

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**PRIMJENA MONOKLONSKIH PROTUTIJELA U LIJEČENJU MALIGNIH  
HEMATOLOŠKIH BOLESTI**

**MONOCLONAL ANTIBODIES APPLIED IN TREATMENT FOR  
HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES**

**SEMINARSKI RAD**

**Marija Lugar**

**Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)**

**Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić**

**Zagreb, 2018.**

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. MONOKLONSKA PROTUTIJELA.....	3
2.1. Mehanizam djelovanja monoklonskih protutijela.....	4
2.2. Vrste monoklonskih protutijela.....	6
3. MALIGNNE HEMATOLOŠKE BOLESTI.....	8
4. ANTI-LSA.....	9
4.1. Anti-CD20.....	9
4.2. Anti-CD22.....	10
5. ANTI-NLSA.....	12
5.1. Anti-CD58.....	12
5.2. Anti-CD38.....	12
5.2. Anti-CD40.....	13
6. LITERATURA.....	15
7. SAŽETAK.....	17
8. SUMMARY.....	18

## 1. UVOD

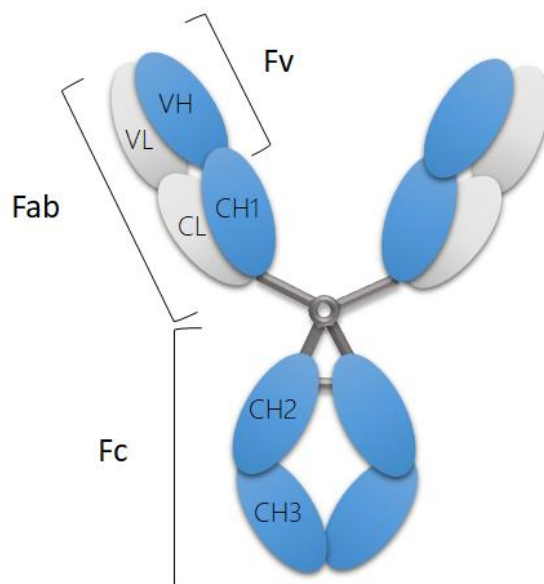
Monoklonska protutijela prepoznaju specifične ciljane antigene, stoga se koriste kao terapija u liječenju solidnih i hematoloških tumora, infekcija i autoimunih bolesti (Jarobe i sur. 2014). Njihova primjena nije ograničena samo na imunoterapiju, već ima široku primjenu u medicini - u otkrivanju nekih tvari u tijelu (npr. hormona, lijekova), mikroorganizama i tumora, pripremi cjepiva i presađivanju tkiva i organa (Andreis i sur. 2010).

Khöler i Milstain, spajanjem besmrtnih mijeloma stanica s mišjim stanicama slezene koje stvaraju protutijela, uspjeli su dobiti hibridoma stanicu – stanicu koja stvara neograničenu količinu monoklonskih protutijela. Prva uspješna primjena monoklonskih protutijela u klinici bila je 1982. godine, kada je postignuta sedmogodišnja remisija kod pacijenta oboljelog od limfoma B-stanica. Djelovanje monoklonskih protutijela mnogostruko je: aktiviraju staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima (engl. *antibody dependent cell cytotoxicity*, ADCC) i toksičnost ovisnu o komplementu (engl. *complement dependent cytotoxicity*, CDC), inhibiraju rast i potiču apoptozu stanica (Jarobe i sur. 2014). Ponekad se koriste kao nosači citotoksičnih tvari poput radioizotopa, katalitičkih toksina i lijekova (Adams i Weiner 2005). Monoklonska protutijela predstavljaju veliki napredak kao ciljane terapije koja smanjuje toksičnost i pospješuje učinkovitost u liječenju malignih bolesti (Tazi i sur. 2011). Imunoterapija, temeljena na monoklonskim protutijelima, proglašena je znanstvenim otkrićem godine u časopisu *Science* 2013. godine (Couzin-Frankel 2013).

Osim što se primjenjuju u liječenju solidnih tumora poput raka dojke, melanoma, raka debelog crijeva, raka pluća i drugih, primjenjuju se i u liječenju hematoloških tumora (Adams i Weiner 2005). Tumorske hematološke stanice idealne su mete za imunoterapiju jer izražavaju velik broj antigena koje imunološki sustav može prepoznati te reagirati na njih (Aurer 2014). Razlikujemo dvije vrste monoklonskih protutijela ovisno o tipu antigena kojeg prepoznaju: antigene specifične za staničnu liniju (engl. *lineage specific antigens*, LSA) velikim afinitetom vežu anti-LSA, dok antigene nespecifične za staničnu liniju (engl. *non-lineage specific antigens*, NLSA) vežu anti-NLSA monoklonska protutijela (Cuesta-Mateos i sur. 2018). U četvrtom i petom poglavlju opisana su tek neka od mnogobrojnih postojećih anti-LSA i anti-NLSA monoklonskih protutijela.

