjugátů v protinádorové terapii.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of pharmacology and toxicology

Candidate: Alena Vaidlová

Supervisor: Pharm.Dr. Martina Čečková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Usage of antibodies and immunoconjugates in the pharmacotherapy of cancer.

This diploma thesis displays possibility of tumor treatment by antibodies, their conjugates and antibody fragments. Antibody therapy uses natural antibody binding of tumor cell or other abnormal cell. Antibodies bind only cells with cellular biomarkers which are present on target cells. Binding initiates disposal process of damaged cell. Genetic engineering helps to create different antibodies and their conjugates with different qualities, especially various affinity to specific structures they recognise. Unconjugated antibodies are chimerical, humanized, pure human or pure murine. Conjugated antibodies are represented by immunoconjugates, conjugates with cytostatics, with enzymes, with phytoxic or animal toxins. Development of antibodies has totally new phenomenon – creating of antibody fragments. These elements are products of genetic engineering and their utilization has a great future. This work summarizes the latest knowledge about using monoclonal antibodies and immunoconjugates in anticancer therapy.

Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK	7
2	CÍL PRÁCE	9
3	METODIKA	9
4	ÚVOD	10
5	PROTILÁTKY	11
5.1	MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY	12
5.2	TYPY MoAb	13
5.3	MECHANISMUS ÚČINKU MoAb	17
6	NEKONJUGOVANÉ PROTILÁTKY	19
6.1	CHIMÉRICKÉ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY	19
6.2	HUMANIZOVANÉ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY	24
6.3	LIDSKÉ PROTILÁTKY A MYŠÍ PROTILÁTKY	31
6.4	BISPECIFICKÉ PROTILÁTKY	34
7	KONJUGOVANÉ PROTILÁTKY	36
7.1	RADIOKONJUGÁTY	36
7.2	IMUNOKONJUGÁTY S CYTOSTATIKY	39
7.3	IMUNOKONJUGÁTY S ENZYMY	41
7.4	IMUNOKONJUGÁTY S TOXINY	43
7.4.1	IMUNOTOXINY	44
7.4.2	CHEMICKÉ KONJUGÁTY	45
7.4.3	REKOMBINANTNÍ IMUNOTOXINY	45
7.4.4	IMUNOTOXINY TESTOVANÉ PRO TERAPII HEMATOLOGICKÝCH NÁDORŮ	48
7.4.5	IMUNOTOXINY TESTOVANÉ PRO TERAPII SOLIDNÍCH NÁDORŮ	50
8	MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY REGISTROVANÉ V ČR	53

9	MONOKLONÁLNÍ PROTI LÁTKY NOVÉ GENERACE.....	54
10	ZÁVĚR	55
11	LITERATURA	56

1 SEZNAM ZKRATEK

FDA	Food and Drug Administration
MoAb	Monoklonální protilátka
VH	Lehký řetězec
VL	Těžký řetězec
IgG	Imunoglobulin G
HAMA	Human anti-mouse antibody
ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity
CDC	Complement dependent cytotoxicity
CD antigeny	Cluster of differentiation
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor
TRAIL	Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Including Ligand
HCL	Vlasatobuněčná leukemie
EMA	European Medicines Agency
TGF- α	Transformující růstový faktor α
EGF	Epidermální růstový faktor
CLL	Chronická lymfatická leukemie
AML	Akutní myeloidní leukemie
NHL	Nehodgkinské lymfomy
VEGFR	Receptor pro cévní endoteliální růstový faktor
VEGF-A	Cévní endoteliální růstový faktor A
HER2	Receptor pro lidský epidermální růstový faktor
ERBB2/HER2/NEU	Receptor z rodiny pro epidermální růstový faktor
NSCLC	Nemalobuněčný karcinom plic
EGFR/ERBB1/HER1	receptor z rodiny pro epidermální růstový faktor
DLBCL	Difúzní velkobuněčný lymfom
CEA	Carcinoembryonic antigen
MTC	Medulární karcinom
CTCL	Lymfom kožních T-buněk

KRAS	Kirsten rat sarcoma
Ep-CAM	Epithelial cell adhesion molecule
TNT	Tumor necrosis treatment
PSMA	Prostate-specific membrane antigen
MMAE	Monomethylauristatin E
ADEPT	Antibody directed enzyme therapy
DNA	deoxyribonukleová kyselina
PE	Pseudomonas exotoxin
DT	Diphtheria toxin
OBV3	Myší monoklonální protilátka
rRA	rekombinantní ricinový řetězec A
bR	Blokovaný ricin
dgA	Deglykosilovaný ricinový řetězec A
PAP	Pokeeweed antiviral protein
MAb	Nemonoklonální protilátka
IL	interleukin
GM-CSF	Granulocyty-makrofágy tlustého střeva stimulující faktor
Tf	transferin
HD	Hodgkinova nemoc
CIS	Carcinom in situ
CSF	Metastazující nádor poškozující mozkomíšní mok
SCLC	Malobuněčný karcinom plic
ALL	Akutní lymfoblastická leukemie
ATL	Leukemie dospělých T-buněk
BLT	Bispecifický ligandem řízený toxin

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je vytvořit přehled protilátek a imunokonjugátů, které jsou v současné době používány v protinádorové terapii, popsat mechanismy účinku jednotlivých typů protilátek a aktuálního využití jednotlivých zástupců této skupiny moderních léčiv ve farmakoterapii. Do práce byly zahrnuty jak přípravky používané v klinické praxi, tak látky, které procházejí klinickým testováním.

3 METODIKA

Publikace, které sloužily jako zdroj informací pro tuto diplomovou práci, byly získány především vyhledáváním pomocí databáze PubMed a z některých dalších informačních zdrojů (internetové stránky Evropské agentury pro léčiva – EMEA, světové zdravotnické organizace – WHO a správy potravin a léčiv FDA).

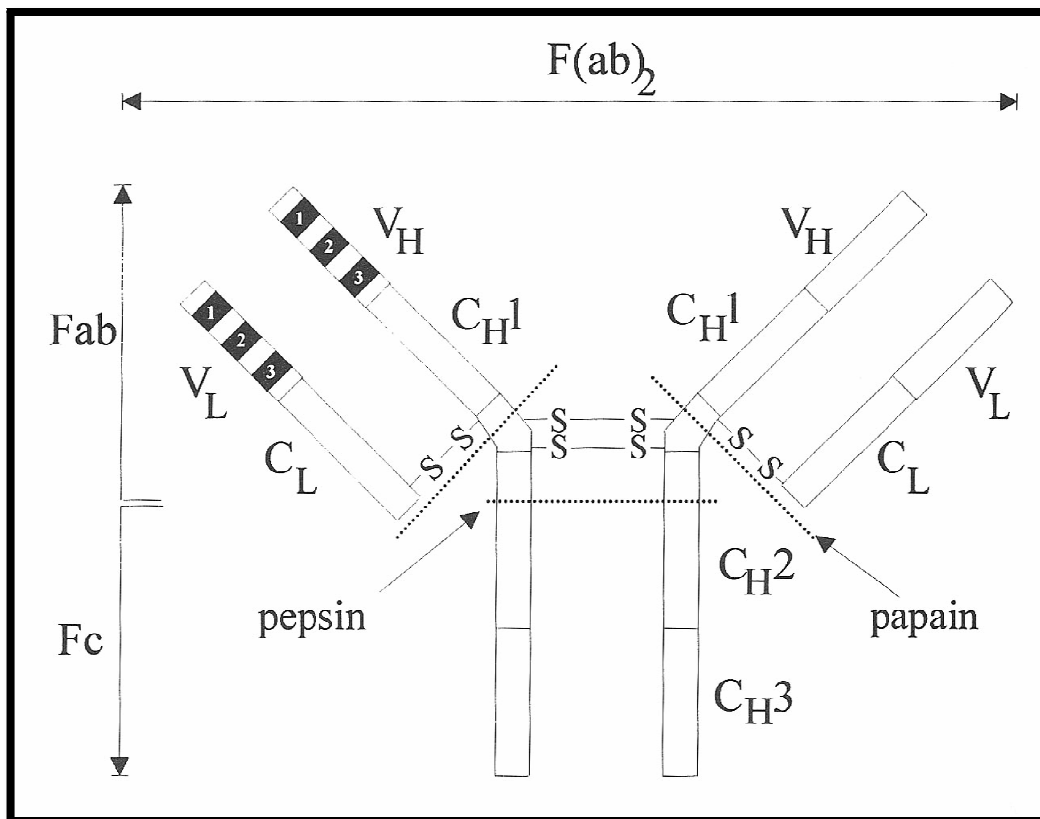
4 ÚVOD

Monoklonální protilátky (MoAb) dnes patří v moderní medicíně neodmyslitelně k terapii nádorů. Studium využití monoklonálních protilátek otevírá nové možnosti v léčbě nádorů a současně ukazuje cestu, která je pro pacienta šetrnější a bezpečnější.

Od objevu protilátek koncem 19. století do prvních úspěchů s využitím monoklonálních protilátek uplynulo více než sto let. První monoklonální protilátky schválila FDA (Food and Drug Administration) v terapii B-lymfomů v roce 1997 a od té doby byly do praxe zavedeny desítky MoAb, které rozšířily možnosti složité léčby rakoviny. Přestože, MoAb dosud nemohou zcela nahradit protinádorovou chemoterapii, využívají se hojně a výborně doplňují širokou škálu protinádorových léčiv (Klener 2008).

5 PROTILÁTKY

Protílátky jsou látky bílkovinné povahy tvořené imunitním systémem a specificky zaměřené proti určitému cizorodému materiálu (antigenu) choroboplodnému zárodku nebo toxinu, který její tvorbu vyvolal. Podílí se na jeho zneškodňování a v některých případech může poskytovat naprostou ochranu před jeho působením



Obr. 1. Struktura molekuly imunoglobulinu. Znázorněna jsou i proteolyticky senzitivní štěpná místa a generované fragmenty. Převzato z (Hajdúch a kol. 2010).

Protílátky nebo jinak imunoglobuliny jsou znázorňované tvarem písmene Y a jejich základní struktura je tvořena čtyřmi polypeptidickými částmi. Ty jsou uspořádány do dvou zrcadlově identických párů lehkých a těžkých řetězců (Obr. 1)

N-terminální úsek je tvořen čtyřmi variabilními úseky (V-domény) po dvou těžkých (V_H) a 2 lehkých řetězcích (V_L). Každá V-doména se skládá ze tří hypervariabilních oddílů, které určují antigenní specifitu protilátek (komplementarity determining regions – CDRs). Jednotka tvořená V_L - V_H se nazývá F_v protilátky a je zodpovědná za vazbu antigenu. C-konec lehkých i těžkých řetězců je sekvenčně méně variabilní. Lehký řetězec nese dva izozypy κ a λ , jejichž zastoupení v molekule je

variabilní. Těžký řetězec může být složen z několika izotypů ($\mu, \delta, \gamma, \alpha, \epsilon$) (Hajdúch a kol. 2010).

5.1 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

V roce 1974 objevili Caesar Milstein a Georg F. Köhler postup, jak připravit monoklonální protilátky za tento objev byli později oceněni i Nobelovou cenou. Monoklonální protilátky jsou protilátky produkované jen jedním klonem B lymfocyту, a vykazují tak shodnou antigenní specifitu. Podstatou přípravy monoklonálních protilátek je spojení nesmrtelné myelomové buňky s B-lymfocytem a následná produkce specifické protilátky. Namnožením a selekcí takto spojených buněk vzniká hybridomová linie, která je nesmrtelná a produkuje protilátky určité specifity (Sobotková a Bartůňková, 2008). Původním využitím tohoto typu protilátek byla především diagnostika. S postupujícím výzkumem se však monoklonální protilátky staly významnou skupinou v terapii nádorů a staly se součástí rozvíjející se cílené léčby (targeted therapy).

5.2 TYPY MoAb

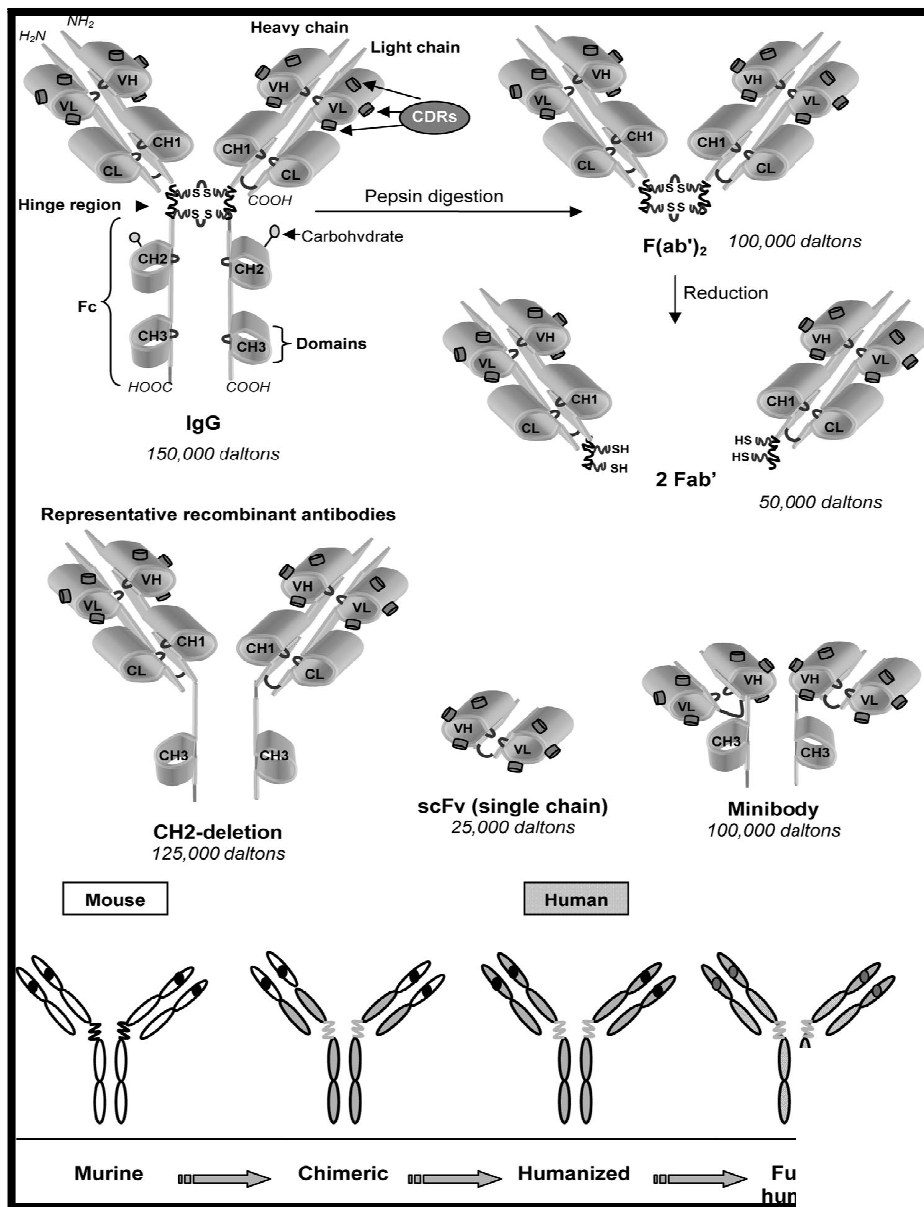
Typy monoklonálních protilátek se liší skladbou a původem proteinu. Existují protilátky *čistě myší*, *chimérické*, *humanizované a plně lidské*. Myší protilátky při humánní aplikaci vyvolávaly tvorbu lidských neutralizačních protilátek *HAMA* (human anti-mouse antibody), které inhibovaly biologickou účinnost terapeuticky podávané MoAb a neumožňovaly optimální vazbu lidských imunokompetentních buněk na Fc fragment, což výrazně snižovalo protinádorový účinek. Díky moderním technikám genového inženýrství je možné vyrábět protilátky obsahující část myších a část lidských sekvencí aminokyselin, tzv. chimérické nebo humanizované protilátky. Kromě toho lze vyrábět i čistě lidské protilátky. Čistě myší protilátky se označují koncovkou– *momab*, chimérické koncovkou– *ximab*, humanizované koncovkou– *zumab* a čistě lidské koncovkou– *mumab* (Klener a Klener jr.2010).

