

TERAPEUTICKÉ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY V ONKOLOGII

Karel Cwierotka¹, Radek Trojanec², Kateřina Špačková², Marián Hajdúch^{1,2}

¹Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

²Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc

Jednou ze strategií v léčbě onkologických onemocnění je použití monoklonálních protilátek. Výhodou této léčby je zaměření na cílovou strukturu a tím zamezení poškození zdravé okolní tkáně. Terapeutické užití protilátek bylo podmíněno snížením jejich imunogenicity, což umožnila konstrukce humanizovaných protilátek. Krátký přehledový článek rovněž přináší popis struktury a funkce imunoglobulinů, jako i mechanismů cytotoxického účinku monoklonálních protilátek.

Současná onkologie využívá jak nekonjugované protilátky zaměřené proti cílovému proteinu (např. rituximab, trastuzumab, bevacizumab jako součást rutinní terapeutické praxe), tak i konjugované systémy, z nichž některé již byly úspěšně vyzkoušeny v klinických studiích (imunokonjugát BR96-doxorubicin, anti-disialogangliosid GD2/IL-2), jiné jsou předmětem výzkumu. Protilátky lze dále konjugovat s efektorovými složkami (např. toxiny, cytokiny, cytostatiky, radionuklidy) a použít je jako transportní systém k cílové buňce.

Klíčová slova: monoklonální protilátky, cílená léčba malignit, imunoterapie, imunoglobuliny, humanizované protilátky, konjugované protilátky, imunotoxiny, imunocytokiny, radiokonjugáty.

THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES IN ONCOLOGY

One of the strategies in the treatment on oncological disease is the use of monoclonal antibodies. The advantage of this therapy is arraying against a target structure thus avoiding the harm to healthy surrounding tissues. Therapeutic use of antibodies is conditioned by the decrease of their immunogenicity, which was allowed by a construction of humanised antibodies. Short review article brings also a description of structure and function of immunoglobulins and also mechanisms cytotoxic action of monoclonal antibodies. Contemporary oncology uses either unconjugated antibodies against target protein (e. g. rituximab, trastuzumab, bavacizumab as a part of routine practice), or conjugated systems, of which some were already tested successfully in clinical studies (BR96-doxorubicine immunoconjugate, anti-disialogangliosid GD2/IL-2), others are under investigation. Antibodies can be conjugated further with effector compounds (e. g. toxins, cytokines, cytostatics, radionuclides) and can be used as a transport system to target cell. **Key words:** monoclonal antibodies, targeted therapy of malignancies, immunotherapy, immunoglobulins, humanised antibodies, conjugated antibodies, immunotoxins, immunocytokines, radioconjugates.

Historie terapeutického použití monoklonálních protilátek v onkologii

Po objevu protilátek v roce 1890 Emilem von Behringem byl záhy rozpoznán jejich potenciální i praktický terapeutický význam coby „otrávených šípů či magických strel“ především v cílené léčbě infekčních onemocnění. Mimořádnou zásluhu má v této oblasti Paul Ehrlich, který již od roku 1906 zavedl do lékařské literatury pojem imunoterapie. Nicméně trvalo téměř století, než se podařilo realizovat účinné imunoterapeutické postupy v klinické praxi.

Dalším milníkem v imunoterapii se stal objev Cesara Milsteina a George F. Kohlera publikovaný v roce 1974, kterým byla příprava monoklonálních protilátek. Tito autoři spojili v jedné hybridní linii biologické vlastnosti dvou mateřských buněk: B-lymfocyty tvořícího protilátky a nesmrtelné nádorové buňky myelomové řady. Selekcí a namnožením hybridních buněk vzniká hybridomová linie, která není omezená v počtu dělení, je tudíž nesmrtelná, a současně produkuje monoklonální protilátku s unikátní specifitou (1, 2, 3).

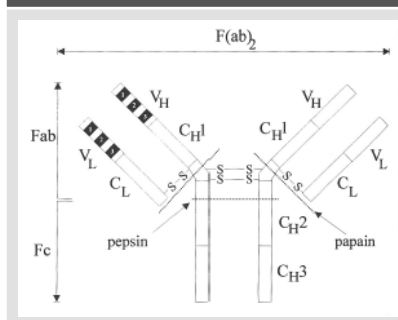
Existence hybridomových linií produkujících definované monoklonální protilátky umožnila rovněž pochopení genetické podstaty antigenní variability protilátek. Byly popsány jednotlivé geny kódující konstantní i variabilní úseky lehkých a těžkých řetězců, což vedlo k jejich přípravě rekombinantními DNA technologiemi. Monoklonální protilátky našly ihned po svém objevu široké diagnostické použití (1, 2). Ehrlichova vize léčebného použití monoklonálních protilátek v léčbě nádorů se však oficiálně dočkala svého naplnění až od roku 1997, kdy Food and Drug Administration (FDA, americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) schválil použití první monoklonální protilátky k adjuvantní imunoterapii lidských B-lymfomů. Poté následovaly další terapeutické aplikace u karcinomu kolorekta, prsu a dosud probíhá hodnocení klinického přínosu a vhodných indikací této léčby i u dalších nádorů (1, 2, 3, 4, 5, 6).

