

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Интегрисане академске студије фармације

Г06 – Фармацеутска биотехнологија

Моноклонска антитела

12. НЕДЕЉА НАСТАВЕ

Летњи семестар 2022/2023. године

Крагујевац

Моноклонска антитела

- Моноклонска антитела и њихови деривати чине највећу групу протеинских лекова и представљају део фармацеутске биотехнологије који се најбрже развија.
- Моноклонска антитела припадају класи биофармацеутика, добијају се рДНК технологијом и представљају вид хуморалне имунотерапије.
- Највећи број моноклонских антитела присутних на тржишту се користи у терапији карцинома, затим у терапији имунолошких поремећаја, а све више се развијају и моноклонска антитела за лечење инфективних обољења. Такође, моноклонска антитела се користе и у дијагностичке сврхе (сцинтиграфије, биохемијске анализе).

Моноклонска антитела

- Најпре су развијена мишја моноклонска антитела (**-омаб**), а потом химерна (**-ксимаб**), хуманизована (**-зумаб**) као и хумана антитела (**-умаб**).
- Особине које моноклонска антитела чине погодним за примену у терапији су:
 - висока специфичност за циљни молекул и
 - карактеристична грађа.

Грађа антитела

- За сада је описано пет главних класа антитела (имуноглобулини, Ig): IgM, IgG, IgA, IgD и IgE.
- Са аспекта фармацеутске биотехнологије IgG је најважнија класа.
- Постоје четири подкласе хуманог IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄) и четири подкласе мишјег IgG (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} и IgG₃).

Грађа антитела

- Антитела се састоје од:
 - Fab (енгл. *fragment antigen binding*) фрагмената - одговоран је за препознавање и везивање антигена.
 - Fc (енгл. *fragment crystalline*, кристалише у раствору) фрагмената - одговоран за биолошку активност и ефекторске функције антитела.
- Између Fab и Fc региона се код већине антитела налази савитљиви зглобни регион.

Грађа антитела

- Имуноглобулини су гликопротеини, код којих је угљенохидратни део везан за тешки ланац (најчешће C_H2 домен) N-гликозидном везом.
- Уклањање угљенохидратног ланца нема утицај на везивање антигена, али утиче на различите ефекторске функције антитела и полуживот у серуму.

Грађа антитета

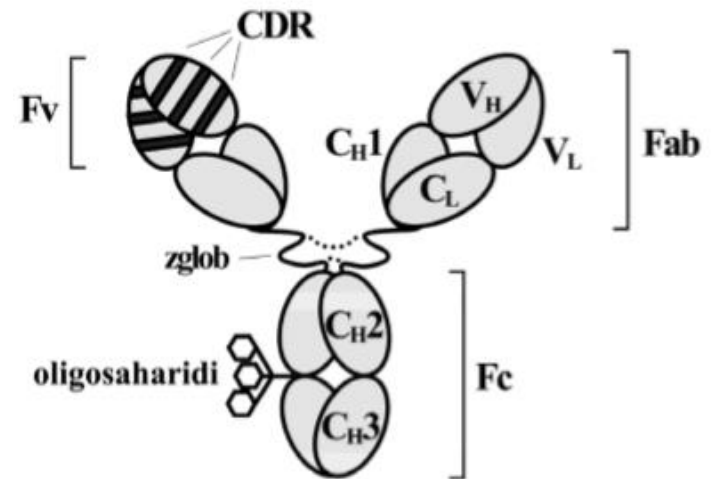
- Имуноглобулини свих класа имају сличну основну структуру и састоје се од четири ланца, од којих су два идентична лака (L) и два идентична тешка (H) ланца.
- Између ланаца се формирају дисулфидне везе и нековалентне интеракције.
- Нативне конформације свих имуноглобулинских ланаца су састављене од одвојених домена, стабилованих интраланчаним дисулфидним везама. Сваки домен садржи око 110 аминокиселина.

Грађа антитела

- Н и L ланци садрже варијабилне (V) и константне (C) домене.
 - L ланци садрже један варијабилни (V_L) и један константни (C_L) домен.
 - H ланци садрже један варијабилни (V_H) и три константна (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}) домена.
- Варијабилни домени антитела поседују везивно место за антиген (CDR – енгл. *complementarity-determining regions*) и разликују се у аминокиселинском саставу на том месту, док се константни домени (унутар било које класе/подкласе антитела) не разликују.

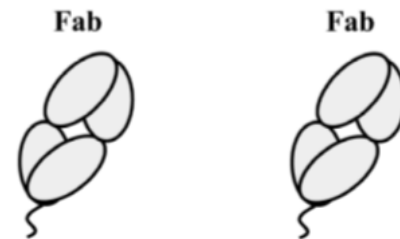
Грађа антитела

- Н ланци поред варијабилног и константних домена, имају једну кратку секвенцу која спаја C_H1 домен и C_H2 домен.
- Ова секвенца се назива флексибилни везујући регион (Н – енгл. *hinge*), „зглоб“, састављен од неколико пролина.



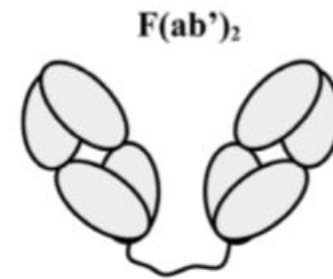
Грађа антитела

- Флексибилни везујући регион је осетљив на одређене протеолитичке ензиме (нпр. папаин).
- Папаин разграђује имуноглобулин у делу флексибилног везујућег региона, при чему настају два одвојена антиген-везујућа фрагмента ($2 \times F(ab)$) и константни фрагмент (F_c).
- Fab фрагменти задржавају способност везивања антигена, али губе способност преципитације антигена *in vitro*. F_c фрагмент посредује у различитим ефектима антитела.



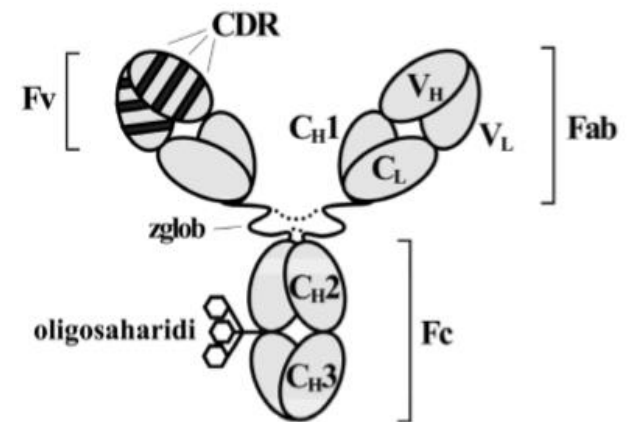
Грађа антитела

- Инкубација имуноглобулина са другим протеазама (нпр. пепсином) изазива фрагментацију антитела непосредно испод флексибилног везујућег региона. При чему настају $F(ab)_2$ и F_c .
- Наиме, две дисулфидне везе према С-терминусу зглоба остају интактне и два фрагмента за везивање антигена остају заједно.
- Због своје бивалентне природе, $F(ab)_2$ задржава способност преципитације антигена *in vitro*.