Tab. 1. Nomenklatura monoklonálních protilátek. Upraveno podle (Sobotková a Bartůňková 2008).

PŘEDPONA	CÍLOVÁ STRUKTURA	PŮVOD (TYP) PROTILÁTKY	PŘÍPONA	
VARIABILNÍ	ba(c)	Bakterie	-mab	
	ci(r)	Kardiovaskulární systém		
	co(l)	Nádor tlustého střeva		
	fu(n)	Houba		
	go(t)	Nádor varlete		-a- Krysa
	go(v)	Nádor vaječníku		- axo- Hybrid krysa/křeček
	ki(n)	Interleukin		-e- Křeček
	le(s)	Ložisko infekce		-i- Primáti
	li(m)	Imunitní systém		-o- Myš
	ma(r)	Nádor prsu		-u- Humánní
	me(l)	Melanom		-xi- Chimérický
	mu(l)	Muskuloskeletární systém		- xizu Chimérický/humanizovaný
	neu(r)	Nervový systém		- -zu- humanizovaný
	o(s)	Kost		
	pr(o)	Nádor prostaty		
	tox(a)	Toxin		
	tu(m)	Libovolný nádor		
	vi(r)	viry		

Snaha posílit léčebnou účinnost MoAb vedla ke konstrukci *konjugovaných protilátek*, u kterých je na vlastní protilátku navázán radionuklid, cytostatikum, toxin nebo enzym.

MoAb dosud používané v klinické praxi jsou monospecifické protilátky klasické struktury, namířené proti jednomu konkrétnímu antigenu. V posledních letech začal také vývoj a testování protilátek bispecifických a trifunkčních, stejně jako konstrukce derivátů protilátek, scFv (single-chain fragment variable), *scDb* (single-chain Diabodie). Bispecifické monoklonální protilátky obsahují dva různé Fab fragmenty a mají tudíž schopnost vázat dva různé antigeny. Mohou být připraveny klasickou hybridomovou technikou, čímž vznikají tzv. *trifunkční protilátky* s dvěma odlišnými Fab fragmenty a Fc fragmentem. Jedním Fab fragmentem obvykle vážou nádorový antigen a druhým Fab fragmentem atrahují T-lymfocyty do místa nádoru. Prostřednictvím Fc fragmentu mají navíc schopnost aktivovat pomocné buňky a indukovat ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) (Sharkey a Goldenberg 2006).



Obr. 2. schematické znázornění molekuly IgG(imunoglobulin G), chemicky vyrobené fragmenty a několik rekombinantních fragmentů protilátek s jejich nominálními molekulovými hmotnostmi. Dole, schematicky znázorněný proces zapojení myší protilátky pomocí inženýrství, snižující jejich imunogenitu. Chimerické protilátky spojují VL a VH části myších IgG s lidskými IgG. Humanizované protilátky spojují pouze CDR části z myší MAb, spolu s některými sousedními rámci, aby byla udržena konformační struktura CDRs. Plně lidská IgG může být izolována ze specializovaných transgenních myší chovaných k produkci lidských IgG po imunizaci nádorovým antigenem nebo speciální phage display metodou. Převzato z (Sharkey a Goldenberg 2006).

5.3 MECHANISMUS ÚČINKU MoAb

Jak již bylo zmíněno, Fab fragment slouží k vazbě antigenu, zatímco Fc fragment protilátky zprostředkovává vazbu a aktivaci pomocných buněk imunitního systému. Vazba protilátky na příslušný nádorový antigen nasměruje pomocné buňky imunitního systému do místa tumoru, což vede k významnému nárůstu fagocytózy a/nebo indukci apoptózy nádorových buněk. Tento mechanismus protinádorového účinku MoAb se označuje jako ADCC. Dalším mechanismem, kterým MoAb vyvolává smrt cílových buněk, je aktivace komplementu neboli CDC (komplement dependent toxicity). MoAb mohou vykazovat i přímý cytotoxický účinek, který spočívá v bloádě vazby ligandu na specifický receptor buď neutralizací ligandu nebo vazbou na extracelulární doménu receptoru. V obou případech MoAb blokuje aktivaci příslušné signální dráhy (transdukční kaskády), a proto lze léčbu pomocí monoklonálních protilátek zahrnout mezi cílenou léčbu (Klener a Klener jr.2010).

Cílem monoklonálních protilátek jsou znaky na povrchu nádorových buněk. Protilátka rozpozná tento znak, naváže se na něj a umožní rozpoznání a zničení nádoru imunologickými protinádorovými mechanismy. Mimo tyto znaky může protilátka rozpoznat například růstové faktory nebo transmembránové receptory (Klener 2008).

Znaky, proti kterým jsou protilátky zaměřeny, se nazývají biomarkery. Využívají se jako indikátory přítomnosti nebo rizika vzniku určitého patologického stavu. V případě nádorových onemocnění mohou biomarkery indikovat molekulární aberaci nebo patologický jev, dále mohou určovat míru odpovědi na léčbu. V případě cílené terapie je důležité najít validní biomarkery, které by byly dostatečně specifické a citlivé pro konkrétní cílené léčivo (Klener a Klener jr.2010).

Většina používaných monoklonálních protilátek je směřována proti povrchovým znakům a nachází uplatnění v léčbě hematologických onemocnění. Pokud jsou protilátky cíleny na iniciační etapu transdukční kaskády, tj. proti růstovému faktoru nebo proti extracelulární doméně membránových receptorů, uplatní se i v léčbě solidních nádorů (Klener 2008).

NĚKTERÉ SPECIFICKÉ BIOMARKERY

Monoklonální protilátky jsou velkou skupinou molekul, které zasahují na nejrůznějších buněčných úrovních (Halámková a kol. 2008).

Vyhledávání cílů monoklonálních protilátek je samostatným oborem, který se rozvíjí stejně rychle jako vývoj protilátek. Proto jsou zde uvedeny pouze nejčastější cíle MoAb.

CD ANTIGENY

Jako CD antigeny (diferenciační antigeny - cluster of differentiation) označujeme membránové antigeny, které mají na povrchu stejnou antigenní determinantu - tzv.epitop. Tyto epitopy lze identifikovat stejnou monoklonální protilátkou. (Halámková a kol. 2008).

RECEPTORY PRO RŮSTOVÉ FAKTORY

Jednou z nejlépe prozkoumaných receptorových skupin je rodina receptorů epidermálního růstového faktoru EGFR, která zahrnuje skupinu tyrozinkinázových receptorů. Jedná se o receptor pro epidermální růstový faktor EGFR (také HER 1, c-ErbB-1), HER 2/neu (c-erbB-2), HER 3 (c-ErbB-3) a HER 4 (c-ErbB-4). Prostřednictvím monoklonálních protilátek proti těmto receptorům lze způsobit blokádu extracelulární vazebné domény receptoru, a tím zabránit přenosu signálu intracelulárně (Halámková a kol. 2008).

TRAILR

Je receptor, který specificky váže ligand TRAIL (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand). Patří mezi receptory smrti (nebo-li „death“receptory) a po vazbě ligandu indukuje apoptózu v buněčných nádorových liniích, které ho exprimují. Je zkoušen hlavně u pacientů s pokročilým kolorektálním karcinomem (Halámková a kol. 2008).

TYROZINKINÁZY

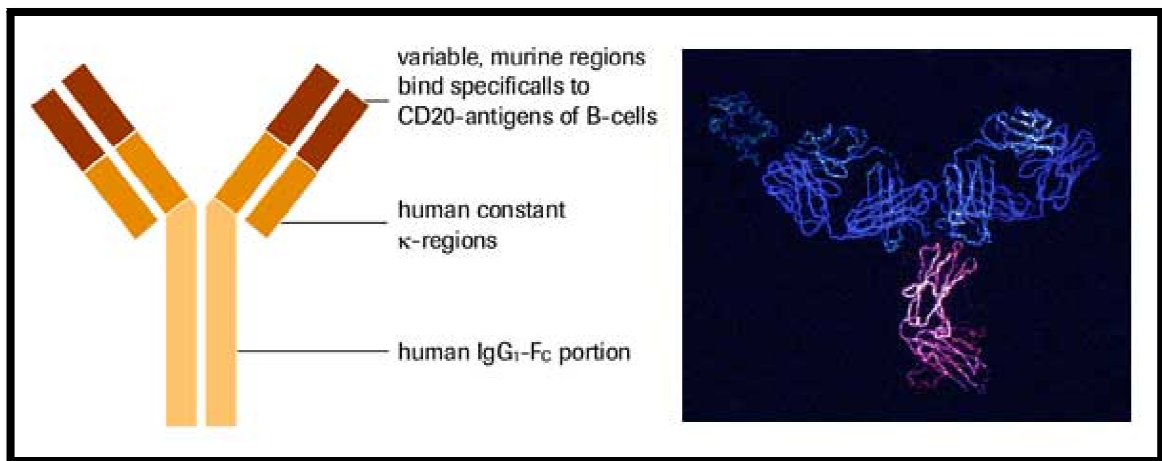
Tyrozinkináza je enzym katalyzující fosforylaci tyrozinových zbytků. Existují 2 druhy tyrozinkináz:receptorové tyrozinkinázy a nereceptorové (buněčné) tyrozinkinázy. Receptor má extracelulární (vazebnou), transmembránovou a intracelulární (katalytickou)doménu, která se nachází pod buněčným povrchem. Po vazbě ligandu na

extracelulární doménu receptoru dojde k jeho dimerizaci a autofosforylaci tyrozinových zbytků intracelulární domény. Tak dochází k její aktivaci a následné aktivaci proteinů jednotlivých signálních drah, které se podílejí na přenosu signálu do nitra buňky. Tímto jsou tyrozin kinázy odpovědné za regulaci buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy. Vazbou monoklonálních protilátek na extracelulární doménu dojde k blokadě signální dráhy (Halámková a kol. 2008).

6 NEKONJUGOVANÉ PROTILÁTKY

6.1 CHIMÉRICKÉ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

Chimérické monoklonální protilátky, jak znázorňuje obrázek 3, obsahují myší variabilní oblast (část protilátky, která specificky rozpozná antigení cíl) zapojenou do konstantní domény lidské protilátky. Tyto sekvence mohou být zaměněny s lidskými, aniž by vyvolaly imunitní odpověď organismu. Díky této vlastnosti je možné jejich použití v praxi. Nemalou výhodou chimérických protilátek je jejich delší biologický poločas (Strome a kol. 2007). Chimérické monoklonální protilátky zmíněné v této kapitole uvádí tabulka 2.



Obr. 3. Chimérická monoklonální protilátka, Převzato z (roche 2010).

Tab. 2. Chimerické monoklonální protilátky. Upraveno podle (Klener a Klener jr.2010, Sharkey a Goldenberg 2006, Sobotková a Bartůňková 2008).

Generický název	Obchodní přípravek	Cílová struktura	Indikace
Rituximab	Mabthera	CD20	NHL
Galiximab	Primatized	CD80	NHL
Lumiliximab	Lucid	CD23	CLL
SGN-30	/	CD30	Hodgkinův lymfom
Basiliximab	Simulect	CD25	Prevence rejekce při transplantaci
Cetuximab	Erbix	EGFR/ERBB1/HER1	
Volociximab	/	$\alpha 5\text{-}\beta 1$ integrin	
81C6(^{131}I)	Neuradiab	tenascin	
Infliximab		TNF- α	Prevence rejekce při transplantaci

NHL- nehodgkinský lymfom, CLL- chronická lymfatická leukemie

RITUXIMAB

Rituximab je nejdéle používaná, genetickým inženýrstvím získaná chimerická protilátka proti antigenu CD-20, který se nachází na normálních i maligních B-lymfocytech. Antigen je exprimován buňkami u více než 95 % nehodgkinských lymfomů typu B, není však přítomen na hematopoetických kmenových buňkách, na pro-B-buňkách a na plazmocytech. Tato protilátka se specificky váže na antigen CD-20 a působí cytolyzu B-lymfocytů. Rituximab též indukuje apoptózu B-buněk a zvyšuje citlivost k protinádorové terapii. Proto je výhodná jeho kombinace s cytostatickou léčbou. Hlavní indikací jsou folikulární nehodgkinské B-lymfomy, dále (CLL) a Waldenstrámová makroglobulinémie. Z nežádoucích účinků se popisuje cytokinová reakce (teplota, třesavka, tachykardie, bronchokonstrikce, angioedém, pruritus), která se může objevit zejména po první injekci. Výjimečně může aplikace rituximabu vyvolat anafylaktickou hypersenzitivní reakci (Hematology 2010). Dalším využitím Rituximabu

je indikace u vlasatobuněčné leukemie (HCL). Zde je Rituximab využíván při resistenci k terapii purinovými analogy a u časně relabujících pacientů. Terapeutický účinek Rituximabu se projevil až u 80% léčených (zdn.2010). Novou možností pro využití Rituximabu je udržovací terapie po podání cyklofosfamidu, vincristinu a prednisonu. Studie prokázala, že Rituximab prodlužuje přežití u pacientů s pokročilým indolentním lymfomem (Hochster a kol. 2009).

GALIXIMAB

Galiximab je anti-CD-80 monoklonální protilátka. S dobrými výsledky se zkouší u NHL B-buněk. Je velmi dobře tolerován a to jak v monoterapii, tak v kombinaci s Rituximabem. Právě tato kombinace se ukazuje jako velmi dobrá v léčbě folikulárního NHL. Mechanismem účinku je inhibice růstu cílové buňky a aktivace apoptózy. (Leonard a kol. 2007, Vinjamaram a kol. 2008).

LUMILIXIMAB

Lumiliximab je makak- lidská anti-CD23 monoklonální protilátka. Kromě aktivity zprostředkované komplementem a ADCC byl také pozorován proapoptický účinek (Klener a Klener jr.2010). Lumiliximab byl v roce 2008 zaregistrován organizací EMEA (European Medicines Agency) jako orphan drug pro léčbu chronické lymfocytární leukemie (EMEA 2010, b).

