

Wykorzystanie przeciwciał monoklonalnych do celów terapeutycznych

Maciej Kurpisz

Zakład Genetyki Człowieka PAN

Poznań

Od chwili uzyskania przez Kohlera i Milsteina (1) pierwszych przeciwciał monoklonalnych minęło ponad 15 lat; dokonał się olbrzymi postęp w naukach medycznych, a szczególnie immunologii. Wiele z tego postępu zawdzięcza się zresztą uzyskaniu znakomitego narzędzia badawczego, którym okazały się przeciwciała monoklonalne (w identyfikacji z wysoką specyficznością substancji biologicznych i chemicznych). Obecnie znacznie wzrosły „wymagania” wobec przeciwciał monoklonalnych. Oczekuje się ich wielorakiego wykorzystania w: naukach medycznych, monitorowaniu czynników bakteryjnych, toksycznych, zanieczyszczeń produktów żywnościowych itd. Przeciwciała monoklonalne stanowią od kilku lat podstawowy składnik zestawów wykrywających rozmaite substancje lub komórki w testach: radioimmunologicznym, immunosorbentowym z użyciem znacznika enzymatycznego, odczynach immunocytochemicznych lub cytometrii przepływowej. Oczekuje się jeszcze szerszego stosowania przeciwciał monoklonalnych w diagnostyce medycznej i immunoterapii, zwłaszcza zaś postępu w identyfikacji i terapii nowotworów oraz modulacji odpowiedzi immunologicznej, tj. zarówno jej wzmacnianiu lub supresji. Ta ostatnia możliwość byłaby przydatna w wygaszaniu procesu autoimmunologicznego (chorób wywodzących się z odczynu wobec tkanek własnych) oraz w transplantologii dla wyhamowania odczynów przeciw przeszczepianym narządom lub szczególnego ich przypadku tzw. reakcji przeciw gospodarzowi, zdarzającej się w transplantacji szpiku. Oprócz klasycznie uzyskiwanych mysich przeciwciał monoklonalnych, produkowanych przez laboratoryjnie uczulane na daną substancję myszy, dostępne są obecnie tzw. przeciwciała ludzkie uzyskane drogą unieśmiertelnienia limfocytów B. Ludzkie przeciwciała monoklonalne są bardzo chętnie stosowane w immunoterapii i dotąd zarejestrowano ich użycie przeciw szeregowi patogenów, tj. cytomegalowirusowi (CMV), wirusowi opryszczki (półpasiec), różnym serotypom bakterii rodziny *Pseudomonas*, *Klebsiella* czy *Escherichia*. W przypadku, próby terapii eksperymentalnej posocznicy wywołanej bakteriami Gram ujemnymi, zaobserwowano u poddanych leczeniu pacjentów obniżenie śmiertelności po zastosowaniu przeciwciała klasy IgM skierowanego przeciw lipidowi A endotoksyny (2). W innych próbach wykorzystano przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw tzw. cząsteczkom adhezywnym obecnym na leukocytach ludzkich, tj. cząsteczkom wobec siebie komplementarnym, określanym jako

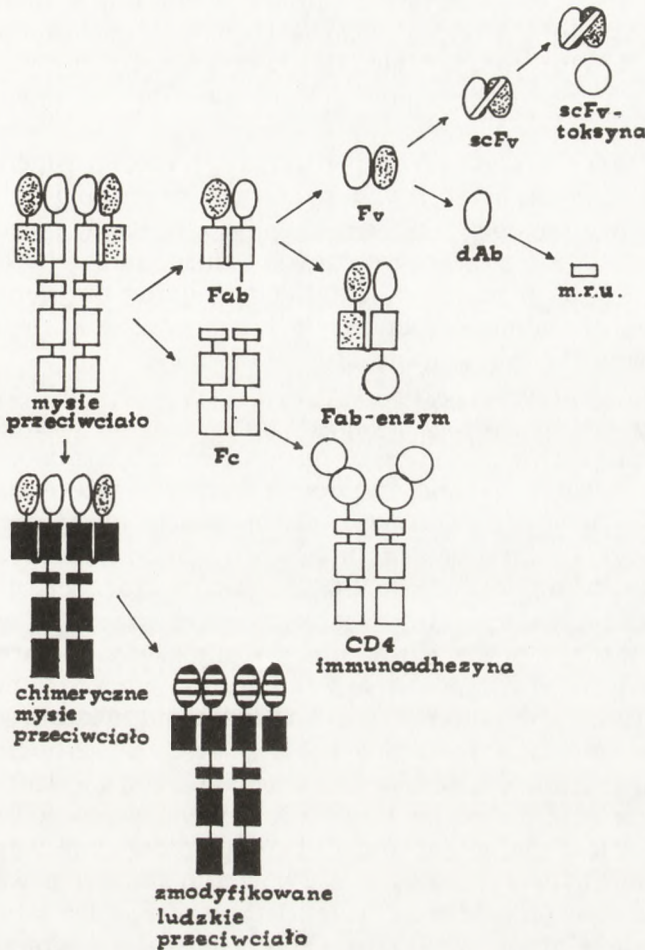
LFA-1 (*lymphocyte functional antigen* = antygen funkcjonalny limfocytów) oraz ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule* = cząsteczka adhezji międzykomórkowej). Struktury te służą do utrzymywania więzi pomiędzy komórkami, a blokowane przez przeciwciała monoklonalne powodują np. hamowanie akumulacji granulocytów obojętnochłonnych obniżając stopień uszkodzenia tkanek (model zwierzęcy) w bakteryjnym zapaleniu opon, szoku pokrwotocznym, po wypełnieniu wsierdza w wyniku urazu (3). Ponadto proponuje się użycie przeciwciał monoklonalnych w leczeniu zawału mięśnia sercowego, zatrucia polekowego czy dla celów immunoantykoncepcji (4). Jakkolwiek marzenie o magicznej broni, którą byłoby utworzenie koktajlu z wielu przeciwciał o działaniu na przykład przeciwnowotworowym nie spełniło się, to badania nad efektywnym wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych dynamicznie postępują. W niniejszym artykule przedstawiono: 1) „inżynierię” modyfikującą strukturę i funkcję przeciwciała, 2) ważniejsze struktury komórkowe będące obiektem działania przeciwciał monoklonalnych, 3) genetyczne próby konstrukcji przeciwciał, 4) ludzkie przeciwciała monoklonalne, 5) przeciwciała o podwójnej swoistości, 6) przeciwciała „uzbrojone” czynnikiem cytotoksycznym (toksyną lub izotopem).

1. Modyfikacje struktury i funkcji przeciwciała

Na rys. 1 przedstawiono schematycznie strukturę przeciwciała, tj. trzy główne domeny części stałej immunoglobuliny (CH1, CH2, CH3 — *constant heavy* = domeny części stałej łańcucha ciężkiego), jedną domenę zmienną łańcucha ciężkiego, mniejszy fragment zawiasowy, łączący między sobą domeny łańcucha ciężkiego oraz łańcuch lekki składający się z domeny stałej oraz zmiennej.

