

Katarzyna Adamczyk

Instytut Chemii i Ochrony Środowiska, Akademia im. Jana Długosza,
42-200 Częstochowa, Al. Armii Krajowej 13/15, e-mail: kasiaadamczyk23@gazeta.pl

Przeciwciała monoklonalne: odkrycie i zastosowanie

Streszczenie: W artykule omówiono historię opracowania technologii fuzji limfocytów dla produkcji przeciwciał monoklonalnych (mAbs), cząsteczek, które są dziś niezastąpionym narzędziem badawczym w różnych dziedzinach badań podstawowych, diagnostyce i terapii medycznej. Opisano również poszczególne grupy przeciwciał monoklonalnych oraz niektóre ich zastosowania w terapii nowotworów.

Słowa kluczowe: diagnoza, fuzja limfocytów, terapia nowotworów

Wstęp

W 1975 roku Georges Köhler (1946–1995) i César Milstein (1927–2002) opracowali technikę fuzji limfocyta B (pochodzącego od myszy) z komórką szpiczaka (nowotworu), która doprowadziła do otrzymania komórek hybrydowych nazwanych hybrydomami. Komórki te posiadały cechy obu komórek rodzicielskich: nieśmiertelność komórki nowotworowej i zdolność do masowej produkcji specyficznych przeciwciał, takich jak wytwarzane przez użytą do fuzji komórkę B. Wszystkie hybrydomy, pochodzące od jednej komórki hybrydowej uzyskanej w wyniku fuzji, produkują przeciwciała o jednym, znanym rodzaju swoistości. Takie pochodzące z jednego klonu hybrydom przeciwciała nazywa się przeciwciałami monoklonalnymi. Mogą być one używane zarówno w badaniach podstawowych, w diagnostyce oraz praktyce klinicznej, wiele z nich stosuje się jako leki dla osób cierpiących na raka, artretyzm i choroby serca. Köhler i Milstein otrzymali za swoje odkrycie Nagrodę Nobla wraz z Nielsem Jerne'm w roku 1984.

1. Odkrycie przeciwciał monoklonalnych

Aby zdać sobie sprawę z drogi, która zawiodła uczonych do odkrycia metody wytwarzania przeciwciał monoklonalnych, musimy cofnąć się o prawie pół wieku. Niels Kai Jerne (1911–1994) pracował wówczas nad teorią, która wyjaśniałaby proces powstawania różnorodności przeciwciał. W jaki sposób jest

to bowiem możliwe, aby układ odpornościowy produkował przeciwciała rozpoznające właściwie każdy mikroorganizm (bakterie, grzyby, drożdże, wirusy) czy inne pasożyty? Niels Jerne był pierwszym naukowcem, który wysunął teorię selekcji naturalnej w formowaniu przeciwciał (1955). W przeciwieństwie do ówczesnych tez podstawą jej była selekcja działająca na poziomie komórkowym. Jerne argumentował, że pojawienie się antygenów nie wywołuje procesu tworzenia przeciwciał przeciwko danemu, określonemu antygenowi na zasadzie instrukcji (kiedy to antygen dostawszy się do komórki służy jako matryca, na której odpornościowe białko związa się przestrzennie, tworząc w ten sposób konfigurację komplementarną do antygeny). Twierdził on, iż antygen powoduje „naturalną selekcję” przeciwciał rozpoznających go. Frank Macfarlane Burnet udoskonalił hipotezę Jerne’a, znaną obecnie jako „teoria selekcji klonalnej”, wysuwając wniosek, iż możliwe jest powstanie ogromnej liczby klonów limfocytów, gotowych do swoistej odpowiedzi na wiele różnych antygenów, natomiast już po wtargnięciu antygeny do organizmu dochodziłoby jedynie do selekcji wyszukujących i rozpoznających go limfocytów określonego klonu [1-3].

Drugie ważne odkrycie Jerne’a okazało się mieć niespodziewanie duże znaczenie praktyczne. Przedstawił on rewolucyjną metodę tysinek hemolitycznych, która pozwoliła immunologom na uwidocznienie i określenie liczby produkujących przeciwciała limfocytów B bez użycia mikroskopu, na zwykłej szalce Petriego. W metodzie tej wylewa się ciekłą warstwę żelu agarowego, zawierającego zawiesinę komórek śledziona myszy (uczulonych czerwonymi krwinkami barana), wymieszaną z zawiesiną erytrocytów baranich, do szalki Petriego. Płytkę tę poddaje się inkubacji (kilka godzin w temperaturze 37°C), następnie na jej powierzchnię nalewa się świeżą surowicę świnki morskiej jako źródło układu dopełniacza. Po ponownej inkubacji trwającej około 45 minut oblicza się liczbę plamek hemolizy, widocznych na płytce. Plamki te są to miejsca, w których wydzielane są przeciwciała rozpoznające antygeny na powierzchni erytrocytów baranich. Ponieważ w obecności dopełniacza przeciwciała te wywołują rozpad krwinek czerwonych (hemolizę), plamki hemolizy przez analogię do lizy bakterii pod wpływem bakteriofaga nazwano „tysinkami”. Jak wypowiedział się Niels Jerne: „Kiedy wróciłem [do laboratorium] z moich ferii bożonarodzeniowych w styczniu 1963 roku, mój współpracownik pokazał mi płytkę z setkami malutkich tysinek, które po wybarwieniu tła [zawierającego czerwone krwinki] benzydyną wyglądały jak gwiazdy na bezchmurnym niebie”. Bez tego odkrycia bardzo niewygodne i czasochłonne byłoby wykrywanie komórek hybrydowych produkujących przeciwciała monoklonalne [1,4,5].

Milstein, który również interesował się zagadnieniem powstawania i występowania różnorodności przeciwciał, wierzył, że problem ten zostanie

rozwiązany dzięki określeniu ich struktury chemicznej. W latach 1965 - 1970 uczony pracował nad wyjaśnieniem istnienia regionów stałych i zmiennych w cząsteczce przeciwciała. Istniały bowiem miliony różnych struktur przeciwciał, a struktury te pochodziły przecież z białka, które miało w części stałej niezmienną podstawową sekwencję aminokwasów zakodowaną przez jeden z kilku genów.