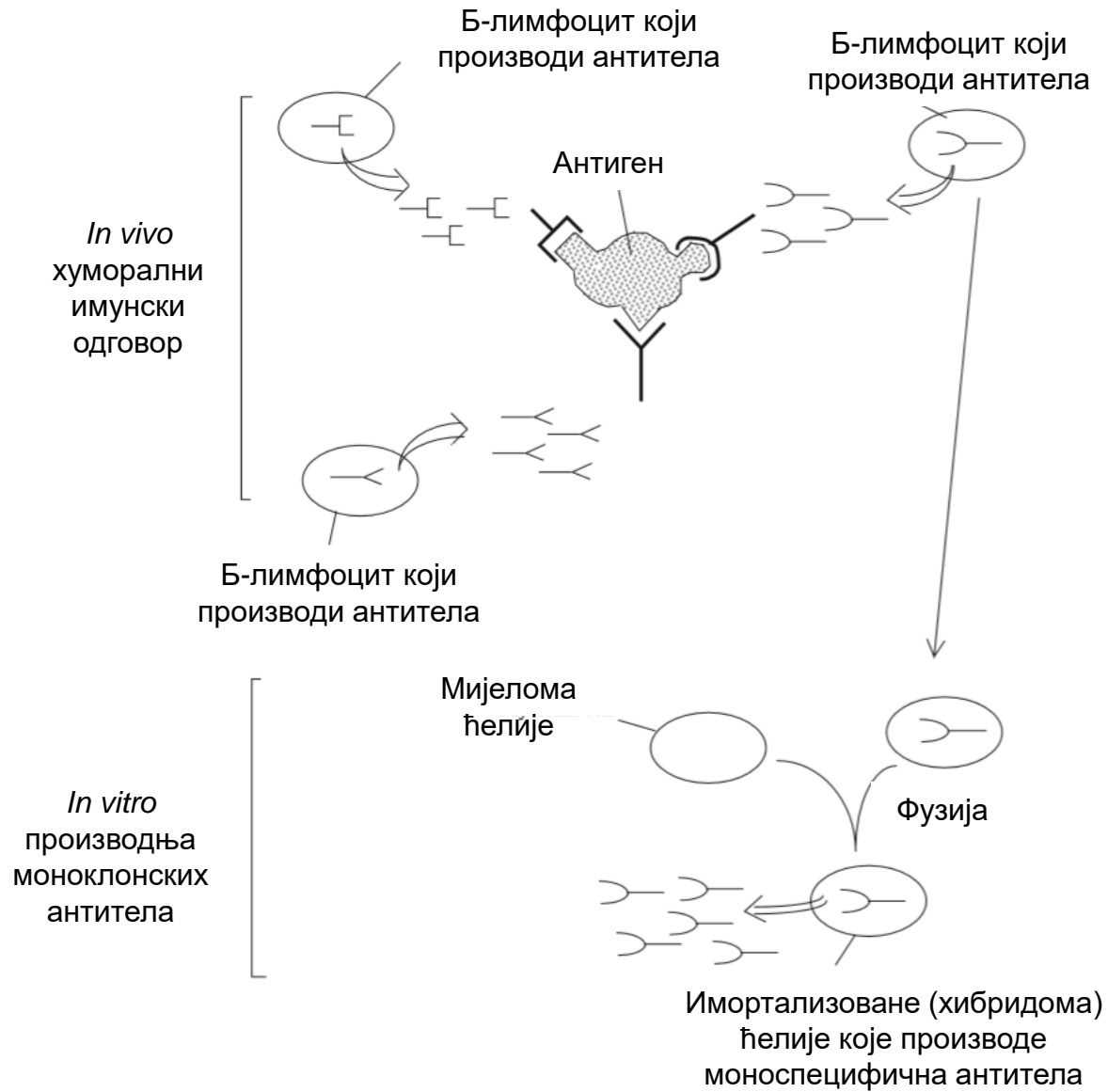
Грађа антитела

- F_V фрагменти се састоје од V_H и V_L домена и једноставно се производе рДНК технологијом. Два F_V домена се стабилизују увођењем интерланчане ковалентне везе (нпр. дисулфидне везе или директним хемијским спајањем). Једноланчани F_V фрагменти настају увођењем кратког пептидног линкера између два F_V домена.
- Унутар варијабилног домена антитела постоје два типа региона:
 1. „хиперваријабилни“ региони (енгл. *complementarity determining regions* - CDR), долазе у непосредну близину након савијања антитела у нативну конформацију и представљају места везивања антигена.
 2. гранични региони (енгл. *framework regions* FR).



Мишја моноклонска антитета

- Производња моноклонских антитета започета је средином '70-их година. Развоју технологије за производњу моноклонских антитета претходило је откриће везано за добијање хибридома ћелија. *Kohler* и *Milstein* су фузионисали бесмртне ћелије мијелома са Б-лимфоцитима. Део тако добијених хибридома ћелија су стабилне, канцерогене и представљају извор за добијање моноклонских (моноспецифичних) антитета.
- Хибридома технологија омогућава релативно једноставну производњу моноклонских антитета против готово сваког жељеног антигена.



Производња моноклонских антитела

Мишја моноклонска антитела

- Б-лимфоцити синтетишу антитела која препознају одређени епитоп на антигену. Међутим, *in vitro* живе врло кратко и самим тим, представљају непрактичан извор за производњу антитела.
- Хибридома технологија за производњу моноклонских антитела подразумева изолацију Б-лимфоцита уз накнадну фузију са трансформисаним ћелијама (мијелом). Велики број тако добијених хибридних ћелија задржава „бесмртност“, стварајући велике количине моноклонских антитела. Хибридома ћелије могу се дугорочно узгајати, тако да ефикасно производе довољну количину моноклонског антитела од интереса.

Мишја моноклонска антитета

- Процес производње моноклонских антитета током '80-их и почетком '90-их година подразумевао је почетну имунизацију миша антигеном од интереса. Мишу се потом одстрањује слезина из које се изолују Б-лимфоцити.
- Изоловани Б-лимфоцити се потом инкубирају са мишјим ћелијама мијелома у присуству пропилен гликола, што подстиче фузију ћелија. Одговарајућим техникама се издвајају само фузионисане ћелије које производе мишје моноклонско антители које се везује за антиген од интереса. Жељени клонови се потом узгајају у већим количинама да би се произвеле потребне количине антитета.

Мишја моноклонска антитета

- Када антиген доспе у организам, стимулише се хуморални имунски одговор, активирају се Б-лимфоцити који производе антитета.
- Везивањем антитета за антиген смањује се или у потпуности инактивира биолошка активност антигена, а уз то се и ствара антиген-антитело комплекс кога ће имунски систем препознати и уништити.
- Антитета се везују само за специфичан део антигена који се назива епитоп. Већина антигена (нпр. протеини, вируси, бактерије) садрже стотине, ако не и хиљаде, различитих епитопа. Епитопи се налазе на површини протеина и састављени су од 5 до 7 аминокиселинских остатака.

Мишја моноклонских антитела

- Мишја моноклонска антитела представљају прву генерацију терапијских моноклонских антитела.
- Најзначајнији представник ове генерације је **муромонаб**, 1986. године одобрен за спречавање одбацавања трансплантираног бубрега. Упркос великим очекивањима, терапија муромонабом није испољила очекиване резултате, јер настају хумана анти-мишја антитела (енгл. *human anti-mouse antibody*, НАМА) и долази до тешких имунолошких реакција у организму пацијента.

Химерна моноклонска антитела

- У циљу смањења имуногености мишјих моноклонских антитела, генским инжењерингом је конструисано **химерно антитело** чији су варијабилни региони мишјег, а константни региони хуманог порекла.
- Овом техником се из хибридома изолују гени који кодирају тешке и лаке ланце мишјег моноклонског антитела жељене специфичности, док се из хуманих Б-лимфоцита изолују гени који кодирају тешке и лаке ланце хуманих антитела. Генским инжењерингом се потом конструишу химерни гени који се састоје из мишјих гена који кодирају варијабилне регионе и хуманих гена који кодирају константне регионе тешких и лаких ланаца.

