

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VERONIKA ROTNIK
MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VERONIKA ROTNIK

**SINERGISTIČNO DELOVANJE TERAPEVTSKIH
MONOKLONSKIH PROTITELES Z AGONISTI
RECEPTORJA EP4 PRI B-CELIČNIH LEVKEMIJAH IN
LIMFOMIH *IN VITRO***

***IN VITRO* SYNERGYSTIC EFFECTS OF THERAPEUTIC
MONOCLONAL ANTIBODIES AND EP4 RECEPTOR
AGONISTS IN B-CELL LEUKEMIA AND LYMPHOMA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinično biokemijo pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Tijane Markovič, mag. farm.

ZAHVALA

Iskrena hvala prof. dr. Ireni Mlinarič-Raščan mag. farm. za omogočeno izdelavo magistrske naloge pod vašim mentorstvom in strokovne nasvete ter vodenje pri pripravi magistrske naloge. Velika zahvala gre somentorici asist. dr. Tijani Markovič mag. farm. za vse nasvete in usmerjanje pri praktičnem delu. Hvala tudi za pomoč pri obdelavi podatkov ter pisanju magistrske naloge.

Rada bi se zahvalila mladi raziskovalki Maši Vidmar, mag. lab. biomed., da si bila vedno pripravljena pomagati pri delu v celičnem laboratoriju. Hvala za prijaznost in dostopnost tudi ostalim s Katedre za klinično biokemijo.

Nenazadnje hvala družini in fantu za spodbudne besede in podporo v času študija ter pri pripravi magistrske naloge. Hvala tudi sošolcem in prijateljem, s katerimi smo si skupaj delili skrbi in si krajšali študentske dni. Zaradi vas mi bodo ostala v čudovitem spominu.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Tijane Markovič, mag. farm.

Veronika Rotnik

Komisija za zagovor:

Predsednik: prof. dr. Samo Kreft

Mentorica: prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan

Somentorica: asist. dr. Tijana Markovič

Članica: doc. dr. Martina Hrast

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	II
KAZALO SLIK	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO ENAČB.....	VI
POVZETEK.....	VII
ABSTRACT	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	X
1 UVOD	1
1.1 LIMFOMI IN LEVKEMIJE	1
1.1.1 Burkittov limfom	1
1.1.2 Kronična limfocitna levkemija	2
1.1.3 Strategije zdravljenja KLL	2
1.2 MONOKLONSKA PROTITELESA USMERJENA PROTI CELIČNEMU OZNAČEVALCU CD20	4
1.2.1 Rituksimab.....	6
1.2.2 Ofatumumab	7
1.2.3 Obinutuzumab	8
1.2.4 Ostala monoklonska protitelesa usmerjena proti CD20.....	9
1.2.5 Mehanizmi celične smrti posredovane z monoklonskimi protitelesi proti CD20	10
1.3 PAROKSIZMALNA NOČNA HEMOGLOBINURIJA.....	12
1.3.1 Ekulizumab.....	13
1.4 PROSTAGLANDINSKI RECEPTOR EP4 IN NJEGOV POTENCIAL V TERAPIJI.....	14
1.4.1 Agonista receptorja EP4	15
2 NAMEN	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 Kemikalije	18
3.1.2 Kompleti za analize	18
3.1.3 Pufri in raztopine	19
3.1.4 Protitelesa in fluorescenčna barvila	19
3.1.5 Gojišča in sestava	19
3.1.6 Laboratorijska oprema	20
3.2 DELO V CELIČNEM LABORATORIJU.....	21
3.2.1 Odmrzovanje celic.....	22
3.2.2 Subkultiviranje celičnih linij.....	22
3.2.3 Štetje celic	22
3.3 UGOTAVLJANJE METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC	23

3.3.1	Postopek določanja metabolne aktivnosti celic na celičnih linijah RAMOS in MEC1 z monoklonskimi protitelesi in agonisti receptorja EP4	24
3.3.2	Priprava celic in postopek ugotavljanja odziva na humani serum na celičnih linijah MEC1 in RAMOS24	
3.4	PRETOČNA CITOMETRIJA.....	25
3.4.1	Priprava celic za analizo ekspresije celičnega označevalca CD20 s pretočno citometrijo.....	26
3.5	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	26
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	27
4.1	HUMANI SERUM INDUCIRA S KOMPLEMENTOM POSREDOVANO CITOTOKSIČNOST <i>IN VITRO</i>	27
4.1.1	Humani serum koncentracijsko odvisno inducira CDC na celični liniji Ramos.....	28
4.1.2	Vpliv humanega seruma na indukcijo CDC na celični liniji MEC1 <i>in vitro</i>	33
4.2	AGONISTI RECEPTORJA EP4 DELUJEJO SINERGISTIČNO Z MONOKLONSKIMI PROTITELESI <i>IN VITRO</i>	41
4.2.1	Sinergistični učinki na celični liniji Ramos	42
4.2.2	Sinergistični učinki na celični liniji MEC1	47
4.3	AGONISTI RECEPTORJA EP4 NE MODULIRAJO EKSPRESIJE CELIČNEGA OZNAČEVALCA CD20	57
5	SKLEPI	59
6	LITERATURA	60
7	PRILOGE.....	I

KAZALO SLIK

Slika 1: Razvoj monoklonskih protiteles usmerjenih proti celičnem označevalcu CD20. Prirejeno po (22, 23).....	5
Slika 2: Primerjava citotoksičnih učinkov posredovanih z monoklonskimi protitelesi skupine II s skupino I. Prirejeno po (24).	5
Slika 3: Vezavna mesta anti CD20 monoklonskih protiteles. Povzeto po (37).....	8
Slika 4: Shematski prikaz mehanizma programirane celične smrti povzročene z monoklonskim protitelesom skupine II. Povzeto po (55).	11
Slika 5: Mehanizmi delovanja anti-CD20 monoklonskih protiteles skupine I (rituksimab, ofatumumab) in skupine II (obinutuzumab). Povzeto po (29).	12
Slika 6: Mehanizem delovanja ekulizumaba v kaskadi reakcij sistema komplementa. Zaradi vezave monoklonskega protitelesa na komponento komplementa C5, ne pride do nastanka MAC. Povzeto po (59).	13
Slika 7: Strukturne formule agonistov receptorja EP4 PGE2, PGE1-OH in L-902,688 (68, 76, 77).....	16
Slika 8: Štetje celic s hemocitometrom pod invertnim mikroskopom. (foto: V. Rotnik)....	23
Slika 9: Redukcija reagenta MTS v formazan.....	23
Slika 10: Vpliv humanega seruma kot vira komplementa na metabolno aktivnost celic Ramos po tretiranju z rituksimabom.	29
Slika 11: Vpliv humanega seruma kot vira komplementa na metabolno aktivnost celic Ramos po tretiranju z ofatumumabom.	30
Slika 12: Vpliv humanega seruma kot vira komplementa na metabolno aktivnost celic Ramos po tretiranju z obinutuzumabom.....	31
Slika 13: Vpliv humanega seruma kot vira komplementa na metabolno aktivnost celic Ramos po tretiranju z alemtuzumabom.	32
Slika 14: Vpliv humanega seruma kot vira komplementa na metabolno aktivnost celic MEC1 po tretiranju z rituksimabom.....	34
Slika 15: Vpliv humanega seruma kot vira komplementa na metabolno aktivnost celic MEC1 po tretiranju z ofatumumabom.....	35
Slika 16: Vpliv humanega seruma kot vira komplementa na metabolno aktivnost celic MEC1 po tretiranju z obinutuzumabom.	36
Slika 17: Vpliv humanega seruma na kot vira komplementa na metabolno aktivnost celic MEC1 po tretiranju z alemtuzumabom.	37

Slika 18: Mehanizmi delovanja monoklonskih protiteles skupine I in skupina II.	38
Slika 19: Primerjava citotoksičnosti monoklonskih protiteles usmerjenih proti celičnem označevalcu CD20 v prisotnosti različnih koncentracij humanega seruma.	39
Slika 20: Primerjava učinkovitosti monoklonskih protiteles rituksimab, ofatumumab in obinutuzumab v različnih koncentracijah.	40
Slika 21: Vrednotenje sinergističnih učinkov po 24 urah in po 48 urah na primeru obinutuzumaba in PgE1-OH na celični liniji MEC1.	41
Slika 22: Relativna metabolna aktivnost celic Ramos po tretiranju z PgE1-OH in L-902,688.	43
Slika 23: Relativna metabolna aktivnost celic Ramos po 48-urni inkubaciji z obinutuzumabom in PgE1-OH ob prisotnosti 1 % humanega seruma kot virom komplementa.	44
Slika 24: Relativna metabolna aktivnost celic Ramos po 48-urni inkubaciji z rituksimabom in L-902,688.	45
Slika 25: Relativna metabolna aktivnost celic Ramos po 48-urni inkubaciji z ofatumumabom in L-902,688.	46
Slika 26: Relativna metabolna aktivnost celic Ramos po 48-urni inkubaciji z L-902,688 in obinutuzumabom.	47
Slika 27: Relativna metabolna aktivnost celic MEC1 po tretiranju z PgE1-OH in L-902,688.	48
Slika 28: Relativna metabolna aktivnost celic MEC1 po 48-urni inkubaciji s PgE1-OH in rituksimabom.	49
Slika 29: Relativna metabolna aktivnost celic MEC1 po 48-urni inkubaciji s PgE1-OH in ofatumumabom.	50
Slika 30: Relativna metabolna aktivnost celic MEC1 po 48-urni inkubaciji s PgE1-OH in obinutuzumabom.	51
Slika 31: Relativna metabolna aktivnost celic MEC1 po 48-urni inkubaciji z L-902,688 in rituksimabom.	53
Slika 32: Relativna metabolna aktivnost celic MEC1 po 48-urni inkubaciji z L-902,688 in ofatumumabom.	54
Slika 33: Relativna metabolna aktivnost celic MEC1 po 48-urni inkubaciji z obinutuzumabom in L-902,688.	55

Slika 34: Ekspresija celičnega označevalca CD20 na celicah Ramos po tretiranju z agonisti receptorja EP4.....	57
Slika 35: Ekspresija CD20 na celicah MEC1 po tretiranju z agonisti receptorja EP4.	58

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Kriteriji za določevanje stadija bolezni po Binetu pri bolnikih s KLL.	
Povzeto po (14, 15).....	3
Preglednica II: Smernice prvega zdravljenja bolnikov s KLL. Povzeto po (12).....	4
Preglednica III: Povzetek glavnih značilnosti terapevtskih monoklonskih protiteles po skupinah. Povzeto po (25).	6
Preglednica IV: Kemikalije	18
Preglednica V: Kompleti za analize	18
Preglednica VI: Protitelesa in fluorescenčna barvila.....	19
Preglednica VII: Gojišča in sestava.....	19
Preglednica VIII: Laboratorijska oprema	20
Preglednica IX: Pomen vrednosti kombinacijskega indeksa.....	42
Preglednica X: Kombinacijski indeks za ofatumumab in PgE1-OH na celični liniji MEC1	50
Preglednica XI: Kombinacijski indeksi za obinutuzumab in PgE1-OH na celični liniji MEC1.	52
Preglednica XII: Kombinacijski indeks za L-902,688 in obinutuzumab na celični liniji MEC1.	55
Preglednica XIII: Povzetek sinergističnih učinkov na celičnih linijah Ramos in MEC1....	56

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Formula za izračun števila celic	22
--	----

POVZETEK

Odkritje monoklonskih protiteles je pomenilo znatno izboljšanje kliničnih izidov pri zdravljenju B-celičnih limfomov in levkemij. Zaradi heterogenosti poteka bolezni in različnih odzivov posameznikov na terapijo pa predstavlja izziv iskanje novih terapevtskih pristopov, s katerimi bi lahko premostili pojav rezistenc in neodzivnosti na zdravljenje.

V magistrski nalogi smo vrednotili sinergistične učinke terapevtskih monoklonskih protiteles z agonisti receptorja EP4 pri B-celičnih limfomih in levkemijah. S tem namenom smo najprej ovrednotili citotoksičnost monoklonskih protiteles v odvisnosti od prisotnosti komponent komplementa *in vitro*. Izbrali smo monoklonska protitelesa usmerjena proti celičnemu označevalcu CD20 (rituksimab, ofatumumab in obinutuzumab) in CD52 (alemtuzumab), ki se uporabljajo v terapiji B-celičnih obolenj. Učinek monoklonskih protiteles smo testirali na celični liniji Burkittovega limfoma Ramos ter na celični liniji kronične limfocitne levkemije MEC1. Metabolno aktivnost celic smo ugotavljali s testom MTS. Potrdili smo, da je pri monoklonskih protitelesih skupine I (rituksimab, ofatumumab) glavna pot delovanja s komplementom posredovana citotoksičnost, medtem ko citotoksični učinki obinutuzumaba, ki spada v skupino II, niso odvisni od razpoložljivosti komponent komplementa.

V predhodnih študijah so ugotovili, da aktivacija prostaglandinskega receptorja EP4, ki se nahaja na limfocitih B, inhibira NF- κ B signalno pot, kar vodi v apoptozo malignih limfocitov B. Preko inhibicije NF- κ B inducirajo apoptozo tudi anti-CD20 monoklonska protitelesa zato smo želeli ugotoviti, ali skupaj delujejo sinergistično. Uporabili smo agonista receptorja EP4 PgE1-OH in L-902,688 ter monoklonska protitelesa rituksimab, ofatumumab in obinutuzumab. Primerjali smo citotoksične učinke agonista receptorja EP4, monoklonskega protitelesa in njune kombinacije na celičnih linijah Ramos in MEC1. Na celični liniji Ramos smo ugotovili sinergistično delovanje rituksimaba in ofatumumaba v kombinaciji s spojino L-902,688. Za oba so v predhodnih študijah že potrdili sinergistične učinke s PgE1-OH. Obinutuzumab je izkazal močne sinergistične učinke z obema agonistoma receptorja EP4 na celični liniji MEC1. Sinergistične učinke smo potrdili tudi s programom CompuSyn. S pretočno citometrijo smo pokazali, da PgE1-OH in L-902,688 ne modulirata ekspresije celičnega označevalca CD20.

Z našo raziskavo smo *in vitro* pokazali, da bi lahko bila kombinacija agonistov receptorja EP4 in monoklonskih protiteles usmerjenih proti CD20 potencialni nov terapevtski pristop pri zdravljenju B-celičnih levkemij in limfomov.

Ključne besede: kronična limfocitna levkemija (KLL), anti-CD20 monoklonska protitelesa, rituksimab, ofatumumab, obinutuzumab, receptor EP4, PgE1-OH, L-902,688, sinergizem

ABSTRACT

Monoclonal antibodies dramatically improved treatment strategies of B-cell malignancies through past few years. However, B-cell lymphoma and leukaemia are very heterogeneous diseases and treatment outcomes are unpredictable due to resistance and non-responsiveness to current treatment options. Thus, there is persistent need to search for new treatment options.

In my master thesis I evaluated synergistic effect of therapeutic monoclonal antibodies and EP4 receptor agonists *in vitro*. First, I evaluated cytotoxicity of monoclonal antibodies under limited availability of complement *in vitro*. We tested monoclonal antibodies that are commonly used in treatment for B-cell malignancies, namely, anti-CD20 (rituximab, ofatumumab, obinutuzumab) and anti-CD52 (alemtuzumab). Experiments were carried on Burkitt lymphoma cell line Ramos and chronic lymphocytic leukemia cell line MEC1. Cell viability was evaluated by MTS metabolic activity assay. We demonstrated that the key mechanism of action of type I monoclonal antibodies is complement dependent cytotoxicity, while efficacy of type II monoclonal antibody, obinutuzumab did not depend on complement level.

Previous studies demonstrated that activation of prostaglandin receptor EP4, which is located on surface of B lymphocytes, inhibits NF- κ B signal pathway and leads to apoptosis of malignant B lymphocytes. Anti-CD20 monoclonal antibodies also inhibits NF- κ B pathway, thus we hypothesised that EP4 agonists and anti-CD20 monoclonal antibodies may act synergistically. Synergistic effects of monoclonal antibodies rituximab, ofatumumab and obinutuzumab and EP4 agonists, PGE1-OH and L-902,688 were investigated *in vitro*. Cytotoxicity of monoclonal antibody, EP4 agonist and combination of both was compared on cell lines Ramos and MEC1. We observed strong synergistic effects of ofatumumab and rituximab in combination with L-902,688 on cell line Ramos. Both monoclonal antibodies have already shown synergistic effects with PGE1-OH in previous studies. Obinutuzumab acted synergistically with PGE1-OH and L-902,688 on cell line MEC1. Synergistic effects were confirmed with program CompuSyn, which evaluates synergistic effect by calculating combination index of multiple drugs. We have also shown by using flow cytometry that EP4 agonists, PGE1-OH and L-902,688 do not modulate CD20 expression. Thus, they do not impact cytotoxicity of monoclonal antibodies.

In my master thesis I demonstrated that combination of EP4 receptor agonists and monoclonal antibodies against surface antigen CD20 could be a potential therapeutic approach for the treatment of B-cell lymphoma and leukaemia.

Keywords: chronic lymphocytic leukaemia (CLL), anti-CD20 monoclonal antibody, rituximab, ofatumumab, obinutuzumab, EP4 receptor, PgE1-OH, L-902,688, synergy

SEZNAM OKRAJŠAV

ADCC	s protitelesi posredovana citotoksičnost (<i>ang. Antibody dependent cell cytotoxicity</i>)
CDC	s komplementom posredovana citotoksičnost (<i>ang. Complement dependent cytotoxicity</i>)
CD	celični označevalec (<i>ang. cluster of differentiation</i>)
CD20+	celica, pozitivna na CD20+
CD52+	celica, pozitivna na CD52+
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EC₅₀	srednja efektivna koncentracija
EP4	prostaglandinski receptor EP4 (<i>angl. Prostaglandin E2 receptor, type 4</i>)
FACS	pretočna citometrija (<i>ang. fluorescence activated cell sorting</i>)
FBS	fetalni goveji serum (<i>ang. Fetal bovine serum</i>)
FDA	Zvezna agencija za hrano in zdravila (<i>ang. Food and Drug Administration</i>)
Ki	konstanta inhibicije
KI	kombinacijski indeks
KLL	kronična limfocitna levkemija (<i>ang. chronic lymphocytic leukemia</i>)
L-902,688	selektivni agonist receptorja EP4
LAF	laminarni pretok zraka (<i>ang. laminar air flow</i>)
MAC	kompleks, ki napade celico (<i>ang. membrane attack complex</i>)
MTS	3-(-4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
PBS	fosfatni pufer z NaCl (<i>ang. Phosphate buffered saline</i>)

PgE1-OH	prostaglandin E1 alkohol
PGE2	prostaglandin E2
ROS	reaktivne kisikove spojine
RPMI	vrsta medija (<i>ang. Roswell Park Memorial Institute</i>)
T	temperatura
UV	ultravijolična svetloba

1 UVOD

1.1 Limfomi in levkemije

Levkemije in limfomi so krvni raki, ki prizadenejo celice limfatičnega izvora. Za levkemije je značilna klonska proliferacija limfocitov v kostnem mozgu. Levkemije delimo glede na izvor celic na B-celične, T-celične in mieloične (1). Limfomi so heterogena skupina novotvorb, ki nastanejo zaradi nenadzorovanega razraščanja limfocitov T, limfocitov B ali celic ubijalk (NK) v primarnih ali sekundarnih limfatičnih tkivih (2, 3).

1.1.1 Burkittov limfom

Burkittov limfom je zelo agresiven B-celični limfom in najhitreje rastoči humani tumor. Za Burkittov limfom je značilna kromosomska translokacija gena, ki aktivira onkogen c-MYC ter povišana ekspresija BCL-2. Pojavlja se tudi mutacija transkripcijskega dejavnika TCF-2, ki igra pomembno vlogo pri diferenciaciji limfocitov B (4). Povečano tveganje za razvoj bolezni predstavljajo okužbe z Epstein-Barr virusom, malarija in okužbe z virusom HIV. Posledično se Burkittov limfom pojavlja najpogosteje v Afriki, Braziliji in Papuanski Novi Gvineji. Zbolijo najpogosteje otroci, mediana starosti, pri kateri je odkrita bolezen, je 8 let (5). Bolezen je diagnosticirana štirikrat pogosteje pri fantih kot pri deklicah (5, 6).

Zdravljenje Burkittovega limfoma je odvisno od razširjenosti bolezni. Če je bolezen lokalizirana, se jo najprej zdravi operativno in nato s kemoterapijo. Za zdravljenje Burkittovega limfoma, ki zajema več bezgavk, se uporabljajo visoke doze kemoterapije (ciklofosfamid, vinkristin, doksorubicin, kortikosteroid) in metotreksata. Število ciklov je določeno glede na agresivnost in razširjenost bolezni. Če po drugem ciklusu ni dosežen popoln odgovor, kar pomeni remisijo brez znakov bolezni, vključijo v shemo zdravljenja rituksimab. Kadar odgovor ni dosežen niti po 4. ciklusu, sledi terapija R-DA-EPOCH, ki vključuje rituksimab, etopozid, vinkristin, doksorubicin, ciklofosfamid in kortikosteroid. V razvitih državah s takšno terapijo dobro obvladujejo bolezen. V primeru ponovitve bolezni je prognoza sicer slabša, saj že pri prvem zdravljenju uporabijo agresivno kemoterapijo. V državah v razvoju so rezultati zdravljenja slabši. Bolezen je mnogokrat odkrita prepozno, bolniki zdravljenja ne zaključijo zaradi previsokih stroškov ali umrejo zaradi stranskih učinkov, saj ni zadostne zdravstvene oskrbe med zdravljenjem (6).

1.1.2 Kronična limfocitna levkemija

Kronična limfocitna levkemija (KLL) je najpogostejša levkemija v zahodnem svetu (7). Prizadene večinoma starejšo populacijo. Mediana starosti ob diagnozi je 72 let. Pojavlja se dvakrat pogosteje pri moških kot pri ženskah (8). Za KLL je značilen razrast CD5+ limfocitov B v krvi, kostnem mozgu, bezgavkah in vranici. Bolezen je pogosto asimptomatska in jo odkrijejo naključno pri krvnih preiskavah, najbolj očiten simptom pa je povečanje bezgavk. Študije kažejo, da imajo svojci bolnikov s KLL 2 do 7 – krat večje tveganje za pojav bolezni. V ogroženo skupino spadajo tudi bolniki okuženi z virusom hepatitisa C ali z virusom HIV, saj je incidenca bolezni pri njih signifikantno višja. Ugotovili so tudi povečano tveganje za razvoj bolezni pri osebah izpostavljenih herbicidu »Agent Orange«, niso pa bile ugotovljene povezave z izpostavljenostjo ionizirajočemu sevanju (9). Iniciator KLL so običajno kromosomske strukturne mutacije:

- **Delecija 13q14** se pojavlja v 55 % primerov KLL. Odkrili so, da sta v tem segmentu DNA locirani miRNA 15a in 16-1, ki sta ključnega pomena za patogenezo levkemije. Delecija napoveduje dobro prognozo, mediana preživetja je 111 do 133 mesecev (8,10).
- **Delecija 11q** se pojavlja v 10 % primerov KLL. Segment vsebuje gen Ataxia-telangiectasia mutated ATM, ki kodira kinazo odgovorno za odziv na poškodbe DNA. Delecija običajno povzroči hiter razvoj bolezni in zmanjša preživetje, mediana preživetja je 79 mesecev (8, 10).
- **Trisomija 12** se pojavlja v 10 – 20 % primerov KLL, vendar njen pomen še ni povsem pojasnjen. Mediana preživetja pri bolnikih s to mutacijo je 5 let (8, 11).
- **Delecija 17p** se pojavlja v 5 – 8 % primerov KLL. Vsebuje segment 17p13, kjer je lociran gen TP53, pomemben tumor supresorski gen. Bolniki s to delecijo so rezistentni na kemoterapijo, česar ne izboljša niti dodatek anti-CD20 monoklonskih protiteles. Zato takšna mutacija pomeni zelo slabo prognozo za bolnika, mediana preživetja je 32 mesecev (8, 10, 12, 13).

1.1.3 Strategije zdravljenja KLL

KLL je heterogena bolezen, zato zdravljenje ni enolično določeno. Odvisno je od stadija bolezni, simptomov, fizičnega stanja bolnika in genetskega ozadja (Preglednica II).

Za določevanje razširjenosti bolezni se uporabljata dva sistema in sicer petstopenjski sistem po Raiju in tristopenjski sistem po Binetu. Oba sistema temeljita na laboratorijskih preiskavah ter kliničnem pregledu bolnika. V Evropi se uporablja sistem po Binetu (Preglednica I), ki bolnike uvrsti v eno od treh skupin A, B, C; na podlagi česar se določi zdravljenje.

Preglednica I: Kriteriji za določevanje stadija bolezni po Binetu pri bolnikih s KLL. Povzeto po (14, 15)

Stadij	Kriterij
A	• Anemija ni prisotna • Trombocitopenija ni prisotna • Prizadeta so manj kot tri področja limfatičnega tkiva
B	• Anemija ni prisotna • Trombocitopenija ni prisotna • Prizadeta so 3 ali več področij limfatičnega tkiva
C	• Prisotna anemija (hemoglobin < 10 g/dl) in/ali • Prisotna trombocitopenija (trombocitov < 100.000/mm³) • Število prizadetih področij ni pomembno

Terapija cilja različne tarče, pri čemer se uporablja:

- Citostatike – klorambucil, fludarabin in bendamustin
- Monoklonska protitelesa usmerjena proti CD20 (rituksimab, ofatumumab, obinutuzumab) in CD52 (alemtuzumab)
- Učinkovine, ki delujejo na signaliziranje B-celičnega receptorja (BCR) – inhibitor fosfatidilinozitol 3-kinaze idelalisib in inhibitor Brutonove tirozin kinaze ibrutinib
- Antagonista anti-apoptotičnega proteina BCL-2 – venetoklaks
- Imunomodulatorno učinkovino – lenalidomid, ki se uporablja pri zdravljenju relapsov KLL (12).

Preglednica II: Smernice prvega zdravljenja bolnikov s KLL. Povzeto po (12)

Stadij bolezni (Binet)	Fizično stanje bolnika	Del(17p)	Terapija
A in B	Dobra splošna kondicija	DA ali NE	Zdravljenje ni indicirano. Spremljanje bolnika.
C	Dobra splošna kondicija, mlajši od 65 let	NE	R-FC ali BR (starejši od 65 let v dobri splošni kondiciji)
		DA	ibrutinib ali idelalisib + rituksimab ali alogenična PKMC
	Starejši od 65 let, slabša splošna kondicija	NE	Rituksimab ali ofatumumab ali obinutuzumab + klorambucil ali ibrutinib
		DA	Ibrutinib, alemtuzumab, visoke doze rituksimaba ali ofatumumaba

Del(17p) = delecija 17p; R-FC = kombinacija rituksimab, fludarabin, klorambucil; BR = bendamustim, rituksimab; PKMC = presaditev krvotvornih matičnih celic

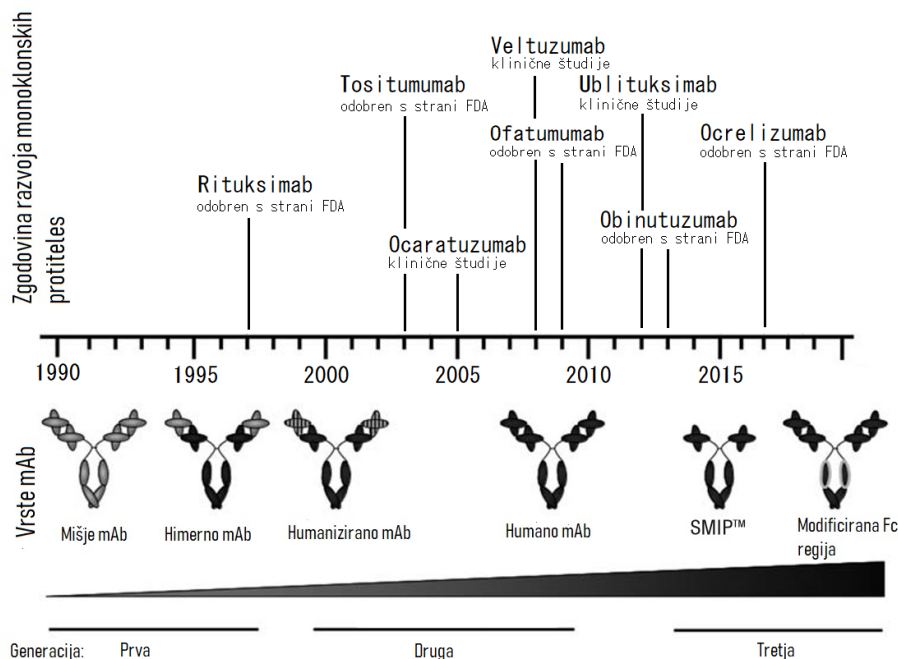
Bolezen se pogosto ponovi v prvih dveh letih po zaključenem zdravljenju. Zdravljenje ponovitve običajno zajema agresivnejšo terapijo, ki zajema eno od možnosti: idelalisib + rituksimab ali ibrutinib; venetoklas, kombinacijo ibrutiniba ali venetoklaksa z anti-CD20 monoklonskimi protitelesi (12). Po najnovejših evropskih smernicah je alemtuzumab predlagan le še za bolnike z delecijo 17p, zaradi slabe odzivnosti na fludarabin, vendar se vseeno rajši odločijo za zdravljenje z ibrutinubom, lenalidomidom, venetoklaksom in anti-CD20 monoklonskimi protitelesi (16). Za bolnike s KLL v dobri splošni kondiciji predstavlja možnost zdravljenja tudi alogenična presaditev krvotvornih matičnih celic, ki pa je tvegan postopek (12).

