

Molekularna biotehnologija: rekombinantna protitelesa

Protitelesa, ki preprečujejo zavračanje presadkov

Prvo odobreno zdravilo na osnovi Ab

Podjetje Ortho Biotech je v ZDA leta 1986 uspelo registrirati za uporabo na ljudeh mišje mAb OKT3, ki so ga uporabljali za pasivno imunizacijo pacientov pri transplantaciji ledvic. Ab je bilo specifično za površinski receptor CD3, značilen za T-celice imunskega sistema in je delovalo kot imunosupresor. Ugotovili so zmerno uspešnost protiteles kljub stranskim učinkom (vročina, srbenje).

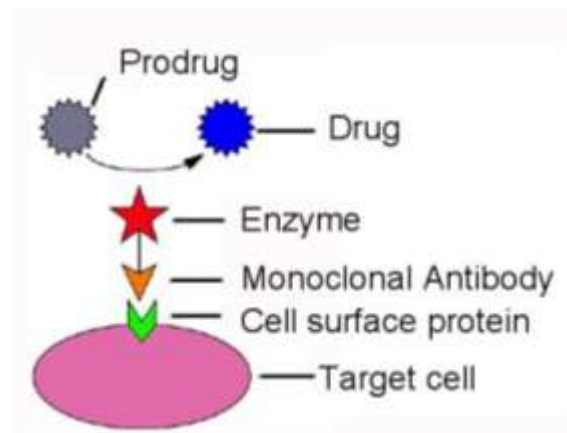
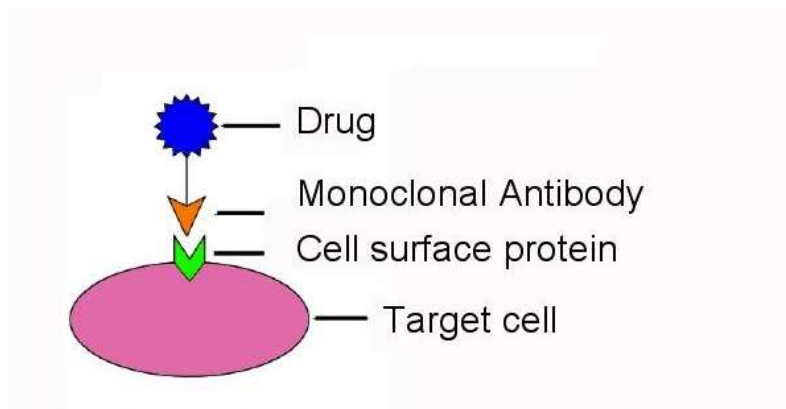
Za proizvodnjo protiteles so hibridomske celice samo pogojno uporabne, saj rastejo počasi, dosegajo nizke gostote in zahtevajo draga gojišča. Zato so monoklonska protitelesa predraga za široko terapevtsko uporabo.

Cenejša protitelesa bi lahko pridobili v *E. coli* ali v transgenskih organizmih. Tehnoloških ovir za to ni. Za delovanje je potrebna le regija F_v ali F_{ab} .

Kemijsko modificirana Ab

Analiza delovanja Ab *in vitro* kaže pogosto boljše rezultate kot kasneje *in vivo*. To je pogosto posledica težjega doseganja tarčnih mest v telesu v zadostni koncentraciji za učinkovito delovanje. Možna rešitev bi sicer bila povečevanje doze, kar pa prej privede do stranskih učinkov, pa tudi dražje je. Možnih je več rešitev:

- enkapsuliranje Ab v liposome z ustrezno prilagojeno površino;
- gene za toksine vstavimo v limfocite, ki so usmerjeni na tumorske celice;
- zdravilo pripravimo na mAb, ki je specifično za površinski Ag tarčnih celic (npr. tumorskih);
- uporabimo neaktivno obliko zdravila, na Ab pa vežemo encim, ki ga aktivira šele v bližini tarčnih celic.