Химерна моноклонска антитела

- Када се химерни гени уведу у CHO ћелије или мишје мијеломске ћелијске линије (NS0 и SP2/0) синтетишу се и секретују химерна антитела која су око 70% хумана.
- Овако добијена антитела имају исту специфичност за циљни молекул као и мишје моноклонско антитело из ког су настала, док су полуживот и ефекторске функције много сличније хуманом антителу.
- Прво химерно моноклонско антитело одобрено за терапију је **абциксимаб** (антиагрегациони лек).

Химерна моноклонска антитета

- Химерна моноклонска антитета имају мању имуногеност од мишјих јер је мањи део химерног антитета мишјег порекла, такође НАМА одговор је углавном усмерен на епитопе на Fc доменима антитета, а варијабилни регион је мање имуноген.
- Међутим, иако су химерна антитета мање имуногена за човека од мишјих, и она могу довести до стварања НАМА.
- Клиничка испитивања химерних антитета су показала да су безбедна и нетоксична. Стопа имунског одговора након примене једне дозе опала је са 80% (мишја) на 5% (химерно). Међутим, поновна примена химерних антитета повећава имунски одговор код већине прималаца.

Химерна моноклонска антитела

- Химерна антитела омогућавају функције посредоване Fc фрагментом (нпр. активирање комплемента итд.), јер овај домен има хуману секвенцу.
- Иако химерна антитела садрже читав варијабилни регион мишјег порекла, само CDR унутар варијабилног домена заправо утиче на специфично препознавање антигена.

Хуманизована моноклонска антитела

- Метода која додатно смањује имуногеност мишјих антитела је њихова “хуманизација”. Ово подразумева преношење нуклеотидних секвенци које кодирају шест CDR региона мишјег антитела, најважнијих за контакт са специфичним антигеном, у ген за хумано антитело.
- Међутим, антитело које је настало као резултат коришћења само CDR региона мишјих антитела често је имало значајно смањен афинитет за везивање за антиген. Да би се овај проблем превазишао и задржао афинитет оригиналног мишјег антитела у хуманизованом моноклонском антителу поред CDR присутни су и FR региони мишјег порекла који омогућавају оријентацију CDR у простору.

Хуманизована моноклонска антитела

- Хуманизовано антитело је више од 90% хумано. Прво хуманизовано моноклонско антитело 1997. године одобрено за употребу било је **дацлизумаб**. Ово моноклонско антитело се специфично везује за алфа ланац рецептора за интерлеукин-2 и примењује се за спречавања акутног одбацавања трансплантираног бубрега.
- Након примене хуманизованих моноклонских антитела НАМА одговор се покреће код 9% пацијената. Анализом стварања антитела у организму пацијената након примене мишјих, химерних или хуманизованих моноклонских антитела показано је да химеризација односно хуманизација мишјих антитела значајно смањује њихову имуногеност. Међутим, и химерна и хуманизована моноклонска антитела су имуногена у одређеном проценту, што указује на потребу стварања хуманих антитела.

Хуманизована моноклонска антитела

- **Бевацизумаб** је рекомбинантно хуманизовано моноклонско IgG₁ антитело, молекулске масе 149 kDa. За клиничку употребу је одобрено прво у САД 2004. године, а потом у ЕУ 2005. године. Примењује се у третману пацијената са метастатским колоректалним карциномом, у комбинацији са специфичним хемиотерапеутицима (аналози 5-флуороурацила).
- Бевацизумаб инхибира ангиогенезу неопходну за раст тумора. Везује се за хумани васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF) и спречава његово везивање за рецептор на површини ћелије, што је кључно за формирање нових крвних судова у здравом и оболелом ткиву.
- Инжењерисано антитело се производи у CHO ћелијама у биореакторима запремине 12000 L. Пречишћава се протеин А афинитетном хроматографијом, после чега следи секвенцијална анјонска и катјонска хроматографија.

Хуманизована моноклонска антитета

- Бевацизумаб се формулише као стерилни раствор у бочицама за једнократну употребу. Ексципијенси су:
 - фосфатни пуфер,
 - трехалоза и
 - *Polysorbate 20*.
- Примењује се у виду *i.v.* инфузије једном у 2 недеље.
- Полуживот препарата је приближно 20 дана (11 - 50 дана), док је клиренс променљив у зависности од телесне тежине, пола и величине тумора.
- Озбиљна, понекад смртоносна нежељена дејства су: перфорација ГИТ-а, компликације зарастања рана и крварење.
- Контраиндикација је примена препарата у првих месец дана након већих операција.

Хумана моноклонска антитела

- Крајњи циљ у развоју моноклонских антитела за терапијску примену је постизање потпуне биокомпатибилности тј. производња моноклонског антитела које ће се састојати од комплетно хуманих полипептидних ланаца.
- Док је производња мишјих моноклонских антитела постала рутина, производња хуманих моноклонских антитела класичном технологијом хибридома је била отежана и мање успешна. Разлог за ово је нестабилност хуманих хибридома, а и *in vivo* имунизација људи, за разлику од мишева, није била могућа за већину антигена.

Хумана моноклонска антитела

- Међутим, развој метода за испољавање фрагмената антитела у бактеријама и приказивање тих фрагмената на бактериофагима, тзв. „*phage-display*” технологија, као и технике за селекцију фрагмената антитела који имају жељену специфичност за циљни антиген, омогућио је настанак хуманих моноклонских антитела.
- Поред, „*phage-display*” технологије за добијање хуманих моноклонских антитела користе се и трансгени мишеви који садрже гене за хумане имуноглобулине.

„*Phage-display*” технологија

- У „*phage-display*” технологији антитела високог афинитета настају рекомбинацијом различитих генских сегмената који кодирају варијабилни регион антитела и соматским хипермутацијама гена за имуноглобулине, најчешће у оквиру CDR региона.
- „*Phage-display*” технологија имитира имунски систем јер омогућава:
 - формирање велике библиотеке гена који ће кодирати антитела или само њихове делове који везују антиген и
 - селекцију фрагмената антитела који ће се највећим афинитетом везати за жељени циљни молекул.

„*Phage-display*” технологија

- У нативном молекулу антитела варијабилни региони тешког и лаког ланца су делови различитих полипептидних ланаца.
- Међутим, нове технологије су омогућиле комбиновање варијабилних региона оба ланца у оквиру једног полипептидног ланца при чему настаје функцијски протеин који везује антиген. То мало антитело назива се једноланчани варијабилни фрагмент (енгл. *single-chain variable fragment*, ScFv). У њему су V_H и V_L повезани флексибилним пептидним ланцем, $(Gly_4Ser)_3$, који олакшава оријентацију CDR ка антигену на исти начин као што је то у природном антителу.

„*Phage-display*” технологија

- Код „*phage-display*” технологије прво се ствара библиотека гена од којих један кодира антитело од интереса. Гени за антитела се потом фузионишу са генима за протеине омотача бактериофага (pIII, pIV или pVIII). Затим се бактериофаг инкубира са *E. coli*, што олакшава његову репликацију.
- Експресија фузионисаног гена током репликације и инкорпорирање фузионисаног производа у омотач зрелог бактериофага омогућава експресију генског производа на површини бактериофага.
- ScFv протеини се испољавају на омотачу бактериофага везани за gP3 протеин.
- Репликацијом бактериофага у *E. coli* настаје библиотека бактериофага који испољавају ScFv фрагменте специфичне за широк спектар антигена.