Przekonstruowanie cząsteczki przeciwciała mysiego pojawiło się jako problem badawczy, gdy wykazano, że przeciwciało mysie nie współpracuje zadowalająco z ludzkim komplementem, przez co pomniejszona jest jego funkcja terapeutyczna. Jakkolwiek niektóre izotypy przeciwciał zwierzęcych wydajniej pełnią swoje funkcje efektorowe u człowieka niż inne (np. szczególnie korzystne są $\gamma 2a$, tj. IgG2a u myszy oraz $\gamma 2b$ u szczura), to jednak ich obcość gatunkowa powoduje powstanie silnej odpowiedzi antyglobulinowej u człowieka znoszącej ich efekt terapeutyczny. Wobec znacznych trudności w uzyskaniu ludzkich przeciwciał monoklonalnych, zdecydowano się na zastąpienie fragmentu stałego immunoglobuliny mysiej fragmentem ludzkim, wiążąc w ten sposób mysią domenę zmienną z domenami stałymi immunoglobuliny ludzkiej (chimeryczne przeciwciało mysie — 5). Obniżyło to znacznie immunogenność przeciwciała chimerycznego u człowieka (6), niemniej cząsteczka ta zachowuje pewną szczątkową immunogenność wskutek zachowanej struktury podstawowej części zmiennej (tzw. struktury kartki β — 7).

Poszczególne domeny immunoglobulin składają się z podstawowych struktur białkowych β opisywanych w literaturze jako struktury „kartkowe” lub „harmonijkowe” oraz pętli peptydowych. Struktury β składają się z konser-



Rys. 1. Strukturalne modyfikacje przeciwciała. Występujące skróty: Fc (constant fragment = stały fragment przeciwciała), Fab (antigen binding fragment = fragment przeciwciała wiążący antygen), Fv (variable fragment = fragment zmienny), scFv (single chain Fv fragment = pojedynczy łańcuch fragmentu zmiennego), dAb (antibody domain = domena przeciwciała), m.r.u. (minimal recognition unit = minimalna jednostka „rozpoznająca” antygen). (Schemat wg T. Waldmanna).

watynych sekwencji aminokwasowych, natomiast pętle peptydowe są konserwatywne w domenach stałych, a hyperzmiennie w domenie zmiennej. Powstała zatem zmodyfikowana cząsteczka przeciwciała ludzkiego (rys. 1) poprzez dołączenie do immunoglobuliny ludzkiej tylko hyperzmiennych (pochodzących z przeciwciała myszy) pętli (8). Przy tej modyfikacji okazało się, że dla funkcji przeciwciała niezbędne jest zorientowanie struktur β w taki sposób

aby umożliwiły one upakowanie zarówno części zmiennej łańcuchów ciężkiego jak i lekkiego. Jakkolwiek hyperzmiennie pętle przeciwciała stanowią w znakomitej przewadze miejsca kontaktów immunoglobuliny z antygenem, to nie bez znaczenia dla funkcji przeciwciała jest system powiązań pomiędzy konserwatywnymi strukturami β a rejonami hyperzmiennymi (9).

Jednym z ciekawych fenomenów było utworzenie tzw. przeciwciał o podwójnej swoistości (nie przedstawiono tego na rys. 1). Budowa ich, (omówiona bardziej szczegółowo w oddzielnym podrozdziale), może zostać osiągnięta poprzez technikę fuzji dwóch różnych hybrydom produkujących przeciwciała przeciw oddzielnym epitopom (10) w taki sposób, że każdy pojedynczy łańcuch zmienny (składający się z części zmiennych jednego łańcucha ciężkiego i jednego łańcucha lekkiego) reaguje z jedną determinantą antygenową. Kompletna, dimerowa forma immunoglobuliny, w takim przypadku, reagować będzie z dwoma, różnymi determinantami antygenowymi.

Nową funkcję efektorową „odziedziczyło” przeciwciała poprzez fuzję fragmentów genów kodujących fragment wiążący antygen (Fab) oraz genów toksyny (11) lub enzymu (12). W ten sposób, np. aktywator plazminogenu może być dostarczony do miejsca krzepnięcia poprzez fragment przeciwciała wiążący fibrynę. Efektem tego może być miejscowa aktywacja plazminogenu (13) oraz odwrotnie dołączona cząsteczka, np. fragmentu stałego przeciwciała może uzupełniać funkcję efektorową innego białka, jak ma to miejsce w przypadku immunoadhezyny CD4 (rys. 1). Cząsteczka CD4 wiąże się z glikoproteiną gp120 występującą na powierzchni komórki zainfekowanej wirusem HIV, natomiast połączenie CD4 z fragmentem Fc umożliwia immunoadhezynie nabycie funkcji cytolitycznej w wyniku odczynu komórkowego związanego z obecnością przeciwciał (tzw. ADCC) aktywowanych i wiązanych przez fragment Fc (14).

Zarówno kompletna cząsteczka przeciwciała (o m.cz. 150 Kd), jak i jej mniejsze fragmenty (o m. cz. od 12 – 50 Kd) mogą zachować aktywność wiązania antygeny. Małe fragmenty mogą być sprzężone, np. z radioizotopami, które z kolei mogą mieć znaczenie w tworzeniu obrazu pewnego narządu, względnie mogą być przydatne w celach leczniczych, gdyż łatwiej przenikają do kompartmentów tkankowych (15). Co prawda małe fragmenty przeciwciał są szybciej usuwane z krążenia (16), to jednak czasami może to być poważną zaletą, np. przy usuwaniu leków lub ich metabolitów. Za pomocą krystalografii udało się z fragmentów Fab przeciwciała wyodrębnić jeszcze mniejsze cząsteczki przeciwciała o zachowanej funkcji — Fv (17). Niestety, fragmenty Fv są heterodimerami związanymi niekowalencyjnie, a przez to ulegają one łatwej dysocjacji (18). Bardziej stabilne kompleksy Fv, tj. scFv (rys. 1), mogą być tworzone poprzez związanie heterodimeru hydrofilnym peptydem łączącym (19) lub indukowanie nowych mostków dwusiarczkowych pomiędzy domenami (18). Pojedyncze domeny fragmentu zmiennego łańcucha ciężkiego immunoglobuliny (tzw. dAb, rys. 1) lub minimalne jednostki wiążące antygen, tzw. m.r.u. wymagają jeszcze intensywnych wysiłków dla uzyskania ich właściwej efektywności działania, np. poprzez dołączenie małych elementów wspomagających.