SGN-30

Je chimérická monoklonální protilátka proti CD30. Mechanismem účinku je aktivace ADCC a zástava buněčného cyklu. Protilátka se zatím zkouší v terapii Hodgkinova lymfomu a anaplastického velkobuněčného lymfomu.

BASILIXIMAB

Basiliximab je chimérická myší/lidská monoklonální protilátka třídy IgG1 specificky namířená proti CD25. Používá se k prevenci akutní rejekce po alogenní transplantaci ledviny. Nemá uplatnění v terapii nádorů.

CETUXIMAB

Cetuximab je chimérická monoklonální protilátka zaměřená proti extracelulární doméně receptoru pro (EGFR). Vazba Cetuximabu je pětikrát silnější než vazba přirozených ligandů TGF- α (Transformující růstový faktor α) a EGF (epidermální růstový faktor). Jeho vazbou na extracelulární doménu se zablokuje dimerizace a následná autofosforylace receptoru intracelulární kinázové domény. Cetuximab vykazuje také protinádorový účinek mechanismem ADCC. Výsledkem působení Cetuximabu je zamezení buněčné proliferace. Účinek Cetuximabu je prokázán při léčbě kolorektálního karcinomu a u rakoviny krku a hlavy (Reade a Ganti 2009).

Při léčbě dlaždicového karcinomu hlavy a krku může být použit samostatně, nebo v kombinaci s radioterapií a radioimunoterapií (Xia a kol. 2009).

V léčbě kolorektálního karcinomu je Cetuximab velmi dobře tolerován a má prokázaný protinádorový účinek. Využívá se zejm. v kombinaci s chemoterapií (Marshall 2009). Cetuximab je možné použít i u pacientů s metastazujícím kolorektálním karcinomem, kteří mají metastázy v játrech a sníženou jaterní funkci. Používá se Cetuximab samotný nebo v kombinaci s Irinotecanem, který má výsledky dokonce i u pacientů nereagujících na samotný Irinotecan. Dále je možná kombinace Cetuximabu s látkou FOLOX (leucovorin/5-FU/oxaliplatin) (Shitara a Yokota 2009).

EGFR je také běžně exprimován buňkami endometria. V pokročilém stádiu rakoviny endometria se špatnou prognózou dochází k nadprodukci EGFR. V této souvislosti probíhají výzkumy využití cetuximabu jako možné léčby. Nemalou výhodou této terapie je menší toxicita oproti klasické chemoterapii (Marshall 2009).

VOLOCIXIMAB

Volociximab je chimérická monoklonální protilátka, která se specificky váže na $\alpha 5$ - $\beta 1$ integrin. Touto vazbou se blokuje angiogeneze nádorových buněk, což způsobí snížení proliferace nádorových buněk a omezení migrace nádoru. Volociximab byl testován v terapii melanomu a pankreatického a renálního karcinomu (Bhaskar a kol. 2007).

81C6

Je konjugovaná chimérická protilátka. Bližší informace budou uvedeny v části konjugované protilátky.

INFLIXIMAB

Infliximab je chimérická lidská/myší monoklonální IgG1 protilátka namířená proti TNF- α . Nevyužívá se v terapii nádorů (Sobotková a Bartůňková 2008).

6.2 HUMANIZOVANÉ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

Tab. 3. Humanizované monoklonální protilátky. Upraveno podle (Klener a Klener jr.2010, Klener 2008, Sobotková a Bartůňková 2008, Stish a kol. 2010).

Generický název	Obchodní přípravek	Cílová struktura	Indikace
Bevacizumab	Avastin	VEGF	Nádorové cévy
Ranibizumab	Lucentis	VEGF	Nádorové cévy
Trastuzumab	Herceptin	ERBB2/HER2/NEU	Karcinom prsu, ovaria
Pertuzumab	Omnitarg	ERBB2/HER2/NEU	Karcinom prsu, ovaria
Nimotuzumab	Theraloc	EGFR/ERBB1/HER1	Karcinom tlustého střeva, plic
Alemtuzumab	MabCampath	CD52	CLL
Lintuzumab	Zamyl	CD33	AML
Matuzumab		EGFR	
Dacetuzumab (SGN-40)	/	CD40	
Epratuzumab	/	CD22	NHL
Veltuzumab	/	CD20	
Apolizumab	Remitogen	HLA-DR	NHL
Milatuzumab	/	CD74	
Labetuzumab	/	CEA, CIDE	
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	CD33	AML
Inotuzumab ozogamicin	/	CD22	
Tacatuzumab tetraxetan	/	AFP	
Siplizumab	/	CD2	T-lymfomy
Atlizumab	Actemra	IL-6	Castelmannova Choroba plazmocytom

AML- akutní myeloidní leukemie

BEVACIZUMAB

Je humanizovaná monoklonální protilátka proti ligandu VEGFR (receptor pro cévní endoteliální růstový faktor). Vazbou Bevacizumabu dochází k neutralizaci ligandu a k blokadě novotvorby cév nádoru (Klener a Klener jr.2010).

Používá se v kombinaci s jinými protinádorovými přípravky. K léčbě metastazující rakoviny tlustého střeva nebo konečníku je nejvýhodnější v kombinaci s chemoterapií, která zahrnuje fluoropyrimidin (např. 5-f luorouracil). U metastazující rakoviny prsu v kombinaci s paklitaxelem nebo docetaxelem, u neresektabilního pokročilého, metastazujícího nebo rekurentního nemalobuněčného karcinomu plic u pacientů, jejichž nádorové buňky nejsou dlaždicového typu, v kombinaci s chemoterapií, která zahrnuje léčivo na bázi platiny. U pokročilé nebo metastazující rakoviny ledvin se používá v kombinaci s interferonem alfa-2a (EMEA .2010, e).

RANIBIZUMAB

Patří do skupiny látek určených k léčbě neovaskularizace v oblasti oka. Ranibizumab je fragment humanizované monoklonální protilátky proti VEGF-A. Váže se se silnou afinitou na VEGF-A isoformy (např. VEGF110, VEGF121 a VEGF165) a tím brání vazbě VEGF-A na receptory VEGFR-1 a VEGFR-2. Blokáda vazby VEGF-A na jeho receptory vede k zamezení proliferace endoteliálních buněk a zabránění neovaskularizace a propustnosti cév. Všechny tyto účinky přispívají ke snížení progresu neovaskulárních forem věkem podmíněné makulární degenerace (EMEA . 2010, h).

TRASTUZUMAB

Trastuzumab je rekombinantní humanizovaná monoklonální protilátka proti receptoru 2 pro lidský epidermální růstový faktor HER2 (human epidermal growth factor receptor 2). Zvýšená exprese HER2 je pozorována u 20 – 30 % primárních karcinomů prsu. Trastuzumab inhibuje proliferaci lidských nádorových buněk, které ve zvýšené míře exprimují HER2. Navíc trastuzumab působí mechanismem ADCC. V monoterapii se využívá k léčbě pacientů, kteří byli pro své metastazující nádorové onemocnění již léčeni nejméně 2 chemoterapeutickými režimy. Předchozí chemoterapie musí zahrnovat antracyklin a taxan, s výjimkou pacientů, pro které jsou tyto látky nevhodné. Pokud pacienti nedostávali předchozí chemoterapii, používá se kombinace trastuzumabu s paklitaxelem nebo docetaxelem. U postmenopauzálních pacientek

s metastatickým karcinomem se využívá kombinace s inhibítorem aromatázy. Trastuzumab je také indikován u pacientek s HER2 pozitivním časným karcinomem prsu po chirurgickém zákroku, chemoterapii a radioterapii. Léčba trastuzumabem je obecně dobře snášena, v některých případech se může objevit kardiotoxicita po kombinaci s doxorubicinem (EMEA 2010, i, Morris a Hudis 2009).

PERTUZUMAB

Je humanizovaná monoklonální protilátka, která se váže na extracelulární doménu receptoru ERBB2/HER2/NEU (Receptor z rodiny pro epidermální růstový faktor). Vazba pertuzumabu na doménu brání dimerizaci receptoru s ostatními členy rodiny a dochází k bloádě proliferace nádorových buněk. Pertuzumab zatím není schválen ke klinickému použití, ale stále se jeho účinky testují (Klener a Klener jr.2010).

Pertuzumab je aktivní u karcinomů s přítomnou molekulou HER-2 bez genové amplifikace. Preklinické studie ukazují možnost využití pertuzumabu v léčbě nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) a jeho relapsující formy (Johnsonand a Jenne 2006, Herbst a kol. 2009).

Klinickou studií bylo zjištěno, že je výhodné kombinovat léčbu pertuximabu a rituximabu v terapii rakoviny prsu. V této kombinaci blokují signální dráhu receptoru, zastavují buněčný růst a indukují apoptózu. Výsledky ukázaly, že kombinace obou látek je pro terapii nádoru prsu mnohem výhodnější než léčba samotnými protilátkami (Nahta a kol. 2004).

Pertuzumab byl také testován v kombinaci s erlotinibem, což je inhibitor růstového faktoru HER1/EGFR. Testování kombinace léčiv bylo prováděno u nádorových buněk prsu a plic. Testy prokázaly, že kombinace léčiv je více účinná než monoterapie (Friess a kol. 2005).

NIMOTUZUMAB

Je monoklonální protilátka proti extracelulární doméně receptoru pro EGFR/ERBB1/HER1. V roce 2008 získal statut orphan léčiva pro terapii karcinomu pankreatu (Klener a Klener jr.2010).

Nimotuzumab zlepšuje protinádorové účinky radiace u prokázaného NSCLC. Tento účinek může být spřažen s úrovní exprese EGFR spíše než s mutací EGFR (Akashi a kol. 2008).

ALEMTUZUMAB

Monoklonální protilátka anti CD52. Struktura CD52 je vázána na povrchu lymfocytů. Při CLL dochází k nadprodukcii lymfocytů. Vazbou alemtuzumabu na CD52 dochází k jejich odumírání. Dále je exprimován u NHL. Alemtuzumab je lékem třetí volby při léčbě lymfocytární leukemie (EMA. 2010, j)

LINTUZUMAB

Humanizovaná monoklonální protilátka proti CD33 exprimovanému na povrchu buněk AML a jiných myeloproliferací. Dosud je v klinickém zkoušení (Klener a Klener jr.2010).

Ve studii, která testovala kombinaci lintuzumabu s chemoterapeutiky se neprokázal jeho významnější podpurný účinek (Feldman a kol. 2005).

MATUZUMAB

Je lidská monoklonální protilátka proti lidskému EGFR. Byla testována na různých typech lidských nádorů, například primární peritoneální karcinom, karcinom vaječníků, gastrointestinální nádory. Studie prokázaly dobrou účinnost protilátky k těmto typům nádorů (Rivera a kol 2008).

DACETUZUMAB

Anti CD-40. Antigen CD-40 je transmembránový protein exprimovaný na povrchu normálních B-buněk. Daclizumab blokuje při zvýšené expresi tento protein, čímž spustí apoptózu nádorových buněk. Účinkuje zejména u lymfomů B-buněk a mnohočetného myelomu. Výhodná je jeho kombinace s jinými léčivy (Khubchandani a kol. 2009, Hussein a kol. 2010).

Dacetuzumab vykazuje dobré výsledky i v klinických studiích u pacientů s NHL (Advani a kol. 2009).

Dále se Dacetuzumab s určitým úspěchem testoval u nemocných s chronickou lymfocytární leukemií. Jeho účinek zde není úplně zřejmý (Furman a kol 2010).

EPRATUZUMAB

Je humanizovaná monoklonální protilátka zaměřená proti antigenu CD22, exprimovanému na povrchu zralých B- lymfocytů. Mechanismus účinku je zprostředkován pomocí ADCC a dále působí fosforylaci a agregaci CD22 antigenů, což vyvolává antiproliferační a imunomodulační účinky. Významný je také jeho konjugát s ⁹⁰Y. Epratuzumab zatím není indikován ke standardnímu léčení, ale probíhají klinické zkoušky (Klener a Klener jr. 2010).

V mezinárodní multicentrické studii byl epratuzumab testován v kombinaci s rituximabem (anti CD20) u pacientů po chemoterapii s NHL relapsujícím a nereagujícím na předchozí léčbu. Výsledky ukázaly u těchto pacientů trvalé zlepšení (Leonard a kol. 2008).

VELTUZUMAB

Je anti- CD20 monoklonální protilátka s 90% lidskou komponentou. Veltuzumab se váže na stejný epitop jako rituximab, ale má protražovaný účinek na B- lymfocyty a intenzivnější mechanismus CDC. Předpokládají se u něj indikace folikulární lymfom a DLBCL (difúzní velkobuněčný lymfom) (Klener a Klener jr. 2010).

Veltuzumab a Epratuzumab byly použity pro výrobu bispecifické rekombinantní protilátky. Tato protilátka se testovala in vivo a in vitro pro léčbu NHL. Bispecifická protilátka vykazovala lepší účinek ADCC než samotné protilátky a také ve vysokých dávkách inhibovala Daudiho lymfom. Příprava bispecifické protilátky ukázala nové možnosti využití do budoucna (Li a kol. 2005).

APOLIZUMAB

Je humanizovaná monoklonální protilátka proti β řetězci HLA antigenu II. třídy HLA- DR. V preklinických studiích se zkouší jeho účinnost v léčbě NHL a CLL (Robak T., 2008, Leonard a Link , 2002).

DACLIZUMAB

Daclizumab je humanizovaná lidská/myší IgG1 monoklonální protilátka namířená proti podjednotce α receptoru pro IL-2. Využívá se v kombinaci s dalšími imunosupresivy k prevenci akutní rejekce po alogenní transplantaci ledviny (Sobotková a Bartůňková 2008).

MILATUZUMAB

Humanizovaná monoklonální protilátka proti CD-74. Tento membránový protein je produkován ve větší míře maligními B-buňkami. Milatuzumab se proto může uplatnit při léčbě různých druhů lymfomů, jako je Hodgkinův lymfom nebo mnohočetný myelom. Největší účinek Milatuzumabu se projevil v kombinaci s jinými cytotoxickými léčivy, jako jsou bortezomib, doxorubicin a dexamethason. Dále je výhodná jeho konjugace s toxinem Ranpirnasa, čímž vzniká imunotoxin nazvaný 2L-Rap-hLL1- γ 4P se zvýšeným účinkem proti NHL a mnohočetnému myelomu (Mark a kol. 2009, Stein a kol. 2009, Stein a kol. 2007).

LABETUZUMAB

Je humanizovaná anti-CEA monoklonální protilátka. CEA (carcinoembryonic antigen) je sérový nádorový marker, který se spojen s růstem nádorů a tvorbou metastáz. Pozitivní výsledky lametuzumabu byly pozorovány u medulárního karcinomu (MTC- medullary thyroid cancer), a to jak v monoterapii, tak v kombinaci s chemoterapeutikem dacarbazinem. Při kombinované terapii labetuzumab zvyšuje citlivost nádoru vůči dacarbazinu aniž by se zvyšovala jeho toxicita (Stein a Goldberg 2004).

Labetuzumab je možné využít při léčbě MTC jako radiokonjugát ^{90}Y -hMN-14IgG nebo ^{131}I - MN- 14 F(ab)₂ (Sharkey a kol. 2005, Juweid a kol. 1999).