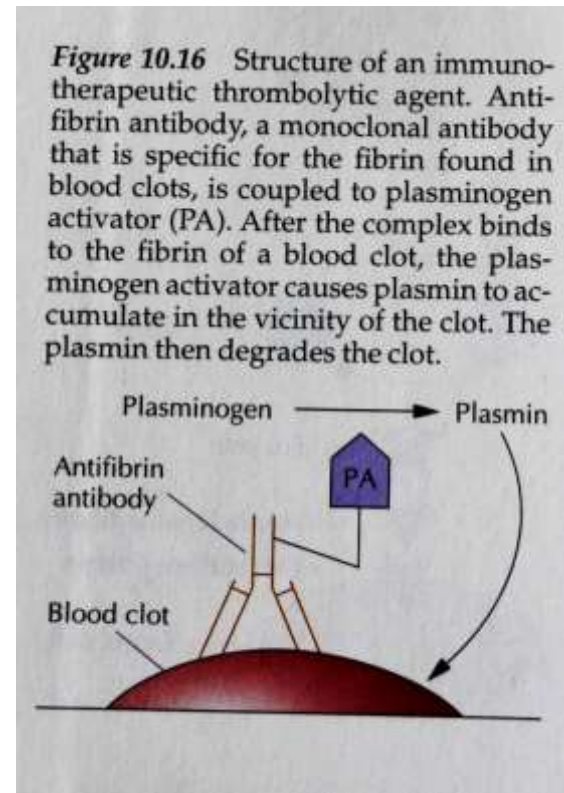
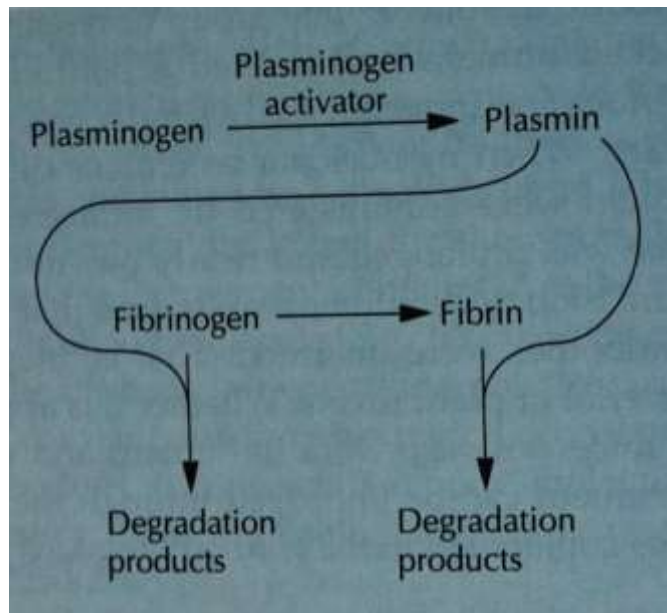


Primeri dostavnih sistemov na osnovi mAb

Možnost uporabe modificiranih Ab za odstranjevanje žilnih krvnih strdkov

Večina naravnih smrti v razvitem svetu je posledica zamašitve koronark ali možganskih žil s krvnim strdkom. Strdek sestavlja fibrinska mreža, razvije pa se na mestu, kjer je žilna stena poškodovana. Pri zdravem človeku fibrin v strdku razgrajuje proteaza plazmin. Ta nastaja iz prekursorja ob delovanju aktivatorja plazminogena. Strdki v veliko primerih nastanejo, ker sistem aktivacije plazminogena ne deluje pravilno.

Plazmin pa ima širšo specifičnost in lahko razgrajuje tudi fibrinogen. Če bi uporabili za zdravljenje sam plazmin, bi lahko prišlo do spontanih krvavitev, ker se kri ne bi mogla strjevati. Z vezavo PA na protitelo proti fibrinu so encim pripeljali v bližino strdkov, kjer je v modelnem sistemu prišlo do razgrajevanja strdkov, ne pa tudi do razgradnje fibrinogena.



Problemi pri pripravi in uporabi Ab

Izpleni kemijsko modificiranih Ab so nizki, vezava efektorja na Ab poteče na naključnih mestih in lahko povzroči inaktivacijo vezanega proteina. Ker zdravljenje zahteva večkratno doziranje, lahko pride do imunskega odgovora na zdravilo, ki vsebuje mišja zaporedja (odziv HAMA).

Človeških mAb ni mogoče pripraviti konvencionalnimi tehnikami preko hibridomskih celic, ker:

- so človeški kromosomi pri fuziji človeških limfocitov z mišjimi mielomskimi celicami nestabilni;
- človeške mielomske celične linije, ki bi nadomestila mišje, še niso uspeli pridobiti;
- tudi če bi bilo možno pripraviti človeške hibridomske celice, ne bi bilo etično, da bi Ag vbrizgali človeku in mu potem odvzeli del vranice, da bi dobili celice, ki proizvajajo Ab.

