

Využití průtokové cytometrie při monitorování pacientů na biologické léčbě

Setkání uživatelů průtokové cytometrie Beckman Coulter
Valeč 14.5.2018

Irena Francová VFN Praha, ÚLBLD -KIA

Biologická léčba

- moderní, rychlý vývoj nových léčiv i léčebných indikací
- účinná, ale s řadou závažných NÚ
- drahá

sledování v rutinní laboratoři - 2 přístupy

stanovení plazmatické koncentrace biologického léku před podáním další infuze – trough levels

sledování efektu terapie - cytometrie

Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (RS) je chronické zánětlivé autoimunitní onemocnění, při kterém imunitní systém jedince napadá vlastní struktury CNS



zánětlivá demyelinizace, poškození a ztráta axonů a neuronů
invalidita

- 0,1% generace „západních“ zemí – 2,5 miliónu
- mladí lidé, v produktivním věku 20-30 let, častěji ženy
- severojižní gradient
- vyšší výskyt ve skupině s lepším socioekonomickým postavením
- ČR 10-13 000 nemocných

PATOGENEZE RS

Paradigma CNS jako imunoprivilegovaného orgánu



Vztah a komunikace imunitního a nervového systému

Poznání imunopatogeneze vede k možnostem nasazení
cílené imunoterapie

Disease Modifying Drugs v případě RS

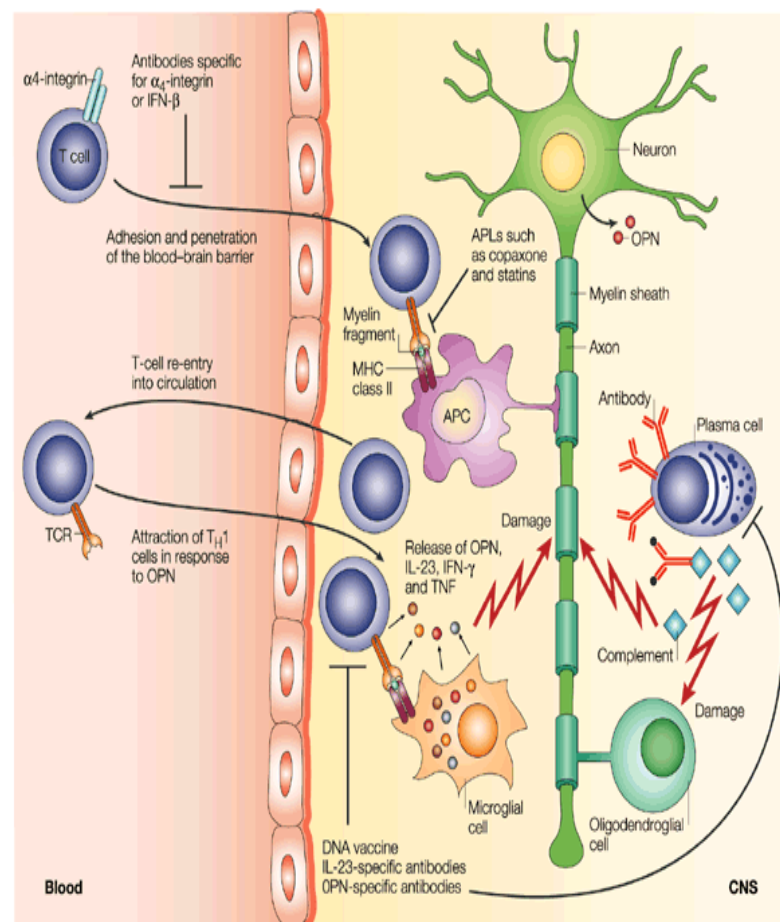
Imunopatogeneze RS

vrozená imunita

- PAMP - virové infekce CNS, EBV
- DAMP - buněčný stres, buněčná smrt, mitochondrie

specifická imunita

- autoreaktivní Th1 ly – aktivace a přestup přes HEB,
- Th17
- cytotoxická destrukce myelinových struktur – Tc
- autoreaktivní Bly – aktivace a přestup přes HEB – klonální expanze – plazmatické a paměťové buňky



Nature Reviews | Immunology

zvířecí model - experimentální autoimunitní encefalitida

Farmakoterapie

Kortikoidy a cytostatika – autoimunitní onemocnění

1993 první DMD – interferony β (1a a 1b), dodnes léky první volby

1996 – glatiramer acetát, lék 1. volby

2004 – 1. mAb - natalizumab – pozastavení (fatální oportunní infekce CNS), nyní znovu používán za zprísněných podmínek monitorace pacienta

další mAb proti dalším terčovým strukturám – alemtuzumab, rituximab, ocrelizumab ...

2010 perorální léky pro léčbu RS

fingolimod, teriflunomid, dimethyl fumarát

lemtuzumab

Lemtrada

Depletes CD52+ mononuclear cells, including CD4+ and CD8+ T cells, B cells, monocytes and some dendritic cells.



Daclizumab

Zybrita

Enhances NK regulatory cell activity on T cells. Leads to increased lysis of activated T cells by CD56bright NK cells.



phery

blood brain barrier

**Mitoxantrone
Teriflunomide**

Mabthera

**Rituximab
Ocrelizumab
Ofatumumab**

Lysis of CD20+ B-cells

Prevents proliferation of autoimmune T cells and B cells

**Natalizumab
IFN-β**

Tysabri

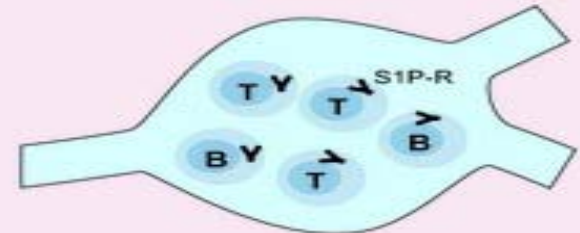
Inhibits VLA-4 interactions with VCAM-1, thereby blocking the entry of VLA-4+ cells into the CNS across the BBB



Fingolimod

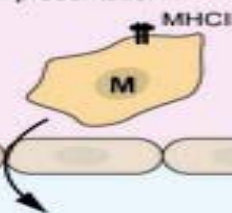
Gilenya

Fingolimod retains T-cells and B-cells in lymph nodes by internalizing their S1P-receptors



**Laquinimod
IFN-β**

Downregulates MHC-II on the Macrophage (M) inhibits "antigen presentation".