Struktura imunoglobulinů

Imunoglobuliny jsou bílkovinné molekuly schématicky znázorňované tvarem písmene Y, jejichž základní struktura je tvořena čtyřmi

polypeptidickými částmi. Ty jsou uspořádány do dvou zrcadlově identických párů lehkých a těžkých řetězců (viz obrázek 1). N-terminální úsek imunoglobulinů je tvořen čtyřmi variabilními úseky (V-domény), po dvou na těžkých (VH) i lehkých řetězcích (VL). Každá V-doména se skládá ze tří hypervariabilních oddílů, které určují antigenní specifitu protilátek (complementarity determining regions – CDRs). Jednotka tvořená VL-VH se nazývá Fv protilátky a je zodpovědná za vazbu antigenu. Ve srovnání s N-terminálními sekvencemi, je C-konec lehkých i těžkých řetězců sekvencně podstatně konzervativnější.

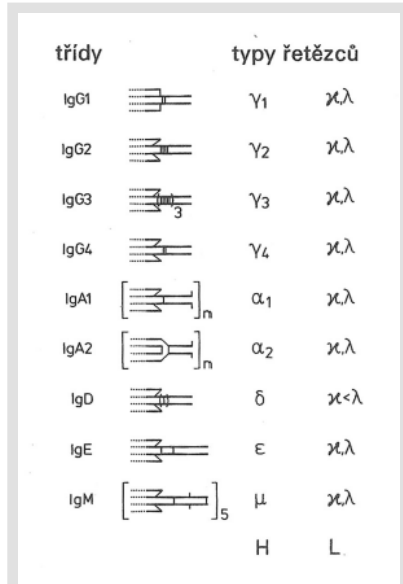
Obrázek 1.



MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

Laboratoř experimentální medicíny, Dětská klinika LF UP a FN Olomouc, Puškinova 6, 775 20 Olomouc
e-mail: hajduchm@atlas.cz

Obrázek 2.



Lehký řetězec nese dva izotypy κ a λ , jejichž zastoupení v molekule imunoglobulinu je individuálně variabilní a zřejmě postrádá fyziologický význam (obrázek 2).

Těžký řetězec může být složen z několika izotypů (μ , δ , γ , α , ϵ), čímž je v podstatě determinována příslušnost protilátky k jednotlivým třídám a podtřídám imunoglobulinů (IgM, IgD, IgG, IgA, IgE). Například nejčastější izotyp těžkého řetězce γ má ve své konstantní části tři sekvenčně vysoce konzervativní domény (C_H1 , C_H2 a C_H3), které vytvářejí konstantní úsek těžkého řetězce. Domény C_H1 a C_H2 jsou propojeny pantovým úsekem. Pantové úseky obou těžkých řetězců jsou mezi sebou propojeny disulfidovými vazbami. C_H2 úsek je glykosylován, což přispívá ke stabilitě imunoglobulinové molekuly. Lehký řetězec má pouze jednu konstantní doménu C_L1 a ta se nachází oproti C_H1 domény. Obě konstantní domény těžkých i lehkých řetězců jsou vzájemně rovněž propojeny disulfidovým můstkem. Zatímco variabilní úseky protilátek Fab určují antigenní variabilitu, konstantní úseky odpovídají za efektorové funkce protilátek, například za vazbu komplementu, za interakci s Fc receptorem na imunokompetentních buňkách a podobně (8, 9).

Štěpení imunoglobulinové molekuly různými proteolytickými enzymy v definovaných úsecích vede k rozpadu nativní bílkoviny na typické fragmenty, čehož lze prakticky využít. Například papain štěpí protilátku na tři fragmenty (10). Jeden fragment se skládá z C_H2 a C_H3 domén, snadno krystalizuje a je známý jako Fc fragment. Další dva fragmenty označené jako Fab (antigen binding) jsou identické a sestávají z celého lehkého řetězce a Fd (část těžkého řetězce obsahující C_H1 doménu). Použijeme-li pepsin, vznikají pouze dva fragmenty: F (ab')₂, což jsou v podstatě

Tabulka 1. Některé s nádorem asociované antigeny použitelné jako cíle pro monoklonální protilátky

Receptory pro	Epiteliální růstový faktor
růstové hormony	fibroblastový růstový faktor vaskulární endoteliální růstový faktor inzulinový růstový faktor somatotropní hormon receptory pro imunocytokiny (IL-2, IL-6 a podobně)
mutované onkoproteiny	protein p53
povrchové buněčné znaky	leukocytární znaky, například CD20 antigeny krevních skupin, například +sialyl Lewisx, sialyl Lewis a
jiné antigeny	karcinoembryonální antigen gangliosidy tyrosináza

Tabulka 2. Farmakologické vlastnosti monoklonálních a rekombinantních protilátek

- vysoká specifita pro nádorové antigeny
- nízká zkřížená reaktivita s normálními somatickými buňkami
- vhodné farmaceutické vlastnosti – vysoká čistota a schůdná velkoobjemová produkce
- možnost předurčit antigenní specifitu
- ovlivnění efektorové funkce protilátky
- možnost navázání toxinu, cytostatika, radionuklidu či cytokinu

Tabulka 3. Problémy léčby monoklonálními protilátkami

- distribuce a průnik protilátky do nádoru
- neadekvátní migrace buněčných efektorů (leukocytů) do nádoru
- antigenní heterogenita nádoru
- maskování či internalizace nádorových antigenů

dva spojené Fab fragmenty a torzo Fc úseku (8, 9, 11, 12, 13, 14).