2. Komórkowe struktury powierzchniowe: obiekty działania przeciwciał monoklonalnych

Stosowanie przeciwciał monoklonalnych wynika z chęci oddziaływania czynnikami wybiórczo hamującymi odpowiedź immunologiczną. Najszerzej dotąd klinicznie używanym przeciwciałem jest tzw. OKT3 skierowane przeciw markerowi CD3 różnicowania limfocytów T.

2.1. Przeciwciało anty-CD3

Przeciwciało anty-CD3 to znacznik kompleksu receptora na antygen limfocytów T, który znajduje się na wszystkich komórkach T. Przeciwciało zastosowano dla „wytlumienia” ostrej reakcji odrzucania przeszczepu (nerki). Stwierdzono w ok. 93% przypadków odwrócenie ostrej reakcji odrzucenia przeszczepu, co w porównaniu z 75% efektywnością przy stosowaniu środków konwencjonalnych, czyni używanie tego przeciwciała bardzo obiecującym (20). Istnieją jednak pewne skutki uboczne stosowania przeciwciała OKT3. Aktywuje ono limfocyty T, czemu towarzyszy uwalnianie czynnika martwiczego guza (TNF — *tumor necrosis factor*), interferonu γ oraz interleukiny 2 (IL-2). Powoduje to wystąpienie ostrych objawów klinicznych takich jak: wysoka temperatura, wymioty, biegunka czy zakłócenie oddechu.

2.2. Przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw polimorficznym podjednostkom α i β ludzkiego receptora na antygen limfocytów T (TCR — *T cell receptor*)

Przeciwciało monoklonalne (BMA 031) skierowane przeciw części stałej kompleksu TCR użyto z sukcesem w leczeniu ostrej reakcji odrzucania przeszczepu typu przeszczep przeciw gospodarzowi (21)(GVHD — *graft versus host disease*).

Inne stosowane przeciwciała skierowane były przeciw rejonom hyperzmienionemu kompleksu TCR (wiążącemu antygen) i łączyły się z determinantą idiotypową rejonu hyperzmienionego, ulegającą ekspresji na komórkach białaczkowych (22). Stwierdzono 80% spadek liczby komórek białaczkowych po infuzji przeciwciała, jednak przy wystąpieniu pewnych skutków ubocznych typu: temperatura, dreszcze, mdłości, wymioty, biegunka, krótki oddech.

Przeciwciała skierowane przeciw idiotypowym fragmentom, charakterystycznym dla danego rejonu zmiennego poszczególnych kompleksów TCR, przy występującej oligoklonalności TCR dla danej jednostki chorobowej (np. w indukowanym u myszy eksperymentalnym zapaleniu mózgu — odpowiedniku stwardnienia rozsianego u człowieka) mogą prowadzić (u myszy) do wygaszenia reakcji autoimmunologicznej (23).

2.3. Przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw idiotypom immunoglobulin występującym na limfocytach B

Przeciwciała te znane jako antyidiotypowe używane są w leczeniu pacjentów z chłoniakiem limfocytów B (24). U połowy leczonych pacjentów zauważono przynajmniej częściową poprawę objawów. W trakcie dojrzewania, w komórkach B zachodzi tzw. zjawisko hypermutacji, powodujące powstanie olbrzymiego zróżnicowania idiotypowego wewnątrz populacji limfocytów B, tak że niektóre nowotworowo zmienione komórki B nie są rozpoznawane przez przeciwciała antyidiotypowe.

2.4. Przeciwciała rozpoznające struktury powierzchniowe, odpowiedzialne za interakcje międzykomórkowe

Przeciwciała o których wspomniano w części wstępnej artykułu, skierowane przeciw strukturom LFA-1 i ICAM-1 hamują reakcje odrzucania przeszczepu oraz GVHD (25).

Odbywają się także próby kliniczne z przeciwciałami skierowanymi przeciw strukturom CD4 i CD8, odgrywającym ważną rolę w aktywacji limfocytów T, rozpoznawaniu produktów genów kompleksu zgodności tkankowej itd. Przeciwciała te powodują supresję reakcji odrzucenia przeszczepu, GVHD lub reakcji autoimmunologicznych (26). Stosowanie przeciwciał anti-CD4 powoduje obniżenie liczby komórek typu helper, co np. u myszy prowadzi do przeżycia przeszczepu wysepek Langerhansa trzustki (27). Ponadto zaobserwowano, że podawanie przeciwciał anti-CD4 powoduje osłabienie objawów zapalenia stawów indukowanego u szczura typem II kolagenu, zapalenia mózgu u myszy oraz nużliwości mięśni na tle autoimmunologicznym (26).

2.5. Przeciwciała skierowane przeciw łańcuchowi α receptora interleukiny 2, o indukowanej ekspresji na aktywowanych lub patologicznych limfocytach T (anty IL-2R α).

Przeciwciała te znane też jako anti-Tac są szczególnie użyteczne, gdyż łańcuch α receptora nie występuje na komórkach spoczynkowych. Znalazły zastosowanie w usuwaniu aktywowanych limfocytów T zaangażowanych w reakcjach odrzucania przeszczepu, odczynach autoimmunologicznych, białaczkach (28).

3. Genetyczne aspekty uzyskiwania przeciwciał monoklonalnych

Obok tradycyjnie stosowanej metodyki uzyskiwania przeciwciał monoklonalnych dynamicznie rozwijają się badania wykorzystujące techniki biologii molekularnej. Wśród nich można wyróżnić techniki dotyczące: a) zmian stru-

ktury przeciwciała, b) klonowania przeciwciał (lub ich fragmentów) z następową transfekcją, c) tzw. klonowania bezpośredniego przy zastosowaniu techniki PCR z następową ekspresją, d) stosowania myszy o upośledzonej odporności komórkowo-humoralnej, tolerujących komórki bądź tkanki ludzkie (myszy SCID).

A. Zmiany struktury przeciwciał opisano w rozdz. 1. Głównie chodzi tu o zmniejszenie odczynu organizmu na immunoglobuliny np. poprzez zamianę części stałej przeciwciała mysiego na ludzkie (rys. 1, przeciwciało chimeryczne, zmodyfikowane przeciwciało ludzkie). Na przykład stosując wersję chimeryczną przeciwciała mysiego skierowanego przeciw antygenowi guza jelita zaobserwowano odczyn ze strony organizmu na to przeciwciało tylko w 10% przypadków (29) szczepionych małą *Cynomolgus*. Stosuje się też zamianę domeny stałej na należącą do innej podklasy immunoglobuliny dla uzyskania odpowiedniego efektu efektorowego przeciwciała. Na przykład „humanizacja” mysiego przeciwciała anti-Tac spowodowała przedłużenie „żywności” tego przeciwciała z 38 na 103 godziny (29). W innym przypadku zamiana podklasy na ludzką immunoglobulinę IgG1 (przeciwciało CAMPATH-1) zwiększyło jego efektywność w reakcji typu ADCC (30).