Okolo roku 1970 Milstein i jego współpracownicy nabrali przekonania, że liczba pojedynczych genów kodujących sekwencję podstawową jest nieduża, a powstawanie niekończącej się różnorodności przeciwciał zachodzi w procesach somatycznych, w wyniku mutacji, zdarzających się z ogromną częstością (hipermutacji) w obrębie wybranego odcinka genu. Aby to udowodnić, uczeni potrzebowali jednorodnych preparatów przeciwciał do badania sekwencji aminokwasów w tych białkach. Jednakże sekwencjonowanie przeciwciał izolowanych z surowic odpornościowych było niemożliwe, ponieważ nie dało się ich wyodrębnić z mieszaniny bardzo różnych przeciwciał wytwarzanych przez różne limfocyty. Jedynym wyjątkiem zdarzającym się w naturze są szpiczaki – nowotwory limfocytów B, wywodzące się z jednej komórki wyjściowej i wytwarzające monoklonalne białko immunoglobulinowe. Nieznana jest jednak na ogół swoistość takiej immunoglobuliny, więc nie można badać w jaki sposób ewentualne mutacje mogą wpływać na jej oddziaływanie z antygenem.

W czasie, gdy Milstein pracował nad zagadnieniem różnorodności przeciwciał, jego współpracownik Cotton przygotowywał inny typ eksperymentu, który okazał się ważniejszy niż na początku sądzono. Dotyczył on fuzji dwóch komórek szpiczaka w hodowli, u którego badano zjawisko wyłączenia allelicznego, zapobiegające reorganizacji genów u drugiego z pary homologicznych chromosomów w komórce B, która zsyntetyzowała już po jednym rodzaju łańcuchów H i L. Przeprowadzona fuzja wykazała, że zjawisko allelicznego wyłączenia genów nie było dominujące. Wręcz przeciwnie, fuzja pozwoliła otrzymać mieszańca z kodominacyjną ekspresją łańcuchów przeciwciał pochodzących od obu komórek rodzicielskich.

Milstein przyjechał na początku lat 70. do Basel Institute z wynikami swoich badań, aby wygłosić wykład, po którego wysłuchaniu na zawsze zmieniło się życie Köhlera. Przyłączył się on do głównego projektu badawczego Milsteina i współpracowników, jakim było poszukiwanie somatycznych mutantów w komórkach produkujących przeciwciała. Wziął także udział w innym, mniejszym projekcie, badającym fenotypową ekspresję somatycznych komórek hybrydowych powstałych z fuzji komórek szpiczaka ze zmutowanymi komórkami tego nowotworu.

W czasie tych badań, grupa uczonych zrozumiała, że nie można przeprowadzać, jak w poprzednich doświadczeniach, „przesiewu”

zmutowanych komórek w celu znalezienia mutantów ze zmienionymi właściwościami elektroforetycznymi, ponieważ byłaby to metoda zbyt czasochłonna. Jedyną drogą naprzód wydawało się użycie linii komórkowej szpiczaka zdolnej do ekspresji przeciwciał. Można by badać w ten sposób mutanty, opierając się na zdolności tych komórek do wytwarzania przeciwciał o znanej swoistości. Chociaż były wówczas znane komórki szpiczaka zdolne do spełnienia tej roli, żadne nie okazały się odpowiednie. Późniejsza wypowiedź Milsteina: „Ponieważ nie mogliśmy zdobyć gotowej linii komórek, które robiłyby to, co chcielibyśmy, byliśmy zmuszeni ją skonstruować. W ten sposób drobny eksperyment, który przeprowadziliśmy w ramach badań dotyczących hybrydyzacji komórek szpiczaka rozwinął się w metodę produkcji hybrydom” [6].

Köhler zajmował się w owym czasie poszukiwaniem sposobu na uzyskanie odpowiedniej ilości przeciwciał z hodowli komórek B, potrzebnej do badań. Nie było to możliwe, ponieważ limfocyty B nie żyją długo *in vitro*. Po wysłuchaniu seminarium Milsteina, Köhler znalazł wreszcie rozwiązanie tego problemu. Uczony próbował odkryć, jak zmienne i stałe regiony lekkich i ciężkich łańcuchów przeciwciał współdziałają powodując wytworzenie swoistości antygenowej. Rozważył fuzję komórek B, które produkują przeciwciała przeciwko znanemu antygenowi, z komórkami szpiczaka, aby uczynić je nieśmiertelnymi - w ten sposób mogłyby bez końca proliferować w pożywce, wydzielając przy tym przeciwciała o pożądanej swoistości. W pierwszym etapie doświadczenia immunizowano myszy przeciw antygenom erytrocytów baranich. Po immunizacji myszy można stwierdzić w śledziona zwierzęcia komórki wytwarzające przeciwciała przeciwko antygenom erytrocytarnym, przy czym każda komórka produkuje przeciwciała jednego rodzaju (erytrocyty baranie niosą na sobie antygeny I, II, i/lub III – stąd przeciwciała anty-I, anty-II i anty-III). Köhler i Milstein dokonali fuzji komórek limfocytów B pobranych ze śledziona immunizowanego zwierzęcia z dostępną linią komórek szpiczaka, tworząc klon komórkowy o cechach hybrydy.

Do wykrycia hybrydom (hybryd komórek B i szpiczaka), które wydzielają przeciwciała przeciwko czerwonym krwinkom barana zastosowano metodę łąsinek opracowaną przez Jerne'a. Komórki te wydzielają do środowiska tylko jeden typ przeciwciała antyerytrocytarnego, przeciwko jednemu antygenowi, np. anty-I. Otrzymano w ten sposób klony komórek, syntetyzujących to samo przeciwciała, dlatego obecnie stosuje się określenie przeciwciała monoklonalne. Milstein zrozumiał wówczas, że wykorzystanie nowo odkrytej metody do wytwarzania przeciwciał monoklonalnych ma większe znaczenie, niż ich główny cel, jakim były w owym czasie badania nad różnorodnością przeciwciał [1,6,7].

