

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biofyziky a fyzikální chemie



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Monoklonální protilátky a jejich fragmenty v nukleární
medicině**

Barbora Doušová

Školitel práce: Doc. Ing. Alice Lázníčková, CSc.

Hradec Králové, 2016

Prohlášení

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.

Podpis _____

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Doc. Ing. Alici Lázníčkové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracovávání mé bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala svým přátelům a kolegům na brigádě, kam chodím za podporu a pomoc při plánování směn. V neposlední řadě bych tímto ráda poděkovala mé asistanterce, že mi při plánování směn vždy vyhověla a poskytla prostor pro studium.

Největší poděkování patří mé mamince, která mi byla oporou po celou dobu studia a poskytla mi pro studium ty nejlepší podmínky.

Obsah

1.	Cíl práce	6
2.	Úvod.....	7
3.	Imunitní systém	8
4.	Protilátky	9
4.1	Polyklonální protilátky	11
4.2	Monoklonální protilátky	12
4.2.1	Mechanismus účinku monoklonálních protilátek	13
4.2.2	Názvosloví monoklonálních protilátek	14
4.2.3	Klasifikace monoklonálních protilátek	15
4.3	Protilátkové fragmenty	19
4.4	Fc – fúzní proteiny a imunocytokiny	20
5.	Přehled používaných monoklonálních protilátek.....	21
5.1	Protilátky proti membránovým antigenům leukocytů.....	21
5.1.1	Rituximab	21
5.1.2	Alemtuzumab	23
5.1.3	Epratuzumab.....	24
5.1.4	Zanolimumab	24
5.2	Konjugované protilátky	25
5.2.1	Ibritumomab tiuxetan	25
5.2.2	Tositumomab.....	25
5.2.3	Gemtuzumab ozogamicin	26
5.2.4	Inotuzumoab ozogamicin	26
5.3	Protilátky proti receptorům rodiny EGFR/ERBB/HER	26
5.3.1	Cetuximab	26
5.3.2	Trastuzumab	28
5.3.3	Panitumumab.....	29
5.3.4	Nimotuzumab	30
5.3.5	Pertuzumab.....	32
5.4	Protilátky s antiangiogením účinkem	33
5.4.1	Bevacizumab	33
5.5	Bispecifické/trifunkční protilátky	33
5.5.1	Ertumaxomab	33
5.5.2	Catumaxomab.....	34
5.6	Další perspektivní protilátky	34

5.6.1	Denosumab.....	34
5.6.2	Pemtumomab.....	34
5.6.3	Basiliximab.....	34
6.	Metody stanovení monoklonálních protilátek.....	34
6.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	34
6.2	Tenkvrstvá chromatografie.....	36
6.3	Gelová permeační chromatografie (GPC)	38
7.	Závěr	40
8.	Seznam zkratek	41
9.	Seznam použité literatury	42

1. Cíl práce

Cílem mé práce bylo prostudovat v odborné zahraniční i tuzemské literatuře možnosti využití monoklonálních protilátek v nukleární medicíně a upozornit na jejich případné popsané nežádoucí účinky. Dále bylo mým cílem popsat základní stanovení monoklonálních protilátek. Laboratorní výzkum je velkým přínosem pro vývoj monoklonálních protilátek a jejich stanovení pro léčbu závažných onemocnění nebo alespoň ke zpomalení jejich rozvoje.

2. Úvod

Již před více než 100 lety byly protilátky objeveny Emilem von Behringem. Krátce po jejich objevu byl rozpoznán i jejich potenciální terapeutický význam. Do lékařské praxe byl pak pojem imunoterapie zaveden v roce 1906 Paulem Ehrlichem. Trvalo však spoustu let, než byly imunoterapeutické postupy zavedeny do klinické praxe. Dalším významným datem byl rok 1974, kdy byl objeven postup přípravy monoklonálních protilátek Caesarem Milsteinem a Georgem F. Köhlerem. Za tento objev dostali vědci o 10 let později Nobelovu cenu.

Monoklonální protilátky se široce uplatňují v diagnostice a při terapii celé řady onemocnění. Jejich hlavní uplatnění je v transplantační medicíně, při léčbě onkologických onemocnění, ale také v léčbě autoimunitních chorob. V současné době se používá několik terapeutických monoklonálních protilátek. Celá řada dalších je ve fázi výzkumu nebo klinických studií. Protilátky slouží jako nosiče léčiv či toxinů nebo se využívá jejich fyziologických funkcí, jako jsou např. ozonizace, aktivace komplementu atd. (1)

3. Imunitní systém

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům organismu. Jeho funkcí je udržování integrity organismu tak, že rozpoznává škodlivé od neškodného a chrání tak organismus proti škodlivým látkám. Mezi hlavní funkce imunitního systému patří obranyschopnost, autotolerance a imunitní dohled. Obranyschopností se rozumí ochrana organismu proti patogenním mikroorganismům a jejich toxickým produktům. Díky autotoleranci je pak organismus schopný rozpoznat vlastní tkáň organismu a udržovat vůči nim toleranci. Poslední velice důležitou funkcí je imunitní dohled, který zajišťuje průběžné odstranění starých, poškozených, nefunkčních nebo mutovaných buněk. Kromě těchto funkcí má pro obranu proti infekci velice zásadní význam neporušený povrch kůže a sliznic a jejich obranné mechanismy. Tyto mechanismy lze rozdělit na mechanické (pohyb řasinek, longitudinální vtok vzduchu v dýchacích cestách nebo tekutiny v močových cestách), chemické (lysozym ve slinách a potu, pepsin v žaludku a střevě, kyselé pH žaludku a moči) a mikrobiální (normální nepatogenní flóra kůže a sliznic). Rozlišujeme imunitu vrozenou tzv. neadaptivní, nespecifickou a imunitu získanou tzv. adaptivní, specifickou.

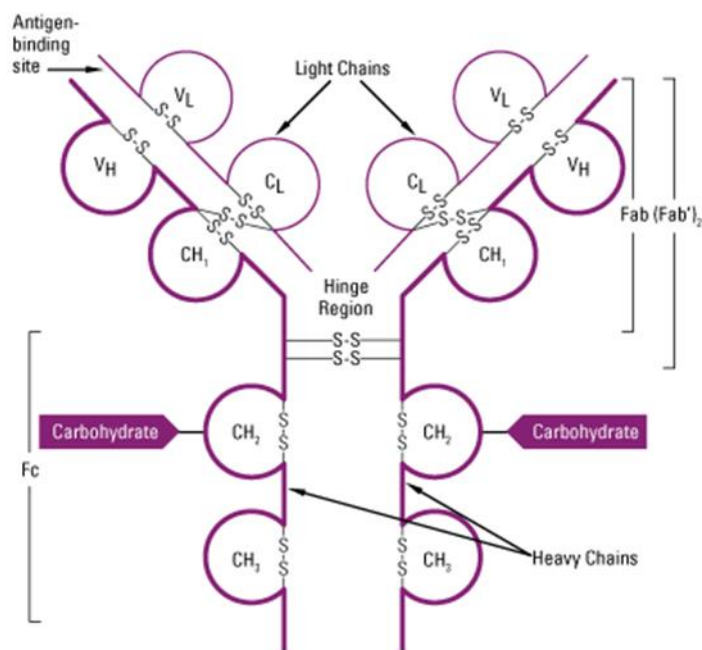
Vrozená imunita je evolučně starší a reaguje na přítomnost škodliviny velice rychle, v minutách. Nespecifické imunitní mechanismy jsou tvořeny buněčnými a humorálními složkami. Buněčnou složku představují fagocytující buňky a přirozené cytotoxické buňky tzv. NK buňky (natural killers – přirození zabíječi). Humorální složku pak tvoří komplementový systém, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny. Nespecifická imunita nemá na rozdíl od specifické tzv. imunologickou paměť, to znamená, že není ovlivněna předchozím setkáním se škodlivou látkou.

Pokud v organismu již infekce probíhá, zapojuje se druhý typ imunity a to imunita získaná. Tento typ imunity je evolučně mladší a uplatňuje antigenně specifické

mechanismy, které reagují na každou cizorodou molekulu prostřednictvím vysoce specifických molekul. Mezi tyto molekuly řadíme protilátky a antigeně specifické receptory T lymfocytů, které se aktivují až po setkání s antigenem. Na rozdíl od nespecifické imunitní reakce, dochází k úplnému rozvoji reakce až po několika dnech či týdnech. Charakteristickým rysem adaptivní imunity je pak imunologická paměť. Adaptivní i neadaptivní mechanismy jsou pro obratlovce životně důležité a nepostradatelné a vzájemně spolu kooperují. (2)

4. Protilátky

Protilátky jsou látky bílkovinné povahy, které v organismu vznikají jako imunitní odpověď na stimulaci antigenem. Tím může být např. bakterie, virus nebo látka endogenního původu. Protilátky jsou v těle produkovány B – lymfocyty. Každý má na svém povrchu určitý typ protilátky, která slouží jako receptor pro rozeznání specifického antigenu. Po navázání antigenu dochází ke stimulaci B – lymfocytu, následuje dělení, tvorba a sekrece protilátky, která se zachytila na povrch antigenu. (3) Protilátky lidského organismu se nazývají imunoglobuliny (Ig). Molekula imunoglobulinu má tvar písmene Y (obrázek č. 1). Tvoří ji dva těžké řetězce (H), které jsou kovalentně spojeny pomocí disulfidických (cystinových) můstků. Ke každému H řetězci je disulfidickým můstkem připojen jeden lehký řetězec (L). Těžké řetězce se skládají ze čtyř domén, lehké řetězce pouze ze dvou domén. Každá doména je tvořena sekvencí 110 – 120 aminokyselin. Domény na N – konci každého řetězce jsou variabilní, ostatní domény jsou konstantní. Variabilní domény se označují jako V_H a V_L , konstantní jako C_L nebo C_H . Variabilní domény obou řetězců spolu pak vytváří vazebné místo pro antigen. (2)



Obr. č. 1: Základní struktura protilátky (5)

Je známo 5 základních tříd imunoglobulinů krevního séra: IgD, IgE, IgG, IgA a IgM. IgD má velmi krátký poločas rozpadu a jeho koncentrace v séru je velice nízká. Působí jako membránový receptor na povrchu B – lymfocytů při navození imunologické tolerance.