Dalším možným využitím labetuzumabu je léčba kolorektálního karcinomu a gastrointestinálních metastáz. Pro tuto terapii byl využit opět radiokonjugát ^{131}I -MN-14 IgG (Hajjar a kol 2002).

GEMTUZUMAB OZOGAMYCIN, INOTUZUMAB OZOGAMYCIN

Jsou to konjugáty monoklonální protilátky s antibiotikem ozogamycinem. Podrobnější informace jsou uvedeny v příslušné kapitole

TACATUZUMAB TETRAXETAN

Konjugovaná monoklonální protilátka. Podrobnější informace jsou uvedeny v příslušné kapitole.

SIPLIZUMAB

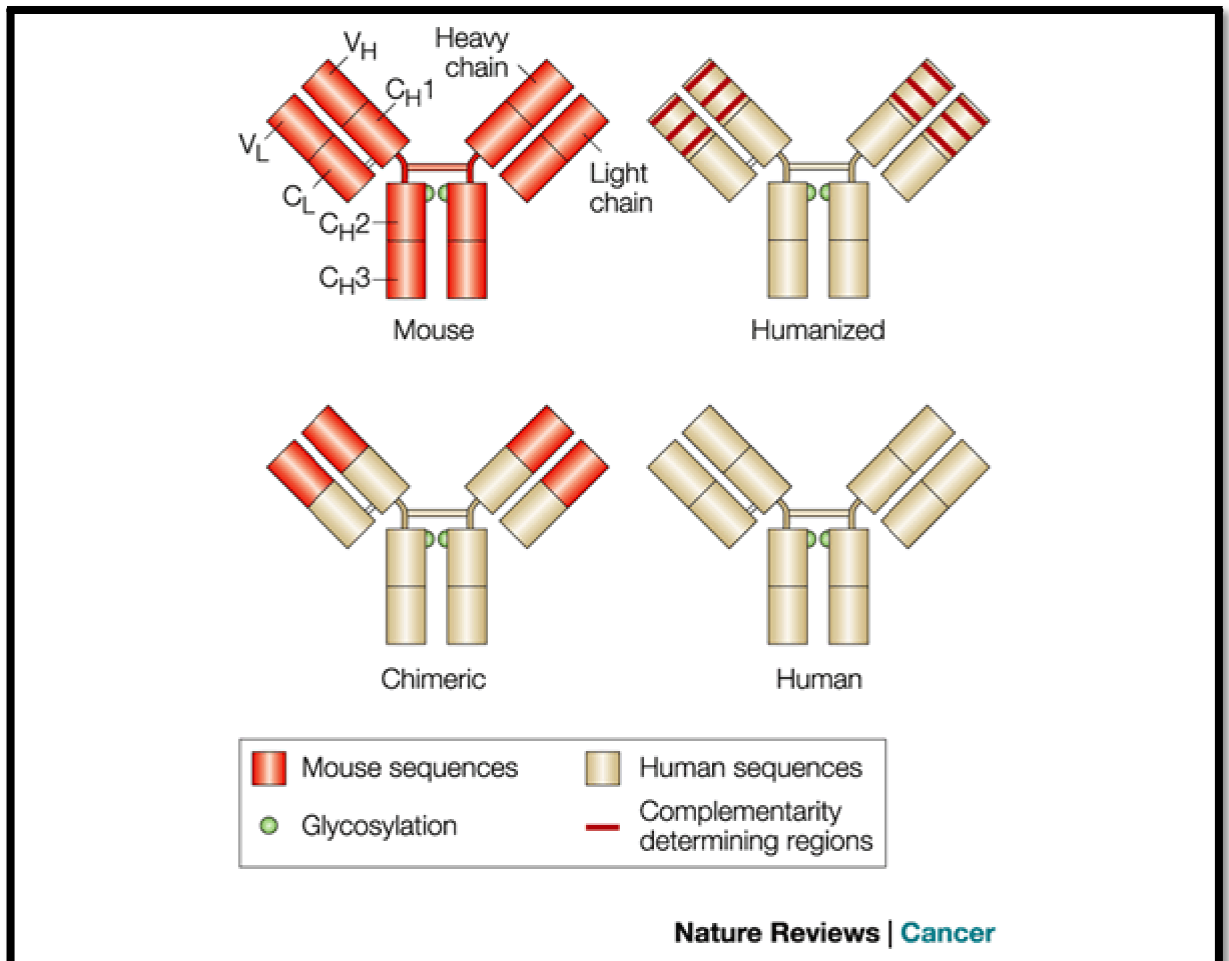
Je anti CD-2 monoklonální protilátka. V roce 2006 byl schválen komisí Evropských společenství jako léčivý přípravek pro vzácná onemocnění, konkrétně pro léčbu malignit T-lymfocytů a NK-lymfocytů. (EMEA 2010, f).

ATLIZUMAB

Protilátka proti receptoru IL-6. Má využití v léčbě hematologických chorob, zejména Castelmannovy choroby a mnohočetného myelomu (Klener 2008).

6.3 LIDSKÉ PROTILÁTKY A MYŠÍ PROTILÁTKY

Typ lidské a myší protilátky je znázorněn na obrázku 4. Protilátky uvedené v této kapitole zahrnuje tabulka 4.



Obr. 4. myší a lidské monoklonální protilátky. Převzato z (Carter 2001)

Tab. 4. Lidské a myší monoklonální protilátky.

Upraveno podle (Klener 2008, Sobotková a Bartůňková 2008, Rivera a kol. 2008).

Generický název	Obchodní přípravek	Cílová struktura	indikace
Oftatumumab (Humax CD20)	/	CD20	NHL
Zanolimumab (Humax CD4)	UltiMab	CD4	Mucosis fungoides, T-lymfomy
Iratumumab	/	CD30	Hodgkinův lymfom
Panitumumab	Vectibix	EGFR	
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	CD20	NHL
Tositumomab	Bexxar	CD20	NHL
Zalutumumab		EGFR	
Edrecolomab		IgG2a	Nádory tlustého střeva
Catumaxomab		CD-3	Maligní ascites, karcinom vaječnicků, GIT karcinom

OFATUMUMAB

Je plně humanizovaná monoklonální protilátka s vysokou afinitou proti CD-20, který je exprimován na B-buňkách. Vyvolává smrt cílových buněk pomocí aktivace komplementu již při nízké expresi CD-20 (Maddocks a Lin 2009).

Je schválen FDA a EMEA pro léčbu CLL. Testuje se v terapii lymfomů (Zhang 2009).

Určitý účinek prokázal ve studii testující léčbu relapsujícího nebo těžko léčitelného folikulárního NHL (Hagenbeek a kol. 2008).

ZANOLIMUMAB

Je monoklonální protilátka proti antigenu CD-4. Zanolimumab je výjimečný tím, že působí na buňky nádoru dvojitým mechanismem účinku. Jednak blokuje signální dráhu po navázání na receptor a dále vyvolá buněčnou lýzi spuštěním Fc dependentního mechanismu ADCC. Zanolimumab byl testován pro použití u kožních T-buněčných lymfomů (CTCL) a uzlinových T-lymfomů (Rider a kol. 2009, Kim a kol 2007).

Dobré výsledky vykazuje i v kombinaci s běžnou chemoterapií při léčbě PTCL (peripheral T cell lymphoma) (d'Amore a kol. 2010).

IRATUMUMAB (MDX-060)

Je lidská anti-CD30 monoklonální protilátka. Její využití se předpokládá v terapii Hodgkinova lymfomu (Ansell a kol. 2007, Klimm a kol. 2005).

PANITUMUMAB

Panitumumab je monoklonální protilátka určená k terapii metastazující rakoviny tlustého střeva a konečníku. Mechanismem účinku je vazba Panitumabu na receptor EGFR, který se nachází na povrchu nádorových buněk a nemá mutovaný KRAS (Kirsten rat sarcoma) gen. Mutace KRAS genu ruší účinek Panitumumabu. Vazbou na receptor EGRF dojde k blokadě přenosu buněčných signálů a zastavení buněčného dělení a tvorby metastáz. Panitumumab je používán v kombinaci s irinotecanem, v případě, že předchozí terapie samotným irinotecanem selhala (EMEA. 2010, k).

Panitumumab je dále dobře účinný v léčbě pokročilého kolorektálního karcinomu (Rivera a kol. 2008).

IBRITUMOMAB TIUXETAN

Je konjugovaná myší monoklonální protilátka s ^{90}Y . Bližší informace budou upřesněny v příslušné kapitole.

TOSITUMOMAB

Je testován pro léčbu nádorů ve formě radiokonjugátu. Bude podrobně popsán v příslušné kapitole.

ZALUTUMUMAB

Monoklonální protilátka zaměřená proti EGFR. Je zkoušen pro použití u rakoviny dlaždicového epitelu hlavy a krku (Rivera a kol. 2008).

EDRECOLOMAB

Je myší IgG2a monoklonální protilátka zaměřená proti antigenu 17-1A (Ep-CAM - epithelial cell adhesion molecule). Navázáním edrecolomabu na Ep-CAM dojde k aktivaci pomocných buněk imunitního systému a tím ke snížení proliferace nádorových buněk. Edrecolomab vykazuje účinek u nádorů tlustého střeva. Dále byl sledován jeho pozitivní efekt při léčbě metastáz rakoviny prsu do kostní dřeně (Gambill 2001, Kirchner a kol. 2002).

CATUMAXOMAB

Podrobnější informace jsou uvedeny v části bispecifické protilátky.

6.4 BISPECIFICKÉ PROTILÁTKY

Jsou to protilátky, které mají schopnost vázat se na dva antigeny současně.

CATUMAXOMAB

Je první EMEA schválená monoklonální protilátka anti-EpCAMaanti-CD3. Svým složením je krysa/myší hybridomová trifunkční, bispecifická monoklonální protilátka. Má předpoklady k léčbě rakoviny vaječníků, gastrointestinálního karcinomu a k léčbě maligního ascitu (Ruf a kol. 2010, Shen a Zhu 2008).

Používá se k léčbě maligního ascitu, nahromadění tekutiny v peritoneální dutině, který je způsoben karcinomem. Katumaxomab rozpoznává přítomnost molekuly EpCAM, která se nachází ve větším počtu na povrchu některých nádorových buněk a váže se na ně. Dále rozpoznává antigen CD3, který je na povrchu T-lymfocytů. Vazbou katumaxomabu na oba antigeny dojde k přiblížení T-lymfocytů k nádoru do takové míry, že jsou schopny zahájit jeho destrukci (EMEA 2010, c).

ERTUMAXOMAB

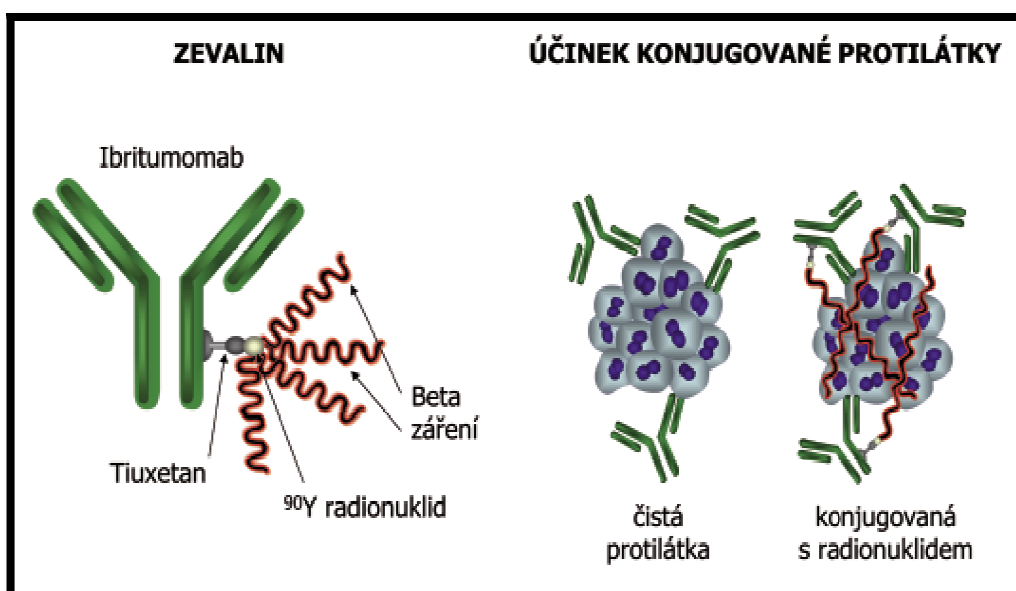
Je bispecifická monoklonální protilátka proti Her2 a CD3 se selektivní vazbou na Fc γ typ I / III receptory. Má za následek tvorbu komplexu buněk nádorových, T-lymfocytů a buněk pomocných. Ertumaxomab je schopen indukovat imunitní efektorové buňky a buněčnou cytotoxicitu u různých typů nádorů, které mají nízkou expresi Her2. Ertumaxomab může být využíván u pacientek s nádorem prsu, které nemohou být léčeny rituximabem (Jäger a kol. 2008).

7 KONJUGOVANÉ PROTILÁTKY

Snaha posílit léčebnou účinnost MoAb vedla ke konstrukci konjugovaných protilátek, u kterých je na vlastní protilátku navázán radionuklid, cytostatikum, toxin nebo enzym (Klener a Klener jr.2010).

Bylo zjištěno, že konjugované protilátky jsou více účinné než nekonjugované. Přípravují se pro zvýšení aktivity svých nekonjugovaných forem, ale tato potenciace účinku často znamená také zvýšení toxicity. Častým nežádoucím účinkem je hepatotoxicita, gastrotoxicita nebo hematotoxicita. Toxické účinky konjugátů závisí na jejich typu (Sharkey a Goldenberg 2008).

7.1 RADIOKONJUGÁTY



Obr. 5.: Schemaické znázornění účinku protilátky konjugované s radionuklidem.

Převzato z (Klener P. 2008).

V praxi se osvědčily zejména protilátky s navázaným radionuklidem, nejčastěji ytriem (^{90}Y) nebo jodem (^{131}I). Radionuklid je protilátkou dopraven až do nádorové tkáně a podle povahy zářiče vykazuje různě intenzivní cytotoxický účinek na nedostupné maligní elementy uvnitř nádorové masy (Klener a Klener jr.2010).

Konjugáty s radionuklidy se mohou podávat dvěma způsoby. První je podání hotového konjugátu radionuklid- protilátka, takzvaná přímá konjugace. Druhý způsob je

pretargeting technika, což se dá přeložit jako technika předběžného cíle. Do těla se v první fázi podá konjugovaná cílená protilátka, která se naváže na antigen nádoru a poté, co se úplně odstraní z krve, se podá konjugát radionuklidu. Ten je navázaný na malou molekulu, která má schopnost navázat se na cílovou protilátku. Po té, co se radionuklid naváže na protilátku, se oddělí průvodní molekula a rychle se eliminuje ledvinami. Tímto postupem je možné dodat vyšší radiaci, než jakou by se dosáhlo podáním hotového konjugátu. Výhodou radiokonjugátů je bezpochyby to, že jejich okruh působení se neomezuje pouze na označené buňky, ale i na buňky v okolí. Nemusí být tedy bezpodmínečně označeny všechny nádorové buňky. Velikost rozsahu a účinnost závisí na typu radioaktivního záření (Sharkey a Goldenberg 2008). Mechanismus účinku radiokonjugátu znázorňuje obrázek 5.