B. Klonowanie i transfekcja genów dla immunoglobulin:

— konstruowanie heterohybridoma. Gen kodujący część zmienną ludzkiego przeciwciała (skierowane przeciw tężcowi) został sklonowany, a następnie uległ ekspresji w linii komórkowej szpiczaka mysiego SP 2/0 wraz z sekwencjami promotora (31). W wyniku tego doświadczenia uzyskano stabilną linię komórkową, wydzielającą znacznie większe ilości przeciwciał niż oryginalna heterohybrida;

— konstruowanie ludzkiej hybrydoma. Obejmuje transfekcję DNA uzyskanego z komórki nowotworowej do linii komórkowej produkującej przeciwciało, względnie transfekcję DNA z linii produkującej przeciwciało do linii komórkowej szpiczaka (32).

C. Najbardziej modne obecnie techniki wykorzystują reakcję PCR dla uzyskania DNA przeciwciała lub jego fragmentu, który za pomocą wektora przeniesiony jest do układu ekspresji komórkowej, względnie ekspresja fragmentu przeciwciała osiągnięta jest na samym wektorze:

— używając „uniwersalnych” primerów dla fragmentu Fab przeciwciała (ograniczających odpowiedni odcinek replikowanej nici DNA) oraz reakcji PCR można uzyskać sekwencje genów dla części zmiennej przeciwciała (33). Wprowadzając zaś miejsca restrykcyjne do sekwencji primerów, można pociąć odcinki amplifikowanego DNA i wklonować do komórki bakteryjnej lub ssaków dla osiągnięcia ekspresji. (Sekwencje zrearanżowanych genów części zmiennej immunoglobuliny przepisywane są z mRNA na cDNA drogą odwrotnej transkrypcji). Materiałem wyjściowym może być linia hybrydoma, niestabilna hybrydoma (heterohybridoma), pojedyncza komórka hybrydomy lub limfocyt B (albo jego klon). Ekspresja białka o ograniczonej złożoności w komórce bakteryjnej (szeroko stosowany układ *E. coli*) powoduje możliwość uzyskania jedynie fragmentów immunoglobuliny — Fab lub Fv;

— klonowanie (z heterogennej mieszaniny komórek) części zmiennych łańcuchów ciężkiego i lekkiego, które łączą się w układzie ich ekspresji w sposób losowy, dał wyjście do niezwyklej techniki zwanej „kombinowaną biblioteką” klonów (*combinatorial library*). Około 1000 różnych łańcuchów ciężkich i 1000 lekkich może w jej efekcie przynieść ok. 5×10^6 klonów cząsteczek Fab (układ ekspresji w *E. coli*; 34) lub Fv (na powierzchni faga — 35).

D. Wprowadzenie nie przegrupowanych segmentów genów ludzkich immunoglobulin do komórek rozrodczych myszy może doprowadzić do przeprowadzenia prawidłowej rearanżacji sekwencji genowych i produkcji ludzkich przeciwciał. Taka transgeniczna mysz może być użyta do produkcji biotechnologicznej (36). Do przedjadrza myszy wprowadzono minilocus łańcucha ciężkiego immunoglobuliny M, składającego się z niezrearanżowanych segmentów V (*variable* — zmienny), D (*diversity* — odpowiedzialny za różnorodność cząsteczki), J (*joining* — łączący). Fragmenty genu przegrupowane zostały w tkankach limfoidalnych myszy, a ok. 4% limfocytów B produkowało łańcuch ciężki μ w ilości ok. 50 μg na ml surowicy.

4. Ludzkie przeciwciała monoklonalne

Ze względu na wywoływanie odczynu antyglobulinowego, mysie przeciwciała monoklonalne zastępuje się (dla celów terapeutycznych) przeciwciałami ludzkimi. Ludzkie przeciwciała monoklonalne w sposób naturalny lepiej też współpracują z innymi komponentami układu immunologicznego człowieka (układ dopełniacza, reakcja typu ADCC i in.). Jednakże technologia uzyskiwania ludzkich przeciwciał monoklonalnych jest nadal daleka od opanowania, a większość uzyskiwanych tradycyjną drogą ludzkich przeciwciał monoklonalnych charakteryzuje się niskim powinowactwem do antygeny przez co nie daje się wykorzystywać w praktyce (37). Istnieje kilka metod uzyskiwania ludzkich linii komórkowych produkujących przeciwciała, tj. a) klasyczna fuzja ludzkich limfocytów B krwi obwodowej z linią partnerską (fuzji) o charakterze nowotworowym (linia partnerska może być zarówno ludzka jak mysia), b) unieśmiertelnienie ludzkich limfocytów B poprzez ich transformację wirusem *Epstein Barr* (EBV), c) połączenie obu technik poprzez preselekcję transformowanych komórek produkujących przeciwciała z następową fuzją z linią partnerską (ludzką lub inną). Problemy przedstawionych tu technik to: niski odsetek komórek B uczulonych na dany antygen u człowieka, niska wydajność fuzji pomiędzy komórkami ludzkimi lub w przypadku tzw. heterohybrydoma niska stabilność tego tworzy (wskutek eliminacji z hybrydu, zwłaszcza chromosomów ludzkich) oraz niska wydajność produkcji przeciwciał przez linie transformowane EBV wskutek słabo rozwiniętego układu sekrecyjnego białek w komórkach limfoblastoidalnych. Próba przezwyciężenia tych trudności było połączenie obu technik co polepszyło wydajność fuzji, stabilność i sekrecję przeciwciał uzyskanych metodą EBV — hybrydoma. Szczegóły techniczne wymienionych podejść badawczych opisano w pracy przeglądowej (38). Metoda ta posiada jednak inne naturalne ograniczenia. Stałymi problemami

są niska pula uczulonych limfocytów krążących oraz uzależnienie od stanu immunologicznego osobnika, od którego pobiera się komórki (zwykle niski stopień immunizacji osobnika jest przyczyną uzyskiwania w hybrydoma przeciwciał o niskim powinowactwie). Ponieważ przedstawione techniki wykorzystują naturalnie występujące, uczulone komórki, uzyskiwanie limfocytów B o wybranych swoistościach, np. wobec tkanek własnych, embrionalnych lub nowotworowych jest w pewnych sytuacjach niemożliwe. W związku z tym nabrały znaczenia techniki wspomagające uczulenie limfocytów lub powodujące zwiększenie liczby takich komórek poprzez stosowanie różnych czynników sprzyjających produkcji przeciwciał lub proliferacji i różnicowaniu komórek należących do linii B.

Zamierzenia te, można w pewnych przypadkach, osiągnąć przez uczulanie limfocytów *in vivo*, zwłaszcza wobec antygenów bakteryjnych lub wirusowych, podlegających naturalnemu szczepieniu (39). Powstało szereg metod uczulania ludzkich limfocytów B w warunkach *in vitro*, w podstawowych dwóch układach doświadczalnych, tj. wtórnej lub pierwotnej stymulacji antygenowej (40). Zbadano też wpływ poszczególnych cytokin zarówno na podtrzymywanie produkcji przeciwciał przez linie hybrydoma, linie transformowane (EBV) (41), jak również na układy uczulania limfocytów B w warunkach *in vitro* (42).

