

primenu: od mišjih do humanih

**Zorica Stojić-Vukanić*, Nevena Arsenović-Ranin, Marina Milenković,
Biljana Bufan**

Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, Katedra za mikrobiologiju i imunologiju,
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

* **Autor za korespondenciju:** e-mail zoricasv@pharmacy.bg.ac.rs (Tel: + 381 11 3951224)

Kratak sadržaj

Monoklonska antitela (mAt) i njihovi derivati su najveća grupa proteina koji se koriste u terapiji i predstavljaju segment farmaceutske industrije koji se najbrže razvija. Osobine antitela koje ih čine izuzetno interesantnim za primenu u terapiji su prvenstveno njihova visoka specifičnost za ciljani molekul a zatim i njihova karakteristična građa. Pored visoke specifičnosti, i druge osobine antitela kao što su imunogenost, afinitet, stabilnost, efektorske funkcije, poluživot, penetracija i distribucija u tkiva, moraju se uzeti u obzir kada se ove molekule koriste kao lekovi. Sa stanovišta proizvodnje, što lakše dobijanje, stabilnost i manja cena su najvažniji zadaci koje farmaceutska industrija treba da ostvari.

U ovom radu biće opisana građa i funkcija antitela, savremene metode za dobijanje delimično i kompletno humanih mAt i njihovih derivata, kao i načini za poboljšanje njihovog afiniteta, efektorske funkcije i farmakokinetike.

Ključne reči: monoklonska antitela, derivati antitela, humana antitela, efektorske funkcije

1. Uvod

Monoklonska antitela (mAt) i njihovi derivati su najveća grupa proteina koji se koriste u terapiji i predstavljaju segment farmaceutске industrije koji se najbrže razvija. Trenutno je na tržištu Sjedinjenih Američkih Država (SAD) i Evropske unije (EU) više od 30 antitela odobrenih od strane Agencije za hranu i lekove (engl. Food and Drug Administration, FDA) i Evropske agencije za lekove (engl. European Medicines Agency, EMA) dok je oko 350 mAt u različitim fazama kliničkih studija (1, 2). Na tržištu još uvek dominiraju mAt koja se koriste u terapiji kancera, zatim po zastupljenosti slede preparati mAt za terapiju bolesti u čijoj osnovi su imunološki poremećaji, a sve je više i mAt protiv različitih infektivnih agenasa.

Iako je prvo registrovano mAt bilo poreklom iz miša (muromonab-CD3) dalji razvoj ovih bioloških lekova išao je u pravcu himernih, humanizovanih i naročito, kompletno humanih antitela. Noviji podaci pokazuju (period od 2000. do 2008. godine) da su od svih mAt koja su ušla u kliničke studije, 45% bila humana mAt, 39% humanizovana, dok je procenat himernih (9%) i mišjih (7%) antitela značajno smanjen (3).

Osobine antitela koje ih čine izuzetno interesantnim za primenu u terapiji su prvenstveno njihova visoka specifičnost za ciljni molekul, a zatim i njihova karakteristična građa. Pored visoke specifičnosti, i druge osobine antitela kao što su imunogenost, afinitet, stabilnost, efektorske funkcije, poluživot, penetracija i distribucija u tkiva, moraju se uzeti u obzir kada se ove molekule koriste kao lekovi. Sa stanovišta proizvodnje, što lakše dobijanje, stabilnost i manja cena najvažniji su zadaci koje farmaceutska industrija treba da ostvari.

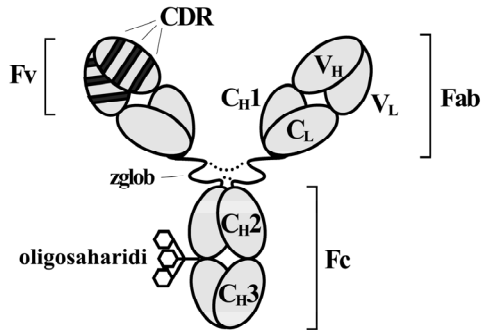
U ovom radu biće opisana građa i funkcija antitela, savremene metode za dobijanje delimično i kompletno humanih mAt i njihovih derivata, kao i načini za poboljšanje njihovog afiniteta, efektorske funkcije i farmakokinetike.