IgE tvoří jen malé procento ze všech Ig. Hraje významnou roli v přecitlivělosti 1. typu a jeho zvýšené hladiny lze najít např. u alergické rýmy, astmatu či ekzému. Uplatňuje se také v obranných reakcích proti mnohobuněčným parazitům na sliznicích a je hlavní příčinou atopických reakcí.

IgG je nejhojnější třídou protilátek. U člověka se vyskytují 4 podtřídy – IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, které hrají různou roli při imunitní reakci. IgG je jednou z hlavních součástí humorální složky imunitní odpovědi. Je schopný procházet placentou a proto tvoří obranyschopnost plodu, který ještě nemá dostatečně vyvinuté vlastní obranné

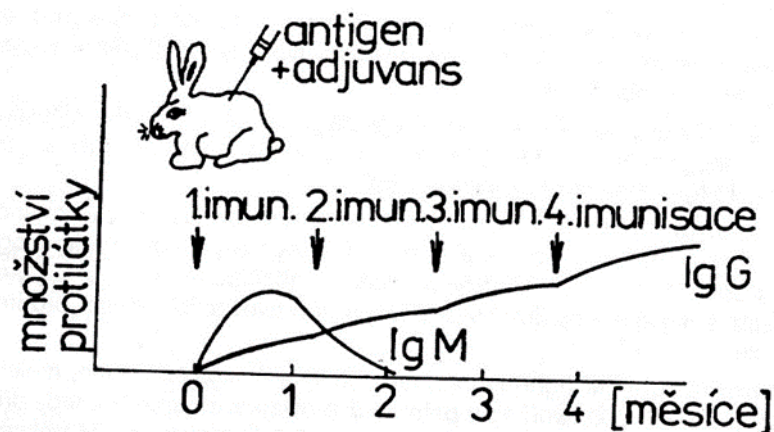
mechanismy. IgG se tvoří v pozdní fázi infekčního onemocnění a může přetrvávat dlouhodobě.

IgA tvoří asi 15% celkových Ig. Vyskytuje se ve dvou formách – slizniční a sérové. Molekuly IgA jsou sekretované na povrchu sliznic. Zde tvoří významnou součást ochrany proti mikroorganismům. Jsou známy dvě podtřídy – IgA1, který pochází se slizničních plazmocytů a IgA2, ten je produkován v kostní dřeni.

IgM tvoří asi 10% celkových Ig, je protilátkou časně imunitní odpovědi a tvoří se v plasmatických buňkách, kostní dřeni, slezině a lymfatických uzlinách. (2,4)

4.1 Polyklonální protilátky

Při přirozené odpovědi imunity na antigen vznikají protilátky. Ty jsou většinou polyklonální. Připravují se imunizací zvířat (obrázek č. 2), kterým se aplikuje antigen v emulzi s Freundovým adjuvans – zvyšuje antigenní odezvu. Doba imunizace je pro jednotlivé antigeny různá. Během této doby vzniká v séru zvířete směs různých protilátek. Ty jsou zaměřené proti různým antigenním determinantám antigenu, který byl použit k imunizaci. Pokud má antigen tři antigenní determinanty, vzniknou tři druhy protilátek v séru. (6)

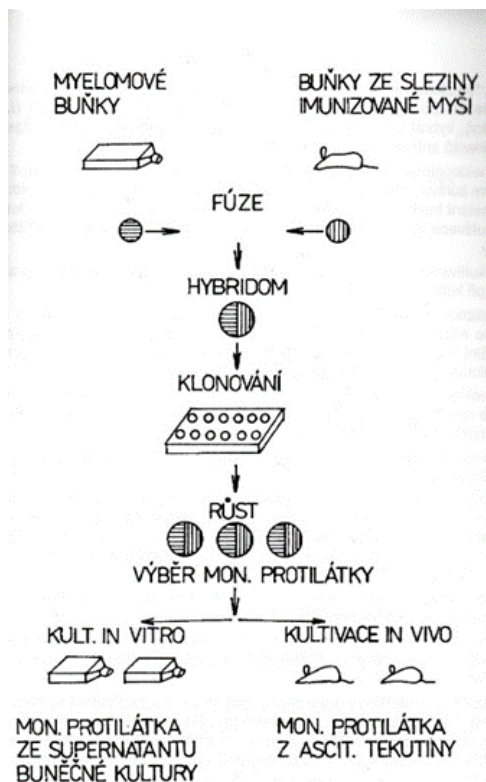


Obr. č. 2: Schéma přípravy polyklonálních protilátek (6)

4.2 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky (MP) jsou produkované pouze jedním klonem B – lymfocytů. Vykazují proto shodnou antigenní specifitu a jsou naprosto homogenní. MP si našly své místo v diagnostice a terapii zejména nádorových onemocnění, autoimunitních či zánětlivých onemocněních.

První experimentálně používané MP byly produkovány hybridomovou technologií (viz obr. 3). Jednalo se o cizorodé myší proteiny. Nejprve se provede imunizace myši příslušným antigenem. Z myší sleziny se získají lymfocyty, které produkují protilátky. Tyto lymfocyty se podrobí somatické hybridizaci s nádorovými buňkami. V prostředí polyethylenglykolu dochází ke splynutí jader nádorové buňky a myších lymfocytů a vznikne tzv. hybridom, což je klon buněk schopný produkovat monoklonální protilátky. Syntéza dále pokračuje v hybridomu. Po nádorové buňce získá hybridom „nesmrtelnost“ a může se neomezeně množit po mnoho generací. MP lze získat z hybridomů dvojím způsobem. Prvním způsobem je kultivace v příslušném kultivačním médiu *in vitro*. Zdrojem protilátky je pak medium (supernatant buněčné kultury). Druhým způsobem je kultivace *in vivo*. Hybridom se vnese do myší břišní dutiny, kde roste jako nádor a vylučuje protilátku do břišní tekutiny. (6)



Obr. 3: Schéma přípravy monoklonálních protilátek (6)

První monoklonální protilátkou, která byla zavedena do praxe, byl Muromonab, což je myší protilátka namířená proti antigenu CD3. Tato MP byla užívána pro léčbu odmítnutí transplantovaného orgánu u pacientů s transplantovanou ledvinou, srdcem nebo játry. V USA byl registrován již v roce 1986. Vykazoval však mnoho nežádoucích účinků a proto byl vytlačen protilátkami Basiliximab a Alemtuzumab. (8)

4.2.1 Mechanismus účinku monoklonálních protilátek

Terapeutická MP se skládá ze dvou stejných částí Fab, které slouží k vazbě nádorového antigenu a jednoho fragmentu Fc. Ten zprostředkovává vazbu a aktivaci buněk imunitního systému (makrofágů, NK – buněk, ...). „Vazba protilátky na příslušný nádorový antigen nasměruje pomocné buňky imunitního systému do místa nádoru, což vede k významnému nárůstu fagocytózy a/nebo k indukci apoptózy nádorových buněk cytotoxickými látkami sekretovanými z cytotoxických T – lymfocytů a NK – buněk.“ Tento účinek se označuje jako antibody – dependent cell – mediated cytotoxicity (ADCC). Monoklonální protilátka může vyvolat smrt cílových buněk i jiným mechanismem. Tím je například aktivace komplementu neboli complement dependent

cytotoxicity (CDC). Dalším způsobem je vyvolání přímého cytotoxického účinku (např. anti – EGFR Cetuximab), blokáda vazby ligandu na specifický receptor neutralizací ligandu nebo vazbou na extracelulární doménu receptoru. V těchto případech MP blokuje aktivaci signální dráhy. Proto je léčba monoklonálními protilátkami nejen biologická, ale i cílená.

Protilátky obsahující dva odlišné Fab fragmenty, které vážou dva odlišné antigeny, nazýváme protilátky bispecifické. Lze je připravit rekombinantní technologií. Protože bispecifické protilátky vážou dvěma odlišnými fragmenty dva antigeny a fragment Fc zprostředkovává vazbu efektorových buněk, mluvíme o tzv. trifunkčních MP. Jsou známy tzv. bi – specific T – cell engagers (BiTE). Jedná se o zvláštní typ bispecifické protilátky, která je tvořena dvěma fragmenty scFv (single – chain fragment variable). Jeden z těchto fragmentů váže antigen CD3 na povrchu lymfocytů a druhý váže antigen exprimovaný na nádorových buňkách. BiTE tímto způsobem přitahují T – lymfocyty do místa růstu nádoru. (11)

4.2.2 Názvosloví monoklonálních protilátek

Názvosloví je velice zajímavou kapitolou. Samotný název MP napoví, o jakou protilátku se jedná a proti čemu je namířena (viz obr. 4). První část názvu je variabilní, další část označuje cíl MP např. *-tum-* tumor, *-vir-* virový antigen, *-lim-* složka imunitního systému. Další část názvu vysvětluje původ MP. Nejčastější je *-u-* pro označení MP lidského původu, *-o-* myší původ, *-zu-* humanizované protilátky a *-xi-* jsou protilátky chimérické. Název každé MP je ukončen příponou *-mab*. (7)

Complete List of Stems for Monoclonal Antibody Nomenclature

Target substem			Target substem			
PREFIX	OLD	NEW	MEANING	OLD	NEW	MEANING
	-anibi-	-	angiogenesis (inhibitor)	-toxa-	-tox(a)-	toxin
	-ba(c)-	-b(a)-	bacterium	-co(l)-		colonic tumor
	-ci(r)-	-c(i)-	circulatory system	-go(t)-		testicular tumor
	fu(ng)-	-ff(u)-	fungus	-go(v)-		ovarian tumor
	-ki(n)-	-k(i)-	interleukin	-ma(r)-	-t(u)-	mammary tumor
	-le(s)-	-	inflammatory lesions	-me(l)-		melanoma
	-li(m)-	-l(i)-	immune system	-pr(o)-		prostate tumor
	-mu(l)-	-	musculoskeletal system	-tu(m)-		miscellaneous tumor
	-ne(u)(r)-	-n(e)-*	nervous system	-vi(r)-	-v(i)-	virus
variable	-o(s)-	-s(o)-	bone			