Interesującym układem doświadczalnym jest wykorzystanie myszy SCID dla indukcji odpowiedzi humoralnej na wybrany antygen (43,44). Myszy SCID pozostające w stanie tolerancji wobec komórek człowieka są idealnym, długotrwałym inkubatorem (repopulowanych ludzkich limfocytów do jamy otrzewnej) zarówno dla indukcji odpowiedzi humoralnej typu pierwotnego jak i wtórnego. Uczulane *in situ* limfocyty mogłyby być wykorzystane dla konstrukcji hybrydoma po uprzednim ich pozyskaniu z myszy. Inną możliwością jest bezpośrednie wykorzystanie precypitowanych z surowicy myszy immunoglobulin ludzkich.

Obecnie najbardziej obiecującą technologią jest wykorzystanie manipulacji genetycznych dla konstrukcji ludzkiej hybrydoma, co opisano w poprzednim podrozdziale. Połączenie techniki uczulania limfocytów *in vitro* lub *in situ* z bezpośrednim klonowaniem fragmentów genów odpowiedzialnych za kodowanie części zmiennej immunoglobuliny może być metodą najszybciej prowadzącą do celu.

5. Przeciwciała o podwójnej swoistości

Przeciwciała te można użyć jako nośniki izotopów, toksyn, leków cytotoksycznych lub czynniki „przenoszące” komórkę efektorową (cytotoksyczną) w pobliże celu (45). Szczególnie ta ostatnia rola wywołała duże zainteresowanie badawcze wobec wykorzystania ich w praktyce. Przeciwciała o podwójnej swoistości można uzyskać techniką fuzji dwóch hybrydom (kwadroma) lub poprzez preparatykę chemiczną (wiązanie krzyżowe monomerów dwóch różnych przeciwciał, wytwarzanie mostków dwusiarczkowych itd.). Można też

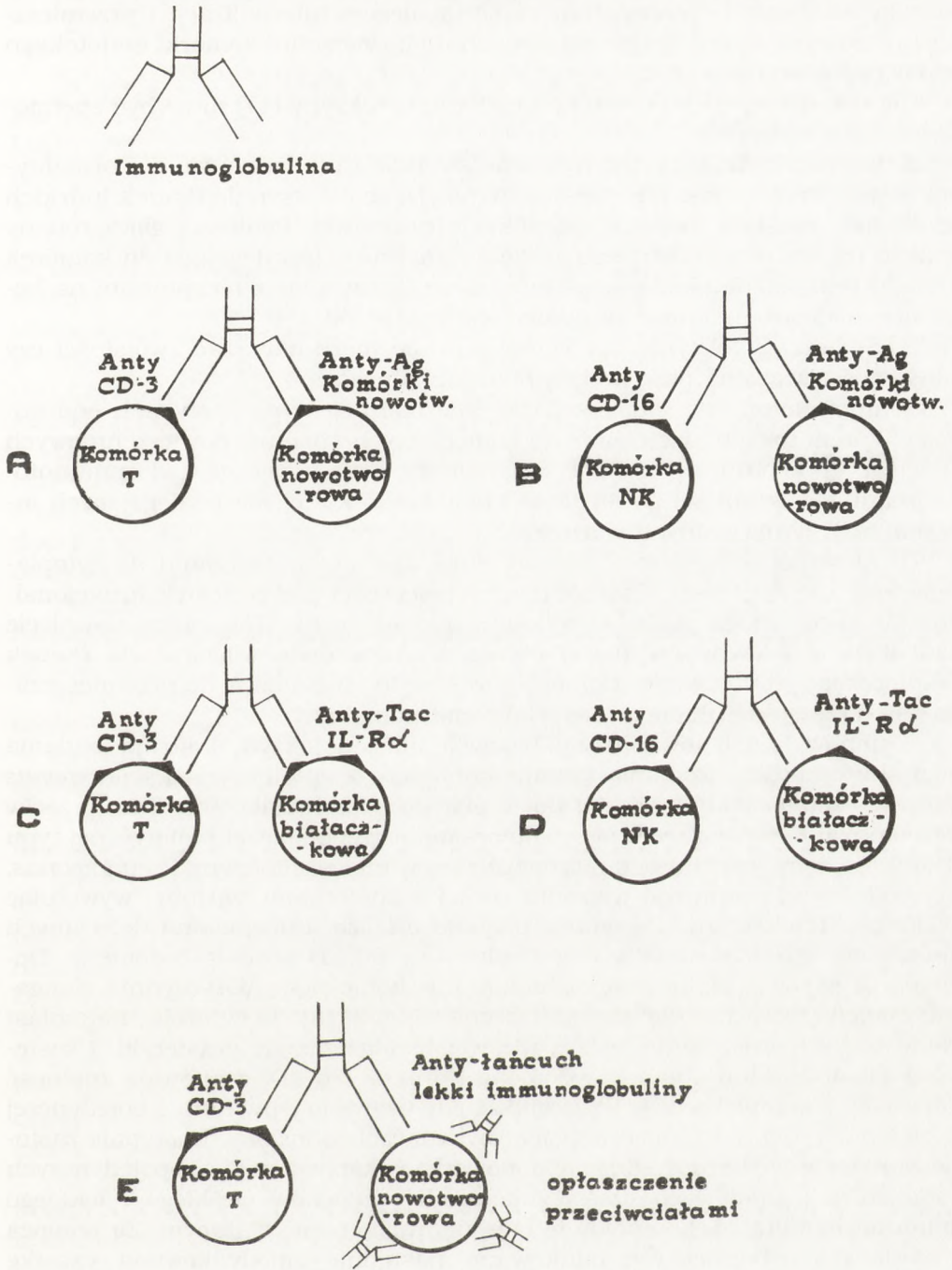
wytwarzać je za pomocą technik bezpośredniego klonowania (geny różnych części zmiennych łańcuchów ciężkich i lekkich wprowadzone do faga lub *E. coli*). Pojedyncze łańcuchy peptydowe Fv mogą być łączone za pomocą peptydowych „linkerów”. Oczywiście przeciwciała te powinny aktywować komórki efektorowe zgodnie z ich funkcją i regułami kierującymi odpowiedzią immunologiczną, a zatem w zgodzie z tzw. restrykcją immunologiczną (antygen znajduje się na komórce posiadającej ten sam zestaw antygenów zgodności tkankowej co efektorowa).