Funkce imunoglobulinů a mechanismy cytotoxického účinku monoklonálních protilátek

Jak již bylo zmíněno, antigenní komplexmentarita protilátky je vázána na variabilní úseky Fab fragmentů, zatímco Fc úsek zprostředkovává efektorové funkce protilátky. Mezi nejdůležitější patří aktivace klasické dráhy komplementu. Tuto schopnost nemají všechny protilátky, například u lidí je vázána na podtřidu IgG1. Po vazbě příslušné protilátky na bakteriální, eukaryotickou nebo transformovanou nádorovou buňku atakuje její buněčné membrány komplex složek komplementu C5–C9 a současně se uvolňují chemotaktické fragmenty C3a a C5a. Složky komplementu penetrují cytoplazmatickou membránu buňky, čímž ji usmrtí. Současně uvolněné chemoatraktanty vedou ke kumulaci leukocytů a k iniciaci zánětlivé imunitní odpovědi (15, 16, 17, 18).

Některé populace leukocytů (neutrofily, eozinofily, bazofily a zejména makrofágy) exprimují Fc receptor a prostřednictvím Fc konce protilátky rozpoznávají a následně fagocytují nádorové buňky. Tato další fyziologická cytocidní funkce protilátek je závislá na vazbě Fc konce protilátky na Fc receptor exprimovaný na leukocytech. Protilátka zde nemá přímou cytocidní funkci, pouze zprostředkovává rozpoznání nádorové

buňky cytotoxickými NK buňkami (antibody dependent cell cytotoxicity – ADCC). Mechanizmy vlastního rozpoznání nádorové buňky protilátkou navedenými efektorovými buňkami jsou různé, makrofágy se orientují podle změn v lipidické struktuře membrány, NK buňky zřejmě podle defektní exprese antigenů hlavního histokompatibilního komplexu (8, 13, 14, 19).

Třetí potenciálně cytotoxický mechanismus, který může protilátka navodit, vychází z Jerneho konceptu idiotypové a antiidiotypové sítě (20). Stručně řečeno, každá protilátka je specifická pro určitý antigen a její vazebné místo označujeme jako idiotyp. Pakliže vytvoříme protilátku proti tomuto idiotypu protilátky, získáme antiidiotypovou protilátku, která bude napodobovat konformační strukturu původního antigenu. Například, indukujeme-li imunitní odpověď proti protilátce proti inzulinu, dostaneme antiidiotypovou protilátku, která bude konformačně shodná s příslušným epitopem molekuly inzulinu a její aplikace zvířeti vyvolá snížení hladiny krevního cukru. Podobným způsobem lze připravit antiidiotypové protilátky proti nádorovým antigenům, a těmi pak jako vakcínami aktivně imunizovat nemocné s cílem vyvolat aktivní specifickou protinádorovou odpověď imunitního systému. Po podání monoklonální protilátky ve formě pasivní imunoterapie vznikají antiidiotypové protilátky v organismu v různé míře spontánně a mohou navozovat protinádorový efekt přídatným mechanismem aktivní imunitní reakce (3, 7, 21).

Tabulka 4. Biologické účinky navozené nekonjugovanými protilátkami

1. Přímé protinádorové účinky	• indukce apoptózy • interference s vazbou mezi receptorem a jeho ligandem • ovlivnění účinnosti klasických cytostatik • zábrana tvorby proteinů nezbytných pro zachování maligního fenotypu buňky
2. Indukce antiidiotypové imunitní odpovědi	
3. Cytotoxicita závislá na komplementu	
4. Buňkami zprostředkovaná cytotoxicita závislá na protilátce	

Farmakologické aspekty imunoterapie monoklonálními protilátkami

Existence vhodných nádorových antigenů (tabulka 1) a následně monoklonálních protilátek záhy po jejich objevu iniciovala řadu klinických studií v oblasti diagnostiky a léčby nádorových onemocnění. Jejich výsledky však byly přinejmenším sporné a spíše než na terapeutický přínos poukázaly na potíže spojené s jejich aplikací. Výhody monoklonálních protilátek jsou shrnuty v tabulce 2, problémy a nevýhody v tabulce 3

Klíčovým problémem je skutečnost, že průměrná monoklonální protilátka má molekulovou hmotnost kolem 150 kDa, což je zhruba 150× více než klasická cytostatika. Proto mají monoklonální protilátky ve srovnání s běžně užívanými cytostatiky pomalejší distribuční kinetiku a podstatně nižší průnik do nádorové tkáně. V biotických vzorcích získaných od pacientů léčených monoklonálními protilátkami se prokazuje jejich nehomogenní distribuce v rámci nádoru, což je podmíněno nehomogenní expresí nádorových antigenů a také přirozenými bariérami pro imunoglobuliny.