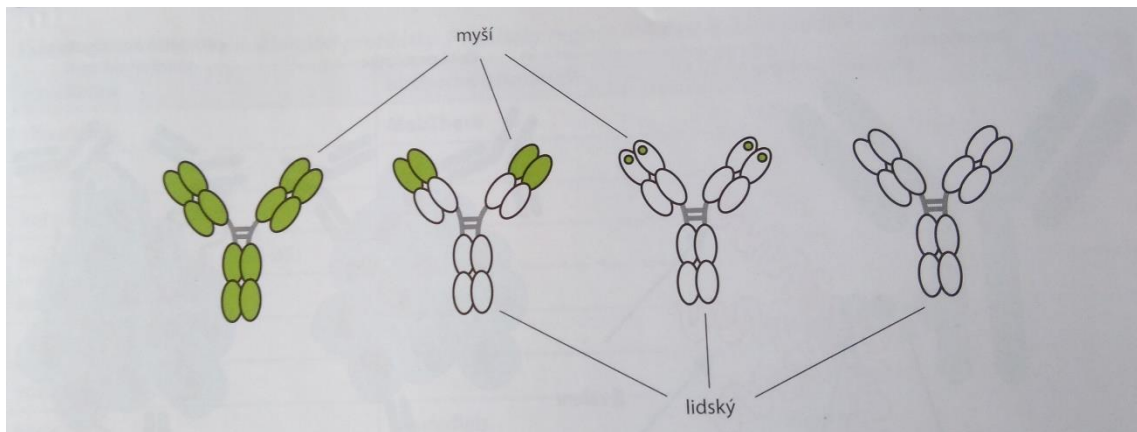
Source substem		Source substem		Suffix	
	MEANING		MEANING		
-a-	rat	-xi-	chimeric (human/foreign)		
-e-	hamster	-zu-	humanized		
-i-	primate	-xizu-*	chimeric/humanized hybrid		
-o-	mouse	-axo-	rat/mouse hybrid	-mab	
-u-	human				

*under discussion
as of February 2010

Obr. 4: Názvosloví monoklonálních protilátek (9)

4.2.3 Klasifikace monoklonálních protilátek

Podle struktury dělíme MP na myší, chimérické, humanizované a lidské (viz obr. 5). Chimérické protilátky jsou složeny z lidské a myší části – konstantní část lehkého a těžkého řetězce je lidského původu, variabilní část, která je zodpovědná za vazbu na cílovou molekulu je myšího původu. MP používané k terapii mohou indukovat tvorbu neutralizačních protilátek HAMA (human anti – mouse antibody) nebo HAHA (human anti – human antibody).



Obr. 5: Typy MP – skladba podle původu proteinu (10)

Z čistě lidských protilátek se používají v onkologické praxi protilátky proti epidermálnímu růstovému faktoru (EGFR) – Panitumumab. Tato protilátka se používá k léčbě kolorektálního karcinomu. V klinickém zkoušení je Ofatumumab anti – CD20 u non – Hodgkinova lymfomu a anti – CD4 Zanolimumab u T – buněčných lymfomů.

Čistě myší protilátky se používají v konjugaci s radionuklidem. Jedná se o anti – CD20 protilátky Ibritumomab s navázaným ytrem (^{90}Y) a Tositumomab s navázaným jodem (^{131}I). Tyto MP se používají k léčbě maligních lymfomů.

V praxi se nejčastěji používají protilátky chimérického původu. Mezi široce používané chimérické protilátky patří Rituximab, používaný k léčbě non – Hodgkinova lymfomu a Cetuximab pro léčbu kolorektálního karcinomu. Dále jsou do klinické praxe zaváděny protilátky anti – CD23 Lumiliximab či Galiximab anti – CD80.

Mezi nejčastěji používané nebo klinicky testované protilátky patří MP humizované. Jedná se o Bevacizumab či jeho fragment Ranibizumab užívaný pro nitrooční aplikaci, Trastuzumab pro léčbu karcinomu prsu nebo anti – CD52 Alemtuzumab používaný k léčbě chronické lymfocytární leukémie. Přehled používaných MP chimérických, myších, lidských a humanizovaných viz tabulka 1 – 4.

protilátka	cílová struktura
Rituximab	CD20
Galiximab	CD80
Lumiliximab	CD23
Basiliximab	CD25
Cetuximab	EGFR
Voloxicimab	A5 – β 1 integrin

Tab. č. 1: Chimérické MP. Protilátky registrované v ČR jsou zvýrazněny. (10)

protilátky	cílová struktura
Ibritumomab	CD20
Tositumomab	CD20
Bectumomab	CD22

Tab. č. 2: Myší MP. Protilátky registrované v ČR jsou zvýrazněny. (10)

protilátky	cílová struktura
Panitumumab	EGFR
Zanolimuab	CD4
Iratumumab	CD30
Ofatumumab	CD20

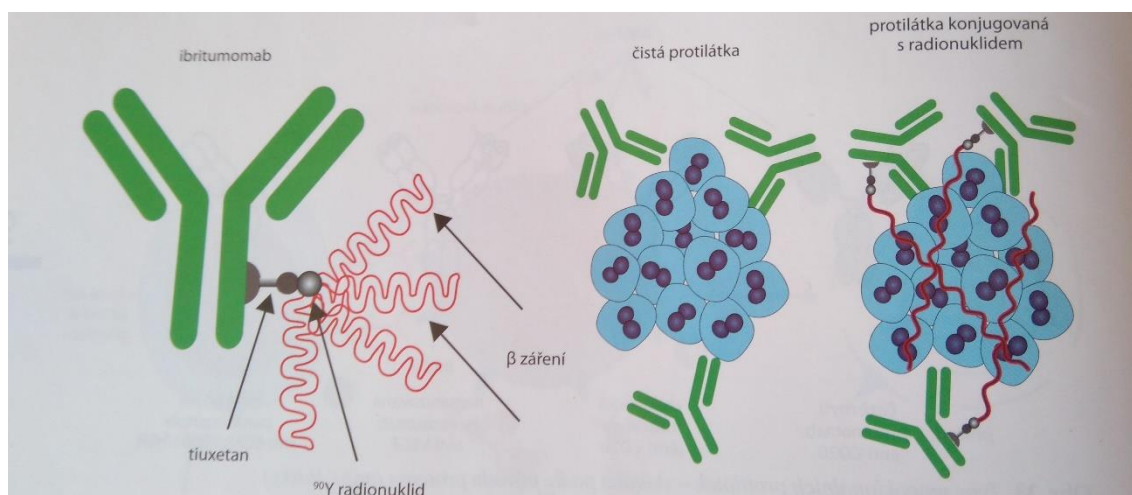
Tab. č. 3: Čistě lidské MP. Protilátky registrované v ČR jsou zvýrazněny. (10)

protilátka	cílová struktura
Bevacizumab	VEGF
Ranibizumab	VEGF
Trastuzumab	ERBB2
Pertuzumab	ERBB2
Nimotuzumab	EGFR
Alemtuzumab	CD52
Epratuzumab	CD22
Veltuzumab	CD20
Apolizumab	HLA – DR
Milatuzumab	CD74
Daclizumab	IL2
Mepolizumab	IL5
Gemtuzumab ozogamicin *)	CD33

Tab. č. 4: Humanizované MP. Protilátky registrované v ČR jsou zvýrazněny. (10)

*) protilátka konjugovaná s kalicheamycinem

Konjugované protilátky byly vyvinuty k posílení účinnosti MP. Jedná se o protilátky, u kterých je na vlastní protilátku navázán radionuklid, cytostatikum, toxin nebo enzym. V praxi se nejvíce osvědčily MP s navázaným radionuklidem. Pro značení se nejčastěji používá yttrium (^{90}Y) nebo jod (^{131}I). Radionuklid je protilátkou dopraven do nádorové tkáně, a podle povahy záření vykazuje různě intenzivní cytotoxický účinek na elementy uvnitř nádoru (viz obr. 6). (10)

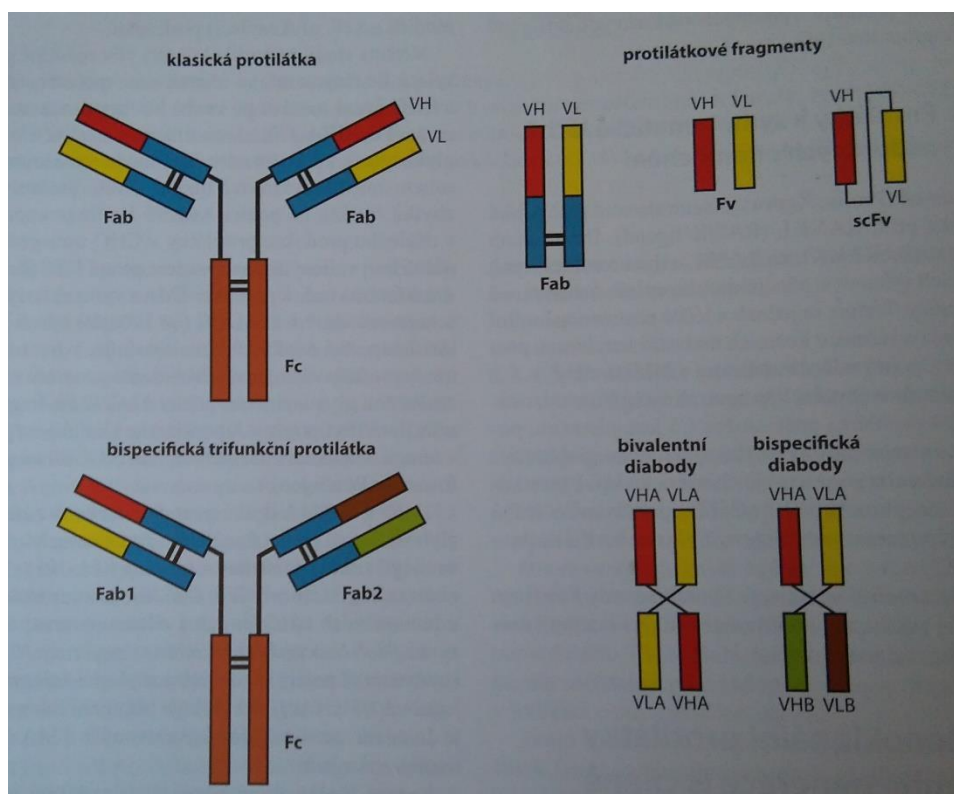


Obr. 6: Účinek MP konjugované s radionuklidem. (10)

4.3 Protilátkové fragmenty

Kromě nezkrácených protilátek můžeme rekombinantně připravit i spoustu protilátkových fragmentů. Lze připravit Fab nebo scFv fragmenty. Kombinací dvou scFv fragmentů vzniká tzv. diabody (Dd). Mohou být bivalentní monospecifické (homodimer dvou scFv fragmentů se stejnou antigenní specifitou, fragment Fv je částí Fab fragmentu) nebo bivalentní bispecifické (heterodimer dvou scFv fragmentů s odlišnou antigenní specifitou). Pokud dva fragmenty scFv vytvářejí jeden polypeptidový řetězec, vzniká single – chain diabody (scDb), ten má malou molekulární hmotnost, což je oproti klasické protilátce velká výhoda. Mají ale i nevýhodu – chybí zde fragment Fc.