Na rys. 2 zobrazowano graficznie przykłady działania przeciwciał o podwójnej swoistości. Najszerzej wykorzystane są cytotoksyczne komórki T oraz tzw. naturalni zabójcy (NK — *natural killer*). Interesujące są przykłady C i D (rys. 2), ze względu na fakt, że standardowe mysie przeciwciała anti-Tac nie współpracują z leukocytami człowieka, np. w reakcji typu ADCC. Jednak przeciwciała o podwójnej swoistości, anti-Tac-CD3 lub anti-Tac-CD16 współpracują z ludzkimi komórkami efektorowymi i doprowadzają do zniszczenia komórek z receptorem dla IL-2. W przedstawionym przykładzie E (rys. 2) — układ modelowy został opracowany dla komórek szczura (46).

Innym przykładem wykorzystania przeciwciała o podwójnej swoistości to przyspieszenie rozpuszczenia skrzepu. Przeciwciała było nośnikiem swoistości wobec tkankowego aktywatora plazminogenu (tPA — *tissue plasminogen activator*) i fibryny (4). Przeciwciała o podwójnej swoistości z pewnością zawierają w sobie olbrzymie możliwości aplikacyjne.

6. Immunotoksyny

W próbach immunoterapii stosuje się szereg toksyn komórkowych pochodzenia roślinnego lub bakteryjnego w sprzężeniu z odpowiednim przeciwciałem monoklonalnym (30). Podstawową strategią postępowania jest wyselekcjonowanie takiej toksyny aby jako czynnik komórko-bójczy nie miała ona możliwości wiązania się z komórkami *per se*, ale była kierowana do miejsca wiązania przez odpowiednie przeciwciała. Większość toksyn zawarta w immunokoniugatach działa w cytoplazmie komórki docelowej, gdzie hamują syntezę białka. Po związaniu się z antygenem powierzchniowym, immunotoksyny pobierane są drogą endocytozy, a następnie „dostarczane” do endosomów. Niektóre toksyny, jak np. błonicy, przemieszczają się następnie poprzez układ błon do cytoplazmy, inne jak rycyna przechodzą do układu Golgiego, skąd raczej ich mała część może się przemieścić do cytoplazmy. Niestety, większość z nich przedostaje się do lizosomów, w których są degradowane. W cytoplazmie, klinicznie używane immunotoksyny bądź oddziałują hamująco na kompleks ADP — (*adenosine diphosphate* = dwufosforan adenozyliny) czynnik wydłużania łańcucha 2 (biosynteza białka) — w ten sposób działa egzotoksyna *Pseudomonas* — względnie inaktywują podjednostkę 60S rybosomu w taki sposób, że obniżają jej zdolność do wiązania się z czynnikiem 2 (elongacji) — w taki sposób działa rycyna. Niestety, aby zabić komórkę, w jej cytoplazmie



Rys. 2. Przykłady stosowania przeciwciał o podwójnej swoistości.

musi znajdować się ok. 10 cząsteczek toksyny. Ponieważ nie wszystkie cząsteczki związane do powierzchni komórki ulegają internalizacji i przemieszczeniu do cytoplazmy, liczba związanych do powierzchni komórki endotoksyn musi być znacznie wyższa.

Dla osiągnięcia efektywności danej immunotoksyny (47) musi być spełnionych kilka warunków:

A. Immunokoniugat musi reagować swoiście i nie łączyć się z „normalnymi” komórkami (tkankami). Nieswoiste przyleganie toksyn do tkanek ludzkich może być zniesione poprzez modyfikację cząsteczki. Ponieważ glikoproteiny toksyn pochodzenia roślinnego zawierają mannozę (przylegającą do komórek układu retikulośródbłonkowego) lub fukozę (łączącą się z receptorami na hepatocytach) pożądana jest deglikozylacja cząsteczki.

B. Sprzężenie toksyny z przeciwciałem nie może naruszać swoistości czy aktywności wiązania przeciwciała monoklonalnego.

C. Immunotoksyna musi podlegać internalizacji w pęcherzykach endosomów. Zatem toksyny kierowane do komórkowych struktur powierzchniowych ulegających w naturalny sposób internalizacji mają przewagę nad immunotoksynami wiążącymi się do struktur błony komórkowej nie podlegających internalizacji w normalnych warunkach.

D. Aktywna komponenta toksyny musi ulec przemieszczeniu do cytoplazmy komórki docelowej. Jednak różne właściwości podjednostek funkcjonalnych toksyny mogą posiadać wykluczające się cechy. Tak zatem usunięcie łańcucha B toksyny rycynowej obniża jej nieswoiste wiązanie do tkanek zmniejszając jednocześnie zdolność pozostałego łańcucha A do przemieszczania się przez układ błon pęcherzyków endosomalnych.

Postęp w konstruowaniu efektywnych immunotoksyn ilustrują badania nad skutecznością działania immunokoniugatu z egzotoksyną *Pseudomonas* (PE — *Pseudomonas exotoxin*) dołączoną do przeciwciała anty-Tac (przeciw receptorowi IL-2) wiążącego się z komórkami ostrej białaczki limfatycznej typu T (48). Znanym jest fakt ograniczonego stosowania egzotoksyny *Pseudomonas*, ze względu na możliwość wiązania się jej z komórkami wątroby, wywołując efekt hepatotoksyczny. Z pomocą przyszła analiza funkcjonalna delecyjnych mutantów egzotoksyny (49). Cząsteczka o m. 66 kD posiada 3 domeny. Domena III odpowiedzialna jest za hamowanie kompleksu ADP-czynnik elongacji; domena II warunkuje przemieszczenie się toksyny do cytozolu, natomiast domena I odpowiedzialna jest za nieswoiste wiązanie się cząsteczki. Cząsteczka PE 40, z której usunięto domenę I o m.c. 26 kD, zachowała zdolność interakcji z kompleksem ADP, jednakże gdy używano jej w formie pojedynczej molekuly — jej efekt komórkobójczy był znacznie obniżony. Następnie zastosowano technikę bezpośredniego klonowania i ekspresji w *E. coli* pojedynczych łańcuchów peptydowych części zmiennych łańcuchów ciężkiego i lekkiego immunoglobuliny (11). Peptydy te łączono fragmentem wiążącym. Za pomocą inżynierii genetycznej wyprodukowano następnie zmodyfikowaną cząstkę PE40, którą połączono łańcuchem peptydowym z fragmentami Fv konstruując cząsteczkę [anty-Tac(Fv)-PE40].

7. Przeciwciała monoklonalne związane z pierwiastkami promieniotwórczymi

Droga toksyn do cytozolu jest nader skomplikowana. Poza tym toksyny *per se* wywołują odpowiedź immunologiczną, która może zablokować ich działanie. Stąd alternatywnie dla immunotoksyn poczęto konstruować inne immunokoniugaty, np. przeciwciała związane z izotopami. Detekcja za pomocą znakowanych izotopowo przeciwciał jest dość powszechnie stosowana wobec antygeny karcynoembrionalnego lub uzupełnia inne techniki identyfikacji guza nowotworowego. Jakkolwiek całe cząsteczki IgG są bardziej efektywne biologicznie niż ich fragmenty, to molekuly F(ab')₂ lub Fab są używane preferencyjnie dla uwidocznienia ogniska nowotworowego ze względu na lepszą penetrację tkanek i szybszy połowiczny rozpad. Guzy o średnicy 0,5 cm bardzo często niewykrywalne metodami tradycyjnej radiologii mogą być identyfikowane przez przeciwciała ze sprzężonymi izotopami.