Milstein odłożył na razie na bok zagadnienie różnorodności przeciwciał, aby skupić się na zademonstrowaniu praktycznego znaczenia przeciwciał

monoklonalnych w różnych dziedzinach badań podstawowych i w diagnostyce klinicznej. Uczony był w stanie wykazać, że hybrydowe komórki szpiczaka nadawały się do użycia w produkcji standardowych odczynników, takich jak przeciwciała antyhistaminowe i antyallotypowe, do badań powierzchni komórek antygenów nowotworowych. Procedura ta również pozwalała na dostarczanie odczynników do frakcjonowania komórek. Przeciwciała monoklonalne mogły także zostać użyte jako odczynniki do określania grup krwi w neurofarmakologii, oraz na dużą skalę w oczyszczaniu naturalnych produktów. Są to podstawowe z ogólnych zastosowań przeciwciał monoklonalnych; na początku, po wynalezieniu technologii produkcji hybrydom było jeszcze możliwe krótkie streszczenie jej zastosowań. Obecnie jednak zastosowanie przeciwciał monoklonalnych w badaniach podstawowych, biochemii klinicznej, diagnostyce, terapii medycznej i w przemyśle jest tak rozpowszechnione, iż nie da się go łatwo podsumować [6].

Po dokonanych odkryciach ani Milstein ani Kohler nie ubiegali się o ich opatentowanie. Prawie dziesięć lat zabrało Komisji Nobla uznanie ważności odkrycia metody produkcji przeciwciał monoklonalnych. W 1984 roku Jerne, Milstein i Köhler dzielili Nagrodę Nobla z dziedziny Fizjologia i Medycyna otrzymaną „za teorię zasad zróżnicowania, rozwoju i kontroli działania układu odpornościowego oraz za odkrycie mechanizmów rządzących powstawaniem przeciwciał monoklonalnych”. Bez Nielsa Jerne’a nie byłoby bowiem teorii dotyczących zróżnicowania się przeciwciał, nie byłoby założonego przez niego Instytutu Immunologii w Bazylei, rewolucyjnej metody łąsinek hemolitycznych, czy w końcu seminarium Milsteina. Bez Milsteina nie byłoby technologii produkcji hybrydom. Gdyby zaś nie Köhler, musielibyśmy czekać jeszcze pewnie bardzo długo aby wszystkie te odkrycia połączyły się w jedno [1].

2. Otrzymywanie przeciwciał monoklonalnych

Przeciwciała monoklonalne otrzymuje się w wyniku fuzji limfocytów B, które determinują swoistość produkowanych przez hybrydy przeciwciał, z komórkami szpiczaka (nowotworu, który wywodzi się z limfocytów B) dostarczającymi hybrydzie rybosomy oraz aparat Golgiego, lecz przede wszystkim umożliwiającymi jej nieograniczoną proliferację *in vitro*.

Przed fuzją limfocyty B uczula się antygenem, następnie miesza się je z komórkami szpiczaka, dodając substancji ułatwiających fuzję błon (np. glikol polietylenowy). Tylko niektóre komórki ulegają fuzji, jednak ponieważ fuzji mogą ulegać zarówno dwa limfocyty jak i dwie komórki nowotworowe, otrzymuje się niewiele pożądaných hybryd, w dodatku nie wszystkie z nich wytwarzają przeciwciała. Do fuzji z komórkami B używa się specyficznych linii komórek szpiczaka. Przede wszystkim powinny to być komórki pozbawione

możliwości wytwarzania własnych przeciwciał, ponieważ gdyby prawidłowo je wytwarzały, bardzo trudno byłoby wyizolować z hodowli przeciwciała produkowane przez hybrydy, o pożądanej swoistości. Oprócz tego, pożądane są takie komórki szpiczaka, które wykazują jakiś defekt metaboliczny, np. nie syntetyzują ważnego dla nich enzymu. Dzięki temu po fuzji w selektywnym środowisku można łatwo „pozbyć się” komórek nowotworowych, które nie uległy fuzji z limfocytami, pozostawiając tylko komórki hybrydowe (limfocyty giną w hodowli po krótkim czasie). Następnie rozcieńcza się zawiesiny hodowlane, aby uzyskać pojedyncze hybrydy, które wysiewa się do oddzielnych mikroplutek z dołkami (ze studzienkami). Cały czas kontroluje się płyn z dołków na obecność przeciwciał. Jeżeli w jednym dołku znajduje się jedna komórka hybrydowa, wszystkie pochodzące od niej przeciwciała będą identyczne, więc będą to przeciwciała monoklonalne [8].

3. Terapia z użyciem przeciwciał monoklonalnych

W leczeniu ludzi czy zwierząt zastosowanie przeciwciał monoklonalnych polega głównie na ich bezpośrednim podawaniu w postaci czystej lub zmodyfikowanej. Jedne z pierwszych badań w dziedzinie immunoterapii nowotworów dotyczyły zdolności cząsteczek przeciwciał do pobudzania układu immunologicznego do walki z cząsteczkami chorobotwórczymi. Jednak ponieważ samo podanie przeciwciał nie było wystarczające w walce z nowotworem, zaczęto rozważać możliwości użycia przeciwciał monoklonalnych jako specyficznych nośników przenoszących leki, radioizotopy czy toksyny [9].