## 2. MONOKLONSKA PROTUTIJELA

Protutijela su glikoproteini koji pripadaju superobitelji imunoglobulina. Stvaraju ih B-stanice, odnosno plazma stanice kao krajnji diferencirani oblik B-stanica. Osnovna građevna jedinica protutijela četverolančana je struktura koju čine dva identična laka i dva identična teška lanca. Ovisno o tipu teškog lanca razlikujemo pet razreda imunoglobulina (Ig), odnosno izotipova: IgG, IgA, IgM, IgE i IgD. Većina monoklonskih protutijela koja se primjenjuje u liječenju bolesti pripada IgG razredu (Slika 1.) (Andreis i sur. 2014). Kod čovjeka postoje četiri podrazreda  $\gamma$ -imunoglobulina (IgG): IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> i IgG<sub>4</sub>. Oboje IgG<sub>1</sub> i IgG<sub>3</sub> aktiviraju ADCC i CDC, ali se IgG<sub>3</sub> ne koristi u terapijske svrhe radi kratkog vremena poluživota, stoga većina monoklonskih protutijela pripada podrazredu IgG<sub>1</sub> (Buss i sur. 2012).



**Slika 1.** Građa  $\gamma$ -imunoglobulina (IgG).

Oznake: CH, konstantna domena teškog lanca; CL, konstantna domena lakog lanca; Fab, antigen-vezujuća regija; Fc, konstantna regija; Fv, vezno mjesto za antigen; VH, varijabilna domena teškog lanca; VL, varijabilna domena lakog lanca. (preuzeto i prilagođeno prema: <https://www.invivogen.com/>)

Aminokrajevi varijabilnih domena teškog i lakog lanca oblikuju vezno mjesto za antigen koje se nalazi u antigen-vezujućoj regiji (engl. *antigen binding fragment*, Fab) tako da Fab obavlja funkciju prepoznavanja antigena, a konstantna regija (engl. *crystalline fragment*, Fc) izvršnu funkciju - aktivira obrambene mehanizme i određuje sekundarna biološka svojstva neovisna o specifičnosti kao što je npr. vrijeme poluživota protutijela. Fab se sastoji od

varijabilne i konstantne domene lakog lanca te varijabilne i prve konstantne domene teškog lanca, a preostale konstantne domene teškog lanca čine Fc (Abbas i sur. 2017, Buss i sur. 2012).

U odgovoru na antigen gotovo uvijek se stvaraju poliklonska protutijela koja proizvode i izlučuju različiti klonovi B-stanica. Poliklonska protutijela heterogena su skupina protutijela koja prepoznaju različite epitope istog antigena. U slučaju multiplog mijeloma, tumora plazma stanica stvara se posve homogena skupina imunoglobulina. Monoklonska protutijela, homogenu skupinu protutijela specifičnih samo za jedan epitop antigena, proizvodi i izlučuje jedna vrsta B-stanica (<https://www.pacificimmunology.com/resources/antibody-introduction/polyclonal-vs-monoclonal-antibodies/>). G. Köhler, C. Milstein i N. K. Jerne prvi puta su 1975. godine izolirali monoklonska protutijela iz klonova stanica (Miličić, 2016). Za otkriće tehnologije hibridoma stanica dodijeljena im je 1984. godine Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu ([https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1984/](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/)).

### *2.1. Mehanizam djelovanja monoklonskih protutijela*

Oboje Fc i Fab određuju mehanizam djelovanja pojedinog monoklonskog protutijela kao lijeka u liječenju malignih bolesti (Cuesta-Mateos i sur. 2018). Mehanizam djelovanja ovisi o samom protutijelu, antigenu na koje je usmjereno te o tome koristi li se samo, u kombinaciji s kemoterapijom ili povezan s radioizotopom ili toksinom (Tazi i sur. 2011). Protutijela mogu imati izravan učinak na stanicu ili mogu djelovati posredno putem ADCC, CDC ili blokiraju vezanje liganda (Slika 2.).