¹³¹I-tositumomab

V terapii lymfomu B-buněk (B-lymfocytů) se uplatňují konjugáty anti- CD20 konjugované s ¹³¹I nebo ⁹⁰Y. Využívá se také kombinace samotné radioimunoterapie kombinované s ¹³¹I-tositumomab, která vyvolává u jinak neléčených pacientů odezvu až 96% (Green a kol. 2007).

⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan

Konjugáty ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan a ¹³¹I – tositumomab jsou schválené pro léčbu ne Hodgkinského a folikulárního lymfomu (Sharkey a kol. 2010).

81C6

V roce 2006 byla uznána radiokonjugovaná ¹³¹I anti- tenascin protilátka 81C6 jako orphan léčivo pro léčbu gliomu. Mechanismus účinku je takový, že protilátka nalezne buňky nádoru a naváže se na ně. Pomocí radiace vyzařované ¹³¹I dochází k poškození buněk nádoru a k jejich destrukci (EMA 2010, a).

⁹⁰Y)-DOTA

V roce 2009 byla jako orphan léčivo pro terapii rakoviny pankreatu schválena radiokonjugovaná monoklonální protilátka (⁹⁰Y)-DOTA-radioaktivně označená monoklonální protilátka proti mucinu 1. Mucin 1 je protein přítomný na mnoha buňkách, ale jeho nadměrná produkce je typická pro rakovinu pankreatu. Konjugát se díky protilátce naváže na rakovinové buňky a ty jsou následně poškozeny a ničeny radioaktivním zářením z ⁹⁰Y (EMEA 2010, d).

Mnoho kombinací protilátkových konjugátů je teprve ve fázi klinického a preklinického výzkumu. Příkladem může být studie, která ukazuje využití kombinace nekonjugované humanizované protilátky anti-CD20 (veltuzumab) s ⁹⁰Y-konjugovanou humanizovanou protilátkou anti-CD22 (epratuzumab). Tato kombinace byla testována na myších modelech. Studie prokázala významný ústup B-lymfomu po několikátýdenní aplikaci (Mattes a kol. 2008).

¹⁸⁶Re- EPRATUZUMAB

Epratuzumab se dále testoval jako Radiokonjugát ¹⁸⁶Re- epratuzumab u pacientů s NHL. Zjišťovala se jeho nejvyšší možná tolerovaná dávka (Postema a kol. 2003).

TACATUZUMAB TETRAXETAN

Radioimunokonjugát složený z monoklonální protilátky HuAFP31, chelatující kyseliny DOTA (tetra-azacyclododecanetetra-acetic acid) a je označena radioizotopem Yttrium 90. Váže se na nádorové buňky exprimující alfa fetoprotein. Je v první fázi klinického zkoušení nádorů jater (Cancer 2010 a, Cancer 2010 b).

¹³¹I-chTNT

Radiokonjugát spojený z radionuklidu jódu-131 a rekombinantní chimérické TNT (tumor necrosis treatment)protilátky. TNT využívá degenerované nádorové buňky a nekrotické oblasti jako cíl radioimunoterapie. ¹³¹I-chTNT je velmi dobře snášen a může být využit pro léčbu obtížně léčitelných nádorů plic (Chen a kol. 2005).

7.2 IMUNOKONJUGÁTY S CYTOSTATIKY

Jako první systémové nosiče využitelné v cílené protinádorové terapii byly zkoumány monoklonální protilátky. Jejich výhodnou vlastností je jejich vysoká vazebná afinita na specifické antigeny. Nejvíce využívané jsou monoklonální protilátky třídy IgG, protože jsou velmi malé a jsou přítomné ve všech tělních tekutinách. Používají se chimérické nebo humanizované protilátky. Po vazbě protilátky na cílovou strukturu na povrchu nádoru dojde k přenosu konjugátu dovnitř buňky. Ten je zprostředkován endocytózou. Jakmile je konjugát uvnitř buňky, je léčivo odděleno pomocí lysozymů. Množství léčiva v buňce je redukováno P- glykoproteinovou transmembránovou pumpou oproti systémové aplikaci samotného léčiva. Množství cytotoxického léčiva vázaného na protilátku nesnižuje její schopnost vázat se na antigen, ale exprese antigenů na nádorech je kapacitně omezená.

Léčiva používaná pro vytvoření konjugátu jsou například, vinka alkaloidy, antracykliny, doxorubicin, CC-1065 (produkt *Sreptomyces zelensis*), druhá generace taxanů, monomethyl auristatin E, Geldanamycin. Významnou látkou je cantuzumab mertansine, konjugát s DM1 (MYTANSINOID 1), což je derivát maytansinoidu obsahující makrocyclický laktam z ansamycinu.

GEMTUZUMAB OZOGAMYCIN

Konjugát monoklonální protilátky gemtuzumabu (anti- CD33) a cytotoxického antibiotika ozogamicinu, což je derivát calicheamycinu. Používá se na léčbu akutní myeloidní leukemie u pacientů, kteří nereagují na jinou chemoterapeutickou léčbu nebo se u nich vyskytl relaps (Singh a kol. 2008, Damle 2004).

INOTUZUMAB OZOGAMYCIN

Stejně jako Gemtuzumab je konjugátem monoklonální protilátky s ozogamycinem. Zatím je klinicky zkoušen u pacientů s NHL (Damle 2004).

cAC10-vcMMAE

Dalším příkladem je konjugát monoklonální protilátky cAC10 s monomethyl auristatinem E (MMAE) (Singh a kol. 2008).

MLN2704

Je konjugát monoklonální protilátky a chemoterapeutika a jeho cílem je PSMA (prostate-specific membrane antigen). Tento transmembránový receptor je exprimován buňkami prostaty a jeho exprese se v průběhu maligního onemocnění zvyšuje. Chemoterapeutikum konjugované v MLN2704 je MYTANSINOID1 (DM1) a způsobuje depolymerizaci mikrotubulů. Po navázání konjugátu na příslušný receptor dojde k oddělení chemoterapeutika a jeho přesun dovnitř buňky, kde způsobí buněčnou smrt. Účinek konjugátu byl testován na zvířecích modelech. Výsledky prokázaly i účinek na osteoblastické metastázy rakoviny prostaty (Henry a kol. 2004).

TRASTUZUMAB-MCC-DM1

Je dalším konjugátem, který byl schválen pro klinické studie. Tento konjugát je složen z HER-2 monoklonální protilátky Trastuzumabu a chemoterapeutika MYTANSINOIDU (DM1). Trastuzumab sám vykazuje účinek při léčbě rakoviny prsu, kde dochází k nadměrné expresi HER-2. Bylo prokázáno, že konjugací s DM1 se zvýšila aktivita léčiva vůči všem buňkám s nadměrnou expresí HER-2 a zároveň se snížila toxicita DM1 (Phillips a kol. 2008).

BENTUXIMAB REDOTIN (SGN-35)

SGN-35 je protilátkový konjugát složený z tubulinového inhibitoru MMAE a monoklonální protilátky anti-CD30 (cAC10). SGN-35 je aktivní v léčbě Hodgkinova lymfomu. Po uvolnění z vazby působí MMAE jak v rakovinné buňce, tak v buňkách okolních, kam se dostane díky propustnosti buněčné membrány. Jako další možné využití SGN-35 se ukazuje terapie ATL (Adult T-cell leukemia- leukemie dospělých T buněk) (Okeley a kol. 2010, Maeda a kol. 2010).

Konjugace monoklonální protilátky s cytostatikem se využívá méně často. Vazbou cytostatika na protilátku se může jednak měnit specifita protilátky, jednak může vážnout internalizace MoAb s navázaným cytostatikem, nutná pro vlastní cytotoxický účinek. Přesto se i tohoto využívá v klinické praxi (Klener a Klener jr.2010).

7.3 IMUNOKONJUGÁTY S ENZYMY

Antibody- directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) je konjugace monoklonální protilátky s enzymem schopným přeměnit neúčinnou látku na látku cytotoxickou. Tento mechanismus účinku má dva kroky. V první fázi se vytvořené monoklonální protilátky spojí s enzymem schopným konvertovat léčivo a podají se intravenózně pacientovi. Konjugát se pak naváže na specifický antigen vytvořený na povrchu nádorových buněk. V druhé fázi se podá systémově netoxické léčivo, naváže se na cílový enzym a dojde k přeměně léčiva na aktivní cytotoxickou formu. Pro tento typ konjugátu jsou vhodná zejména léčiva s malou molekulou, která snadno difundují do okolní nádorové tkáně. Po uvolnění konvertovaného léčiva dochází k intoxikaci všech buněk v okolní tkáni a ne jen těch rychle se dělících nebo označených specifickým antigenem. Proto je velmi důležité přesné načasování podání protilátky s enzymem a následné podání netoxického léčiva tak, aby všechny protilátky byly nakumulovány v místě nádoru a nedocházelo k intoxikaci zdravých tkání nebo krve.

Konjugáty protilátek s enzymy musí splňovat několik vlastností. Cílový antigen může být exprimován buď na povrchu nádorových buněk, nebo v extracelulární matrix. Enzym by měl mít nejlepší aktivitu při pH nádorové extracelulární tekutiny. Konjugát protilátky a enzymu může být imunogenní a vzniklé protilátky mohou narušovat léčbu, proto by léčivo mělo být závislé na dávce a nezávislé na buněčném cyklu. Pro dostatečný léčebný efekt musí zůstat konjugát navázan na antigen dostatečně dlouhou dobu a sledně musí být rychle odstraněn z krevního řečiště, aby nedocházelo k intoxikaci.

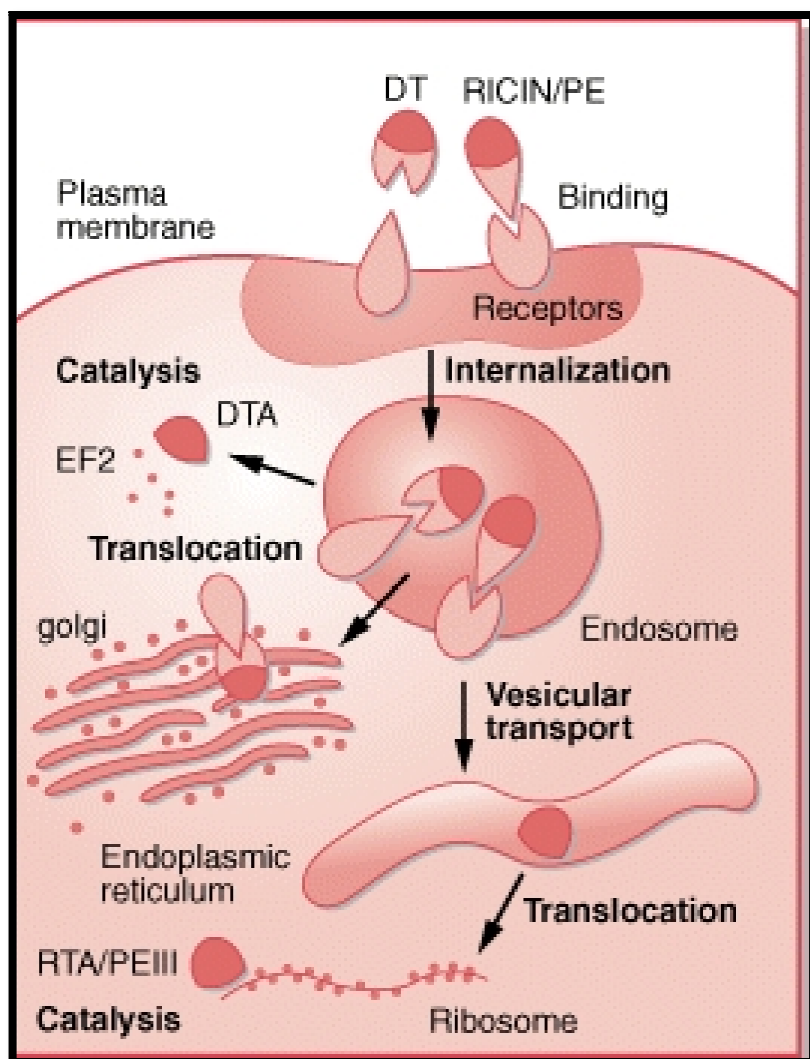
Pro konjugaci se používají například enzymy alkalická fosfatáza, α -galaktosidáza, karboxypeptidáza A, β -glukuronidáza, nitroreduktáza, β -laktamáza, karboxypeptidáza, cytosin deamináza, benzylpenicilin amidáza.

Z léčiv používaných pro konjugaci se používají například paklitaxel, antracykliny, dinitrobenzamid.

Mezi největší výhody enzymatických konjugátů patří zesílení cytotoxicity proti nádorovým buňkám a snížení toxicity proti zdravým tkáním, které nejsou označeny antigenem.

Použití konjugátů má také překážky, které spočívají v imunogenně způsobené použitými enzymy, které nejsou tělu vlastní. Tento problém se dá odstranit použitím lidských enzymů konjugovaných s lidskými nebo humanizovanými protilátkami (Singh a kol. 2008).

7.4 IMUNOKONJUGÁTY S TOXINY



Obr. 6. Toxinové imunokonjugáty. Model buněčné intoxikace toxiny a cílenými toxiny. Receptor pro cílené toxiny se liší od receptoru původních toxinů, ale kroky následující po navázání ukazují určité podobnosti mezi cíleným a původním toxinem. Toxiny se váží na povrchové buněčné receptory. Tento komplex je přenesen do nitra buňky pomocí vhodných kompartmentů. Pro přenos Diphtheria toxinů jsou vhodné endozomy a pro přenos Pseudomonas exotoxinů nebo Ricinu se využívá endoplazmatické retikulum. Do cytosolu se dostane pouze katalytická doména toxinů, která inaktivuje syntézu proteinů. Převzato z (NCBI 2010).

7.4.1 IMUNOTOXINY

Výzkum imunotoxinů jako možných agens pro cílenou protinádorovou terapii probíhá několik posledních desetiletí. Imunotoxiny opět využívají proteinové molekuly na povrchu nádorových buněk jako svůj cíl. Díky této selektivní vazbě je jejich působení šetrné ke zdravým buňkám.

Imunotoxiny jsou složeny z částice selektivně rozpoznávající cíl, což je ligand nebo protilátka a z toxinu s cytotoxickým účinkem. Úkolem protilátky je rozpoznat cílový receptor na nádorové buňce a celou molekulu k němu dopravit. Toxin pak spustí buněčnou smrt. Toxiny působí buď v cytosolu, kde katalyzují inhibici životních funkcí nádorové buňky nebo porušují buněčnou membránu.

Protilátka může být s toxinem spojena buď disulfidovou nebo thioetherovou vazbou, nebo může být s těmito molekulami spojena na úrovni DNA (deoxyribonukleová kyselina). Protože mnoho cílů toxicity je umístěno v cytosolu, je pro cytotoxický účinek nezbytný receptor zprostředkující endocytózu. Jelikož u toxinové částice byla předem odstraněna transmembránová doména, musí být protilátka schopná vazbu na tento receptor zprostředkovat. Jakmile se toxin dostane dovnitř buňky, inhibuje syntézu proteinů a způsobuje tak buněčnou smrt.

