B lymfocyty v roztroušené skleróze mozkomíšní a postavení biologika cílícího na B lymfocyty v její léčbě

prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.

Ústav klinické imunologie a alergologie, LF UK a FN Hradec Králové

V současnosti je prokázáno, že úloha B lymfocytů v obranném i poškozujícím zánětu je daleko komplexnější než tvorba protilátek po antigenní stimulaci. B lymfocyty jsou významným zdrojem regulačních i efektorových cytokinů. Kromě schopnosti rozpoznat antigeny prostřednictvím BcR jsou schopny rozpoznávat signály nebezpečí a poškození, které následně zpracují a prezentují T lymfocytům v podobě antigenních peptidů navázaných na molekuly HLA. Bylo překvapením, že biologická terapie monoklonální protilátkou antiCD20 (ocrelizumab) prokázala v klinických studiích vysokou účinnost v léčbě roztroušené sklerózy. Různá biologika antiCD20 rozpoznávají stejnou molekulu B lymfocytů. Liší se však zásadně ve struktuře a posttranslačních modifikacích. Tyto vlastnosti významně ovlivňují bezprostřední i dlouhodobé nežádoucí účinky terapie antiCD20 v léčbě roztroušené sklerózy.

Klíčová slova: roztroušená skleróza, B lymfocyty, molekula CD20, biologická terapie, ocrelizumab.

B lymphocytes in cerebrospinal multiple sclerosis and the role of a B lymphocyte-targeting biologic agent in its therapy

The role of B cells in the inflammatory response is much wider as previously thought. B cells are not only antibodies producing cells but are the rich source of various proinflammatory cytokines and chemokines. B cells can identify various signals of danger or damage. These danger molecules are processed and presented in the form of antigenic peptides in the context of HLA molecules to T cells. Surprisingly, biological therapy with ocrelizumab targeting CD20 molecule expressed on B cells was evidenced as highly effective therapy of multiple sclerosis in large clinical trials. There are the substantial differences in the structure and posttranslational modification comparing different antiCD20 monoclonal antibodies. These differences are responsible for both immediate and longterm adverse effects of this type of biological therapy in the treatment of multiple sclerosis.

Key words: multiple sclerosis, B cells, molecule CD20, biological therapy, ocrelizumab.

Úvod

Roztroušená skleróza mozkomíšní (RS) je závažné imunopatologické a neurodegenerativní onemocnění centrální nervové soustavy. Naše populace patří mezi nejpostiženější. Patogeneze RS je popsána pouze z části, přestože toto onemocnění je studováno na nejvyšší úrovni již několik desítek roků. K dispozici máme i zvířecí model experimentální autoimunitní encefalitidy (EAE). Jedná se jednoznačně o multifaktoriální onemocnění s určitou genetickou predispozicí,

kteří není příliš výrazná. Z neznámých příčin, pravděpodobně pod vlivem faktorů vnějšího světa, mezi které patří zřejmě některé virové infekce, dochází k prolomení homeostatických regulací imunitní soustavy. Výsledkem je poškozující zánět, jehož cílem jsou především obalové struktury nervových vláken. Jsou definovány hlavní terče této autoreaktivity, kterým je např. myelinový bazický protein (MBP). Na základě rozsáhlých experimentálních i klinických výzkumů je v současné době obecně přijímáno, že ústřed-

ní úlohu v poškozujícím zánětu u nemocných s RS sehrávají abnormálně funkčně polarizované subsety T lymfocytů Th1 a Th17, které podle stávajícího konceptu považujeme za klíčovou součást poškozujícího zánětu. Ztráta homeostatických regulací je charakterizována nižší aktivitou subsetu Treg T lymfocytů. Tento koncept je nepochybně alespoň z části pravdivý. Důkazem jsou účinné léčebné zásahy, používané již řadu roků k léčbě některých forem roztroušené sklerózy, které jsou založeny především na modulaci

KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA: prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc., jan.krejsek@fnhk.cz
Ústav klinické imunologie a alergologie, LF UK a FN Hradec Králové
Sokolská tř. 581, 500 05 Hradec Králové

Cit. zkr: Neurol. praxi 2018; 19(3): 218–223
Článek přijat redakcí: 15. 4. 2018
Článek přijat k publikaci: 15. 5. 2018