3.1. Przeciwciała monoklonalne nieskoniugowane

Aktywując układ immunologiczny, przeciwciała monoklonalne nieskoniugowane indukują niszczenie komórek nowotworowych, na drodze dwóch głównych mechanizmów, jakimi są cytotoksyczność zależna od przeciwciał oraz cytotoksyczność zależna od komplementu (dopełniacza). Cytotoksyczność zależna od dopełniacza indukowana jest przez związanie antygenów znajdujących się na komórce docelowej przez przeciwciało (poprzez jego fragmenty Fab). Fragment Fc wiąże składniki dopełniacza, uruchamiając kaskadę enzymów, co prowadzi do wytworzenia kompleksu atakującego błonę komórkową komórki nowotworowej. Cytotoksyczność zależna od przeciwciał (ADCC - ang. Antibody Dependent Cell Cytotoxicity) to proces, w którym przeciwciało działa jak łącznik, wiążący ze sobą komórkę docelową (nowotworową) i komórkę efektorową (T lub NK). Komórka docelowa jest niszczone przez zbliżoną do niej komórkę NK lub fagocyt, w procesie lizy lub fagocytozy. Mechanizm ADCC wykorzystują takie przeciwciała monoklonalne jak: trastuzumab, rituksimab, alemtuzumab. Trastuzumab wykorzystuje również

mechanizm blokowania receptorów, który polega na tym, iż przeciwciało wiążąc się do receptorów komórki nowotworowej, blokuje miejsce wiązania do tych receptorów innych cząsteczek, na przykład pobudzających wzrost komórek nowotworowych. W ten sposób wzrost guza zachodzi wolniej [10-12].

Tradycyjne mysie przeciwciała monoklonalne mają ograniczone zastosowanie w terapii człowieka, z uwagi na dość szybką inaktywację przez komórki układu immunologicznego człowieka. Po podaniu przeciwciał pochodzących od gryzonia system odpornościowy człowieka rozpoznaje je jako obce białko i tworzy przeciwciała przeciwko przeciwciałom mysim, co określamy jako odpowiedź HAMA (human anti mouse antibody). Ta reakcja na mysie przeciwciała może wywoływać w organizmie człowieka symptomy podobne do grypy, reakcji alergicznych, a w najcięższych przypadkach prowadzić do śmierci. Sprawia to, iż mysie przeciwciała monoklonalne nie mogą być stosowane w leczeniu ludzi przez zbyt długi czas, a czasem w ogóle nie jest to możliwe. W dodatku czas przeżywania mysich przeciwciał *in vivo* jest dość krótki – wszystko to znacznie ogranicza efektywność terapii [13].

3.1.1. Przeciwciała chimeryczne i humanizowane

Z pomocą inżynierii genetycznej konstruuje się chimeryczne przeciwciała monoklonalne w ten sposób, że regiony stałe łańcuchów ciężkiego (H) i lekkiego (L) mysiego przeciwciała monoklonalnego danej klasy zastępuje się na poziomie DNA regionami stałymi ludzkich łańcuchów H i L innego przeciwciała tej samej klasy. W utworzonej tak cząsteczce tylko regiony zmienne (V), o znanej specyficzności antygenowej, pochodzą od myszy, natomiast reszta genu, około 75%, jest pochodzenia ludzkiego. Procedura wytwarzania przeciwciał chimerycznych znacznie osłabia immunogenność przeciwciał, chociaż nie likwiduje jej jeszcze całkowicie. Chimeryczne przeciwciała nie są jednak tak szybko eliminowane z krążenia jak zwykłe przeciwciała monoklonalne. U ludzi stosowane jest między innymi przeciwciało Infliximab (Remicade®), obiecujące w walce z chorobami autoimmunologicznymi, takimi jak reumatoidalne zapalenie stawów [14].

Rituksimab jest chimerycznym przeciwciałem monoklonalnym, stosowanym w leczeniu nawrotowych oraz opornych chłoniaków nieziarnicznych o niskim stopniu złośliwości. Przeciwciało to skierowane jest przeciwko białku powierzchniowemu CD20, które znajduje się na zdrowych limfocytach B, oraz na większości chłoniaków wywodzących się z komórek B. Po związaniu rituksimabu z antygenem, na drodze cytotoksyczności zależnej od układu dopełniacza, bądź komórkowej zależnej od przeciwciał, dochodzi do lizy komórek nowotworowych. Przeciwciało rituksimab zostało zarejestrowane w 1997 roku przez US Food and Drug Administration (FDA) [15,16].

Można obecnie produkować przeciwciała, które posiadają tylko regiony hiperzmiennie pochodzące od myszy, natomiast reszta DNA pochodzi od człowieka. Takie przeciwciała, zawierające około 95% sekwencji ludzkich nazywamy „uczłowieczonymi” czyli humanizowanymi. Do przeciwciał humanizowanych należy przeciwciało Vitaxin, które wiąże się do integryn naczyniowych znajdujących w naczyniach krwionośnych guzów (nieobecnych w normalnej tkance). W próbach klinicznych Vitaxin powodował kurczenie się guzów bez szkodliwych skutków ubocznych. Natomiast Herceptin® (trastuzumab) wiąże HER2, który jest receptorem dla epidermalnego czynnika wzrostu (EGF) znajdującego się na niektórych komórkach nowotworowych (np. raka piersi, chłoniaka) [8,17].

3.1.2. Ludzkie przeciwciała monoklonalne

Całkowicie ludzkie przeciwciała monoklonalne można utworzyć przez fuzję limfocytów B człowieka z komórkami szpiczaka. Jest to jednak dość trudną procedurą, ponieważ wciąż niedostępna jest odpowiednia ludzka linia komórek szpiczaka jako partner do fuzji, trudno też zwykle uzyskać odpowiednie limfocyty. Opracowano zatem kilka alternatywnych strategii otrzymywania ludzkich przeciwciał monoklonalnych:

- a) fuzja ludzkich limfocytów z komórkami szpiczaka myszy – prowadzi jednak często do powstania hybryd które są niestabilne i tracą ludzkie chromosomy.
- b) transformacja ludzkich limfocytów wirusem Epsteina-Barr (EBV) - stosowana od wielu lat, w celu uzyskania nieśmiertelnych ludzkich komórek B.
- c) fuzja ludzkich limfocytów B transformowanych wirusem EBV z komórkami szpiczaka myszy [14,18].