Snížený průnik protilátek byl pozorován v málo vaskularizovaných nádorech. Další bariérou je zvýšený intersticiální tlak uvnitř nádorů, který pracuje proti pasivní difuzi imunoglobulinů do tumoru. Poměrně velká vzdálenost mezi krevní cévou a intersticiem, v němž se nacházejí nádorové buňky, dále prodlužuje čas potřebný k difuzi těchto makromolekul k nádorovým buňkám vzdáleným od krevního řečiště. Tyto distribuční faktory pak limitují použití monoklonálních protilátek u pacientů s objemnějšími nádory a současně omezují i průnik cytotoxických leukocytů do nádoru. Logickým důsledkem těchto úvah je směřování potenciálního využití monoklonálních protilátek k eliminaci cirkulujících nádorových buněk a minimální reziduální choroby (22).

Heterogenní exprese antigenů v nádoru je dalším faktorem ovlivňujícím úspěšnost terapie monoklonálními protilátkami. Snížená denzita antigenů pak bude zřejmě jedním z klíčových mechanismů rezistence nádorových buněk na léčbu protilátkami. V současnosti máme k dispozici pouze několik málo antigenů vhodných k cílené imunoterapii (tabulka 1). Patří k nim imunoglobulinové idiotypy u B-buněčných lym-

fomů, některé leukocytární diferenciační antigeny, mutovaný receptor pro epidermální růstový faktor, onkoprotein HER2/neu, VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor), mutovaný onkopsupresor p53, glykoprotein s adhezivní funkcí asociovaný se střevními nádory CO17 – 1A, karcinoembryonální antigen a podobně (23).

Humanizované monoklonální protilátky

Počáteční klinické studie s použitím monoklonálních protilátek používaly imunoglobuliny produkované hybridomovou technologií, z čehož plyne, že tyto proteiny byly cizorodé (myší). Důsledkem aplikace myších monoklonálních protilátek nemocnému byla indukce imunitní odpovědi a produkce anti-myších protilátek, nazývaných HAMA (human anti-mouse antibodies), v organizmu do 2–3 týdnů po prvním podání monoklonální protilátky pacientovi. Lidské protilátky proti myším imunoglobulinům tvorbou imunokomplexů znemožňují vazbu na nádorový antigen, urychlují eliminaci léčiva z krevního oběhu a mohou vést také k anafylaxi či sérové nemoci. Z těchto důvodů bylo věnováno rozsáhlé úsilí technologii přípravy lidských monoklonálních protilátek a chimerických humánních/myších (humanizovaných) protilátek. Zatímco příprava a zejména průmyslová produkce lidských monoklonálních protilátek je příliš komplikovaná, některé humanizované protilátky již rutinně používáme v klinické praxi (8, 28, 29).

Princip jejich přípravy spočívá v propojení hybridomové a DNA rekombinantní technologie. Nejříve se získá klasickou hybridomovou technologií myší monoklonální protilátka proti nádorovému antigenu. Z hybridomové linie produkující protilátku s příslušnou specifitou se připraví RNA a z ní reverzní transkripční cDNA. Následně se pomocí polymerázové řetězové reakce amplifikují úseky genů myšího imunoglobulinu, které kódují hypervariabilní domény CDR. Touto částí genetické informace se nahradí CDR lidského imunoglobulinu a chimerní geny kódující humanizovanou monoklonální protilátku jsou posléze vloženy do vhodné savčí buňky, ve které jsou velkokapacitně syntetizovány. Z uvedeného vyplývá, že humanizovaná monoklonální protilátka nese variabilní úsek kódující antigenní specifitu z myší monoklonální protilátky a konstantní úseky z lidského immu-

globulinu. Takovéto protilátky mají požadovanou antigenní specifitu a jsou jen minimálně imunogenní (8, 28, 29).

Fragmenty protilátek

Mikroprostředí nádoru a jeho vaskularizace vytvářejí poměrně významnou bariéru pro vstup intaktních makromolekul. V zásadě platí pravidlo, že čím větší je molekula bílkoviny, tím obtížnější je její průnik do tumoru. Z těchto důvodů byla provedena řada studií na chemicky nebo geneticky připravených fragmentech protilátek. Běžně se používají F(ab')₂, Fab a Fv úseky se zachovanou antigenní specifitou (13, 14, 30).

Fv úseky připravené enzymatickou digestí jsou v podmínkách in vivo extrémně nestabilní. Částečné stabilizace bylo dosaženo s použitím jednořetězcových Fv (single chain Fv, scFv), kde V_L a V_H jsou vzájemně propojeny vhodným peptidovým linkerem. Jednořetězcové Fv mají ovšem poměrně nízkou vazebnou afinitu k antigenu, a tak u nich dochází k pouze přechodným interakcím. Mají nejlepší průnik do nádoru, současně jsou však z krevního oběhu velmi rychle eliminovány proteolytickými enzymy. Předpokládá se, že scFv naleznou své optimální uplatnění ve spojení s toxiny, kdy je žádoucí maximální průnik molekuly imunotoxinu do nádoru a jeho současná rychlá clearance z normální nenádorové tkáně. S optimalizací velikosti protilátky a s ohledem na požadovaný terapeutický efekt i délku jeho trvání se pak dále zvýší léčebný potenciál pasivní protilátkové imunoterapie (13, 14, 30).