Toxiny použité pro přípravu imunotoxinů patří do třídy toxických proteinů. Dělí se na rostlinné a bakteriální.

Rostlinné toxiny jsou glykosylované) a lze je rozdělit na toxiny třídy I, hemitoxiny, kam patří PAP (pokeweed antiviral protein), saporin, bryodin 1, bouganin a gelonin a na toxiny třídy II, holotoxiny, které zahrnují ricin, abrin, lectin a modecin.

Holotoxiny obsahují doménu vazebnou a katalytickou, zatímco hemitoxiny pouze katalytickou. Katalytické domény obou typů toxinů jsou přeneseny do cytosolu, kde indukují apoptózu. Vazebná doména holotoxinu musí být před translokací do cytosolu odstraněna (Kreitman 2006, Li a kol. 2005).

Naproti tomu bakteriální proteiny glykosilované nejsou. Patří sem *Pseudomonas* exotoxin A (PE) a *Diphtheria* toxin (DT) nebo Cyt1Aa, toxin z *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. (Li a kol. 2005, Cohen a kol. 2007).

DT byl připraven jako nosič cytotoxického účinku do jinak neléčitelného nádoru. Jediná jeho molekula v nádorové buňce může způsobit její smrt. DT se selektivně váže na nádorové buňky pomocí vazebné domény vazebného receptoru. Podle studie, která se zabývala vazbou DT na receptor, ale bylo zjištěno, že

rekombinovaný DT385 může být cytotoxický i pro nádorové buňky bez vazebného receptoru (Zhang a kol. 2010). Mechanismus účinku toxinových konjugátů znázorňuje obrázek 6.

Cyt1A toxin byl konjugován s myelinovými peptidy a úspěšně testován na myších pro léčbu mnohočetného myelomu (Cohen a kol. 2007).

Imunotoxiny můžeme rozdělit do dvou kategorií: Chemické konjugáty (první generace) a rekombinantní imunotoxiny (druhá generace).

7.4.2 CHEMICKÉ KONJUGÁTY

Do první generace imunotoxinů patří celé protilátky, chemicky konjugované s toxinem. Spojení může být provedeno ohebnou disulfidickou vazbou nebo thioetherovou vazbou. Třebaže thioetherová vazba je stabilnější v krevním řečišti a tkáňovém moku, jsou thioetherové konjugáty méně účinné než disulfidové. S několika konjugovanými toxiny byly zahájeny klinické zkoušky. Jsou to například konjugáty anti- CD5 a anti CD- 7 spojené s ricinem. Dále PE spojený s OVB3, což je myší monoklonální protilátka reagující s nádorem vaječníků nebo PE spojený s LL2 molekulou zacílenou na nádory B- buněk.

7.4.3 REKOMBINANTNÍ IMUNOTOXINY

Výzkum a nové technologie výroby rekombinačních proteinů umožnily vyrábět rekombinantní imunotoxiny vysoké kvality a čistoty. Mnoho klinicky schválených imunotoxinů obsahuje celou IgG molekulu. Přítomnost protilátkové Fc domény, ale může vést k vazbě na určité druhy proteinů v plasmě a způsobovat nežádoucí toxicitu imunotoxinu v játrech a ve slezině. Protože vazebné místo pro antigeny se nachází na Fv doméně protilátky, je odstranění Fc domény pomocí genového inženýrství velmi výhodné. Vznikly tak generace rekombinantních protilátkových fragmentů zahrnující jedno- řetězcové Fv (single- chain, ScFv), disulfid- stabilizované Fv, bivalentní disulfid- stabilizované Fv a jedno- řetězcové disulfid- stabilizované Fv (single- chain disulfid- stabilized Fv, SdsFv). Částice ScFv, jsou velkými kandidáty pro fúzi s proteiny, protože jsou málo toxické pro normální tkáň a jejich příprava je velmi snadná (Li a kol. 2005).

Imunotoxiny klinicky testované v posledních letech s různou úspěšností jsou uvedeny v tabulkách 5 a 6.

Tab. 5. Chemické konjugáty. Upraveno podle (Kreitman 2006).

konjugát	antigen	ligand	Zkrácený toxin	Základní toxin	Onemocnění
RFT5-dgA	CD25	MAb	dgA	Ricin	HD
RFB4-dga	CD22	MAb	dgA	Ricin	B-NHL, CLL
RFB4-Fab'- dgA	CD22	Fab'	dgA	Ricin	B-NHL
HD37-dgA	CD19	MAb	dgA	Ricin	B-NHL
Anti-CD7- dgA	CD7	MAb	dgA	Ricin	T-NHL
K _i -4.dgA	CD30	MAb	dgA	Ricin	HD
LMB-1	Le ^y	MAb	Lys-PE38	PE	Karcinom
TF-CRM107	TFR	Tf	CRM107	DT	Gliom
B43-PAP	CD19	MAb	PAP	PAP	ALL
Anti-B4- bRicin	CD19	MAb	bR	Ricin	B-NHL
Ber-H2-Sap6	CD30	MAb	Sap6	Saponin	HD
Anti-My9- bRicin	CD33	Mab	bR	Ricin	AML
454A12-rRA	TFR	MAb	rRA	Ricin	CSF
N901-bR	CD56	MAb	bR	Ricin	SCLC

Tab. 6. Rekombinantní toxiny. Upraveno podle (Kreitman 2006).

konjugát	antigen	ligand	Zkrácený toxin	Základní toxin	Onemocnění
Ontak	IL2R	IL-2	DAB ₃₈₉	DT	CTCL, CLL, NHL
BL22	CD22	dsFv	PE38	PE	HCL, CLL, NHL
LMB-2	CD25	scFv	PE38	PE	NHL, leukemie
DT388-GM-CSF	GM-CSF	GM-CSF	DT388	DT	AML
B3(Fv)-PE38	Le ^y	scFv	PE38	PE	Karcinom
B3(dsFv)-PE38	Le ^y	dsFv	PE38	PE	Karcinom
TP40	EGFR	TGF α	PE40 ^{4a}	PE	CIS, karcinom moč. měchýře
TP38	EGFR	TGF α	PE38	PE	Glioblastom
BR96(csFv)-PE40	Le ^y	scFv	PE40	PE	Karcinom
Erb38	ErbB2	dsFv	PE38	PE	Rakovina prsu
NBI-3001	IL4R	IL-4(38-37)	PE38KDEL	PE	Gliom
IL13-PE38QQR	IL13R	IL-13	PE38QQR	PE	karcinom ledvin
SS1(dsFv)-PE38	Mesothelin	dsFv	PE38	PE	Mesotheliom
DAB ₃₈₉ EGF	EGFR	EGF	DAB ₃₈₉	DT	Karcinom

Toxiny obsahující rekombinantní řetězec A ricinu (rRA), blokovaný ricin (bR), deglykosylovaný A řetězec ricinu (dgA), pokeweed antiviral protein (PAP), zkrácený diphteria toxin (DT338 nebo DAB₃₈₉), zkrácený pseudomonas exotoxin (PE38 nebo PE40), mutovaný diphteria toxin (CRM107). Nemonoklonální protilátkové ligandy (MAb) zahrnující interleukin-2, -4, a -13 (IL-2, IL-4, IL-13), granulocyty-makrofágy tlustého střeva stimulující faktor (GM-CSF), epidermální růstový faktor (EGF), transferin (Tf). PE 40^{4AA} je PE40 s alaninem substituovaným za cystein v pozici 265, 287, 372, a 379. PE38QQ je PE38 s 2 glutaminy a 1 argininem nahrazujícími 3 lysiny PE38 na pozicích 590, 606, 613., hogkinova nemoc (HD), carcinom in situ (CIS), metastazující nádor poškozující mozkomíšni mok (CSF), malobuněčná rakovina plic (SCLC), akutní lymfoblastická leukemie (ALL).

7.4.4 IMUNOTOXINY TESTOVANÉ PRO TERAPII HEMATOLOGICKÝCH NÁDORŮ

Hematologické nádory jsou optimální pro terapii pomocí imunotoxinů. Maligní buňky jsou často intravaskulární a proto snadno dostupné pro intravenózně podávané léčivo. Uvedené konjugáty jsou součástí klinického testování.

DAB389-IL (Denileukin diftitox)

Je složen z interleukinu-2 a zkráceného diphteria toxinu. Byl schválen FDA pro léčbu CTCL (lymfom kožních T-buněk). Dále je možné jeho využití u periferního T-lymfomu, CLL, B-NHL. IL-2 receptor receptor je přítomen u mnoha hematologických zhoubných nádorů. Imunokonjugátem je fúzní molekula obsahující IL-2 a DT. Zkouší se účinnost pro lymfom kožních T-buněk (CTCL), (ATL) a další leukemie a lymfomy B-buněk a T-buněk.

anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2).

Monoklonální protilátka anti-CD25 je označována jako anti-Tac. S touto protilátkou byl vytvořen rekombinantní imunotoxin anti-Tac(Fv)-PE40 a nepatrně kratší derivát anti-Tac(Fv)-PE38 (nazývaný LMB-2). Prvotní studie ukazují, že LMB-2 je selektivně cytotoxický vůči CD25+ linii maligních buněk a vůči leukemickým buňkám získaným od pacientů. LMB-2 se zkouší pro léčbu vlasatobuněčné leukemie (HCL) a leukemie dospělých T-buněk.

RFT5-dgA (anti CD25)

Vznikl chemickou konjugací dgA (deglykosylovaný A řetězec ricinu) a monoklonální protilátky RFT5. Testuje se pro použití u Hodgkinova lymfomu.

BL22, RFB4(dsFv)-PE38 (CAT-3888)

Patří mezi konjugáty anti-CD22. Testuje se pro použití u lymfomů B-buněk a vlasatobuněčné leukemie (Kreitman 2006). Tento imunotoxin má také velmi slibné terapeutické využití při léčbě dětských hematologických malignit (Wayne a kol. 2010).

DT388-GM-CSF (DTGM)

Receptor pro granulocytové- makrofágové kolonie stimulující receptor (GM-CSFR) je přítomen na buňkách akutní myeloidní leukemie (AML). Tento receptor je cílem pro DT388-GM-CSF, který vznikl fúzí lidského GM-CSF a bakteriálního toxinu (Kreitman 2006).

HD37-dgA (anti-DC19) a RFB4-dgA (anti-CD22)

Vykazují účinek u pacientů s maligními B-buňkami.

T25(dsFv)-PE38 a T6(dsFv)-PE38

Konjugáty s potencionální cytotoxicitou vůči CD30.

DT388_IL3

Byla zjištěna jeho toxicita vůči AML, primární AML nebo chronické myeloidní leukemii.

BU12-saporin

Imunotoxin zkonstruovaný z monoklonální protilátky anti-CD19(BU-12) a ribosomy inaktivujícího proteinu saporinu. Testuje se pro léčbu akutní lymfoblastické leukemie a dalších nádorů s povrchovým antigenem CD-19 (Ortín M. 2005).

Anti-CD7saporin a anti-CD38saporin

Jejich cílem je mnohočetný myelom a leukemie T-buněk. Cytotoxicita se zvyšuje při vzájemné kombinaci.

Anti-80 a anti-86 konjugáty s geloninem

Léčba hodgkinova lymfomu (Kreitman 2006).

7.4.5 IMUNOTOXINY TESTOVANÉ PRO TERAPII SOLIDNÍCH NÁDORŮ

Léčba solidních nádorů pomocí cílené terapie imunotoxinů je mnohem obtížnější, než terapie hematologických nádorů. Solidní nádory jsou tvořené těsnými a pevnými shluky buněk. Další překážkou je aktivita imunitního systému pacienta. Buňky imunitního systému tvoří protilátky, které neutralizují toxin.

DAB₃₈₉EGF

Byl vytvořen spojením EGF a diphteria toxinu. Je zaměřen na nádory tvořící EGFR. V poslední době je testován zejména pro lokální léčbu nádorů mozku a pankreatu.

LMB-1

Chemický konjugát B3 a PE38. Zaměřuje nádory exprimující Le^y.

LMB-7 (B3(Fv)-PE38) a LMB-9 (B3(DsFv)-PE38)

Rekombinantní imunotoxiny zaměřené proti Le^y. Le^y exprimuje karcinom prsu, vaječníků a karcinomy gastrointestinálního původu. Výhodou LMB-9 je jeho stabilita při 37°C.

BR96(sFv)-PE40

Rekombinantní imunotoxin anti Le^y

ScFv(FRP5)-ETA

Imunotoxin zaměřený proti erB5, který se objevuje u rakoviny prsu a tlustého střeva.

IL4(38-37)-PE38KDEL

Léčba solidních nádorů a hematologických malignit obsahující IL4R. Imunotoxin je vysoce toxický pro jaterní tkáň. Testuje se pro intratumorální použití u mnohočetného glioblastomu.

IL13-PE38QQR

Imunotoxin zaměřuje receptor IL13, který souvisí s receptorem IL4 a je exprimován u řady solidních nádorů. Imunotoxin se testuje hlavně u metastazujícího renálního karcinomu.

Tf-CRM107

Konjugát obsahující lidský transferin a mutovaný difteria toxin. Působí cíleně proti transferinovému receptoru. Ten je přítomen na všech buňkách, které jsou aktivně vázané pomocí železa, částečně v játrech.

SS1(dsFv)-PE38(SSP1)

Cílem je protein mesothelin u solidních nádorů, jako je mesotheliom nebo karcinom vaječníků a prsu.

N901-bR

Cílem je antigen CD56. Tento antigen je exprimován buňkami malobuněčného karcinomu plic (Kreitman 2006).

DTAT13

Je rekombinantní bispecifický imunotoxin složený ze zkráceného diphteria toxinu, fúzního proteinu, části urokinázového typu plasminogenového aktivátoru a části lidského IL-13. Jeho cílem je urokinázový typ plasminogen aktivací receptor. Je slibný pro využití u multifonního glioblastomu (Halla Vallera 2006, Rustamzadeh a kol 2006).

anti-IL-13R α 2(scFv)-PE38

Je imunotoxin s velkou selektivitou a specifitou vůči receptoru IL-13R α 2. Tento receptor je exprimován buňkami různých solidních nádorů, fibroblastů a dalších buněk. Imunotoxin je tvořen fúzí specifické protilátky proti IL-13R α 2 a mutovaného pseudomonas exotoxinu. Testy in vitro byla prokázána protinádorová aktivita a imunotoxin je doporučen pro testování in vivo (Kioi a kol. 2008).

ScFv(FRP5)-(ETA)

Je imunotoxin složený z toxinu ETA, Pseudomonádový exotoxin A, a rekombinantní Sc protilátky se specifickou vazbou na HER2/neu. Bylo zjištěno, že injekčním podáním imunotoxinu přímo do podkožního nádorového uzlu dochází k jeho zmenšení a celkovému ústupu. První studie pro podání imunotoxinu intravenózně ukázaly, že látka by mohla být podána pacientovi v dostatečné dávce a bez výrazného hepatotoxického účinku (Messmer a Kipps 2005).