„*Phage-display*” технологија

- Након тога следи афинитетна селекција (енгл. *biopanning*) која подразумева да се цела библиотека бактериофага прегледа како би се идентификовало кодирање протеина од интереса.
- Афинитетна селекција подразумева пролазак библиотеке антитела кроз колону у којој се налазе имобилисани антигени. У колони се задржава само бактериофаг који експримира антитело од интереса.
- На овај начин се селективно изолује бактериофаг за који је везан одговарајући ScFv.
- Везани бактериофаг се затим елуира, нпр.:
 - смањењем рН вредности (применом пуфера за елуацију ниже рН вредности) или
 - додатком конкурентног лиганда (слободних циљних молекула) у пуфер.

„*Phage-display*” технологија

- Елуирани бактериофаг се додатно пречишћава коришћењем афинитетне колоне како би се изоловали само они бактериофаги који се за имобилисани лиганд везују највећим афинитетом.
- Након одабира ScFv који се високим афинитетом везује за циљни антиген, изолују се гени који кодирају варијабилне регионе тешког и лаког ланца и користе за синтетисање комплетног антитела у комбинацији са генима за константне регионе.
- Ген који кодира протеин од интереса се издваја из генома бактериофага стандардним техникама, а потом уграђује у одговарајући експресиони систем који омогућава производњу веће количине гена.

„*Phage-display*” технологија

- Развијене су различите варијације ове технике, неке од њих користе инжењерисани фаг (фагемид), док друге не постижу експресију библиотека на површини бактериофага, већ на површини бактерија.
- Антитела добијена „ *phage-display*” технологијом су комплетно хумана.
- Прво хумано моноклонско антитело добијено „*phage-display*” технологијом је **адалимумаб** које је 2002. године одобрено за примену у терапији реуматоидног артритиса.

Трансгени мишеви

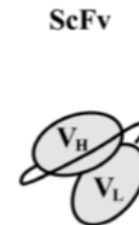
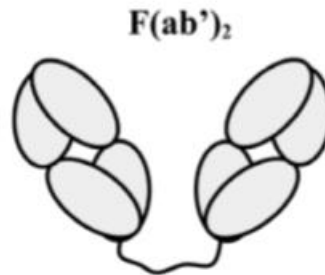
- Хумана моноклонска антитела могу се добити и коришћењем трансгених мишева који, уместо својих, имају гене за хумане имуноглобулине.
- Мишевима се инактивирају гени за имуноглобулине (не продукују антитела и немају зреле Б-лимфоците), а убацују хумани гени за тешке и лаке ланце имуноглобулина, па ови мишеви синтетишу и секретују хумана антитела.
- Када се трансгени мишеви имунизују било којим антигеном, они продукују хумана антитела високог афинитета специфична за тај антиген. Ћелије хибридома настале фузијом ћелија слезине имунизованих трансгених мишева и ћелија мијелома, секретују хумана антитела у неограниченој количини.
- **Пантиумумаб** је прво хумано антитело добијено коришћењем трансгених мишева које је 2006. године одобрено за терапију колоректалног карцинома у САД.

Фрагменти (деривати) антитела

- Једно од ограничења у лечењу солидних тумора антителима је њихово слабо продирање у туморску масу највероватније због величине интактног антитела (150 kDa). Терапија тумора антителима показала се ефикаснијом у лечењу дисеминованих карцинома (нпр. леукемије и лимфоми).
- Имајући у виду да антитела Fab фрагментом препознају антиген, а Fc фрагментом остварују ефекторске функције, у терапији многих болести довољно је само да антитело препозна специфично циљни молекул, док присуство Fc фрагмента није неопходно. Због тога, пажња је преусмерена на производњу и употребу фрагмената (деривата) антитела који задржавају капацитет везивања антигена.

Фрагменти (derivати) антитела

- Фрагменти попут $F(ab)$, $F(ab)_2$ и F_v могу се релативно једноставно синтетисати, коришћењем рДНК технологије.



Фрагменти (деривати) антитела

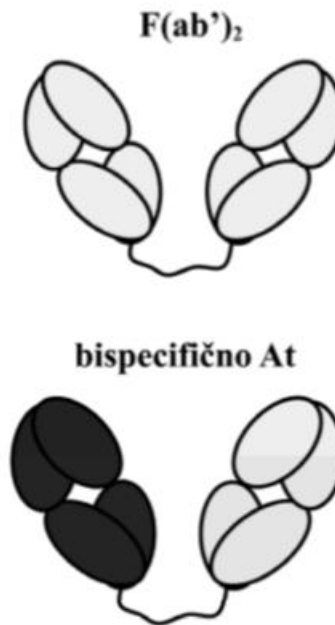
- Деривати антитела се примењују у терапији оних болести где само препознавање антигена од стране антитела и његово следствено везивање директно утиче на функцију антигена тј. циљног молекула.
 - Ако је антиген ензим, антитело се везује у близини активног места ензима и на тај начин инхибира његову функцију.
 - У случају да је антиген рецептор, на површини ћелије, везивање антитела за њега ће ометати везивање лиганда, или се синтетише антитело које ће имитирати везивање лиганда, у смислу покретања активације сигнала посредством специфичног рецептора.
 - Такође, бројни деривати антитела су синтетисани и користе се за неутралисање лиганда, као што су различити хормони, цитокини или неки токсини (нпр. змијски отров), и спречавање њиховог дејства посредством специфичних рецептора.

Фрагменти (деривати) антитела

- Посебну категорију деривата антитела представљају **биспецифична антитела**. Она се састоје од два Fab фрагмента која потичу од родитељских антитела различите специфичности. Циљ дизајнирања оваквих антитела је да се ћелије имунског система доведу у блиски контакт са ћелијама тумора. У ту сврху један Fab фрагмент се специфично везује за молекул на туморској ћелији док се други везује за молекул на ефекторској ћелији (цитотоксични Т лимфоцит, гранулоцит и др.).
- Било би идеално да биспецифично антитело, поред довођења ћелија у блиски контакт уједно активира и ефекторске ћелије. То се и остварује коришћењем биспецифичних антитела код којих је један од Fab фрагмената специфичан за FcR (неутрофили, макрофаге и др.) или CD3 (Т-лимфоцит), тј. молекуле који активирају ефекторске ћелије.

Фрагменти (деривати) антитела

- **Катумаксомаб** је пример биспецифичног моноклонског антитела.
- Ово моноклонско антитело је одобрено у ЕУ за терапију малигног асцитеса, његов један Fab фрагмент је специфичан за адхезивни молекул епителних ћелија (енгл. *epithelial cell adhesion molecule*, EPCAM), а други за CD3 молекул на Т-лимфоциту.



Фрагменти (деривати) антитела

- Фрагменти се могу обележавати, нпр. радиоактивним маркерима у циљу да се користе као дијагностичка и терапијска средства.
- Фрагменти имају знатно смањени полуживот у серуму и не могу покренути ефекторске функције. Радиоактивно обележени фрагменти могу се боље прилагодити када се користе у дијагностичке сврхе.
- Иако због ниже молекулске масе ефикасније продиру у туморе, комплетна химерна/хуманизована антитела су ефикаснија, нарочито у терапији.

Полуживот у серуму моноклонских антитела

- У поређењу са хуманим моноклонима (полуживот 14 - 21 дан), мишји моноклони примењени код људи имају релативно кратак полуживот (30 - 40 h). Химеризација повећава полуживот у серуму 5 пута, са вредностима од око 230 h.