Možne rešitve:

1.

Izolirane limfocite B, ki so aktivno sintetizirali Ab, so inkubirali s fluorescenčno označenim Ag in z napravo FACS osamili celice, ki so izražale točno določena protitelesa. Ker celice B v kulturi slabo rastejo, so jih transformirali z Epstein-Barrovim virusom, nakar je bila rast bolj stabilna. Nekatere od celic so izločali topna specifična Ab, a so izpleni nizki, prav tako niso dosegli visoke afinitete.

2.

Celice človeškega imunskega sistema vnesemo v miši brez lastnih imunskih celic (scid-miši). Take miši s hudo kombinirano imunsko pomanjkljivostjo prevzamejo človeške celice in če jim injiciramo Ag, proizvajajo človeška Ab.

3.

V miši brez lastnih genov za Ig vstavimo človekove gene za Ig in po injiciranju Ag pričakujemo razvoj človeških Ab.

4.

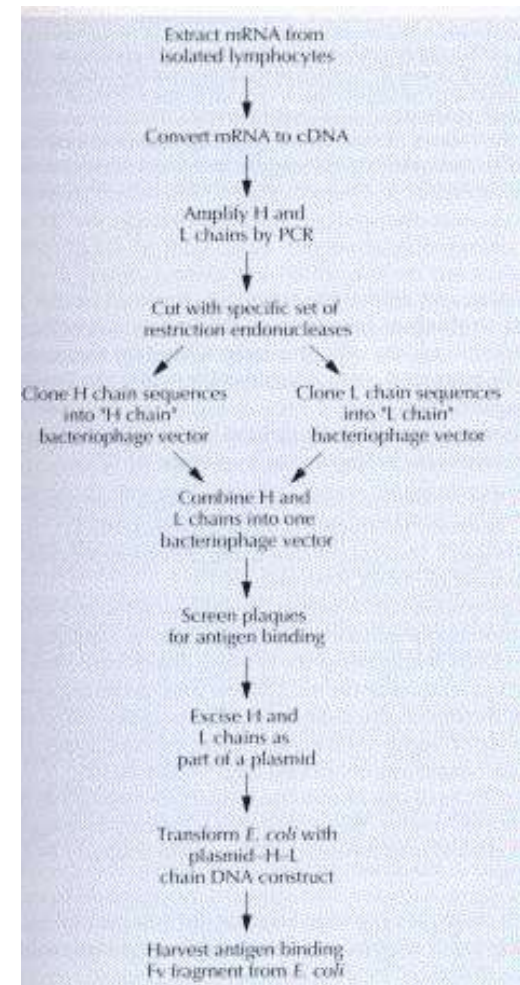
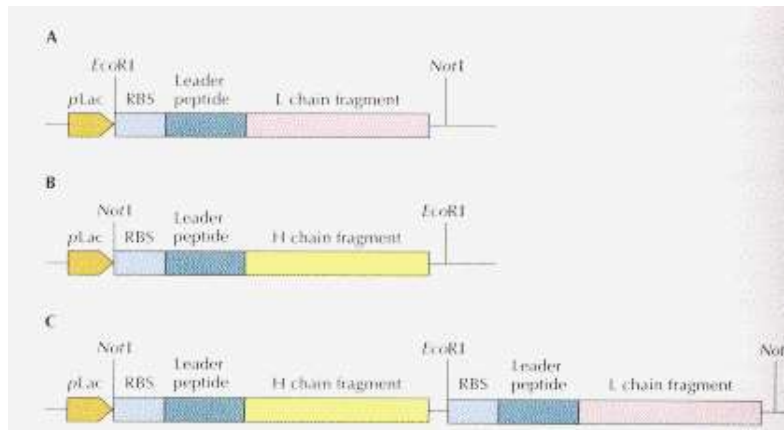
Pripravimo rekombinantna Ab.