Powyższe strategie prowadzące do wytworzenia ludzkich przeciwciał monoklonalnych są często zawodne ze względu na konieczność stosowania wirusów, ograniczoną swoistość wytwarzanych przeciwciał monoklonalnych oraz niską wydajność. Wciąż opracowywane są nowe strategie, między innymi udało się otrzymać myszy, które cierpią na ciężki niedobór odporności. Ich limfocyty zastępuje się limfocytami człowieka; po uczuleniu określonym antygenem zwierzę wytwarza odpowiednie ludzkie komórki B, które można następnie poddać fuzji z mysimi liniami komórek szpiczaka. Wyhodowano także inne myszy – transgeniczne – które charakteryzują się brakiem genów kodujących immunoglobuliny (są one zdezaktywowane). Do limfocytów B gryzoni wprowadza się geny immunoglobulinowe człowieka. Pierwszy dokonany eksperyment opierał się na wprowadzeniu do przedjędrza myszy *minilocus*

łańcucha ciężkiego immunoglobuliny M, który złożony był z niezrearranzowanych segmentów V (variable – zmienny), D (diversity – odpowiedzialnych za różnorodność cząsteczki) oraz J (joining – łączący). W komórkach myszy doszło do rearanżacji, czego skutkiem była produkcja przeciwciał posiadających ludzki łańcuch ciężki μ (charakterystyczny dla klasy IgM) przez około 4% mysich limfocytów B [8,19].

Przeciwciała monoklonalne uzyskiwać można także z „bibliotek” prezentowanych na fagach (phage display). W tej technice fragmenty DNA kodujące części zmienne przeciwciał pochodzące z różnych limfocytów B są wprowadzane do bakteriofaga, w którym ulegają ekspresji jako fragmenty F_v (białkowe fragmenty reagujące specyficznie z antygenem, złożone wyłącznie z części zmiennych immunoglobulin). DNA może być również wprowadzane bezpośrednio do bakterii (np. *Escherichia coli*); po zakażeniu bakteriofagami bakterie syntetyzują białka kodowane przez geny immunoglobulinowe i włączają je do nowo powstałych bakteriofagów. Każdy z bakteriofagów „prezentuje” taki fragment F_v na swojej powierzchni; służą one jako wzorzec do produkcji specyficznych przeciwciał monoklonalnych, dlatego zbiór regionów F_v utworzony na fagach nazywa się biblioteką. Badacze mogą użyć antygeny będącego potencjalnym celem, na przykład receptora na komórkach nowotworowych, do wychwycenia z „biblioteki” tych bakteriofagów, które zawierają gen kodujący najbardziej swoiste przeciwciało dla danego antygeny. W celu produkcji dużych ilości pożądaných przeciwciał, wprowadza się odpowiednie bakteriofagi do komórek bakterii i hoduje *in vitro*, następnie sprzęga się otrzymany fragment F_v z częścią stałą pochodzącą z ludzkiej immunoglobuliny [19,20].

3.2. Skoniugowane przeciwciała monoklonalne

Działanie sprzężonych przeciwciał monoklonalnych polega na dostarczaniu do komórek nowotworowych różnorodnych czynników, które je niszczą, takich jak radioizotopy (radiofarmaceutyki), toksyny, enzymy czy leki. Dostarczanie przez przeciwciała leków cytotoksycznych w okolice guza stwarza możliwość osiągnięcia dużego ich stężenia, ponieważ nie występuje konieczność ograniczenia dawki leku z uwagi np. na objawy niepożądane. Przeciwciała monoklonalne skoniugowane z innymi czynnikami bywają nazywane „magicznymi kulami”, ponieważ specyficznie łącząc się z określonym antygenem przenoszą swój „ładunek” tam, gdzie jest potrzebny, minimalizując uszkodzenia zdrowych komórek w innych częściach ciała. Wciąż jednak przeciwciała te wywołują wiele skutków ubocznych [21].

3.2.1. Immunotoksyny

Immunotoksyny wytwarzane są przez chemiczne połączenie przeciwciała z toksyną. Toksyna może być związana z fragmentem Fc lub fragmentem Fab przeciwciała (z fragmentem Fab jeśli jest to przeciwciało o podwójnej swoistości). Zasada działania takich koniugatów polega na tym, że po przyłączeniu się do danego antygeny, np. na powierzchni komórki nowotworowej, toksyna może zniszczyć tę komórkę, bez szkody dla innych, zdrowych komórek organizmu.

Do produkcji immunotoksyn wykorzystano najskuteczniejsze toksyny, takie jak bakteryjna egzotoksyna A *Pseudomonas* czy dyfterotoksyna. Przeciwciała sprzęga się również z toksynami roślinnymi (abryna, rycyna), a także grzybowymi (α -sarcyna, α -amanityna), przy czym rycyna i dyfterotoksyna wykazują szczególnie dużą aktywność. Porównując, do zabicia komórki nowotworowej potrzeba około miliona cząsteczek klasycznego leku przeciwnowotworowego lub jednej cząsteczki toksyny.

Po związaniu się z antygenem powierzchniowym, immunotoksyny pobierane są do wnętrza komórki docelowej; większość z nich działa w cytoplazmie, gdzie blokując kompleks ADP (difosforanu adenozyne), niezbędny do wydłużania łańcucha białkowego w procesie biosyntezy, hamują syntezę białka. Tak działa między innymi egzotoksyna A *Pseudomonas*. Droga toksyn do cytoplazmy jest jednak dość skomplikowana, poza tym wiele z nich ulega zniszczeniu w lizosomach. Inne toksyny, np. rycyna, mogą również oddziaływać inaktywująco na podjednostkę 60S rybosomu, obniżając jej zdolność do wiązania się z czynnikiem elongacji [8, 19].