Rekombinantní metodou lze spojit i více fragmentů. Pak vznikají multivalentní či multispecifické protilátky tzv. triabodies, tetrabodies. Jsou známy tzv. intrabodies což jsou neutralizační intracelulární protilátky odrážející nové možnosti genové terapie. Vnesení genu pro monoklonální protilátku do nádorových buněk s jejich následnou expresí uvnitř buňky rozšiřuje zásadním způsobem operační pole MP. Vhodnými intrabodies jsou především scDb pro svou malou velikost. Na obrázku č. 7 je znázorněno porovnání klasických (bivalentních monospecifických) protilátek, bispecifických/trifunkčních protilátek a diabodies. (11)



Obr. č. 7: Porovnání klasických protilátek, bispecifických/trifunkčních protilátek a diabodies (11)

4.4 Fc – fúzní proteiny a imunocytkiny

Fc – fúzní proteiny neboli peptibodies jsou rekombinantně připravené makromolekuly. U těchto molekul je cílový protein nebo peptid navázán na Fc část MP. Tato vazba významně prodlouží biologický poločas fúzovaného proteinu či peptidu. Fc – fúzní proteiny mohou aktivovat buňky imunitního systému a tím napodobovat funkci ADCC. Většina v dnešní době používaných Fc – proteinů existuje ve formě homodimerů. Ty mohou být modifikovány do hexamerů a tím narůstá valence a avidita takového komplexu.

V současné době se většina registrovaných Fc – fúzních proteinů používá k léčbě neonkologických chorob, jako jsou choroby pojiva. Pro terapii revmatoidní artritidy se používá *etanercept*. Jedná se o Fc – fúzní protein spojující velkou extracelulární doménu receptoru pro TNF (tkáňový nekrotizující faktor) s Fc – fragmentem IgG. Fc – fúzní proteiny se využívají také jako nádorové vakcíny.

Mluvíme – li o imunocytokinech, popisujeme alternativu spojení dvou molekul s odlišnými funkcemi do jedné. Jde o fúzní proteiny vzniklé spojením cytokinů a monoklonálních protilátek, u kterých se předpokládá kombinace terapeutického účinku protilátky s imunostimulací v místě nádoru. Zkouší se Tucotuzumab – celmoleukin pro léčbu karcinomu ovarií, prostaty a kolorektálního karcinomu. (11)

5. Přehled používaných monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky se staly významným léčebným prostředkem nejen v oblasti onkologie, ale i pro léčbu hematologických malignit a solidních nádorů. V přehledu jsou uvedeny monoklonální protilátky, které jsou registrované k dispozici v ČR, které se staly součástí léčby nebo jsou ve fázi klinického zkoušení.

5.1 Protilátky proti membránovým antigenům leukocytů

Tyto protilátky byly nejdříve používané v klinické praxi. Slouží k léčbě hematologických malignit – nehodgkinských lymfomů, chronické lymfatické leukémie, akutních leukémií nebo mnohočetného myelomu. (11)

5.1.1 Rituximab

Jedná se o chimérickou myší – lidskou monoklonální protilátku proti antigenu CD20. Rituximab byl první MP schválenou k použití v klinické praxi. Byl schválen k terapii maligních onemocnění nehodgkinských lymfomů (NHL). CD20 je exprimován na více než 90% buněk NHL. Mechanismus účinku je komplexní. Účinek této MP je ovlivněn densitou CD20 antigenu na povrchu buněk a také výrazně posiluje chemoterapii. Na obrázku 8 je znázorněna krystalická struktura Fab fragmentu Rituximabu v komplexu s epitopem peptidu.



Obr. 8: Struktura Fab fragmentu Rituximabu (12)

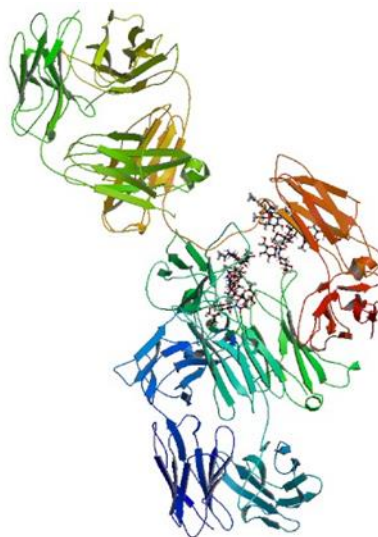
Indikace: Rituximab se používá pro léčbu NHL buď samostatně, nebo v kombinaci s chemoterapií. Dále je indikován k terapii difúzního velkobuněčného B – lymfocytárního lymfomu. Mimo to se používá v rámci klinického zkoušení. V roce 2009 bylo registrováno Národním institutem zdraví (NIH) přes 801 studií. Při těchto studiích byl testován účinek Rituximabu u dalších hematologických malignit jako jsou lymfomy z plášťové zóny, primární lymfomy centrálního nervového systému, Hodgkinovy lymfomy, mnohočetné myelomy a další. Testuje se i účinek této MP k terapii autoimunitních onemocnění (idiopatická trombocytopenická purpura, autoimunní hemolytická anemie). Prověřuje se také účinek v kombinaci s jinými MP (Galiximab), různými cytostatiky (purinová analoga) a mnoha jinými látkami. Podává se intravenózně.

Jako u jiných léčebných prostředků, jsou i u monoklonálních protilátek pozorovány nežádoucí účinky. U protilátky Rituximab jsou poměrně časté, byly zjištěny u více než 80% nemocných. Nežádoucím účinkům lze předcházet popř. je úspěšně léčit. Mezi nejčastější, avšak méně závažné nežádoucí účinky patří horečka a třes, které přicházejí po první aplikaci léku již během 30 minut. Mezi závažné komplikace patří riziko reaktivace chronické hepatitidy B, proto se před aplikací Rituximabu provádí serologické

vyšetření na hepatitidu B. Po aplikaci této MP může dojít k alergické reakci a srdeční zástavě. Tyto nežádoucí účinky však patří mezi velice vzácné. (11)

5.1.2 Alemtuzumab

Alemtuzumab je humanizovaná IgG1 – κ monoklonální protilátka (struktura na obrázku č. 9). Je namířena proti povrchovému glykoproteinu CD52. Tento glykoprotein je exprimován na povrchu T – a B- lymfocytů normálních i maligních buněk, na povrchu monocytů/makrofágů a thymocytů. Protilátka účinkuje především na cirkulující lymfocyty. Po jeho podání klesají buňky CD4+ a CD8+, což má za následek poruchu buněčné imunity. Je zde tedy zvýšené riziko infekce. Alemtuzumab nepoškozuje hematopoetické a progenitorové buňky. Při léčbě touto protilátkou dochází ke vzniku oportunních infekcí. Je zde i riziko reaktivace cytomegalovirové infekce. Alemtuzumab se podává intravenózně či subkutánně.



Obr. č. 9: Struktura alemtuzumabu (13)

Indikace: Nejčastěji se používá k terapii chronické lymfocytární leukémie (CLL), u níž není vhodné použít chemoterapii. Jedná se o jedinou známou účinnou látku pro toto onemocnění. Alemtuzumab lze indikovat i při nejhorší prognóze CLL.

Léčba touto monoklonální protilátkou má také své nežádoucí účinky. Patří mezi ně pancytopenie, autoimunitní trombocytopenie, hemolytická anemie, třesavka, hypotenze, dušnost, bronchospasmus, hyperpyrexie. K profylaxi těchto nežádoucích účinků je potřebná premedikace kortikoidy a antihistaminiky. Je doporučena také profylaxe proti *Pneumocystis jiroveci*, kterým může být pacient infikován v důsledku léčby. (11)

5.1.3 Epratuzumab

Jedná se o humanizovanou monoklonální IgG1 protilátku proti antigenu CD22, který je exprimován na povrchu vyzrálých B – lymfocytů. Není imunogenní, což znamená, že neindukuje tvorbu autoprotilátek HAHA. Mechanismus účinku je zejména ADCC. Epratuzumab působí fosforylaci a agregaci CD22 antigenů. To vyvolává antiproliferační a imunomodulační účinky. Je známa také konjugovaná protilátka s radioizotopem yttria ^{90}Y .

Indikace: Epratuzumab se standardně nepoužívá. Je pouze testován v rámci klinických studií. Zkouší se k terapii NHL, které nereagují na rituximab. Probíhá testování také pro léčbu akutní lymfoblastické leukémie a autoimunitních onemocnění (např. Sjögnerův syndrom.).