Obr. 1. B lymfocyty jsou integrální součástí poškození zánětu u nemocných s RS

T lymfocytární imunity. Bylo překvapením, když před několika lety klinické experimenty prokázaly výbornou účinnost léčebných zásahů zprostředkovaných biologickou terapií cílící na B lymfocyty. Konkrétně se jedná o použití monoklonálních protilátek reagujících s molekulou CD20 B lymfocytů. Tyto nové poznatky přinesly zcela nový vhled na imunopatogenetické mechanismy podílející se na vzniku a rozvoji RS. Přinesly však také řadu otázek, z nichž mnohé mají i velmi praktické dopady. Jednou z nich je například skutečnost, které z dostupných monoklonálních protilátek reagujících s CD20, které byly schváleny pro léčbu jiných onemocnění, budou pro imunomodulační zásahy u nemocných s RS nejvýhodnější. Tento přehledový článek by v tomto směru měl přinést alespoň rámcově odpovědi.

B lymfocyty jako integrální součást poškození zánětu u nemocných s RS

Již desítky roků je známo, že v likvoru nemocných s RS je možné detekovat tzv. oligoklonální proužky imunoglobulinů. Průkaz těchto oligoklonálních imunoglobulinů v likvoru je považován za dobrý pomocný diagnostický marker u nemocných s RS. Jejich přítomnost v likvoru a další nálezy, např. transkriptomu B lymfocytů, jasně ukazují na intratekální syntézu těchto protilátek. Přes dlouholeté úsilí nebyly nalezeny interpretačně významné terče těchto oligoklonálních protilátek. Většina z nich reaguje s různými strukturami CNS. To je interpretováno, buď jako epifenomen, který ukazuje na imunitní odpověď na poškozené struktury mozku, nebo je přítomnost

těchto protilátek vykládána jako jeden z mechanismů, jakými se imunitní systém podílí na „úklidu“ v kompartmentu CNS. Nyní by bylo chybné tvrdit, že protilátková aktivita v CNS u nemocných s RS je pouhý epifenomen. Jsou jasné důkazy, že autoprotilátky se váží na strukturní elementy v mozku, např. myelinové pochvy, oligodendrocyty, astrocyty. Byla prokázána kolokalizace protilátek a aktivovaných složek komplementového systému a také cytotoxických buněk. Oba tyto mechanismy jsou prokazatelně zapojeny do efektorových fází poškození zánětu u nemocných s RS. Je pravděpodobnější, že aktivní zapojení B lymfocytů do poškození zánětu u nemocných s RS je komplexnější a B lymfocyty se nepochybně podílejí i na iniciačních fázích poškození zánětu. B lymfocyty totiž prokazatelně slouží jako mimořádně efektivní buňky, které jsou schopny identifikovat vzory DAMP/ PAMP (Damage Associated Molecular Patterns/ Pathogen Associated Molecular Patterns), internalizovat je a nitrobuněčně zpracovat. Vzniklé antigenní peptidy prezentují v kontextu molekul HLA T lymfocytárnímu systému. Mohou se tedy jednoznačně podílet na aktivaci, klonální expanzi a funkční polarizaci autoreaktivních T lymfocytů ve strukturách CNS. B lymfocyty jsou vydatným vzorem prozánětlivých cytokinů a chemokinů. Jejich prostřednictvím jsou zapojeny do samotné buněčné organizace poškození zánětu u nemocných s RS. Poskytují také růstové faktory a antiapoptotické podněty nutné pro přežívání imunitních buněk, které jsou součástí poškození zánětu u nemocných s RS.