1.2 Monoklonska protitelesa usmerjena proti celičnemu označevalcu CD20

Celični označevalec CD20 je neglikozilirani protein z molekulsko maso okoli 35 kDa, ki se nahaja na celični membrani B-limfocitov. Na površini celice so molekule organizirane v dimere in tetramere (17). Njegova naloga je regulacija procesov inicializacije in diferenciacije celičnega cikla. Pojavlja se na 90 % B-limfocitov. Izražajo ga pre-B limfociti, zreli B-limfociti, aktivirani limfociti in spominske celice, ne pojavlja pa se na plazmatkah ali v drugem tkivu. Tako predstavlja dobro tarčo za zdravljenje limfomov in levkemij (18–20).

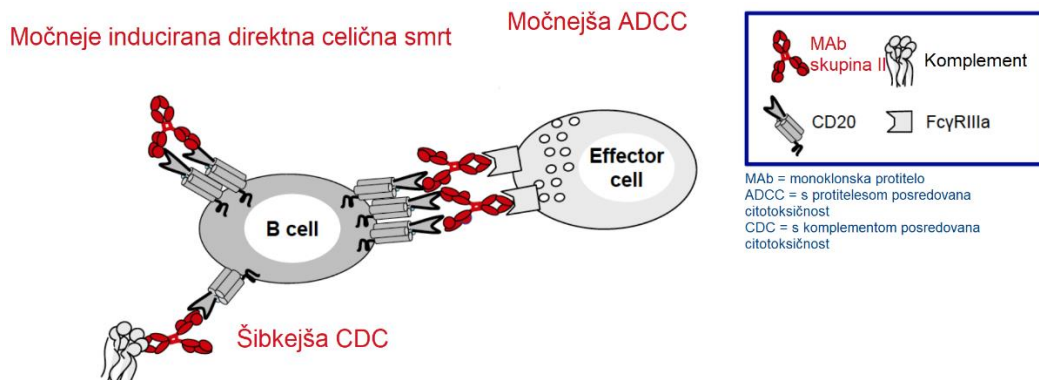
Prvo monoklonsko protitelo usmerjeno proti celičnemu označevalcu CD20, ki še vedno ostaja zlati standard, je bil rituksimab. Gre za himerno monoklonsko protitelo in spada v prvo generacijo razvoja monoklonskih protiteles. V drugo generacijo spadajo humanizirana

in humana monoklonska protitelesa, ki še nimajo spremenjene Fc regije (ofatumumab, veltuzumab, ocrelizumab). V tretji generaciji razvoja so humana monoklonska protitelesa, ki imajo modificirano Fc regijo in s tem boljšo afiniteto do FcγRIIIa receptorja (Slika 1) (21).



Slika 1: Razvoj monoklonskih protiteles usmerjenih proti celičnem označevalcu CD20. Prirejeno po (22, 23).

Glede na mehanizem delovanja delimo anti-CD20 monoklonska protitelesa v skupini I in II (Preglednica III). Večina do sedaj razvitih monoklonskih protiteles usmerjenih proti CD20 spada v skupino I (rituksimab, ofatumumab, veltuzumab, ocaratuzumab). Za njih je značilno, da inducirajo močnejšo s komplementom posredovano citotoksičnost (CDC) in s protitelesom posredovano citotoksičnost (ADCC) ter v manjši meri inducirajo apoptozo v primerjavi z monoklonskimi protitelesi skupine II (Slika 2).



Slika 2: Primerjava citotoksičnih učinkov posredovanih z monoklonskimi protitelesi skupine II s skupino I. Prirejeno po (24).

Preglednica III: Povzetek glavnih značilnosti terapevtskih monoklonskih protiteles po skupinah. Povzeto po (25).

	Skupina I (rituksimab, ofatumumab)	Skupina II (obinutuzumab)
Modificirana Fc regija	Ne	Da
Glikozilacija	Ne	Da
ADCC	↑↑	↑↑
CDC	↑↑↑	-
Programirana celična smrt	↑	↑↑↑

1.2.1 Rituksimab

Rituksimab je himerno monoklonsko protitelo usmerjeno proti celičnemu označevalcu CD20. Po mehanizmu delovanja spada v skupino I. Citotoksične učinke posreduje preko CDC, ADCC in indukcije programirane celične smrti (26).

Rituksimab je bil odobren pod imenom Rituxan® v Ameriki leta 1997, v Evropi pa leta 1998 pod imenom MabThera®. Indiciran je za zdravljenje limfomov, KLL in v kombinaciji z metotreksatom za zdravljenje bolnikov z revmatoidnim artritisom (19, 26, 27). Klinične študije kažejo, da dodatek rituksimaba k shemi fludarabin, ciklofosamid (FC) izboljša izide zdravljenja. Hallek in sodelavci so v klinični študiji CLL8, v kateri je sodelovalo 817 prej nezdravljenih bolnikov v dobri splošni kondiciji, ugotovili, da je ob dodatku rituksimaba popolno remisijo doseglo 44 % bolnikov, v primerjavi s shemo FC, kjer je doseglo popolno remisijo 22 % bolnikov (28). V klinični študiji REACH, v kateri je sodelovalo 552 bolnikov, ki se jim je bolezen ponovila, je bila popolna remisija z FCR dosežena v 24,3 % primerov, v primerjavi z 13,0 % ob uporabi sheme FC (28). Rituksimab je razmeroma varno zdravilo, njegov glavni stranski učinek pa je infuzijska reakcija. Povečana je tudi možnost bakterijskih in virusnih infekcij, še posebno reaktivacija hepatitisa B, poleg tega se pojavlja še neutropenija (28–30).

Rezistenca na rituksimab

Kljub pomembnim dosežkom rituksimaba pri zdravljenju levkemij in limfomov, veliko bolnikov postane rezistentnih ali pa niso odzivni na monoterapijo. Eden izmed razlogov za neodzivnost na zdravljenje je polimorfizem posameznega nukleotida v genu, ki kodira FcγRIIIa receptor. Posledica tega je zmanjšana afiniteta Fc receptorja za rituksimab, kar se

kaže v zmanjšani ADCC (21). Manj učinkovita ADCC je lahko tudi posledica vezave komponente komplementa C1q na Fc regijo monoklonskega protitelesa, zaradi česar z njim ne morejo interagirati efektorske celice (29).

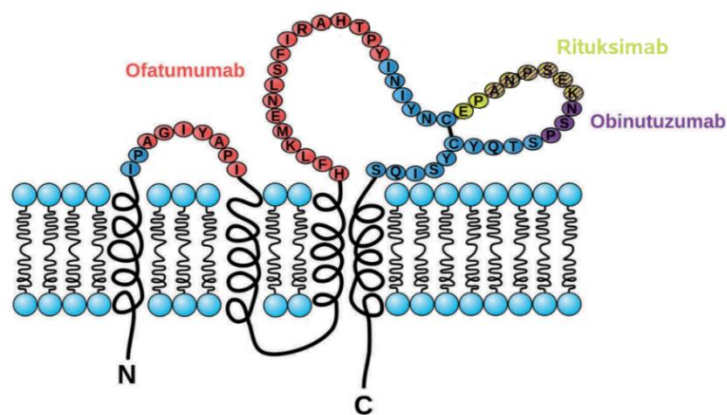
Citotoksični učinki rituksimaba posredovani preko CDC so odvisni od ekspresije CD20, zato nizka ekspresija CD20 pomeni tudi slabši odziv na zdravljenje. Študije kažejo, da se ekspresija CD20 zniža po dolgotrajni izpostavljenosti celic rituksimabu (31). Drugi mehanizem znižanja ekspresije CD20 je znan pod izrazom »*shaving*«. Gre za pojav, pri katerem efektorske celice prepoznajo kompleks rituksimab-CD20 in namesto, da bi celice ubijalke (NK, *ang. natural killer cells*) inducirale ADCC, monociti odstranijo kompleks (21, 31, 32). Na razvoj rezistence na rituksimab vpliva tudi koncentracija komplementa inhibitornih proteinov CD55 in CD59. Povečana koncentracija le-teh pomeni manjšo indukcijo CDC. Prav tako lahko manjšo odzivnost na terapijo na račun CDC pričakujemo pri bolnikih, ki imajo izčrpane komponente komplementa zaradi dolgotrajne izpostavljenosti terapiji z monoklonskimi protitelesi (29, 32).

Študije kažejo, da večkratna izpostavljenost rituksimabu povzroči znižano ekspresijo proapoptotičnih proteinov BAX in BAK, kar se odraža v rezistenci na apoptozo povzročeno z rituksimabom (33).

1.2.2 Ofatumumab

Ofatumumab je popolnoma humanizirano monoklonsko protitelo in spada v skupino I monoklonskih protiteles usmerjenih proti celičnem označevalcu CD20. Veže se na specifičen epitop, ki zajema veliko in malo ekstracelularno zanko CD20, na aminokislinske ostanke 159, 163 in 166. Ta epitop se nahaja bližje celični membrani od tistega, na katerega se veže rituksimab, kar se kaže v učinkovitejši CDC v primerjavi z rituksimabom (Slika 3). Ofatumumab se je izkazal za učinkovitega tudi pri celicah, ki so bile rezistentne na rituksimab (21).

FDA je ofatumumab pod imenom Arzerra odobrila leta 2009, EMA pa leta 2010 (34, 35). Indiciran je v kombinaciji s klorambucilom ali bendamustinom za začetno zdravljenje bolnikov s KLL, ki se ne morejo zdraviti z fludarabinom; za zdravljenje bolnikov s KLL, ki niso odzivni na zdravljenje z fludarabinom in alemtuzumabom ter za zdravljenje bolnikov z relapsom KLL (v kombinaciji s fludarabinom in ciklofosfamidom) (36).



Slika 3: Vezavna mesta anti CD20 monoklonskih protiteles. Povzeto po (37).

Slika predstavlja vezavna mesta treh izbranih monoklonskih protiteles usmerjenih proti CD20. Z rdečo je označeno vezavno mesto za ofatumumab, z rumeno za rituksimab, z vijolično pa za obinutuzumab. Vidimo, da se vezavni mesti za rituksimab in obinutuzumab deloma prekrivata.

In vitro študije kažejo, da je ofatumumab učinkovit že pri nizkih koncentracijah komplementa, kar je pomembna prednost pred rituksimabom. Raziskave kažejo, da bi lahko bil ofatumumab rešitev za bolnike s pomanjkanjem proteinov komplementa ali z visokim izražanjem komplement inhibitornih proteinov (36). Klinične študije, ki bi primerjale izide zdravljenja z ofatumumabom in rituksimabom še niso bile izvedene. Opravljenih pa je že veliko kliničnih študij monoterapije ofatumumaba ter uporabe ofatumumaba v kombinaciji s citostatiki. Študija COMPLEMENT-1 je vključevala 447 bolnikov z nezdravljeno KLL, ki niso bili primerni za zdravljenje z fludarabinom. Zdravili so jih s klorambucilom ter kombinacijo klorambucila in ofatumumaba. V kombinaciji z ofatumumabom so dosegli mediano preživetja brez napredovanja bolezni 22,4 mesecev, pri zdravljenju s samim klorambucilom pa 13,1 mesec. Robak in sodelavci so naredil raziskavo na 365 bolnikih s ponovljeno KLL. Primerjali so izide zdravljenja FC (kombinacija fludarabin, ciklofosfamid) in OFC (kombinacija fludarabin, ciklofosfamid in ofatumumab). Popolno remisijo pri zdravljenju z FC so dosegli pri 7 % bolnikov, z OFC pa pri 27 % bolnikov (28).

Ofatumumab je v splošnem varno zdravilo. Tako kot pri rituksimabu se tudi pri ofatumumabu pojavlja infuzijska reakcija, ki se najpogosteje pojavi ob prvi aplikaciji zdravila, nato pa se stanje izboljša. Pojavljajo se tudi stranski učinki hematološke narave, kot so anemija, trombocitopenija in neutropenija (38).

1.2.3 Obinutuzumab

Obinutuzumab, imenovan tudi GA-101, je novejša monoklonsko protitelo usmerjeno proti CD20. Gre za popolnoma humanizirano monoklonsko protitelo, ki spada v skupino II (21).

Njegova značilnost je modificirana veriga Fc regije. Celične linije, s katerimi proizvajajo obinutuzumab, so modificirali tako, da prekomerno izražajo glikozilacijska encima GMP3 in Golgi manozidazo 2 (39). Posledica tega je zmanjšana fukozilacija Fc regije, kar izboljša afiniteto do FcγRIIIa na celicah NK (25, 40). Obinutuzumab se veže deloma na isti epitop kot rituksimab vendar v drugačni konformaciji z molekulo CD20. Posledica tega je 5 do 100-krat močnejša ADCC in močnejše inducirana programirana celična smrt, vendar pa nižja CDC v primerjavi z rituksimabom in ofatumumabom (21).

Obinutuzumab je bil odobren s strani FDA pod imenom Gazyva leta 2013, EMA pa je zdravilo Gazyvaro odobrila leta 2014 (41, 42). Sprva je bil indiciran za zdravljenje KLL v kombinaciji s klorambucilom. Kasneje so ga v kombinaciji z bendamustinom odobrili tudi za zdravljenje folikularnega limfoma pri bolnikih, ki se jim je bolezen ponovila oziroma so neodzivni na zdravljenje z rituksimabom (25). V klinični študiji CLL11, ki je obsegala 781 bolnikov z nezdravljeno KLL s pridruženimi bolezenskimi stanji, so primerjali izide zdravljenja obinutuzumaba in rituksimaba v kombinaciji s klorambucilom in zdravljenje s samim klorambucilom. Rezultati študije kažejo, da je obinutuzumab učinkovitejši pri zdravljenju KLL kot rituksimab. S kombinacijo klorambucila in obinutuzumaba so dosegli mediano preživetja brez napredovanja bolezni 26,7 mesecev, pri klorambucilu in rituksimabu 16,3 mesece, pri zdravljenju s samim klorambucilom pa 11,1 mesec (28).

Problem pri zdravljenju z obinutuzumabom predstavljajo stranski učinki. Močna infuzijska reakcija se je po prvi infuziji pojavila pogosteje kot pri rituksimabu. Tudi v kombinaciji obinutuzumaba s klorambucilom se je pojavila v 20 %, pri rituksimabu pa le v 4 % primerov. Razlog za to še ni povsem raziskan, vendar predvidevajo, da je to posledica močne aktivacije FcγR in zaradi tega sprostitve provnetnih citokinov TNFα, IL-6 in IL-8 (13, 15). Kot stranski učinki se pojavljajo tudi neutropenija, trombocitopenija, anemija in infekcije, ki pa so dobro obvladljivi in ne motijo učinkovitosti zdravljenja (17, 21, 43).

1.2.4 Ostala monoklonska protitelesa usmerjena proti CD20

Ocaratuzumab (AME-133v) je humanizirano monoklonsko protitelo z modificiranimi Fab-in Fc- regijama. Spada v tretjo generacijo razvoja monoklonskih protiteles usmerjenih proti celičnemu označevalcu CD20, po mehanizmu delovanja pa v skupino I. Izkazuje direktno celično smrt in CDC primerljivo rituksimabu, vendar pa je izrazito močnejši v indukciji ADCC. Prednost ocaratuzumaba je tudi neodvisnost od polimorfizmov FcγRIIIa receptorja. V teku so klinične študije za zdravljenje ponovljenega ali neodzivnega Ne-Hodkingovega

limfoma in KLL z ocaratuzumabom. Glede na mehanizem delovanja pričakujejo, da bi lahko dosegli željen učinek z nižjimi odmerki, kar bi lahko omogočilo tudi subkutano administracijo zdravila (21, 28).

Veltuzumab (IMMU-106) je monoklonsko protitelo druge generacije. Gre za humanizirano monoklonsko protitelo, ki spada v skupino I. Izkazuje boljšo afiniteto do FcγRIIIa receptorja, izboljšano ADCC in CDC v primerjavi z rituksimabom. Veltuzumab je fazi II kliničnega testiranja za zdravljenje imunske trombocitopenične purpure (44). Preizkušali so ga tudi v fazi I/II kliničnega preizkušanja za zdravljenje Ne-Hodkingovega limfoma in KLL (28, 45, 46).

Ublituximab (TG-1101) je himerno monoklonsko protitelo iz skupine I. Kaže močnejšo citotoksičnost posredovano s fagocitozo (ADCP) in ADCC. Trenutno je v fazi III kliničnega razvoja za zdravljenje Ne-Hodkingovega limfoma in KLL ter multiple skleroze (28, 47).

Ocrelizumab je humanizirano monoklonsko protitelo druge generacije. Spada v skupino I in zaradi modificirane Fc regije izkazuje boljšo ADCC in CDC v primerjavi z rituksimabom. Ocrelizumab je pod imenom Ocrevus® FDA odobrila marca 2017 z zdravljenje multiple skleroze (21, 48). Preizkušali so ga tudi za zdravljenje Ne-Hodkingovega limfoma.

Tositumomab je mišje monoklonsko protitelo usmerjeno proti celičnemu označevalcu CD20. Po mehanizmu delovanja spada v skupino II (21). Citotoksične učinke posreduje preko CDC, ADCC in indukcije celične smrti ter zavira celični cikel. Indukcijo celične smrti so dodatno povišali s kovalentno vezavo radioaktivnega izotopa joda na tositumomab (49). Zdravilo Bexxar (tositumomab in I¹³¹-tositumomab) je leta 2003 FDA odobrila za zdravljenje folikularnega limfoma, pri bolnikih neodzivnih na rituksimab. Leta 2014 so ga umaknili iz prodaje, saj zanj ni bilo dovolj zanimanja (50). Klinično so ga ovrednotili tudi v zdravljenju KLL v remisiji po prvem zdravljenju, z namenom izboljšati popoln odgovor zdravljenja in zmanjšati minimalno rezidualno bolezen (51).

1.2.5 Mehanizmi celične smrti posredovane z monoklonskimi protitelesi proti CD20

- ***S komplementom posredovana citotoksičnost (CDC)***

Biološke molekule, ki inducirajo CDC, najprej sprožijo nastajanje lipidnih raftov z molekulami CD20 na površini tarčne celice. To je povezano z boljšo afiniteto Fc regije monoklonskega protitelesa do komponente komplementa C1q (52, 53). Sproži

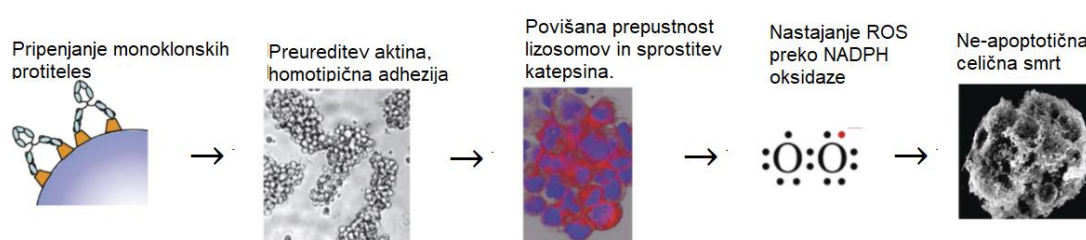
se kaskada reakcij, ki pripelje do nastanka kompleksa, ki napade celico – ang. *membrane attack complex (MAC)*. MAC nato povzroči lizo celice (Slika 5) (40).

- ***S protitelesom posredovana citotoksičnost (ADCC)***

ADCC je posledica imunskega odziva, sproženega zaradi vezave monoklonskega protitelesa na antigen. Efektorske celice, med katere sodijo celice ubijalke (NK celice) in makrofagi, se preko svojega Fc receptorja vežejo na monoklonsko protitelo vezano na limfocit B ter sprožijo lizo celice (Slika 5) (21, 32).

- ***Programirana celična smrt***

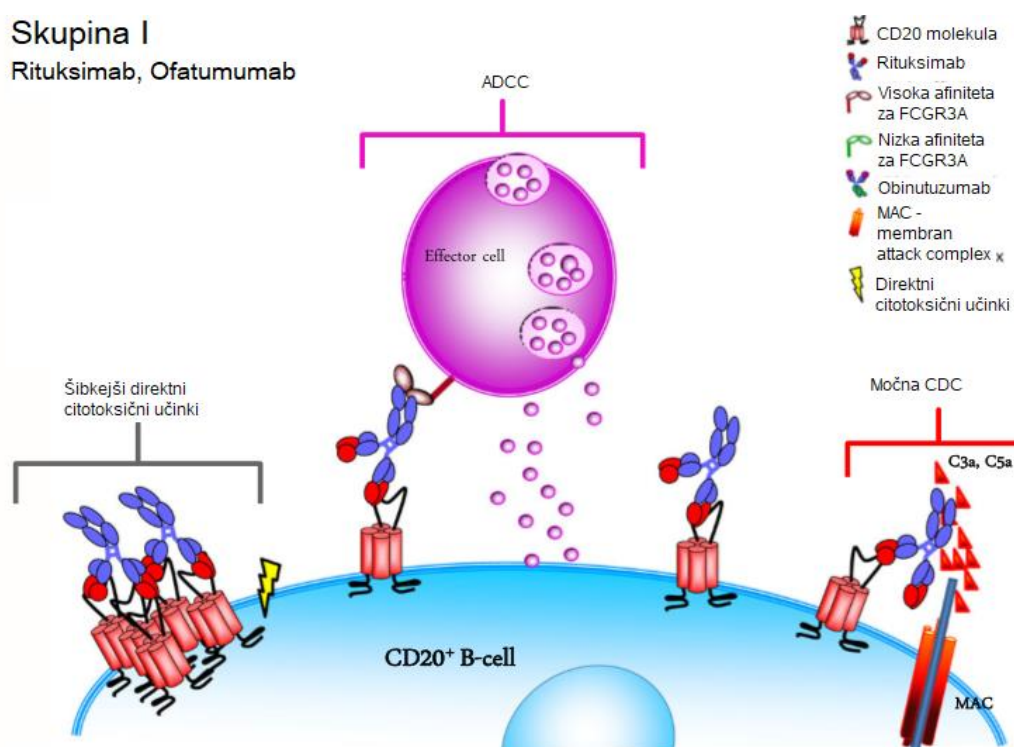
- *Apoptoza* je programirana celična smrt, ki nastane zaradi notranjih ali zunanjih poškodb celice. Zaradi notranjih poškodb v celici začne iz organelov izhajati citokrom C, ki se veže na Apaf1 (*apoptotic protease-activating factor 1*), na katerega se vežejo tudi kaspaze-9. Nastane apoptosom, ki sproži kaskado reakcij, ki vodi v apoptozo preko intrinzične poti. Za ekstrinzično pot apoptoze je odgovoren dejavnik tumorske nekroze ($\text{TNF}\alpha$), ki po vezavi na receptor aktivira kaspaze preko submembranskih domen. Za regulacijo apoptoze so odgovorni proteini družine Bcl-2 (54).
- *Ne-apoptotična programirana celična smrt* je posledica homotipične adhezije limfocitov B z monoklonskimi protitelesi skupine II (Slika 4). Zaradi preureditve aktinskega citoskeleta se spremeni permeabilnost lizosomov. Pride do sprostitve katepsina B iz lizosomov limfocitnih celic (27, 55). To sproži nastajanje reaktivnih kisikovih spojin (ROS), ki vodijo v smrt celice (55).



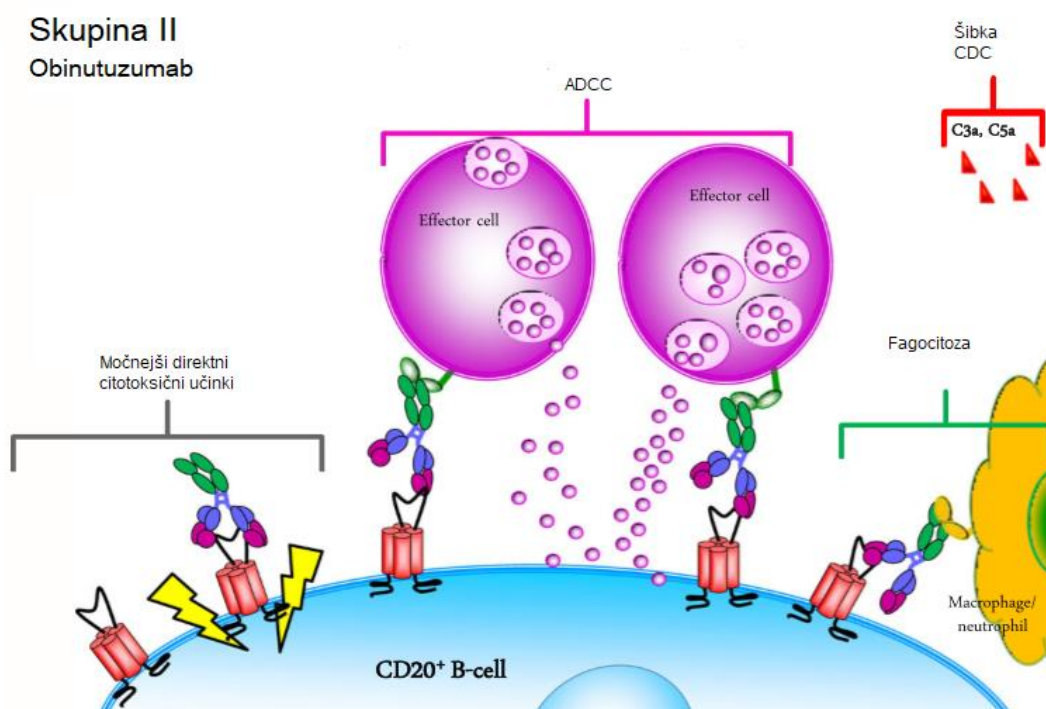
Slika 4: Shematski prikaz mehanizma programirane celične smrti povzročene z monoklonskim protitelesom skupine II. Povzeto po (55).

Skupina I

Rituksimab, Ofatumumab

**Skupina II**

Obinutuzumab



Slika 5: Mehanizmi delovanja anti-CD20 monoklonskih protiteles skupine I (rituksimab, ofatumumab) in skupine II (obinutuzumab). Povzeto po (29).

1.3 Paroksizmalna nočna hemoglobinurija

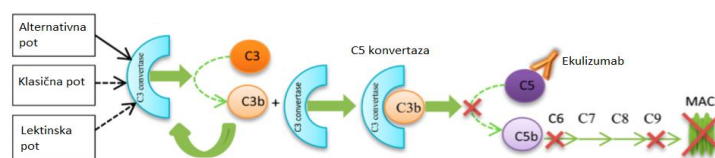
Paroksizmalna nočna hemoglobinurija je redka bolezen, ki prizadene 1–5 odraslih na milijon ljudi, pojavlja pa se v vseh starostnih obdobjih in pri obeh spolih približno enako pogosto. Bolezen spremlja odpoved kostnega mozga, hemolitična anemija in tromboze, kar je lahko

življenje ogrožajoče (56, 57). Paroksizmalna nočna hemoglobinurija nastane zaradi mutacije krvotvorne matične celice v kostnem mozgu. Mutacija povzroči pomanjkanje dveh proteinov, CD55 in CD59, kar vodi v nekontrolirano aktivacijo komplementa in posledično pripelje do hemolize (58). Zaradi tega pride do pomanjkanja normalnih krvnih celic - eritrocitov, levkocitov in trombocitov. Zaradi hemolize eritrocitov se v urinu pojavlja hemoglobin, kar bolniki opazijo kot temno obarvanje urina, ki je bolj izrazito zjutraj. Pomanjkanje eritrocitov v krvi povzroči anemijo, kar se izraža kot slabotnost, omotica, povečan srčni utrip in kratka sapa. Zaradi pomanjkanja levkocitov pa so bolniki bolj nagnjeni k infekcijam. Bolniki s paroksizmalno nočno hemoglobinurijo so v rizični skupini za razvoj levkemije (57–59).

Zdravljenje paroksizmalne nočne hemoglobinurije je odvisno od oblike bolezni. Pri subklinični obliki bolezni, ko je klonov malo in bolniki nimajo kliničnih simptomov, ki bi zahtevali zdravljenje, bolnike samo spremljajo s pregledi vsakih 6-12 mesecev. Klasična paroksizmalna nočna hemoglobinurija zahteva zdravljenje z inhibitorjem komplementa ali presaditev kostnega mozga (59).