Nežádoucí účinky jsou v porovnání s ostatními MP celkem mírné. Patří sem únava a anorexie. (11)

5.1.4 Zanolimumab

Jedná se o lidskou MP IgG1 proti receptoru CD4. Ty jsou exprimovány na T – lymfocytech. Účinkuje indukci ADCC – inhibuje aktivaci T – lymfocytů. Zanolimumab není schválen k léčbě. Prozatím se pouze testuje jeho účinnost u mycosis

fungoides, což je epidermoidní kožní T – lymfom, nebo u Sézaryho syndromu (leukemická forma mycosis fungoides). Mezi nežádoucí účinky patří hypotenze, hypertermie, alergie, neutropenie a trombocytopenie. (11)

5.2 Konjugované protilátky

V klinické praxi se nejčastěji používá konjugace s radionuklidy.

5.2.1 Ibritumomab tiuxetan

Tato IgG1 monoklonální protilátka anti – CD20 je myšičího původu. Je konjugovaná s radionuklidem Ytria ^{90}Y . Ytrium je β zářič, záření proniká 11,9 mm a působí lýzu okolních buněk i v omezeně vaskularizovaném tumoru. Váže se na povrch normálních i patologických B – lymfocytů. Tiuxetan je chelatační látka, která je kovalentně navázána na protilátku a umožňuje tak její konjugaci s radionuklidem.

Indikace: Ibritumomab tiuxetan je indikován k léčbě CD20+ folikulárního lymfomu v relapsu po terapii rituximabem.

Mezi nežádoucí účinky při léčbě touto protilátkou patří hlavně různý stupeň hematologické toxicity, kterému lze částečně zamezit aplikací hematopoetických růstových faktorů. Mezi další, ne tak závažné nežádoucí účinky patří únava, nevolnost, horečka, třesavka – ty však vznikají při kombinaci s Rituximabem. (11)

5.2.2 Tositumomab

Tato myšičí protilátka IgG2 – λ proti antigenu CD20 je konjugovaná s radionuklidem jodu 131 (^{131}I). Protože radionuklid vyzařuje γ záření, je nutné dodržovat přísná pravidla radiační ochrany při manipulaci s ním. Proto se dává ve speciálních stříkačkách s ochranným obalem. Indikuje se k terapii NHL. „V EU má od roku 2003 statut *orphan drug* k léčbě folikulárního lymfomu“. (11) *Orphan drug* jsou farmaceutické přípravky, které se používají k léčbě vzácných onemocnění.

Byly zjištěny závažné nežádoucí účinky jako je těžká cytopenie (snížený počet všech typů krevních buněk), zejména trombocytopenie, hypersenzitivní reakce na myší bílkovinu, hypotyreóza, sekundární myelodysplastický syndrom. Při aplikaci se může objevit, horečka, třesavka, dušnost a bronchospasmus.

5.2.3 Gemtuzumab ozogamicin

Gemtuzumab ozogamicin je humanizovaná protilátka konjugovaná s kalicheamycinem. Jedná se o protinádorové antibiotikum izolované z bakterie *Microsporium calichensis*. Patří mezi protilátky proti antigenu anti – CD33.

V USA je indikován k léčbě akutní myeloidní leukémie, v EU byl však v roce 2007 zamítnut. (11)

5.2.4 Inotuzumab ozogamicin

Tato protilátka je také konjugovaná s kalicheamycinem. Jedná se o rekombinantní humanizovanou protilátku anti – CD22. Kalicheamycin působí na dvojité zlomy DNA a zánik buněk apoptózou. Není však schválen ke klinickému použití. (11)

5.3 Protilátky proti receptorům rodiny EGFR/ERBB/HER

Monoklonální protilátky proti těmto receptorům se uplatňují hlavně při léčbě solidních nádorů – kolorektální karcinom a karcinom prsu.

5.3.1 Cetuximab

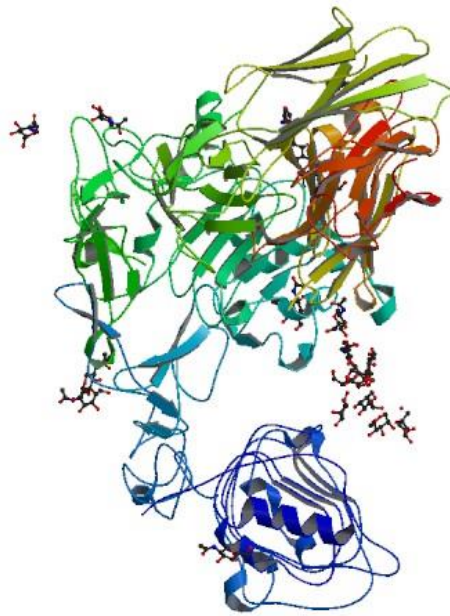
Jedná se o chimérickou IgG1 MP proti extracelulární doméně receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR/ERBB/HER1) (obr. 10). Tím, že se Cetuximab naváže na receptor, dojde k blokadě aktivace signálního přenosu kaskády MAPK (mitogen – activated protein kinases). Dále také zvyšuje expresi inhibitoru cyklin dependentních kináz. Dojde tak k omezení buněčné proliferace. Důsledkem zvýšení aktivity kaspáz dochází k indukci apoptózy a snížení exprese adhezivních molekul. To

pak vede k omezení invazivity a metastazování. Antiangiogenní (angiogeneze – tvorba krevního zásobení kolem nádoru) a antiproliferační účinky má blokáda exprese VEGF (vascular endothelial growth factor) a FGF (fibroblast growth factor). Cetuximab se podává v infuzích.

Indikace: Cetuximab se používá k léčbě kolorektálního karcinomu a jeho metastáz, které exprimují EGFR/ERBB/HER1. Podává se pacientům, u kterých selhala předchozí léčba oxaliplatinou a irinotekanem. Užívá se v monoterapii nebo v kombinaci s chemoterapií. Dále je tato monoklonální protilátka indukována k léčbě lokálně pokročilých forem spinocelulárního karcinomu v ORL oblasti buď k monoterapii nebo v kombinaci s deriváty platiny u metastatických forem.

I užívání Cetuximabu má nežádoucí účinky. Patří mezi ně nejčastěji kožní příznaky, zejména vyrážky, poruchy nehtů a poškození bazálních keratinocytů, které vyvolá tzv. rash (vyrážka, která ovlivňuje barvu, vzhled a texturu kůže). Mezi další příznaky patří celková slabost, bolest břicha, nevolnost a zvracení. Může se objevit i hypomagnezemie.

(11)



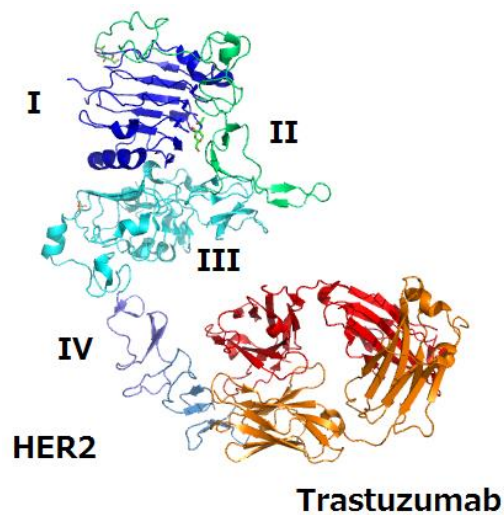
Obr. č. 10: Struktura extracelulární domény EGFR v komplexu s Fab fragmentem Cetuximabu (14)

5.3.2 Trastuzumab

Jedná se o rekombinantní humanizovanou IgG1 – κ MP proti receptoru ERBB2/HER2/NEU (obr. č. 11). Zvýšená exprese tohoto receptoru se nachází u pacientek s karcinomem prsu, ale i u karcinomu ovarií, prostaty a endometria. K aktivaci receptoru dochází tvorbou heterodimerů s dalšími receptory receptorové rodiny EGFR/ERBB/HER. Dochází k blokadě signalizačních kaskád MAPK, které stimuluje proliferaci nádorových buněk, jejich invazivitu a inhibici apoptózy. Trastuzumab vykazuje také imunomodulační účinky a potlačuje produkci angiogenních faktorů. U karcinomu prsu se zvýšená exprese receptoru považuje za nepříznivý faktor. Jejím důsledkem dochází ke kratšímu přežívání, snížené citlivosti k chemoterapii a k hormonální léčbě. Tato MP neproniká hematoencefalickou bariérou. I při úspěšné léčbě primárního nádoru může tedy dojít k metastazování do CNS.

Indikace: Je indikován u pacientek s karcinomem prsu. Ve většině případů se používá pouze v kombinaci s jinými léčivy. Samostatně lze použít pouze při selhání předchozí hormonální léčby.

Nejzávažnějším nežádoucím účinkem indikace Trastuzumabu je jeho kardiotoxicita. Díky vysoké kardiotoxicitě dochází k poruše systoly. Je proto velice důležité monitorovat kardiální funkce pomocí echokardiografu. Mezi další nežádoucí účinky patří dušnost nebo pleurální výpotek v důsledku pneumotoxicity Trastuzumabu. (11)



Obr. č. 11: Trastuzumab v komplexu s HER2 (15)

5.3.3 Panitumumab

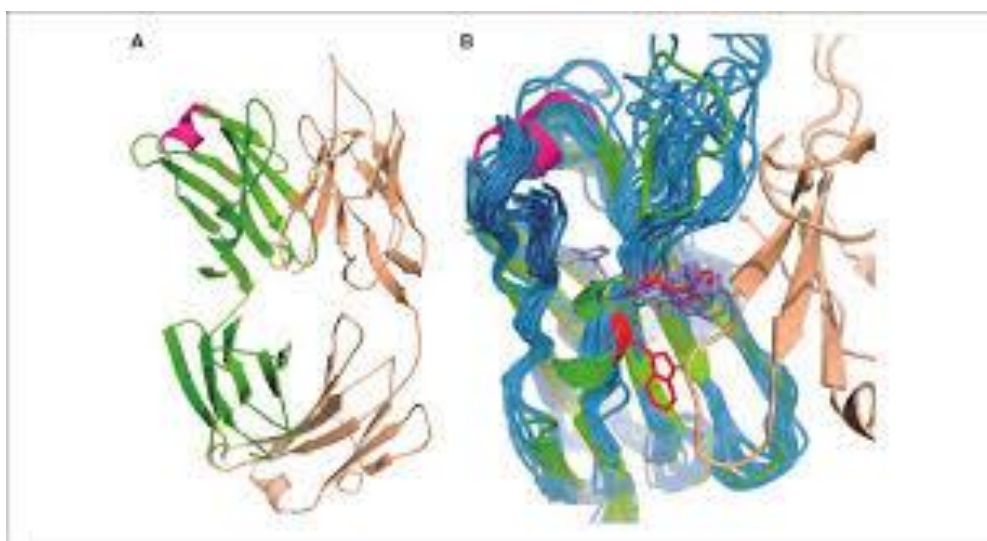
Tato lidská monoklonální IgG2 protilátka vykazuje vysokou afinitu k receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR/ERBB/HER1). Váže se na extracelulární doménu a inhibuje příslušnou transdukční kaskádu, což vede k omezené proliferaci a indukci apoptózy, ke snížení produkce IL8 a VEGF.