U nejzávažnějších forem RS, např. primárně progresivní formy, byly post mortem prokázány

zorganizované tzv. terciární lymfatické struktury na meningách těchto pacientů. Terciární lymfatické struktury jsou typicky přítomné u všech zkoumaných imunopatologických onemocnění, např. revmatoidní artritidy, aterosklerózy, různých vaskulitid, máme-li jmenovat pouze některé z nich. Přesto v případě RS, považované za T lymfocytární imunopatologii s klíčovým podílem subsetů Th1 a Th17, byl nález těchto struktur překvapením. Je otázkou, zda terciární lymfatické struktury nejsou přítomny rovněž v CNS nemocných s remitující relabující formou RS. Důkazy je však pro tuto formu obtížné přinést. Terciární lymfatické struktury jsou místem lokální odpovědi B lymfocytů na antigenní podněty. V těchto strukturách jsou přítomny folikulární dendritické buňky a také folikulární T lymfocyty Tfh, poskytující nejučinnější regulační podporu B lymfocytům stimulovaným antigenem. B lymfocyty v nich po antigenní stimulaci klonálně expandují a terminálně diferencují do buněk, které tvoří imunoglobuliny. Absolutní důkazy o zapojení B lymfocytů do patogeneze RS získáváme z klinicky prokázaného pozitivního efektu biologické terapie cílící specificky na B lymfocyty reprezentovaného zejména protilátkami zaměřenými na molekulu CD20, ale také z použití alemtuzumabu (antiCD52). Molekula CD52 je vyjádřena na řadě buněčných elementů imunitní soustavy, včetně B lymfocytů. Aplikace antiCD52 velmi výrazně ovlivňuje právě B lymfocytární systém (Gelfand et al., 2017) (obrázek 1).

Diferenciace B lymfocytů

B lymfocyty patří k nejlépe prozkoumaným elementům imunitní soustavy. Množství poznatků, které o nich byly z různých ohledů získány, je ohromné. Studium B lymfocytů má celou řadu praktických výstupů směrem do klinické medicíny, diagnostické praxe a ovlivňuje zdraví lidí obecně. Zde se zaměříme pouze na stručné ozřejmení diferenciace B lymfocytů. B lymfocyty se vyvíjejí v primárních orgánech krvetvorby, kterým po narození zůstává kostní dřeň. Jejich vývoj probíhá z kmenové buňky krvetvorby. Pro sledování diferenciálních procesů je velmi výhodné a vysoce specifické stanovovat membránové nebo nitrobuněčné molekuly pomocí monoklonálních protilátek s vyhodnocením průtokovou cytometrií. Pro tyto účely byla vytvořena závazná nomenklatura leukocytárních znaků, kterou označujeme jako CD klasifikace.

Obr. 2. Diferenciace B lymfocytů nezávislá na přítomnosti antigenu a stimulovaná antigenním podnětem

Obr. 3. Mechanismus účinku biologik reagujících s molekulou CD20 B lymfocytů

Každé molekule v ní přísluší určité pořadové číslo. Přiřazení znaku CD značí, že o této molekule víme prakticky vše. Kmenová buňka krvetvorby exprimuje znak CD34. Z ní se na základě aktuálních potřeb člověka vyvíjejí všechny větve krvetvorby. Na nejnižší diferenciální úrovni se od sebe odděluje lymfoidní a myeloidní vývojová větev. V rámci lymfoidní vývojové větve potom probíhá vývoj v oddělených větvích, které dávají vznik T lymfocytům a B lymfocytům. Zatímco vývoj T lymfocytů probíhá v thymu, vývoj B lymfocytů se celý uskutečňuje v kostní dřeni. Velmi brzy v průběhu diferenciace exprimují prekursor B lymfocytů membránový znak CD19, který je specifický pro B lymfocytární větev. V postupných dalších krocích, které probíhají bez přítomnosti antigenu, dochází ke komplexním změnám vyhrávajícího B lymfocytu. To se odráží na jeho imunobiologických vlastnostech. Postupně ztrácí znaky nezralosti a získává další B lymfocytární znaky, které si podrží až do stádia zralého B lymfocytu. Z těchto

znaků můžeme zdůraznit především molekulu CD20, která bude předmětem bližší informace dále. Připomínáme však, že zralé B lymfocyty nesou řadu dalších specifických znaků pro B lymfocyty, jakými je např. CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40 a další. Podstatné pro vývoj B lymfocytů je uskutečnění tzv. přeskupení genových segmentů, které kódují receptory pro antigen na B lymfocytech. Úspěšné přeskupení genových segmentů vede k vyjádření receptoru pro antigen BcR na B lymfocytu na povrchu buňky. Přítomnost receptorů BcR definuje zralý B lymfocyt. Na této úrovni končí na antigenu nezávislý vývoj B lymfocytů, který vede k vytvoření ohromného repertoáru různých B lymfocytů s různými specifitami receptorů BcR, kterými budou rozpoznávat antigenní podněty. Všechny zralé B lymfocyty nesou panB lymfocytární znaky, mezi nimi také molekulu CD20. Další vývoj probíhá pouze u těch B lymfocytů, které rozpoznaly antigen, obdržely všechny další nutné podněty od kooperujících buněk, především