Do danego przeciwciała monoklonalnego można związać izotop o specyficznych właściwościach, taki koniugat może być cytotoksyczny wobec komórki z odległości równej jej kilku średnic, przez co może zabijać nie tylko komórkę docelową, ale także sąsiadujące z nią inne komórki patologiczne. Efekt końcowy nie zależy od internalizacji immunokoniugatu do komórki.

Przeciwciało może być bezpośrednio związane z izotopem lub za pośrednictwem czynnika chelatującego. Aby immunokoniugat był efektywny biologicznie musi spełniać pewne warunki:

- a) sprzężanie czynnika chelatującego z przeciwciałem monoklonalnym nie może powodować upośledzenia swoistości przeciwciała;
- b) znakowanie izotopem lub chelatowanie nie powinno zmieniać dystrybucji czy katabolizmu przeciwciała;
- c) związek chelatujący nie powinien przedwcześnie uwalniać przeciwciała lub izotopu (przed wykonaniem funkcji docelowej).

Istnieje cały szereg izotopów promieniotwórczych o emisjach typu γ , β lub α . Izotopy emitujące promieniowanie β jakkolwiek bardziej efektywne niż emitery γ , nie są optymalne, ze względu na niską energię liniową, która powoduje nieefektywną cytotoksyczność wobec komórki docelowej przy zachowanej toksyczności wobec względnie odległych normalnych tkanek. Jednakże pewne izotopy β , takie jak I^{131} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Cu^{67} były z sukcesem stosowane w immunoterapii. Na przykład sprzężony z przeciwciałem przeciw ferrytynie I^{131} był używany w leczeniu hepatoma, a sprzężony z tym samym przeciwciałem Y^{90} spowodował kompletną remisję choroby Hodgkina u 4 na 8 leczonych pacjentów (50).

Na przyszłość pokłada się nadzieje w konstruowaniu stabilnych immunokoniugatów z emiterami α , które mogą być niezwykle efektywne wobec komórek docelowych nie powodując uszkodzeń tkanki odległej od ataku immunologicznego (51). Izotopy emitują cząstki α obdarzone dużą energią, od 6-9 MeV, (dziesięciokrotnie wyższe niż γ lub β) na krótkie odległości (40 – 80 μ m). Odpowiednimi pierwiastkami promieniowania α dla użytku klinicz-

nego są ^{211}As , ^{212}Pb czy ^{212}Bi . Chelatowany do przeciwciała anty-Tac ^{212}Bi o aktywności promieniowania 0,5 μCi lub ekwiwalentnie 12 rad/ml eliminował ponad 98% proliferujących komórek o ekspresji IL-2R nie uszkadzając komórek nie posiadających ekspresji tego receptora (52).

Uwagi końcowe

Przeciwciała monoklonalne to ciągle nie wykorzystane czynniki immunologiczne o dużym potencjale diagnostycznym, terapeutycznym i badawczym, a zatem niewątpliwej wartości komercyjnej. Dostrzeżenie zwłaszcza tej ostatniej korzyści spowodowało w ostatnich latach znaczny wzrost zainteresowania tymi ciałami biologicznie czynnymi przez duże ośrodki biotechnologiczne, które przejęły na siebie ciężar badawczy dotyczący ich wdrażania. Należy ocenić to pozytywnie, gdyż technologie związane z wytwarzaniem przeciwciał monoklonalnych są bardzo kosztowne, a przez to niemożliwe do realizacji w wielu ośrodkach uniwersyteckich. Duże zainteresowanie produkcją ciał biologicznie czynnych, szczególnie w walce z AIDS lub innymi chorobami wirusowymi (przy braku efektywnych wirusobójczych środków farmakologicznych) oraz schorzeniami nowotworowymi powoduje dynamiczny rozwój badań. Nie należy zapominać, że znakomita większość tzw. zestawów diagnostycznych, wykrywających m.in. wirusy HIV lub żółtaczkę wyposażona jest w przeciwciała monoklonalne. Ze szczególną uwagą śledzi się postęp w wytwarzaniu przeciwciał drogą manipulacji genetycznej, która teoretycznie jest w stanie wytworzyć wszystkie warianty przeciwciał powstające w organizmach żywych. Również w naszym kraju wprowadzenie półprzemysłowej produkcji przeciwciał wyprowadziłoby nas z niewygodnej i bardzo kosztownej pozycji chronicznego importera. Ta sytuacja, przy trudnej ekonomicznej dyspozycji kraju, może spowodować dalszy regres we wprowadzaniu nowoczesnej terapii medycznej.

Literatura

1. Kohler G., Milstein C., (1975), *Nature*, 52, 495 - 497.
2. Ziegler E. J., Fisher C. J. Jr., Sprung C. L., Straube R. C., Sadoff J. C., Foulke G. E., Wortel C. H., Fink M. P., Dellinger R. P., Teng N. N., et al., (1991), *N. Engl. J. Med.*, 324, 429 - 436.
3. Vedder N. B., Winn R. K., Rice C. L., Chi E. Y., Arfors K. E., Harlan J. M., (1988), *J. Clin. Invest.*, 81, 939 - 944.
4. Haber T., Quertermous, Matsueda M., Runge S., (1989), *Science*, 243, 51 - 56.
5. Neuberger M. S., Williams G. T., Mitchell E. B., Jouhal S. S., Flanagan J. G., Rabbitts T. H., (1985), *Nature*, 314, 268 - 270.
6. LoBuglio A. F., Wheeler R. H., Trang J., Haynes A., Rogers K., Harvey E. B., Sun L., Ghrayeb J., Khazaeli M. B., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 4220 - 4224.
7. Bruggemann M., Winter G., Waldmann H., Neuberger M. S., (1989), *J. Exp. Med.*, 170, 2153 - 2157.
8. Jones P. T., Dear P. H., Foote J., Neuberger M. S., Winter G., (1986), *Nature*, 321, 522 - 525.
9. Riechmann L., Clark M., Waldmann H., Winter G., (1988), *Nature*, 332, 323 - 327.