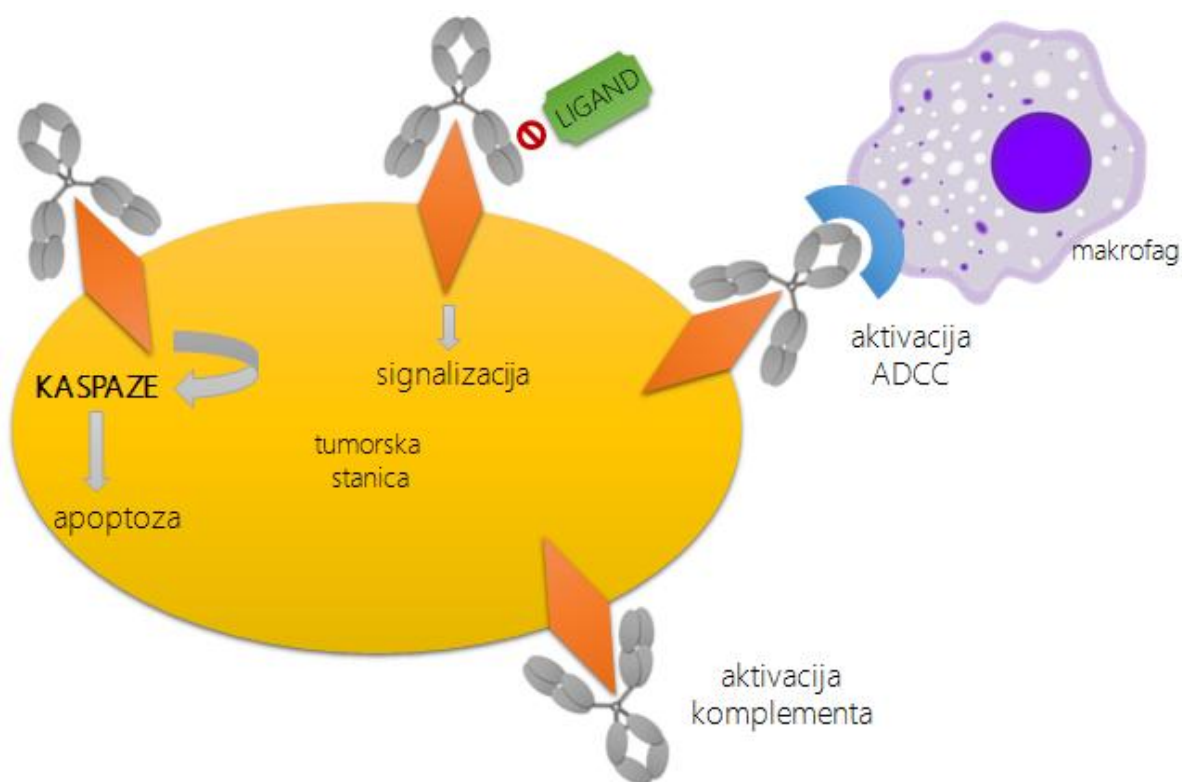
Fc receptor izražen na izvršnim imunološkim stanicama (poglavito NK-stanicama, uz neutrofile i makrofage) veže Fc regiju protutijela čime dolazi do otpuštanja perforina i granzima koji dovode do lize stanica. Na ovaj način aktivira se ADCC. Oslobođene stanične ostatke i antigene prikupljaju antigen predočne stanice i predočavaju ih B-stanicama koje tada stvaraju protutijela na različite epitope antigena tumorskih stanica, i citotoksičnim T-stanicama koje prepoznaju i ubijaju tumorske stanice (Adams i Weiner 2005).

Još jedan mehanizam ubijanja stanica posredovan protutijelima je CDC. Vezanjem IgG na antigen otvaraju se vezna mjesta na Fc regiji za koja se veže C1q komponenta komplementa te tako započinje aktivacija komplementa klasičnim putem, a završava stvaranjem kompleksa koji napada membranu što rezultira lizom stanice (Andreis i sur. 2010). Iako IgM najučinkovitije

aktivira komplement, ne koristi se u terapijske svrhe zbog teške ekstravazacije iz krvožilnih struktura (Adams i Weiner 2005).

Česte mete u liječenju tumora su receptori faktora rasta, općenito prekomjerno izraženi kod velikog broja malignih stanica. U normalnim uvjetima, vezanjem liganda na receptor dolazi do dimerizacije i pokretanja signalnih kaskada što dovodi do proliferacije stanica i neosjetljivosti na citotoksične tvari. Međutim, vezanje protutijela na receptor može onemogućiti vezanje liganda ili spriječiti dimerizaciju receptora, čime se normalizira stanični rast i uspostavlja osjetljivost tumorskih stanica na citotoksične tvari (Adams i Weiner 2005).

Vezanje protutijela može imati izravan učinak na stanicu na način da aktivira signalne putove koji dovode do programirane stanične smrti (apoptoze) (Jarobe i sur. 2014). Za apoptozu je karakteristična aktivacija unutarstaničnih kaspaza, cijepanje DNA, kondenzacija i fragmentacija jezgre te bubrenje stanične membrane (Abbas i sur. 2017).