Natalizumab

Tysabri

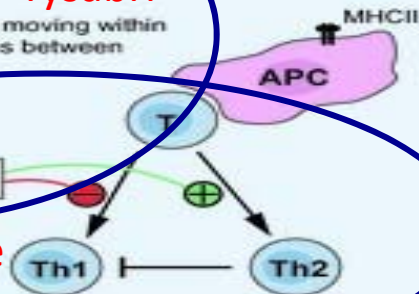
Inhibits T cells and B cells from moving within the CNS by blocking interactions between VLA-4 and Fibronectin

**IFN-β
Laquinimod**

Downregulates MHCII

Glatiramer acetate

Copaxone



**Fingolimod
Laquinimod**

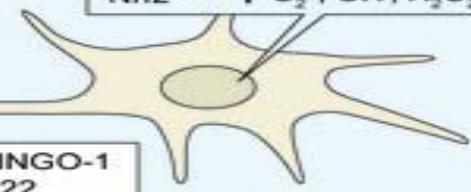
Enhances production of BDNF by neurons and other cells.

Tecfidera

Dimethyl fumarate

Enhances Nrf2, reducing oxygen radical activity

Nrf2 → O₂⁻, OH[·], H₂O₂



**IFN-β
Laquinimod**

Downregulates MHCII

**TNF-α
NO
IFN-γ**

Disrupts myelin

ODC

**Anti-LINGO-1
rHIgM22**

Increases ODC remyelination of axons

Glatiramer acetát (Copaxone)

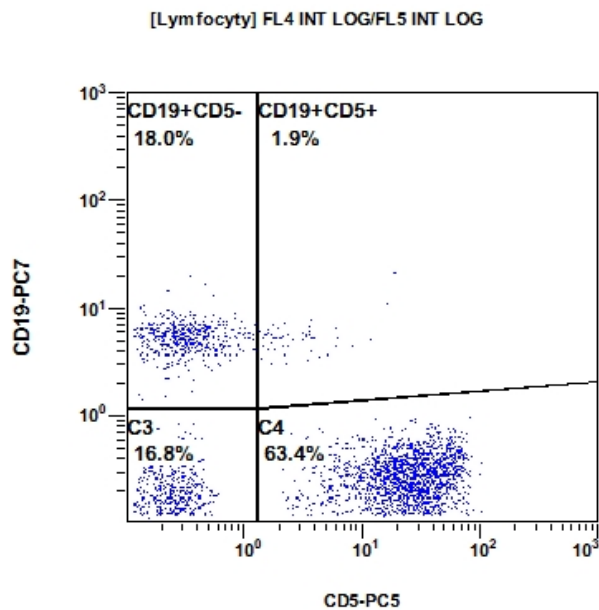
- syntetický tetramer peptid (L-glutamát, L-lysin, L-alanin a L-tyrosin), který napodobuje strukturu myelinu (MBP)
- vysoce afinitní vazba na MHC II APC pro antigen MBP
- tlumivé změny odpovědi imunitního systému na tento antigen (shift Th1 na Th2 a aktivace T regulačních buněk na periférii)
- prostup Th2 ly přes HEB – produkce protizánětlivých cytokinů IL-10

Bez významných změn v běžných laboratorních parametrech

Natalizumab (Tysabri)

humanizovaná mAb proti integrinu VLA 4 ($\alpha 4\beta 1$)

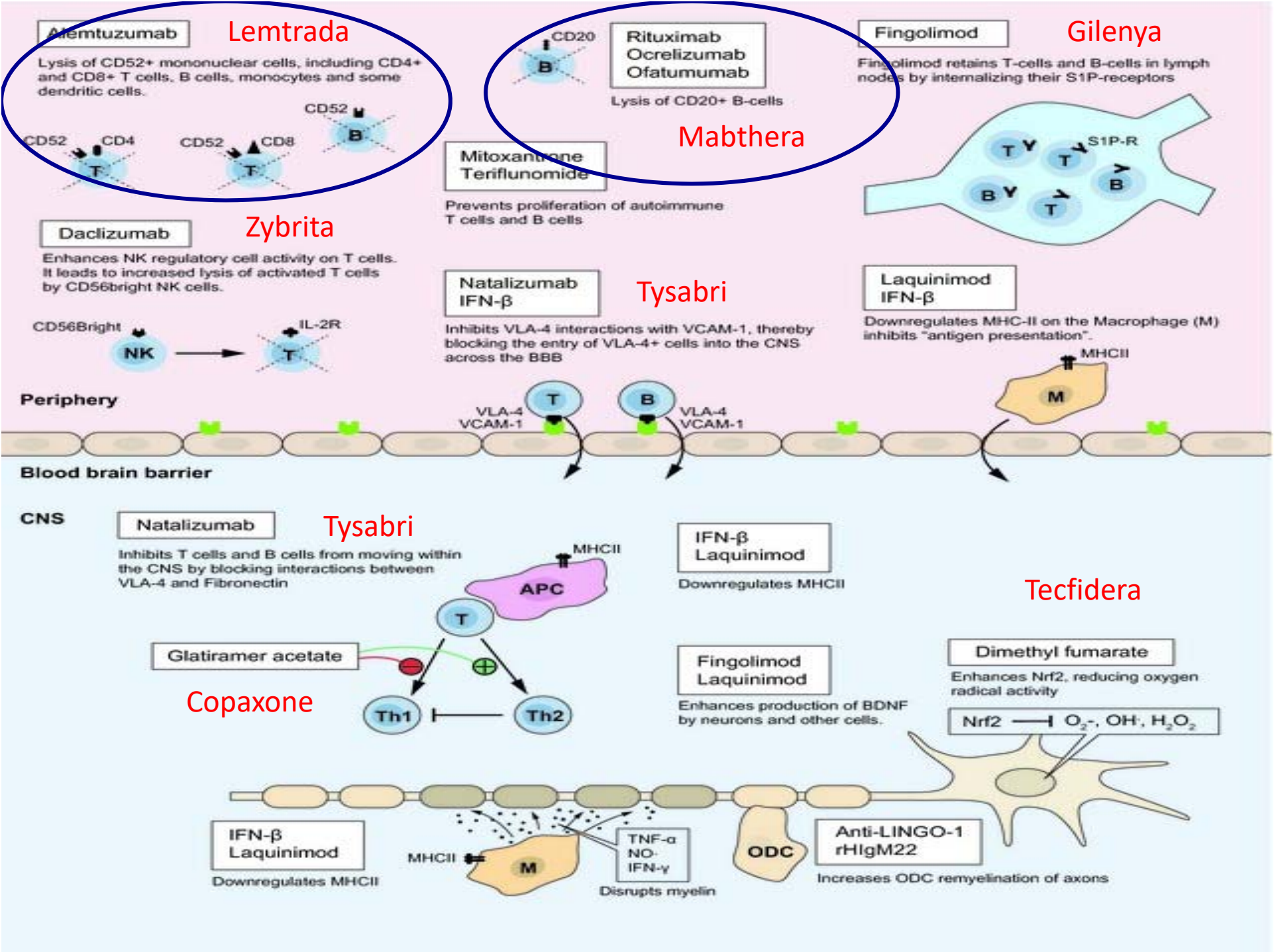
- přestup aktivovaných CD4+ lymfocytů přes HEB do CNS (interakce s VCAM 1 endotelií)
- protizánětlivé působení v CNS
- neuroprotektivní účinek