Wciąż istnieją jednak pewne problemy w stosowaniu immunotoksyn na większą skalę, między innymi duży rozmiar większości takich koniugatów, co ogranicza ich penetrację w głąb tkanek. Ponieważ toksyny mogą działać zarówno na komórki nowotworów, jak i na zdrowe komórki (posiadają one bowiem wspólne antygeny powierzchniowe), obawiano się iż w czasie terapii immunotoksyny mogą doprowadzić do eliminacji zbyt dużej liczby komórek prawidłowych. Wykazano jednak, iż nie zawsze jest to groźne, ponieważ w niektórych przypadkach prekursorzy komórek krwi mogą łatwo ulec odtworzeniu po zaprzestaniu terapii. Immunotoksyny w terapii nowotworów stosuje się w raku jajnika (dootrzewnowo), raku pęcherza (dopęcherzowo), w zapaleniu opon na tle nowotworowym (podoponowo) a także w białaczce, chłoniaku, raku sutka, raku okrężnicy, raku płuc [8,12].

Ozogamycyna gemtuzumabu (Mylotarg) jest połączeniem przeciwciała anty-CD33 z kalicheamycyną - kompleksem oligosacharydów, które indukują rozcinanie DNA. Antygen CD33 wykrywany jest na blastach u chorych na ostrą białaczkę szpikową. Mylotarg wiąże się z dużą liczbą receptorów

powierzchniowych i szybko ulega wciągnięciu do komórki, gdzie zostaje uwolniony aktywny lek. Jest pierwszą immunotoksyną, która daje obiecujące rezultaty w walce z białaczką, jednak wciąż występuje wiele skutków ubocznych, między innymi groźna choroba zakrzepowa naczyń wątroby, której objawy to podwyższone stężenie bilirubiny i podwyższenie aktywności aminotransferaz. Jest to zespół o dużej śmiertelności, wystąpienie objawów jest przyczyną odrzucania kolejnej dawki leku, a w konsekwencji – nawrotu choroby [10, 17].

3.2.2. Przeciwciała skoniugowane z radioizotopami

Przeciwciała monoklonalne mogą być powiązane z radioizotopami, takimi jak: jod 131, itr 90, bizmut 212, miedź 67, ren 186 i 188. Takie koniugaty doprowadzają do zniszczenia komórki przez uszkodzenie DNA pod wpływem promieniowania. Często jednak wykazują one cytotoksyczność względem komórki już z odległości równej kilku jej średnicom, co sprawia, iż również sąsiadujące komórki mogą ulegać zniszczeniu. Z tego względu przeciwciała monoklonalne sprzężone z radioizotopami są szczególnie efektywne w przypadku prób leczenia nowotworów litych. Otrzymano dobre wyniki w próbach stosowania radiofarmaceutyków w leczeniu białaczek, raka jelita grubego oraz chłoniaków nieziarnicznych, gdzie zaobserwowano wysoki odsetek remisji [8, 19].

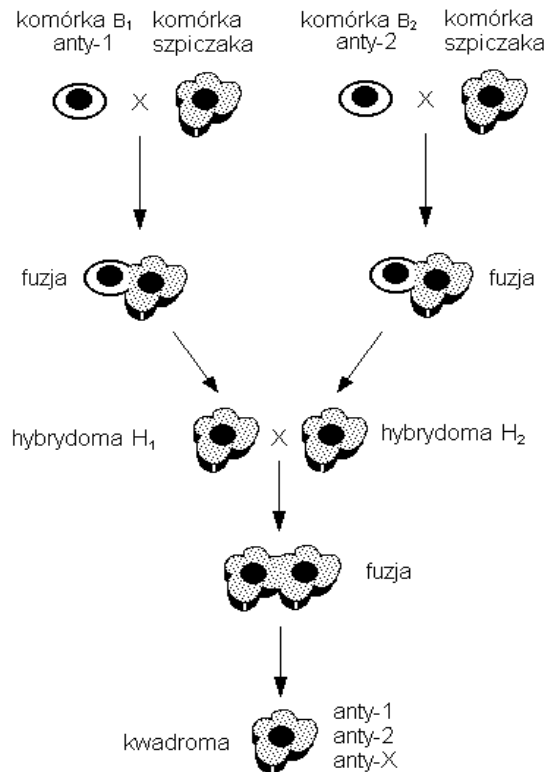
Dwa najczęściej stosowane koniugaty przeciwciał monoklonalnych z radioizotopami to Ibritumomab tiuxetan (Zevalin) oraz tositumomab (Bexxar). Ibritumomab, skierowany przeciwko antygenowi CD20, sprzężony jest z izotopem Itru 90, który emituje cząstki β . Może być stosowany w leczeniu chorych na nawrotowe lub odporne chłoniaki grudkowe o niskim stopniu złośliwości lub chłoniaki nieziarniczne. Przeciwciałem mysim sprzężonym z jodem 131, również skierowanym przeciwko CD20 jest ^{131}I – tositumomab. Jest ono łatwo dostępne i proste do sprzężenia, z tego względu często używa się go, oprócz terapii, także w diagnostyce. Tositumomab stosowany jest głównie w leczeniu chłoniaków nieziarnicznych, często u chorych opornych na leczenie rituksimabem, u których doszło do nawrotu choroby. Przeciwciało to u około 30% pacjentów powoduje całkowitą remisję.

Proces leczenia nowotworów za pomocą przeciwciał sprzężonych z radioizotopami wymaga dużej ostrożności, mającej na celu przede wszystkim niedopuszczenie aby taki koniugat dostał się do zdrowych tkanek (np. płuc, śledziony, wątroby). Najczęściej podaje się najpierw przeciwciało nieskoniugowane, np. rituximab, a dopiero potem koniugat przeciwciał monoklonalnych z radioizotopem. Skutki uboczne stosowania przeciwciał sprzężonych z radioizotopami są podobne do reakcji na rituximab, głównym

objawem jest mielosupresja szpiku kostnego, a także napromieniowanie tkanek związane z długim okresem krążenia koniugatów we krwi. U niewielkiej liczby chorych może wystąpić ostra białaczka, lub dochodzi do rozwoju infekcji [10, 21].