**Slika 2.** Mehanizam djelovanja monoklonskih protutijela.

(preuzeto i prilagođeno prema: Jarobe i sur. 2014)

## 2.2. Vrste monoklonskih protutijela

Prvotna monoklonska protutijela bila su mišjeg podrijetla, a kasnije su dobivena kimerna, humanizirana i humana (Slika 3.) (Buss i sur. 2012).



**Slika 3.** Vrste monoklonskih protutijela ovisno o podrijetlu.

U zagradama su navedeni nastavci koji se koriste u nazivlju monoklonskih protutijela.  
(preuzeto i prilagođeno prema: Buss i sur. 2012)

Mišja protutijela dobivaju se tehnologijom hibridoma stanica otkrivenom 1975. godine (Miličić 2016). Hibridoma stanica nastaje spajanjem stanice slezene miša imuniziranog poznatim antigenom, odnosno B-stanice koja proizvodi protutijela, sa stanicama mijeloma koje su postale besmrtne. Hibridoma stanice dijele se kontinuirano i proizvode protutijela samo jedne specifičnosti. Primjena ovih protutijela je ograničena jer imunološki sustav čovjeka prepoznaje

mišja protutijela kao strana i pokreće imunološki odgovor na ista pa se mišja protutijela brzo odstranjuju iz organizma (Abbas i sur. 2017).

Tehnikama genetičkog inženjerstva omogućen je razvoj sljedeće generacije protutijela, kimernih protutijela koja se sastoje od mišje varijabilne regije i humane konstantne regije. Ova protutijela imaju dulje vrijeme poluživota te mogu aktivirati ADCC i CDC zahvaljujući humanoj konstantnoj regiji (Miličić 2016). Dugotrajna primjena ovih protutijela također može izazvati stvaranje anti-Ig protutijela (Abbas i sur. 2017).

Daljnji korak u razvoju monoklonskih protutijela bilo je stvaranje humaniziranih i potpuno humanih protutijela. Kod humaniziranih protutijela mišjeg podrijetla je samo regija koja određuje komplementarnost (Miličić 2016). Za dobivanje humanih protutijela koriste se tehnologija rekombinantne DNA za kloniranje DNA i transgenični miševi. U transgeničnim miševima mišji imunoglobulinski geni zamijene se humanima, potom se miševi imuniziraju antigenom kako bi se dobila humana protutijela jedne specifičnosti (Abbas i sur. 2017).



### 3. MALIGNNE HEMATOLOŠKE BOLESTI

Hematološke maligne bolesti obuhvaćaju tumore stanica mijeloidne i limfoidne stanične linije. Prema klasifikaciji hematoloških tumora Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) iz 2008. godine razlikujemo pet osnovnih kategorija u koje se svrstavaju hematološki maligniteti (Tablica 1.) (Campo i sur. 2011).

**Tablica 1.** Osnovna podjela malignih hematoloških bolesti prema klasifikaciji WHO iz 2008. godine\*

Maligne hematološke bolesti
Tumori zrelih B-stanica
Tumori zrelih T-stanica i NK-stanica
Hodkinovi limfomi
Tumori histiocita i dendritičnih stanica
Posttransplantacijski limfoproliferativni poremećaji

\*(preuzeto i prilagođeno iz Campo i sur. 2011)

Ovisno o mjestu nastanka i mjestu gdje se nalazi većina mase tumora, tumori limfocita mogu se podijeliti na nodalne limfome (tumor smješten poglavito u limfnim čvorovima), ektranodalne limfome (tumor se nalazi u ekstralimfatičkim i ekstramedularnim organima, npr. u probavilu, mozgu, plućima) i leukemije (tumor zahvaća koštanu srž i krv). Podjela na limfome i leukemije nije potpuna jer je u nekim slučajevima moguće da se bolest prvotno prikaže kao leukemija, a u povratku bolesti (engl. *relapse*) kao limfom i obratno. U liječenju ovih bolesti najčešće se primjenjuje kemoterapija, zatim radioterapija, imunoterapija, radioimunoterapija te u nekim slučajevima kombinacija intenzivne kemoradioterapije i transplantacije autolognih matičnih hematopoetskih stanica (Aurer 2014).

## 4. ANTI-LSA

Antigeni specifični za pojedinu staničnu liniju, poput nekih CD molekula (engl. *cluster of differentiation*, CD) karakterističnih za određeni diferencijacijski stadij u hematopoezi, potencijalne su mete monoklonskih protutijela u liječenju malignih hematoloških bolesti. Primjerice, izražaj CD19, CD20 i CD22 karakterističan je u diferencijaciji B-stanica, a CD3 specifičan je za T-stanice (Cuesta-Mateos i sur. 2018).