↑Ly, především eosinofilů v KC
Oportunní infekce sledování prot

IgG	16 g/l	
IgA	5,7 g/l	
IgM	0,24 g/l	
	%	$10^9/l$
WCB		9,53
Ly	28,4	2,71
Mo	6,5	0,62
Eo	3,8	0,36
CD3+	62,1	1,68
CD3+CD4+	45,8	1,24
CD3+CD8+	15,4	0,42
CD19+	19,9	0,54
NK bb	17,6	0,48
Treg	8,53	0,106

ů a
iru



Rituximab (MabThera), Ocrelizumab (Ocrevus)

- rituximab – chimerická myší-humánní anti-CD20 mAb
- ocrelizumab (od roku 2018) - humanizovaná anti-CD20 mAb

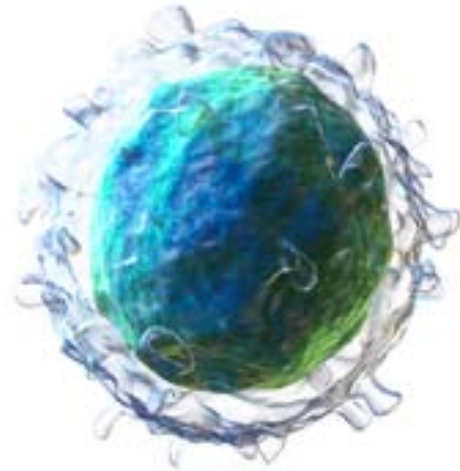
B ly v patogenezy RS

- prezentace Ag,
- aktivace autoreaktivních Tly,
- tvorba germinálních center ektopických meningeálních folikulů

Mechanismus účinku léčiva

- komplementem zprostředkovaná cytotoxicita
- ADCC

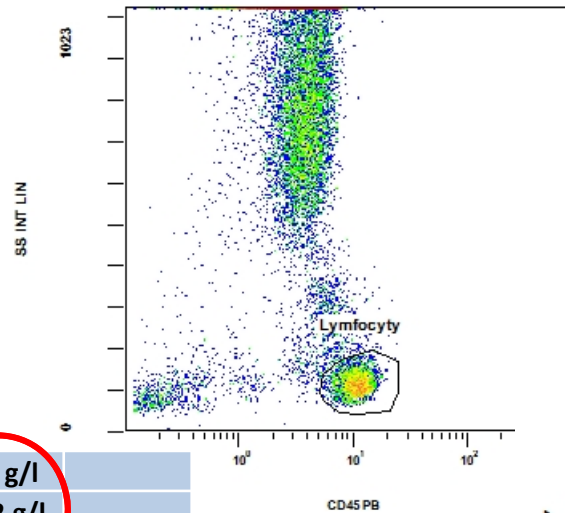
Úvodní pulsní léčba, další dávka doporučena až po objevení Bly v PK obvykle 6-8 měsíců



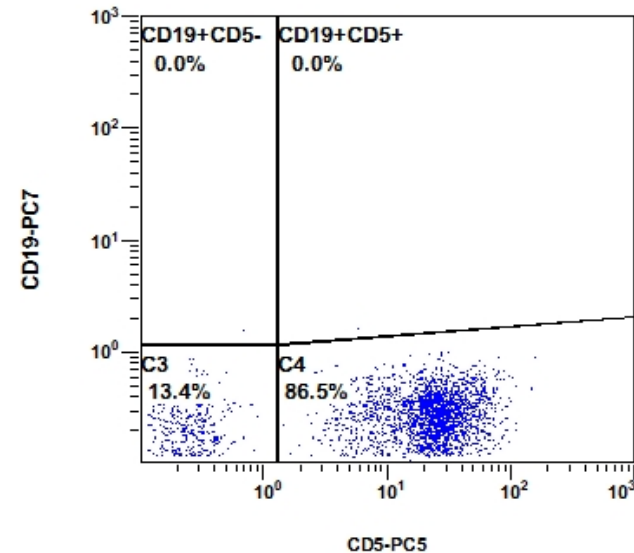
Laboratorní nález – anti-CD20

- deplece B ly
- může se objevit neutropenie
- mírně snížené sérové hladiny Ig (nejvíce IgM), brát v úvahu možnost občasného podávání malých dávek IVIG

[Ungated] FL9 INT LOG/SS INT LIN



[Lymfocyty] FL4 INT LOG/FL5 INT LOG



IgG	5,3 g/l	
IgA	0,52 g/l	
IgM	0,28 g/l	
	%	10 ⁹ /l
WCB		6,91
Ly	20,8	1,44
Mo	6,1	0,42
Eo	3,5	0,24
CD3+	83,7	1,21
CD3+CD4+	61,7	0,89
CD3+CD8+	20,3	0,29
CD19+	0	0
NK bb	15,5	0,54
Treg	9,66	0,086

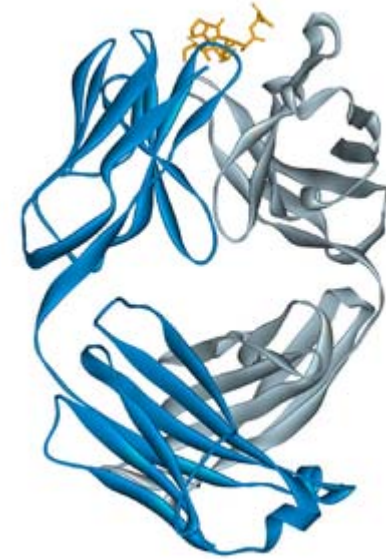
Pacientka po 7 pulsu
Mab Thera, poslední
dávka 18/04/18,
Hizentra 1g/14d

Alemtuzumab (Lemtrada)

Humanizovaná anti-CD52

CD52 – pravděpodobně role v migraci Tly a kostimulaci

- zralé T a B lymfocyty
- monocyto-makrofágová řada
- neutrofily
- NK buňky



Imunitní restart

?Mechanismus lýzy terčových buněk – aktivace komplementu, buněčná cytolýza závislá na komplementu, protilátkami zprostředkovaná cytotoxicita (přímé působení NK buněk)?