2. Struktura i funkcije antitela

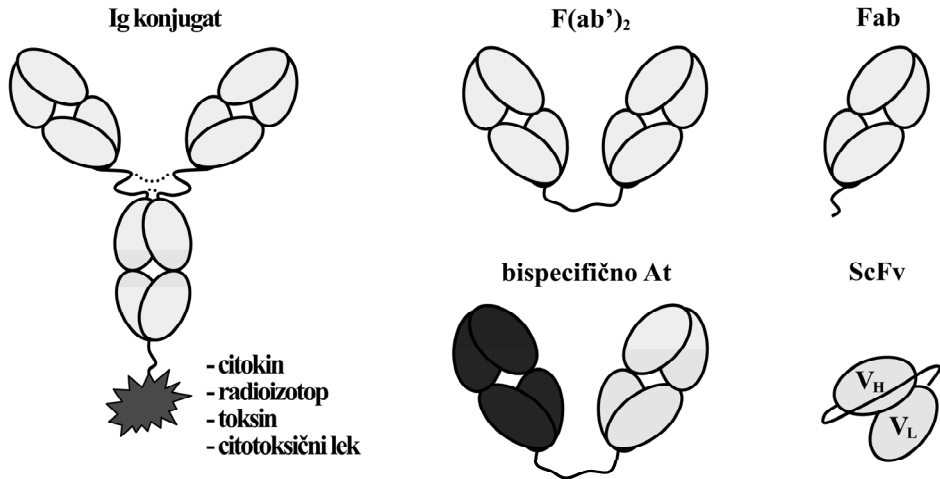
Antitela ili imunoglobulini (Ig) su visoko specifični proteini sekretovani od strane B limfocita čija je uloga da neutrališu i uklone mikroorganizme i njihove toksine. Postoji pet klasa imunoglobulina: IgM, IgG, IgE, IgA i IgD. Sa biotehnoškog aspekta, IgG je najvažnija klasa i kod ljudi postoji četiri potklase IgG - IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4. IgG se sastoji iz dva identična teška (engl. heavy, H) lanca (50 kDa) i dva identična laka (engl. light, L) lanca (25 kDa). Laki lanci IgG se sastoje od jednog varijabilnog (V) domena (VL) i jednog konstantnog (C) domena (CL), dok teške lance čine jedan V domen (VH) i tri C domena (CH1, CH2 i CH3) (Slika 1a).

Funkcijski, molekul antitela se može podeliti na dva fragmenta koji vezuju antigen (engl. fragment antigen binding, Fab) i konstantni Fc region koji je odgovoran za biološku aktivnost i efektorske funkcije antitela, a ime je dobio zbog osobine da kristališe u rastvoru (engl. fragment crystalline). Između Fab i Fc regiona, kod većine antitela, nalazi se savitljivi zglobni region (Slika 1a).

a)



b)



Slika 1. Struktura molekula antitela IgG klase (a), imunokonjugata i derivata antitela (b). Skraćenice: CDR, hipervarijabilni region; Fab, fragment koji vezuje antigen; Fc, konstantni fragment; Fv, varijabilni fragment; C_H , konstantni domen teškog lanca; C_L , konstantni domen lakog lanca; V_H , varijabilni domen teškog lanca; V_L , varijabilni domen lakog lanca; ScFv, jednolančani varijabilni fragment.

Figure 1. The structure of IgG antibody molecule (a), antibody conjugates and fragments (b). Abbreviations: CDR, complementarity determining region (hypervariable region); Fab, antigen-binding fragment; Fc, crystalline fragment; Fv, variable fragment; C_H , heavy chain constant domain; C_L , light chain constant domain; V_H , heavy chain variable domain; V_L , light chain variable domain; ScFv, single-chain variable fragment.

Varijabilni domeni H i L lanaca na aminoterminalnom kraju Fab fragmenata vezuju antigene. U okviru svakog VH i VL domena nalaze se tri hipervarijabilna regiona tj. CDRs (engl. complementarity determining regions) od kojih najveću varijabilnost ima CDR3, i on najviše učestvuje u vezivanju antitela za antigen. Ostale amino-kiseline V regiona okružuju CDR regione i pružanjem potpore omogućavaju njihovo usmeravanje u prostoru ka antigenu (engl. framework residues, FR) (Slika 1a).

Antitela svoje Fc regione (najčešće je to CH2 domen) koriste za aktivaciju različitih efektorskih mehanizama. Čelijska citotoksičnost zavisna od antitela (engl. antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) i citotoksičnost zavisna od komplementa (engl. complement-dependent cytotoxicity, CDC) su najvažniji efektorski mehanizmi pomoću kojih se mikroorganizmi i njihovi toksini eliminišu. Da bi antitela ostvarila te funkcije neophodno je učešće različitih komponenti odbrane domaćina kao što su fagocitne, urođenoubilačke (engl. natural killer, NK) ćelije i sistem komplementa. Tokom ADCC antitela se vezuju za Fc receptore (FcR) koji se nalaze na površini makrofaga i neutrofila (FcγRI) kao i na površini NK ćelija (FcγRIII) i dovode do fagocitoze odnosno lize ciljne ćelije koja je obložena antitelima IgG klase. Kod CDC, vezivanje C1q komponente komplementa za IgG antitela vezana za ciljnu ćeliju dovodi do kaskadnog aktiviranja komponenti komplementa na površini iste ćelije i sledstveno njene lize. Treba naglasiti da je kod ljudi IgG1 potklasa najefikasnija u aktivaciji oba navedena efektorska mehanizma (ADCC i CDC) što je čini najprikladnijom za korišćenje u terapiji tumora i infekcija izazvanih različitim patogenima kod ljudi. S druge strane, IgG4 potklasa je neefikasna u započinjanju ADCC ili CDC, pa se zato ova antitela mogu koristiti u nekim dijagnostičkim procedurama ili pak kada je neophodno blokirati neki molekul na površini ciljne ćelije ali ne i aktivirati efektorske mehanizme imunskog sistema koji će uništiti ciljnu ćeliju.