### 4.1. Anti-CD20

Rituximab prvo je monoklonsko protutijelo odobreno za liječenje malignih hematoloških bolesti kod čovjeka 1997. godine. Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) odobrila ga je za liječenje ne-Hodkinovog limfoma i kronične limfocitne leukemije B-stanica. Velikom afinitetom veže se na CD20, membranski protein veličine 33 kDa, specifičan za liniju B-stanica (Cuesta-Mateos i sur. 2018). Prisutan je na B-stanicama u svim diferencijacijskim stadijima, izuzev limfoblata i plazma stanica (Aurer 2014). Rituximab kimerno je monoklonsko IgG<sub>1</sub> protutijelo sastavljeno od mišje Fab i humane Fc regije. Zahvaljujući humanoj konstantnoj regiji duže preživljava u cirkulaciji, učinkovitiji je u aktivaciji CDC i ADCC. Također, vezanjem protutijela na CD20 dolazi do aktivacije unutarstaničnog singlanog puta koji uzrokuje promjenu u protoku kalcijevih iona te dolazi do apoptoze. Osim što ubija maligne, ubija i normalne CD20<sup>+</sup> stanice (Smith 2008). CD20 dobra je meta jer je u velikom broju izražena na stanicama, a manje prisutna u plazmi te prilikom vezanja protutijela ne dolazi do internalizacije ni otpuštanja antigena s površine membrane stanica (Smith 2008, Aurer 2014). Naročito je bitno što kod liječenih pacijenata nije primijećena značajna podložnost infekcijama ni narušenje humoralne imunosti, iako dolazi do smanjenja broja IgM protutijela u plazmi i limfopenije B-stanica (Tazi i sur. 2011).

Danas postoje još četiri anti-CD20 monoklonska protutijela odobrena od strane FDA (Tablica 2.) i zajedno s rituximabom čine više od 30% trenutnih monoklonskih protutijela u primjeni za liječenje malignih bolesti čovjeka. Uspješnost anti-CD20 monoklonskih protutijela potaknula je razvoj još nekoliko monoklonskih protutijela na antigene specifične za pojedinu staničnu liniju kao što su CD19, CD22 i CD79b. Međutim, do danas u kliničkim istraživanjima

nisu pokazali veliku uspješnost zbog internalizacije antigena prilikom vezanja protutijela (Cuesta-Mateos i sur. 2018).

**Tablica 2.** Anti-CD20 monoklonska protutijela (mAb) odobrena od strane FDA\*

mAb	Vrsta	Bolest(i) za koju je odobreno
<b>Rituximab</b>	kimerno	ne-Hodkinov limfom B-stanica, kronična limfocitna leukemija
<b>Ofatumumab</b>	humano	kronična limfocitna leukemija
<b>Veltuzumab</b>	humanizirano	idiopatska trombocitopenija purpura
<b>Ocrelizumuab</b>	humanizirano	multipla skleroza
<b>Obinutuzumab</b>	humanizirano	kronična limfocitna leukemija

\*(preuzeto i prilagođeno prema: Cuesta-Mateos i sur. 2018)

#### 4.2. Anti-CD22

CD22 transmembranski je glikoprotein izražen na zrelih B-stanicama i na većini malignih B-stanica (Lamb 2017). Pretpostavlja se da regulira aktivaciju B-stanica te služi kao adhezijska molekula (Abbas i sur. 2017). Vezanjem protutijela na CD22 dolazi do internalizacije ovog antigen-antitijelo (Ag-Ab) kompleksa, stoga bi se mogao koristiti kao posrednik za dopremu lijeka u obliku imunotoksina (Smith 2008, Farhadfar i Litzow 2016).

Inotuzumab ozogamicin humanizirano je anti-CD22 monoklonsko IgG<sub>4</sub> protutijelo kovalentno vezano na citotoksični derivat kalihemicin, N-acetil- $\gamma$ -kalihemicindimetilhidrazid. Prilikom vezanja protutijela dolazi do internalizacije Ag-Ab kompleksa, otpuštanja kalihemicina u stanicu i konačno apoptoze (Lamb 2017). Kalihemicin, prirodni produkt bakterije *Micromonospora echinospora*, ima antitumorsko djelovanje jer njegovim vezanjem na DNA dolazi do mjesno-specifičnog cijepanja dvolančane DNA (Love i sur. 1992). Inotuzumab ozogamicin odobren je 2017. godine kao monoterapija u liječenju odraslih pacijenata s relapsnom/refraktornom akutnom limfoblastičnom leukemijom (Lamb 2017).