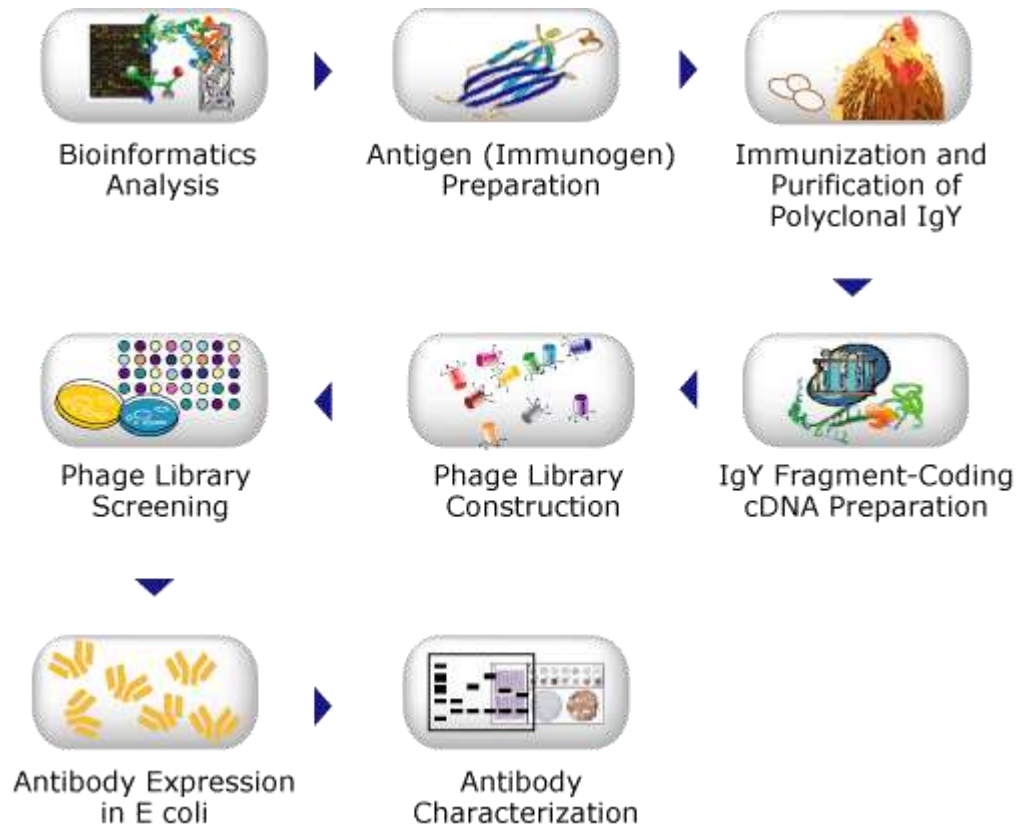
Priprava Ab v *E. coli*

- Iz mišjih ali človeških limfocitov B izoliramo mRNA in jo pretvorimo v cDNA.
- S PCR ločeno pomnožimo regiji, ki zapisujeta za verigi H in L.
- Vsako pomnoženo regijo (heterogena zaporedja) vnesemo v vektorje na osnovi bakteriofaga λ .
- cDNA za po eno verigo L in H vnesemo v isti (kombinatorični) vektor in izrazimo v *E. coli* celotno protitelo (ali le fragmente Fv, če pomnožimo le variabilne domene).
- Klone testiramo na vezavo antigena.

V stopnji kombiniranja L- in H- verig ustvarimo tudi nenaravne kombinacije regij, ki imajo morda vezavna mesta za povsem nove epitope.

Fagna knjižnica ima običajno 10^6 - 10^8 klonov, kar je primerljivo s številom različnih protiteles, ki so jih sposobne sintetizirati sesalske celice. Še večjo raznolikost pa lahko dosežemo z naključno mutagenezo. Testi specifičnosti trajajo v povprečju 2 tedna, kar je bistveno manj kot testiranje nekaj 100 hibridomskih celičnih linij.