1.3.1 Ekulizumab

Preživetje in kvaliteta življenja bolnikov s paroksizmalno nočno hemoglobinurijo se je dramatično izboljšala z odkritjem monoklonskega protitelesa ekulizumab. Gre za humanizirano monoklonsko protitelo, ki blokira aktivacijo sistema komplementa. Veže se na komponento komplementa C5 in s tem prepreči cepitev na C5a in C5b. Zaradi tega ne pride do nastanka kompleksa MAC (*ang. membrane attack complex*), kar prepreči hemolizo krvnih celic (Slika 6). MAC je kompleks sestavljen iz proteinov komplementa C5b, C6, C7, C8 in več molekul C9. Ti proteini skupaj tvorijo poro v membrani celice, ki omogoča vdor Ca^{2+} v celico, kar vodi v celično smrt (60).



Slika 6: Mehanizem delovanja ekulizumaba v kaskadi reakcij sistema komplementa. Zaradi vezave monoklonskega protitelesa na komponento komplementa C5, ne pride do nastanka MAC. Povzeto po (59).

Študije kažejo, da ekulizumab uspešno ustavlja intravaskularno hemolizo in s tem zmanjšuje potrebo po transfuziji. Zmanjšuje tudi incidenco tromboz, ki so glavni vzrok smrti bolnikov s paroksizmalno nočno hemoglobinurijo (58). Resnejši stranski učinek zdravljenja z inhibitorjem komplementa pa je lahko okužba z *Neisseria meningitidis*, zato je priporočljivo cepljenje vsaj 14 dni pred prvo dozo zdravila in spremljanje bolnikov med zdravljenjem (59).

1.4 Prostaglandinski receptor EP4 in njegov potencial v terapiji

Prostaglandin E₂ (PGE₂) je metabolit arahidonske kisline in mediator številnih fizioloških in patoloških procesov v telesu. Pomembno vlogo ima pri vnetju, angiogenezi, nastanku vročine, vazodilataciji in nenazadnje pri nastanku in napredovanju tumorjev. Eden izmed štirih z G- proteinom sklopljenih receptorjev preko katerih PGE₂ posreduje svoje učinke je receptor EP4. Pojavlja se na celicah gastrointestinalnega trakta, maternice, kosteh in krvotvornih organih (61). Aktivacija receptorja aktivira adenilat ciklazo in sproži produkcijo cAMP ter inhibira NF-κB signalno pot.

Zaradi pomembne vloge in razširjenosti receptorja EP4 imajo agonisti in antagonisti receptorja EP4 velik potencial pri zdravljenju številnih patoloških stanj.

Ulcerozni kolitis

Aktivacija prostaglandinskega receptorja EP4 ima protivnetne učinke, prispeva k obnovi mukoze in preprečuje nastanek ulceroznega kolitisa. V kliničnih študijah so preizkušali intravensko administracijo agonista receptorja EP4 ONO-4819CD, ki je se je izkazal kot učinkovit pri bolnikih z zmernim ulceroznim kolitisom (62). *In vitro* se je učinkovit izkazal tudi novejši agonist receptorja EP4 KAG-308, katerega prednost je možnost peroralne uporabe (61, 63). KAG-308 je trenutno v fazi II kliničnih preizkušanj za zdravljenje ulceroznega kolitisa (64).

Astma in kronični bronhitis

Študije kažejo vpletenost PGE₂ v patogenezi astme. Intranasalna aplikacija PGE₂ na miškah je zavrla nastajanje provnetnih citokinov povezanih z nastankom astme. Agonist receptorja EP4, PGE1-OH, je posredoval podobne učinke kot PGE₂ (65, 66). Agonisti receptorja EP4 zaradi bronhoprotektivnih, protivnetnih in antifibrotičnih učinkov predstavljajo potencialno

strategijo zdravljenja astme in kroničnega bronhitisa (67). PgE1-OH, je bil vrednoten v fazi I kliničnega testiranja za terapijo astme (68).

Možganska kap

Novejše raziskave so pokazale nevroprotektivno vlogo receptorja EP4. *DeMars* in sodelavci so pokazali, da aktivacija receptorja EP4 z agonistom L-902,688 zmanjša obseg poškodbe možganov po možganski kapi, poleg tega pa nadaljnje zdravljenje z agonistom receptorja EP4 izboljša regeneracijo živčnega tkiva (69).

Kronična mieloična levkemija

Najnovejše predklinične študije kažejo potencialno uporabnost receptorja EP4 v zdravljenju kronične mieloične levkemije. Levkemične matične celice imajo sposobnost samoobnove in so odgovorne za iniciacijo ter napredovanje kronične mieloične levkemije. Ugotovili so, da aktivacija receptorja EP4 zniža aktivnost levkemičnih matičnih celic. Kot agonista receptorja EP4 so identificirali molekulo PGE1, ki je znan tudi kot alprostadil in se že uporablja v zdravljenju erektilne disfunkcije, saj povzroči vazodilatacijo. PGE1 aktivira receptor EP4 in posledično zmanjša delovanje transkripcijskega dejavnika AP-1, ki je odgovoren za diferenciacijo celic in tumorogenezo. Ugotovili so, da bi kombinacija PGE1 in tirozin-kinaznih inhibitorjev lahko predstavljala uspešno terapijo kronične mieloične levkemije. Podobne učinke je posredoval tudi agonist receptorja EP4, mizoprostol (70). Mizoprostol je analog PGE1, ki je registriran za prekinitev nosečnosti (71, 72).

Kronična limfocitna levkemija

Predhodne raziskave raziskovalne skupine prof. Mlinarič-Raščan so pokazale, da agonist receptorja EP4, PgE1-OH, uspešno inhibira proliferacijo celic KLL *in vitro*. Ugotovili so, da agonisti receptorja EP4 inducirajo apoptozo preko povišanja koncentracije cAMP in modulacije NF- κ B signalne poti. Povečana aktivnost NF- κ B je značilna za rakave celice in pripomore k njihovi pospešeni rasti, zato je inhibicija signalne poti potencialen terapevtski pristop zdravljenja B-celičnih levkemij in limfomov (73).

1.4.1 Agonista receptorja EP4

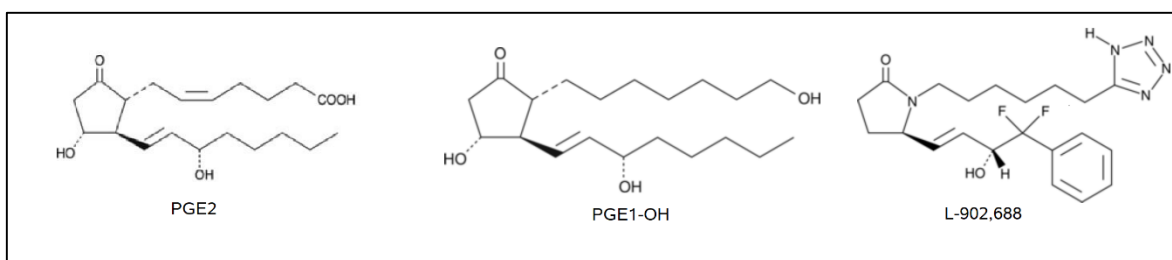
PgE1-OH

Prostaglandin E1 alkohol (PgE1-OH) je selektivni agonist receptorja EP4 (Slika 7) (68). Njegove učinke, posredovane preko receptorja EP4, so raziskovali na celičnih modelih B-

celične levkemije in limfomov. Ugotovili so, da na malignih limfocitih B inhibira anti-apoptotične signale posredovane preko NF- κ B (61). Poleg tega jih tudi senzibilizira za kemoterapevtike tako, da zniža ekspresijo genov družine BCL-2 (73).

L-902,688

L-902,688 je agonist receptorja EP4 (Slika 7). Ima 4000-krat višjo afiniteto za receptor EP4, napram ostalim EP receptorjem (74). V predhodnih raziskavah raziskovalne skupine prof. Irene Mlinarič-Raščan so ugotovili, da deluje selektivno citotoksično na celice KLL (75).



Slika 7: Strukturne formule agonistov receptorja EP4 PGE2, PGE1-OH in L-902,688 (68, 76, 77).

Na sliki so predstavljene strukturne formule endogenega liganda receptorja EP4 PGE2 ter selektivnih agonistov receptorja EP4, PGE1-OH in L-902,688. Vsi imajo ciklopentanonski obroč, razlikujejo pa se v stranskih verigah. PGE1-OH in L-902,688 se od PGE2 razlikujeta v odsotnosti dvojne vezi na α -lipofilni verigi. PGE1-OH ima namesto karboksilne skupine pripet alkohol, L-902,688 pa tetrazolno skupino, s čimer so zmanjšali oksidativno nestabilnost. L-902,688 ima spremenjeno tudi ω -lipofilno verigo (61).

2 NAMEN

V magistrski nalogi se bomo osredotočili na vrednotenje sinergističnih učinkov terapevtskih monoklonskih protiteles z agonisti receptorja EP4 pri B-celičnih levkemijah in limfomih *in vitro*.

Najprej bomo ovrednotili citotoksične učinke monoklonskih protiteles usmerjenih proti celičnemu označevalcu CD20 (rituksimab, ofatumumab, obinutuzumab) in CD52 (alemtuzumab) na celični liniji Burkittovega limfoma Ramos in celični liniji kronične limfocitne levkemije MEC1. Ugotavljali bomo odvisnost citotoksičnih učinkov monoklonskih protiteles od koncentracije prisotnega humanega seruma kot vira komplementa. Predvsem nas bo zanimal učinek novejšega monoklonskega protitelesa obinutuzumaba v primerjavi z ostalimi, ki so v terapiji že dlje časa. Živost celic bomo vrednotili s testom metabolne aktivnosti MTS. Citotoksične učinke anti-CD20 monoklonskih protiteles bomo primerjali z ekspresijo celičnega označevalca CD20, ki jo bomo določili s pretočno citometrijo.

V nadaljevanju bomo ovrednotili sinergistično delovanje terapevtskih monoklonskih protiteles z agonisti receptorja EP4 PgE1-OH in L-902,688 na celičnih linijah Ramos in MEC1. Primerjali bomo citotoksične učinke agonista EP4, monoklonskega protitelesa ter njune kombinacije. Potencialno sinergistično delovanje bomo ovrednotili tudi s programom CompuSyn. Primerjali bomo rezultate pridobljene na obeh celičnih linijah med seboj ter ovrednotili potencialno terapevtsko vrednost kombinacije v terapiji B-celičnih obolenj. S pretočno citometrijo bomo ugotavljali tudi ekspresijo označevalca CD20 na celicah Ramos in MEC1 po tretiranju z necitotoksičnimi koncentracijami PgE1-OH in L-902,688. Ovrednotili bomo vpliv agonistov receptorja EP4 na modulacijo ekspresije celičnega označevalca CD20 na površini limfocitov B in posledično na citotoksične učinke posredovane preko monoklonskih protiteles usmerjenih proti CD20.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije

Preglednica IV: Kemikalije

Kemikalija	Proizvajalec
2-merkaptetoetanol	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
Alemtuzumab 30 mg/ml	Clinigen Group plc, Staffordshire
Arzerra 1000 mg/ 50ml	Novartis, Švica
DMSO	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
Etilni alkohol 96 %	ECP, d.o.o. Trzin, Slovenija
Fetalni goveji serum (FBS)	Gibco, ZDA
Ficoll-Paque™ plus REAGENT	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Švedska
Gazyva 1000 mg/40 ml	Roche, Švica
Goveji serumski albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
Humani serum	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
L-902,688	Cayman Chemical, MI, ZDA
L-glutamin	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
MabThera 500 mg/50 ml	Roche, Švica
Penicilin, streptomycin	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
Prostaglandin E1 alkohol (PgE1-OH)	Cayman Chemical, MI, ZDA
Raztopina triptanskega modrila	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
RPMI 1640 medij	Sigma-Aldrich, MO, ZDA

3.1.2 Kompleti za analize

Preglednica V: Kompleti za analize

Komplet	Proizvajalec
Cell titer 96® Aqueous One Solution cell proliferation assay (MTS Reagent)	Promega, Madison, WI, ZDA

3.1.3 Pufri in raztopine

Pufri in raztopine	Sestava
10-kratni PBS s pH 7,4	• 80 g NaCl • 2 g KCl • 36,3 g Na₂HPO₄×12 H₂O • 2,4 KH₂PO₄ • Ultračista H₂O, dopolnimo do 1,0 L <i>Natehtali smo sestavine, jih razopili v vodi, uravnavali pH in avtoklavirali.</i>
1-kratni PBS (delovni fosfatni pufer)	10-kratni PBS smo redčili 1:10 z ultračisto vodo in avtoklavirali.
4 % raztopina formaldehida	• 40 ml 10 % formaldehida • 60 ml ultračiste H₂O
3 % raztopina BSA v PBS	• 100 ml PBS • 3 g BSA
0,5 % raztopina Tritona	• 250 µL Tritona-X 10 • 50 ml PBS

3.1.4 Protitelesa in fluorescenčna barvila

Preglednica VI: Protitelesa in fluorescenčna barvila

Protitelesa in fluorescenčna barvila	Proizvajalec
Monoklonsko mišje protitelo proti humanemu označevalcu CD20, konjugirano s fluorokromom FITC	BD Pharmingen™, ZDA

3.1.5 Gojišča in sestava

Preglednica VII: Gojišča in sestava

Gojišče	Sestava
RPMI medij (MEC)	• 500 ml RPMI-1640 • 50 ml hdFBS • 5,5 ml antibiotika in antimikotika

	• 5,5 ml L-glutamina
RPMI medij (Ramos)	• 500 ml RPMI-1640 • 50 ml hdFBS • 5,5 ml antibiotika in antimikotika • 5,5 ml L-glutamina • 500 μl 50 mM 2-merkaptoetanol
Medija za zamrzovanje celic (MEC1, Ramos)	• 25 ml RPMI medij • 20 ml hdFBS • 5 ml DMSO

3.1.6 Laboratorijska oprema

Preglednica VIII: Laboratorijska oprema

Aparatura	Proizvajalec
Avtoklav	A-21, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
BD Microlance™ 3 igle	Becton Dickinson, S.A., Španija
BD Plastipak™ brizgalke	Becton Dickinson, S.A., Španija
Centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415 R)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Centrifugirke (15 ml in 50 ml)	TPP, Trasadingen, Švica
Centrifugirke za pretočno citometrijo (Flowtubes)	Invitrogen, ZDA
Hemocitometer	Brand Neumbauer, Nemčija
Hladilnik/zamrzovalnik	Gorenje, Velenje, Slovenija
Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Nemčija
Invertni svetlobni mikroskop (Olympus CK40)	Olympus optical Co. GmbH, Hamburg, Nemčija
Komora z laminarnim pretokom zraka	Siemens, ZDA
Krioviale	Sarstedt, Hübner, Nemčija
Krovnna stekla	Assistent, Sondheim, Nemčija
Mikrocentrifugirke (0,5 ml, 1,5 ml in 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija

Mikotitrski čitalec (Synergy™ HTX)	BioTek Instruments, Inc., VT, ZDA
Multikanalne pipete (100, 300 µl)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Nastavki za pipete (do 10, 200 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
Pipete (0,1 – 2,5 µl, 0,5 – 10 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Plastične sterilne mikrotitrne ploščice za gojenje celičnih kultur (s 6, 12, 24 ali 96 vdolbinami)	TPP, Trasadingen, Švica
Posode T-flask za gojenje celičnih kultur	TPP, Trasadingen, Švica
Pretočni citometer Attune NxT	Invitrogen, ZDA
Programska oprema CompuSyn	ComboSyn, Inc.
Programska oprema FlowJo®	FlowJo, LLC, Ashland, Oregon, ZDA
Programska oprema Gen5	BioTek Instruments, Inc., VT, ZDA
Programska oprema GraphPad Prism 5	GraphPad Software, CA, ZDA
Serološke pipete za enkratno uporabo (5, 10, 25 in 50 ml)	TPP, Trasadingen, Švica
Tehtnica	Mettler Toledo
Vodna kopel	Mikro+polo, Maribor, Slovenija
Vortex (Vortex GENIE 2)	Scientific, industries, Orlando, Florida
Zamrzovalnik (-80 °C)	Forma scientific, Midland, ON, Kanada
Zaščitne rokavice	Kimberly-Clark

3.2 Delo v celičnem laboratoriju

Rokovanje s celičnimi kulturami zahteva posebne, temu namenjene prostore, ki zagotavljajo aseptično okolje. Ob vstopu v laboratorij oblečemo haljo, ki je namenjena zgolj delu v celičnem laboratoriju in prav tako obutev. Lahko uporabimo tudi copate za enkratno uporabo. Pri delu ves čas uporabljamo zaščitne rokavice, ki jih pred in po delu razkužimo s 70 % etanolom. Za rokovanje s celičnimi linijami je v laboratoriju nameščena komora z laminarnim pretokom zraka (LAF komora) s HEPA (angl. high efficiency particle) filtrom. To zagotavlja konstanten tok filtriranega zraka in s tem odstranjuje kontaminante iz okolja in preprečuje njihov dostop v naše delovno okolje.

Pred delom v komori celotno delovno površino razkužimo s 70 % etanolom, prav tako vso opremo in material za delo, preden ga damo v komoro. Preden pričnemo z delom moramo vklopiti še UV svetilko za 20 minut. S tem zagotovimo popolno sterilnost. Nato lahko v komoro prenesemo celične kulture.

3.2.1 Odmrzovanje celic

Celične kulture smo hranili v zmrzovalniku na -80°C v kriovialah, ki so označene z imenom linije, datumom zamrzovanja in količino zamrznjenih celic. Celične linije Ramos in MEC1 smo odmrzovali hitro. Celice smo nato z 1 ml pipeto počasi prenesli v falkonko z medijem, segretim na 37°C . Suspenzijo smo centrifugirali 5 min pri 1200 rpm. Supernatant smo odpipetirali, peleto pa resuspendirali v svežem mediju.

3.2.2 Subkultiviranje celičnih linij

Celične linije smo gojili v mediju RPMI z ustreznimi dodanimi hranili v inkubatorju, kar zagotavlja optimalne pogoje za rast (5 % CO_2 , 100 % vlažnost, 37°C). Vzdrževali smo optimalno koncentracijo za rast posamezne celične linije. Celice MEC1 smo vzdrževali na koncentraciji od $3 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ celic/ml, celično linijo Ramos pa na $2 \times 10^5 - 2 \times 10^6$.

3.2.3 Štetje celic

Za redčitev celic na željeno koncentracijo smo morali celice pred redčenjem prešteti. Za štetje smo uporabili 10 μl celične suspenzije, ki smo ji dodali 10 μl triptan modrega. To prehaja membrano mrtvih in poškodovanih celic, ki jih zato obarva modro, žive pa zaradi intaktne membrane ne vsebujejo barvila. Zmes celične suspenzije in modrila smo premešali s pipetiranjem in nato nanесли 10 μl na hemocitometer. Celice smo šteli pod invertnim mikroskopom (Slika 8) v štirih vidnih poljih in nato koncentracijo izračunali po formuli (Enačba 1). Uporabili smo suspenzije celic, kjer je bil odstotek živih celic vsaj 90 %.

Enačba 1: Formula za izračun števila celic

$$\text{št. celic/ml} = \frac{A + B + C + D}{4} \times DF \times 10^4$$

A, B, C, D = število živih ali mrtvih celic v posameznem polju hemocitometra

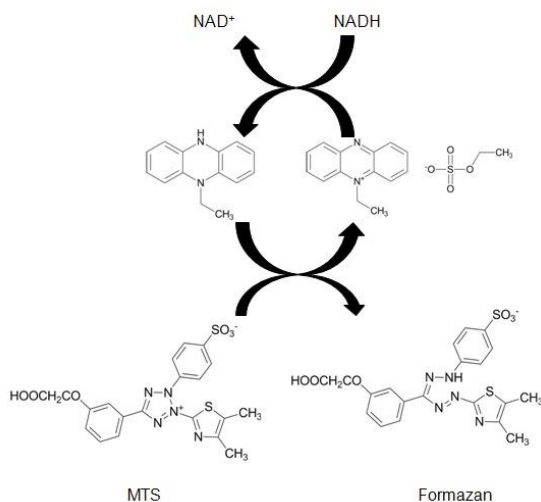
DF = faktor redčenja



Slika 8: Štetje celic s hemocitometrom pod invertnim mikroskopom. (foto: V. Rotnik)

3.3 Ugotavljanje metabolne aktivnosti celic

Za vrednotenje metabolne aktivnosti celic smo uporabili kolorimetrične metode. Za ugotavljanje metabolne aktivnosti celic celičnih linij MEC1 in Ramos smo uporabili test MTS.



Slika 9: Redukcija reagenta MTS v formazan.

Preko vmesnega akceptorja elektronov se elektron iz NADH prenese v citoplazmo, kjer reducira MTS v formazan. Redukcija da vodotopen produkt, ki povzroči temnejše obarvanje. Povzeto po (78).

MTS je 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol v obliki iona dvojčka, ki se v prisotnosti mitohondrijske reduktaze (NADPH, NADH) reducira v formazan (Slika 9). Količina nastalega produkta je sorazmerna z metabolno aktivnostjo celic. Formazan absorbira svetlobo pri 492 nm. Absorbanco merimo kolorimetrično, za kar smo mi uporabili spektrofotometer.

Sama absorbanca nam še ne da deleža metabolno aktivnih celic. Količino metabolno aktivnih celic smo izračunali tako, da smo rezultate meritev normirali na kontrolo topila (DMSO). Na celičnih linijah smo vse eksperimente izvedli v triplicatu, iz katerih smo lahko izračunali povprečje. Za vsak poskus smo naredili tri biološke ponovitve.

3.3.1 Postopek določanja metabolne aktivnosti celic na celičnih linijah RAMOS in MEC1 z monoklonskimi protitelesi in agonisti receptorja EP4

Pripravili smo presežek celične suspenzije celic Ramos oziroma MEC1 s koncentracijo $0,3 \times 10^6$ celic/ml. Suspenziji smo dodali 1 % humanega seruma. Suspenzijo smo dobro premešali s pipetiranjem in prenesli na mikrotitrsko ploščico z 12 vdolbinicami. Celice smo tretirali z različnimi koncentracijami monoklonskih teles in agonistov receptorja EP4 ter kombinacijami obeh. V vsaki mikrotitrski ploščici smo pustili tudi dve netretirani vdolbinici za kontrolo in kontrolo topila (DMSO), ter vdolbinico, kamor smo nanesti čisti medij, ki je predstavljal slepo kontrolo.

Vsako vdolbinico smo premešali s pipetiranjem in nato prenesli z multikanalno pipeto po 100 μ l alikvota v triplicatu na mikrotitrsko ploščico z 96 vdolbinicami. Za vsak eksperiment smo pripravili dve mikrotitrski ploščici, da smo lahko izmerili metabolno aktivnost celic po 24 urah in 48 urah. Ploščice smo nato inkubirali v inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂). Po 21 h in 45 h smo dodali v vsako vdolbinico 10 μ l MTS reagenta ter inkubirali 3 ure. Po treh urah smo izmerili absorbanco nastalega produkta pri 492 nm.

3.3.2 Priprava celic in postopek ugotavljanja odziva na humani serum na celičnih linijah MEC1 in RAMOS

1. Pripravili smo suspenzijo celic s koncentracijo $3,8 \times 10^5$.
2. Suspenzijo smo dobro premešali in jo prenesli v mikrotitrsko ploščico z 12 vdolbinicami.

3. Dodali smo ustrezno količino humanega seruma (0 %, 1 %, 5 % ali 20 %) ali medija, tako da smo imeli na koncu v vseh vdolbinicah koncentracijo $0,3 \times 10^6$.
4. Celice smo nato izpostavili monoklonskim protitelesom s koncentracijo 10 $\mu\text{g/ml}$. Pripravili smo tudi netretirane alikvote za vsako koncentracijo humanega seruma.
5. Celično suspenzijo v vsaki vdolbinici smo dobro premešali s pipetiranjem.
6. Z multikanalno pipeto smo prenesli po 100 μl v treh tehničnih ponovitvah na mikrotitrsko ploščico z 96 vdolbinicami.
7. Ploščice smo inkubirali na 37 °C, 5 % CO_2 in po 21-ih urah dodali reagent MTS.
8. Po 24-ih urah smo izmerili absorbanco in izračunali delež metabolno aktivnih celic pri različnih koncentracijah humanega seruma.

V primeru ugotavljanja odziva na toplotno deaktiviran humani serum je bil postopek enak, le da smo humani serum pred tem deaktivirali na 56 °C, 30 minut. Za ugotavljanje vpliva ekulizumaba na odziv na humani serum smo celice tretirali z 200 $\mu\text{g/ml}$ ekulizumaba deset minut pred dodatkom monoklonskih protiteles.

3.4 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je laserska tehnika, ki nam omogoča merjenje več parametrov celic hkrati. Ugotavljamo lahko število celic, njihovo velikost in kompleksnost. Za analizo potrebujemo celice v suspenziji, saj lahko le tako pride do hidrodinamskega fokusiranja. To pomeni, da vzorec s počasnejšim tokom prehaja v hitrejši tok nosilne tekočine. Zaradi površinske napetosti in laminarnega toka potujejo celice posamično. Pri potovanju celic skozi laserski žarek pride do razprševanja svetlobe. Dva fotodetektorja zaznata količino svetlobe, ki jo odda obsevana celica. Prvi detektor meri prednje sipanje, ki nastane zaradi stika s celično membrano in nam tako da podatke o velikosti celice. Drugi detektor zazna svetlobo, ki potuje skozi citoplazmo, kjer interagira s celičnimi organeli in se odbije pravokotno na smer laserskega žarka, kar imenujemo stransko sipanje. Stransko sipanje svetlobe torej odraža kompleksnost celic, več kot je organelov, večje bo stransko sipanje.

S pretočno citometrijo lahko ugotavljamo tudi funkcionalne lastnosti celic na podlagi specifičnih molekul, kot so celični označevalci na površini ali v notranjosti celic. Njihovo prisotnost ugotavljamo s protitelesi konjugiranimi s fluorokromi. Fluorescenčni detektorji merijo emitirano svetlobo, ki jo po vznujanju oddajo fluorokromi.

3.4.1 Priprava celic za analizo ekspresije celičnega označevalca CD20 s pretočno citometrijo

1. Pripravili smo celično suspenzijo z $0,25 \times 10^6$ celicami.
2. Celično suspenzijo smo prenesli v centrifugirke za pretočno citometrijo. Za vsak vzorec smo pripravili dva alikvota celic (označene s fluorokromi in neoznačene)
3. Celice smo centrifugirali na 1200 rpm, 5 minut.
4. Odstranili smo supernatant in pelet suspendirali v 100 μ l PBS.
5. V centrifugirke, kjer smo imeli označene celice, smo dodali 2,5 μ L monoklonskega mišjega protitelesa proti humanemu označevalcu CD20, ki je konjugirano s fluorokromom FITC.
6. Celice smo inkubirali 15 minut v temi na sobni temperaturi in nato analizirali s pretočnim citometrom.

3.5 Statistična obdelava podatkov

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili program GraphPad Prism. Podatke smo analizirali s testom ANOVA in post-hoc testom Tuckey. Statistično signifikantno: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Sinergizme monoklonskih protiteles in agonistov receptorja EP4 smo ovrednotili programom CompuSyn.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Humani serum inducira s komplementom posredovano citotoksičnost *in vitro*

Znano je, da se rezistenca na monoklonska protitelesa pogosto pojavi pri zdravljenju levkemij zaradi izčrpanja komponent komplementa. Zato nas je najprej zanimal vpliv komponent komplementa na učinkovitost izbranih monoklonskih protiteles *in vitro*. V ta namen smo uporabili monoklonska protitelesa rituksimab, ofatumumab in obinutuzumab, ki so usmerjena proti celičnemu označevalcu CD20. Uporabili smo tudi monoklonsko protitelo alemtuzumab, ki je usmerjeno proti celičnemu označevalcu CD52. Delovanje monoklonskih protiteles smo preizkušali na dveh celičnih linijah, Ramos in MEC1. Celična linija Ramos je bila pridobljena od bolnika z Burkittovim limfomom. Celice izražajo površinska označevalca CD20 in CD52. Celična linija MEC1 predstavlja model za študije kronične limfocitne levkemije (KLL) *in vitro*. Pridobljena je od bolnika s KLL v zgodnji prolimfocitni transformaciji, ki predstavlja napredovanje bolezni v bolj agresivno obliko in ima slabo prognozo (79–81). Celice MEC1 ne izražajo površinskega označevalca CD52, izražajo pa CD20 (79).