Epratuzumab slobodno je humanizirano anti-CD22 monoklonsko IgG<sub>1</sub> protutijelo koje se internalizira nakon vezanja na CD22. Vezanje ovog protutijela uzrokuje izravnu fosforilaciju uzvodnih (engl. *upstream*) ključnih inhibitornih receptora u signalnom putu receptora B-stanica

(Wei i sur. 2017). Trenutno se ispituje u kliničkim istraživanjima liječenja akutne limfoblastične leukemije i ne-Hodkinovog limfoma B-stanica (Cuesta-Mateos i sur. 2018). Očekuje se povezivanje epratuzumaba s citotoksičnom tvari jer prilikom vezanja ovog protutijelana antigen također dolazi do inetrnalizacije (Wei i sur. 2017).

## 5. ANTI-NLSA

Antigeni nespecifični za staničnu liniju (engl. *non-lineage specific antigens*, NLSA) obuhvaćaju mnoge molekule poglavito izražene na tumorskim stanicama, uključujući onkogenske receptore, kemokinske receptore te molekule uključene u formiranje i održavanje tumorskog mikrookoliša, ali nisu ograničeni na određeni tip stanica ili tkiva. Ovi antigeni potencijalne su univerzalne mete u liječenju raka. Primjerice, anti-NLSA monoklonska protutijela pokazala su se kao dobra opcija u liječenju multiplog mijeloma, poremećaja B-stanica u kojem tumorske stanice ne izražavaju CD-20 (Cuesta-Mateos i sur. 2018).

### 5.1. Anti-CD52

Glikoprotein CD52 (CAMPATH-1) vezan na glikozilfosfatidilinozitol prisutan je na površini B, T i NK-stanica, monocita, makrofaga, eozinofila i dendritičnih stanica, a ne nalazi se na matičnim stanicama koštane srži (Smith 2008, Tazi i sur. 2011). Iako nije poznata točna patofiziološka uloga CD52 u hematološkim malignitetima, molekula CD52 dobra je meta jer je u velikom broju izražena na tumorskim stanicama T-prolimfocitne leukemije, Sezary sindroma, akutne limfoblastične leukemije, kronične limfocitne leukemije i akutne mijeloidne leukemije (Cuesta-Mateos i sur. 2018).

Alemtuzumab humanizirano je anti-CD52 monoklonsko IgG<sub>1</sub> protutijelo. Vezanjem na CD52 aktivira ADCC i CDC te potiče apoptozu stanica. Posljedično dolazi do smanjenja broja T- i B-stanica, odnosno limfopenije i imunosupresije, stoga postoji velik rizik pojave infekcije (Tazi i sur. 2011). Godine 2001. odobren je od strane FDA za liječenje pacijenata s relapsnom/refraktornom kroničnom limfocitnom leukemijom (Adams i Weiner 2005). Koristi se i u liječenju ne-Hodkinovog limfoma T-stanica, ali često dolazi do značajne T-stanične imunodeficijencije i posljedične podložnosti infekcijama, a mogu se pojaviti i granulocitopenija ili trombocitopenija, stoga se oprezno primjenjuje kod pacijenata (Aurer 2014). Povučen je s tržišta 2012. godine iz strateških razloga (Cuesta-Mateos i sur. 2018).

### 5.2. Anti-CD38

Molekula CD38 transmembranski je glikoprotein dvojake funkcije: djeluje kao receptor uključen u adheziju cirkulirajućih limfocita i endotelnih stanica te kao ektoenzim NAD-

hidrolaza/ADPR-ciklaza uključen u mobilizaciju citosolnog kalcija i aktivaciju signalnih puteva koji kontroliraju proliferaciju limfocita i stvaranje inzulina u stanicama gušterače. Izražaj CD38 manji je na stanicama solidnih i hematoloških tkiva, u odnosu na normalne i tumorske plazma stanice kod kojih je iznimno velik izražaj CD38. Trenutno postoje tri vrste anti-CD38 monoklonskih protutijela - isatuximab, MOR202 i daratumumab (van de Donk i sur. 2016).

Daratumumab, humanizirano anti-CD38 monoklonsko IgG<sub>1</sub> protutijelo, prvo je monoklonsko protutijelo odobreno od strane FDA u liječenju multiplog mijeloma i jedino je odobreno anti-CD38 protutijelo zahvaljujući raznolikom antitumorskom djelovanju i velikom afinitetu prema jedinstvenom epitopu CD38 (van de Donk i sur. 2016, Cuesta-Mateos i sur. 2018). Učinkovito aktivira ADCC i CDC, modulira enzimsku aktivnost CD38 te inducira apoptozu. Novija istraživanja ukazuju da utječe na smanjenje populacije supresijskih stanica mijeloidnog podrijetla, regulatornih T- i B-stanica, uz istovremeni porast populacije pomagačkih i citotoksičnih T-stanica, čime je pojačano antitumorsko djelovanje daratumumaba (Krejčík i sur. 2016).