Nekonjugované protilátky

Protilátky mohou být použity samostatně jako forma pasivní specifické imunoterapie využívající výše popsaných protinádorových imunitních mechanismů, nebo konjugovány s cytotoxickými látkami či radioizotopy, které pouze navádějí k cílovým buňkám (viz dále). Účinky samostatně působících nekonjugovaných protilátek závisí na míře jejich kumulace v nádoru a schopnosti navodit některý z biologických účinků vyjmenovaných v tabulce 4.

Nejvýznamnějšího pokroku bylo dosaženo v oblasti imunoterapie maligních B-lymfomů. Bylo využito individuálně připravených antiidiotypových protilátek i imunoglobulinů směřovaných proti některé z antigenních determinant B-buněk. Snad největšího úspěchu dosáhla humanizovaná monoklonální protilátka anti-CD20, rituximab (Rituxan, Mabthera), která po vazbě na specifický receptor B-buněk spouští neznámým mechanismem programovanou buněčnou smrt – apoptózu. Rituximab je indikován k léčbě B-buněčných lymfomů s nízkým gradingem (46% objektivních klinických odpo-

Tabulka 5. Základní charakteristiky vybraných imunokonjugáčích strategií

1. imunotoxiny	- vysoká cidní účinnost - katalytická podstata toxinu umožňuje amplifikovat biologický účinek v místě nádoru - dobře definované mechanismy účinku používaných toxinů
2. imunokonjugáty s klasickými protinádorovými léčivy	- potvrzená protinádorová účinnost cytostatik - dobře definovaná farmakokinetika, toxicita a účinnost preparátů - možnost využití „by-stander“ efektu - internalizace imunokonjugátu není potřebná
3. imunocytokiny	- možnost přípravy konjugátů rekombinantní technologií - nízká systémová toxicita - lokální indukce protinádorové imunitní odpovědi - možnost volby konjugovaného cytokinu dle typu imunitní odpovědi, která má být preferenčně generována
4. radioimunokonjugáty	- široká škála izotopů vhodných ke klinickému použití - účinnost i v okolních buňkách, které nemají dostatečnou expresi nádorového antigenu - internalizace radioimunokonjugátu není potřebná - předpověditelná toxicita na základě znalosti celkové aplikované radioaktivní dávky

vědí), ale prokázal účinnost také u chronické lymfatické leukemie a u leukemie z vlasatých buněk. Protilátka zřejmě senzibilizuje nádorové buňky vůči standardní chemoterapii, jelikož nemocní léčení kombinací rituximabu s klasickým CHOP režimem dosáhli objektivních odpovědí až ve 100 % (31, 32, 33).

Dalším slibným léčivem je myší monoklonální protilátka 17-1A (edrecolomab – Panorex). Tento preparát aplikovaný nemocným po resekci kolorektálního karcinomu stadia C snížil o 30 % úmrtnost a o 27 % rekurenci onemocnění ve srovnání se skupinou bez adjuvantní léčby. Tato studie mimo jiné potvrdila význam monoklonálních protilátek pro eradikaci minimální reziduální choroby (34). Tyto slibné výsledky vedly ke klinické studii srovnávající adjuvantní léčbu edrecolomabem v monoterapii, v kombinaci s 5-fluorouracilem a leucovorinem s adjuvantní chemoterapií 5-FU s leucovorinem. Výsledky ve smyslu celkového přežití a přežití bez známek nemoci byly stejné ve skupinách léčených adjuvantní chemoterapií s nebo bez edrecolomabu. Monoterapie protilátkami dokonce vedla k horším výsledkům než standardní chemoterapeutický režim. Jako jedno z možných vysvětlení je uváděn vznik HAMA. Vysoké titry protilátek byly detekovány již u druhé nebo třetí infuze (35).

Důležitou skupinou jsou protilátky interagující s vazbou receptoru a jeho ligandu. Typickým představitelem je humanizovaná monoklonální protilátka proti proteinu HER2/neu, trastuzumab (Herceptin), která se váže na receptor analogní epidermálnímu růstovému faktoru a neutralizuje prognosticky nepříznivou amplifikaci genu HER2/neu v nádorových buňkách pacientek s karcinomem prsu. Herceptin je účinný v terapii metastazujícího karcinomu prsu a jeho účinek je potencován klasickými protinádorovými léčivy, například taxolem, doxorubicinem a cisplatinou (24, 25, 26).

V únoru 2004 byla schválena ke klinickému použití v USA (www.fda.gov) u karcinomu kolorekta monoklonální protilátka proti VEGF (významný růstový faktor, který vede k indukci novotvorby cév) Bevacizumab (Avastin).

Antiidiotypové protilátky

V posledním desetiletí se objevila také řada prací zabývajících se využitím antiidiotypových protilátek v onkologické indikaci. Zde však jde již o mechanismem účinku odlišnou aktivní imunizaci čili vakcinaci. Práce provedená na kolorektálním karcinomu popisuje terapeutické užití lidské antiidiotypové protilátky 105AD7, která rozpoznává vazebné místo protinádorové protilátky 791T/36 a napodobuje tak povrchový antigen CD55. Vakcinace nemocných touto protilátkou vede k měřitelné protinádorové imunitní odpovědi, zejména u pacientů s HLA-DR1, HLA-DR3 a HLA-DR7 haplotypy, ačkoliv klinické hodnocení přípravku je zatím předčasné (36). Nadějných výsledků bylo dosaženo rovněž s použitím antiidiotypů simulujících epitopy antigenů melanomových buněk pacientů s maligním melanomem a karcinoembryonálního antigenu u nemocných s kolorektálním karcinomem (37, 38, 39).