Velmi rychlá deplece buněk PK, populace v lymfatických uzlinách zachovány – obranyschopnost pacienta!

Obnova lymfocytů začíná totiž až po několika týdnech, a to nerovnoměrně pro různé populace

Dlouhodobá deplece CD19+ paměťových B lymfocytů důležitá pro RS

KO po 14 dnech od podání:

WBC $2,16 \times 10^9/l$

Ly $0,18 \times 10^9/l$

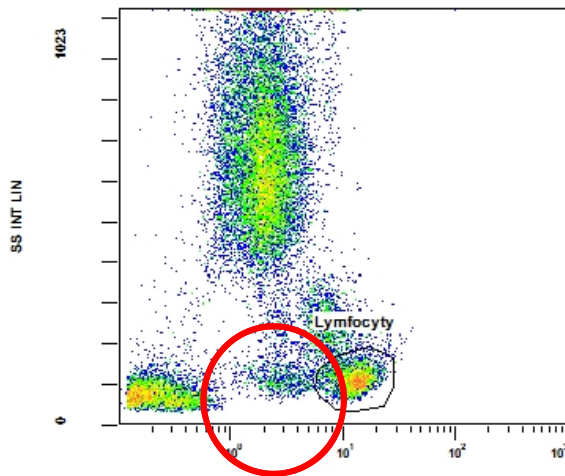
Neu $1,76 \times 10^9/l$

Mo $0,22 \times 10^9/l$

Porovnávací nálezy - Lemtrada

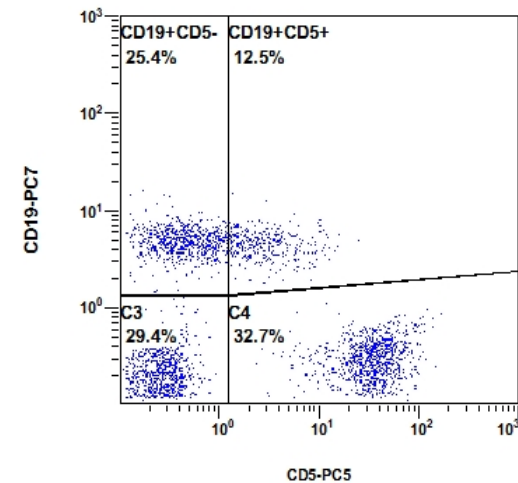
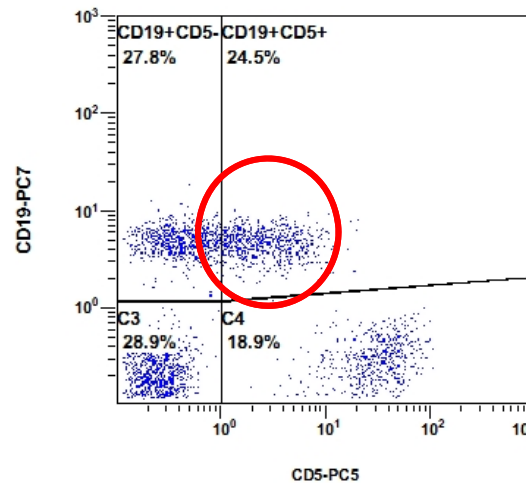
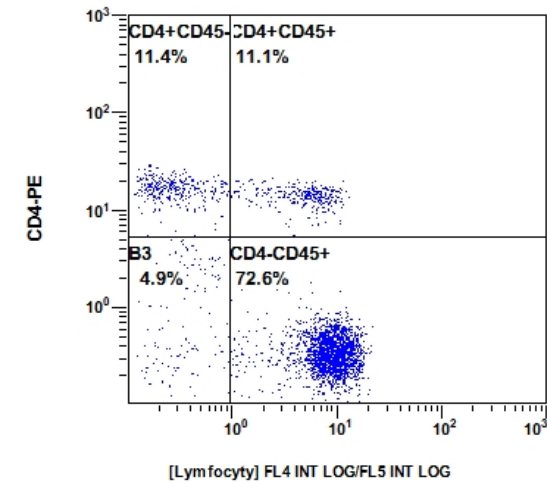
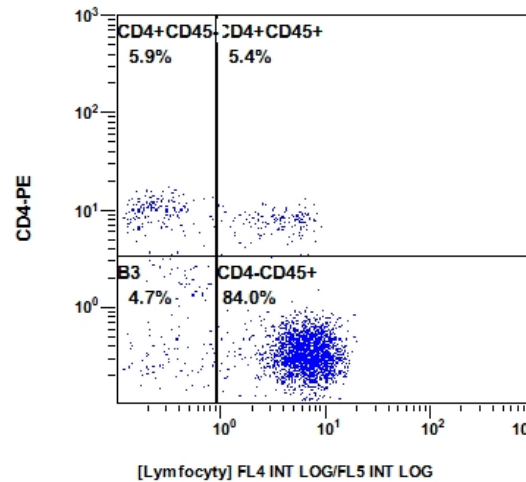
Lemtrada po půl roce

Lemtrada po roce



lymfopenie – už několik hodin po podání!!

	po půl roce		po roce	
	%	abs.	%	abs.
Ly		0,91		1,0
CD3+	17,8	0,16	34,6	0,35
CD3+CD4+	11,3	0,1	23,8	0,24
CD3+CD8+	5,3	0,05	10,2	0,1
CD19+	53,1	0,48	39,6	0,4
NK bb.	24,9	0,23	27	0,27
Treg	13,7	0,014	12,6	0,03



Alemtuzumab

Lemtrada

Lysis of CD52+ mononuclear cells, including CD4+ and CD8+ T cells, B cells, monocytes and some dendritic cells.