od T lymfocytu subsetů Tfh a Th2. Výsledkem je klonální expanze antigenem stimulovaných B lymfocytů, jejich další diferenciace, somatická mutace a izotopové přepnutí, na jejichž konci je vznik plazmatických buněk. K těmto procesům stimulovaným antigenem dochází v sekundárních lymfatických orgánech, především lymfatických uzlinách, slezině a jistě také v lymfoidní tkáni spojené se sliznicemi. V průběhu této terminální diferenciace dochází k rozsáhlým změnám imunobiologických vlastností B lymfocytů, které můžeme sledovat např. změnou membránových molekul. Velmi zjednodušeně lze konstatovat, že pan B lymfocytární znaky vyjádřené na zralých B lymfocytech, včetně CD20, jsou postupně ztráceny a na plně diferencovaných plazmatických buňkách se již tyto membránové struktury nevyskytují. Naopak, plazmatické buňky získávají jinou membránovou výbavu, která je pro ně typická. K primární protilátkové odpovědi dochází i v terciárních lymfatických strukturách imunitní soustavy lokalizovaných u nemocných s RS na meningách (Krejsek et al., 2016) (obrázek 2).

Hybridom, monoklonální protilátky

Metodický vývoj v biomedicíně můžeme s plným oprávněním rozdělit na období před konstrukcí hybridomu a po úspěšném zkonstruování hybridomu. K této technologické revoluci došlo v polovině sedmdesátých let 20. století. Je spjata se jmény César Milstein a Georges Köhler, kteří za objev hybridomu byli po zásluze odměněni Nobelovou cenou za fyziologii a lékařství. Hybridom byl původně konstruován jako in vitro fúze diferencovaného B lymfocytu, tedy buňky s potenciálem tvořit protilátky a nádorově změněné plazmatické, myelomové, buňky. Vzniklé umělé syncytium, hybridom, v sobě spojuje vlastnosti obou těchto buněčných elementů. Nelze totiž in vitro vytvořit podmínky, které by vedly po antigenní stimulaci k dlouhodobé proliferaci a přežívání B lymfocytů a jejich terminální diferenciaci. B lymfocyty za podmínek in vitro přecházejí do apoptózy. Nekonečný proliferativní potenciál jim předá právě nádorově změněná myelomová buňka. Hybridomová technologie se ukázala jako mimořádně perspektivní, protože jednotlivé hybridomy dávají vznik tzv. monoklonálním protilátkám. Monoklonální protilátky jsou vlastně solubilní receptory BcR B lymfocy-

tu, který byl fúzován s myelomovou buňkou. Jsou svou molekulární podstatou zcela totožné. Jsou totožné i co do antigenní struktury, kterou rozpoznávají. Monoklonální protilátky se staly nenahraditelným nástrojem ve výzkumu, diagnostice a nakonec i v léčbě různých nemocí.

Konstrukce hybridomů a produkce monoklonálních protilátek se ukázala být také mimořádně komerčně úspěšným projektem. Obrazně i doslova lze říci, že nejsou vyráběny dražší látky na světě. I tyto aspekty podnítily rozvoj hybridomové technologie, ke kterému dochází od osmdesátých let minulého století. Vedlo to k tomu, že jednotlivé hybridomy bylo zapotřebí utřídit stran specifity jimi tvořených protilátek. K tomu slouží celosvětové úsilí vybraných laboratoří, výsledkem jejichž práce je již zmíněná CD klasifikace. Počet plně definovaných CD znaků postupně roste. V současné době dosahuje již téměř 400. Původní technologie používané ke konstrukci hybridomů vycházely z myších buněk. To nebylo na závadu, dokud byly monoklonální protilátky využívány pouze pro *in vitro* výzkumné účely nebo pro *in vitro* diagnostiku. Brzy však byl doceněn potenciál monoklonálních protilátek, především jejich specifita, pro využití v klinické praxi. Již několik desetiletí budované klinické zkušenosti jasně definují nezastupitelné postavení monoklonálních protilátek v léčbě imunopatologických onemocnění, transplantační imunologie, onkologii, především hematologii a z části také v infekčním lékařství. Výčet všech chorobných stavů, pro které byly monoklonální protilátky již schváleny zdravotnickými autoritami pro léčebné účely, by byl dlouhý (Du et al., 2017).