Bispecifické protilátky

Zvláštní skupinou nekonjugovaných protilátek přepravených rekombinantními DNA technologiemi jsou bispecifické protilátky. Jedna jejich antigenní specifita bývá namířena proti nádorovému antigenu a druhá proti vhodnému markeru imunokompetentních buněk s cílem přitáhnout cytotoxické buňky do nádoru. Příkladem je bispecifická protilátka, jejíž jedno vazebné místo je namířeno proti HER2/neu a druhé proti nízkofinitnímu Fc receptoru, jenž se nachází na povrchu NK buněk a zralých makrofágů. Aplikace takovéto protilátky vede ke kumulaci a aktivaci cytotoxických

buněk v místě nádoru exprimujícího HER2/neu (40).

Protilátkové konjugáty

V zásadě se jedná o chemické či genetické konjugáty imunoglobulinů nebo jejich fragmentů s vhodnou efektorovou složkou, například s toxiny, cytokiny, cytostatiky, radionuklidy (tabulka 5).

Imunotoxiny

Vazbu monoklonální protilátky nebo jejího fragmentu s toxinem označujeme názvem imunotoxin. Jako toxinu často používáme rostlinných nebo bakteriálních jedů s katalytickou účinností, které smrti buňky v nanomolárních koncentracích. Toxiny mají obvykle dvě domény. První kóduje vazbu toxinu na buňku a druhý pak samotnou katalytickou podjednotku toxinu. V případě imunotoxinu nahrazujeme vazebnou doménu částí imunoglobulinové molekuly, která zaručuje antigenní specifitu a která směřuje toxinovou podjednotku k nádorovým buňkám (4, 5, 6, 41).

Nejčastěji používanými toxiny jsou ricin a pseudomonádový exotoxin. Nevýhodou imunotoxinů je skutečnost, že katalytické podjednotky se uplatňují výlučně intracelulárně a je nezbytná jejich internalizace. Rostlinné a bakteriální toxiny jsou rovněž silně antigenní a vyvolávají časnou imunitní odpověď, která neutralizuje účinnost těchto konjugátů. Přes všechny překážky jsou imunotoxiny mimořádně účinné v řadě preklinických nádorových modelů. Podrobněji se problematice imunotoxinů věnuje následující kapitola (41, 42, 43, 44).

Konjugáty typu

protilátka-cytostatikum

Tento druh protilátkových konjugátů umožňuje cílenou expozici nádorových buněk standardnímu cytostatiku ve vysoké lokální koncentraci. Protinádorová chemoterapeutika mají obvykle dobře prostudovanou farmakologii, toxicitu i účinnost ve své volné formě. Lze tudíž předpokládat, že jejich podání ve formě konjugátu s protilátkou bude vzhledem k lokálnímu působení méně toxické a účinnější (41).

Slibných preklinických výsledků bylo například dosaženo s použitím imunokonjugátu BR96-doxorubicin v řadě experimentálních nádorových modelů. Klinické studie fáze I prokázaly, že limitní toxicitou konjugátu je gastritida, pravděpodobně způsobená interakcí s Fc koncem intaktní molekuly IgG BR96 (45, 46). Nedávno byly rovněž publikovány výsledky s calicheamicinem konjugovanými protilátkami v léčbě leukemií a některých solidních tumorů (47). Konjugáty typu protilátka-cytostatikum rovněž nabízejí zajímavou možnost překonání rezistence nádorových buněk na cytostatika.

Tyto komplexy neprocházejí cytoplazmatickou membránou pasivní difuzí, nýbrž aktivní a pasivní endocytózou. Nemohou být proto z nádorové buňky eliminovány transmembránovými transportéry, které v rezistentních buňkách pumpují cytostatika z cytoplazmy zpět do extracelulárního prostoru.

Imunocytokiny

Reprezentují zvláštní skupinu hybridních molekul, které mají v sobě obsaženo vazebné místo protilátky pro antigen a biologicky aktivní část cytokinu. Protilátková doména navádí molekulu cytokinu do nádoru a cytokinová část zde aktivuje imunitní odpověď. Tento postup se zdá být užitečný v léčbě chemorezistentních dobře imunogenních nádorů, například neuroblastomu, kolorektálního karcinomu a maligního melanomu. Byla připravena řada chemických i genetických konjugátů protilátek s různými cytokiny (TNF- α , IL-2, GM-CSF, IL-4) (48). Povzbudivých výsledků bylo dosaženo v preklinických modelech s imu-

nocytokinem anti-disialogangliosid GD2/IL-2 v modelu maligního melanomu a neuroblastomu. Preparát je v současnosti ve fázi klinického zkoušení (49, 50, 51).