3.2.3. Przeciwciała o podwójnej swoistości

Przeciwciała o podwójnej swoistości uzyskuje się najczęściej sprzęgając chemicznie dwa różne przeciwciała. Powstają w ten sposób immunoglobuliny mogące reagować z dwoma różnymi antygenami, ponieważ zawierają cztery fragmenty Fab, po dwa z każdego przeciwciała. Przeciwciała bispecyficzne to również połączone chemicznie dwa różne fragmenty Fab, pochodzące od różnych przeciwciał, oraz tak zwane podwójne hybrydy. Produktem fuzji dwóch linii komórek hybrydowych, czyli czterech komórek wyjściowych, jest kwadroma (Rys. 1).



Rysunek 1. Produkcja kwadromy za pomocą hybrydyzacji hybrydom.

Komórka ta może produkować przeciwciała o różnej kombinacji łańcuchów ciężkich i lekkich, pochodzących od obu partnerów fuzji. Nieliczne z nich będą przeciwciałami o podwójnej swoistości, zawierającymi dwa fragmenty Fab pochodzące od dwóch różnych linii hybrydom.

Przeciwciała bispecyficzne mogą służyć jako nośniki izotopów, toksyn, czy też leków cytotoksycznych. Najczęściej jednak wykorzystywane są jako czynniki pobudzające komórkę efektorową (cytotoksyczną) do zniszczenia nowotworu, ponieważ mają one tę właściwość, iż jeden fragment Fab skierowany jest przeciwko antygenom związanym z komórkami nowotworowymi, natomiast drugi może wiązać między innymi antygeny powierzchniowe komórek T (CD3) lub komórek NK (CD16). Takie przeciwciało zbliża zatem limfocyt T do komórki nowotworowej, jednocześnie aktywując go i zwiększając jego zdolności cytotoksyczne, co skutkuje zniszczeniem komórki nowotworowej. Inne przeciwciała bispecyficzne mają jeden fragment Fab skierowany przeciwko antygenom TAA na komórce nowotworowej, natomiast drugi przeciwko antygenom powierzchniowym CD64 (FcγRI) obecnym na powierzchni makrofagów lub antygenom CD89 (FcαR) obecnym na neutrofilach. Jeszcze inne mogą do jednego z fragmentów Fab przyłączać toksynę.

W terapii stosuje się między innymi przeciwciała bispecyficzne skierowane przeciwko antygenom nowotworowym oraz związkowi chemicznemu DTPA (kwas 2-etyleno-3-amino-5-octowy). Takie bispecyficzne przeciwciała monoklonalne po wprowadzeniu do organizmu łączą się jednym fragmentem Fab z antygenem komórki nowotworowej. Następnie podaje się pacjentowi DTPA związany z radioaktywnym itrem, który łączy się z drugim fragmentem Fab przeciwciała. Emitowane przez itr promieniowanie prowadzi do zniszczenia komórki nowotworowej, a także komórek sąsiednich, natomiast nadmiar DTPA jest usuwany z organizmu [8, 22].

Interesującym przykładem zastosowania przeciwciał bispecyficznych w terapii białaczek jest możliwość wiązania się tych przeciwciał z receptorem dla IL-2 (interleukina 2 – białko wytwarzane przez pobudzone limfocyty T, niezbędne do ich aktywacji) czyli antygenem CD25 (IL-2R alfa – podjednostka α receptora dla IL-2, inaczej antygen Tac). Limfocyty T zmienione nowotworowo w ostrej białaczce limfatycznej typu T charakteryzują się niezwykle dużą ilością antygeny CD25 na swojej powierzchni, w przeciwieństwie do normalnych limfocytów T. Przeciwciała o podwójnej swoistości, anty-CD25-CD3 (drugie ramię Fab wiąże komórkę T) oraz anty-CD25-CD16 (wiążące komórkę NK) prowadzą do zniszczenia komórek z receptorami dla IL-2 przez aktywację komórek efektorowych [19, 23].

Próbuje się konstruować przeciwciała o podwójnej lub potrójnej swoistości (trójspecyficzne) charakteryzujące się zmniejszonymi wymiarami.

Przeciwciała o potrójnej swoistości (sprzęgnięte trzy cząsteczki przeciwciał), wiążące dwie różne cząsteczki na limfocycie T cytotoksycznym, mocniej go aktywują i silniej wiążą z komórką nowotworową. Uzyskiwane różne połączenia przeciwciał wykazują coraz lepszą efektywność przeciwnowotworową [8].

3.2.4. Przeciwciała monoklonalne sprzężone z enzymami

Koniugaty przeciwciał monoklonalnych z enzymami, które katalizują przemiany nieczynnych form leków, indukują przekształcenie nieczynnego proleku w aktywny lek przeciwnowotworowy. Pacjentom podaje się przeciwciało monoklonalne związane z enzymem, specyficzne względem antygenów powierzchniowych komórki nowotworowej. Dzięki temu enzym zostaje dostarczony w pobliże guza. Następnie podaje się nieczynny lek (prolek), który jest aktywowany przez enzym do postaci czynnej, niszczącej komórki nowotworowe. Taka forma terapii nazywana jest terapią „przeciwciało-enzym-prolek”. Pozwala ona na ograniczenie toksyczności stosowanych chemioterapeutyków, ponieważ czynny związek niszczący komórki nowotworowe powstaje tylko w tych miejscach, w których znajduje się aktywujący go enzym sprzężony z przeciwciałem monoklonalnym. Jednym z częściej stosowanych w terapii nowotworów jest przeciwciało monoklonalne sprzężone z deaminazą cytozyny, która katalizuje przemianę 5- Fluorocytozyny (prolek) w 5- Fluorouracyl, - silny czynnik chemioterapeutyczny [8, 24].

3.2.5. Immunoliposomy

Oprócz tworzenia koniugatów z radioizotopami czy toksynami, przeciwciał monoklonalnych można użyć również do opłaszczania sztucznie tworzonych liposomów wypełnionych odpowiednim lekiem. Liposomy te są to małe, kuliste pęcherzyki, otoczone błoną fosfolipidową; przeciwciała zakotwicza się w ich błonie sprzęgając chemicznie niepolarne fragmenty błony z cząsteczkami specyficznych przeciwciał monoklonalnych. Największą zaletą immunoliposomów jest duża wydajność transportu, oraz zmniejszenie efektów ubocznych dzięki koncentracji leku jedynie w miejscu docelowym. Przenoszone przez liposomy leki przeciwnowotworowe to najczęściej mitomycyna C, daunorubicyna oraz metotreksat.