Klinické aplikace monoklonálních protilátek záhy ukázaly, že monoklonální protilátky původně konstruované myšími hybridomy lze použít pouze jednorázově. Tyto protilátky se totiž chovají jako xenologní proteiny a vyvolávají v léčené osobě rychlou indukci xenoreaktivity, nejsnáze detekovatelnou jako přítomnost protilátek. Opakované aplikace myších monoklonálních protilátek jsou spojeny s výraznými riziky závažných nežádoucích účinků této léčby. Vytrácí se také efektivita této terapie, protože vznikající protilátky neutralizují účinek biologik. Proto byly postupně konstruovány nové typy hybridomů, které problémy s xenoreaktivitou řešily. Odpovídajícím způsobem byla také vytvořena závazná nomenklatura, která popisuje původ

monoklonálních protilátek použitých k léčbě. Provedeme pouze velmi rámcový přehled těchto biotechnologických modifikací hybridomové technologie. Pro označení odlišně konstruovaných hybridomů se používá přípona pro danou protilátku. Ta je v případě myšího hybridomu –mab (muromab, antiCD3). Xenoreaktivita myších protilátek je soustředěna do Fc části molekuly imunoglobulinů. Xenoreaktivitu se zásadně podařilo snížit konstrukcí hybridomů, které produkují tzv. chimérické monoklonální protilátky. V nich je Fc část molekuly myší monoklonální protilátky nahrazena lidským proteinem. Tyto tzv. chimérické protilátky nesou příponu –ximab (rituximab, antiCD20). Chimérické monoklonální protilátky lze opakovaně aplikovat bez význačnějších rizik velkých nežádoucích vedlejších účinků. Snaha o konstrukci ještě bezpečnějších monoklonálních protilátek pro léčebné účely úspěšně pokračovala. Následně byly konstruovány hybridomy, které vytváří tzv. humanizované monoklonální protilátky. V nich je již prakticky celá molekula imunoglobulinů lidského původu. Myšího původu zůstávají klíčové epitopy protilátky odpovědné za vazbu na antigenní determinanty terčových molekul. Jedná se o tzv. CDR oblasti (Complementarity Determining Regions). Tyto humanizované protilátky nesou příponu –zumab (ocrelizumab, antiCD20). Vrcholem hybridomové technologie jsou plně humánní hybridomy, které produkují monoklonální protilátky svou strukturou zcela totožné s běžnými lidskými protilátkami. Tyto tzv. lidské hybridomy, tvoří humánní monoklonální protilátky, které jsou označeny –umab (ofatumumab, antiCD20). Možností, jak měnit strukturu monoklonálních protilátek pro klinické použití, je však více. Většina těchto modifikací se soustředí na Fc fragment imunoglobulinů, kam přináší různé chemické modifikace s cílem zlepšit snášenlivost takto manipulovatelných protilátek. Podrobnější informace jsou dostupné v literatuře (Krejsek et al., 2016).