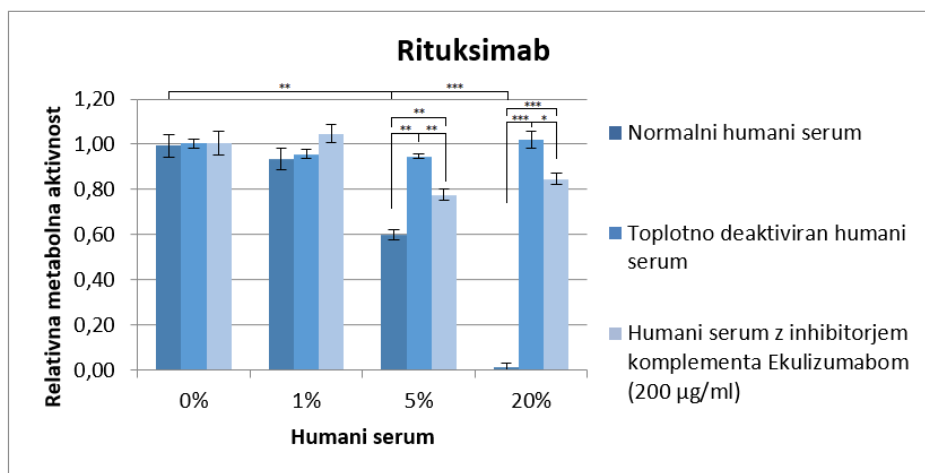
Ovrednotiti smo želeli vpliv humanega seruma, ki predstavlja vir komponent komplementa, na s komplementom posredovano citotoksičnost (CDC). V ta namen smo celice inkubirali v prisotnosti polnega humanega seruma. Ta vsebuje beljakovine komplementa, ki so potrebne za indukcijo CDC. Z namenom potrditve smo naredili tudi eksperiment s toplotno deaktiviranim humanim serumom ter eksperiment z inhibitorjem komplementa ekulizumabom. Ta se veže na beljakovino komplementa C5 in prepreči cepitev na C5a in C5b ter s tem preprečuje nastanek terminalnega kompleksa MAC, kar prepreči lizo celice preko CDC (82). Izbrali smo monoklonska protitelesa, ki se uporabljajo v terapiji zdravljenja limfomov in levkemij. Rituksimab spada v skupino I monoklonskih protiteles in je prvo monoklonsko protitelo, ki je bilo uvedeno v klinično prakso terapije levkemij in limfomov. Ofatumumab je novejša monoklonska protitela skupine I. Obinutuzumab je predstavnik skupine II monoklonskih protiteles. Uporabili smo tudi alemtuzumab, ki je usmerjen proti celičnemu označevalcu CD52 in se danes le še občasno uporablja v terapiji KLL. Vsa monoklonska protitelesa smo uporabili v terapevtski koncentraciji tj. 10 µg/ml.

4.1.1 Humani serum koncentracijsko odvisno inducira CDC na celični liniji Ramos

Najprej smo ugotavljali vpliv prisotnosti komponent komplemента na indukcijo CDC posredovano preko monoklonskih protiteles na celični liniji Burkittovega limfoma Ramos. Suspenziji celic Ramos smo kot vir komplemента dodali humani serum v različnih koncentracijah.

Ugotovili smo, da so na celični liniji Ramos višje koncentracije humanega seruma signifikantno zmanjšale metabolno aktivnost celic predvsem za monoklonska protitelesa rituksimab in ofatumumab. Monoklonsko protitelo rituksimab je v prisotnosti 5 % humanega seruma zmanjšalo metabolno aktivnost celic za 39 %, v prisotnosti 20 % humanega seruma pa je bilo metabolno aktivnih le še nekaj odstotkov celic (Slika 10). Celice smo inkubirali tudi v prisotnosti toplotno deaktiviranega humanega seruma, da bi potrdili vpliv komponent komplemента na indukcijo CDC. S segrevanjem humanega seruma smo deaktivirali proteine komplemента, ki zaradi izgube funkcije ne morejo inducirati CDC. Ugotovili smo, da je rituksimab v prisotnosti 5 % humanega seruma zmanjšal metabolno aktivnost celic na 61 %, dodatek 5 % toplotno deaktiviranega humanega seruma pa ni induciral CDC, saj je bila metabolna aktivnost celic 95 %. Tudi dodatek 20 % toplotno deaktiviranega humanega seruma ob tretiranju z rituksimabom ni spremenil metabolne aktivnosti celic v primerjavi z netretirano kontrolo. S tem smo potrdili, da je CDC pomemben mehanizem delovanja monoklonskih protiteles.

Za ovrednotenje vpliva prisotnosti humanega seruma na citotoksičnost monoklonskih protiteles smo uporabili tudi inhibitor komplemента ekulizumab. Ta se veže na komponento komplemента C5 in prepreči nadaljno kaskado reakcij (83). Ugotovili smo, da izpostavitve celične suspenzije s humanim serumom ekulizumabu deloma zniža delovanje monoklonskih protiteles. Dodatek inhibitorja komplemента rituksimabu je jasno preprečil indukcijo CDC. Signifikantne razlike so vidne ob dodatku ekulizumaba v primeru 5 % in 20 % humanega seruma. Ob pretretiranju z ekulizumabom je kljub prisotnosti 20 % humanega seruma metabolno aktivnih še 82 % celic. S tem poskusom smo dodatno dokazali, da je CDC pomemben mehanizem delovanja monoklonskih protiteles.



Slika 10: Vpliv humanega seruma kot vira komplementa na metabolno aktivnost celic Ramos po tretiranju z rituksimabom.

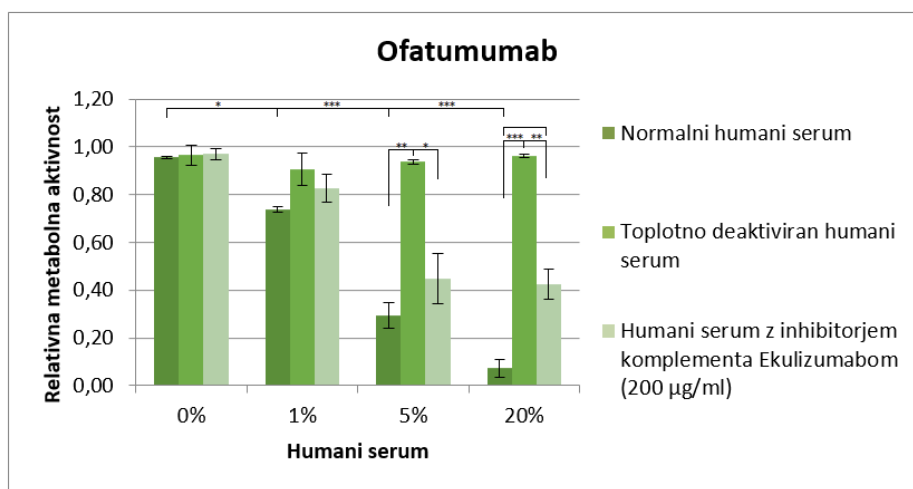
Celični suspenziji celic Ramos smo dodali 1 %, 5 % in 20 % humanega seruma kot vir komplementa. Celice smo nato tretirali z rituksimabom v koncentraciji 10 µg/ml. Po 24-urni inkubaciji smo dodali reagent MTS in iz meritev absorbance izračunali relativno metabolno aktivnost celic. Enak postopek smo ponovili s toplotno deaktiviranim humanim serumom ter ob prisotnosti inhibitorja komplementa ekulizumaba. Vsak eksperiment smo izvedli v triplikatu in naredili tri biološke ponovitve. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ns: ni signifikantne statistične povezave.

Nadalje smo ugotavljali vpliv humanega seruma na citotoksičnost monoklonskega protitelesa ofatumumab v koncentraciji 10 µg/ml (Slika 11). V odsotnosti humanega seruma je bilo po tretiranju celic Ramos z ofatumumabom metabolno aktivnih še 95 % celic. Po dodatku 5 % humanega seruma se je metabolna aktivnost celic statistično signifikantno zmanjšala, metabolno aktivnih je bilo 29 % celic. Ob dodatku 20 % humanega seruma je bilo metabolno aktivnih le še 7 % celic. Rezultati potrjujejo dosedanje ugotovitve *in vitro* študij, da ima ofatumumab močnejši citotoksični učinek povzročen s komplementom kot rituksimab (84). Iz grafov na sliki 10 in sliki 11 vidimo, da je ob dodatku 5 % humanega seruma citotoksičnost pri ofatumumabu signifikantno večja kot pri rituksimabu.

Ob tretiranju celic z ofatumumabom v prisotnosti polnega humanega seruma in deaktiviranega humanega seruma so razlike v metabolni aktivnosti celic zelo jasno izražene. Ugotovili smo statistično signifikantne razlike v metabolni aktivnosti celic v primeru dodanega 5 % normalnega humanega seruma in 5 % deaktiviranega humanega seruma. Metabolna aktivnost celic po tretiranju z ofatumumabom ob dodatku 5 % polnega humanega seruma je bila 29 %, medtem ko je bila ob dodatku 5 % deaktiviranega humanega seruma 94 % (Slika 11). Ob dodatku 20 % deaktiviranega humanega seruma in tretiranju z ofatumumabom je bila metabolna aktivnost celic 96 %. Naš rezultat se sklada z dejstvom,

da je glavna pot delovanja ofatumumaba CDC, ki v odsotnosti komponent komplemента ne more delovati (28, 38).

Ko smo celice Ramos izpostavili ofatumumabu in inhibitorju komplemента ekulizumabu, je bila CDC manj inhibirana, kot pri rituksimabu. V prisotnosti 20 % humanega seruma je bilo metabolno aktivnih 42 % celic. Menimo, da dodatek ekulizumaba 200 $\mu\text{g/ml}$ ni povsem inhibiral CDC. Nizka metabolna aktivnost je najverjetneje posledica dejstva, da je ofatumumab bolj občutljiv na prisotnost humanega seruma in pride do indukcije CDC že ob prisotnosti manjše količine komponent komplemента (84).

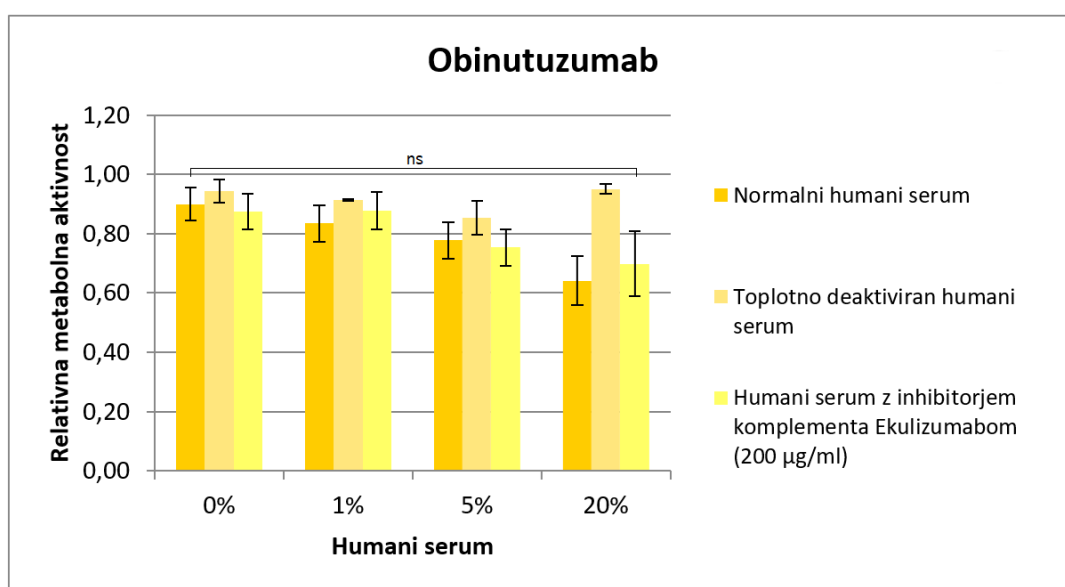


Slika 11: Vpliv humanega seruma kot vira komplemента na metabolno aktivnost celic Ramos po tretiranju z ofatumumabom.

Celični suspenziji celic Ramos smo dodali 1 %, 5 % in 20 % humanega seruma kot vir komplemента. Celice smo nato tretirali z ofatumumabom v koncentraciji 10 $\mu\text{g/ml}$. Po 24-urni inkubaciji smo dodali reagent MTS in iz meritev absorbance izračunali relativno metabolno aktivnost celic. Enak postopek smo ponovili s toplotno deaktiviranim humanim serumom ter ob prisotnosti inhibitorja komplemента ekulizumaba. Vsak eksperiment smo izvedli v triplicatu in naredili tri biološke ponovitve. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ns: ni signifikantne statistične povezave.

Ovrednotili smo tudi vpliv humanega seruma na metabolno aktivnost celic Ramos po tretiranju z obinutuzumabom, ki je monoklonsko protitelo skupine II (Slika 12). Učinkovitost monoklonskega protitelesa je naraščala z višanjem koncentracije humanega seruma, vendar razlike niso statistično signifikantne, kot pri ofatumumabu in rituksimabu. Brez dodatka humanega seruma je bilo metabolno aktivnih še 90 % celic, ob dodatku 5 % humanega seruma se je metabolna aktivnost celic zmanjšala na 83 %, ob dodatku 20 % humanega seruma pa na 64 %. Celice Ramos smo tretirali z obinutuzumabom tudi ob dodatku deaktiviranega humanega seruma. Vidimo, da je bila metabolna aktivnost celic višja ob dodatku toplotno deaktiviranega humanega seruma kot v prisotnosti normalnega

humanega seruma, vendar razlike niso statistično signifikantne in tudi niso tako jasno izražene kot pri monoklonskih protitelesih skupine I. Celice smo tretirali z obinutuzumabom še v prisotnosti normalnega humanega seruma z dodatkom ekulizumaba. Metabolna aktivnost celic je bila v tem primeru primerljiva z metabolno aktivnostjo celic Ramos po tretiranju z obinutuzumabom v prisotnosti normalnega humanega seruma. Rezultati so skladni z dejstvom, da gre citotoksičnost monoklonskega protitelesa obinutuzumaba predvsem na račun indukcije direktne celične smrti in ADCC (85–87). Oba mehanizma sta precej močnejša v primerjavi z rituksimabom in ofatumumabom, kar so dosegli z modifikacijo Fc regije z glikoinžiniringom (21, 28).

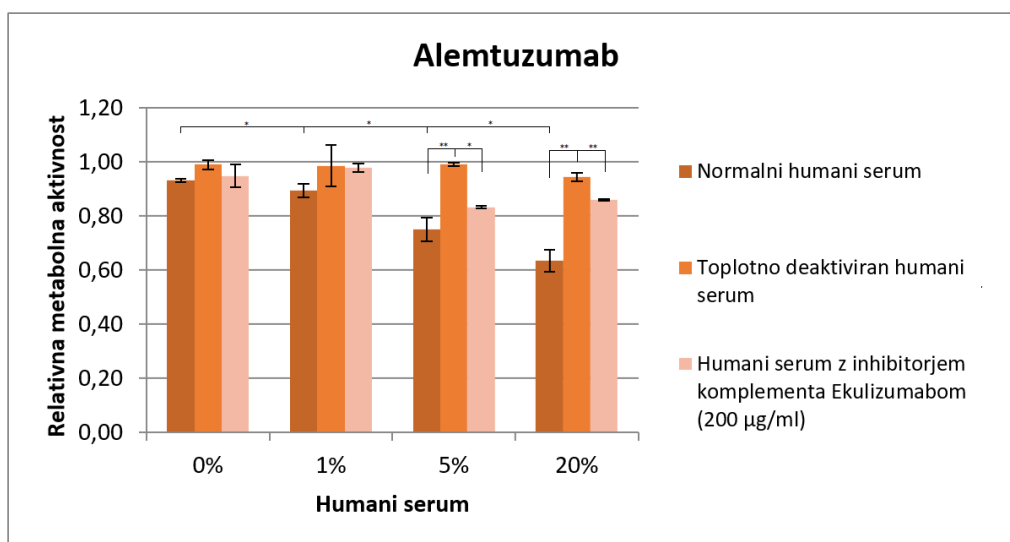


Slika 12: Vpliv humanega seruma kot vira komplementa na metabolno aktivnost celic Ramos po tretiranju z obinutuzumabom.

Celični suspenziji celic Ramos smo dodali 1 %, 5 % in 20 % humanega seruma kot vir komplementa. Celice smo nato tretirali z obinutuzumabom v koncentraciji 10 µg/ml. Po 24-urni inkubaciji smo dodali reagent MTS in iz meritev absorbance izračunali relativno metabolno aktivnost celic. Enak postopek smo ponovili s toplotno deaktiviranim humanim serumom ter ob prisotnosti inhibitorja komplementa ekulizumaba. Vsak eksperiment smo izvedli v triplicatu in naredili tri biološke ponovitve. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ns: ni signifikantne statistične povezave.

Nazadnje smo ugotavljali še vpliv prisotnosti humanega seruma na indukcijo CDC pri monoklonskem protitelesu alemtuzumab, ki je usmerjen proti celičnemu označevalcu CD52 (Slika 13). Opazili smo močnejše delovanje v prisotnosti 5 % in 20 % humanega seruma. V odsotnosti vira komplementa je bilo metabolno aktivnih 93 % celic, pri dodatku 5 % humanega seruma se je metabolna aktivnost zmanjšala na 75 %, pri 20 % humanega seruma pa je bilo metabolno aktivnih 63 % celic. Metabolna aktivnost celic po tretiranju z

alemtuzumabom ob dodatku toplotno deaktiviranega seruma je bila primerljiva v vseh koncentracijah seruma. To nakazuje, da je bila preprečena indukcija CDC zaradi deaktiviranih komponent komplementa. Tudi dodatek ekulizumaba je deloma preprečil citotoksične učinke alemtuzumaba, pri dodatku 20 % humanega seruma in pretretiranju celic z ekulizumabom je bilo metabolno aktivnih 20 % več celic, kot v odsotnosti inhibitorja komplementa.



Slika 13: Vpliv humanega seruma kot vira komplementa na metabolno aktivnost celic Ramos po tretiranju z alemtuzumabom.

Celični suspenziji celic Ramos smo dodali 1 %, 5 % in 20 % humanega seruma, kot vir komplementa. Celice smo nato tretirali z alemtuzumabom v koncentraciji 10 µg/ml. Po 24-urni inkubaciji smo dodali reagent MTS in iz meritev absorbance izračunali relativno metabolno aktivnost celic. Enak postopek smo ponovili s toplotno deaktiviranim humanim serumom ter ob prisotnosti inhibitorja komplementa ekulizumaba. Vsak eksperiment smo izvedli v triplikatu in naredili tri biološke ponovitve. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ns: ni signifikantne statistične povezave.

Z našim eksperimentom *in vitro* na celični liniji Ramos smo ugotovili, da je CDC glavna pot delovanja monoklonskih protiteles skupine I, rituksimaba in ofatumumaba. Močnejše inducira CDC novejši ofatumumab, ki kaže močnejšo citotoksičnost že pri nižjih koncentracijah dodanega humanega seruma *in vitro*. Pokazali smo, da obinutuzumab, ki spada v skupino II anti-CD20 monoklonskih protiteles, ne inducira CDC v takšni meri kot ofatumumab in rituksimab. To potrjujejo podatki iz literature o tem, da obinutuzumab deluje predvsem preko ADCC in indukcije direktne celične smrti (29, 53, 85). Alemtuzumab, ki je usmerjen proti celičnemu označevalcu CD52, je izkazal indukcijo CDC, vendar v precej manjši meri kot ofatumumab in rituksimab.

Naši rezultati *in vitro* potrjujejo dosedanje ugotovitve, da lahko pri bolnikih, ki jim primanjkuje komponent komplementa pričakujemo slabši odziv na zdravljenje z monoklonskimi protitelesi rituksimab in ofatumumab (22, 29, 32, 88). Videli smo, da ob dodatku deaktiviranega humanega seruma in v prisotnosti inhibitorja komplementa, citotoksični učinki niso tako močno izraženi kot v prisotnosti normalnega humanega seruma. Iz tega sklepamo, da bi lahko dodatek sveže plazme kot vira komplementa izboljšal izide zdravljenja z monoklonskimi protitelesi pri bolnikih, ki imajo izčrpane zaloge komponent komplementa (89).

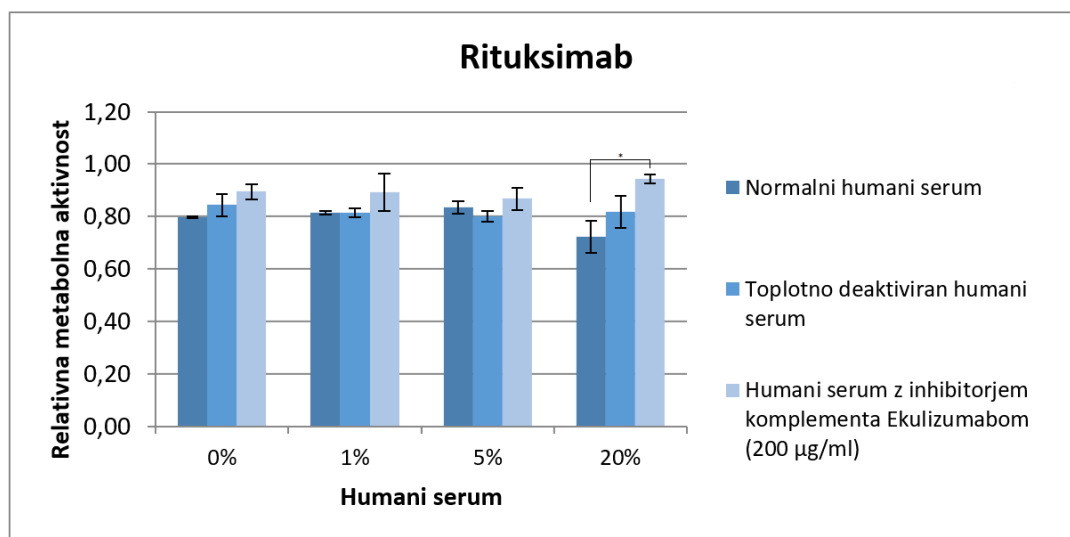
4.1.2 Vpliv humanega seruma na indukcijo CDC na celični liniji MEC1 *in vitro*

Nadalje nas je zanimal vpliv humanega seruma na indukcijo CDC posredovano preko monoklonskih protiteles pri KLL. V ta namen smo uporabili celično linijo MEC1, ki predstavlja *in vitro* model za preučevanje KLL. Preizkušali smo vpliv koncentracije humanega seruma na učinkovitost monoklonskih protiteles proti CD20 in CD52.

Ugotovili smo, da je na celični liniji MEC1 učinkovitost monoklonskih protiteles tipa I, rituksimab in ofatumumab, odvisna od koncentracije humanega seruma. Rituksimab je po 48-urni inkubaciji v prisotnosti 20 % humanega seruma znižal metabolno aktivnost celic na 72 % (Slika 14). Nato smo naredili poskus s toplotno deaktiviranim serumom ter poskus z inhibitorjem komplementa, da bi potrdili vpliv koncentracije humanega seruma na indukcijo CDC. Toplotno deaktiviran serum zaradi denaturiranih komponent komplementa namreč ne more inducirati CDC. V prisotnosti toplotno deaktiviranega seruma je bila metabolna aktivnost celic višja v primerjavi z normalnim humanim serumom. Najbolj opazno je pri dodatku 20 % humanega seruma. Ob dodatku 20 % normalnega humanega seruma je metabolna aktivnost celic 72 %, pri dodatku 20 % toplotno deaktiviranega seruma pa 82 %, kar je primerljivo s citotoksičnimi učinki rituksimaba v odsotnosti humanega seruma.

Z uporabo inhibitorja komplementa ekulizumaba, ki inhibira komponento komplementa C5, smo podobno kot z uporabo deaktiviranega humanega seruma ugotovili, da pomanjkanje komponent komplementa vpliva na citotoksičnost monoklonskih protiteles. S pretretiranjem celične suspenzije z ekulizumabom smo preprečili indukcijo CDC. Iz slike 14 razberemo signifikantno razliko po tretiranju z rituksimabom ob dodatku 20 % normalnega humanega seruma in ob dodatku 20 % humanega seruma z inhibitorjem komplementa. Ob pretretiranju

z ekulizumabom in tretiranju z rituksimabom je metabolna aktivnost celic ob dodatku 20 % humanega seruma še vedno 90 %, brez ekulizumaba pa 72 %. Rezultati kažejo, da rituksimab na celice KLL deluje citotoksično preko CDC, en del citotoksičnosti pa lahko pripišemo tudi indukciji apoptoze in indukciji ADCC (28, 53).



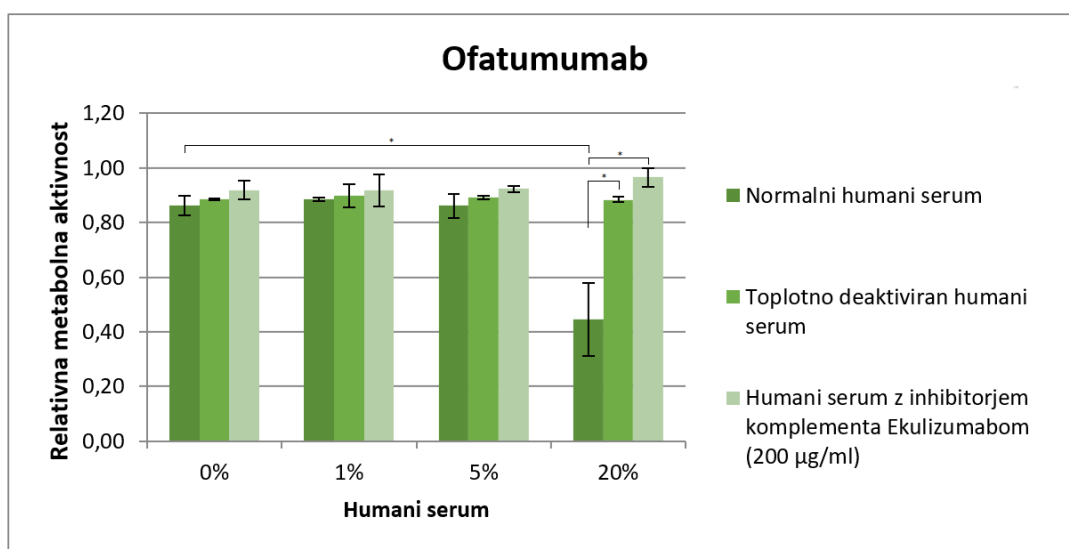
Slika 14: Vpliv humanega seruma kot vira komplekta na metabolno aktivnost celic MEC1 po tretiranju z rituksimabom.

Celični suspenziji celic MEC1 smo dodali 1 %, 5 % in 20 % humanega seruma kot vir komplekta. Celice smo nato tretirali z rituksimabom v koncentraciji 10 µg/ml. Po 24-urni inkubaciji smo dodali reagent MTS in iz meritev absorbance izračunali relativno metabolno aktivnost celic. Enak postopek smo ponovili s toplotno deaktiviranim humanim serumom ter ob prisotnosti inhibitorja komplekta ekulizumaba. Vsak eksperiment smo izvedli v triplicatu in naredili tri biološke ponovitve. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ns: ni statistične povezave.

Pri monoklonskem protitelesu ofatumumabu je koncentracijska odvisnost citotoksičnosti od koncentracije humanega seruma močnejše izražena. V odsotnosti humanega seruma je bilo metabolno aktivnih 86 % celic, ob dodatku 20 % humanega seruma pa se je metabolna aktivnost celic znižala na 45 % (Slika 15). Naši rezultati sovpadajo s podatki iz literature, da ofatumumab močnejše inducira CDC (21, 84, 86). To smo želeli preveriti z dodatkom deaktiviranega humanega seruma. Opazili smo statistično signifikantne razlike v metabolni aktivnosti celic po tretiranju z ofatumumabom v primeru dodatka normalnega humanega seruma in toplotno deaktiviranega humanega seruma. Metabolna aktivnost celic po tretiranju z ofatumumabom od dodatku toplotno deaktiviranega seruma se skoraj ni spremenila, ne glede na količino dodanega seruma. Gibala se je med 88 – 90 %. Statistično signifikantne razlike v preživetju so opazne med dodatkom 20 % normalnega humanega seruma in 20 % deaktiviranega humanega seruma. Vidimo, da je bila metabolna aktivnost ob dodatku 20 %

polnega humanega seruma 45 %, ob dodatku deaktiviranega humanega seruma pa 88 %, kar pomeni da je bila razlika v metabolni aktivnosti celic 43 %.

Dodatek inhibitorja komplemента ekulizumaba je preprečil indukcijo CDC pri ofatumumabu bolj očitno kot pri rituksimabu. Vidimo statistično signifikantno razliko ob dodatku 20 % humanega seruma, kjer je metabolna aktivnost celic le še 45 %, ob pretretiranju z ekulizumabom pa 92 %. Rezultati eksperimenta s toplotno deaktiviranim serumom in eksperimenta z dodatkom ekulizumaba nakazujejo, da k citotoksičnosti ofatumumaba prispeva predvsem CDC.