Indikace: Hlavní indikací Panitumumabu je monoterapie pacientů s kolorektálním karcinomem a jeho metastáz. Testuje se i u nemalobuněčného karcinomu plic v kombinaci s jinými léčivy. Podává se v infuzích.

Tato MP je velmi dermatologicky toxická. Z toho vyplývají i její nežádoucí účinky, mezi které se řadí hlavně akneiformní dermatitida, pruritus (svědění), exfoliace (odlupování kůže) nebo tvorba abscesů. Byla popsána též plicní fibróza, zvracení, nevolnost, ale také hypomagnesemie (snížená hladina hořčíku), hypokalcemie (snížená hladina vápníku) a konjunktivitida. (11)

5.3.4 Nimotuzumab

Nimotuzumab je fragment humanizované terapeutické monoklonální protilátky proti receptoru EGFR o Mh 250 000 h. j. Po celém světě se provádějí klinické studie s cílem vyhodnotit účinnost Nimotuzumabu v různých indikacích. Nimotuzumab je v řadě zemí schválen k léčbě spinocelulárního (dlaždicobuněčného) karcinomu hlavy a krku, gliomu a nasofaryngeálního karcinomu. Celkově můžeme říci, že terapeutický potenciál nimotuzumabu pro léčbu nádorových onemocnění epitelového původu je skutečně velký (obrázek jeho struktury obr. č. 12.). Nimotuzumab je ve srovnání s dalšími již používanými monoklonálními protilátkami, jako je cetuximab a panitumumab velice bezpečný.



Obr. č.:12 Krystalická struktura Fab fragmentu Nimotuzumabu (16)

Nimotuzumab byl získán transplantací oblastí určující komplementaritu z myších monoklonálních protilátek IgG2a ior egf/r3 do lidské struktury za použití počítačového modelování. Rodičovské myši monoklonální protilátky ior egf/r3 byly generovány spojením nádorových (myelomových) buněk se splenocyty pocházejícími z myši, které byly imunizované purifikovanou lidskou placentární frakcí obohacenou EGFR.

Studie prokázaly, že Nimotuzumab inhibuje proliferaci, přežití a angiogenezi a vykazuje tedy protinádorové účinky. Protinádorová aktivita Nimotuzumabu byla testována *in vitro* ve dvoudimenzionálních (2D) a třídimeznionálních (3D) buněčných kulturách odvozených od spinocelulárního karcinomu. Míra inhibice vaskulárního endotelového růstového faktoru byla v jednovrstevných buněčných kulturách závislá na dávce. V rámci studií prováděných na modelech s podkožními xenoimplantáty nádorové linie byly analýzou „Northern Blot“ potvrzeny u nádorů inhibiční účinky Nimotuzumabu na VEGF (vaskulární endotelový růstový faktor). U nádorů léčených Nimotuzumabem bylo také metodou značení volných konců TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) zjištěno pětinasobné zvýšení indexu apoptózy. Nimotuzumab může vzhledem k buněčné cytotoxicitě závislé na protilátkách a závislé na komplementu také vyvolat cytolýzu cílových nádorových buněk. Nimotuzumab má jedinečný klinický profil. Při hodnocení protinádorových účinků nebyly pozorovány závažné toxické reakce na kůži, v ledvinách ani na gastrointestinální sliznici, které jsou běžně spojené s léčbou protilátkami proti EGFR, jako je Cetuximab a Panitumumab.

Nedávná experimentální pozorování ukazují, že na rozdíl od jiných protilátek proti EGFR, Nimotuzumab přirozeně vyžaduje pro vytvoření stabilní vazby k buněčnému povrchu bivalentní vazbu (tj. současnou vazbu obou ramen protilátky ke dvěma cílovým antigenům). Díky tomu se Nimotuzumab selektivně váže k buňkám exprimujícím středně vysoké množství EGFR. Vzhledem k vyšším disociačním konstantám vykazují

Cetuximab i Panitumumab vysokou vazebnou afinitu i při nízké expresi EGFR, která je charakteristická pro zdravou tkáň. Nimotuzumab má oproti tomu nižší vazebnou afinitu, a tudíž se váže s nižší aviditou a interakce s vazebným cílem je přechodná. Díky tomu nepůsobí na zdravou tkáň a nemá závažné toxické účinky, které by omezovaly velikost použité dávky. Při střední až vysoké expresi EGFR se mohou všechny protilátky vázat s vyšší aviditou. Studie hodnotící léčbu Panitumumabem a Cetuximabem nepodaly žádné klinické důkazy, které by ukazovaly na to, že by vyšší vazebná afinita u těchto protilátek vedla k jejich vyšší účinnosti, nicméně jasně ukazují, že silnější vazba vede k vyšší toxicitě léčby. Vazebné vlastnosti Nimotuzumabu mohou *in vivo* zlepšovat cílení na nádory exprimující EGFR v nadměrném množství ve srovnání s jinými protilátkami proti EGFR. (17)

5.3.5 Pertuzumab

Humanizovaná MP, vázající se na extracelulární doménu receptoru ERBB2/HER2/NEU. Vazba této MP na receptor ERBB2/HER2/NEU zabraňuje tvorbu dimerů s ostatními receptory této rodiny a tím dochází k blokáde proliferace nádorových buněk, které jsou závislé na ligandu.

Indikace: na rozdíl od předešlých MP proti receptorům EGFR/ERBB/HER není Pertuzumab schválen ke standardnímu klinickému použití. V rámci studií se testuje jeho použití při léčbě metastatického karcinomu prsu, ovarií, nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu prostaty a tlustého střeva. Ve většině případů se testuje použití jeho použití v kombinaci s jinými léčivy. Dávkuje se nitrožilně.

5.4 Protilátky s antiangiogením účinkem

5.4.1 Bevacizumab

Jedná se o neutralizační humanizovanou protilátku proti ligandu VEGF (Vascular endothelial growth factor). VEGF se váže na VEGFR 3, což komplexně blokuje novotvorbu cév v nádoru.

Indikace: Bevacizumab se používá hlavně léčbě metastatického karcinomu tlustého střeva. V kombinaci s deriváty platiny se používá k léčbě neresektabilního, pokročilého nebo metastazujícího nemalobuněčného karcinomu plic. Nejčastěji se používá k terapii v kombinaci s jinými léčivy, např. s cytostatiky nebo jinými MP. Podává se ve formě infuzí.

Léčba touto MP se dobře toleruje. I přesto byly popsány nežádoucí účinky, mezi které patří nejčastěji hypertenze, proteinurie, slizniční krvácení a epistaxe (přechodné krvácení z porušených cév v oblasti nosní sliznice). Nejobávanější komplikací je perforace střeva.

5.5 Bispecifické/trifunkční protilátky

5.5.1 Ertumaxomab

Tato trifunkční myší protilátka je namířena proti antigenu T – lymfocytů a proti receptoru ERBB2/HER2/NEU. „Afinita vůči CD3 působí atrakci cytotoxických T – lymfocytů do nádorové masy a spolu s aktivací ADCC přes Fc fragment protilátky dochází k posílení přirozených mechanismů buněčné protinádorové imunity“. Ertumaxomab je účinný při rezistenci na Trastuzumab. Je prozatím ve fázi klinických studií u metastatického karcinomu prsu při rezistenci na Trastuzumab. Mezi nežádoucí účinky užívání patří pyretické reakce, bolesti hlavy, nevolnost, zvracení a lymfocytopenie.

5.5.2 Catumaxomab

Patří mezi bispecifické trifunkční hybridní myší monoklonální protilátky. V rámci klinického zkoušení se testuje k léčbě nemocných s karcinomem ovarií a maligní ascites.

5.6 Další perspektivní protilátky

5.6.1 Denosumab

Je neutralizační, plně lidská protilátka proti RANK ligandu (Receptor Activator of Nuclear Factor). Probíhá testování k léčbě kostních metastáz u karcinomu prsu nebo prostaty, u revmatoidní artritidy a osteoporózy. Často se používá v kombinaci s bisfosfáty.

5.6.2 Pentumomab

Pentumomab je myší monoklonální protilátka IgG1 proti abnormální formě mucinu, který je produkován při karcinomu ovarií, žaludku a kolorekta, ale i plic, prsu a prostaty. Mezi nežádoucí účinky patří muskuloskeletární potíže a flu – like syndrom (chřipce podobné příznaky).