GRF4KDEL7Mut

Je bispecifický ligandem řízený toxin (BLT), který byl připraven z lidského EGF a IL-4 spojených s PE-38. Tento imunotoxin je slibný v léčbě mezoteliálního lymfomu (Stish a kol. 2010).

NAPTUMOMAB ESTAFENATOX (ABR-217620)

Tato konjugovaná protilátka je kombinací superantigenního stafylokokového enterotoxinu E (SEA/E-120) spojeného s protilátkovým fragmentem proti antigenu 5T4. Byl testován u pacientů s NSCLC, kde prokazoval dobrou toleranci a imunologickou aktivitu jak v monoterapii tak v kombinaci s docetaxelem. Je využíván zejména u vzdorujících nádorů ledvin. (Borghaei a kol. 2009, Robinson a kol. 2010).

8 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY REGISTROVANÉ V ČR

Monoklonální protilátky, které byly zavedeny do praxe v ČR, uvádí tabulka číslo 7.

Tab. 7. MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY REGISTROVANÉ V ČR. Upraveno podle (SUKL 2010, EMEA 2010, g).

REGISTROVANÉ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY	OBCHODNÍ NÁZEV v ČR	INDIKACE
RITUXIMAB	MABTHERA	Léčba nehodgkinského lymfomu, chronická lymfocytární leukémie
TRASTUZUMAB	HERCEPTIN	Časný i metastatický karcinomu prsu, metastatický karcinomu žaludku
ALEMTUZUMAB	MABCAMPATH	léčba chronické lymfocytární leukémie
GEMTUZUMAB	/	Léčba akutní myeloidní leukémie
CETUXIMAB	ERBITUX	Metastazující kolorektální karcinom, spinocelulární karcinomy hlavy a krku
BEVACIZUMAB	AVASTIN	metastazující rakoviny tlustého střeva nebo konečníku v kombinaci s chemoterapií, metastazující rakoviny prsu v kombinaci s paklitaxelem nebo docetaxelem, léčba neresektabilního, pokročilého, metastazujícího nebo rekurentního nemalobuněčného karcinomu plic
PANITUMUMAB	VECTIBIX	Léčba kolorektálního karcinomu
OFATUMUMAB	ARZERRA	léčba chronické lymfocytární leukémie
EDRECOLOMAB	/	
KATUMAXOMAB	REMOVAB	léčba maligního ascitu, který je způsoben karcinomem.

9 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY NOVÉ GENERACE

Díky novým možnostem genového inženýrství dnes můžeme kromě klasické hybridomové techniky rekombinačně připravit i protilátkové fragmenty tzv. diabodies. Diabodies mohou být bivalentní monospecifické (homodimer dvou scFv fragmentů se stejnou antigenní specifitou) nebo bivalentní bispecifické (heterodimer dvou scFv fragmentů s odlišnou antigenní specifitou). Obrovskou výhodou diabodies je jejich malá molekulová hmotnost v porovnání s klasickou protilátkou, nevýhodou je především absence Fc fragmentu. Rekombinantním spojením více scFv mohou vznikat i multivalentní či multispecifické protilátky, nazývané triabodies ,tetrabodies atp.

Imunocytokiny představují další možnou alternativu spojení dvou odlišných funkcí do jedné molekuly. Imunocytokiny jsou fúzní proteiny cytosinů a monoklonálních protilátek, u nichž se předpokládá kombinace terapeutického účinku protilátky s lokální imunostimulací v místě nádoru.

Peptibodies je označení pro rekombinantně připravené fúzní proteiny Fc fragmentů IgG s polypeptidy vykazujícími vazebnou afinitu vůči specifickým molekulám (ligandům, receptorům apod.).

Intrabodies (neutralizační intracelulární protilátky) odrážejí nové možnosti genové terapie. Vnesení genu pro MoAb do nádorových buněk s následnou expresí monoklonální protilátky uvnitř buňky, s předpokládaným inhibičním účinkem MoAb vůči konkrétním intracytoplazmatickým proteinům, zásadním způsobem rozšiřuje operační pole monoklonálních protilátek. Vhodnou formu intrabodies představují vzhledem ke své malé velikosti především diabodies (scDb) nebo ještě lépe monovalentní scFv.

Chimérické imunoreceptory jsou další perspektivní alternativou terapeutického využití monoklonálních protilátek. MoAb specifické pro určitý cytosin/růstový faktor se mohou svým modifikovaným Fc fragmentem vázat na povrch nádorových buněk a fungovat zde jako tzv. *decoy* receptory neboli falešné (chimérické) imunoreceptory, což vede k depleci klíčových stimulačních molekul z nádorového prostředí (Klener a Klener jr.2010).

10 ZÁVĚR

Cílem mé práce bylo představit využití protilátek v nádorové terapii.

Protilátky jsou zde rozděleny do hlavních kapitol nekonjugované protilátky a konjugované protilátky. Tyto kapitoly se dále dělí. Nekonjugované protilátky jsou rozděleny podle původu na chimérické, humanizované, čistě lidské a bispecifické. Mezi cílové struktury chimérických MoAb patří hlavně CD antigeny a receptory z rodiny EGFR. Zástupci z této skupiny jsou Rituximab, Cetuximab, Galiximab a jejich využití je zejména v léčbě NHL, nebo kolorektálního karcinomu.

.Humanizované MoAb mají jako hlavní cíle opět struktury CD a receptory z rodiny EGFR. Jejich zástupci Bevacizumab, Trastuzumab, Nimotuzumab Lintuzumab nebo Epratuzumab se používají hlavně k léčbě NHL, AML, karcinomu prsu, tlustého střeva. Lidské a myší MoAb mají stejné cílové struktury jako předchozí skupiny. Hlavními indikacemi jejich zástupců Oftatumumab, Tositumomab jsou NHL.

Konjugované protilátky jsou rozděleny na radiokonjugáty, konjugáty s cytostatiky, konjugáty s enzymy, konjugáty s toxiny. Mimo toxinových konjugátů využívají všechny skupiny do konjugovaného spojení dříve uvedené nekonjugované protilátky. Dochází tak k zesílení protinádorového účinku. Protilátka zde slouží jako nosič účinné látky do požadovaného cíle. U toxinových konjugátů se k přenosu do cíle mimo protilátek často využívá i protilátkových fragmentů. Jejich hlavními indikacemi jsou NHL, ALL, AML, CLL, karcinom prsu nebo ledvin.

Díky novým možnostem, které nám poskytují jak moderní technologie, tak genové inženýrství se může vyvíjet i výzkum protilátek poměrně rychlým tempem. Vývoj nových protilátek, protilátkových částic a konjugátů nepřináší jen úspěšnější léčbu pacientů s rakovinou, ale také zmenšení nepříjemných nežádoucích účinků, které s sebou běžná chemoterapie přináší.

11 LITERATURA

Advani R, Forero-Torres A, Furman RR, Rosenblatt JD, Younes A, Ren H, Harrop K, Whiting N, Drachman JG. (2009) Phase I study of the humanized anti-CD40 monoclonal antibody dacetuzumab in refractory or recurrent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009 Sep 10;27(26):4371-7.

Akashi Y., Okamoto I., Iwasa T., Yoshida T., Suzuki M., Hatashita E., Yamada Y., Satoh T., Fukuoka M., Ono K. a Nakagawa K. (2008) Enhancement of the antitumor activity of ionising radiation by nimotuzumab, a humanised monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor, in non-small cell lung cancer cell lines of differing epidermal growth factor receptor status. *British Journal of Cancer* 98, 749 – 755

Ansell SM, Horwitz SM, Engert A, Khan KD, Lin T, Strair R, Keler T, Graziano R, Blanset D, Yellin M, Fischkoff S, Assad A, Borchmann P. (2007) Phase I/II study of an anti-CD30 monoclonal antibody (MDX-060) in Hodgkin's lymphoma and anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007 Jul 1;25(19):2764-9.

Bhaskar V, Zhang D, Fox M, Seto P, Wong MH, Wales PE, Powers D, Chao DT, Dubridge RB, Ramakrishnan V., (2007) A function blocking anti-mouse integrin alpha5beta1 antibody inhibits angiogenesis and impedes tumor growth in vivo. *J Transl Med*. 2007 Nov 27;5:61.

Borghaei H, Alpaugh K, Hedlund G, Forsberg G, Langer C, Rogatko A, Hawkins R, Dueland S, Lassen U, Cohen RB. (2009) Phase I dose escalation, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of naptumomab estafenatox alone in patients with advanced cancer and with docetaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Sep 1;27(25):4116-23.

CANCER a, [online] [cit. 25. 4. 2010] Dostupné z: <http://www.cancer.gov/search/ViewClinicalTrials.aspx?cdrid=419742&version=HealthProfessional&protocolsearchid=8026478>

Cancer b, [online] [cit. 10. 7. 2010]. Dostupné z <http://www.cancer.gov/drugdictionary/?CdrID=425347>

Carter P. (2001) Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature Reviews Cancer* 1,2001, 118-129

Cohen S., Cahan R., Ben-Dov E., Nisnevitch M., Zaritsky A. a Firer M. (2007) Specific Targeting to Murine Myeloma Cells of Cyt1Aa Toxin from *Bacillus thuringiensis* Subspecies *israelensis*. Published, *JBC Papers in Press*, July 11, 2007, DOI 10.1074/jbc.M703567200

Damle N. (2004) Tumour-targeted chemotherapy with immunoconjugates of calicheamicin. *Expert Opin Biol Ther*. 2004 Sep;4(9):1445-52.

d'Amore F, Radford J, Relander T, Jerkeman M, Tilly H, Osterborg A, Morschhauser F, Gramatzki M, Dreyling M, Bang B, Hagberg H. (2010)
Phase II trial of zanolimumab (HuMax-CD4) in relapsed or refractory non-cutaneous peripheral T cell lymphoma. *BJ Haematol.* 2010 Jul 14. 565–573

EMEA a, [online] [cit. 4. 2. 2010] dostupné z:
www.ema.europa.eu/pdfs/human/comp/opinion/22196108en.pdf, London, 15 June 2009,
Doc.Ref.: EMEA/COMP/221961/200

EMEA b, [online] [cit. 15. 3. 2010] dostupné z:
www.ema.europa.eu/pdfs/human/comp/opinion/67112508en.pdf, London, 24 June 2009,
Doc.Ref.: EMEA/COMP/671125/2008

EMEA c, [online], [cit. 26. 4. 2010] Dostupné z:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000972/WC500051809.pdf

EMEA d, [online], [cit. 27. 5. 2010], Dostupné z:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2009/10/WC500005415.pdf
EUROPEAN PUBLIC ASSESSMENT REPORT (EPAR), EMEA/H/C/972

EMEA e, [online] [cit 5. 6. 2010] dostupné z:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Assessment_Report_-_Variation/human/000582/WC500075000.pdf

EMEA f, [online] [cit. 12.6.2010] Dostupné z:
http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2006/2006062911749/dec_11749_cs.pdf

EMEA g, [online], [cit. 4. 7. 2010] dostupné z:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/home/Home_Page.jsp&murl=&mid=

EMEA h, [online] [cit 7. 7. 2010] dostupné z:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000715/WC500043548.pdf

EMEA i, [online] [cit 8. 7. 2010] Dostupné z:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf

EMEA j, [online] [cit. 10. 7. 2010] dostupné z:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000353/WC500025270.pdf

EMEA k, [online],[cit.12. 7. 2010] dostupné z:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000741/WC500047710.pdf

Feldman E., Brandwein J., Stone R., Kalaycio M., Moore J., O'Connor J., Wedel N., Roboz G., Miller C., Chopra R., Jurcic J., Brown R., Ehmann W., Schulman P., Frankel

S., De Angelo D. a Scheinberg D. (2005) Phase III Randomized Multicenter Study of a Humanized Anti-CD33 Monoclonal Antibody, Lintuzumab, in Combination With Chemotherapy, Versus Chemotherapy Alone in Patients With Refractory or First-Relapsed Acute Myeloid Leukemia.

Journal of clinical oncology 23:4110-4116

Friess T., Scheuer W. a Hasmann M. (2005) Combination Treatment with Erlotinib and Pertuzumab against Human Tumor Xenografts Is Superior to Monotherapy., Clin Cancer Res 2005;11(14) July 15, 2005

Furman RR, Forero-Torres A, Shustov A, Drachman JG. (2010)
A phase I study of dacetuzumab (SGN-40, a humanized anti-CD40 monoclonal antibody) in patients with chronic lymphocytic leukemia.
Leuk Lymphoma. 2010 Feb;51(2):228-35

Gambill B. D., Edrecolomab (Panorex®) as Adjuvant Therapy for Stage II Colon Cancer. (2001)

Clinical Colorectal Cancer May 2001, 16-17,1533-0028

Green D., Pagel J., Pantelias A., Hedin N., Lin Y., Wilbur D, Gopal A., Hamlin D. a Press O. (2007) Pretargeted Radioimmunotherapy for B-Cell Lymphomas, Clin Cancer Res 2007;13(18 Suppl) 5598s

Hagenbeek A., Gadeberg O., Johnson P., Pedersen L. M., Walewski J., Hellmann A., Link B. K., Robak T., Wojtukiewicz M., Pfreundschuh M., Kneba M., Engert A., Sonneveld P., Flensburg M, Petersen J., Losic N. and Radford J. (2008)
First clinical use of ofatumumab, a novel fully human anti-CD20 monoclonal antibody in relapsed or refractory follicular lymphoma: results of a phase 1/2 trial
Blood 2008;111:5486-5495

Hajdúch M., Cwiertka K., Trojanec R. a Špačková K. Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii [online] [cit. 15. 3. 2010]
http://lem.ocol.cz/_data/1156179437_96.pdf

Hajjar G., Sharkey R., Burton J., Zhang Ch., Yeldell D., Matthies A., Alavi A., Losman M., Brenner A., Goldenberg D. (2002). Phase I Radioimmunotherapy Trial with Iodine-131– Labeled Humanized MN-14 anti– carcinoembryonic antigen monoclonal antibody in patients with metastatic gastrointestinal and colorectal cancer. Clinical Colorectal Cancer, Vol. 2, No. 1, 31-42,

Halámková J., Šmardová J., Pour L., Tomášek J., Novotný J., Demlová R., Koptíková J., Kiss I., Adam Z., Nové léky v onkologii, [online] posl.revize 6.3.2008 [cit.15. 7. 2010]. Dostupné z: www.zdn.cz/news/check-sub?id=350862

Hall WA, Vallera DA. (2006)
Efficacy of antiangiogenic targeted toxins against glioblastoma multiforme.
Neurosurg Focus. 2006 Apr 15;20(4):E23.