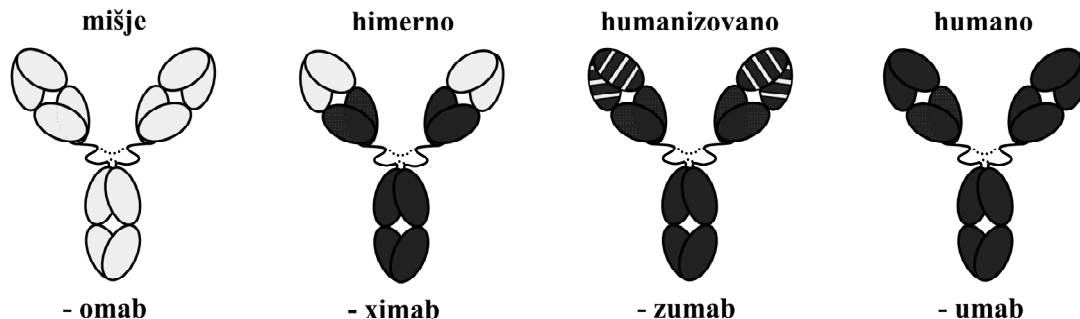
Pored važne uloge Fc regiona u aktivaciji efektorskih ćelija imunskog sistema, ovaj region je povezan i sa vremenom poluživota IgG antitela u serumu. Naime, jedan tip FcR, nazvan neonatalni FcR (FcRn) jer je ispoljen u placenti i ima važnu ulogu u neonatalnom imunitetu, ispoljen je i u endotelu i nekim drugim tipovima ćelija odraslih osoba, gde učestvuje u zaštiti IgG antitela od intracelularnog katabolizma. Kada endotelne ćelije preuzmu IgG antitela, FcRn, koji se nalazi u endozomima endotelnih ćelija, vezuje se za antitela između CH2 i CH3 domena. Ovako vezana IgG antitela su zaštićena od degradacije u lizozomima i vraćaju se nazad u cirkulaciju. Kao posledica ovog procesa IgG antitela imaju poluživot od oko tri nedelje (23 dana) što je mnogo duže od poluživota ostalih klasa antitela (npr. poluživot antitela IgA klase je 6, IgM je 5 i IgE klase je 2 dana). Ova osobina Fc regiona IgG antitela je od izuzetnog značaja u praksi kod dizajniranja bioloških lekova. Tako, ako želimo da smanjimo poluživot antitela koje se koristi u terapiji umesto kompletnog molekula IgG mogu se koristiti samo Fab fragmenti, ili ako želimo da produžimo poluživot nekom proteinu koji se

koristi u terapiji možemo ga vezati za Fc region IgG (npr. vezivanje solubilnih receptora za citokine za Fc fragment humanog IgG molekula) (4).

3. Razvoj monoklonskih antitela za terapijsku primenu

3.1. Mišja monoklonska antitela

Nakon otkrića i uspostavljanja tehnologije hibridoma 1975. godine, koja je omogućila dobijanje mAt nakon fuzije besmrtnih ćelija mijeloma sa B ćelijama slezine miša koje proizvode antitelo željene specifičnosti, nastala je prva generacija mišjih mAt koja je korišćena u terapijske svrhe (5, 6) (Slika 2). Istorijski, najznačajnije je anti-CD3 mišje mAt, muromonab (Orthoclone OKT3[®], Tabela I) jer je to prvo antitelo koje je odobreno 1986. godine za sprečavanje odbacivanja transplantiranog bubrega. Uprkos velikim očekivanjima, ova terapija nije pokazala dobre rezultate. Uzrok leži u činjenici da su mišja mAt imunogena za čoveka i da terapija ovim antitelima, naročito ponovljena, dovodi do teških imunoloških reakcija u organizmu pacijenta, kao posledica nastanka humanih anti-mišjih antitela (engl. human anti-mouse antibody, HAMA) (7). Podaci dobijeni analizom stvaranja antitela u organizmu pacijenta (anti-antibody response; AAR) nakon primene 44 različita mišja mAt pokazuju da 84% mišjih mAt indukuje značajan HAMA odgovor, dok samo 7% odnosno 9% odgovor koji se može tolerisati ili zanemariti (8).



Slika 2. Šematski prikaz mišjih, himernih, humanizovanih i humanih antitela. U internacionalnom nezaštićenom nazivu antitela sufix -omab označava mišja, -ximab himerna, -zumab humanizovana, a -umab humana antitela.

Figure 2. Schematic representations of mouse, himeric, humanized and human antibodies. International non-proprietary naming convention: -omab, murine; -ximab, chimeric; -zumab, humanized; -umab, human.

3.2. Himerna monoklonska antitela

U cilju smanjenja imunogenosti mišjih mAt, genetičkim inženjeringom je konstruisano himerno antitelo čiji su varijabilni regioni mišjeg, a konstantni humanog porekla (9, 10). Suština ove tehnike je da se iz hibridoma izoluju geni koji kodiraju teške i lake lance mišjeg mAt željene specifičnosti, dok se iz humanih B limfocita izoluju geni koji kodiraju teške i lake lance humanih antitela. Zatim se genetičkim inženjeringom konstruišu himerni geni koji se sastoje iz mišjih gena koji kodiraju varijabilne regione i humanih gena koji kodiraju konstantne regione teških i lakih lanaca. Kada se himerni geni ubace u ćelije ovarijuma kineskog hrčka (engl. Chinese hamster ovary, CHO), ili mišje mijelomske ćelijske linije (NS0 i SP2/0) doći će do sinteze i sekrecije himernih antitela koja su oko 70% humana (Slika 2). Ova antitela imaju istu specifičnost za ciljni molekul kao i mišje mAt iz kog su nastala, dok su poluzivot i efektorske funkcije mnogo sličnije humanom antitelu. Osam godina od uvođenja mišjeg, Orthoclone OKT3[®] u terapiju, 1994. godine, drugo antitelo odobreno za terapiju sprečavanja koagulacije krvi bilo je abciksimab, Fab fragment himernog mAt (ReoPro[®], Tabela I). Od tada još pet himernih mAt je odobreno i koristi se u terapiji različitih oboljenja (Tabela I). Iako su himerna antitela manje imunogena za čoveka od mišjih, i ona mogu dovesti do značajnog stvaranja humanih anti-himernih antitela (engl. human anti-himeric antibody, HACA). Analizom 15 himernih antitela sa jasnim AAR, 40% himernih antitela je imalo značajan HACA odgovor, dok je 27% odnosno 33% imalo HACA odgovor koji se mogao zanemariti ili tolerisati (8).