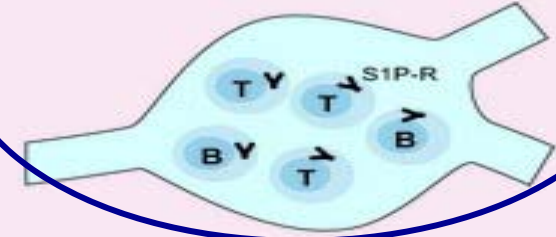
**Rituximab
Ocrelizumab
Ofatumumab**

Lysis of CD20+ B-cells

Fingolimod

Gilenya

Fingolimod retains T-cells and B-cells in lymph nodes by internalizing their S1P-receptors



**Mitoxantrone
Teriflunomide**

Mabthera

Prevents proliferation of autoimmune T cells and B cells

Daclizumab

Zybrita

Enhances NK regulatory cell activity on T cells. It leads to increased lysis of activated T cells by CD56bright NK cells.



**Natalizumab
IFN-β**

Tysabri

Inhibits VLA-4 interactions with VCAM-1, thereby blocking the entry of VLA-4+ cells into the CNS across the BBB

**Laquinimod
IFN-β**

Downregulates MHC-II on the Macrophage (M) inhibits "antigen presentation".

Periphery

Blood brain barrier

CNS

Natalizumab

Tysabri

Inhibits T cells and B cells from moving within the CNS by blocking interactions between VLA-4 and Fibronectin

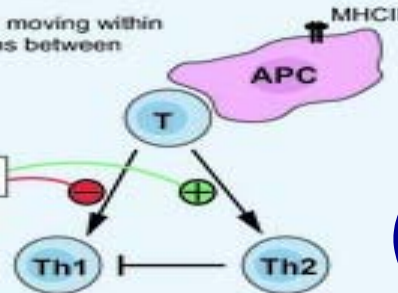
**IFN-β
Laquinimod**

Downregulates MHCII

Tecfidera

Copaxone

Glatiramer acetate

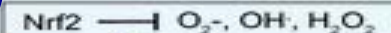


**Fingolimod
Laquinimod**

Enhances production of BDNF by neurons and other cells.

Dimethyl fumarate

Enhances Nrf2, reducing oxygen radical activity



**IFN-β
Laquinimod**

Downregulates MHCII

MHCII



Disrupts myelin

TNF-α
NO
IFN-γ

ODC

**Anti-LINGO-1
rHlgM22**

Increases ODC remyelination of axons



Fingolimod (Gilenya)

- Blokuje a internalizuje chemokinový receptor pro S1P1(sfingosin-1-fosfát) na povrchu lymfocytů a buněk CNS
- Znemožnění účinku vlastního S1P (vytahuje lymfocyt z uzliny)
- Změna poměrů v chemokinových signálech v uzlině a zadržení lymfocytů v uzlině



snižuje schopnost infiltrace autoreaktivních lymfocytů do CNS
přímý účinek na buňky CNS, protože i ty mají S1P1 receptor

askomyceta *Isaria Sinclairia*



- efekt reversibilní při vysazení léku, vrací se k normě během 1 až 2 měsíců
- při infekce jsou tyto buňky po aktivaci příslušným antigenem opět uvolněny z uzliny do periferní krve a mohou se účastnit imunitní reakce. !Herpetické infekce - VZV!

Laboratorní nález - Gilenya

Periferní krev

Těžká lymfopenie (o 70%)