Immunoliposomy są jednak dość niestabilne, ponieważ błona fosfolipidowa jest strukturą półpłynną o stosunkowo małej odporności mechanicznej. Wynika z tego problem, zarówno przy wprowadzaniu takiego koniugatu do organizmu, jak i podczas przechowywania. Kolejną przeszkodą jest częsty wychwyty tych struktur przez komórki żerne (makrofagi) układu immunologicznego. Naukowcy próbują zwiększać trwałość błon liposomów, a jednocześnie zmniejszać ich rozpoznawalność przez układ limfatyczny. Niestety,

zwiększenie stabilności błon powoduje zwiększenie trudności w uwalnianiu transportowanego leku [25].

Zakończenie

W latach osiemdziesiątych badania nad przeciwciałami monoklonalnymi przyjęto z dużym optymizmem. Jako pociski z trucizną czy radioaktywnym izotopem miały rozpoznać komórki nowotworowe i uwolnić śmiertelność ładunek, nie szkodząc zdrowym komórkom. Terapeutyczne rozczarowania tamtych lat, kiedy przeciwciała monoklonalne – „magiczne kule”- traktowane jako cudowny lek okazały się niewypałem, nie poszły na marne, zwiększyły tylko zapal uczonej w kierunku tworzenia coraz lepszych i lepiej tolerowanych przeciwciał monoklonalnych. Teraz, po trzydziestu latach, gdy zastosowanie inżynierii genetycznej pozwala na produkcję całkowicie ludzkich monoklonalnych przeciwciał, być może dzięki rozwojowi nauki i medycyny usłyszymy znowu o cudownych lekach na raka i inne choroby – „magicznych kulach”.

Literatura

1. S.S. Alkan, Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine, *Nature Reviews Immunology*, 2004, **4**
2. W. Ptak, Podstawy immunologii, PZWL, Warszawa 1987
3. M. Jakóbisiak, Powstawanie przeciwciał w „Immunologia”, Marek Jakóbisiak, Praca zbiorowa pod redakcją Marka Jakóbisiaka, PWN, Warszawa 2002
4. L. Rżucido, Immunologia ogólna i doświadczalna, PWN, Warszawa 1978
5. N. K. Jerne, A. Nordin, Plaque formation in agar by single antibody - producing cells, *Science*, 1963, **140**, 405
6. C. Milstein, From the structure of antibodies to the diversification of the immune response, *Nobel Lecture*, 8 December 1984
7. Z. Kuratowska, A. Lutyński, J. Dwilewicz-Trojaczek, Wybrane zagadnienia immunologii klinicznej, PZWL, Warszawa 1982
8. M. Jakóbisiak, Przeciwciała monoklonalne, w „Immunologia”, Marek Jakóbisiak, Praca zbiorowa pod redakcją Marka Jakóbisiaka, PWN, Warszawa 2002
9. <http://users.path.ox.ac.uk/~scobbold/tig/new1/mabth.html> – „Antibodies and therapy”
10. W. Łuczyński, M. Krawczuk-Rybak, Magiczne kule – przeciwciała monoklonalne w terapii białaczek i chłoniaków, *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej*, 2002, **56**, 789
11. <http://www.cancersourcern.com/community/archive.cfm?contentid=26157> „Novel Therapies in Cancer Treatment”
12. http://www.cancer.org/docroot/ETO/content/ETO_1_4X_Monoclonal_Antibody_Therapy_Passive_Immunotherapy.asp
13. Research in focus: Monoclonal Antibodies, Medical Research Council, 2000

14. P.M. Lydyard, A. Whealan, M.W. Fanger, Immunologia: Krótkie wykłady, PWN, Warszawa 2001
15. <http://www.leukemia.mastineum.pl/leki/mabtera.htm>
16. <http://www.accessexcellence.org/WN/SUA11/rituxan1197.html>
„First monoclonal cancer therapeutic”
17. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/M/Monoclonals.html>
„Monoclonal antibodies”
18. <http://www.immun.lth.se/TEXTER/MO/Hu-mab.html> – „General aspects of human monoclonal antibody technology”
19. M. Kurpisz, Wykorzystanie przeciwciał monoklonalnych do celów terapeutycznych, *Biotechnologia*, 1993, **2**, 21
20. C. Ezzell, Magic bullets fly again, *Scientific American*, 2001, September
21. M. Harris, Przeciwciała monoklonalne w leczeniu nowotworów, *The Lancet Oncology – PL*, 2004, **3**, wrzesień
22. H. Długońska, W. Rudnicka, Przeciwciała monoklonalne, *Kosmos*, 1992, **41**, 401
23. <http://www.clinicaltrials.gov/ct/gui/show/NCT00001941> - Anti-Tac for Treatment of Leukemia
24. M. Jakóbsiak, W. Lasek, Immunologia nowotworów, w: „Immunologia”, Marek Jakóbsiak, Praca zbiorowa pod redakcją Marka Jakóbsiaka, PWN, Warszawa 2002
25. L. Konieczny, B. Piekarska, I. Roterman, J. Rybarska, B. Stopa, G. Zemanek, Przeciwciała i nośniki leków w terapii celowanej – postęp i ograniczenia, *Biotechnologia*, 2001, **3**, 37

Katarzyna Adamczyk

Monoclonal antibodies – discovery and application

Abstract: In the article the development of lymphocyte fusion for the production of monoclonal antibodies (mAbs) is described. Monoclonal antibodies are unique research tool, that can be used in various areas of basic research, in clinical diagnosis and in the treatment of diverse diseases, including cancer. The article presents separate groups of monoclonal antibodies and their application in cancer treatment.

Keywords: cancer treatment, diagnostics, lymphocyte fusion