5.6.3 Basiliximab

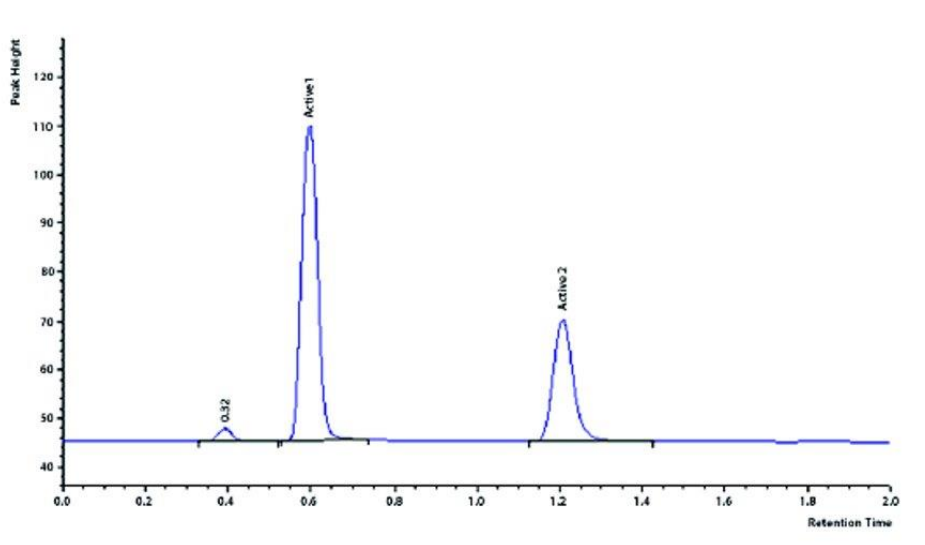
Jedná se o chimérickou myší/lidskou protilátku proti CD/25IL2R α (α podjednotka receptoru pro IL2). Basiliximab má vysokou afinitu k antigenu CD25 u aktivovaných T – lymfocytů a brání vazbě IL2 na receptor. MP je určena k profylaxi akutní rejekce orgánu u alogeních transplantací ledvin. Většinou se užívá v kombinaci s imunosupresivy. Jediným potvrzeným nežádoucím účinkem je hypersenzitivní reakce.

6. Metody stanovení monoklonálních protilátek

6.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC – high performance liquid chromatography) patří mezi separační metody. Je založena na postupném rozdělení látky

mezi dvě fáze – mobilní (pohyblivou) a stacionární (zakotvená). Dělené látky se nazývají soluty. Výsledkem dělení je takzvaný chromatogram (viz obrázek č. 13). Jedná se o závislost koncentrace solutů na množství proteklé mobilní fáze nebo na čase.



Obr. č. 13: Ukázka chromatogramu. (18)

Rozlišujeme separace v plošném nebo kolonovém uspořádání. HPLC se provádí v kolonách. Zde je stacionární fáze umístěna v koloně (trubici), kterou protéká mobilní fáze samovolně vlivem gravitace, nebo je poháněna přetlakem či čerpadlem.

Mobilní fáze se významně podílí na separaci. Je vždy jednoduché změnit polární fázi, než stacionární. Mobilní fáze je charakterizovaná polaritou a selektivitou. Proto se jako mobilní fáze používají polární kapaliny, které jsou seřazeny dle polarit v tzv. eluotopní řadě.

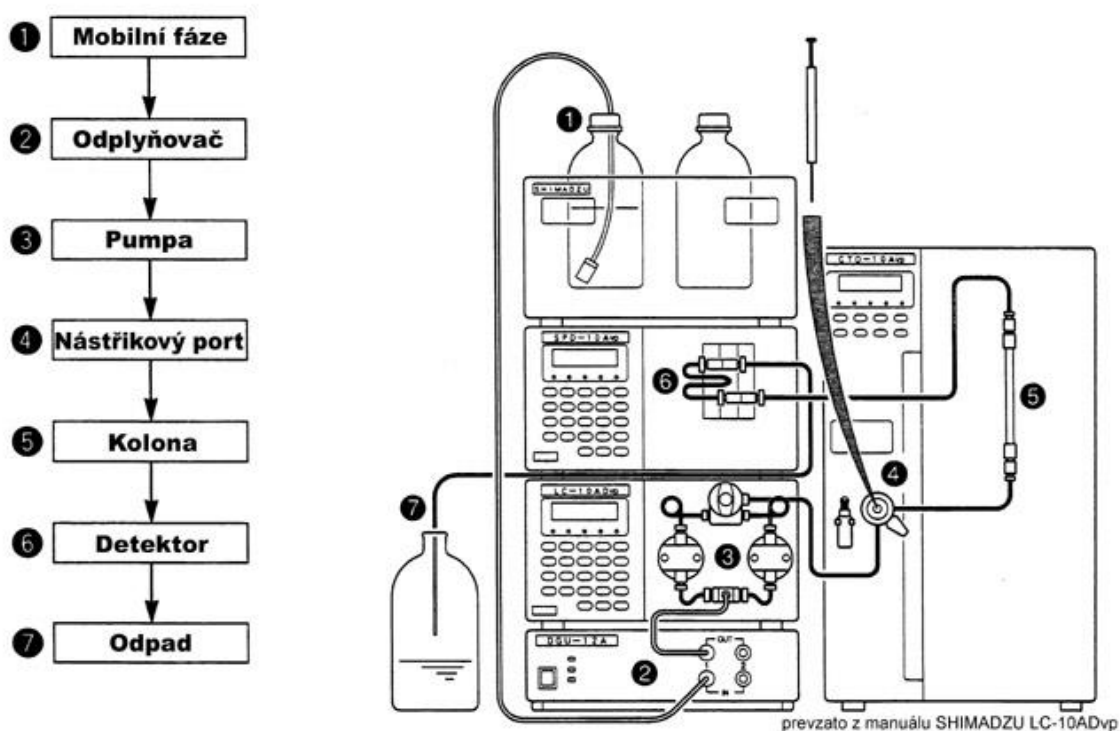
Kolony, které se používají v HPLC musí odolat vysokému tlaku a teplotě. Jsou většinou z ocelové nebo tlustostěnné skleněné trubice o vnitřním průměru 2 – 5 mm a délce 30 – 300 mm. Kolony jsou naplněny právě stacionární fází.

Mezi detektory používané v HPLC patří nejčastěji fotometrický detektor popř. fotometrický detektor pracující v UV oblasti. Dále se používá fluorimetrický detektor, detektory elektrochemické (coulometrické, amperometrické, ...). Pro radioaktivně

značené protilátky se používají různé typy průtokových detektorů radioaktivity. Mezi moderní, drahé a mechanicky náročné detektory patří hmotnostně spektrofotometrický detektor.

HPLC se vyvinula z plynové chromatografie na počátku 70. let. Velkou výhodou je široká oblast použitelnosti a proto velice často doplňuje plynovou chromatografii. Lze ovlivňovat složení mobilní fáze, která se významně podílí na separaci. V porovnání s plynovou chromatografií vyžaduje HPLC složitější a dražší přístrojové vybavení a náročnější mechanismus separace. (19,20)

Blokové schéma HPLC



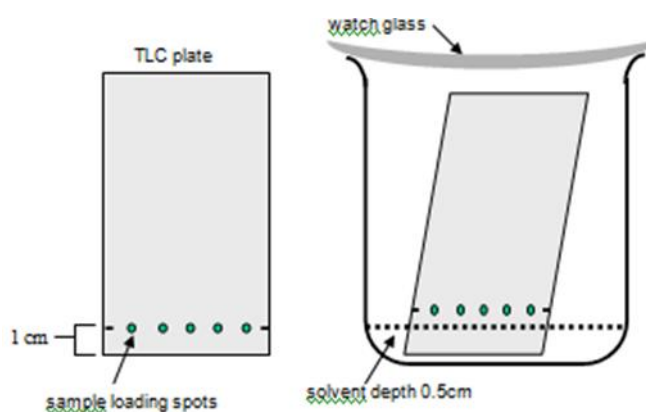
Obr. č. 14: Blokové schéma kapalinového chromatografu. (21)

6.2 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC – Thin Layer Chromatography) se řadí mezi separační metody s plošným uspořádáním. Jedná se o velice jednoduchou, finančně

nenáročnou a často používanou laboratorní metodu. Používá se pro separaci nebo pro semikvantitativní vizuální analýzu. Pro stanovení MP se používá zředka.

Principem TLC je dělení látek mezi mobilní a stacionární fázi. Stacionární fáze je plošně uspořádána, na rozdíl od kolonové chromatografie. Vzorek se nanáší na okraj tenké vrstvy ve formě skvrny. Pak se tenká vrstva ponoří do mobilní fáze, kterou tvoří směs rozpouštědel a nechá se vzlínat. Tenká vrstva je umístěna v komoře nasycené parami mobilní fáze (obrázek 15).

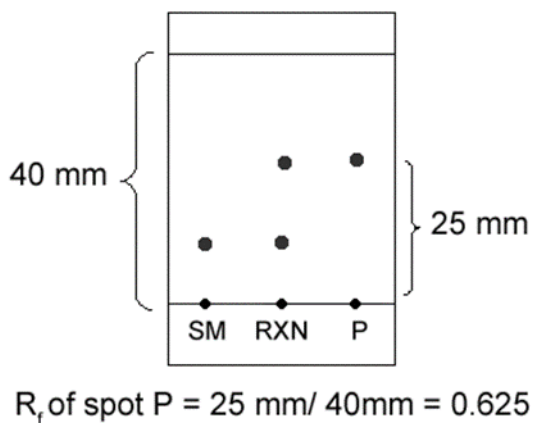


Obr. č. 15: Komora nasycená parami s tenkou vrstvou. (22)

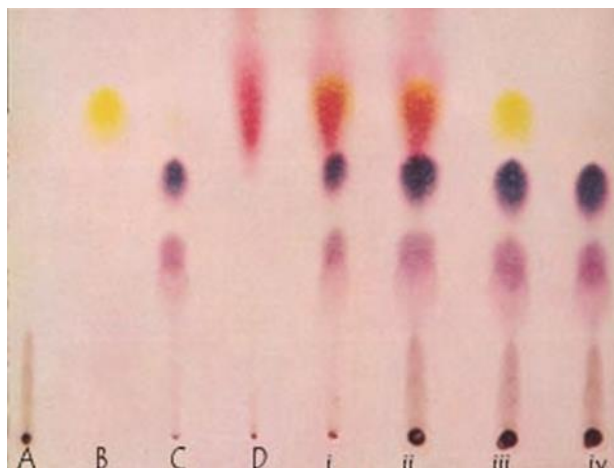
Mobilní fáze pak unáší analyty, které jsou zadržovány různě stacionární fází. Asi 1 cm před koncem TLC desky označíme tzv. čelo. Zde se ukončí analýza. Deska se vyjme z komory, vysuší se, označí se polohy skvrn a čelo. K detekci skvrn se používá reakce s vhodným činidlem, která je zviditelní, popř. UV záření. Některé látky jsou po dělení zbarvené přirozeně.