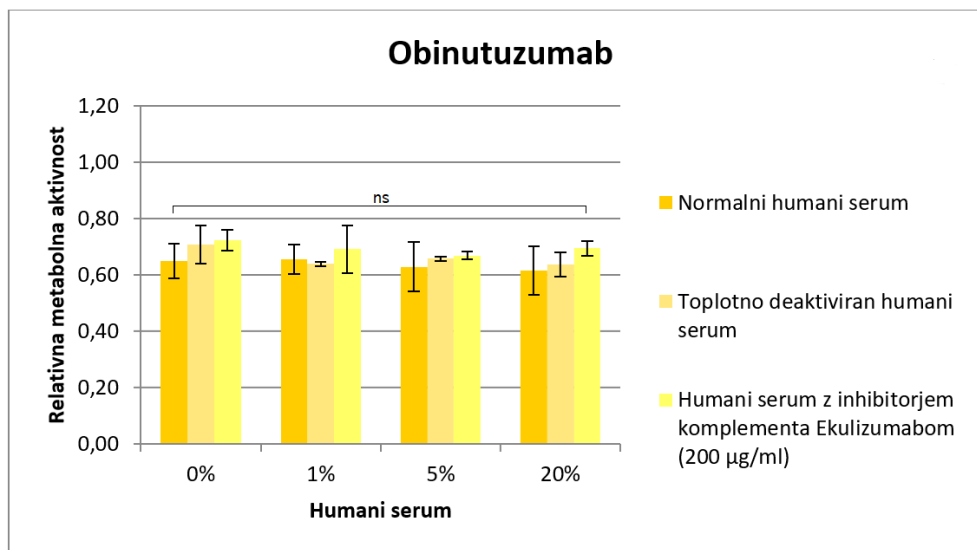


Slika 15: Vpliv humanega seruma kot vira komplemента na metabolno aktivnost celic MEC1 po tretiranju z ofatumumabom.

Celični suspenziji celic MEC1 smo dodali 1 %, 5 % in 20 % humanega seruma kot vir komplemента. Celice smo nato tretirali z ofatumumabom v koncentraciji 10 µg/ml. Po 24-urni inkubaciji smo dodali reagent MTS in iz meritev absorbance izračunali relativno metabolno aktivnost celic. Enak postopek smo ponovili s toplotno deaktiviranim humanim serumom ter ob prisotnosti inhibitorja komplemента ekulizumaba. Vsak eksperiment smo izvedli v triplikatu in naredili tri biološke ponovitve. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ns: ni signifikantne statistične povezave.

Obinutuzumab, ki je monoklonsko protitelo skupine II, je že brez dodatka vira komplemента deloval izrazito bolj citotoksično kot rituksimab in ofatumumab. Preživetje celic MEC1 ob tretiranju z 10 µg/ml obinutuzumaba je bilo 65 % (brez dodatka humanega seruma), v primerjavi z rituksimabom, ki je metabolno aktivnost znižal na 80 % in ofatumumabom, ki je znižal metabolno aktivnost na 86 %. Iz slike 16 vidimo, da dodatek komplemента ni povzročil močnejše indukcije celične smrti. Metabolna aktivnost je bila primerljiva v odsotnosti humanega seruma (65 %) in v prisotnosti 20 % humanega seruma (62 %). Nismo

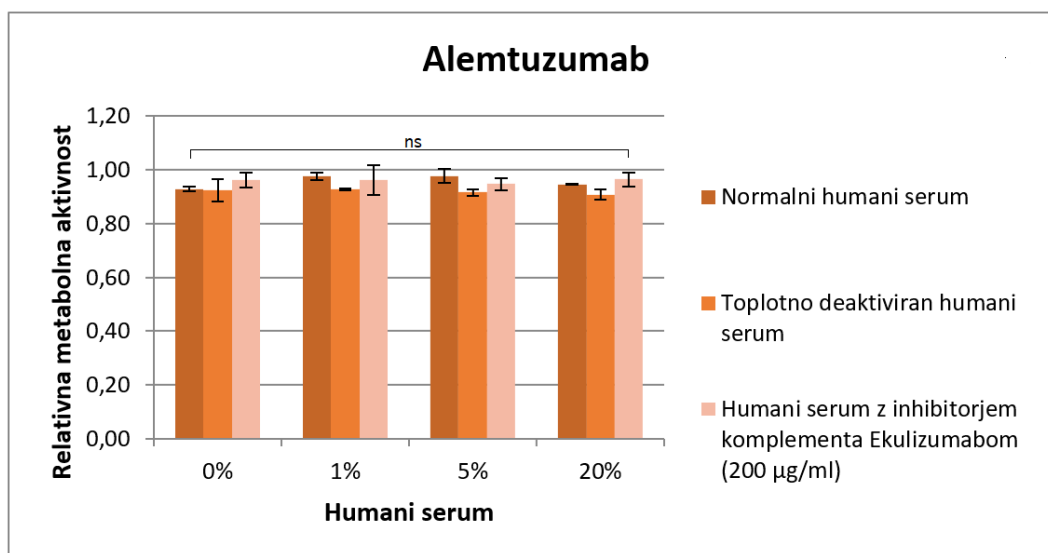
opazili signifikantnih razlik v metabolni aktivnosti celic med dodatkom polnega humanega seruma in toplotno deaktiviranega humanega seruma, metabolna aktivnost celic se je gibala od 66 – 71 %. Tudi po pretretiranju z inhibitorjem komplemента ekulizumabom je bil odstotek metabolno aktivnih celic primerljiv z metabolno aktivnostjo celic v odsotnosti inhibitorja komplemента. Naši rezultati so skladni s podatki iz literature, da so citotoksični učinki obinutuzumaba predvsem posledica indukcije direktne celične smrti in ADCC (25, 29).



Slika 16: Vpliv humanega seruma kot vira komplemента na metabolno aktivnost celic MEC1 po tretiranju z obinutuzumabom.

Celični suspenziji celic MEC1 smo dodali 1 %, 5 % in 20 % humanega seruma kot vir komplemента. Celice smo nato tretirali z obinutuzumabom v koncentraciji 10 µg/ml. Po 24-urni inkubaciji smo dodali reagent MTS in iz meritev absorbance izračunali relativno metabolno aktivnost celic. Enak postopek smo ponovili s toplotno deaktiviranim humanim serumom ter ob prisotnosti inhibitorja komplemента ekulizumaba. Vsak eksperiment smo izvedli v triplikatu in naredili tri biološke ponovitve. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ns: ni signifikantne statistične povezave.

Alemtuzumab, ki je anti-CD52 monoklonsko protitelo, na celicah MEC1 ni imel vpliva na metabolno aktivnost celic, ne glede na koncentracijo humanega seruma (Slika 17). Tudi prisotnost toplotno deaktiviranega seruma ali inhibitorja komplemента ekulizumaba ni povzročila bistvenih sprememb v metabolni aktivnosti celic. Takšen rezultat je v skladu z dejstvom, da celice MEC1 ne izražajo površinskega označevalca CD52, proti kateremu je usmerjeno monoklonsko protitelo alemtuzumab (79).



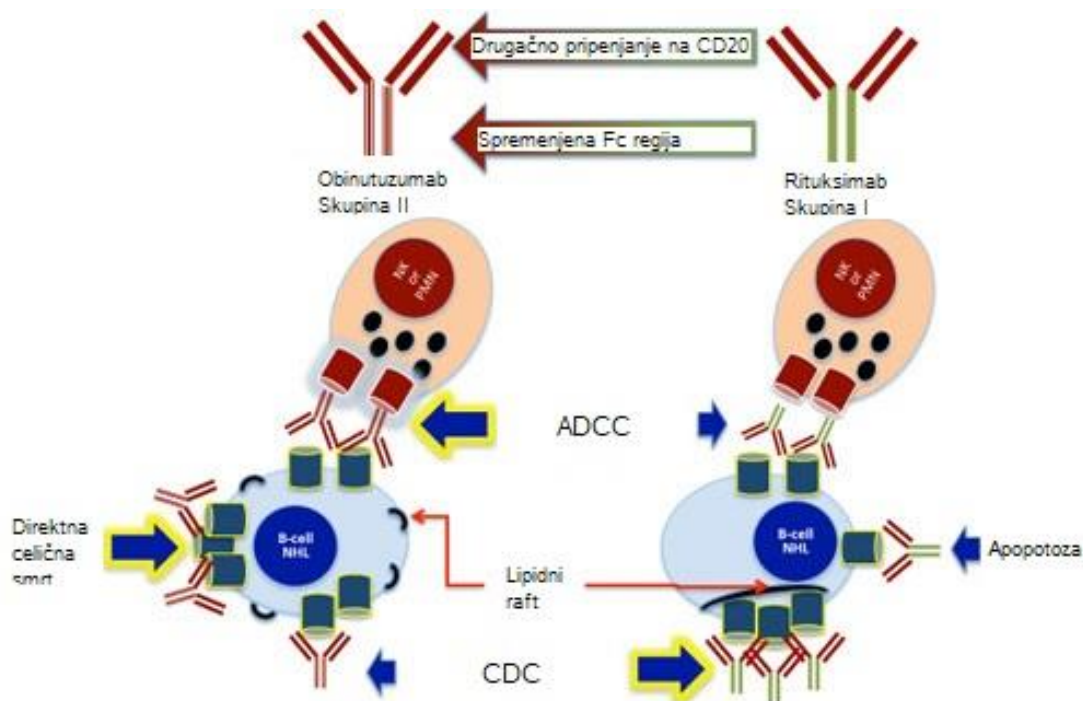
Slika 17: Vpliv humanega seruma na kot vira komplekta na metabolno aktivnost celic MEC1 po tretiranju z alemtuzumabom.

Celični suspenziji celic MEC1 smo dodali 1 %, 5 % in 20 % humanega seruma kot vir komplekta. Celice smo nato tretirali z alemtuzumabom v koncentraciji 10 µg/ml. Po 24-urni inkubaciji smo dodali reagent MTS in iz meritev absorbance izračunali relativno metabolno aktivnost celic. Enak postopek smo ponovili s toplotno deaktiviranim humanim serumom ter ob prisotnosti inhibitorja komplekta ekulizumaba. Vsak eksperiment smo izvedli v triplikatu in naredili tri biološke ponovitve. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ns: ni signifikantne statistične povezave.

Iz našega eksperimenta je razvidno, da so komponente komplekta ključni faktor za indukcijo CDC, ki predstavlja pomemben del citotoksičnosti predvsem pri monoklonskih protitelesih skupine I. Ugotovili smo, da ofatumumab tudi na celični liniji MEC1 močnejše inducira CDC kot rituksimab. Močnejša indukcija CDC ofatumumaba je lahko tudi posledica epitopa, na katerega se veže. Ta ni enak epitopu rituksimaba in vezava na njega povzroči bolj učinkovito s komplementom posredovano citotoksičnost (21, 86). Poleg tega lahko večjo učinkovitost ofatumumaba pripišemo tudi podatku, da je za indukcijo CDC pri ofatumumabu potrebnih manj CD20 molekul kot pri rituksimabu (84).

Ugotovili smo, da pri obinutuzumabu ni bistvenih razlik v metabolni aktivnosti celic v primeru dodatka normalnega humanega seruma, toplotno deaktiviranega humanega seruma in ob pretretiranju z ekulizumabom. Rezultati potrjujejo, da pri monoklonskih protitelesih skupine II ni glavna pot s komplementom posredovana citotoksičnost, kot pri rituksimabu in ofatumumabu, je pa v majhni meri prisotna (Slika 18). Glavna pot delovanja *in vitro* je v našem primeru s protitelesom povzročena apoptoza, saj efektorskih celic, ki bi jih pritegnilo monoklonsko protitelo ni prisotnih, zato njihovega doprinosa k učinkovitosti monoklonskega protitelesa ne morem vrednotiti. Podatki iz literature kažejo na to, da ima

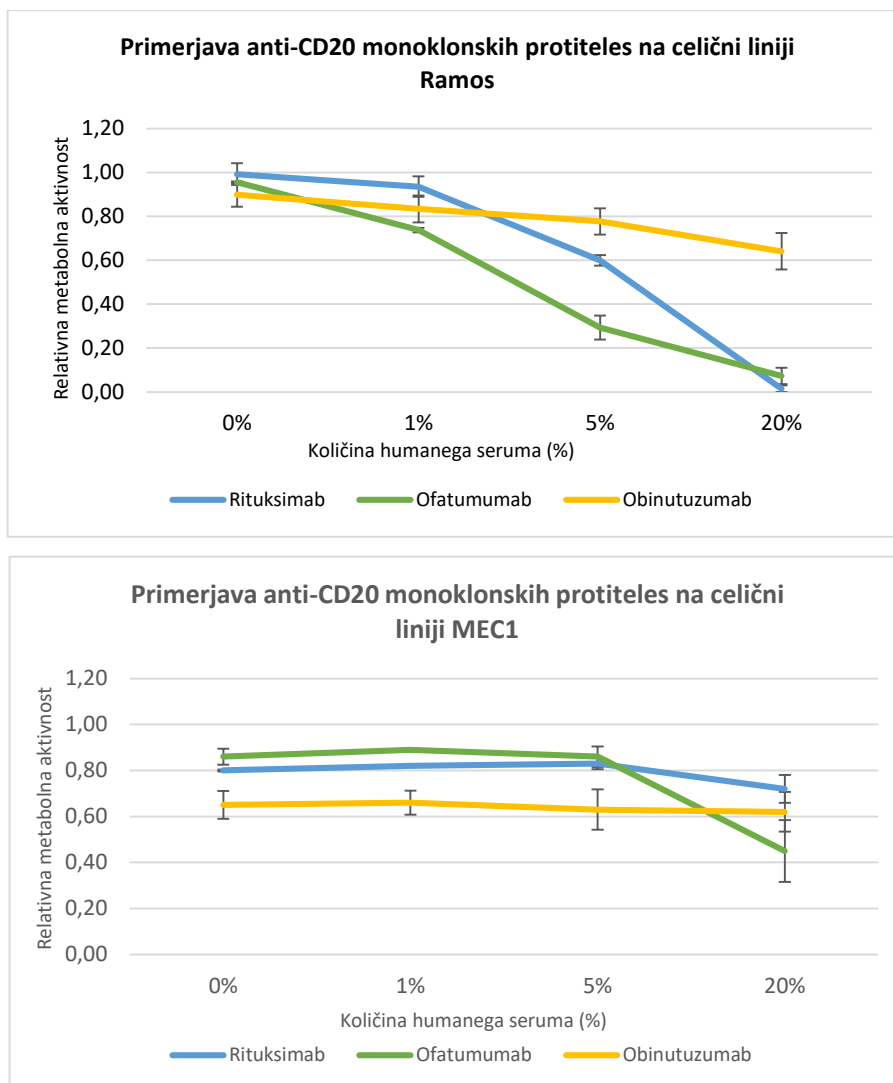
obinutuzumab močno povečano s protitelesom posredovano citotoksičnost v primerjavi z rituksimabom in ofatumumabom (86). Predvidevamo, da bi z obinutuzumabom lahko izboljšali klinične izide zdravljenja tudi pri bolnikih, ki imajo iztrošen vir komplementa ali povišano ekspresijo komplement inhibitornih proteinov.



Slika 18: Mehanizmi delovanja monoklonskih protiteles skupine I in skupina II.

Ob primerjavi rezultatov pridobljenih na celičnih linijah Ramos in MEC1 po tretiranju z izbranimi monoklonskimi protitelesi, smo ugotovili, da v največji meri inducira CDC ofatumumab na obeh celičnih linijah. Iz slike 19 razberemo, da je ofatumumab z višanjem koncentracije humanega seruma najbolj očitno okrepil citotoksične učinke, ki so posredovani zaradi indukcije CDC. Vpliv koncentracije humanega seruma na indukcijo CDC smo opazili tudi pri rituksimabu. Vpliv prisotnosti humanega seruma na citotoksičnost je manj izražen pri obinutuzumabu, ki spada med monoklonska protitelesa skupine II.

Z našo raziskavo *in vitro* smo ugotovili, da rituksimab in ofatumumab izkazujeta močnejšo citotoksično delovanje na celični liniji Burkittovega limfoma Ramos, kot na celicah MEC1 (Slika 19 in Slika 20). Predvidevamo, da je to posledica nižje ekspresije označevalca CD20 na celicah MEC1 v primerjavi z celicami Ramos (88). Mi smo takšen rezultat potrdili na celičnih linijah Ramos in MEC1. Poleg tega so celice MEC1 manj občutljive na citotoksične učinke spojin, saj predstavljajo model rezistentnih celic. Pridobljene so bile namreč od bolnika v zgodnji prolimfocitni transformaciji, ki pomeni napredovano KLL (79).

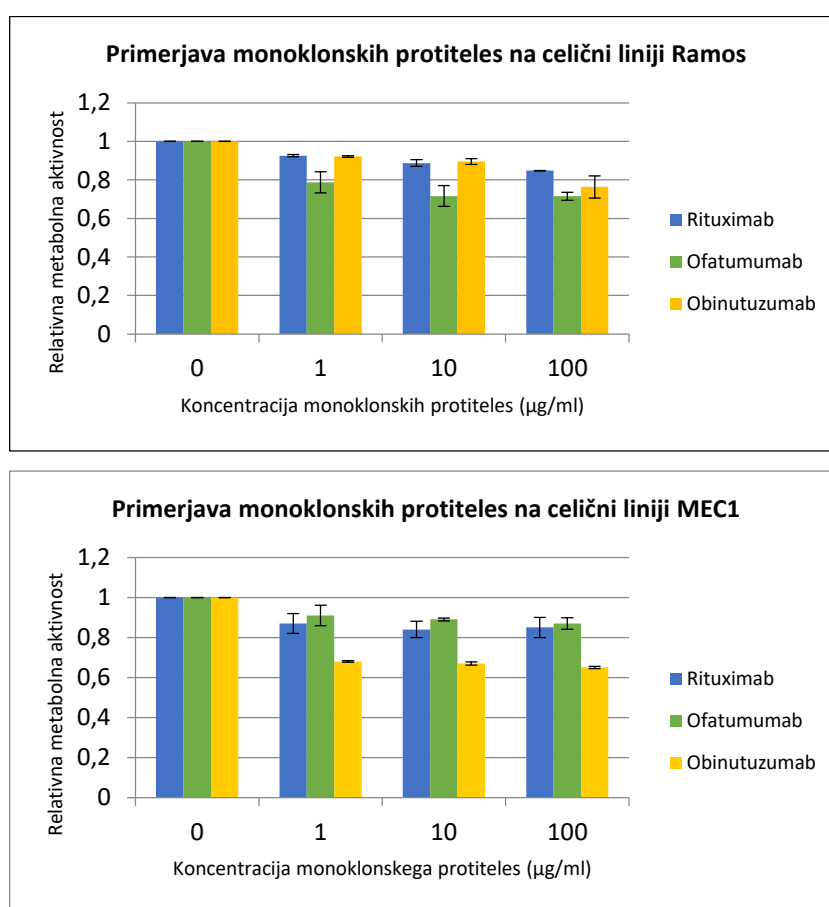


Slika 19: Primerjava citotoksičnosti monoklonskih protiteles usmerjenih proti celičnem označevalcu CD20 v prisotnosti različnih koncentracij humanega seruma.

Slika prikazuje relativno metabolno aktivnost celic Ramos in MEC1 ob dodatku različnih koncentracij humanega seruma kot vir komplementa. Metabolno aktivnost smo ugotavljali s testom MTS 24 ur po tretiranju z monoklonskimi protitelesi v terapevtski koncentraciji 10 µg/ml.

Z uporabo toplotno deaktiviranega seruma in inhibitorja komplementa ekulizumaba smo pokazali pomen humanega seruma za indukcijo CDC. Tako kot na celični liniji Burkittovega limfoma, tudi na celični liniji KLL vidimo, da iztrošene komponente komplementa pomenijo slabši odziv na zdravljenje. S tem smo potrdili, da bi zunanji vir komplementa lahko doprinesel k večji učinkovitosti pri zdravljenju z monoklonskimi protitelesi skupine I. Raziskave v tej smeri so bile že narejene z rituksimabom (88). Ugotovili so, da dodatek sveže plazme zdravih donorjev signifikantno izboljša rezultate zdravljenja pri bolnikih, ki so razvili rezistenco na rituksimab zaradi iztrošenih komponent komplementa. *Klepfish* in sodelavci so naredili raziskavo na petih bolnikih z napredovano KLL, ki je bila slabo

obvladovana, bolniki so imeli zelo nizko kvaliteto življenja. Po zdravljenju z rituksimabom in dodatkom plazme kot virom komplementa, so že po nekaj dneh dosegli signifikantno znižanje malignih limfocitov B ter zmanjšanje neoplazem v bezgavkah in vranici (88). *In vitro* smo ugotovili, da monoklonska protitelesa dajejo primerljive rezultate na metabolno aktivnost celic v vseh treh testiranih koncentracijah. Znano je, da previsoko doziranje monoklonskih protiteles lahko povzroči zmanjšanje ekspresije celičnega označevalca CD20 in izčrpanje komponent komplementa (90). Ekspresija CD20 pa je ključnega pomena za citotoksične učinke monoklonskih protiteles (21, 91). Z uporabo nižjih koncentracij bi se lahko izognili stranskim učinkom zdravljenja in zmanjšali pojavnost rezistenc. S tem bi lahko tudi zmanjšali stroške zdravljenja, saj so biološka zdravila zelo draga.



Slika 20: Primerjava učinkovitosti monoklonskih protiteles rituksimab, ofatumumab in obinutuzumab v različnih koncentracijah.

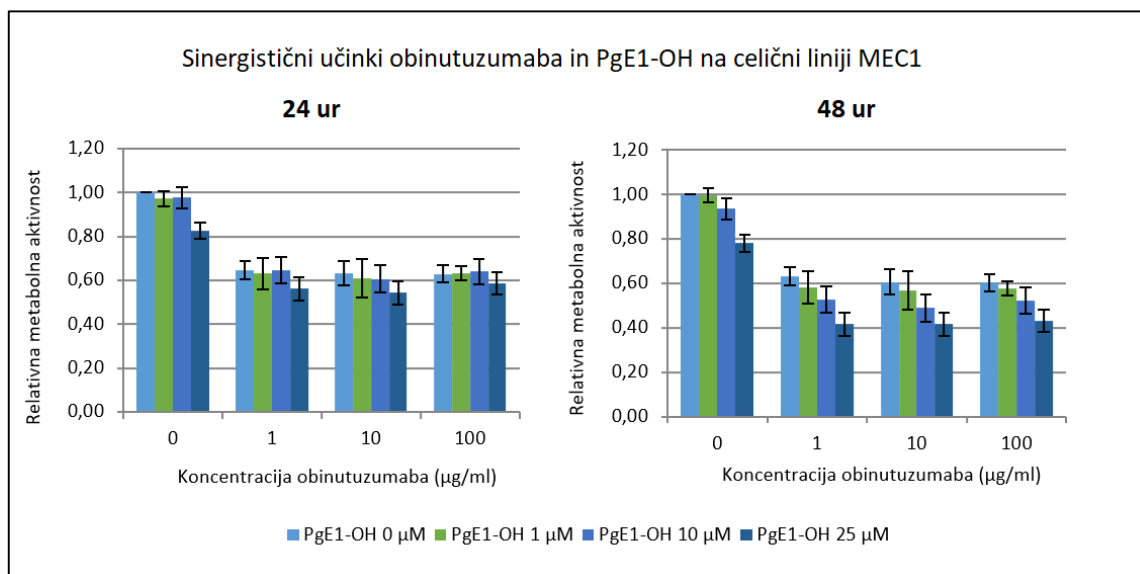
Slika prikazuje relativno metabolno aktivnost celic MEC1 in Ramos ob dodatku 1 % humanega seruma, kot vir komplementa. Metabolno aktivnost smo ugotavljali s testom MTS 24 ur po tretiranju z monoklonskimi protitelesi v treh različnih koncentracijah (1 µg/ml, 10 µg/ml in 100 µg/ml).

Pri ugotavljanju vpliva humanega seruma na učinkovitost monoklonskih protiteles na celični liniji Ramos in celični liniji MEC1 smo zaznali, da ima novejši obinutuzumab boljše

delovanje na celicah MEC1, kar *in vitro* potrjuje njegov pomen v zdravljenju KLL, za kar je tudi registriran (92). *In vitro* so njegovi citotoksični učinki močnejši v primerjavi z rituksimabom in ofatumumabom (Slika 20). To *in vivo* potrjujejo tudi najnovejši podatki nadaljevalnih študij. Obinutuzumab (zdravilo Gazyva) je od odobritve za zdravljenje KLL leta 2013 do leta 2018 v primerjavi z rituksimabom za 51 % zmanjšal napredovanje bolezni ali smrti izid pri bolnikih s KLL (93).

4.2 Agonisti receptorja EP4 delujejo sinergistično z monoklonskimi protitelesi *in vitro*

V magistrski nalogi smo želeli ovrednotiti sinergistično delovanje agonistov receptorja EP4 in terapevtskih monoklonskih protiteles *in vitro*. V ta namen smo izbrali dva agonista receptorja EP4 (PgE1-OH, L-902,688) ter monoklonska protitelesa rituksimab, ofatumumab in obinutuzumab. Sinergistično delovanje smo preučevali na dveh celičnih linijah, Ramos in MEC1, kot vir komplementa pa smo dodali 1 % humani serum. Živost celic smo vrednotili s testom metabolne aktivnosti MTS. Sinergistične učinke smo ovrednotili po 48 h, saj smo opazili, da so močnejše izraženi kot po 24 h (Slika 21).



Slika 21: Vrednotenje sinergističnih učinkov po 24 urah in po 48 urah na primeru obinutuzumaba in PgE1-OH na celični liniji MEC1.

Suspenziji celic MEC1 ($3,0 \times 10^5$ celic/ml) smo dodali humani serum (1 %). Celice smo tretirali z obinutuzumabom (1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ ter 100 $\mu\text{g/ml}$), agonistom receptorja EP4 PgE1-OH (1 μM , 10 μM in 25 μM) ter kombinacijo obeh. Po 24-urni in 48-urni inkubaciji smo pomerili metabolno aktivnost celic s testom MTS. Poskus smo izvajali v triplicatu in naredili tri neodvisne ponovitve.

Sinergistični učinek smo vrednotili tudi s pomočjo programa CompuSyn, ki na podlagi vnešenih podatkov izračuna kombinacijski indeks (KI). Kombinacijski indeks manjši od 1 ($KI < 1$) pomeni, da učinkovini v izbranih koncentracijah delujeta sinergistično, KI višji od 1 ($KI > 1$) kaže na antagonizem, kadar pa je KI enak 1 to pomeni aditivni učinek dveh ali več spojin. Natančneje je pomen vrednosti kombinacijskega indeksa predstavljen v preglednici IX.

Preglednica IX: Pomen vrednosti kombinacijskega indeksa.

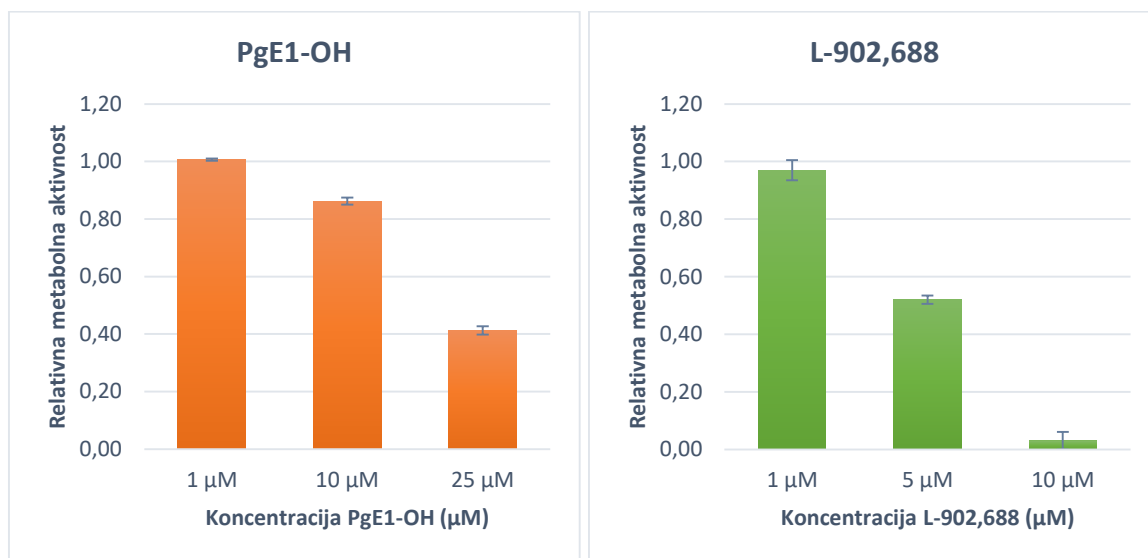
Kombinacijski indeks (KI)	Simbol	Pomen
< 0.1	+++++	Zelo močan sinergizem
0.1 – 0.3	++++	Močan sinergizem
0.3 – 0.7	+++	Sinergizem
0.7 – 0.85	++	Zmeren sinergizem
0.85 – 0.90	+	Rahel sinergizem
0.90 – 1.10	+-	Skoraj aditiven
1.10 – 1.20	-	Rahel antagonizem
1.20 – 1.45	--	Zmeren antagonizem
1.45 – 3.3	---	Antagonizem
3.3 – 10	----	Močan antagonizem
> 10	-----	Zelo močan antagonizem

4.2.1 Sinergistični učinki na celični liniji Ramos

Najprej smo ovrednotili sinergistične učinke agonistov receptorja EP4 in monoklonskih protiteles na celični liniji Ramos, ki predstavlja model za preučevanje B-celičnih limfomov *in vitro*. V predhodnih študijah so že ugotovili, da agonist receptorja EP4, PgE1-OH, deluje sinergistično v kombinaciji z rituksimabom in ofatumumabom (94). V okviru magistrske naloge smo preizkušali še delovanje obinutuzumaba, novejšega monoklonskega protitelesa v kombinaciji s PgE1-OH. Nato smo vsa tri monoklonska protitelesa testirali še v kombinaciji s selektivnim agonistom receptorja EP4, L-902,688.