Molekula CD20, ideální terč biologické terapie cílí na B lymfocyty

Molekula CD20 je vyjádřena v průběhu diferenciaci B lymfocytů již na nezralých stádiích. Expres molekuly CD20 se v průběhu zrání zvyšuje a dosahuje nejvyšší denzity na úrovni zralého plně imunokompetentního B lymfocy-

tu. Nevyskytuje se ani na kmenových buňkách krvetvorby, ani na plazmatických buňkách. Molekula CD20 je membránový fosfoprotein, který čtyřikrát prochází cytoplazmatickou membránou B lymfocytu. Patří strukturně mezi tzv. tetraspanové molekuly. Její přesná fyziologická úloha není známa. Nejsou známy ani ligandy této molekuly. Předpokládá se účast CD20 v aktivaci B lymfocytů, pravděpodobně v souvislosti s hospodařením s vápníkem. Membránová exprese molekuly CD20 je stabilní. Nedochází k jejímu uvolňování do tělních tekutin v podobě solubilních forem, tak jak tomu je velmi běžné u jiných membránových molekul leukocytů. Vyskytuje se rovněž na nádorově změněných buňkách B lymfocytárního původu, tj. buněčných elementech B lymfoproliferativního onemocnění charakteru B-NHL nebo CLL. Právě B lymfocytární lymfoproliferativní onemocnění bylo již před 20 lety první klinickou indikací pro využití terapie antiCD20. S touto formou terapie hematologických onemocnění byla získána obrovská klinická zkušenost (Salles et al, 2017). Indikační šíře biologické terapie antiCD20 byla postupně rozšiřována do léčby imunopatologických stavů. Jmenovat můžeme imunopatologie s převažující autoprotilátkovou aktivitou, jakými jsou revmatoidní artritida, systémový lupus a některé typy vaskulitid. V neurologické indikaci je to např. myasthenia gravis. Ve všech těchto indikacích je používána chimérická monoklonální protilátka antiCD20 označovaná jako rituximab. Jejich aplikace vede v léčeném člověku k tvorbě xenoreaktivity charakterizované především tvorbou antichimérických protilátek (HACA – Human AntiChimeric Antibodies), jejichž přítomnost může být příčinou závažnějších nežádoucích účinků terapie a může být také důvodem pro snížení účinnosti léčby (Du et al., 2017).

Proto byly postupně vyvíjeny humanizované protilátky antiCD20, např. ocrelizumab, obinutuzumab a další, či humánní protilátky antiCD20, např. ofatumumab. Změn v konstrukci monoklonálních protilátek, které jsou žádoucí s ohledem na klinické aplikace, není dosahováno pouze výše uvedeným procesem, na jehož vrcholu je teoreticky plně humánní protilátka. Bylo prokázáno v *in vitro* experimentech i v klinických studiích, že srovnatelné a možná i výhodnější vlastnosti získávají monoklonální protilátky na základě manipulace se složením aminokyselin v tzv. pantové oblasti a manipulací s glykosylací v Fc části molekuly. Glykosylace je proces, kdy

je protein záměrně upravován vazbou cukerných struktur (tzv. „zbytků“), které mohou významným způsobem ovlivňovat jeho vlastnosti. Pantová oblast je část těžkého řetězce imunoglobulinů, kde se rozvírá k Fab části a je klíčová pro stérické (prostorové) uspořádání molekuly, která určuje vazebné vlastnosti protilátky s antigenními epitopy. Vhodnou úpravou cukerných zbytků na Fc části jsou cíleně ovlivněny interakce navázané protilátky s receptory pro Fc část IgG na cytotoxických buňkách, fagocytujících buňkách a také určují aktivaci komplementu (Yang et al., 2018).

Výše uvedené modifikace monoklonálních protilátek mění významným způsobem imunobiologické vlastnosti protilátek reagujících s molekulou CD20 B lymfocytů. Monoklonální protilátky antiCD20 lze v současné době rozdělit do dvou tříd. Do I. třídy je zařazen např. rituximab. Do II. třídy zařazujeme humanizované protilátky ocrelizumab a obinutuzumab a také plně humánní ofatumumab. Výhodou protilátek antiCD20 řazených do II. třídy je v porovnání s I. třídou protilátek snížený pohyb molekul CD20 v buněčné membráně zprostředkovaný lipidovými rafty. Mají zvýšenou schopnost indukovat cytotoxickou aktivitu závislou na protilátce (ADCC). Naopak, je snížena vazba podjednotky C1q na navázanou protilátku. To snižuje komplementem zprostředkovanou cytotoxicitu. Protilátky II. třídy obecně efektivněji stimulují apoptózu B lymfocytů. Zapojují se také do zatím málo poznaného mechanismu usmrcování cílových buněk jinými mechanismy, než je apoptóza. Ten je označen jako mechanismus DCD (Direct Cell Death).