3.3. Humanizovana monoklonska antitela

Dalji napredak u dizajniranju mAt, sa još boljim osobinama a manjom imunogenošću, odnosio se na presađivanje samo najvarijabilnijih, CDR regiona mišjeg antitela u humani molekul antitela, jer kao što je već ranije pomenuto, ti regioni su najvažniji za kontakt sa specifičnim antigenom (10, 11). Međutim, antitelo koje je nastalo kao rezultat presađivanja samo CDR regiona često je imalo značajno smanjen afinitet vezivanja za antigen. Da bi se ovaj problem prevazišao i zadržao afinitet originalnog mišjeg antitela, u molekul humanog antitela, pored CDR regiona, presađene su i okvirne mišje sekvence koje podržavaju orijentaciju CDR u prostoru, čime je značajno unapređen razvoj humanizovanih mAt. Novonastalo humanizovano antitelo je bilo više od 90% humano (Slika 2). Od 1997. godine, kada je daklizumab (Zenapax[®]) prvo humanizovano antitelo specifično za alfa lanac receptora za interleukin (IL)-2 primenjeno u terapiji sprečavanja akutnog odbacivanja transplantiranog bubrega, još devet humanizovanih mAt je odobreno za terapiju i u kliničkoj je primeni (Tabela I). Podaci dobijeni analizom stvaranja antitela u organizmu pacijenta nakon primene 22 humanizovana antitela pokazuju prisustvo humanih anti-humanizovanih antitela

(HAHA), pri čemu je kod samo 9% primenjenih antitela HAHA odgovor bio značajan, dok je kod 55% on bio zanemarljiv ili se mogao tolerisati (36%) (8).

Analizom stvaranja antitela u organizmu pacijenta nakon primene mišjih, himernih ili humanizovanih mAt jasno je pokazano da himerizacija odnosno humanizacija mišjih antitela značajno smanjuje njihovu imunogenost. Međutim, i himerna i humanizovana mAt pokazuju skoro jednake procenete AAR koji se mogu tolerisati (27% himerna u odnosu na 36% humanizovana) ili zanemariti (33% himerna u odnosu na 55% humanizovana) što ukazuje na neophodnost smanjivanja imunogenosti i himernih i humanizovanih antitela.

3.4. Humana monoklonska antitela

Krajnji cilj u razvoju mAt za terapijsku primenu bio je postići potpunu biokompatibilnost tj. konstruisati mAt koje će se sastojati od kompletno humanih polipeptidnih lanaca. Dok je proizvodnja mišjih mAt postala rutina, proizvodnja humanih mAt klasičnom tehnologijom hibridoma je bila otežana i manje uspešna jer su humani hibridomi bili nestabilni i *in vivo* imunizacija ljudi, za razliku od miša, nije bila moguća za većinu antigena. Međutim, razvoj metoda za ispoljavanje fragmenata antitela u bakterijama i prikazivanje tih fragmenata na bakteriofagima tzv. "phage-display" tehnologija, kao i moćne tehnike za selekciju fragmenata antitela koji imaju željenu specifičnost za određeni ciljni antigen, omogućio je nastanak humanih mAt (12-14). Pored, "phage-display" tehnologije za dobijanje humanih mAt koriste se i transgeni miševi koji sadrže gene za humane imunoglobuline (15).

3.4.1. „Phage-display” tehnologija

Antitela visokog afiniteta nastaju rekombinacijom različitih genskih segmenata koji kodiraju varijabilni region antitela i somatskim hipermutacijama gena za imunoglobuline, najčešće u okviru CDR regiona (4). "Phage-display" tehnologija može uspešno da imitira imunski sistem jer omogućava: i) formiranje velike biblioteke gena koji će kodirati antitela ili samo njihove delove koji vezuju antigen i ii) selekciju fragmenata antitela koji će se najvećim afinitetom vezati za željeni ciljni molekul.

U prirodnom molekulu At varijabilni regioni teškog i lakog lanca su delovi različitih polipeptidnih lanaca. Međutim, nove tehnologije su omogućile kombinovanje varijabilnih regiona oba lanca u okviru jednog polipeptidnog lanca pri čemu nastaje funkcijski protein koji vezuje antigen. To mini-antitelo naziva se jednolančani varijabilni fragment (engl. single-chain variable fragment, ScFv) (Slika 1b). U njemu su VH i VL povezani fleksibilnim peptidnim lancem, (Gly₄Ser)₃, koji olakšava orijentaciju CDR ka antigenu na isti način kao što je to u prirodnom antitelu. ScFv proteini se ispoljavaju na spoljnoj strani bakteriofaga vezani za gP3 protein njegovog omotača. Replikacijom bakteriofaga u *E. coli* nastaje biblioteka faga koji ispoljavaju ScFv

fragmente specifične za širok spektar antigena. Izlaganjem takve biblioteke bakteriofaga imobilisanom antigenu od interesa, moguće je selektivno izolovati fag za koji je vezan odgovarajući ScFv.