V TLC se dělí látka mezi stacionární a mobilní fází, jako u všech ostatních typů chromatografií. Zde se ale nachází ještě třetí fáze a tou jsou páry mobilní fáze. Poloha separovaných zón je popsána tzv. retenčním faktorem R_F . Je definován jako poměr vzdáleností, které urazili složku vzorku d_i a čelo mobilní fáze d_m . ($R_F = d_i/d_m$). Hodnota retenčního faktoru se pohybuje od 0 do 1. Pokud je hodnota 0 látka nemigruje, naopak

při hodnotě 1 látka putuje s čelem rozpouštědla. (obrázek č. 16, 17– ukázky chromatogramů) (19)



Obr. č. 16: Chromatogram se znázorněním výpočtu R_f . (23)



Obr. č. 17: Ukázka chromatogramu. (24)

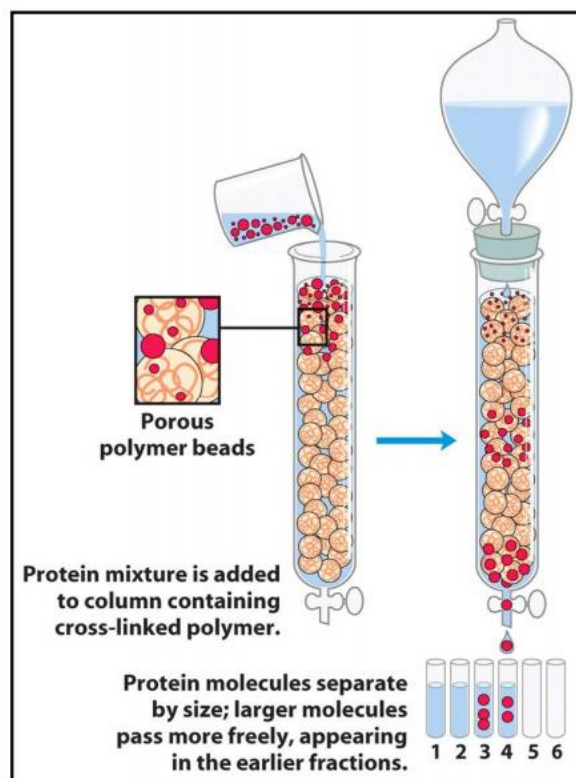
6.3 Gelová permeační chromatografie (GPC)

Gelová chromatografie patří mezi chromatografie kapalinové. Dochází tedy k rozdělení rozpuštěné látky mezi mobilní fázi, a rozpouštědlo uzavřené v pórech gelu, které představuje fázi stacionární. K separaci látek pak dochází na základě nesterjné velikých dělených molekul (schéma obr. 16).

Gely a porézní částice jsou buď hydrofobní, nebo hydrofilní povahy. Na hydrofilních gelech dochází k dělení hydrofobních makromolekul elucí vodnými roztoky. Hydrofobní molekuly se pak frakcionují na hydrofobních gelech elucí organickým rozpouštědlem.

Jako hydrofilní gely se používají polymery na bázi dextranu nebo akrylamidu. Nejvíce se používají tzv. Sephadexy. Jedná se o příčně zesítené dextransy. Velikost pórů je dána stupněm zesítení při polymeraci dextranu epichlorhydrinem. Na tom závisí i velikost molekul, které je možné dělit.

Sephadexy bobtnají ve vodě a vodných roztocích. Kolony, které se jimi plní, nesnáší velký tlak. To omezuje použitelnost kolon i větší průtokovou rychlost. Jako mobilní fáze se při dělení na Sephadexu používají vodné roztoky elektrolytů určité iontové síly. Mezi nejčastěji dělené látky pomocí GPC patří peptidy, proteiny a jiné látky používané zejména v biochemii. Tyto látky lze analyzovat, nebo určit jejich molekulovou hmotnost. Jako detektor se v GPC používá nejčastěji diferenciální refraktometr. (25)



Obr. č. 18: Schéma GPC. (26)

7. Závěr

V mojí bakalářské práci jsem studovala mechanismus účinku monoklonálních protilátek, jejich použití k terapii maligních i benigních onemocnění i jejich následné nežádoucí účinky. Vytvořila jsem stručný přehled a rozdělení do skupin podle místa účinku popř. struktury.

Monoklonální protilátky mají dle mého názoru velký potenciál pro léčbu jinak neléčitelných onemocnění. Většinou jsou již schválené a některé jsou stále ve fázi klinického testování. Mají ovšem i mnoho nežádoucích účinků, některé mohou být i smrtelné. Je proto třeba pečlivě zvážit jejich použití pro individuální léčbu pacienta, popřípadě monitorovat rizika vzniku nežádoucích účinků a pokusit se jim předejít.

8. Seznam zkratek

NK – natural killers (přirození zabíječi)

Ig – imunoglobulin

Fab – antigen binding fragment

Fc – fragment crystallizable region

CD – cluster of differentiation

ADCC – antibody – dependent cell – mediated cytotoxicity

CDC – complement dependent cytotoxicity

BiTE – bi – specific T – cell engagers

ScFv – single – chain fragment variable

HAMA – human anti – mouse antibody

HAHA – human anti – human antibody

EGFR – epidermal growth factor receptor

VEGF – vascular endothelial growth factor

FGF – Fibroblast growth factors

HLA – DR – Human Leukocyte Antigen - antigen D Related

IL – interleukin

DNA – deoxyribonucleic acid

ORL – otorhinolaryngologie

NHL – nehodgkinský lymfom

Db – diabody

scDb – single – chain diabody

TNF – tumor necrosis factor

CLL – chronická lymfocytární leukémie

NIH – National Institutes of Health

RANK – Receptor Activator of Nuclear Factor

TUNEL – Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling

MAPK – Mitogen – activated protein kinase

HPLC – high – performance liquid chromatography

UV – ultrafialová oblast světla

GPC – gel permeation chromatography

9. Seznam použité literatury

- (1) <http://www.remedia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Monoklonalni-protilatky-a-dalsi-biologicka-leciva-uzivana-v-imunosupresivni-lecbe/6-F-iQ.magarticle.aspx> čerpáno 9. 11. 2015
- (2) HOŘEJŠÍ, V.; BARTŮŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. Praha: Triton, 2009. s. 23 – 25, 67 – 68
- (3) ALBERTS, B. et al. *Základy buněčné biologie*. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998. s. 158
- (4) KOPECKÝ, O.; ANDRÝS, C.; BUDAYOVÁ, E.; DRAHOŠOVÁ, M.; HAVLASOVÁ, J.; KREJSEK, J.; LUKEŠOVÁ, Š.; VOKURKOVÁ, D. *Laboratorní vyšetření v klinické imunologii a alergologii*. Hradec Králové: Garamon s.r.o, 2004. s. 63 – 65
- (5) <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/antibody-structure-classes.html> staženo 24. 3. 2016
- (6) ZICHOVÁ, M.; HUŠÁK, V.; ŠAFARČÍK, K. *Vyšetřovací metody in vitro v nukleární medicíně*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1993, s. 36 – 38
- (7) <http://www.remedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2008/5-2008/Monoklonalni-protilatky-a-dalsi-biologicka-leciva-uzivana-v-imunosupresivni-lecbe/e-9q-a5-iQ.magarticle.aspx> čerpáno 27.12.2015
- (8) http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_06_464-470.pdf staženo 9. 11. 2015
- (9) <http://bioatla.com/educational-appendix/antibody-nomenclature/> staženo 24. 3. 2016
- (10) KLENER, P.; KLENER, P. jr. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha: Grada Publishing a.s., 2010, s. 78 – 82, 157 – 167
- (11) KLENER, P.; KLENER, P. jr. *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha: Grada Publishing a.s., 2013, s. 87 – 95
- (12) <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2OSL> staženo 22. 4. 2016
- (13) <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00087> staženo 22. 4. 2016
- (14) <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1yy9> staženo 24. 4. 2016
- (15) https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trastuzumab-HER2_complex_1N8Z.png staženo 24. 4. 2016
- (16) TALAVERA, A.; FRIEMANN, R.; GÓMEZ – PUERTA, S.; Nimotuzumab, an Antitumor Antibody that Targets the Epidermal Growth Factor Receptor, Blocks Ligand Binding while Permitting the Active Receptor Conformation. *Canc. Res.*, 2009, s. 5853
- (17) RAMAKRISHNAN, S. M.; ESWARAIAN, a.; et al. Nimotuzumab, a promising therapeutic monoclonal for treatment of tumors of epithelial origin
- (18) <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/38386-Generic-Automated-Sample-Preparation-Including-Online-HPLC-Analysis-for-Application-within-the-Pharmaceutical-Industry/> staženo 25. 4. 2016
- (19) ŠTULÍK, K. A KOLEKTIV.; *Analytické separační metody*. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Krolinum, Praha 2004. s. 24 – 27, 78 – 87, 136 – 137
- (20) OPEKAR, F.; JELÍNEK, I.; RYCHLOVSKÝ, P.; PLZÁK, Z.; *Základní analytická chemie*. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha 2010. s. 164 – 167
- (21) http://old.lf3.cuni.cz/chemie/english/practical_trainings/task_B2.htm staženo 25. 4. 2016

- (22) <http://www.expertsmind.com/questions/thin-layer-chromatography-tlc-30144992.aspx>
staženo 25. 4. 2015
- (23) http://www.mendelset.com/articles/683/thin_layer_chromatography_tlc staženo 26. 4.
2016
- (24) [http://faculty.ksu.edu.sa/18856/Chromatographic/Thin%20layer%20chromatography.jp
g](http://faculty.ksu.edu.sa/18856/Chromatographic/Thin%20layer%20chromatography.jpg) staženo 26. 4. 2016
- (25) ZÝKA, J.; A KOL. Analytická příručka. Nakladatelství technické literatury. Praha
1988. s. 184 – 187
- (26) http://biomikro.vscht.cz/vyuka/ib/4_prednaska2012.pdf staženo 25. 4. 2016