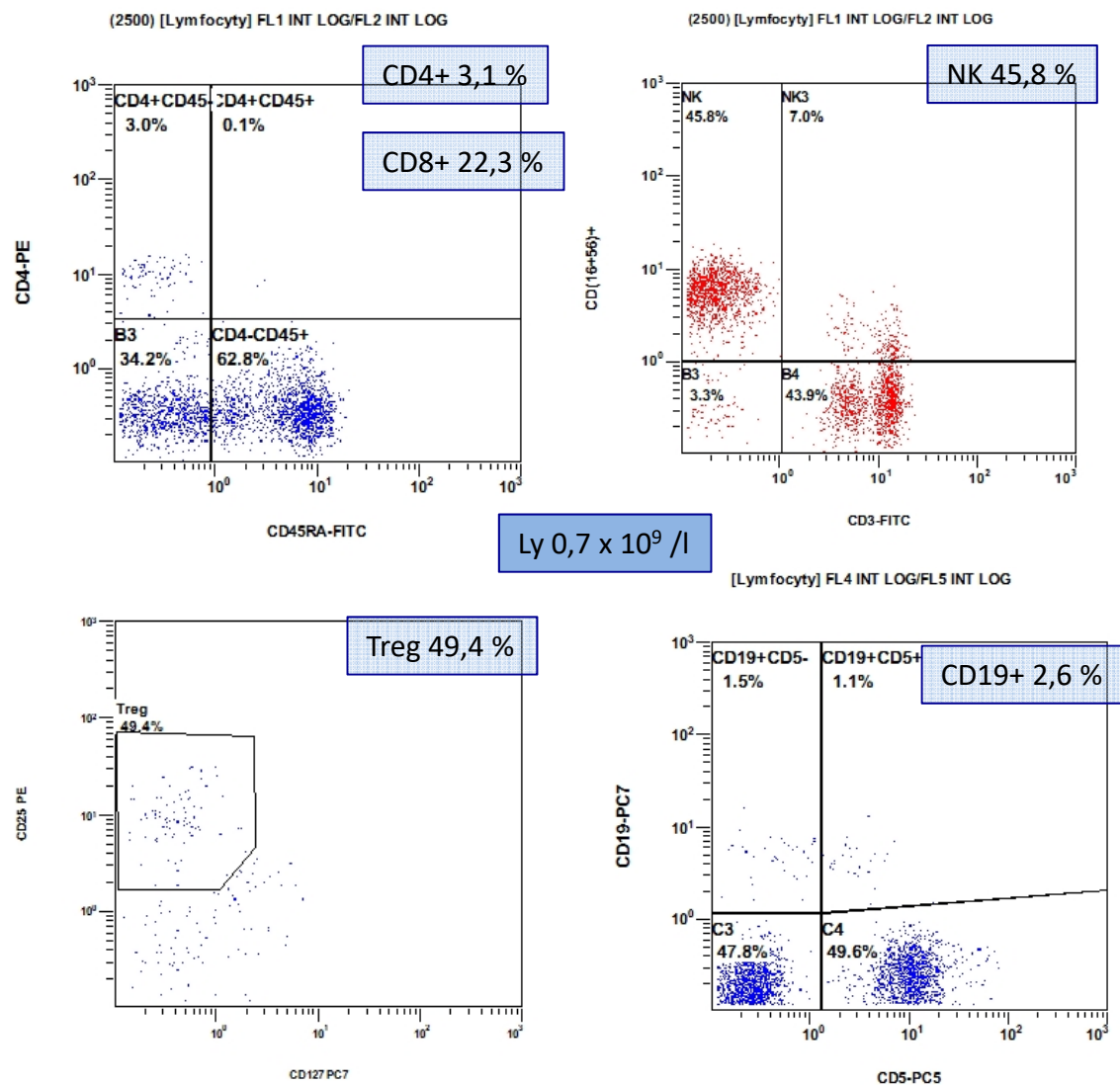
↓CD4+

↑relativní počty NK, v
absolutních počtech jen nízké
snížení,

↑ relativních hodnot Treg

↑INFγ a TNFα ↓IL-2

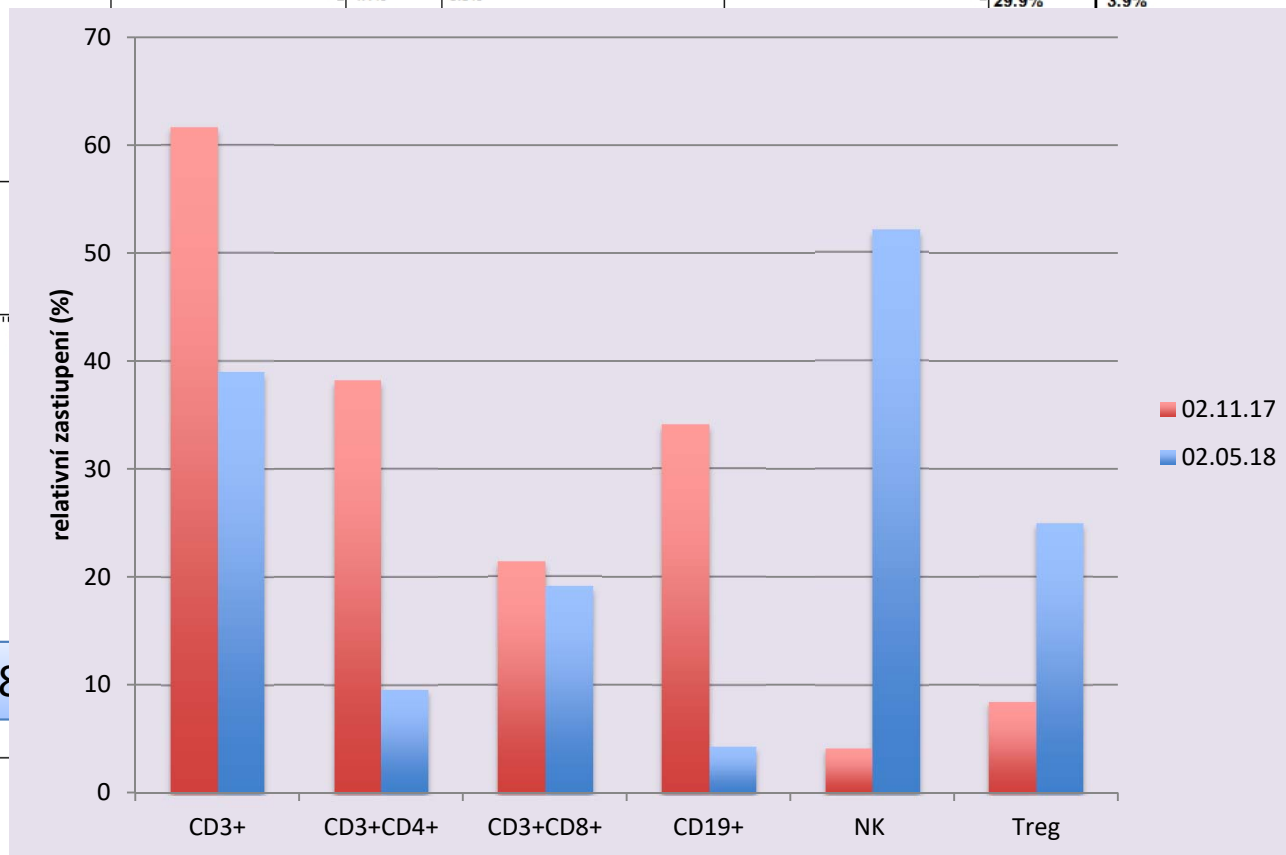
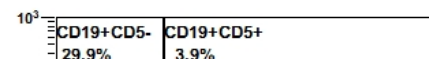
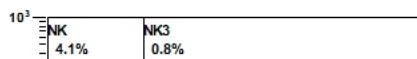
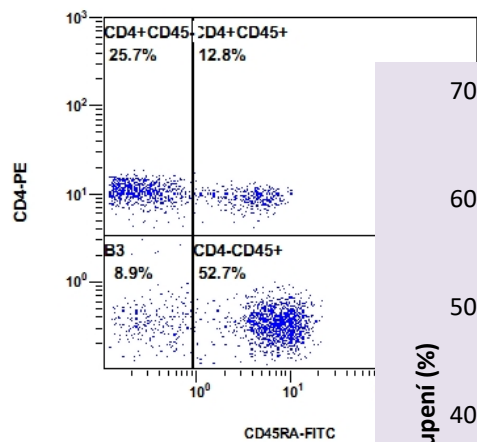
Laboratorní nález = HIV infekce



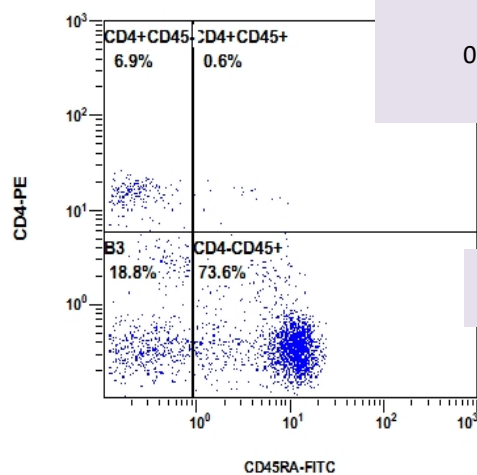
výsledky z 2.11.2017

(2500) [Lymfocyty] FL1 INT LOG/FL2 INT LOG

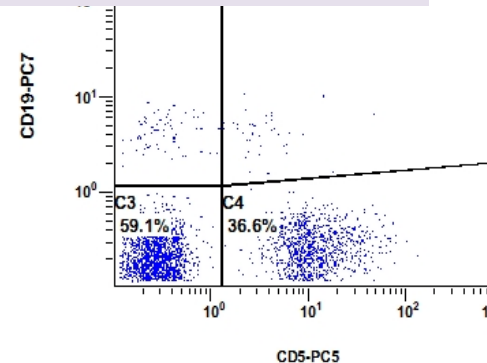
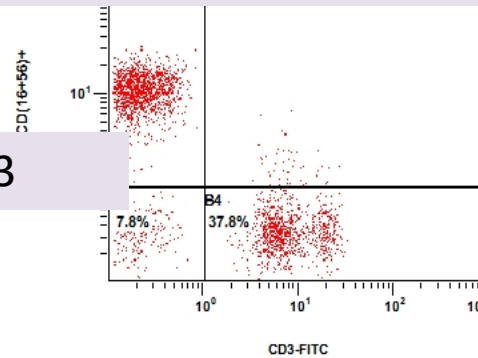
[Lymfocyty] FL4 INT LOG/FL5 INT LOG