### 5.3. *Anti-CD40*

CD40 transmembranski je protein iz superobitelji receptora za faktor nekroze tumora prisutan na B-stanicama, makrofagima i dendritičnim stanicama. Receptor je za molekulu CD40L (CD154) poglavito izraženu na pomagačkim T-stanicama (Honeychurch i sur. 2015). Međureakcija CD40L na pomagačkim T-stanicama s CD40 na dendritičnim stanicama povećava predočavanje antigena i izražaj kostimulatora na ovim antigen-predočnim stanicama (engl. *antigen-presenting cell*, APC), stoga je CD40 bitan u aktivaciji makrofaga i B-stanica pomagačkim T-stanicama (Honeychurch i sur. 2015, Abbas 2017). Osim što je izražen na normalnim APC, nalazi se i na nekim tumorskim stanicama u slučaju B-staničnog limfoma i raka bubrega pa bi mogao koristiti kao meta za opsonizaciju tumorskih stanica (Hassan i sur. 2014).

Trenutno postoje četiri vrste anti-CD40 monoklonskih protutijela (tri agonističkog i jedno antagonističkog djelovanja) koja se ispituju u kliničkim istraživanjima za liječenje multiplog mijeloma, kronične limfocitne leukemije, ne-Hodgkinovog limfoma i difuznog limfoma velikih B-stanica (Honeychurch i sur. 2015). Agonistička anti-CD40 protutijela mogu imitirati funkciju CD40L i pojačati antitumorski učinak tako što pojačavaju izražaj MHC molekula i kostimulatora

na APC, dodatno aktiviraju pomagačke T-stanice i NK-stanice preko citokina izlučenih iz CD40<sup>+</sup> stanica. Neka anti-CD40 protutijela djeluju antagonistički na način da opsoniziraju tumorske stanice za ostale izvršne mehanizme kao što je ADCC. Trenutno su se najboljim pokazala lucatumumab antagonističkog djelovanja i dacetuzumab djelomičnog agonističkog djelovanja (Hassan i sur. 2014).

## 6. LITERATURA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, 2017. Osnove imunologije: Funkcije i poremećaji imunološkog sustava. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Split, 82-88, 277, 298, 308-309.
- Adams GP, Weiner LM, 2005. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nature biotechnology* **23**, 1147-1157.
- Andreis I, Batinić D, čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M i sur., 2010. Imunologija. Medicinska naklada, Zagreb, 58-73, 258.
- Aurer I, 2014. Hematološki maligniteti. U: Medicinska / internistička onkologija. Ur. Bešlija S, Vrbanec D, Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu, Sarajevo, 491-513.
- Buss N APS, Henderson SJ, McFarlane M, Shenton JM, de Haan L, 2012. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Current Opinion in Pharmacology* **12**, 615-622.
- Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES, 2011. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* **117**, 5019-5032.
- Couzin-Frankel J, 2013. Cancer Immunotherapy. *Science* **342**, 1432-1433.
- Cuesta-Mateos C, Alcaraz-Serna A, Somovilla-Crespo B, Munoz-Calleja C, 2018. Monoclonal Antibody Therapies for Hematological Malignancies: Not Just Lineage-Specific Targets. *Frontiers in Immunology* **3**, 1-33.
- Farhadfar N, Litzow MR, 2016. New monoclonal antibodies for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research* **49**, 13-21.
- Jarboe J, Gupta A, Saif W, 2014. Therapeutic Human Monoclonal Antibodies Against Cancer. U: Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols. Ur. Steinitz M, Pharmaceutical Biotechnology. Springer Science+Business Media, 61-79.
- Krejci J, Casneuf T, Nijhof IS, Verbist B, Bald J, Plesner T, Syed K, Liu K, van de Donk NW, Weiss BM, Ahmadi T, Lokhorst HM, Mutis T, Sasser AK, 2016. Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood* **128**, 384-394.
- Lamb YN, 2017. Inotuzumab Ozogamicin: First Global Approval. *Drugs* **77**, 1603-1610.
- Love SF, Maiese WM, Rothstein DM, 1992. Conditions for protoplasting, regenerating, and transforming the chaliceamicin producer, *Micromonospora echinospora*. *Applied and environmental microbiology* **58**, 1376-1378.