Je na místě otázka, jak se jednotlivé monoklonální protilátky cílící na CD20 mezi sebou liší a zda je z toho možné odvodit klinické implikace. V následujících odstavcích uvádím příklad tří antiCD20 protilátek, které se používají v klinické praxi a svými vlastnostmi stran účinnosti a bezpečnosti se liší – v jednom případě je tato odlišnost dokumentována přímým klinickým srovnáním (rituximab a obinutuzumab). Rituximab je chimérická protilátka IgG1 I. třídy, která se váže na přesně definované epitopy molekuly CD20, konkrétně imunodominantní úseky tvořené aminokyselinami 170 až 173 a 182 a 185, které jsou na nativní molekule z důvodu konformační struktury v těsné blízkosti. Vazba rituximabu vede k přeskupení molekuly

CD20 v lipidových raftech buněčné membrány tak, že se mohou zapojit imunitní mechanismy odpovědné za depleci B lymfocytů. Depleci zprostředkují mechanismy na protilátce závislé cytotoxicity, kdy se na Fc fragment antiCD20 navázaný na imunogenní epitop CD20 váží prostřednictvím svých receptorů pro Fc fragment cytotoxické buňky, především přirozené cytotoxické NK buňky. Tímto mechanismem však dochází k interakci B lymfocytů s dalšími buněčnými elementy, např. monocytů a makrofágů. Vazba monoklonální protilátky antiCD20 vede k tvorbě membránově vázaných imunitních komplexů, které aktivují komplement klasickou cestou. Výsledkem je sestavení komplexů MAC, které lyzují B lymfocyty. V neposlední řadě vazba antiCD20 destabilizuje B lymfocyty a může být příčinou apoptotické smrti B lymfocytů. Děje se tak cestou aktivace nitrobuněčných signálních drah (Al-Sawaf et al., 2017).

Ocrelizumab je humanizovaná protilátka IgG1 II. třídy, která se váže také na velkou extracelulární smyčku molekuly CD20. Vazebný epitop je však odlišný od epitopu, na který se váže rituximab. V porovnání s rituximabem vazba ocrelizumabu vede k silnější depleci B lymfocytů cestou ADCC. Aktivace komplementu je prostřednictvím této protilátky daleko slabší. To by mohlo být výhodou, protože při aktivaci komplementového systému vznikají prozánětlivé působky, které by mohly být součástí nežádoucích vedlejších účinků aplikace ocrelizumabu. Opakovaná léčebná aplikace ocrelizumabu vede rovněž k odpovědi na tuto protilátku. Odpověď je v porovnání s rituximabem mnohem slabší, protože humanizovaná protilátka ocrelizumab neindukuje tak výraznou xenoreaktivitu. Přesto se vytváří protilátky, které označujeme jako protilátky HACA (Human AntiHumanized Antibodies). Jejich tvorba je však podstatně nižší v porovnání s tvorbou protilátek HACA po expozici rituximabu.

Obinutuzumab je rovněž humanizovaná protilátka IgG1 II. třídy vázající se na jiný, ale překrývající se epitop jako rituximab. Byla vytvořena za pomoci technologie kontrolující glykosylaci Fc části protilátky, čímž došlo k výraznému zvýšení schopnosti ostatních buněk imunitní soustavy, zejména NK buněk, s touto protilátkou interagovat. Význam tohoto rozdílu je klinicky dokumentován přímým srovnáním s rituxima-

bem, kdy léčba onkologických pacientů léčebných obinutuzumabem vedla k výrazně delšímu celkovému přežití.