Radioimunokonjugáty

Radioimunoterapie je nová léčebná modalita, která s použitím radioimunokonjugátů dokáže do místa nádoru dodat 3x až 50x vyšší dávku záření než do normální tkáně. K vazbě na bílkovinnou molekulu protilátky se využívá vysokoenergetických β -zářičů s relativně krátkým poločasem rozpadu, nejčastěji ^{131}I nebo ^{90}Y . Výhodou radioimunokonjugátů je skutečnost, že k navození žádaného biologického účinku není potřeba jejich vazba na každou nádorovou buňku, jelikož emitované záření má větší akční rádius než toxiny či cytostatika.

Vysoká účinnost těchto léčiv byla prokázána zejména u některých hematologických malignit. Za zmínku stojí studie Presse et al., který aplikoval myeloablativní dávku radioimunokon-

jugátu protilátky anti-CD20 a ^{131}I pacientům s chemorezistentním lymfomem. Čtyřiaosmdesát procent těchto pacientů dosáhlo kompletní remise a 11% remise parciální. Řada klinických odpovědí byla dlouhodobá, až 62% nemocných bylo bez progresu dva roky po léčbě (52). Slibné výsledky byly také publikovány s použitím anti-CD33 radioimunokonjugátu v rámci předtransplantační přípravy nemocných s akutní myeloidní leukémií (53, 54, 55).

Poděkování:

Práce na projektech spojených s terapeutickými monoklonálními protilátkami je na našich pracovištích realizována díky podpoře grantových agentur: Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy ČR (J14/98: 151100001), Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví ČR (7506-3, 7495-3) a z výtežku Běhu Terryho Foxe.

Literatura

- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. *Nature*. 1975; 256: 495–497.
- Pastan I, Willingham MC, Fitzgerald DJ. Immunotoxins. *Cell*. 1986; 47: 641–648.
- Pai LH, Pastan I. Immunotoxin therapy for cancer. *JAMA* 1993; 269(1): 78–81.
- Vitetta ES, Fulton RJ, May RD, Till M, Uhr JW. Redesigning major poisons to create antitumor reagents. *Science*. 1987; 238: 1098–1104.
- Pastan I, Chaudhary V, Fitzgerald D. Recombinant toxins as novel therapeutic agents. *Annu Rev Biochem*. 1992; 61(suppl): K31–K54.
- Pai LH, Batra JK, Fitzgerald DJ, Willingham MC, Pastan I. Anti-tumor activities of immunotoxins made of monoclonal antibody B3 and various forms of *Pseudomonas* exotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 3358–3362.
- Souriau C, Hudson PJ. Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2003; 2: 305–318.
- Rosypal S. Úvod do molekulární biologie, 2. díl, 2000, Brno, 502–572.
- Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics, Bios Scientific Publishers, Ltd, Oxford, UK, 1999: 202–208.
- Vermeer AWP, Norde W. The thermal stability of immunoglobulin: Unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophysical Journal* 2000; 78: 394–404.
- Jones RG, Landon J. A protocol for enhanced pepsin digestion: A step by step method for obtaining pure antibody fragment in high yield from serum. *J Immunol Methods* 2003; 275: 235–250.
- French RR. Production of bispecific end trispecific F(ab)2 and F(ab)3 antibody derivatives. *Methods Mol Biol* 1998; 80: 121–134.
- Ferenčík M, Rovenský J, Mathea V. Dictionary of Immunology. Slovak Academic Press, Bratislava, 2000.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology, Mosby International Ltd, London, 1998, 5. vydání.
- Mian IS, Bradwell AR, Olson AJ. Structure, function and properties of antibody binding sites. *J Mol Biol* 1991; 217(1): 133–151.
- Guttieri MC, Sinha T, Bookwalter C, et al. Cassette vectors for conversion of Fab fragments into full-length human IgG1 monoclonal antibodies by expression in stably transformed insect cells. *Hybrid Hybridomics* 2003; 22(3): 135–145.
- Willemsen RA, Debets R, Chames P, Bolhuis RL. Genetic engineering of T cell specificity for immunotherapy of cancer. *Hum Immunol* 2003; 64(1): 56–68.
- Bird P, Lachmann PJ. The regulation of IgG subclass production in man: low serum IgG4 in inherited deficiencies of the classical pathway of C3 activation. *Eur J Immunol* 1988; 18(8): 1217–1222.
- Cooley S, Burns LJ, Repka T, Miller JS. Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Exp Hematol* 1999; 27(10): 1533–1541.
- Jerne NK. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol* 1974; 125C(1–2): 373–389.
- Uchigata Y, Takayama-Hasumi S, Kawanishi K, Hirata Y. Inducement of antibody that mimics insulin action on insulin receptor by insulin autoantibody directed at determinant at asparagine site on human insulin B chain. *Diabetes* 1991; 40(8): 966–970.
- Shockley TR, Lin K, Nagy JA, et al. Penetration of tumor tissue by antibodies and other immunoproteins. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 618: 367–382.
- Cersosimo RJ. Monoclonal antibodies in the treatment of cancer. *Am J Health Syst Pharm* 2003; 60(16): 1631–1641.
- Špačková K, Trojanec R, Šoukalová J, Cwiertka K, Hajdúch M: Herceptin – první geneticky směřované léčivo v terapii karcinomu prsu. *Klin Farmakol Farm* 2002; 16(1–2): 29–30.
- Trojanec R, Špačková K, Cwiertka K, Džubák P, Janošáková A, Kolář Z, Houserková D, Mihál V, Hajdúch M: Amplifikace genu Her-2/neu: molekulární, buněčné a klinické aspekty. *Klin Farmakol Farm* 2002; 16(1–2): 23–29.
- Sliwkowski MX, et al. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 1999; 26: 60–70.
- Weiner LM. An overview of monoclonal antibody therapy of cancer. *Semin Oncol* 1999; 26: 41–50.
- Klee GG. Human anti-mouse antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124(6): 921–923.
- van Dijk MA, van de Winkel JG. Human antibodies as next generation therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 2001; 5(4): 368–374.
- Colcher D, Pavlinkova G, Beresford G, Booth BJ, Batra SK. Single-chain antibodies in pancreatic cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 880: 263–80.
- Boye J, Elter T, Engert A. An overview of the current clinical use of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Ann Oncol* 2003; 14(4): 520–535.
- Anderson DR, Grillo-Lopez A, Varns C, et al. Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Biochem Soc Trans* 1997; 25(2): 705–708.
- Bendandi M, Longo DL. Biologic therapy for lymphoma. *Curr Opin Oncol* 1999; 11: 343–350.
- Riethmüller G, Schneider-Gadicke E, Schlimok G. Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group. *Lancet* 1994; 343(8907): 1177–1183.
- Punt CJA, Nagy A, Douillard JY, et al. Edercolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study. *Lancet* 2002; 360: 671–677.
- Durrant LG, Maxwell-Armstrong C, Buckley D, et al. A neoadjuvant clinical trial in colorectal cancer patients of the human anti-idiotypic antibody 105AD7, which mimics CD55. *Clin Cancer Res* 2000; 6(2): 422–430.
- Lutzky J, Gonzalez-Angulo AM, Orzano JA. Antibody-based vaccines for the treatment of melanoma. *Semin Oncol* 2002; 29(5): 462–470.
- Zbar AP, Lemoine NR, Wadhwa M, et al. Biological therapy: approaches in colorectal cancer. Strategies to enhance carcinoembryonic antigen (CEA) as an immunogenic target. *Br J Cancer* 1998; 77(5): 683–693.
- Foon KA, John WJ, Chakraborty M, et al. Clinical and immune responses in advanced colorectal cancer patients treated with anti-idiotypic monoclonal antibody vaccine that mimics the carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res* 1997; 3(8): 1267–1276.
- Repp R, Van Ojik HH, Valerius T, et al. Phase I clinical trial of the bispecific antibody MDX-H210 (anti-Fc γ RII x anti-HER-2/neu) in combination with Filgrastim (G-CSF) for treatment of advanced breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 89(12): 2234–2243.
- Kreitman RJ. Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 1999; 11(5): 570–578.