Za vrednotenje sinergističnih učinkov monoklonskih protiteles s PgE1-OH smo izbrali koncentracije 1 μM , 10 μM in 25 μM . Pri koncentraciji agonista receptorja EP4 1 μM je bil citotoksični učinek PgE1-OH komaj opazen, medtem ko je pri koncentraciji 25 μM metabolno aktivnih le še približno 40 % celic (Slika 22). Pri spojini L-902,688 smo uporabili nekoliko nižje koncentracije in sicer 1 μM , 5 μM ter 10 μM . Takšne koncentracije smo

izbrali na podlagi rezultatov predhodnih raziskav, kjer so izračunali vrednosti EC_{50} , ki predstavljajo koncentracijo učinkovine potrebne za povzročitev 50 % smrti celic. Za L-902,688 so na celični liniji Ramos določili povprečno vrednost EC_{50} po 48 urah $4,71 \pm 0,13 \mu M$ (75). Na sliki 22 vidimo, da je bila pri koncentraciji L-902,688 $5 \mu M$ živost celic približno 50 %, torej se naši rezultati ujemajo s predhodno določenimi vrednostmi EC_{50} .



Slika 22: Relativna metabolna aktivnost celic Ramos po tretiranju z PgE1-OH in L-902,688.

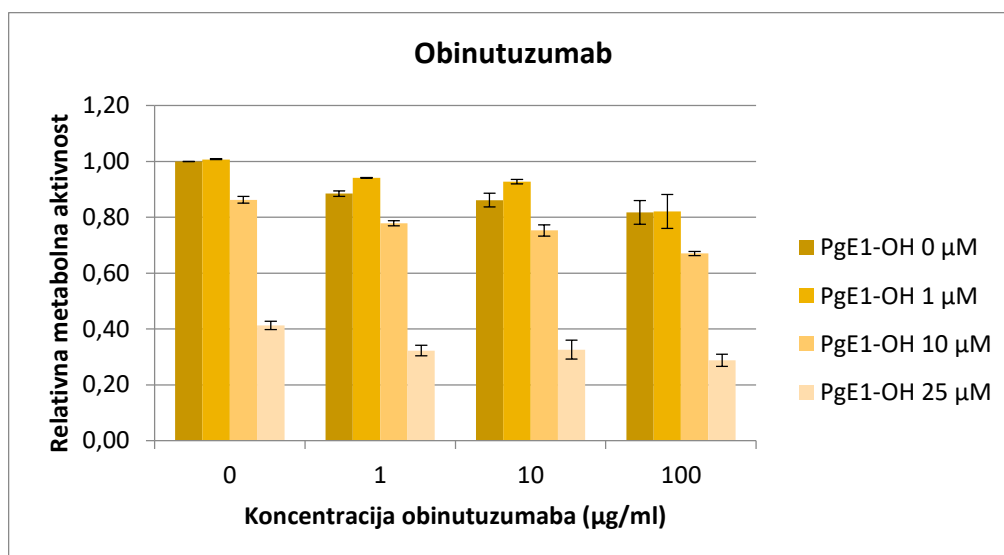
Suspenziji celic Ramos ($3,0 \times 10^5$ celic/ml) smo dodali humani serum (1 %). Celice smo tretirali z agonistoma receptorja EP4 PgE1-OH (1 µM, 10 µM in 25 µM) ter L-902,688 (1 µM, 5 µM in 10 µM). Po 48-urni inkubaciji smo pomerili metabolno aktivnost celic s testom MTS. Poskus smo izvajali v triplikatu in naredili tri neodvisne ponovitve.

4.2.1.1 Sinergistični učinek PgE1-OH in monoklonskih protiteles

V predhodnih študijah raziskovalne skupine so ugotovili, da anti-CD20 monoklonski protitelesi skupine I, rituksimab in ofatumumab izražata sinergistične učinke s spojino PgE1-OH. V kombinaciji s PgE1-OH sta rituksimab in ofatumumab primerljivo znižala metabolno aktivnost celic, program CompuSyn, pa je potrdil sinergistično delovanje (94). Želeli smo ovrednotiti še kombinacijo PgE1-OH ter novejšega monoklonskega protitelesa obinutuzumaba, ki spada med monoklonska protitelesa skupine II.

Ugotovili smo, da ima obinutuzumab v vseh testiranih koncentracijah (1 µg/ml, 10 µg/ml in 100 µg/ml) primerljivo citotoksično delovanje na celice Ramos. Metabolno aktivnih je bilo še 82 – 88 % celic. Na sliki 23 vidimo, da je tretiranje celic z agonistom receptorja EP4, PgE1-OH, v koncentracijah 10 µM in 25 µM okrepilo citotoksične učinke obinutuzumaba. Obinutuzumab je v koncentraciji 10 µg/ml in 100 µg/ml v prisotnosti 10 µM PgE1-OH

deloval signifikantno bolj citotoksično v primerjavi z obinutuzumabom samim. Metabolna aktivnost celice po tretiranju s 100 $\mu\text{g/ml}$ obinutuzumaba je bila 82 %, 10 μM PgE1-OH je znižal metabolno aktivnost celic na 86 %, kombinacija obeh pa na 67 %. Prav tako smo zaznali statistično signifikantno znižanje metabolne aktivnosti celic že v najnižji koncentraciji monoklonskega protitelesa 1 $\mu\text{g/ml}$ ob inkubaciji z 10 μM in 25 μM PgE1-OH.



Slika 23: Relativna metabolna aktivnost celic Ramos po 48-urni inkubaciji z obinutuzumabom in PgE1-OH ob prisotnosti 1 % humanega seruma kot virom komplemента.

Suspenziji celic Ramos ($3,0 \times 10^5$ celic/ml) smo dodali humani serum (1 %). Celice smo tretirali z obinutuzumabom (1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ ter 100 $\mu\text{g/ml}$), agonistom receptorja EP4 (1 μM , 10 μM in 25 μM) ter kombinacijo obeh. Po 48-urni inkubaciji smo pomerili metabolno aktivnost celic s testom MTS. Poskus smo izvajali v triplicatu in naredili tri neodvisne ponovitve.

Sinergistično delovanje smo ugotavljali tudi s programom CompuSyn (Priloga 1). Program je potrdil sinergistične učinke v primeru PgE1-OH 10 μM v kombinaciji s 100 $\mu\text{g/ml}$ obinutuzumaba ($KI = 0,86$). Ob inkubaciji celic v prisotnosti 10 μM PgE1-OH s koncentracijami obinutuzumaba 1 $\mu\text{g/ml}$ in 10 $\mu\text{g/ml}$ pa je lahko razlog za nižjo metabolno aktivnost posledica aditivnih učinkov posameznih učinkovin ($KI \approx 1$).

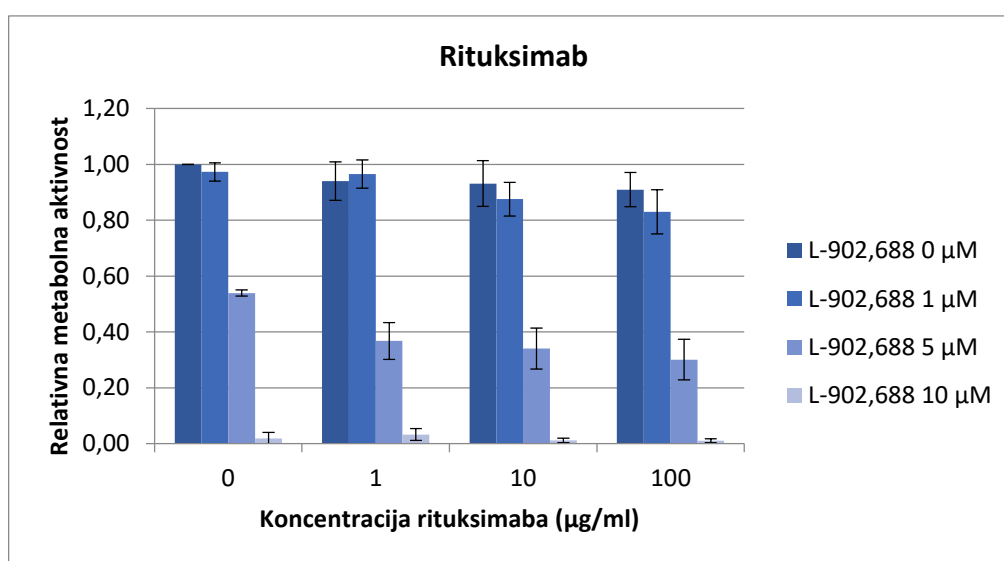
4.2.1.2 *Spojina L-902,688 deluje sinergistično z monoklonskimi protitelesi*

Nadalje smo želeli ugotoviti ali novejši agonist receptorja EP4, L-902,688, v kombinaciji z monoklonskimi protitelesi bolj zniža metabolno aktivnost celic kot vsaka učinkovina posebej.

S tem namenom smo najprej ovrednotili sinergistično delovanje spojine L-902,688 in monoklonskih protiteles tipa I. Po tretiranju celic Ramos z 100 $\mu\text{g/ml}$ rituksimabom je bilo

metabolno aktivnih še 91 % celic (Slika 24), pri ofatumumabu 100 µg/ml pa 77 % (Slika 25). Spojina L-902,688 v koncentraciji 1 µM ni imela pomembnega vpliva na preživetje, pri 5 µM pa je bilo metabolno aktivnih le še 54 % celic, kar se sklada s podatki o $EC_{50} = 4,71 \pm 0,13 \mu M$ (75).

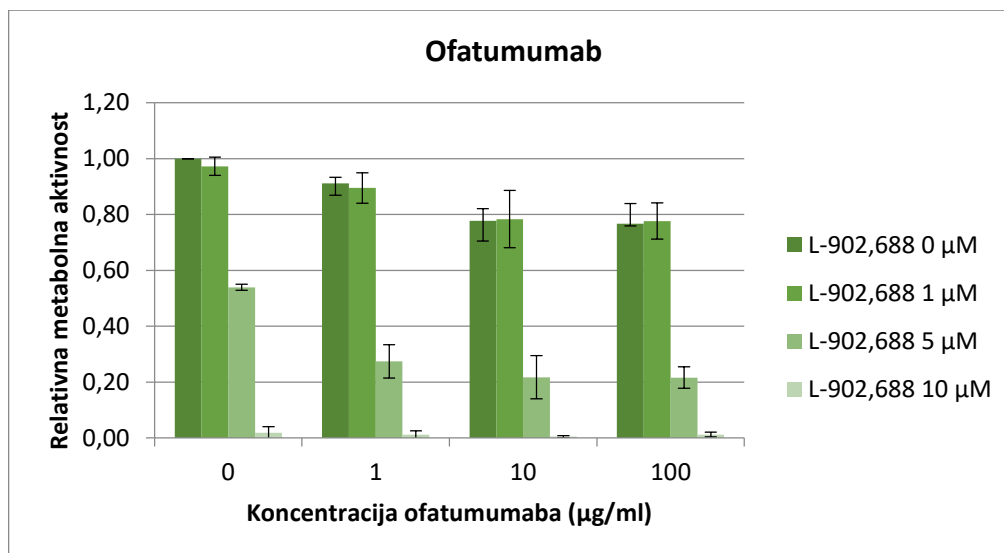
Pri kombinaciji rituksimaba (konc. 10 µg/ml in 100 µg/ml) in agonista receptorja EP4, L-902,688, v koncentraciji 1 µM opazimo sinergistične učinke, kar smo potrdili tudi z izračunom KI (Priloga 2). Slednji je imel v obeh primerih vrednost od 0,3 – 0,7. Rituksimab je v koncentraciji 1 µg/ml znižal metabolno aktivnost celic na 94 %, 5 µM L-902,688 na 54 %, skupaj pa sta znižala metabolno aktivnost celic na 37 % (Slika 24).



Slika 24: Relativna metabolna aktivnost celic Ramos po 48-urni inkubaciji z rituksimabom in L-902,688.

Suspenziji celic Ramos ($3,0 \times 10^5$ celic/ml) smo dodali humani serum (1 %). Celice smo tretirali z rituksimabom (1 µg/ml, 10 µg/ml ter 100 µg/ml), agonistom receptorja EP4 L-902,688 (1 µM, 5 µM in 10 µM) ter kombinacijo obeh. Po 48-urni inkubaciji smo pomerili metabolno aktivnost celic s testom MTS. Poskus smo izvajali v triplicatu in naredili tri neodvisne ponovitve.

5 µM L-902,688 je izkazoval močne sinergistične učinke tako v kombinaciji z rituksimabom kot tudi z ofatumumabom. Pri kombinaciji novejšega monoklonskega protitelesa ofatumumaba in agonista receptorja EP4, L-902,688, so bili citotoksični učinki kombinacije še močnejše izraženi. Po 48-urni inkubaciji je bilo po tretiranju s 5 µM L-902,688 metabolno aktivnih 54 % celic, po tretiranju z ofatumumabom v koncentraciji 1 µg/ml je bilo metabolno aktivnih 91 % celic, po tretiranju s kombinacijo obeh v prej navedenih koncentracijah pa 27 % celic (Slika 25). Sinergističnega delovanja pri najvišji izbrani koncentraciji L-902,688 (10 µM) ni smiselno vrednotiti, saj je živost celic nižja od 5 %.

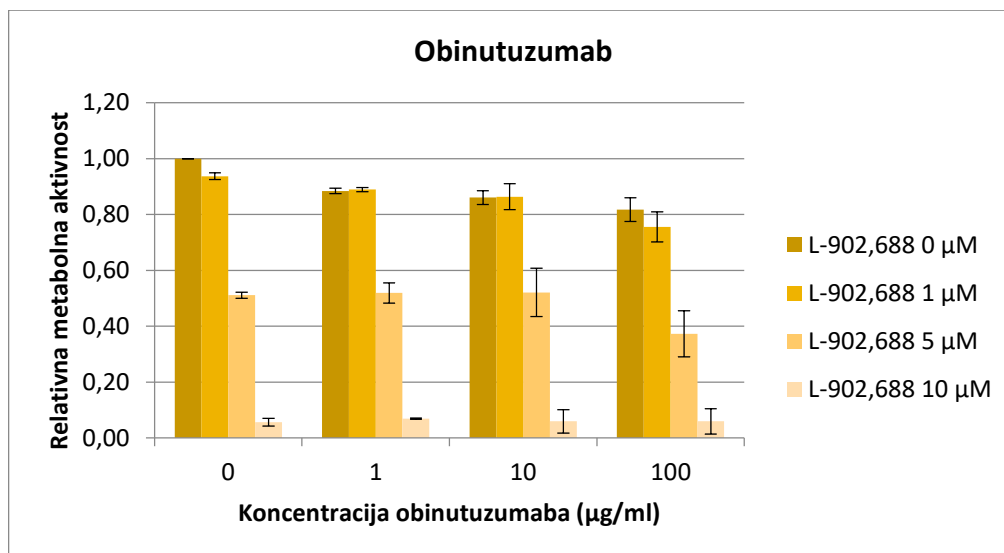


Slika 25: Relativna metabolna aktivnost celic Ramos po 48-urni inkubaciji z ofatumumabom in L-902,688.

Suspenziji celic Ramos ($3,0 \times 10^5$ celic/ml) smo dodali humani serum (1 %). Celice smo tretirali z ofatumumabom (1 µg/ml, 10 µg/ml ter 100 µg/ml), agonistom receptorja EP4 L-902,688 (1 µM, 5 µM in 10 µM) ter kombinacijo obeh. Po 48-urni inkubaciji smo pomerili metabolno aktivnost celic s testom MTS. Poskus smo izvajali v triplicatu in naredili tri neodvisne ponovitve.

Znano je, da aktivacija receptorja EP4 inhibira NF-κB signalno pot, prav tako pa delujeta preko signalne poti NF-κB tudi monoklonska protitelesa usmerjena proti celičnemu označevalcu CD20 (69). Preko inhibicije NF-κB pride do zmanjšanja ekspresije anti-apoptotičnega proteina BCL-xL, kar senzibilizira celice za apoptozo (73, 95, 96). Iz tega sklepamo, da je sinergistično delovanje lahko tudi posledica močnejše indukcije apoptoze.

Zanimalo nas je tudi ali monoklonsko protitelo skupine II, obinutuzumab ter spojina L-902,688 posredujeta sinergistične učinke. Obinutuzumab je imel na celicah Ramos primerljivo učinkovitost kot ostali dve monoklonski protitelesi. Kot vidimo iz grafa (Slika 26) pa v kombinaciji z L-902,688 ni jasno opaznih sinergističnih učinkov v nobeni testni kombinaciji koncentracij. To smo potrdili tudi s programom CompuSyn. Takšen rezultat razloži tudi dejstvo, da je obinutuzumab registriran za zdravljenje KLL in folikularnega limfoma (92).



Slika 26: Relativna metabolna aktivnost celic Ramos po 48-urni inkubaciji z L-902,688 in obinutuzumabom.

Suspenziji celic Ramos ($3,0 \times 10^5$ celic/ml) smo dodali humani serum (1 %). Celice smo tretirali z ofatumumabom (1 µg/ml, 10 µg/ml ter 100 µg/ml), agonistom receptorja EP4 L-902,688 (1 µM, 5 µM in 10 µM) ter kombinacijo obeh. Naredili smo tudi kontrolo topila DMSO. Po 48-urni inkubaciji smo pomerili metabolno aktivnost celic s testom MTS. Poskus smo izvajali v triplicatu in naredili tri neodvisne ponovitve.

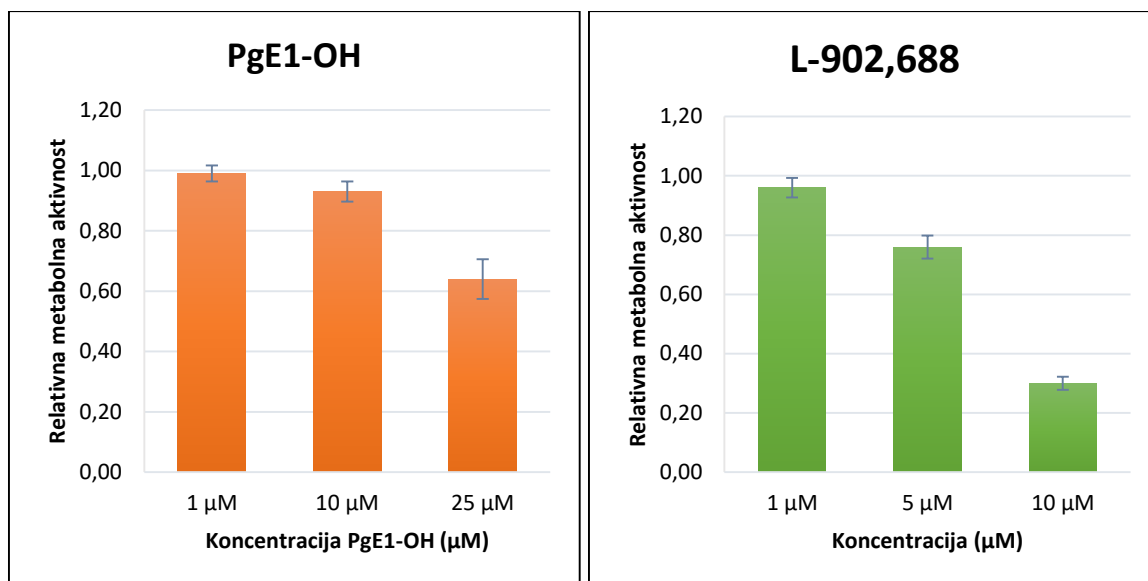
Rezultati naše *in vitro* raziskave nakazujejo, da je kombinacija agonista receptorja EP4 ter rituksimaba ali ofatumumaba v terapiji B-celičnih limfomov bolj obetavna kot kombinacija z obinutuzumabom, ki je registriran za zdravljenje KLL.

4.2.2 Sinergistični učinki na celični liniji MEC1

V terapiji KLL se uporabljajo monoklonska protitelesa rituksimab, ofatumumab, obinutuzumab in alemtuzumab samostojno ali v kombinaciji s kemoterapijo. Kemoimunoterapija vključuje kombinacije monoklonskih protiteles s fludarabinom, ciklofosfamidom, klorambucilom ali bendamustinom (12). Zanimalo nas je, ali agonisti receptorja EP4 in monoklonska protitelesa usmerjena proti celičnem označevalcu CD20 delujejo sinergistično *in vitro* na celični liniji KLL MEC1. V ta namen smo izbrali celično linijo MEC1, ki je pridobljena od 58-letnega moškega diagnosticiranega s KLL v prolimfocitni transformaciji (79). Ugotavljali smo sinergistične učinke terapevtskih monoklonskih protiteles v kombinaciji z agonistoma receptorja EP4 PgE1-OH in L-902,688. Uporabili smo enake koncentracije učinkovin kot na celični liniji Burkittovega limfoma.

Iz slike 27 vidimo, da PgE1-OH pri koncentraciji 1 µM ni imel vpliva na metabolno aktivnost celice MEC1, v koncentraciji 10 µM je bilo metabolno aktivnih še 93 % celic. Po tretiranju z 25 µM PgE1-OH je metabolna aktivnost celic padla na 63 %. Spojina L-902,688

v koncentraciji 1 μM ni imela pomembnega vpliva na metabolno aktivnost celic. 5 μM L-902,688 je zmanjšala metabolno aktivnost celic na 76 %, po tretiranju z 10 μM L-902,688 pa je bilo metabolno aktivnih še 30 % celic.

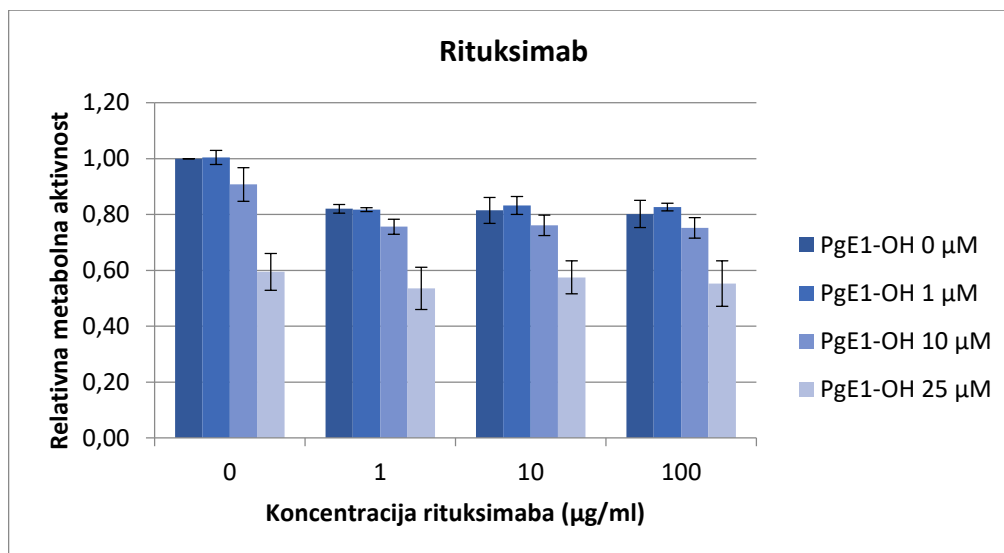


Slika 27: Relativna metabolna aktivnost celic MEC1 po tretiranju z PgE1-OH in L-902,688.

Suspenziji celic MEC1 ($3,0 \times 10^5$ celic/ml) smo dodali humani serum (1 %). Celice smo tretirali z agonistoma receptorja EP4 PgE1-OH (1 μM , 10 μM in 25 μM) ter L-902,688 (1 μM , 5 μM in 10 μM). Po 48-urni inkubaciji smo pomerili metabolno aktivnost celic s testom MTS. Poskus smo izvajali v triplikatu in naredili tri neodvisne ponovitve.

4.2.2.1 Sinergistični učinki PgE1-OH in terapevtskih monoklonskih protiteles

Najprej smo celice MEC1 tretirali z rituksimabom ter PgE1-OH (Slika 28). Ugotovili smo, da je PgE1-OH v koncentraciji 10 μM nekoliko okrepil citotoksične učinke monoklonskega protitelesa. Rituksimab je v terapevtski koncentraciji 10 $\mu\text{g/ml}$ zmanjšal metabolno aktivnost celic na 81 %, PgE1-OH 10 μM je zmanjšal metabolno aktivnost na 91 %, kombinacija obeh pa na 76 %. Po tretiranju celic z agonistom receptorja EP4 PgE1-OH v koncentraciji 25 μM je bilo metabolno aktivnih še 59 % celic. Kombinacija 25 μM PgE1-OH in rituksimaba v vseh testiranih koncentracijah je znižala metabolno aktivnost le za dodatnih 2-5 %. Ugotovili smo, da PgE1-OH in rituksimab v kombinaciji ne znižata metabolne aktivnosti celic MEC1 v primerjavi z vsakim posebej.

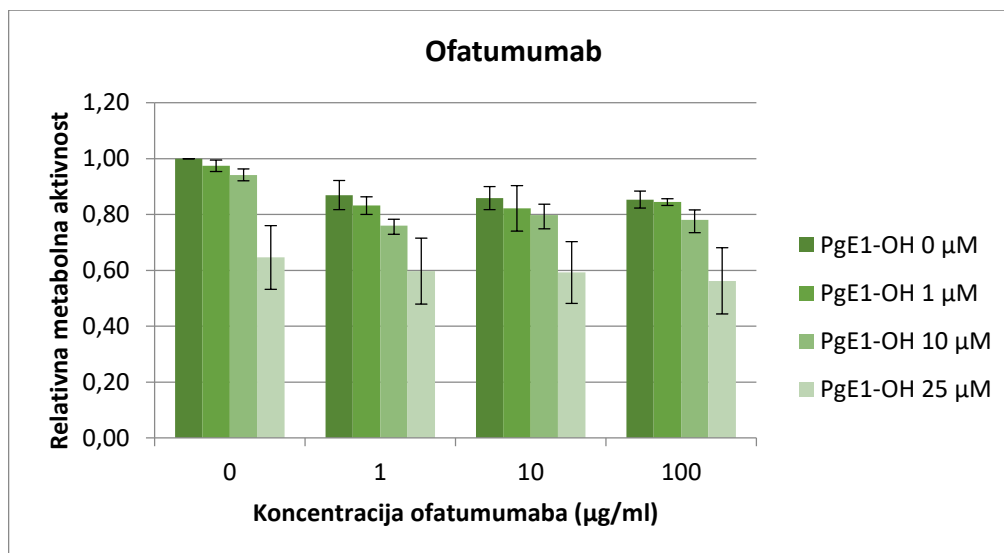


Slika 28: Relativna metabolna aktivnost celic MEC1 po 48-urni inkubaciji s PgE1-OH in rituksimabom.

Suspenziji celic MEC1 ($3,0 \times 10^5$ celic/ml) smo dodali humani serum (1 %). Celice smo tretirali z rituksimabom (1 µg/ml, 10 µg/ml ter 100 µg/ml), agonistom receptorja EP4 PgE1-OH (1 µM, 10 µM in 25 µM) ter kombinacijo obeh. Po 48-urni inkubaciji smo pomerili metabolno aktivnost celic s testom MTS. Poskus smo izvajali v triplikatu in naredili tri neodvisne ponovitve.

Celice smo nato tretirali z ofatumumabom in PgE1-OH (Slika 29). Že pri najnižji koncentraciji ofatumumaba 1 µg/ml, ki je 10-krat nižja od terapevtske, smo zaznali signifikantno razliko ob tretiranju celic z monoklonskim protitelesom in PgE1-OH 10 µM ter kombinacijo obeh. Po tretiranju celic z 1 µg/ml ofatumumabom je bilo metabolno aktivnih 87 %, PgE1-OH v koncentraciji 10 µM je znižal metabolno aktivnost celic na 94 %, kombinacija obeh pa na 76 %. Ugotovili smo tudi, da najnižja koncentracija PgE1-OH (1 µM) in terapevtska koncentracija ofatumumaba, tj. 10 µg/ml, učinkujeta skupaj statistično signifikantno bolje kot vsaka učinkovina posebej.

Obdelava podatkov s CompuSyn (Preglednica X) nam je podala KI, ki kažejo sinergistične učinke v vseh testiranih kombinacijah koncentracij, saj je vrednost KI povsod nižja od 0,5. Vrednosti KI so v primeru 1 µg/ml in 10 µg/ml ofatumumaba v kombinaciji z 1 µM PgE1-OH celo nižji od 0,1, kar pomeni zelo močan sinergizem.



Slika 29: Relativna metabolna aktivnost celic MEC1 po 48-urni inkubaciji s PgE1-OH in ofatumumabom.