- Miličić E, 2016. Monoklonska protutijela: Humanizacija i imunogenost. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb
- Smith MR, 2008. Antibodies and Hematologic Malignancies. *The Cancer Journal* **14**, 184-190.
- Tazi I, Nafil H, Mahmal L, 2011. Monoclonal antibodies in hematological malignancies: Past, present and future. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* **7**, 399-407.
- van de Donk NWCJ, Janmaat ML, Mutis T, Lammerts van Bueren JJ, Ahmadi T, Sasser A, Lokhorst HM, Parren PWHI, 2016. Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunological reviews* **270**, 95-112.
- Robak T, 2014. Current and emerging monoclonal antibody treatments for chronic lymphocytic leukemia: state of the art. *Expert review of hematology* **7**, 841-857.
- Honeychurch J, Cheadle EJ, Dovedi SJ, Illidge TM, 2015. Immuno-regulatory antibodies for the treatment of cancer. *Expert opinion on biological therapy* **15**, 787-801.
- Hassan SB, Sorensen JF, Olsen BN, Pedersen AE, 2014. Anti-CD40-mediated cancer immunotherapy: an update of recent and ongoing clinical trials. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **36**, 96-104.
- Wei G, Wang J, Huang H, Zhao Y, 2017. Novel immunotherapies for adult patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Journal of hematology and oncology* **10**, 150.
- <https://www.pacificimmunology.com/resources/antibody-introduction/polyclonal-vs-monoclonal-antibodies/> pristupljeno: 14.6.2018
- [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1984/](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/) pristupljeno: 4.6.2018.
- <https://www.invivogen.com/review-antibody-generation/> pristupljeno: 6.6.2018.

## 7. SAŽETAK

Monoklonska protutijela su protutijela monovalentnog afiniteta (vežu isti epitop) nastala iz klonova jedinstvene roditeljske B-stanice. Otkriće tehnologije hibridoma stanica omogućilo je dobivanje mišjih monoklonskih protutijela na željeni antigen, a daljnjim napretkom genetičkog inženjerstva i tehnologije rekombinantne DNA moguće je dobiti kimerna, humanizirana te potpuno humana protutijela. Humanizacijom je poboljšana učinkovitost te je produžen poluživot protutijela. U medicini se koriste kao oblik imunoterapije za liječenje autoimunih bolesti, infekcija i tumora. Monoklonska su protutijela novost u liječenju hematoloških maligniteta, tumora mijeloidne i limfoidne stanične linije, uz uobičajene terapije kao što su kemoterapija, radioterapija i transplantacija hematopoetskih matičnih stanica. Zahvaljujući njihovoj specifičnosti prema tumorskim antigenima i učinku na tumorske stanice (aktivacija ADCC, CDC, indukcija apoptoze i blokiranje vezanja liganda), odlična su opcija u liječenju malignih bolesti. Postoje dvije vrste antigena koje prepoznaju: antigeni specifični za staničnu liniju (LSA) koji se nalaze na određenim stanicama prilikom različitih diferencijacijskih stadija te antigeni nespecifični za staničnu liniju (NLSA) koji nisu ograničeni na pojedinu staničnu liniju. Prvo odobreno monoklonsko protutijelo bio je rituximab, anti-LSA protutijelo na CD20, koje se pokazalo učinkovito u liječenju nekih B-staničnih maligniteta. Od tada, mnoga monoklonska protutijela već su odobrena od strane FDA ili se testiraju u kliničkim istraživanjima.

## 8. SUMMARY

Monoclonal antibodies are antibodies with monovalent affinity (they bind to the same epitope) produced by clones of a unique parent B-cell. Discovery of hybridoma technology made it possible to produce murine monoclonal antibodies specific to known antigens and with further advances in genetic engineering and recombinant DNA technology it was possible to produce chimeric, humanized and completely human antibodies. Humanization of the antibody has improved its efficacy and prolonged its half-life. In medicine they are used as a form of immunotherapy for autoimmune diseases, infections and tumors. Monoclonal antibodies are a novelty in treatment of hematological malignancies, tumors of myeloid and lymphoid cell lineages, alongside common therapies as chemotherapy, radiotherapy and transplantation of hematopoietic stem cells. Due to their specificity for tumor-associated antigens and the effect they have on the tumor cells (activation of ADCC, CDC, induction of apoptosis or blocking ligand binding), they are a great option in treatment of malignancies. There are two types of antigens they recognize: lineage specific antigens (LSA) that are present at different differentiation steps of a certain cell lineage, and non-lineage specific antigens (NLSA) that aren't restricted to a single cell lineage. The first approved monoclonal antibody was rituximab, an anti-LSA antibody targeting CD20, which has shown to be effective in treating some B-cell malignancies. Since then, many monoclonal antibodies have been approved by the FDA or are being tested in clinical trials.