42. Vitetta ES, Thorpe PE. Immunotoxins containing ricin or its A chain. *Semin Cell Biol* 1991; 2(1): 47–58.
43. Pastan I. Immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin A: a short history. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52(5): 338–341.
44. Kreitman RJ. Recombinant fusion toxins for cancer treatment. *Expert Opin Biol Ther* 2002; 2(8): 785–791.
45. Hellstrom I, Hellstrom KE, Senter PD. Development and activities of the BR96-doxorubicin immunoconjugate. *Methods Mol Biol* 2001; 166: 3–16.
46. Tolcher AW, Sugarman S, Gelmon KA, et al. Randomized phase II study of BR96-doxorubicin conjugate in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17(2): 478–484.
47. Damle NK, Frost P. Antibody-targeted chemotherapy with immunoconjugates of calicheamicin. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3(4): 386–390.
48. Dillman RO. Monoclonal antibodies in the treatment of malignancy: basic concepts and recent developments. *Cancer Invest* 2001; 19(8): 833–841.
49. Frost JD, Hank JA, Reaman GH, et al. A phase I/IB trial of murine monoclonal anti-GD2 antibody 14.G2a plus interleukin-2 in children with refractory neuroblastoma: a report of the Children's Cancer Group. *Cancer* 1997 Jul 15; 80(2): 317–333.
50. Lode HN, Xiang R, Varki NM, et al. Targeted interleukin-2 therapy for spontaneous neuroblastoma metastases to bone marrow. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(21): 1586–1594.
51. Albertini MR, Gan J, Jaeger P, et al. Systemic interleukin-2 modulates the anti-idiotypic response to chimeric anti-GD2 antibody in patients with melanoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996; 19(4): 278–295.
52. Press OW, Leonard JP, Coiffier B, et al. Immunotherapy of Non-Hodgkin's lymphomas. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2001; 221–240.
53. Buschbaum DJ, et al. Targeted strategies for cancer radiotherapy. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3048s–3055s.
54. DeNardo SJ, Kroger LA, DeNardo GL. A new era for radiolabeled antibodies in cancer? *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 563–569.
55. Zelenetz AD. Radioimmunotherapy for lymphoma. *Curr Opin Oncol* 1999; 11: 375–580.