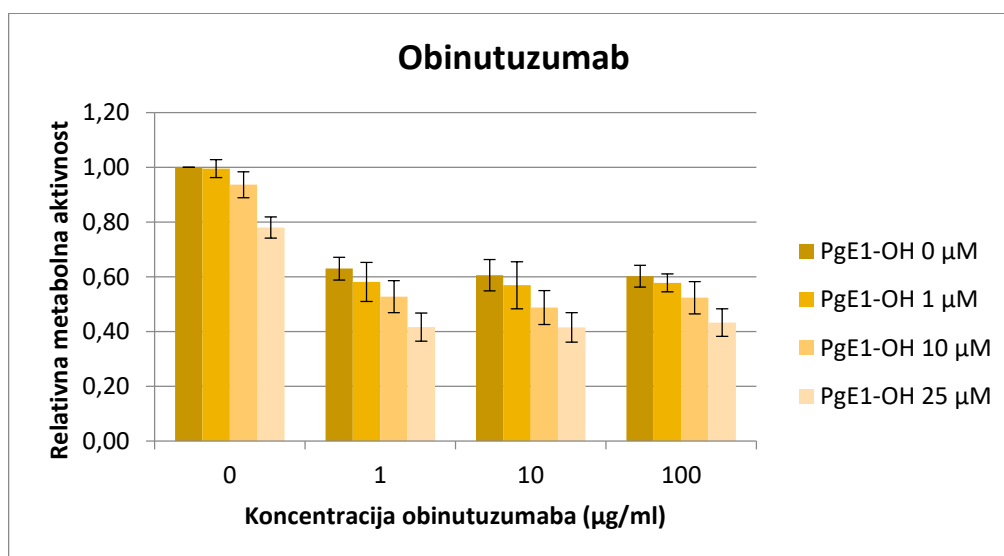
Suspenziji celic MEC1 ($3,0 \times 10^5$ celic/ml) smo dodali humani serum (1 %). Celice smo tretirali z ofatumumabom (1 µg/ml, 10 µg/ml ter 100 µg/ml), agonistom receptorja EP4 PgE1-OH (1 µM, 10 µM in 25 µM) ter kombinacijo obeh. Po 48-urni inkubaciji smo pomerili metabolno aktivnost celic s testom MTS. Poskus smo izvajali v triplikatu in naredili tri neodvisne ponovitve.

Preglednica X: Kombinacijski indeks za ofatumumab in PgE1-OH na celični liniji MEC1

PgE1-OH (µM)	Ofatumumab (µg/ml)	Kombinacijski indeks	Sinergizem
1	1	0,06	+++++
1	10	0,06	+++++
1	100	0,19	++++
10	1	0,37	+++
10	10	0,50	+++
10	100	0,43	+++
25	1	0,35	+++
25	10	0,34	+++
25	100	0,29	++++

Nazadnje smo uporabili še kombinacijo novega, obetajočega monoklonskega protitelesa obinutuzumaba in agonista receptorja EP4 PgE1-OH. Na sliki 30 vidimo, da obinutuzumab izkazuje močno citotoksično delovanje. Metabolna aktivnost celic po tretiranju s terapevtsko koncentracijo obinutuzumaba 10 µg/ml je bila 61 %, kar pomeni precej močnejše citotoksične učinke v primerjavi z rituksimabom in ofatumumabom. Po tretiranju z rituksimabom v koncentraciji 10 µg/ml je bila metabolna aktivnost celic 81 %, po tretiranju celic z ofatumumabom v enaki koncentraciji pa 86 %.

Agonist receptorja EP4 je še okrepil citotoksične učinke monoklonskega protitelesa obinutuzumab (Slika 30). PgE1-OH je v koncentraciji 10 μM znižal metabolno aktivnost celic na 94 %. Pri najnižji testni koncentraciji obinutuzumaba tj. 1 $\mu\text{g/ml}$ je bila metabolna aktivnost celic 63 %, skupaj s PgE1-OH 10 μM pa se je zmanjšala na 53 %. Pri kombinaciji PgE1-OH 25 μM in obinutuzumaba v vseh koncentracijah smo ugotovili statistično signifikantne razlike v preživetju celic v primerjavi s citotoksičnimi učinki, ki jih posreduje obinutuzumab. V terapevtski koncentraciji obinutuzumaba 10 $\mu\text{g/ml}$ v kombinaciji z PgE1-OH 25 μM je padla metabolna aktivnost celic na 42 %. Iz tega sklepamo na močne sinergistične učinke, saj je bila metabolna aktivnost celic po tretiranju s PgE1-OH 25 μM 78 %, po tretiranju z obinutuzumabom 10 $\mu\text{g/ml}$ pa 61 %. S programom CompuSyn smo potrdili močne sinergistične učinke, saj je vrednost $KI = 0,16$, kar pomeni močan sinergizem. Primerljivo znižanje metabolne aktivnosti celic ob tretiranju s PgE1-OH in monoklonskim protitelesom smo dosegli že s koncentracijo obinutuzumaba 1 $\mu\text{g/ml}$.



Slika 30: Relativna metabolna aktivnost celic MEC1 po 48-urni inkubaciji s PgE1-OH in obinutuzumabom.

Suspenziji celic MEC1 ($3,0 \times 10^5$ celic/ml) smo dodali humani serum (1 %). Celice smo tretirali z obinutuzumabom (1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ ter 100 $\mu\text{g/ml}$), agonistom receptorja EP4 PgE1-OH (1 μM , 10 μM in 25 μM) ter kombinacijo obeh. Naredili smo tudi kontrolo topila DMSO. Po 48-urni inkubaciji smo pomerili metabolno aktivnost celic s testom MTS. Poskus smo izvajali v triplicatu in naredili tri neodvisne ponovitve.

V preglednici XI so prikazani kombinacijski indeksi, ki smo jih izračunali s programom CompuSyn. Vidimo, da gre za močne sinergistične učinke v celotnem območju testiranih koncentracij, saj se vrednosti KI gibljejo med 0,01 in 0,16.

Preglednica XI: Kombinacijski indeksi za obinutuzumab in PgE1-OH na celični liniji MEC1.

PgE1-OH (μ M)	Obinutuzumab (μ g/ml)	Kombinacijski indeks	Sinergizem
1	1	0,01	+++++
1	10	0,01	+++++
1	100	0,02	+++++
10	1	0,10	++++
10	10	0,08	+++++
10	100	0,09	+++++
25	1	0,16	++++
25	10	0,16	++++
25	100	0,14	++++

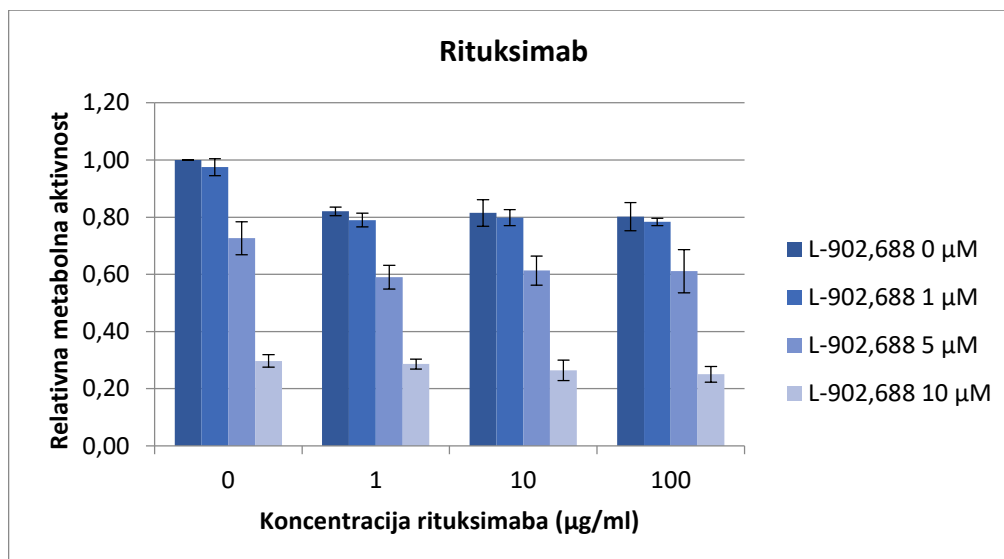
Obinutuzumab predstavlja velik napredek v zdravljenju KLL in se že uporablja v kombinaciji s kemoterapevtiki. Režimi zdravljenja, ki vključujejo obinutuzumab in kemoterapevtike (klorambucil, fludarabin, ciklofosfamid in bendamustin) so se v kliničnih študijah izkazali učinkoviti (97). Iz tega sklepamo, da bi lahko kombinacija PgE1-OH in obinutuzumaba predstavljala potencialen nov terapevtski pristop v zdravljenju KLL, kar smo pokazali z našo *in vitro* študijo.

4.2.2.2 Sinergistični učinki L-902,688 in terapevtskih monoklonskih protiteles

Nadalje smo želeli na celični liniji MEC1 ovrednotiti sinergistične učinke spojine L-902,688 in terapevtskih monoklonskih protiteles. Uporabili smo enake koncentracije učinkovin kot na celični liniji Ramos. Najprej smo celice izpostavili kombinaciji spojine L-902,688 ter rituksimaba.

Iz rezultatov (Slika 31) je razvidno, da je spojina L-902,688 v koncentraciji 5 μ M delovala sinergistično z rituksimabom v celotnem koncentracijskem območju. Rituksimab je zmanjšal metabolno aktivnost celic okoli 80 % v vseh testiranih koncentracijah, L-902,688 v koncentraciji 5 μ M pa na 73 %. L-902,688 je v kombinaciji z najnižjo testirano koncentracijo rituksimaba 1 μ g/ml zmanjšal metabolno aktivnost celic na 59 %. Primerljive rezultate smo dobili tudi z višjimi koncentracijami rituksimaba.

Sinergistično delovanje smo potrdili s programom CompuSyn. Vrednosti KI v tem koncentracijskem območju L-902,688 so se gibale med 0.85 – 0.89 (Priloga 8). V najvišji testirani koncentraciji L-902,688 10 μ M je ta že sam znižal metabolno aktivnost celic na 30 %. Dodatek rituksimaba pa ni statistično značilno znižal metabolne aktivnosti celic.

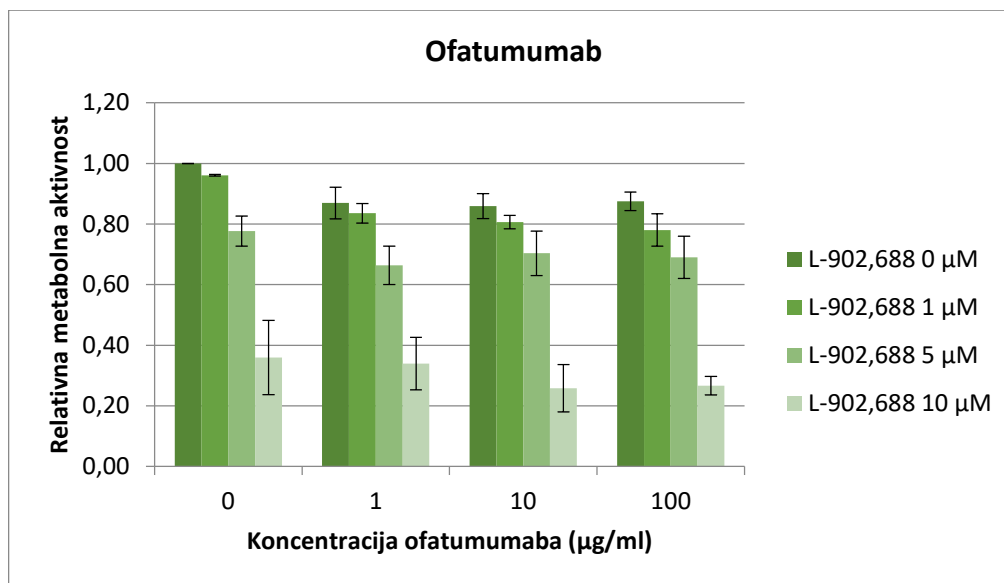


Slika 31: Relativna metabolna aktivnost celic MEC1 po 48-urni inkubaciji z L-902,688 in rituksimabom.

Suspenziji celic MEC1 ($3,0 \times 10^5$ celic/ml) smo dodali humani serum (1 %). Celice smo tretirali z rituksimabom (1 µg/ml, 10 µg/ml ter 100 µg/ml), agonistom receptorja EP4 L-902,688 (1 µM, 5 µM in 10 µM) ter kombinacijo obeh. Naredili smo tudi kontrolo topila DMSO. Po 48-urni inkubaciji smo pomerili metabolno aktivnost celic s testom MTS. Poskus smo izvajali v triplicatu in naredili tri neodvisne ponovitve.

Podobne rezultate kot pri rituksimabu smo dobili tudi pri tretiranju celic MEC1 z L-902,688 in ofatumumabom (Slika 32). Vidimo, da so tako kot pri rituksimabu obetavnejši rezultati v kombinaciji s koncentracijo agonista receptorja EP4 5 µM, v primerjavi z 1 µM. Spojina L-902,688 v koncentraciji 5 µM in ofatumumab v vseh testiranih koncentracijah sta v kombinaciji posredovala močnejše citotoksične učinke kot vsaka učinkovina posebej (Slika 32). Ofatumumab v najnižji koncentraciji je po 48 urah inkubacije zmanjšal metabolno aktivnost celic na 87 %, L-902,688 pa na 78 %. Kombinacija L-902,688 in ofatumumaba je znižala metabolno aktivnost celic na 66 %. Rezultati vseh treh testiranih koncentracij ofatumumaba v kombinaciji z L-902,688 se med seboj skoraj niso razlikovali, kar pomeni, da bi lahko uporabili že 10-krat nižjo koncentracijo od terapevtske za enak učinek na metabolno aktivnost celic.

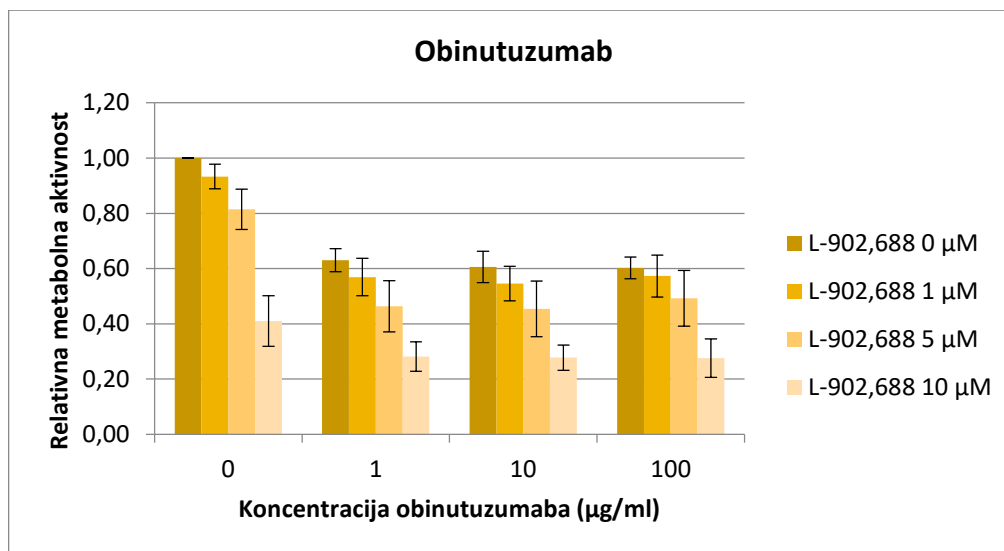
Izračun KI sicer kaže na to, da gre za aditivni učinek spojin, ne sinergistično delovanje, saj so vrednosti KI med 0,90 – 1,02. Uporabili smo tudi koncentracijo agonista L-902,688 10 µM. Po uporabi kombinacije z ofatumumabom se je metabolna aktivnost celic sicer signifikantno zmanjšala, ampak iz grafa (Slika 32) lahko razberemo, da predvsem na račun spojine L-902,688.



Slika 32: Relativna metabolna aktivnost celic MEC1 po 48-urni inkubaciji z L-902,688 in ofatumumabom.

Suspenziji celic MEC1 ($3,0 \times 10^5$ celic/ml) smo dodali humani serum (1 %). Celice smo tretirali z ofatumumabom (1 µg/ml, 10 µg/ml ter 100 µg/ml), agonistom receptorja EP4 L-902,688 (1 µM, 5 µM in 10 µM) ter kombinacijo obeh. Po 48-urni inkubaciji smo pomerili metabolno aktivnost celic s testom MTS. Poskus smo izvajali v triplicatu in naredili tri neodvisne ponovitve.

Nazadnje smo ugotavljali še sinergistično delovanje spojine L-902,688 in obinutuzumaba, ki se je v kombinaciji s PGE1-OH izkazal za najbolj obetavnega na celični liniji MEC1 (Slika 33). Kot že omenjeno, obinutuzumab že sam posreduje opazno močnejše citotoksične učinke kot ofatumumab in rituksimab. Agonist receptorja EP4, L-902,688, je v vseh koncentracijah citotoksične učinke še ojačal v celotnem koncentracijskem območju obinutuzumaba. Po 48 urni inkubaciji celic MEC1 z obinutuzumabom v koncentraciji 1 µg/ml je metabolna aktivnost celic 63 %, v kombinaciji z L-902,688 5 µM pa 46 %. To je tudi 35 % manjša metabolna aktivnost celic, kot smo jo dosegli po inkubaciji z 5 µM L-902,688, ki je znižal metabolno aktivnost na 81 %. Ob izpostavitvi celic agonistu v koncentraciji 10 µM smo v celotnem koncentracijskem območju obinutuzumaba dosegli živost celic 28 %.



Slika 33: Relativna metabolna aktivnost celic MEC1 po 48-urni inkubaciji z obinutuzumabom in L-902,688.

Suspenziji celic MEC1 ($3,0 \times 10^5$ celic/ml) smo dodali humani serum (1 %). Celice smo tretirali z obinutuzumabom (1 µg/ml, 10 µg/ml ter 100 µg/ml), agonistom receptorja EP4 L-902,688 (1 µM, 5 µM in 10 µM) ter kombinacijo obeh. Po 48-urni inkubaciji smo pomerili metabolno aktivnost celic s testom MTS. Poskus smo izvajali v triplicatu in naredili tri neodvisne ponovitve.

Preglednica XII prikazuje izračune KI za L-902,688 ter obinutuzumaba, ki kažejo na sinergistične učinke v vseh kombinacijah agonista in monoklonskega protitelesa.

Preglednica XII: Kombinacijski indeks za L-902,688 in obinutuzumab na celični liniji MEC1.

L-902,688 (µM)	Obinutuzumab (µg/ml)	Kombinacijski indeks	Sinergizem
1	1	0,11	++++
1	10	0,10	++++
1	100	0,13	++++
5	1	0,38	+++
5	10	0,36	+++
5	100	0,48	+++
10	1	0,37	+++
10	10	0,37	+++
10	100	0,37	+++

Iz dobljenih rezultatov sklepamo, da bi lahko bila kombinacija L-902,688 in obinutuzumaba potencialen nov terapevtski pristop pri zdravljenju KLL. Kombinacija obeh učinkovin je izkazala močne citotoksične učinke. Opazili smo, da različne koncentracije monoklonskega protitelesa v kombinaciji z agonisti receptorja EP4 ne povzročijo statistično signifikantnih razlik v preživetju, kar pomeni, da bi potencialno lahko za enak učinek uporabili nižjo koncentracijo zdravila. S tem bi lahko zmanjšali pojavnost stranskih učinkov, kot so

neutropenija in trombocitopenija ter infuzijsko reakcijo. Ti se pogosteje pojavljajo pri obinutuzumabu, kot pri prej omenjenih monoklonskih protitelesih usmerjenih proti CD20 (27, 85).

Izsledke raziskav preučevanja sinergizmov dveh selektivnih agonistov receptorja EP4, PgE1-OH in L-902,688, smo povzeli v preglednici XIII. Na celični liniji Burkittovega limfoma Ramos se je izkazala najbolj učinkovita kombinacija agonistov receptorja EP4 z ofatumumabom. Takšen rezultat je v skladu s podatki o tem, da ima ofatumumab tudi v monoterapiji večji citotoksičen učinek v primerjavi z rituksimabom (98). Močne sinergistične učinke smo opazili tudi v kombinaciji L-902,688 in monoklonskega protitelesa rituksimab, vendar smo z uporabo ofatumumaba in L-902,688 dosegli nižje metabolne aktivnosti celic. Poleg tega je znano, da ofatumumab deluje citotoksično tudi na celice rezistentne na rituksimab, kar dodatno potrjuje njegov potencial v terapiji (21). Z večtarčno terapijo bi lahko tudi zaobšli rezistenco na monoklonska protitelesa rituksimab in ofatumumab, ki se pojavlja zaradi izčrpanih komponent komplekta (29, 32).

Kot lahko razberemo iz preglednice XIII je na celični liniji KLL MEC1 najmočnejše citotoksične učinke posredovala kombinacija agonistov receptorja EP4 in monoklonskega protitelesa obinutuzumab. Obinutuzumab je registriran za zdravljenje KLL in se je v kliničnih študijah že izkazal za uspešnejšega kot rituksimab in ofatumumab (28). Z našo *in vitro* študijo smo ugotovili, da bi lahko bila uporaba PgE1-OH ali L-902,688 kot podporne terapije pri zdravljenju z obinutuzumabom potencialno nov terapevtski pristop za zdravljenje KLL.

Preglednica XIII: Povzetek sinergističnih učinkov na celičnih linijah Ramos in MEC1.

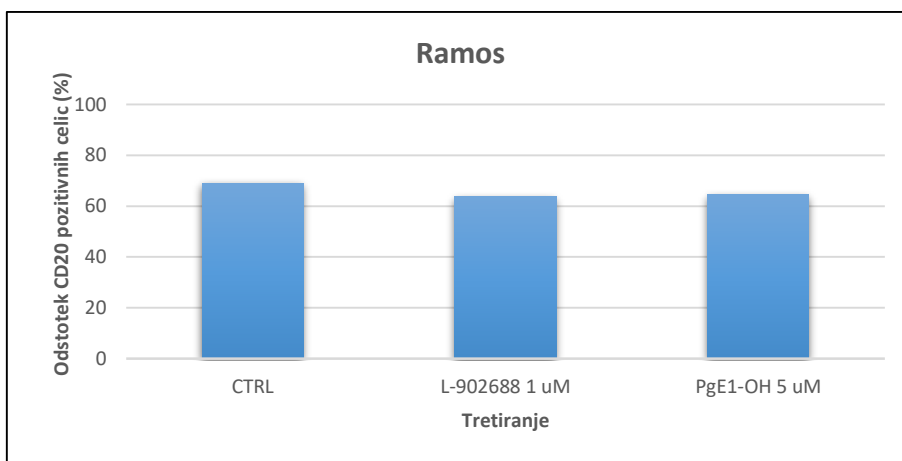
	Celična linija Burkittovega limfoma Ramos		Celična linija kronične limfocitne levkemije MEC1	
	<i>PgE1-OH</i>	<i>L-902,688</i>	<i>PgE1-OH</i>	<i>L-902,688</i>
<i>Rituksimab</i>	+ (94)	++	-	+/-
<i>Ofatumumab</i>	+ (94)	++	+/-	+/-
<i>Obinutuzumab</i>	+/-	-	++	+

Preglednica predstavlja povzetek ugotovljenih sinergističnih učinkov *in vitro* na celičnih linijah Ramos in MEC1. Z »-« smo označili kombinacije pri katerih nismo ugotovili sinergističnih učinkov v nobeni testirani kombinaciji. Rezultate, kjer je kombinacija učinkovin znižala metabolno aktivnost za manj kot <15 %, kot vsaka učinkovina posebej smo označili z »+/-«. Kjer je kombinacija obeh spojin znižala metabolno aktivnost celic za več kot >15 % v primerjavi z 1 smo označili z »+«, če je >20 % pa z »++«.

4.3 Agonisti receptorja EP4 ne modulirajo ekspresije celičnega označevalca CD20

Izražanje celičnega označevalca CD20 na celicah limfocitov B je bistvenega pomena pri zdravljenju z anti-CD20 monoklonskimi protitelesi. Znano je, da je zmanjšanje ekspresije celičnega označevalca CD20 pomeni slabši odziv na zdravljenje (29). Ugotovili so, da nekateri kemoterapevtiki vplivajo na ekspresijo CD20. Gemcitabin, ki se uporablja v zdravljenju difuznega velikoceličnega limfoma B, poveča ekspresijo CD20 in s tem tudi izboljša učinek monoklonskih protiteles (99). Na podlagi teh ugotovitev nas je zanimalo, če imajo tudi agonisti receptorja EP4 vpliv na izražanje celičnega označevalca CD20. V ta namen smo izbrani liniji Ramos in MEC1 tretirali z necitotoksičnimi koncentracijami agonista receptorja EP4 in po 24-urni inkubaciji izmerili ekspresijo CD20 s pretočnim citometrom. Uporabili smo PgE1-OH v koncentraciji 5 μ M in L-902,688 v koncentraciji 1 μ M. Izbrane koncentracije niso imele pomembnega vpliva na preživetje celic, metabolne aktivnosti niso zmanjšale na manj kot 80 %.

S pretočno citometrijo smo ovrednotili ekspresijo molekul CD20 na površini celic Ramos in MEC1 in ugotovili, da izbrana agonista receptorja EP4 v necitotoksičnih koncentracijah nimata pomembnega vpliva na izražanje CD20. V netretiranem alikvotu celic Ramos je po 24-ih urah izražalo CD20 69 % celic. Po tretiranju s PgE1-OH je izražalo CD20 65 % celic, po tretiranju z L-902,688 pa 64 % celic Burkittovega limfoma (Slika 34).

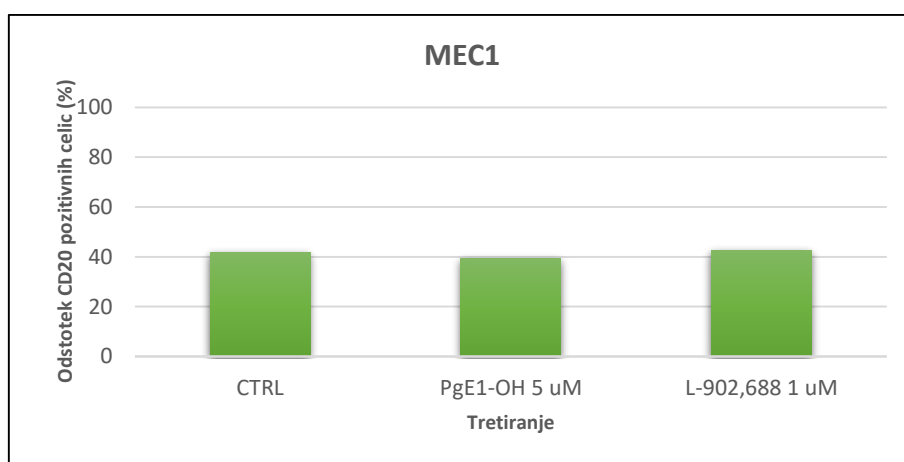


Slika 34: Ekspresija celičnega označevalca CD20 na celicah Ramos po tretiranju z agonisti receptorja EP4.

Celice Ramos ($1,0 \times 10^6$) smo tretirali z PgE1-OH 5 μ M in L-902,688 1 μ M. Po 24-urni inkubaciji smo celicam dodali monoklonsko mišje protitelo proti humanemu označevalcu CD20, ki je konjugirano s fluorokromom, in inkubirali še 15 minut. S pretočno citometrijo smo izmerili ekspresijo CD20.

Ekspresija celičnega označevalca CD20 na površini celic Ramos je primerljiva v vseh treh primerih, zato predvidevamo da PgE1-OH in L-902,688 ne vplivata na modulacijo molekul CD20 na celicah Burkittovega limfoma.

V kontrolnem alikvotu suspenzije celic MEC1 je izražalo celični označevalec CD20 42 % celic. To je v skladu s podatki iz literature, da imajo celice MEC1 manjšo koncentracijo molekul CD20 na površini celic, kot celice Ramos (88) ter z dejstvom, da je CD20 na celicah KLL nizko izražen (8). Iz grafa (Slika 35) razberemo, da se po tretiranju celic MEC1 z agonisti receptorja EP4, ekspresija CD20 ni signifikantno spremenila. Po tretiranju celic s PgE1-OH je CD20 izražalo 40 % celic, po tretiranju s L-902,688 pa 43 % celic. Iz rezultatov sklepamo, da PgE1-OH in L-902,688 ne modulirata ekspresije celičnega označevalca CD20 na celicah KLL.



Slika 35: Ekspresija CD20 na celicah MEC1 po tretiranju z agonisti receptorja EP4.

Celice MEC1 ($1,0 \times 10^6$) smo tretirali z PgE1-OH 5 μ M in L-902,688 1 μ M in inkubirali 24 ur. Nato smo celicam dodali monoklonsko mišje protitelo proti humanemu označevalcu CD20, ki je konjugirano s fluorokromom, in inkubirali še 15 minut. S pretočno citometrijo smo izmerili ekspresijo CD20.