10. Milstein C., Cuello A. C., (1983), *Nature*, 305, 537 – 540.
11. Chaudhary V. K., Queen C., Junghans R. P., Waldmann T. A., FitzGerald D. J., Pastan I., (1989), *Nature*, 339, 394 – 397.
12. Neuberger M. S., Williams G. T., Fox R. O., (1984), *Nature*, 312, 604 – 608.
13. Schnee J. M., Runge M. S., Matsueda G. R., Hudson N. W., Seidman J. G., Haber E., Quertermous T., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 6904 – 6908.
14. Byrn, R. A., Mordenti J., Lucas C., Smith D., Masters S. A., Johnson J. S., Cossum P., Chamow S. M., Wurm F. M., Gregory T., Groopman J. E., Capon D. J., (1990), *Nature*, 344, 667 – 670.
15. Sutherland R., Buchegger F., Scheyer M., Vacca A., Mach J. P., (1987), *Cancer Res.*, 47, 1627 – 1633.
16. Covall D. G., (1986), *Cancer Res.*, 46, 3969 – 3978.
17. Boulot G., Eisele J. L., Bentley G. A., Bhat T. N., Ward E. S., Winter G., Poljak R. J., (1990), *J. Molec. Biol.*, 213, 617 – 619.
18. Glockshuber R., Malia M., Pfitzinger I., Pluckthun A., (1990), *Biochemistry*, 29, 1362 – 1367.
19. Bird R. E., Hardman K. D., Jacobson J. W., Johnson S., Kaufman B. M., Lee S. M., Lee T., Pope S. H., Riordan G. S., Whitlow M., (1988), *Science*, 242, 423 – 426.
20. Ortho Multicenter Transplantation Group, (1985), *N. Engl. J. Med.*, 313, 337 – 340.
21. Schlitt H. J., Schwitzer R., Hurrle R., Wonigeit K., (1988), *Transplant. Proc.*, 20, 103 – 109.
22. Janson C. H., (1989), *Cancer Immunol. Immunother.*, 28, 225 – 229.
23. Acha-Orbea H., Mitchell D. J., Timmermann L., Wraith D. C., Tausch G. S., Waldor M. K., Zamvil S. S., McDevitt H. O., Steinman L., (1988), *Cell*, 54, 263 – 273.
24. Miller R. A., Maloney D. G., Warnke R., Levy R., (1982), *N. Eng. J. Med.*, 306, 517 – 522.
25. Fisher A., (1986), *Lancet*, ii: 1058 – 1061.
26. Waldmann H., (1989), *Annu. Rev. Immunol.*, 7, 407 – 444.
27. Kaufman D. S., Kong C. S., Shizura J. A., Gregory A. K., Fathman C. G., (1988), *Transplantation*, 46, 210 – 215.
28. Waldmann T. A., (1989), *J. Natl. Cancer Inst.*, 81, 914 – 923.
29. Brown P., Parenten G. L., Dirbas F. M., Garsia R. J., Goldman C. K., Bukowski M. A., Junghans R. P., Queen C., Hakimi J., Benjamin W. R., Clark R. E., Waldmann T. A., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2663 – 2667.
30. Schlom J., in: *Molecular Foundations of Oncology*, Broder S., (ed.), Williams and Wilkins: Baltimore, w druku.
31. Gillies S. D., Morrison S. L., Oi V. T., Tonegawa S., (1983), *Cell*, 33, 717 – 721.
32. Strelkauskas A. J., Taylor C. L., Smith M. R., Bear P. D. (1987), in: *Human Hybridomas: Diagnostic and Therapeutic Applications*, Strelkauskas A. J. (ed.), Marcel Dekker: New York, 95 – 117.
33. Orlandi R., Gussow D., Jones P. T., Winter G. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 3833 – 3837.
34. Huse W. D., Sastry L., Iverson S., Kang A. S., Alting-Mees M., Burton D. R., Benkovic S. J., Lerner R. A., (1989), *Science*, 246, 1275 – 1281.
35. Whitlow M., Filpula D., (1991), *A Companion to Methods in Enzymology*, vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1 – 9.
36. Bruggeman M., Caskey H. M., Teale C., Waldmann H., Williams G. T., Surani M. A., Neuberger M. S., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6709 – 6713.
37. James K., Bell G. T., (1987), *J. Immunol. Meth.*, 100, 5 – 40.
38. Kurpisz M., (1990), in: *Gamete Interaction: Prospects for Immunocontraception*, Alexander N. J., Griffin D., Spieler J. M., Waites G. M. H., (ed.), Wiley-Liss Inc., New York, 377 – 402.
39. Boyd J., James K., (1989), in: *Monoclonal Antibodies: Production and Application*, Allan R. Liss, Inc., 1 – 43.
40. Kurpisz M., Wilson G., Gallagher G., (1992), in: *Tumour Immunobiology; A Practical Approach*, Gallagher G., Rees R., Reynolds A., (ed.), Oxford University Press, Oxford, w druku.
41. Fiszer D., Niedbała W., Fernandez N., Kurpisz M., (1992), *Archiv. Immunol. Therap. Experiment.*, 40, w druku.
42. Niedbała W., Kurpisz M., (1992), *Immunol. Lett.*, w druku.

43. Carlsson R., Martensson C., Kalliomaki S., Ohlin M., Borrebaeck C. A. K., (1992), *J. Immunol.*, 148, 1065 – 1071.
44. Smith C. I. E., Abedi M. R., Islam K. B., Johansson M. E. B., Christensson B., Hammarstrom L., (1991), *Immunol. Rev.*, 124, 113 – 138.
45. Staerz U. D., Kanagawa O., Bevan M. J., (1985), *Nature*, 314, 628 – 631.
46. Gilliland L. K., Clark M. R., Waldmann H., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7719 – 7723.
47. Pastan I., Willingham M. C., Fitzgerald D. J., (1986), *Cell*, 47, 641-648.
48. FitzGerald D. J. P., Waldmann T. A., Willingham M. C., Pastan I., (1984), *J. Clin. Invest.*, 74, 966 – 971.
49. Hwang J., Fitzgerald D. J., Adhya S., Pastan I., (1987), *Cell*, 48, 129 – 136.
50. Order S. E., Stillwagon G. B., Klein J. L., Leichner P. K., Siegelman S. S., Fishman E. K., Ettinger D. S., Haulk T. Kopher K., Finney K., et al., (1985), *J. Clin. Oncol.*, 3, 1573 – 1582.
51. Kozak R. W., (1985), *Trends Biotechnol.*, 4, 259 – 263.
52. Kozak R., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 182 – 187.

The application of monoclonal antibodies to medical treatment

Summary

In this review contemporary trends in the application of monoclonal antibodies are presented. There is discussed antibody reengineering for humanization of mouse monoclonal antibodies to avoid anti-globulin reaction of patient. Recent modifications of antibody fragments are also outlined. The most common antigenic structures exposed to antibody attack are characterized. Some aspects of human monoclonal antibody production are briefly described. Three most promising therapeutic antibodies — bispecific antibodies, immunotoxins, and radiolabeled immunoconjugates — are presented.

key words:

monoclonal antibodies, therapy, antibody engineering.

Adres dla korespondencji:

Maciej Kurpisz, Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32,
60 – 479 Poznań.