Тип антитела	Полуживот у серуму
Интактно хумано моноклонско антитело	14 - 21 дан
Интактно мишје моноклонско антитело	30 - 40 h
Химерно антитело	200 - 250 h
Мишји F(ab) ₂ фрагмент	20 h
Мишји Fab фрагмент	2 h

Терапијска/дијагностичка примена моноклонских антитела

- Током '80-их година у фокусу је била њихова употреба за *in vivo* дијагностику и терапију. Прве студије су углавном биле усмерене на карциноме, али се препарати моноклонских антитела данас користе и за:
 - индукцију пасивног имунитета;
 - дијагностичко снимање;
 - терапију (нпр. лечење карцинома, трансплантације и кардиоваскуларне болести).
- Висока специфичност, уз релативно једноставну производњу и могућност континуираног снабдевања, чине моноклонска антитела погодним за употребу у биохемијским анализама.
- Терапијски, они представљају најбројнију категорију биофармацеутика која се истражује. Тренутно је у току неколико стотина претклиничких и клиничких испитивања таквих препарата.

Терапијска/дијагностичка примена моноклонских антитела

- Све *in vivo* дијагностичке/терапијске примене зависе од селективне интеракције моноклонског антитела и одређеног типа циљне ћелије у организму (нпр. ћелија карцинома). Према томе, предуслов за примену моноклонских антитела је идентификација антигена на површини ћелија који је јединствен за тип циљне ћелије.
- Једном када су јединствени површински антигени (енгл. *unique surface antigen* USA или USAg) идентификовани и окарактерисани, могу се произвести специфична моноклонска антитела.
- Специфичност везивања антитела и антигена омогућава да се након инјектовања, антитело селективно накупља само на површини циљних ћелија.
- Специфични одговор који се покреће углавном се одређује само експериментално.

Терапијска/дијагностичка примена моноклонских антитела

- У зависности од терапијске/дијагностичке намене, антитела могу бити:
 - некоњугована;
 - коњугована са радиоизотопом, леком или токсином.
- Уколико је коњуговано, антитело се користи као “чаробни метак”, испоручујући радиоизотоп/лек до специфичних ћелија у организму.
- Код циљања ћелија употребом антитела везивање антитела за USA може изазвати различите одговоре:
 - комплекс антитело-антиген (Ab-USA) се интернализује;
 - Ab-USA комплекс се одваја са површине ћелија;
 - не изазива реакцију.

Имунологија тумора

- Трансформација здраве ћелије у канцерогену је повезана са појачаном експресијом површинских антигена, које имунски систем домаћина препознаје као стране. Ови површински антигени, често названи туморски антигени или површински антигени тумора, се код нетрансформисаних ћелија не експримирају или су изражени у ниским концентрацијама па не могу индуковати имунску толеранцију.
- Присуство тумор специфичних антигена указује да имунски систем препознаје и у одређеној мери уништава трансформисане ћелије (имуносупресија).
- Имуни систем реагује на присуство неких тумора изазивајући њихову делимичну или потпуну регресију.

Имунологија тумора

- Главни имунски елементи против тумора су:
 1. Т-лимфоцити, који препознају и лизирају малигне ћелије.
 2. NK ћелије, које попут неких Т-лимфоцита, индукују лизу туморских ћелија. Туморицидна активност NK ћелија појачана је различитим цитокинима (нпр. IL-2 и TNF).
 3. Макрофаги уништавају туморске ћелије, ослобађајући лизозомалне ензиме и реактивне метаболите кисеоника на површини туморске ћелије. Макрофаги такође производе TNF, који може уништити ћелије тумора:
 - (а) везивањем за површинске рецепторе за TNF (који је директно токсичан за ћелије) и
 - (б) стимулисањем синтезе додатних цитокина (што индиректно уништава тумор активацијом других елемената имунитета).

Имунологија тумора

4. Антитела која везивањем за антиген на површини ћелија обележавају ћелију тумора за уништење. NK ћелије и макрофаги експримирају рецепторе на површини ћелија који се везују за Fc регион антитела. Стога, антитело везано за антигене тумора усмерава имунске елементе директно на површину тумора. Антитела такође активирају комплемент који директно лизира туморске ћелије.

Туморски антигени

- Једноставнија идентификација туморских антигена олакшала би производњу моноклонских антитела способних за селективно везивање за тумор у циљу детекције и/или уништавања туморских ћелија.
- Туморски антиген представља антиген повезан са неком ћелијом карцинома, без обзира на то који фактор(и) је првобитно подстакао ћелијску трансформацију.
- Идентификација туморских антигена јединствених за различите врсте тумора и вируса који изазивају карциноме је основни захтев за ефикасну имунотерапију тумора и представља веома активно подручје биомедицинских истраживања.

Туморски антигени

- Ови антигени се сврставају у једну од три групе, у зависности од механизма настанка тумора:
 1. Тумори изазвани хемијским канцерогенима/озрачивањем - сваки тумор има различити специфични антиген;
 2. Тумори изазвани вирусима - различити типови тумора имају идентичне туморске антигене (посебно ако туморе индукује исти вирус);
 3. Различити индукциони фактори (често непознати) - исти онкофетални антиген може бити експримиран код већег броја различитих врста тумора.
- Карциноембрионски антиген (CEA) и α -фетопротеин (AFP) су до сада најопсежније окарактерисани онкофетални антигени. CEA се већ употребљава као маркер за карцином дебелог црева и ректума.

Туморски антигени

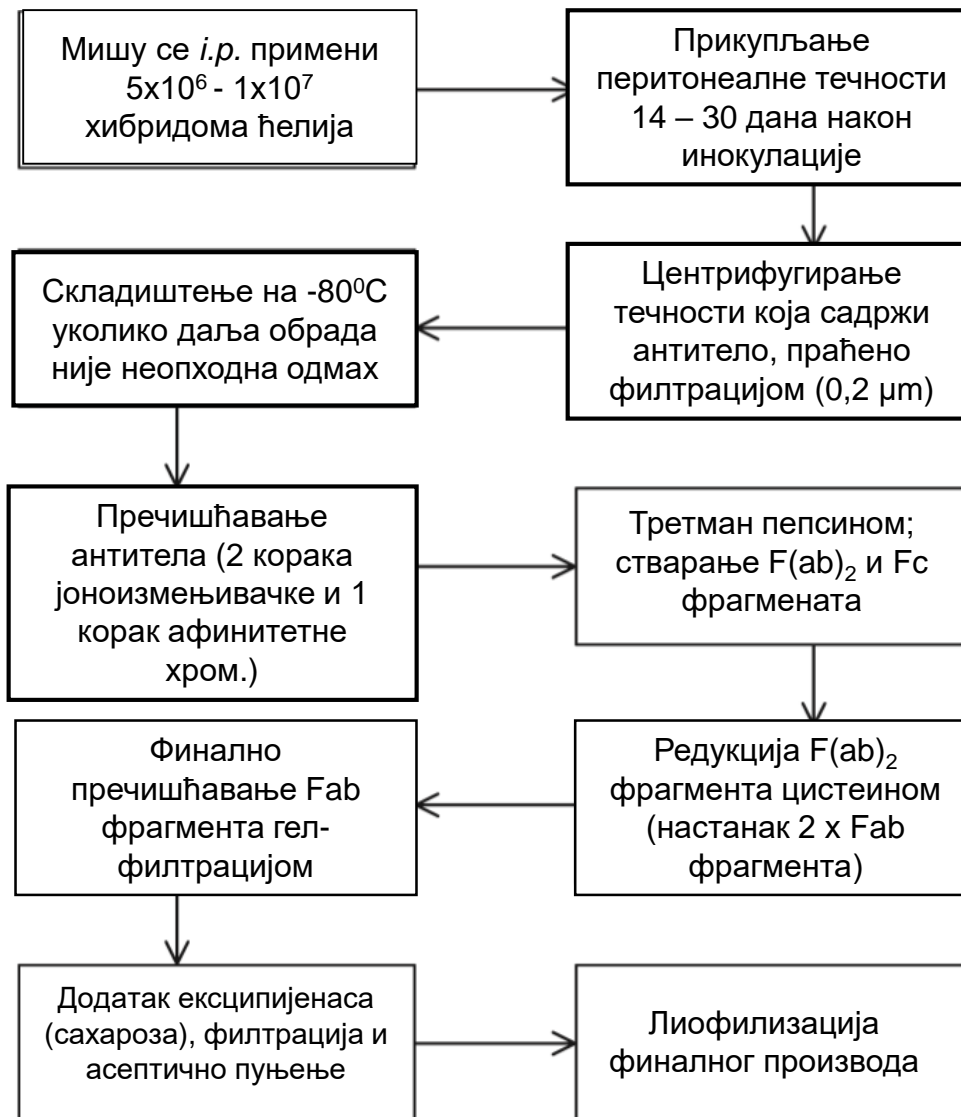
- СЕА је интегрални мембрански гликопротеин, молекулске масе 180 kDa. Овај протеин може бити присутан и у циркулацији у растворљивом облику.
- Експримира се углавном у цревима, јетри и панкреасу, током првих 6 месеци феталног развоја, али је откривено да се у веома малим концентрацијама експримира и у ћелијама слузнице колона одраслих и дојкама током периода лактације.
- Повећани нивои растворљивог (серумског) или СЕА везаног за ћелије могу послужити као индикатори карцинома гастроинтестиналног тракта.