Korišćenjem velikog repertoara naivnih (repertoar V gena nastao kloniranjem gena za antitela izolovanih iz neimunizovanih jedinki; najčešći izvor iRNK su limfociti periferne krvi, kostna srž, tonzile i dr.) i sintetičkih (repertoar V gena nastaje *in vitro*) biblioteka moguće je izolovati ScFv antitela visokog afiniteta koja prepoznaju, kako strane, tako i sopstvene antigene. Nakon odabira ScFv koji se visokim afinitetom vezuje za ciljni antigen, izoluju se geni koji kodiraju varijabilne regione teškog i lakog lanca i koriste za sintetisanje kompletnog antitela kombinacijom sa genima za konstantne regione, slično kao što je već opisano kod dobijanja himernih antitela (12-14). Jedina razlika između himernih antitela i antitela dobijenih „phage-display” tehnologijom je da su ova druga kompletno humana (Slika 2). Prvo humano mAt dobijeno zahvaljujući „phage-display” tehnologiji je adalimumab (Humira®), i ono je 2002. godine odobreno od strane FDA i primenjeno u terapiji reumatoidnog artritisa (Tabela I).

Tabela I Monoklonska antitela odobrena za terapijsku primenu u Evropskoj uniji (EU) i Sjedinjenim Američkim Državama (SAD)¹

Table I Therapeutic monoclonal antibodies approved in the European Union and United States of America¹

Internacionalni nezaštićen naziv (Zaštićen naziv)	Tip	Ciljni molekul	Prva primena za koju je mAt odobreno	Godina kada je odobreno u EU (SAD)
Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®)	mišje IgG2	CD3	profilaksa akutnog odbacivanja organa	1986 (1986#)
Abciximab (Reopro®)	himerno IgG1 Fab	GP1Ib/IIIa	sprečavanje koagulacije krvi	1995 (1994)
Rituksimab (MabThera®, Rituxan®)*	himerno IgG1	CD20	Non-Hodgkin-ov limfom, reumatoidni artritis	1998 (1997)
Baziliximab (Simulect®)*	himerno IgG1	IL-2R	profilaksa akutnog odbacivanja organa	1998 (1998)
Daklizumab (Zenapax®)*	humanizovano IgG1	IL-2R	profilaksa akutnog odbacivanja organa	1999 (1997)#
Palivizumab (Synagis®)*	humanizovano IgG1	RSV	prevencija infekcije RSV	1999 (1998)
Infliksimab (Remicade®)*	himerno IgG1	TNF- α	Crohn-ova bolest	1999 (1998)
Trastuzumab (Herceptin®)*	humanizovano IgG1	HER2	metastatski karcinom dojke	2000 (1998)
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®)	humanizovano IgG4	CD33	akutna mijeloidna leukemija	NO (2000#)
Alemtuzumab (MabCampath®, Campath-1H®)	humanizovano IgG1	CD52	hronična mijeloidna leukemija	2001 (2001)
Adalimumab (Humira®)*	humano IgG1	TNF- α	reumatoidni artritis	2003 (2002)

Internacionalni nezaštićen naziv (Zaštićen naziv)	Tip	Ciljni molekul	Prva primena za koju je mAt odobreno	Godina kada je odobreno u EU (SAD)
Tozitumomab-J ¹³¹ (Bexxar [®])	mišje IgG2	CD20	Non-Hodgkin-ov limfom	NO (2003)
Efalizumab (Raptiva [®])	humanizovano IgG1	CD11a	psorijaza	2004 (2003)#
Cetuxsimab (Erbix [®])*	himerno IgG1	EGFR	metastatski kolorektalni karcinom	2004 (2004)
Ibritumomab tiuksetan (Zevalin [®])	mišje IgG1	CD20	Non-Hodgkin-ov limfom	2004 (2002)
Omalizumab (Xolair [®])*	humanizovano IgG1	IgE	astma	2005 (2003)
Bevacizumab (Avastin [®])*	humanizovano IgG1	VEGF	kolorektalni karcinom	2005 (2004)
Natalizumab (Tysabri [®])*	humanizovano IgG4	α -4 integrin	multipla skleroza	2006 (2004)
Ranibizumab (Lucentis [®])*	humanizovano IgG1	VEGF	neovaskularna senilna makularna degeneracija	2007 (2006)
Panitumumab (Vectibix [®])	humano IgG2	EGFR	kolorektalni karcinom	2007 (2006)
Eculizumab (Soliris [®])	humanizovano IgG2/4	C5	paroksizomalna noćna hemoglobinurija	2007 (2007)
Certolizumab pegol (Cimzia [®])	humanizovano IgG1 Fab, pegilovan	TNF- α	Crohn-ova bolest	2009 (2008)
Golimumab (Simponi [®])*	humano IgG1	TNF- α	reumatoidni i psorijazni artritis, ankiloz. spondilitis	2009 (2009)
Canakinumab (Ilaris [®])	humano IgG1	IL-1 β	Muckle-Wells sindrom	2009 (2009)
Catumaksomab (Removab [®])	pacov IgG2/ miš IgG2 bispecifično	EPCAM/CD3	maligni ascites	2009 (NO)
Ustekinumab (Stelara [®])*	humano IgG1	IL-12/IL-23	psorijaza	2009 (2009)
Tocilizumab (RoActemra, Actemra [®])*	humanizovano IgG1	IL-6R	reumatoidni artritis	2009 (2010)
Ofatumumab (Arzerra [®])	humano IgG1	CD20	hronična limfocitna leukemija	2010 (2009)
Denozumab (Prolia [®])*	humano IgG2	RANK-L	gubitak koštane mase	2010 (2010)
Belimumab (Benlysta [®])	humano IgG1	BlyS	sistemski eritemski lupus	2011 (2011)
Ipilimumab (Yervoy [®])	humano IgG1	CTLA-4	metastatski melanom	2011 (2011)
Brentuksimab vedotin (Adcetris [®])	himerno IgG1; imunokonjugat	CD30	Hodgkin-ov limfom, anaplasični limfom krupnih ćelija	(2011)