Populaci B lymfocytů můžeme poměrně podrobně stratifikovat pomocí vícebarevné imunofluorescence s vyhodnocením průtokovou cytometrií. Kombinací vhodných membránových znaků je možné identifikovat různé subtypy B lymfocytů. Tyto subtypy B lymfocytů se odlišují i co do denzity exprese CD20. Podléhají tedy v různé míře depleci po léčbě antiCD20. Léčbou antiCD20 jsou eliminovány jak populace CD19+/CD27+/IgD+, tak CD19+/CD27+/IgD- populace B lymfocytů. Tyto populace jsou považovány za významné antigen-prezentující buňky. Je podstatné, že terapie antiCD20 u nemocných s RS je považována v porovnání s aplikací jiných monoklonálních protilátek, např. natalizumabu nebo alemtuzumabu, za relativně bezpečnou. Schopnost tvořit protilátky zůstává u nemocných léčených biologickou terapií antiCD20 prakticky zachována. Doporučuje se však, aby případná aktivní imunizace předcházela aplikaci antiCD20. Deplece v B lymfocytární větvi je pouze přechodná. B lymfocytární systém se během několika měsíců obnovuje. Poměrně rozsáhlé klinické zkušenosti s aplikací antiCD20 v hematonekologii ukazují, že riziko infekcí není zásadně zvýšeno. Lze předpokládat, že tomu tak bude i v případě léčby antiCD20 u nemocných s RS (Baker et al., 2017; Sorensen a Blinkenberg, 2016) (obrázek 3).

Závěr

Ještě v nedávné minulosti byla při aplikaci biologické terapie monoklonálními protilátkami sledována pouze specifita těchto protilátek, tj. odpovídající molekula CD, která je jimi rozpoznávána. Tento přístup je již jednoznačně překonán. Při rozhodování o výběru monoklonální protilátky pro léčebné využití musí být zohledněno, které konkrétní epitopy cílové molekuly jsou rozpoznávány konkrétní monoklonální protilátkou. To platí bez zbytku pro léčbu protilátkami antiCD20. Ukazuje se zřetelně se vzrůstajícími klinickými zkušenostmi, že jsou velké rozdíly mezi jednotlivými monoklonálními protilátkami stran nežádoucích účinků a bezpečnosti léčby. Tyto rozdíly lze vysvětlit nejen v kontextu základní molekulární konstrukce protilátek (chimérická, humanizovaná, humánní). Nejnověji je dokládán zásadní význam cukerných zbytků především v Fc části monoklonálních protilátek. Manipulací

s těmito cukernými zbytky (glycoengineering) lze získat výhodnější imunobiologické vlastnosti

monoklonálních protilátek. Výsledkem je lepší klinická účinnost a snížené riziko spojené jak

s podáváním léčiva, tak s ohledem na dlouhodobou bezpečnost léčby (Dubey et al., 2017).

LITERATURA

1. Al-Sawal O, Fischer K, Engelke A, Pflug N, Hallek M, Goede V. Obinutuzumab in chronic lymphocytic leukemia: design, development and place in therapy. *Drug Design, Develop Ther* 2017; 11: 295–304.
2. Baker D, Marta M, Pryce G, Giovannoni G, Schmierer K. Memory B cells are major targets for effective immunotherapy in relapsing multiple sclerosis. *EBioMedicine* 2017; 16: 41–50.
3. Dubey D, Forsthuber T, Flanagan EP, Pittock SJ, Stave O. B-cell-targeted therapies in relapsing forms of MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2017; 4: e405: doi:10.1212/NXI.0000000000000405.
4. Du FH, Mills EA, Mao-Draayer Y. Next-generation anti-CD20 monoclonal antibodies in autoimmune disease treatment. *Autoimmun Highlights* 2017; 8: 1–12.
5. Gelfand JM, Cree BAC, Hauser SL. Ocrelizumab and other CD20+ B-cell-depleting therapies in multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 2017; 14: 835–841.
6. Krejsek J, Andrys C, Krčmová I. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon 2016: 496 s. <http://www.imunologie-cloveka-krejsek.cz>
7. Salles G, Barrett M, Foa R, Maurer J, O'Brien S, Valente N, Wenger M, Maloney DG. Rituximab in B-cell hematologic malignancies: a review of 20 years of clinical experience. *Adv Ther* 2017; 34: 2232–2273.
8. Sorensen PS, Blinkenberg M. The potential role for ocrelizumab in the treatment of multiple sclerosis: current evidence and future prospects. *Ther Adv Neurol Disord* 2016; 9: 44–52.
9. Yang Ch, Gao X, Gong R. Engineering of Fc fragments with optimized physicochemical properties implying improvement of clinical potentials for Fc-based therapeutics. *Front Immunol* 2018; 8: 1–14.