Туморски антигени

- AFP је гликопротеин од 70 kDa који се налази у циркулацији фетуса у развоју, примарно га синтетишу жучна кеса и јетра. AFP је у серуму одраслих присутан у малим количинама.
- Повећани нивои AFP у серуму одраслих често су повезани са различитим карциномима јетре, као и са туморима герминативних ћелија, понекад и код ћелија карцинома желуца и панкреаса.
- Иако је користан тумор маркер, повећан ниво AFP у серуму може бити поседица цирозе и других неканцерогених болести јетре.
- Карцином антиген (CA) 125 је онкофетални протеин који се експримира код 90% аденокарцинома јајника.
- Део протеина се ослобађа са места тумора у системску циркулацију, тако да повишен ниво CA125 у серуму има одређену дијагностичку вредност.

Примена моноклонских антитела за детекцију тумора

- CEA-SCAN је антигенски везујући фрагмент (Fab) специфичног мишјег моноклона против хуманог CEA, који је код неких тумора изражен у високим проценту. Ово се посебно односи на туморе ГИТ-а, као што су карциноми дебелог црева или ректума. За откривање ових карцинома користи се CEA-SCAN (**арцитумомаб**). Међутим, CEA се физиолошки (у нижим нивоима) експримира и код неких нетрансформисаних ћелија. Стога се овај фрагмент антитела углавном користи у дијагнози рецидива и/или метастаза карцинома дебелог црева или ректума. Користи се као додатак стандардним техникама за визуелизацију, као што су компјутеризована томографија или ултразвук. Производ се примењује *i.v.* путем.
- Нежељена дејства су релативно блага и подразумевају мучнину, температуру, осип и главобољу.



Производња карциноембрионског антигена (CEA)-SCAN

Примена моноклонских антитела за детекцију тумора

- Дијагностика аденокарцинома јајника може се спровести имуносцинтиграфијом, коришћењем радиообележених антитела (CA-125). Овај производ је $F(ab)_2$ фрагмент обележен ^{111}In добијен из ћелијске линије мишјег хибридома и ефикасан је у снимању рецидивантног аденокарцинома јајника.

Примена моноклонских антитела за детекцију других болести

- Развијени су различити препарати антитела који олакшавају постављање дијагнозе кардиоваскуларних болести.
- Фрагменти моноклонских антимиозинских антитела (Fab) обележени ^{111}In користе се за сцинтиграфију у комбинацији са планарном гама камером. Антитело је специфично за интрацелуларни миозин који је присутан у миокарду само након инфаркта миокарда.
- Моноклонска антитела могу бити од користи за визуелизацију места и процене захваћености бактеријском инфекцијом. То се може постићи употребом радиообележених антитела која имају афинитет везивања за специфичне површинске антигене бактерија.
- Сличан, али индиректан приступ подразумева употребу антитела у дијагностици, за откривање гранулоцита и других леукоцита присутних на местима инфекције.

Примена моноклонских антитела у терапији

- Проблеми у развијању терапије засноване на антителима за карциноме су:
 - Тренутно је окарактерисан мали број специфичних туморских антигена (ТСА);
 - Неке врсте карцинома, у зависности од узрочника, могу имати другачије ТСА код различитих пацијената;
 - ТСА често експримира, мада у нижим нивоима, један или више (нетрансформисаних) типова ћелија;
 - У неким случајевима, везивање антитела доводи до тренутног одвајања комплекса Ab-ТСА са површине ћелије;
 - ТСА експресија може бити пролазна. За многе туморе, само део (иако велики) туморских ћелија експримира ТСА у било ком тренутку.

Примена радиоактивно обележених моноклонских антитела у терапији тумора

- У неколико клиничких студија су испитивана/се испитују моноклонска антитела коњугована са радиоактивним маркерима, намењена за терапију карцинома. Разлог за таква истраживања је селективна испорука радиоактивности директно до тумора.
- Већина радиоизотопа који су до сада испитивани су β -емитери, и то изотопи јода (^{125}I , ^{131}I), ренијума (^{186}Re , ^{188}Re) и итријума (^{90}Y).
- Средњоенергетска радиоактивност коју ови изотопи емитују је довољна за пролазак кроз неколико слојева ћелија. Накупљање радиоактивности на површини тумора може на тај начин стимулисати озрачивање неколико слојева туморских ћелија, као и суседних здравих ћелија.
- Испитивани су и α -емитери веће енергије. Иако они ефикасно пролазе само кроз један слој ћелија, свака нова емисија зрачења има већу вероватноћу да убије све ћелије на свом путу.

Примена радиоактивно обележених моноклонских антитела у дијагностици тумора

- Радиоактивно обележена моноклонска антитела се користе и у дијагностици (имуносцинтиграфија). У овом случају су радиоизотопи γ -емитери.
- Иако су испитивани различити радиоизотопи јода, најчешће се користи метастабилни технецијум 99 (^{99m}Tc). Он има довољну енергију емисије γ -зрака и релативно кратак полуживот од 6 h (ово смањује излагање пацијента високоенергетским γ -зрацима). Технецијум се може произвести у нуклеарним постројењима релативно једноставно и јефтино, а уз то постоје хемијске методе које олакшавају његово (стабилно) спајање са антителима.

Примена радиоактивно обележених моноклонских антитела у дијагностици тумора

- Пре обележавања моноклонских антитела ^{99m}Tc потребна је почетна редукција дисулфидних остатака антитела при чему настају слободне сулфхидрилне ($-\text{SH}$) групе. Ово се постиже деловањем редукционих средстава, као што су аскорбинска киселина или натријум-дитионат. Потом се извор ^{99m}Tc (нпр. натријум пертехнат $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) одвојено редукује. Накнадно мешање у присуству азота (ради одржавања редукционих услова) ствара директне везе између радиоизотопа и антитела. Након примене, антитуморски ^{99m}Tc коњугат се накопља на туморским ћелијама. Тумор се затим визуелизује одговарајућом опремом за детекцију γ -зрака (нпр. планарна гама камера).
- Бројна радиообележена моноклонска антитела одобрена су као средства за дијагностиковање тумора.