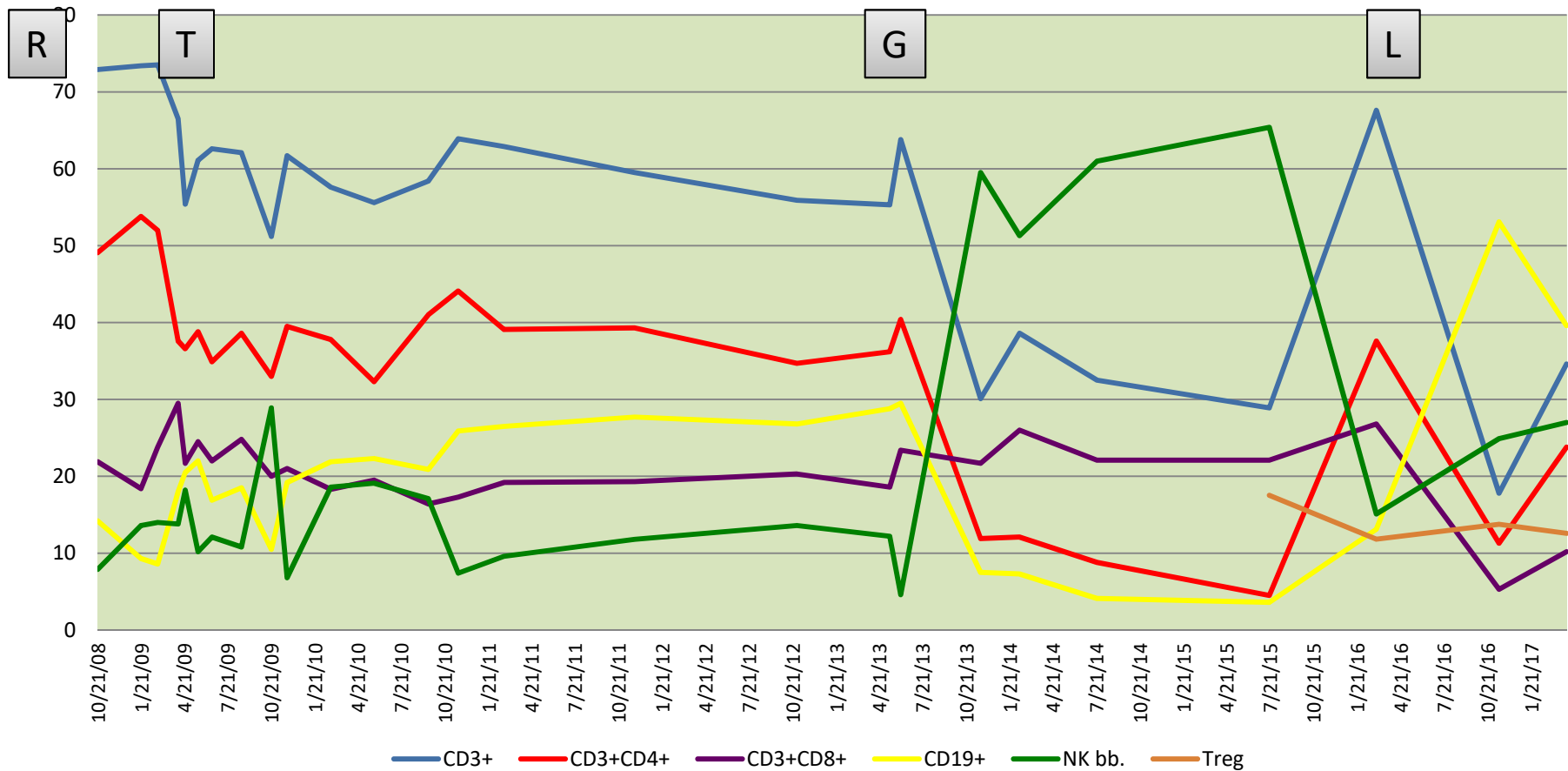
výsledky z 2.5.2018



Ly 0,33

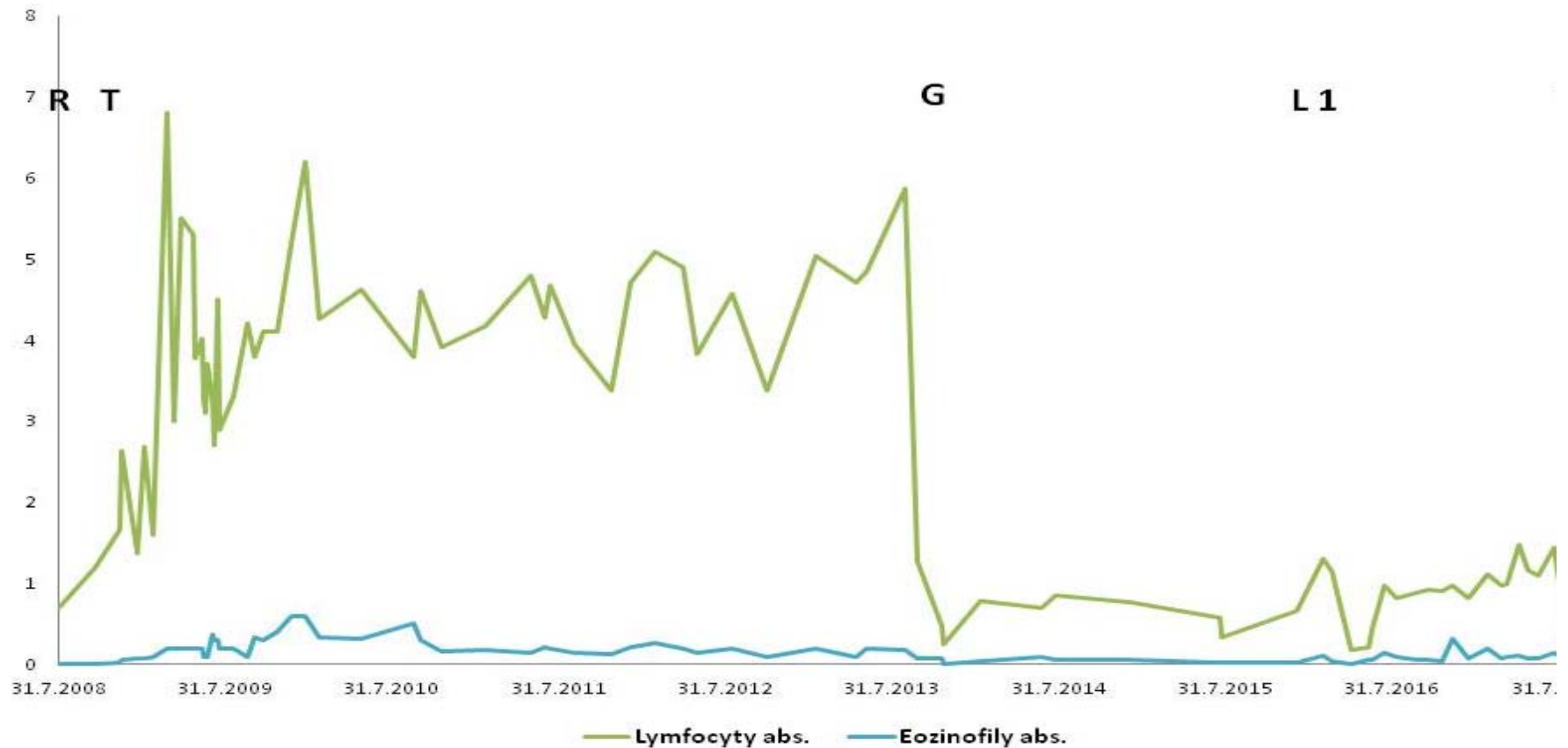


Hodnoty zastoupení jednotlivých subpopulací v závislosti na léčbě

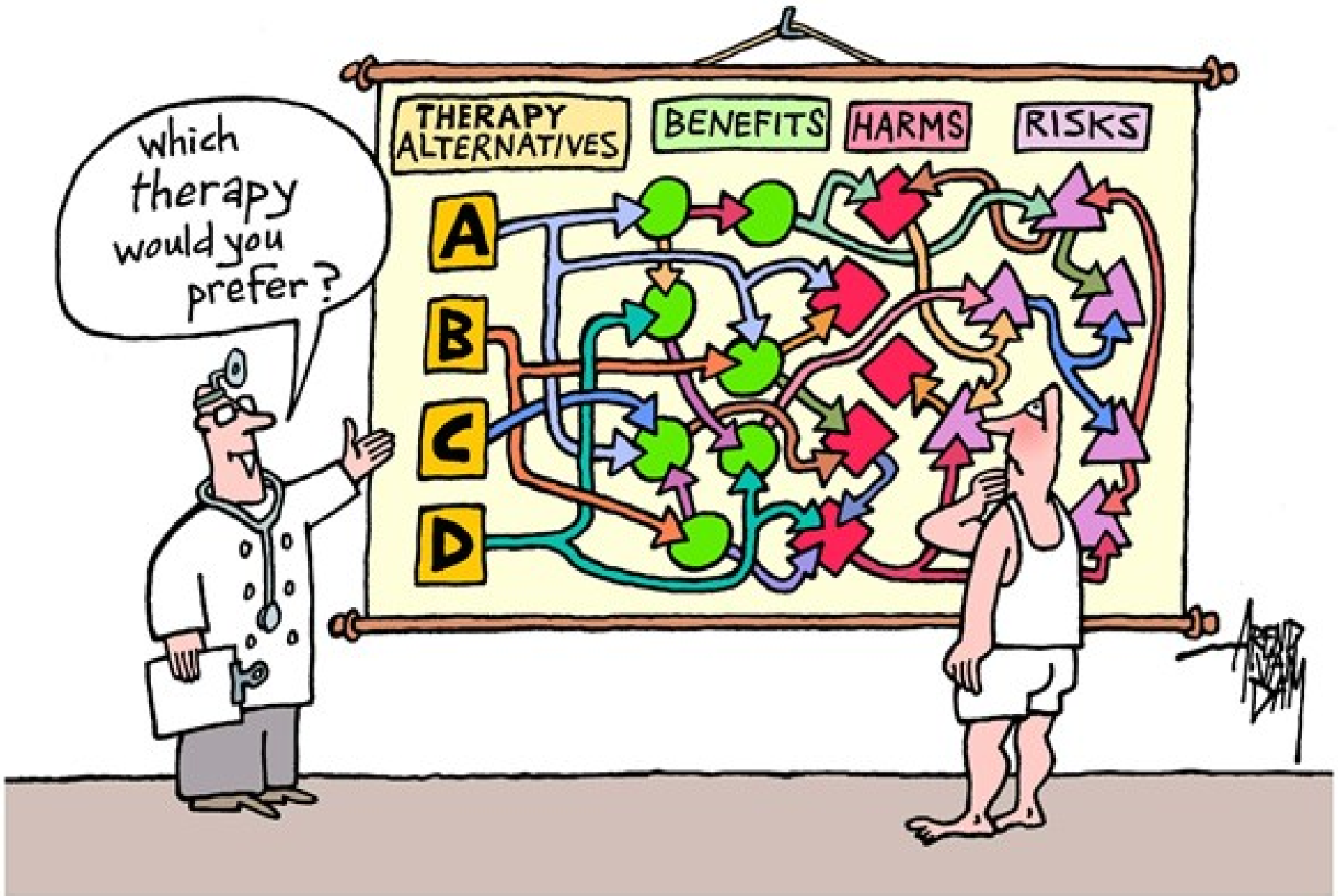


Pacientka léčena od 01/2007 Rebifem (R), 02/2009 změna na Tysabri (T), 08/2013 – 02/2016 Gilenya (G), 1. puls Lemtrady (L) 04/2016

Změny absolutních hodnot lymfocytů a eosinofilů v závislosti na terapii



Pacientka léčena od 01/2007 Rebifem (R), 02/2009 změna na Tysabri (T), 08/2013 – 02/2016 Gilenya (G), 1. puls Lemtrady (L) 04/2016, 2. puls L odložen – thyreotoxikosa s pozitivitou TRAK



informed consent