¹Podaci za tabelu su preuzeti iz ref. 1 i modifikovani u skladu sa Nacionalnim registrom lekova Republike Srbije; *mAt koja se nalaze u Nacionalnom registru lekova Republike Srbije iz 2011. god.; #mAt povučena sa tržišta EU i/ili SAD; Skraćenice: CD, klaster diferencijacije; GP, glikoprotein; IL, interleukin; R, receptor; RSV, respiratorni sincicijalni virus; TNF, faktor nekroze tumora; HER, receptor za humani epidermalni faktor rasta; EGFR, receptor za epidermalni faktor rasta; VEGF, faktor rasta vaskularnog endotela; C, komplement; EPCAM, adhezivni molekul epitelnih ćelija; RANK-L, receptor aktivator NF κ B-ligand; BlyS, stimulator B limfocita; CTLA-4, antigen citotoksičnih T limfocita; NO, nije odobreno.

3.4.2. Transgeni miševi

Humana mAt se mogu dobiti i korišćenjem transgenih miševa koji, umesto svojih, imaju gene za humane imunoglobuline. Kada se miševima funkcijski inaktiviraju geni za imunoglobuline oni ne mogu da produkuju antitela i nemaju zrele B limfocite. Međutim, ubacivanjem segmenata DNK koji sadrže veći deo gena za humane teške i lake lance imunoglobulina ovi miševi sintetišu i sekretuju humana antitela, kod kojih dolazi i do promene klase i do afinitetnog sazrevanja (15-17). Kada se ovi transgeni miševi, imunizuju bilo kojim antigenom, oni će produkovati humana antitela visokog afiniteta specifična za taj antigen, odnosno ćelije hibridoma, nastale fuzijom ćelija slezine imunizovanih transgenih miševa i ćelija mijeloma, sekretovaće humana antitela u neograničenoj količini. Panitumumab (Vectibix[®]) je prvo humano antitelo dobijeno uz pomoć transgenih miševa koje je 2006. godine odobreno za terapiju kolorektalnog karcinoma u SAD. Do marta 2012. godine još 6 humanih mAt dobijenih ovom tehnologijom odobreno je za kliničku primenu u SAD i/ili EU (1-3).

3.5. Derivati antitela

Antitela su velike molekule (150 kDa) koje slabo difunduju iz cirkulacije u npr. solidne mase tumora i sporo se uklanjaju iz organizma. Imajući u vidu da antitela Fab fragmentom prepoznaju antigen, a Fc fragmentom vrše efektorske funkcije, u terapiji mnogih bolesti dovoljno je samo da antitelo prepozna specifično ciljni molekul, dok prisustvo Fc fragmenta nije neophodno. Ova saznanja su usmerila proizvodnju antitela od celih molekula ka njihovim derivatima koji sadrže samo varijabilne regione, imaju bolji klirens, bolju penetraciju u tkiva/tumore i pogodniji su za primenu u dijagnostičkim procedurama i/ili terapiji radioaktivnim supstancama (10, 17) (Slika 1b).

Derivati antitela mogu da se primenjuju u terapiji onih bolesti gde samo prepoznavanje antigena od strane antitela i njegovo sledstveno vezivanje direktno utiče na funkciju antigena tj. ciljnog molekula. Ako je antigen neki enzim, antitelo može da se vezuje u blizini aktivnog mesta enzima i na taj način inhibira njegovu funkciju. U slučaju da je antigen neki receptor, ispoljen na površini ćelije, vezivanje antitela za njega će ometati vezivanje liganda, ili može biti sintetisano antitelo koje će imitirati vezivanje liganda u smislu pokretanja aktivacijskih signala posredstvom specifičnog receptora. Takođe, brojni derivati antitela su sintetisani i koriste se za neutralisanje liganada kao što su različiti hormoni, citokini ili neki toksini (npr. zmijski otrov) i sprečavanje njihovog dejstva posredstvom specifičnih receptora (Tabela I).