Примена коњугованих моноклонских антитела у терапији тумора

- Антитуморска моноклонска антитела се користе и за испоруку токсина до тумора. Токсини коњуговани са терапијским антителима су ризин, токсин винобојке, токсин *Pseudomonas*-а и токсин дифтерије. После везивања за површину, коњугат антитело-токсин улази у ћелију ендоцитозом и изазива штетне ефекте унутар ћелије.
- Један такав производ одобрен за клиничку употребу је **гемтузумаб озогамицин** који се састоји од инжењерисаног антитела (хуманизовано антитело) коњугованог са цитотоксичним антитуморским антибиотиком, калихеамицином.
- Антитело се специфично везује за антиген на површини ћелије, CD33. Ово је адхезиони протеин који се налази на површини леукемијских ћелија код више од 80% пацијената са акутном мијелоидном леукемијом.

Примена коњугованих моноклонских антитела у терапији тумора

- Процес производње подразумева иницијално култивисање ћелијске линије сисара која производи антитела уз накнадно пречишћавање антитела низом хроматографских корака. У *downstream* процес су укључени и ултрафилтрација и инкубација на ниским рН вредностима у циљу уклањања/инактивације сваког, потенцијално присутног, вируса.
- Цитотоксични антибиотик се добија одвојено ферментацијом микроорганизма који га производе, *Micromonospora echinospora sp. calichensis*. Директна хемијска веза антибиотика са антителом остварује се коришћењем бифункционалног линкера.

Примена коњугованих моноклонских антитела у терапији тумора

- Примена гемтузумаб озогамицина доводи до сакупљања антитело-токсин коњугата на површини (CD33 позитивних) леукемијских ћелија, а везивањем се покреће интернализација коњугата. Део лека разграђују лизозоми, али значајан део интактног антибиотика остаје и индукује цитотоксично дејство везивањем за ДНК и раскидањем двоструког хеликса.
- Најзначајнији нежељени ефекат гемтузумаб озогамицина је имуносупресија. Ово се дешава јер одређени додатни (неканцерогени) прекурсори леукоцита такође имају антиген CD33 на својој површини. Имуносупресивни ефекат нестаје након прекида лечења, јер производ не утиче на мултипотентне хематопоеетске матичне ћелије.

Примена коњугованих моноклонских антитела у терапији тумора

- Антитела се такође користе за посредовање у испоруци лека до тумора тако што се хемиотерапеутик коњугује са антителом специфичним за тумор.
- Лекови који се користе у ове сврхе су: адриамицин, аминоптерин, метотрексат и винка алкалоиди.
- Овај приступ директног допремања лекова до тумора имао је успеха, углавном у анималним студијама. Међутим, ограничени број лекова се може коњуговати са антителима, што донекле ограничава испоруку лека.

Примена коњугованих моноклонских антитела у терапији тумора

- Алтернативни приступ је употреба антитела специфичног за тумор за које је везан ензим који активира пролек. Терапијски неактивни пролекови могу се примењивати *i.v.*, а потом се активирају само на површини тумора. Овај приступ је назван ADEPT (енгл. *antibody direct enzyme prodrug therapy*) или катализа усмерена на антитела. Због своје каталитичке природе, један коњугат антитело-ензим активира многе молекуле пролека.
- Већи део активног цитоцида ослобођеног на површини тумора преузима се од стране туморских ћелија једноставном дифузијом или активним транспортом посредованим носачем.

Примена коњугованих моноклонских антитела у терапији тумора

- Примена етопозида у виду пролека је пример овог приступа. **Етопозид** ($C_{29}H_{32}O_{13}$; молекулска маса 588,6) је полусинтетски дериват подофилотоксина, природно изолованог из северноамеричке биљке *Podophyllum peltatum*. Користи се у терапији карцинома, а у ћелију доспева процесом дифузије након чега испољава цитоцидни ефекат.
- Фосфорилисани етопозид не дифундује и представља неактивни облик пролека етопозида. Алкална фосфатаза, међутим, може да одвоји фосфатну групу, ослобађајући активан етопозид.
- Примењује се коњугат антитела са алкалном фосфатазом, при чему овај ензим омогућава ослобађање активног етопозида из фосфорилисаног етопозида на површини тумора, који затим дифузијом улази у туморске ћелије.

Примена коњугованих моноклонских антитела у терапији тумора

- Сада су развијене разне друге комбинације пролекова и ензима, укључујући феноксиацетамидне деривате **доксорубина** (активираног **пеницилин амидазом**) и **5-флуороцитозина** (активираног **цитозин деаминазом**).
- Коришћени пролекови треба да буду јефтини, лако доступни и стабилни на хемијску/ензимску разградњу *in vivo*. Ензими који се користе такође треба да су стабилни у физиолошким условима, да имају висок проценат опоравка *in vivo* и да њихова активност не зависи од кофактора. Иако су ензими сисара мање имуногени од микробиолошких ензима, њихова употреба може довести до компликација уколико је неки од ендогених хуманих ензима способан да активира лек на местима удаљеним од тумора.

Додатне терапијске примене моноклонских антитела

- 1 - 2% светске популације болује од аутоимуних стања, укључујући реуматоидни артритис, мултиплу склерозу и неке облике дијабетеса. У многим случајевима, аутоимуни одговор настаје као последица неадекватне активације специфичних Б-и/или Т-лимфоцита.
- Најчешћи имунотерапијски приступ за потенцијално лечење таквих болести је исцрпљивање популација Т- и Б-ћелија код појединаца. То се може постићи применом антитела против површинског антигена који је присутан у таквим ћелијама.
- Иницијална испитивања су показала да примена (некоњугованог) антитела за CD4 (ћелијски површински гликопротеин присутан на многим Т-лимфоцитима) током 7 дана значајно смањује клиничке симптоме реуматоидног артритиса за неколико месеци.

Додатне терапијске примене моноклонских антитела

- Имајући у виду да имунски механизми посредују у одбацивању трансплантираних органа, пацијентима се прописују имуносупресивни лекови (нпр. стероиди, метаболити циклоспорина). Међутим, код појединих пацијената се могу јавити компликације на стандардну имуносупресивну терапију. Муромонаб CD3 је прво моноклонско антитело које се користило у ове сврхе.
- Бројна додатна моноклонска антитела којима је циљ спречавање одбацивања трансплантата сада се налазе на тржишту, **базиликсимаб** (химерно антитело) и **дацлизумаб** (хуманизовано антитело). Њихова инжењерисана природа је значајно смањила НАМА одговор на њихову администрацију код људи. Оба производа циљају рецептор за IL-2 и селективно се везују за активирани ћелије имунског система, посебно активирани Т-лимфоците, моноците и макрофаге. Везивање спречава даљу ћелијску пролиферацију и самим тим, смањује покушаје имунског система да уништи трансплантирано ткиво.