Henry M., Wen S., Silva M., Chandra S., Milton M. and Worland P. (2004) A prostate-specific membrane antigen-targeted monoclonal antibody–chemotherapeutic conjugate designed for the treatment of prostate cancer.
CANCER RESEARCH 64, 7995–8001, November 1, 2004

Herbst R., Davies M., Natale R., Dang T., Schiller J., Garland L, Miller V., Mendelson D., Van den Abbeele A., Melenevsky Y., de Vries D., Eberhard D, Lyons B., Lutzker S., Johnson B.(2009) Efficacy and safety of single- agent pertuzumab, a human epidermal receptor dimerization inhibitor, in patients with non– small cell lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* Early release 10.1200/JCO.2009.22.3354,9.11.2009

Hochster H., Weller E., Gascoyne R., Habermann T., Gordon L., Ryan T., Zhang L., Colocci N., Frankel S. a Horning S. (2009) Maintenance Rituximab After Cyclophosphamide, Vincristine, and Prednisone Prolongs Progression-Free Survival in Advanced Indolent Lymphoma: Results of the Randomized Phase III ECOG1496 Study. *JCO* April 1, 2009 vol. 27 no. 10 1607-1614

Hussein M, Berenson J., Niesvizky R., Munshi N., Matous J., Sobecks R., Harrop K., Drachman J. and Whiting N. (2010)
A phase I multidose study of dacetuzumab (SGN-40; humanized anti-CD40 monoclonal antibody) in patients with multiple myeloma.
Haematologica. 2010;95:845-848

Chen, Like Y., Changying J., Yan Z., Da S., Shenyu L., Guoqing L., Yangchun Ch., Qing F., Qun T., Dan Y., Peisheng H., Khawli L., Taylor C. R., Epstein A.L. and Wen Ju D. (2005) Pivotal Study of Iodine-131–Labeled Chimeric Tumor Necrosis Treatment Radioimmunotherapy in Patients With Advanced Lung Cancer
J Clin Oncol 23:1538-1547.

Jäger M., Ruf P., Schoberth A., Hess J., Lindhofer H. Effect on low HER2 (1+) expressing tumor cells of the trifunctional antibody ertumaxomab.:*J Clin Oncol* 26: 2008 (May 20 suppl; abstr 3071)

Johnsonand B., a Janne P. Rationale for a Phase II Trial of Pertuzumab, a HER-2 Dimerization Inhibitor, in Patients with Non Small Cell Lung Cancer, *Clin Cancer Res* 2006;12 (14 Suppl) 15.7.2006,4436s

Juweid M., Hajjar G., Swayne L., Sharkey R., Suleiman S., Herskovic T., Pereira M., Rubin A., Goldenberg D. (1999)
Phase I/II Trial of 131I-MN-14 F(ab)2 anti– carcinoembryonic antigen monoclonal antibody in the treatment of patients with metastatic medullary thyroid carcinoma
Cancer 1999. *American Cancer Society* 85:1828–42

Khubchandani S, Czuczman M, Hernandez-Ilizaliturri F.(2009) Dacetuzumab, a humanized mAb against CD40 for the treatment of hematological malignancies. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009 Jun;10(6):579-87.

Kim Y. H., Duvic M., Obitz E, Gniadecki R., Iversen L, O’ sterborg A., Whittaker S., Illidge T. M., Schwarz T., Kaufmann R., Cooper K., Knudsen K. M., Lisby S., Baadsgaard O. and Knox S.J. (2007) Clinical efficacy of zanolimumab (HuMax-CD4): two phase 2 studies in refractory cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*.2007;109:4655-4662

Kioi M., Seetharam S. a Puri R. (2008)
Targeting IL-13RA2-positive cancer with a novel recombinant immunotoxin composed of a single-chain antibody and mutated *Pseudomonas* exotoxin. *Mol Cancer Ther* 2008;7(6):1579–87

- Kirchner E. M., Gerhards R., Voigtmann R. (2002)
Sequential immunochemotherapy and edrecolomab in the adjuvant therapy of breast cancer : reduction of 17-1A-positive disseminated tumor cells. *Annals of oncology* 13:1044-1048,2002
- Klener P. (2008) Omezilo zavádění tzv. Cílené léčby význam protinádorové chemoterapie? *Onkologie* 2(1): 33-37
- Klener P. a Klener P. jr., (2010), Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii, str. 79-88, str. 157-187.
- Klimm B., Schnell R., Diehl V., Engert A. (2005)
Current treatment and immunotherapy of Hodgkin's lymphoma
Haematologica 2005; 90:1680-1692
- Kreitman R. (2006) Immunotoxins for Targeted Cancer Therapy; Published: August 18, 2006 ; 8(3):E532- 51.
- Leonard JP, Friedberg JW, Younes A, Fisher D, Gordon LI, Moore J, Czuczman M, Miller T, Stiff P, Cheson BD, Forero-Torres A, Chieffo N, McKinney B, Finucane D, Molina A. (2007) A phase I/II study of galiximab (an anti-CD80 monoclonal antibody) in combination with rituximab for relapsed or refractory, follicular lymphoma. *Ann Oncol.* 2007 Jul;18(7):1216-23.
- Leonard J., Schuster S., Emmanouilides Ch., Couture F., Teoh N., Wegener W., Coleman M., Goldenberg D. (2008)
Durable complete responses from therapy with combined epratuzumab and rituximab. *Cancer* 2008 Nov 15;113(10):2714-23.
- Li Z., Yu T., Zhao P. and Ma J. (2005) Immunotoxins and Cancer Therapy
Cellular & Molecular Immunology. 2005;2(2):106-112.
- Maddocks K and Lin T. S. (2009)
Update in the management of chronic lymphocytic leukemia
Journal of Hematology & Oncology 2009, 2:29 doi:10.1186/1756-8722-2-29
- Maeda N, Muta H, Oflazoglu E, Yoshikai Y. (2010) Susceptibility of human T-cell leukemia virus type I-infected cells to humanized anti-CD30 monoclonal antibodies in vitro and in vivo. *Cancer Sci.* 2010 Jan;101(1):224-30
- Mark T, Martin P, Leonard JP, Niesvizky R. (2009)
Milatuzumab: a promising new agent for the treatment of lymphoid malignancies. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009 Jan;18(1):99-104.
- Marshall J. (2009) Vascular Endothelial Growth Factor Plus Epidermal Growth Factor Receptor Dual Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer: Synergy or Antagonism?, *Journal of Oncology*, Article ID 937305, 9 pages
doi:10.1155/2009/937305
- Mattes M., Sharkey R., Karacay H., Czuczman M. a Goldenberg D. Therapy of Advanced B-Lymphoma Xenografts with a Combination of 90Y-anti-CD22 IgG

(Epratuzumab) and Unlabeled Anti-CD20 IgG (Veltuzumab). Clin Cancer Res 2008;6155 14(19)

Messmer D. and Kipps T. (2005) Treatment of solid tumors with immunotoxins. Breast Cancer Research 2005, 7:184-186 (DOI 10.1186/bcr1284)

Morris P, Hudis C. (2009)
Personalizing therapy for metastatic breast cancer.
Expert Rev Anticancer Ther. 2009, (9):1223-6.

Nahta R., Hung M. and Esteva F. (2004) The HER-2-Targeting Antibodies Trastuzumab and Pertuzumab Synergistically Inhibit the Survival of Breast Cancer Cells, CANCER RESEARCH 64, 2343–2346, April 1, 2004

NCBI [online] [cit. 16. 5. 2010] Dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cmed6&part=A14913&rendertype=figure&id=A14914>

Nové pohledy na léčbu hematologických malignit. [Online] Poslední revize 12. 02. 2007 [cit. 12.4.2010]
<http://www.hematology.sk/modules.php?name=News&file=article&sid=41>,

Okeley NM, Miyamoto JB, Zhang X, Sanderson RJ, Benjamin DR, Sievers EL, Senter PD, Alley SC. (2010) Intracellular activation of SGN-35, a potent anti-CD30 antibody-drug conjugate. Clin Cancer Res. 2010 Feb 1;16(3):888-97.

Ortú'n M. (2005)
Immunotherapy of hematological malignancies: what is new?
Annals of Oncology 16 (Supplement 2): ii53– ii62, 2005, doi:10.1093/annonc/mdi715

Phillips G., Li G., Dugger D., Crocker L., Parsons K., Mai E., Bla'ttler W., Lambert J., Chari R., Lutz R., Wong W., Jacobson F., Koeppen H., Schwall R., Kenkare-Mitra S., Spencer S. and Sliwkowski M. (2008) Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an antibody– cytotoxic drug conjugate
Cancer Res 2008; 68: (22). November 15, 2008

Postema E, Raemaekers J, Oyen W, Boerman O, Mandigers C, Goldenberg D, van Dongen G, Corstens F., (2003) Final results of a phase I radioimmunotherapy trial using (186)Re-epratuzumab for the treatment of patients with non-Hodgkin's lymphoma., Clin Cancer Res. 2003 Sep 1;9(10 Pt 2):3995S-4002S.

Protilátka [online] [cit. 29.7.2010]. dostupné z
<http://lekarske.slovniky.cz/pojem/protilatka>

Reade Ch., Ganti A. (2009) EGFR targeted therapy in non-small cell lung cancer: potential role of cetuximab, Biologics: Targets & Therapy 2009;3 215–224

Rider D. A., Havenith C.E., de Ridder R., Schuurman J., Favre C., Cooper J.C., Walker S., Baadsgaard O., Marschner S., vandeWinkel J.G., Cambier J., Parren P. and Alexander D.R. (2007) A Human CD4 Monoclonal Antibody for the Treatment of T-Cell Lymphoma Combines Inhibition of T-Cell Signaling by a Dual Mechanism with Potent Fc-Dependent Effector Activity, Cancer Res 2007;67(20):9945–53

Rivera F., Vega-Villegas M. E., Lopez-Brea M. F. and Marquez R. (2008)
Current situation of Panitumumab, Matuzumab, Nimotuzumab And Zalutumumab
Acta Oncologica, 2008; 47: 9_19

Robak T., (2008) Novel monoclonal antibodies for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008 Mar;8(2):156-71.

Robinson MK, Alpaugh RK, Borghaei H. (2010) Naptumomab estafenatox: a new immunoconjugate. *Expert Opin Biol Ther*. 2010 Feb;10(2):273-9.

roche [online] [cit. 27. 7. 2010] Dostupné z:
<http://www.roche.com/pages/facets/9/tum1.jpg>

Ruf P., Kluge M., Jäger M., Burges A., Volovat C., Heiss M.M, Hess J., Wimberger P, Brandt B., Lindhofer H, (2010)
Pharmacokinetics, immunogenicity and bioactivity of the therapeutic antibody catuamoxomab intraperitoneally administered to cancer patients.
British Journal of Clinical Pharmacology, DOI:10.1111/j.1365- 2125. 2010. 03635. x

Rustamzadeh E, Vallera DA, Todhunter DA, Low WC, Panoskaltsis-Mortari A, Hall WA. (2006) Immunotoxin pharmacokinetics: a comparison of the anti-glioblastoma bi-specific fusion protein (DTAT13) to DTAT and DTIL13. *J Neurooncol*. 2006 May;77(3):257-66.

Sharkey R., Hajjar G., Yeldell D., Brenner A, Burton J., Rubin A. and Goldenberg D. (2005) A Phase I Trial Combining High-Dose 90Y Labeled Humanized Anti-CEA Monoclonal Antibody with Doxorubicin and Peripheral Blood Stem Cell Rescue in Advanced Medullary Thyroid Cancer. *J Nucl Med* 2005; 46:620–633

Sharkey R. and Goldenberg D. (2006) Targeted Therapy of Cancer: New Prospects for Antibodies and Immunoconjugates, *CA Cancer J Clin*, 56:226-243,

Sharkey R., Goldenberg D., (2008) Use of antibodies and immunoconjugates for the therapy of more accessible cancers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Sep;60(12):1407-20.

Sharkey R., Karacay H. a Goldenberg D. (2010) Improving the treatment of non-Hodgkin lymphoma with antibody targeted radionuclides. *Cancer*. 2010 February 15; 116(S4)

Shen J, Zhu Z. (2008)
Catumaxomab, a rat/murine hybrid trifunctional bispecific monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Curr Opin Mol Ther*. 2008 Jun;10(3):273-84.

Shitara K., Yokota T (2009) Cetuximab for Patients With Colon Cancer and Hepatic Metastasis Complicated by Liver Dysfunction and Icterus, *Gastrointest Cancer Res*. 2009 Jul– Aug; 3(4): 171–172.

Singh Y., Palombo M. and Sinko P. (2008) Recent Trends in Targeted Anticancer Prodrug and Conjugate Design, *Curr Med Chem*. 2008 ; 15(18): 1802–1826

Sobotková M., Bartůňková J., (2008)
Monoklonální protilátky a další biologická léčiva užívaná v imunosupresivní léčbě

Remedia 18: 356–364

Stein R. and Goldenberg D. (2004)

A humanized monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen, labetuzumab, inhibits tumor growth and sensitizes human medullary thyroid cancer xenografts to dacarbazine chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 2004;3(12):1559–64

Stein R., Mattes M., Cardillo T., Hansen H., Chang Ch., Burton J., Govindan S. and Goldenberg D. (2007) CD74: A New Candidate Target for the Immunotherapy of B-Cell Neoplasms. *Clin Cancer Res* 2007;13(18 Suppl)

Stein R, Smith M, Chen S, Zalath M, Goldenberg D. (2009)

Combining milatuzumab with bortezomib, doxorubicin, or dexamethasone improves responses in multiple myeloma cell lines. *Clin Cancer Res*. 2009 Apr 15;15(8):2808-17.

Stish BJ, Oh S, Chen H, Dudek AZ, Kratzke RA, Vallera DA, (2010)

Design and modification of EGF4KDEL 7Mut, a novel bispecific ligand-directed toxin, with decreased immunogenicity and potent anti-mesothelioma activity.

PMID: 19755995, PMCID: PMC2768099

Strome S., Sausville E, Mann D, (2007) A Mechanistic Perspective of Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy Beyond Target-Related Effects, *The Oncologist* 12:1084–1095

SUKL [online], [cit 2.6.2010] Dostupné z: <http://www.sukl.cz/>

Vinjamaram S, Czuczman MS, Hernandez-Ilizaliturri FJ. (2008) The use of galiximab in non-Hodgkin lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2008 Oct;8(5):277-82.

Vlasatobuněčná leukémie - diagnostika a léčba v roce 2007, [online] poslední revize 6. 3. 2007 [cit. 5. 6. 2010]

<http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/vlasatobunecna-leukemie-diagnostika-a-lecba-v-roce-2007-295148>

Wayne A.S., Kreitman R.J., Findley H.W., Lew G., Delbrook C., Steinberg S.M., Stevenson M.S., FitzGerald D.J., Pastan I. (2010) Anti-CD22 Immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) for CD22-Positive Hematologic Malignancies of Childhood: Preclinical Studies and Phase I Clinical Trial
Published OnlineFirst March 9, 2010; doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2980

Xia L., Zhang B., Liu M., Hu P., Chen X., Guo G., Qiu H., Rong Y., Qian S., Zhou F., Huang Y., Wang T., (2009) Short-term efficacy of cetuximab combined with radiotherapy or chemotherapy on head and neck cancer: a report of 11 cases, *Chinese Journal of cancer*, 2009, 28(9)

Zhang B. (2009) Ofatumumab

Landes Bioscience, [mAbs 1:4, 326-331; July/August 2009];

Zhang Y, Schulte W, Pink D, Phipps K, Zijlstra A, et al.

Sensitivity of Cancer Cells to Truncated Diphtheria Toxin. (2010) *PLoS ONE* 5(5): e10498. doi:10.1371