Posebnu kategoriju derivata antitela predstavljaju bispecifična antitela. Ona se sastoje od dva Fab fragmenta koji potiču iz roditeljskih antitela različite specifičnosti (Slika 1b). Cilj dizajniranja ovakvih antitela je da se ćelije imunskog sistema dovedu u bliski kontakt sa ćelijama tumora. U tu svrhu jedan Fab fragment se specifično vezuje za molekul ispoljen na tumorskoj ćeliji dok se drugi vezuje za molekul ispoljen na

efektorskoj ćeliji (citotoksični T limfocit, granulocit i dr.). Bilo bi idealno da bispecifično antitelo, pored dovođenja ćelija u bliski kontakt, i aktivira efektorske ćelije. To se i ostvaruje korišćenjem bispecifičnih antitela kod kojih je jedan od Fab fragmenata specifičan za FcR (neutrofili, makrofage i dr.) ili CD3 (T limfocit) tj. molekule koji aktiviraju efektorske ćelije (18-20). Catumaksomab (Removab[®]) je primer bispecifičnog mAt koje je odobreno u EU za terapiju malignog ascitesa, a čiji je jedan Fab fragment specifičan za adhezivni molekul epitelnih ćelija (engl. epithelial cell adhesion molecule, EPCAM), a drugi za CD3 molekul na T limfocitu (Tabela I).

3.6. Nove efektorske funkcije

U literaturi postoje podaci koji ukazuju na rezistenciju ćelija tumora na ubijanje posredstvom ADCC i CDC, što ukazuje na potrebu, bar kod terapije određenih tumora, za uvođenjem novih efektorskih funkcija antitela.

To se najčešće ostvaruje vezivanjem mAt ili njihovih derivata za citotoksične lekove (gemtuzumab ozogamicin i brentuksimab vedotin, Tabela I), toksine (ricin), citokine (interleukin (IL)-2, faktor nekroze tumora (TNF)- α), enzime i dr. U svim navedenim slučajevima antitelo služi kao nosač koji će vezanu supstancu dopremiti do ciljnog tkiva, gde će ona ostvariti svoje biološko dejstvo uz minimum sporednih efekata na okolno tkivo (Slika 1b).

Kada se za antitelo vezuju radioizotopi (¹³¹J, ⁹⁰Y), u zavisnosti od prirode i doze radioizotopa (mogu se koristiti niske doze γ emitera ili visoke doze α ili β emitera sa ograničenom prodornošću), ovi konjugati se mogu koristiti u dijagnostici ili terapiji tumora (tozitumomab-¹³¹J i ibritumomab tiuksetan, Tabela I) (Slika 1b).

3.7. Poboljšanje afiniteta vezivanja za antigen, efektorskih funkcija i farmakokinetike antitela

Savremene metode genetičkog inženjeringa omogućavaju kontinuirano poboljšanje osobina antitela i njihovih derivata u smislu povećanja njihovog afiniteta, poboljšanja efektorskih funkcija i promene farmakokinetike.

Najviše pažnje, za sada, posvećuje se povećavanju afiniteta vezivanja antitela za antigen, jer se smatra da će ove promene doprineti primeni manjih doza antitela u terapiji, koje će imati istu pa čak i veću biološku aktivnost, što bi povećalo terapijsku širinu i smanjilo toksičnost i cenu ovih bioloških lekova. Poređenjem i analizom brojnih studija pokazano je da između afiniteta antitela i njegove biološke aktivnosti postoji linearna zavisnost do određenog stepena i da ona zavisi u velikoj meri od prirode antigena i ciljnog tkiva, gustine antigena na ciljnom tkivu i od mehanizma delovanja antitela koje se koristi u terapiji (10, 21). Afinitetno sazrevanje antitela mnogo je poboljšano uvođenjem „phage-display” tehnologije koja omogućava kreiranje velikih biblioteka fragmenata a zatim i selekciju onih sa visokim afinitetom.

Kod onih antitela koja se primenjuju u terapiji, a svoj efekat ostvaruju, ne samo vezivanjem za antigen, već i aktivacijom ćelija imunskog sistema, dosta pažnje se posvećuje poboljšanju njihovog vezivanja za Fc γ R ili komponente komplementa. U nekim slučajevima, kao što je već ranije pomenuto, kada je aktivacija ADCC ili CDC nepoželjna, jer se lizom ciljnih ćelija oslobađaju brojni proinflamatorni citokini, dizajn takvih antitela tokom sinteze ide u smeru korišćenja IgG potklase koja se slabo vezuje za Fc γ R ili komponente komplementa.

Generalno, povećavanjem afiniteta Fc fragmenta antitela za FcR povećava se i njihova efektorska funkcija. S obzirom da je danas dobro poznato da u ovoj interakciji učestvuju oligosaharidi Fc regiona i brojni ostaci amino-kiselina koji se nalaze u regionu zgloba i CH2 domena antitela, poboljšanje ADCC funkcije genetičkim inženjeringom uključuje promene u glikozilaciji Fc regiona IgG i promene u aminokiselinama koje su odgovorne za vezivanje za Fc γ R (10, 22, 23).

Aktivacija komplementa se pokreće vezivanjem njegove prve komponente C1q za region zgloba i CH2 domen antitela. Danas se zna da su aminokiseline na poziciji 270, 322, 329 i 331 u okviru CH2 domena odgovorne za vezivanje C1q komponente, i da zamena jedne ili više amino-kiselina na ovim pozicijama poboljšava vezivanje C1q i sledstvenu aktivaciju komplementa (10, 22, 23).