Моноклонска антитела

-регистрована за примену у Р. Србији

Генерички назив	Заштићен назив	Врста	Индикација	Формулација
Ритуксимаб	<i>Blitzima</i> <i>Mabthera</i> <i>Rixathon</i>	Химерно IgG ₁ антитело	Не-Хоџкинов лимфом, Хронична лимфоцитна леукемија, Реуматоидни артритис, Полиангиитис	Концентрат за раствор за инфузију Концентрат за раствор за инфузију, Раствор за s.c. инј.
Трастузумаб	<i>Herceptin</i> <i>Herzuma</i> <i>Kanjinti</i> <i>Ogivri</i>	Хуманизовано IgG ₁ антитело	Карцином дојке, Метастатски карцином желуца	Концентрат и растварач за раствор за инфузију
Трастузумаб емтанзин*	<i>Kadcyla</i>	Хуманизовано IgG ₁ антитело коњуговано са леком	Метастатски карцином дојке	Прашак за раствор за инфузију
Цетуксимаб	<i>Erbitux</i>	Химерно IgG антитело	Колоректални карцином, Карцином главе и врата	Раствор за инфузију

Моноклонска антитела

-регистрована за примену у Р. Србији

Генерички назив	Заштићен назив	Врста	Индикација	Формулација
Бевацизумаб	<i>Avastin</i>	Хуманизовано IgG ₁ антитело	Узнапредовали карцином колона или ректума, Метастатски карцином дојке, плућа и бубрега, Епителијални карцином јајника и јајовода, Карцином грлића материце	Концентрат за раствор за инфузију
Панитумумаб	<i>Vectibix</i>	Хумано IgG ₂ антитело	Метастатски колоректални карцином	Концентрат за раствор за инфузију
Брентуксимаб ведотин	<i>Adcetris</i>	Химерно IgG ₁ антитело	Хоџкинов лимфом	Концентрат за раствор за инфузију
Пертузумаб	<i>Perjeta</i>	Хуманизовано IgG ₁ антитело	Карцином дојке	Концентрат за раствор за инфузију
Обинутузумаб*	<i>Gazyva</i>	Хуманизовано IgG ₁ антитело	Хронична лимфоцитна леукемија	Концентрат за раствор за инфузију

Моноклонска антитела

-регистрована за примену у Р. Србији

Генерички назив	Заштићен назив	Врста	Индикација	Формулација
Ниволумаб*	<i>Opdivo</i>	Хумано IgG ₄ антитело	Узнапредовали меланом, Карцином плућа, бубрега, главе и врата, Хоџкинов лимфом, Уротелијални карцином	Концентрат за раствор за инфузију
Пембролизумаб*	<i>Keytruda</i>	Хуманизовано IgG ₄ антитело	Узнапредовали меланом, Карцином плућа, Хоџкинов лимфом, Метастатски карцином главе и врата, Метастатски уротелијални карцином	Концентрат за раствор за инфузију
Даратумумаб*	<i>Darzalex</i>	Хумано IgG ₁ антитело	Мултипли мијелом	Концентрат за раствор за инфузију
Атезолизумаб	<i>Tecentriq</i>	Хуманизовано IgG ₁ антитело	Уротелијални карцином, Метастатски карцином плућа	Концентрат за раствор за инфузију

Моноклонска антитела

-регистрована за примену у Р. Србији

Генерички назив	Заштићен назив	Врста	Индикација	Формулација
Деносумаб	<i>Prolia</i>	Хумано IgG ₂ антитело	Остеопороза, Терапија губитка костне масе	Раствор за инј.
Паливизумаб	<i>Synagis</i>	Хуманизовано IgG ₁ антитело	Респираторни синцицијални вирус	Раствор за инј.
Базиликсимаб	<i>Simulect</i>	Химерно IgG ₁ антитело	Превенција одбацивања трансплантата бубрега	Прашак и растварач за раствор за инј.
Алемтузумаб*	<i>Lemtrada</i>	Хуманизовано IgG ₁ антитело	Мултипла склероза	Концентрат за раствор за инфузију
Натализумаб	<i>Tysabri</i>	Хуманизовано IgG ₄ антитело	Мултипла склероза	Концентрат за раствор за инфузију

Моноклонска антитела

-регистрована за примену у Р. Србији

Генерички назив	Заштићен назив	Врста	Индикација	Формулација
Ведолизумаб*	<i>Entyvio</i>	Хуманизовано IgG ₁ антитело	Улцерозни колитис, Кронова болест	Прашак за раствор за инфузију
Белимумаб	<i>Benlysta</i>	Хумано IgG ₁ антитело	Системски еритемски лупус	Прашак за раствор за инфузију
Инфликсимаб	<i>Inflectra</i> <i>Remicade</i> <i>Remsima</i>	Химерно IgG ₁ антитело	Реуматоидни артритис, Кронова болест, Улцерозни колитис, Анкилозирајући спондилитис, Псоријаза, Псоријатични артритис	Концентрат за раствор за инфузију
Ранибизумаб	<i>Lucentis</i>	Хуманизовани Fab фрагмент	Неоваскуларна сенилна макуларна дегенерација, Оштећен вид због дијабетесног макуларног едема	Раствор за интравитреалну инј.

Моноклонска антитела

-регистрована за примену у Р. Србији

Генерички назив	Заштићен назив	Врста	Индикација	Формулација
Адалимумаб	<i>Humira</i> <i>Amgevita</i>	Хумано IgG ₁ антитело	Реуматоидни артритис, Јувенилни идиопатски артритис, Аксијални спондилоартритис, Псоријаза, Псоријатични артритис, Кронова болест, Улцерозни колитис, Увеитис, Гнојно запаљење знојних жлезда	Раствор за инјекције (пен и шприц)
Голимумаб	<i>Simponi</i>	Хумано IgG ₁ антитело	Реуматоидни артритис, Јувенилни идиопатски артритис, Аксијални спондилоартритис, Псоријаза, Псоријатични артритис Улцерозни колитис	Раствор за инјекције (шприц)
Еволокумаб	<i>Repatha</i>	Хумано IgG ₂ антитело	Хипер-холестеролемија	Раствор за инј. у шприцу

Моноклонска антитела

-регистрована за примену у Р. Србији

Генерички назив	Заштићен назив	Врста	Индикација	Формулација
Идаруцизумаб	<i>Praxbind</i>	Хуманизовани Fab фрагмент	Специфичан антагониста дабигатрана	Раствор за инј.
Секукинумаб*	<i>Cosentyx</i>	Хумано IgG ₁ антитело	Псоријаза, Псоријатични артритис, Анкилозирајући спондилитис	Раствор за инј. у шприцу
Устекинумаб	<i>Stelara</i>	Хумано IgG ₁ антитело	Псоријаза, Псоријатични артритис Кронова болест	Раствор за инј. Раствор за инј. у шприцу
Тоцилизумаб	<i>Actemra</i>	Хуманизовано IgG ₁ антитело	Тежак реуматоидни артритис, Јувенилни идиопатски артритис	Концентрат за раствор за инфузију
Омализумаб	<i>Xolair</i>	Хуманизовано IgG ₁ антитело	Алергијска астма	Прашак и растварач за раствор за инј.

**Лекови под додатним праћењем чиме се обезбеђује брзо откривање нових безбедоносних информација. Здравствени радници треба да пријаве сваку сумњу на нежељено дејство лека.*

Моноклонска антитела

-регистрована за примену у Р. Србији

Генерички назив	Заштићен назив	Врста	Индикација	Формулација
Сотровимаб#	<i>Sotrovimab</i>	Хумано IgG ₁ антитело	Терапија благе до умерено тешке инфекције COVID-19 код особа узраста 12 година и старијих који су у високом ризикy за настанак тешког облика инфекције	Раствор за инј.
Бамланивимаб /етесевимаб#	<i>Bamlanivimab /etesevimab</i>	Хумана IgG ₁ антитела	Терапија благе до умерено тешке инфекције COVID-19 код особа узраста 12 година и старијих који су у високом ризикy за настанак тешког облика инфекције	Раствор за инј.
Касиривимаб/ имдевимаб#	<i>Regen-COV</i>	Хумана IgG ₁ антитела	Превенција болести COVID- 19 након излагања вирусy код особа узраста 12 година и старијих који су у високом ризикy за настанак тешког облика инфекције	Раствор за инј.

имају Дозволу за хитну употребу (у ванредним ситуацијама)

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Хвала на пажњи