In vitro smo ugotovili, da agonisti receptorja EP4 ne modulirajo ekspresije celičnega označevalca CD20 na limfocitih B. Predvidevamo, da ob sočasni aplikaciji z anti-CD20 monoklonskimi protitelesi, agonisti receptorja EP4 ne bi zmanjšali citotoksičnosti monoklonskih protiteles usmerjenih proti celičnemu označevalcu CD20, saj ne znižajo ekspresije CD20. To se ujema tudi z našimi ugotovitvami o sinergističnem delovanju agonistov receptorja EP4 in monoklonskimi protitelesi usmerjeni proti CD20 *in vitro*. Iz tega sklepamo, da bi bil takšen pristop zdravljenja potencialen v terapiji B-celičnih levkemij in limfomov.

5 SKLEPI

Veliko oviro k dosegu uspešnih kliničnih izidov pri zdravljenju B celičnih levkemij in limfomov predstavlja pojav rezistenc na aktualna zdravila, zato je potrebno iskanje vedno novih tarč in terapevtskih pristopov. Ena izmed potencialnih terapevtskih tarč je receptor EP4. S tem izhodiščem smo želeli ovrednotiti morebitne sinergistične učinke agonistov receptorja EP4 in terapevtskih monoklonskih protiteles usmerjenih proti CD20.

Najprej smo ovrednotili delovanje monoklonskih protiteles na celični liniji Burkittovega limfoma Ramos in kronične limfocitne levkemije MEC1. Ugotovili smo, da so citotoksični učinki monoklonskih protiteles rituksimab in ofatumumab močno odvisni od razpoložljivih komponent komplemента, saj je njun glavni mehanizem delovanja CDC. Obinutuzumab posreduje citotoksične učinke preko indukcije direktne celične smrti in ADCC, zato pomanjkanje beljakovin komplemента nima pomembnega vpliva na njegovo citotoksičnost. Ugotovili smo, da rituksimab in ofatumumab močnejše inducirata CDC na celični liniji Burkittovega limfoma, medtem ko je obinutuzumab bolj citotoksičen za celice KLL. To se sklada z dejstvom, da je registriran za zdravljenje KLL.

V nadaljevanju smo se osredotočili na ugotavljanje sinergističnih učinkov monoklonskih protiteles usmerjenih proti CD20 in agonistov receptorja EP4. Ugotovili smo, da učinkovini rituksimab in ofatumumab posredujeta sinergistične učinke z agonistom receptorja EP4, L-902,688, na celični liniji Ramos. Menimo, bi lahko imel takšen terapevtski pristop potencial v terapiji B-celičnih limfomov. Na celični liniji MEC1 je najmočnejše citotoksične učinke posredoval obinutuzumab v kombinaciji s PgE1-OH in L-902,688. Predvidevamo, da bi lahko bila sočasna administracija obinutuzumaba in agonista receptorja EP4 potencialen učinkovit terapevtski pristop pri zdravljenju KLL, saj bi lahko uporabili nižje odmerke monoklonskih protiteles in s tem zaobšli stranske učinke in zmanjšali stroške zdravljenja.

Na koncu smo želeli preveriti ali izbrana agonista receptorja EP4 vplivata na ekspresijo molekul CD20 na površini celic Burkittovega limfoma in KLL. S pretočno citometrijo smo ugotavljali ekspresijo celičnega označevalca CD20 in ugotovili, da PgE1-OH in L-902,688 nimata vpliva na izražanje celičnega označevalca CD20.

Naša *in vitro* študija predstavlja pomemben doprinos k iskanju novih terapevtskih pristopov pri zdravljenju B-celičnih limfomov in levkemij.

6 LITERATURA

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, in sod. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016.;127(20):2375–90.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018.;68(1):7–30.
3. Društvo BKB [Internet]. [citirano: september 2018.]. Dostopno na: <http://www.drustvo-bkb.si/o-krvnih-bolezni/akutne-in-kronicne-levkemije/>
4. Schmitz R, Ceribelli M, Pittaluga S, Wright G, Staudt LM. Oncogenic Mechanisms in Burkitt Lymphoma. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014.;4(2):a014282–a014282.
5. Biko DM, Anupindi SA, Hernandez A, Kersun L, Bellah R. Childhood Burkitt Lymphoma: Abdominal and Pelvic Imaging Findings. *American Journal of Roentgenology*. 2009.;192(5):1304–15.
6. Molyneux EM, Rochford R, Griffin B, Newton R, Jackson G, Menon G, in sod. Burkitt's lymphoma. *The Lancet*. 2012.;379(9822):1234–44.
7. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet*. 2012.;380(9844):848–57.
8. Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet*. 2018.;391(10129):1524–37.
9. Strati P, Jain N, O'Brien S. Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. 2018.;93(5):651–64.
10. Nabhan C, Raca G, Wang YL. Predicting Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Contemporary Era. *JAMA Oncology*. 2015.;1(7):965.
11. Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) [Internet]. [citirano: november 2018.]. Dostopno na: <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/CLLID2034.html>
12. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment: HALLEK. *American Journal of Hematology*. 2017.;92(9):946–65.
13. Ghia P, Ferreri AJM, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2007.;64(3):234–46.
14. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, in sod. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008.;111(12):5446–56.

15. CLL Staging | Leukemia and Lymphoma Society [Internet]. [citirano: november 2018.]. Dostopno na: <https://www.lls.org/leukemia/chronic-lymphocytic-leukemia/diagnosis/cll-staging>
16. Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Guidelines: Guidelines Summary [Internet]. [citirano: oktober 2018.] Dostopno na: <https://emedicine.medscape.com/article/199313-guidelines>
17. Evans, PharmD SS, Clemmons, PharmD, BCOP AB. Obinutuzumab: A Novel Anti-CD20 Monoclonal Antibody for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology* [Internet]. 2015. [citirano: julij 2018.];6(4). Dostopno na: [http://www.advancedpractitioner.com/issues/volume-6,-number-4-\(julaug-2015\)/obinutuzumab-a-novel-anti-cd20-monoclonal-antibody-for-chronic-lymphocytic-leukemia.aspx](http://www.advancedpractitioner.com/issues/volume-6,-number-4-(julaug-2015)/obinutuzumab-a-novel-anti-cd20-monoclonal-antibody-for-chronic-lymphocytic-leukemia.aspx)
18. Beers SA, Chan CHT, French RR, Cragg MS, Glennie MJ. CD20 as a Target for Therapeutic Type I and II Monoclonal Antibodies. *Seminars in Hematology*. 2010.;47(2):107–14.
19. Štrukelj B, Kos J, Bozovičar K, Bratkovič T, Lunder M, Glavač I, in sod. *Biološka zdravila: Od gena do učinkovine*. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2007. 532–76.
20. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Molecular Immunology*. 2007.;44(16):3823–37.
21. Robak T, Robak E. New Anti-CD20 Monoclonal Antibodies for the Treatment of B-Cell Lymphoid Malignancies: *BioDrugs*. 2011.;25(1):13–25.
22. Lim SH, Beers SA, French RR, Johnson PWM, Glennie MJ, Cragg MS. Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica*. 2010.;95(1):135–43.
23. Marshall MJE, Stopforth RJ, Cragg MS. Therapeutic Antibodies: What Have We Learnt from Targeting CD20 and Where Are We Going? *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2017. [citirano: november 2018.] Dostopno na: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01245/full>
24. Roche's GA101 (obinutuzumab): Engineering an antibody to beat Rituxan | The Haystack [Internet]. [citirano: november 2018.]. Dostopno na: <http://cenblog.org/the-haystack/2013/07/roches-ga101-obinutuzumab-engineering-an-antibody-to-beat-rituxan/>
25. Said R, Tsimberidou AM. Obinutuzumab for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and other B-cell lymphoproliferative disorders. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2017.;1–8.
26. Feugier P. A review of rituximab, the first anti-CD20 monoclonal antibody used in the treatment of B non-Hodgkin's lymphomas. *Future Oncology*. 2015.;11(9):1327–42.

27. Illidge T, Klein C, Sehn LH, Davies A, Salles G, Cartron G. Obinutuzumab in hematologic malignancies: Lessons learned to date. *Cancer Treatment Reviews*. 2015.;41(9):784–92.
28. Butler LA, Tam CS, Seymour JF. Dancing partners at the ball: Rational selection of next generation anti-CD20 antibodies for combination therapy of chronic lymphocytic leukemia in the novel agents era. *Blood Reviews*. 2017.;31(5):318–27.
29. Freeman CL, Sehn LH. A tale of two antibodies: obinutuzumab *versus* rituximab. *British Journal of Haematology*. 2018.;182(1):29–45.
30. Plosker GL, Figgitt DP. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs*. 2003.;63(8):803–43.
31. Tomita A. Genetic and Epigenetic Modulation of CD20 Expression in B-Cell Malignancies: Molecular Mechanisms and Significance to Rituximab Resistance. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*. 2016.;56(2):89–99.
32. Rezvani AR, Maloney DG. Rituximab resistance. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2011.;24(2):203–16.
33. Olejniczak SH, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Clements JL, Czuczman MS. Acquired Resistance to Rituximab Is Associated with Chemotherapy Resistance Resulting from Decreased Bax and Bak Expression. *Clinical Cancer Research*. 2008.;14(5):1550–60.
34. Arzerra (ofatumumab) FDA Approval History - Drugs.com [Internet]. [citirano: oktober 2018.]. Dostopno na: <https://www.drugs.com/history/arzerra.html>
35. Arzerra | European Medicines Agency [Internet]. [citirano: oktober 2018.]. Dostopno na: <https://www.ema.europa.eu/medicines/human/EPAR/arzerra>
36. Soe ZN, Allsup D. The use of ofatumumab in the treatment of B-cell malignancies. *Future Oncology*. 2017.;13(29):2611–28.
37. Babiker HM, Glode AE, Cooke LS, Mahadevan D. Ublituximab for the treatment of CD20 positive B-cell malignancies. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2018.;27(4):407–12.
38. Barth MJ, Czuczman MS. Ofatumumab: a novel, fully human anti-CD20 monoclonal antibody for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Future Oncology*. 2013.;9(12):1829–39.
39. Ratner M. Genentech's glyco-engineered antibody to succeed Rituxan. *Nature Biotechnology*. 2014.;32(1):6–6.
40. Tobinai K, Klein C, Oya N, Fingerle-Rowson G. A Review of Obinutuzumab (GA101), a Novel Type II Anti-CD20 Monoclonal Antibody, for the Treatment of Patients with B-Cell Malignancies. *Advances in Therapy*. 2017.;34(2):324–56.
41. Gazyva (obinutuzumab) FDA Approval History - Drugs.com [Internet]. [citirano: oktober 2018.]. Dostopno na: <https://www.drugs.com/history/gazyva.html>

42. Gazyvaro | European Medicines Agency [Internet]. [citirano: oktober 2018.]. Dostopno na: <https://www.ema.europa.eu/medicines/human/EPAR/gazyvaro>
43. Al-Sawaf O, Fischer K, Engelke A, Pflug N, Hallek M, Goede V. Obinutuzumab in chronic lymphocytic leukemia: design, development and place in therapy. *Drug Design, Development and Therapy*. 2017.;Volume11:295–304.
44. FDA grants orphan drug designation to veltuzumab for ITP [Internet]. [citirano: oktober 2018.]. Dostopno na: <https://www.healio.com/hematology-oncology/hematology/news/online/%7B42042eb4-656d-4596-9853-896c755a2274%7D/fda-grants-orphan-drug-designation-to-veltuzumab-for-itp>
45. Liebman HA, Saleh MN, Bussel JB, Negrea OG, Horne H, Wegener WA, in sod. Low-dose anti-CD20 veltuzumab given intravenously or subcutaneously is active in relapsed immune thrombocytopenia: a phase I study. *British Journal of Haematology*. 2013.;162(5):693–701.
46. Ph I/II Study of Subcutaneously Administered Veltuzumab (hA20) in NHL and CLL - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [citirano: oktober 2018.]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00546793>
47. TG Therapeutics TGTX-1101 [Internet]. [citirano: september 2018.]. Dostopno na: <http://www.tgtherapeutics.com/pipeline/TGTX-1101.cfm>
48. Mulero P, Midaglia L, Montalban X. Ocrelizumab: a new milestone in multiple sclerosis therapy. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. 2018.;11:175628641877302.
49. Davies AJ. A review of tositumomab and I ¹³¹ tositumomab radioimmunotherapy for the treatment of follicular lymphoma. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2005.;5(4):577–88.
50. Xconomy: Why Good Drugs Sometimes Fail: The Bexxar Story [Internet]. Xconomy. 2013 [citirano: september 2018.]. Dostopno na: <https://www.xconomy.com/national/2013/08/26/why-good-drugs-sometimes-fail-in-the-market-the-bexxar-story/>
51. Shadman M, Gopal AK, Kammerer B, Becker PS, Maloney DG, Pender B, in sod. Radioimmunotherapy consolidation using ¹³¹I-tositumomab for patients with chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma in first remission. *Leukemia & Lymphoma*. 2016.;57(3):572–6.
52. Cragg MS. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood*. 2003.;101(3):1045–52.
53. Meyer S, Evers M, Jansen JHM, Buijs J, Broek B, Reitsma SE, in sod. New insights in Type I and II CD20 antibody mechanisms-of-action with a panel of novel CD20 antibodies. *British Journal of Haematology*. 2018.;180(6):808–20.
54. Reed JC. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood*. 2005.;106(2):408–18.

55. Honeychurch J, Alduaij W, Azizyan M, Cheadle EJ, Pelicano H, Ivanov A, in sod. Antibody-induced nonapoptotic cell death in human lymphoma and leukemia cells is mediated through a novel reactive oxygen species-dependent pathway. *Blood*. 2012.;119(15):3523–33.
56. Hauptman J, Žontar D, Zupan IP. Paroksizmalna nočna hemoglobinurija – pregled populacije bolnikov v Sloveniji. *Zdrav Vestn*. 2016.;10.
57. Reference GH. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria [Internet]. Genetics Home Reference. [citirano: avgust 2018.]. Dostopno na: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/paroxysmal-nocturnal-hemoglobinuria>
58. Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2014.;124(18):2804–11.
59. Devalet B, Mullier F, Chatelain B, Dogné J-M, Chatelain C. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review. *European Journal of Haematology*. 2015.;95(3):190–8.
60. Complement membrane attack complex - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [citirano: september 2018.]. Dostopno na: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/complement-membrane-attack-complex>
61. Markovič T, Jakopin Ž, Dolenc MS, Mlinarič-Rašcan I. Structural features of subtype-selective EP receptor modulators. *Drug Discovery Today*. 2017.;22(1):57–71.
62. Nakase H, Fujiyama Y, Oshitani N, Oga T, Nonomura K, Matsuoka T, in sod. Effect of EP4 agonist (ONO-4819CD) for patients with mild to moderate ulcerative colitis refractory to 5-aminosalicylates: A randomized phase II, placebo-controlled trial: *Inflammatory Bowel Diseases*. 2010.;16(5):731–3.
63. Watanabe Y, Murata T, Amakawa M, Miyake Y, Handa T, Konishi K, in sod. KAG-308, a newly-identified EP4-selective agonist shows efficacy for treating ulcerative colitis and can bring about lower risk of colorectal carcinogenesis by oral administration. *European Journal of Pharmacology*. 2015.;754:179–89.
64. KAG 308 - AdisInsight [Internet]. [citirano: oktober 2018.]. Dostopno na: <https://adisinsight.springer.com/drugs/800039010>
65. Zhou Y, Wang W, Zhao C, Wang Y, Wu H, Sun X, in sod. Prostaglandin E2 Inhibits Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation and Allergic Airway Inflammation Through E-Prostanoid 4-Cyclic Adenosine Monophosphate Signaling. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2018. [citirano: september 2018.];9. Dostopno na: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00501/full>
66. Maric J, Ravindran A, Mazzurana L, Björklund ÅK, Van Acker A, Rao A, in sod. Prostaglandin E 2 suppresses human group 2 innate lymphoid cell function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018.;141(5):1761-1773.e6.
67. Konya V, Marsche G, Schuligoi R, Heinemann A. E-type prostanoid receptor 4 (EP4) in disease and therapy. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013.;138(3):485–502.

68. Prostaglandin E1 Alcohol (CAS 21562-57-2) | Cayman Chemical [Internet]. [citirano: september 2018.]. Dostopno na: <https://www.caymanchem.com/product/13020>
69. DeMars KM, McCrea AO, Siwarski DM, Sanz BD, Yang C, Candelario-Jalil E. Protective Effects of L-902,688, a Prostanoid EP4 Receptor Agonist, against Acute Blood-Brain Barrier Damage in Experimental Ischemic Stroke. *Frontiers in Neuroscience* [Internet]. 2018. [citirano: september 2018.];12. Dostopno na: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2018.00089/full>
70. Li F, He B, Ma X, Yu S, Bhawe RR, Lentz SR, in sod. Prostaglandin E1 and Its Analog Misoprostol Inhibit Human CML Stem Cell Self-Renewal via EP4 Receptor Activation and Repression of AP-1. *Cell Stem Cell*. 2017.;21(3):359-373.e5.
71. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Mysodelle 200 mikrogramov vaginalni dostavni sistem [Internet]. [citirano: oktober 2018.]. Dostopno na: [http://www.cbz.si/zzzs/pao/bazazdr2.nsf/o/FFC532879C84F96BC1257CC900831186/\\$File/s-020245.pdf](http://www.cbz.si/zzzs/pao/bazazdr2.nsf/o/FFC532879C84F96BC1257CC900831186/$File/s-020245.pdf)
72. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Topogyne 400 mikrogramov tablete [Internet]. [citirano: oktober 2018.]. Dostopno na: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/DE7E68E6C4AD445CC1257BDA008317FB/\\$File/s-020880.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/DE7E68E6C4AD445CC1257BDA008317FB/$File/s-020880.pdf)
73. Gobec M, Prijatelj M, Delić J, Markovič T, Mlinarič-Raščan I. Chemo-sensitizing effects of EP4 receptor-induced inactivation of nuclear factor- κ B. *European Journal of Pharmacology*. 2014.;742:81–8.
74. Clark P, Rowland SE, Denis D, Mathieu M-C, Stocco R, Poirier H, in sod. MF498 [N-(2-(2-methoxyphenyl)acetamide)], a Selective E Prostanoid Receptor 4 Antagonist, Relieves Joint Inflammation and Pain in Rodent Models of Rheumatoid and Osteoarthritis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008.;325(2):425–34.
75. Avsec D. Magistrska naloga. Univerza v Ljubljani, fakulteta za farmacijo; 2018.
76. PGE2 | CAS 363-24-6 [Internet]. [citirano: oktober 2018.]. Dostopno na: <https://www.scbt.com/scbt/product/pge2-363-24-6>
77. L-902,688 (CAS 634193-54-7) | Cayman Chemical [Internet]. [citirano: september 2018.]. Dostopno na: <https://www.caymanchem.com/product/10007712>
78. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, in sod. Cell Viability Assays [Internet]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2016 [citirano: oktober 2018.]. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
79. Stacchini A, Aragno M, Vallario A, Alfarano A, Circosta P, Gottardi D, in sod. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leukemia Research*. 1999.;23(2):127–36.

80. Rasul E, Salamon D, Nagy N, Leveau B, Banati F, Szenthe K, in sod. The MEC1 and MEC2 Lines Represent Two CLL Subclones in Different Stages of Progression towards Prolymphocytic Leukemia. Pagano JS, urednik. PLoS ONE. 2014.;9(8):e106008.
81. Rana. Prolymphocytic and Richter's Transformation in Peripheral Blood: A Case Report and Review of Literature. Journal of Hematology [Internet]. 2014. [citirano: oktober 2018.]; Dostopno na: <http://www.thejh.org/index.php/jh/article/view/121>
82. Hillmen P, Hall C, Marsh JCW, Elebute M, Bombara MP, Petro BE, in sod. Effect of Eculizumab on Hemolysis and Transfusion Requirements in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. New England Journal of Medicine. 2004.;350(6):552–9.
83. Luzzatto L, Risitano AM, Notaro R. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and eculizumab. Haematologica. 2010.;95(4):523–6.
84. Okroj M, Eriksson I, Österborg A, Blom AM. Killing of CLL and NHL cells by rituximab and ofatumumab under limited availability of complement. Medical Oncology [Internet]. 2013. [citirano: julij 2018.];30(4). Dostopno na: <http://link.springer.com/10.1007/s12032-013-0759-5>
85. Gagez A-L, Cartron G. Obinutuzumab: a new class of anti-CD20 monoclonal antibody. Current Opinion in Oncology. 2014.;26(5):484–91.
86. Herter S, Herting F, Mundigl O, Waldhauer I, Weinzierl T, Fauti T, in sod. Preclinical Activity of the Type II CD20 Antibody GA101 (Obinutuzumab) Compared with Rituximab and Ofatumumab In Vitro and in Xenograft Models. Molecular Cancer Therapeutics. 2013.;12(10):2031–42.
87. Patz M, Isaeva P, Forcob N, Müller B, Frenzel LP, Wendtner C-M, in sod. Comparison of the in vitro effects of the anti-CD20 antibodies rituximab and GA101 on chronic lymphocytic leukaemia cells: GA101 Effects on CLL Cells. British Journal of Haematology. 2011.;152(3):295–306.
88. Klepfish A, Gilles L, Ioannis K, Eliezer R, Ami S. Enhancing the Action of Rituximab in Chronic Lymphocytic Leukemia by Adding Fresh Frozen Plasma: Complement/Rituximab Interactions & Clinical Results in Refractory CLL. Annals of the New York Academy of Sciences. 2009.;1173(1):865–73.
89. Bologna L, Gotti E, Manganini M, Rambaldi A, Intermesoli T, Introna M, in sod. Mechanism of Action of Type II, Glycoengineered, Anti-CD20 Monoclonal Antibody GA101 in B-Chronic Lymphocytic Leukemia Whole Blood Assays in Comparison with Rituximab and Alemtuzumab. The Journal of Immunology. 2011.;186(6):3762–9.
90. Beurskens FJ, Lindorfer MA, Farooqui M, Beum PV, Engelberts P, Mackus WJM, in sod. Exhaustion of cytotoxic effector systems may limit mAb-based immunotherapy in cancer patients. J Immunol. 2012.;188(7):3532–41.

91. van Meerten T. Complement-Induced Cell Death by Rituximab Depends on CD20 Expression Level and Acts Complementary to Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *Clinical Cancer Research*. 2006.;12(13):4027–35.
92. Gazyvaro 1,000 mg concentrate for solution for infusion - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (eMC) [Internet]. [citirano: november 2018.]. Dostopno na: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/3279/smpc>
93. Roche - New long-term data confirm Roche's Gazyva/Gazyvaro extends the lives of people with chronic lymphocytic leukaemia compared to MabThera/Rituxan [Internet]. [citirano: 2018.]. Dostopno na: <https://www.roche.com/media/releases/med-cor-2018-06-15.htm>
94. Markovič T. Vrednotenje učinkovitosti in imunske modulacije agonistov receptorja EP4 in monoklonskih protiteles in vitro, doktorska disertacija. Ljubljana 2018
95. Jazirehi AR, Huerta-Yepez S, Cheng G, Bonavida B. Rituximab (Chimeric Anti-CD20 Monoclonal Antibody) Inhibits the Constitutive Nuclear Factor- κ B Signaling Pathway in Non-Hodgkin's Lymphoma B-Cell Lines: Role in Sensitization to Chemotherapeutic Drug-induced Apoptosis. *Cancer Res*. 2005.;65(1):264–76.
96. Prijatelj M. Prostaglandinski receptor EP4 regulira delovanje limfocitov B, doktorska disertacija. Ljubljana 2011.;
97. blood-2014-12-613570.full.pdf [Internet]. [citirano: november 2018.]. Dostopno na: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/early/2015/03/13/blood-2014-12-613570.full.pdf>
98. Cheson BD. Ofatumumab, a Novel Anti-CD20 Monoclonal Antibody for the Treatment of B-Cell Malignancies. *Journal of Clinical Oncology*. 2010.;28(21):3525–30.
99. Hayashi K, Nagasaki E, Kan S, Ito M, Kamata Y, Homma S, in sod. Gemcitabine enhances rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity to B cell lymphoma by CD20 upregulation. *Cancer Science*. 2016.;107(5):682–9.

7 PRILOGE

Priloga 1: Vrednosti KI za monoklonsko protitelo obinutuzumab v kombinaciji z agonistom receptorja EP4 PgE1-OH na celični liniji Ramos.

PgE1-OH (μ M)	Obinutuzumab (μ g/ml)	Kombinacijski indeks	Sinergizem
1	1	/	ND*
1	10	/	ND
1	100	0,92	+-
10	1	0,97	+-
10	10	0,94	+-
10	100	0,86	+
25	1	1,60	---
25	10	1,62	---
25	100	1,56	---

*ND = not determined (ni določeno)

Priloga 2: Vrednosti KI za monoklonsko protitelo rituksimab v kombinaciji z agonistom receptorja EP4 L-902,688 na celični liniji Ramos.

L-902,688 (μ M)	Rituksimab (μ g/ml)	Kombinacijski indeks	Sinergizem
1	1	/	ND
1	10	0,55	+++
1	100	0,47	+++
5	1	1,17	-
5	10	1,12	-
5	100	1,05	+-
10	1	0,88	+
10	10	0,60	+++
10	100	0,60	+++

Priloga 3: Vrednosti KI za monoklonsko protitelo ofatumumab v kombinaciji z agonistom receptorja EP4 L-902,688 na celični liniji Ramos.

L-902,688 (μ M)	Ofatumumab (μ g/ml)	Kombinacijski indeks	Sinergizem
1	1	1,81	---
1	10	0,68	+++
1	100	2,95	---
5	1	1,00	+-
5	10	0,92	+-
5	100	0,92	+-
10	1	0,60	+++
10	10	0,47	+++
10	100	0,60	+++

Priloga 4: Vrednosti KI za monoklonsko protitelo obinutuzumab v kombinaciji z agonistom receptorja EP4 L-902,688 na celični liniji Ramos.

L-902,688 (μ M)	Obinutuzumab (μ g/ml)	Kombinacijski indeks	Sinergizem
1	1	2,81	---
1	10	2,08	---
1	100	0,47	+++
5	1	1,40	--
5	10	1,40	--
5	100	1,07	+-
10	1	0,86	+
10	10	0,86	+
10	100	0,80	+

Priloga 5: Vrednosti KI za monoklonsko protitelo rituksimab v kombinaciji z agonistom receptorja EP4 PgE1-OH na celični liniji MEC1.

PgE1-OH (μ M)	Rituksimab (μ g/ml)	Kombinacijski indeks	Sinergizem
1	1	1,08	+-
1	10	/	ND
1	100	/	ND
10	1	0,58	+++
10	10	0,58	+++
10	100	0,57	+++
25	1	1,02	+-
25	10	1,06	+-
25	100	1,03	+-

Priloga 6: Vrednosti KI za monoklonsko protitelo ofatumumab v kombinaciji z agonistom receptorja EP4 PgE1-OH na celični liniji MEC1.

PgE1-OH (μ M)	Ofatumumab (μ g/ml)	Kombinacijski indeks	Sinergizem
1	1	0,06	+++++
1	10	0,06	+++++
1	100	0,19	++++
10	1	0,37	+++
10	10	0,50	+++
10	100	0,43	+++
25	1	0,35	+++
25	10	0,34	+++
25	100	0,29	++++

Priloga 7: Vrednosti KI za monoklonsko protitelo obinutuzumab v kombinaciji z agonistom receptorja EP4 PgE1-OH na celični liniji MEC1.

PgE1-OH (μ M)	Obinutuzumab (μ g/ml)	Kombinacijski indeks	Sinergizem
1	1	0,01	+++++
1	10	0,01	+++++
1	100	0,02	+++++
10	1	0,10	++++
10	10	0,08	+++++
10	100	0,09	+++++
25	1	0,16	++++
25	10	0,16	++++
25	100	0,14	++++

Priloga 8: Vrednosti KI za monoklonsko protitelo rituksimab v kombinaciji z agonistom receptorja EP4 L-902,688 na celični liniji MEC1.

L-902,688 (μ M)	Rituksimab (μ g/ml)	Kombinacijski indeks	Sinergizem
1	1	0,29	++++
1	10	0,40	+++
1	100	0,29	++++
5	1	0,85	+
5	10	0,89	+
5	100	0,89	+
10	1	0,85	+
10	10	0,79	++
10	100	0,76	++

Priloga 9: Vrednosti KI za monoklonsko protitelo ofatumumab v kombinaciji z agonistom receptorja EP4 L-902,688 na celični liniji MEC1.

L-902,688 (μ M)	Ofatumumab (μ g/ml)	Kombinacijski indeks	Sinergizem
1	1	0,35	+++
1	10	0,30	+++
1	100	0,27	++++
5	1	0,91	+/-
5	10	1,02	+/-
5	100	0,99	+/-
10	1	0,77	++
10	10	0,60	+++
10	100	0,62	+++

Priloga 10: Vrednosti KI za monoklonsko protitelo obinutuzumab v kombinaciji z agonistom receptorja EP4 L-902,688 na celični liniji MEC1.

L-902,688 (μM)	Obinutuzumab ($\mu\text{g/ml}$)	Kombinacijski indeks	Sinergizem
1	1	0,11	+++
1	10	0,10	+++
1	100	0,13	++++
5	1	0,38	+-
5	10	0,36	+-
5	100	0,48	+-
10	1	0,37	++
10	10	0,37	+++
10	100	0,37	+++