Kada je reč o farmakokinetici sva istraživanja su usmerena ka poboljšanju vezivanja IgG za FcRn, jer se time produžava i poluživot mAt. Ovo se najčešće ostvaruje zamenom amino-kiselina u okviru mesta za vezivanje antitela za neonatalni receptor (24). Produženje poluživota derivata antitela, kada je to potrebno u terapiji, ostvaruje se vezivanjem lanaca polietilen glikola (PEG) za derivate antitela (PEGilacija) (25). Vezivanjem PEG-a ne produžava se samo poluživot derivata antitela (smanjenje redistribucije iz cirkulacije u ekstravaskularni prostor) već se povećava i njihova rastvorljivost, a smanjuje imunogenost i osetljivost na razgradnju od strane proteaza.

4. Zaključak

Danas, nakon skoro četiri decenije od primene prvog mišjeg monoklonskog antitela u terapijske svrhe, ova grupa bioloških lekova je našla svoje mesto u savremenoj terapiji. Dalji razvoj ovih lekova će verovatno ići u pravcu stvaranja manjih molekula tj. derivata antitela, koji će imati veću stabilnost i poluživot, i efikasnije reagovati sa ćelijama imunskog sistema. Analiza mAt koja su krajem 2011. godine bila u trećoj fazi kliničkih ispitivanja ukazuje da uskoro na tržištu možemo očekivati mAt za terapiju, ne samo kancera i imunoloških poremećaja, već i hemofilije i Alzheimer-ove bolesti (2).

Literatura

1. Reichert JM. Marketed therapeutic antibodies compendium. *MAbs* 2012; 4: 413-15.
2. Reichert JM. Which are the antibodies to watch in 2012? *MAbs* 2012; 4: 1-3.
3. Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nature Rev Drug Discov* 2010; 9: 767- 74.
4. Abbas AK, Lichtman AH. Osnovna imunologija: funkcije i poremećaji imunskog sistema. Beograd: Data status, 2008.
5. Arsenović-Ranin N, Stojić-Vukanić Z, Bufan B. Priručnik za praktičnu nastavu iz imunologije i imunohemije. Beograd: Farmaceutski fakultet, 2007.
6. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-97.
7. Tjandra JJ, Ramadi L, McKenzie IF. Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients. *Immunol Cell Biol* 1990; 68: 367-76.
8. Hwang WYK, Foote J. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* 2005; 36: 3-10.
9. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules; mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 21: 6851-55.
10. Kim SJ, Park y, Hong HJ. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol Cells* 2005; 20: 17-29.
11. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from mouse. *Nature* 1986; 321: 522-25.
12. Huse WD, Sastry L, Iverson SA, Kang AS, Alting-Mees M, Burton DR, et al. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science* 1989; 246: 1275-81.
13. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228: 1315-17.
14. Schirrmann T, Meyer T, Schutte M, Frenzel A, Hust M. Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy. *Molecules* 2011; 16: 412-26.
15. Lonberg N, Huszar D. Human antibodies from transgenic mice. *Int Rev Immunol* 1995; 13: 65-93.
16. Neuberger M. Generating high-avidity human Mabs in mice. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 826. doi: 10.1038/nbt0796-826a.
17. Van Dijk MA, Van de Winkel JGJ. Human antibodies as next generation therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 2001; 5: 368-74.
18. Staerz UD, Kanagawa O, Bevan MJ. Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature* 1985; 314: 628-31.
19. Kontermann RE, Muller D. Recombinant bispecific antibodies for cellular cancer immunotherapy. *Curr Opin Mol Ther* 2007; 9: 319-26.
20. Baeuerle PA, Kufer P, Bargou R. BiTE: Teaching antibodies to engage T cells for cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther* 2009; 11: 22-30.
21. Adams GP, Schier R, Marshall K, Wolf EJ, McCall AM, Marks JD et al. Increased affinity leads to improved selective tumor delivery of single-chain Fv antibodies. *Cancer Res* 1998; 58: 485-90.
22. Lund J, Takahashi N, Pound JD, Goodall M, Jefferis R. Multiple interactions of IgG with its core oligosaccharide can modulate recognition by complement and human Fcγ receptor I and influence the synthesis of its oligosaccharide chains. *J Immunol* 1996; 157: 4963-69.

23. Kubota T, Niwa R, Satoh M, Akinaga S, Shitara K, Hanai N. Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions. *Cancer Sci* 2009; 100: 1566–72.
24. Dall'Acqua WF, Woods RM, Ward ES, Palaszynski SR, Patel NK, Brewah YA et al. Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: Biological consequences. *J Immunol* 2002; 169: 5171-80.
25. Chapman AP. PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 531-45.

Development of therapeutic monoclonal antibodies: from the mouse to the human

Zorica Stojić-Vukanić*, Nevena Arsenović-Ranin, Marina Milenković, Biljana Bufan

University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Microbiology and Immunology, 450 Vojvode Stepe, 11221 Belgrade, Serbia

*Corresponding author: e-mail zoricascv@pharmacy.bg.ac.rs (Tel: + 381 11 3951224)

Summary

Therapeutical monoclonal antibodies (mAbs) represent one of the fastest growing area of the pharmaceutical industry. High target specificity and specific molecular structure are features that make antibodies attractive drug candidates for therapeutical use. Besides high specificity, other characteristics including immunogenicity, affinity, effector functions, half-life as well as easy of production, stability and cost must be considered when an antibody is designed as drug.

In this paper the structure and function of antibody, new technologies for the generation of partly and fully human mAbs and their fragments and methods for enhancing their affinity, effector functions and pharmacokinetics will be describe.

Keywords: monoclonal antibodies, antibody fragments, human antibodies, effector functions