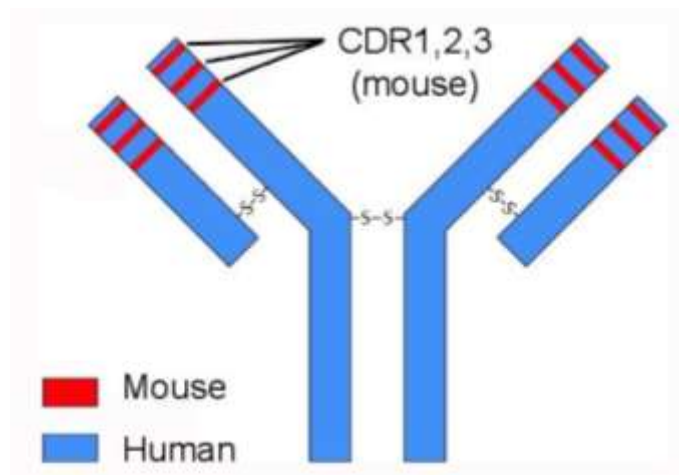
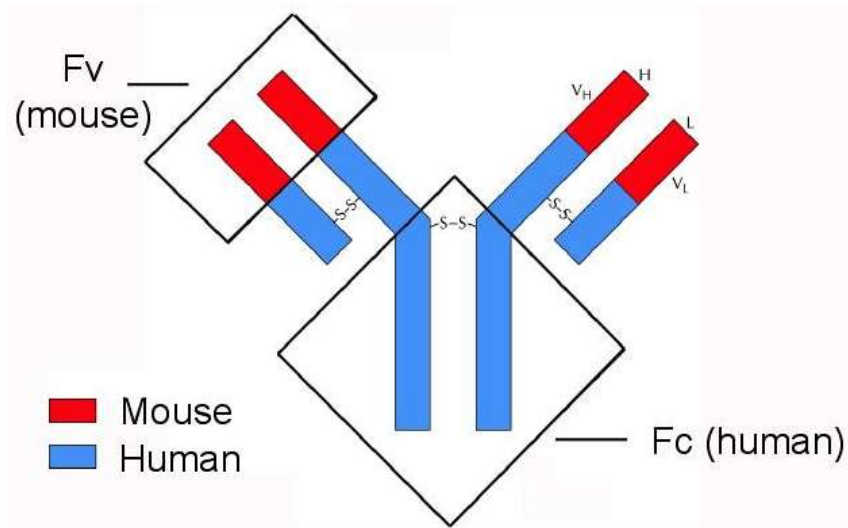


Zmanjšanje imunogenosti protiteles

Za klinično uporabo bi bila primerna le človeška protitelesa, ki pa jih ni mogoče pripraviti zaradi tehničnih težav pri fuziji mišjih in človeških celic oz. iz etičnih razlogov.

Zato so z gensko tehnologijo pripravili konstrukte, pri katerih so človeško regijo Fc povezali z mišjimi regijami Fv (so pri človeku šibko imunogene) → himerno protitelo (70 % človeško, 30 % mišje). Tako hibridno molekulo pripravijo lahko s pomočjo subkloniranih segmentov. Izražanje poteka npr. v gojenih transficiranih limfocitih B.

Bolj izpopolnjena so ‚humanizirana‘ protitelesa, pri katerih so v zapis za človeška protitelesa vstavili le kratke regije, ki določajo komplementarnost (CDR) monoklonskih protiteles mišjega izvora (95 % človeško, 5 % mišje).



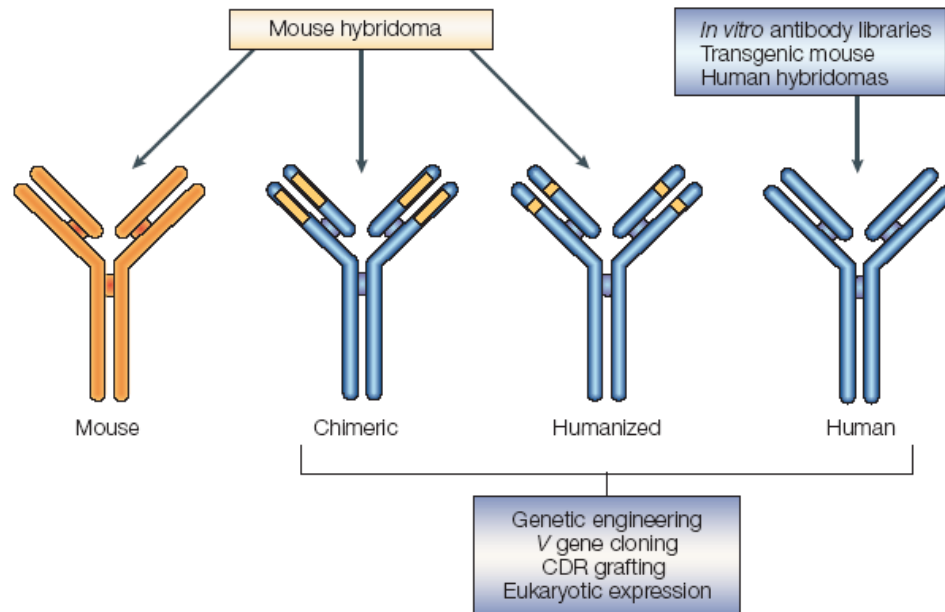
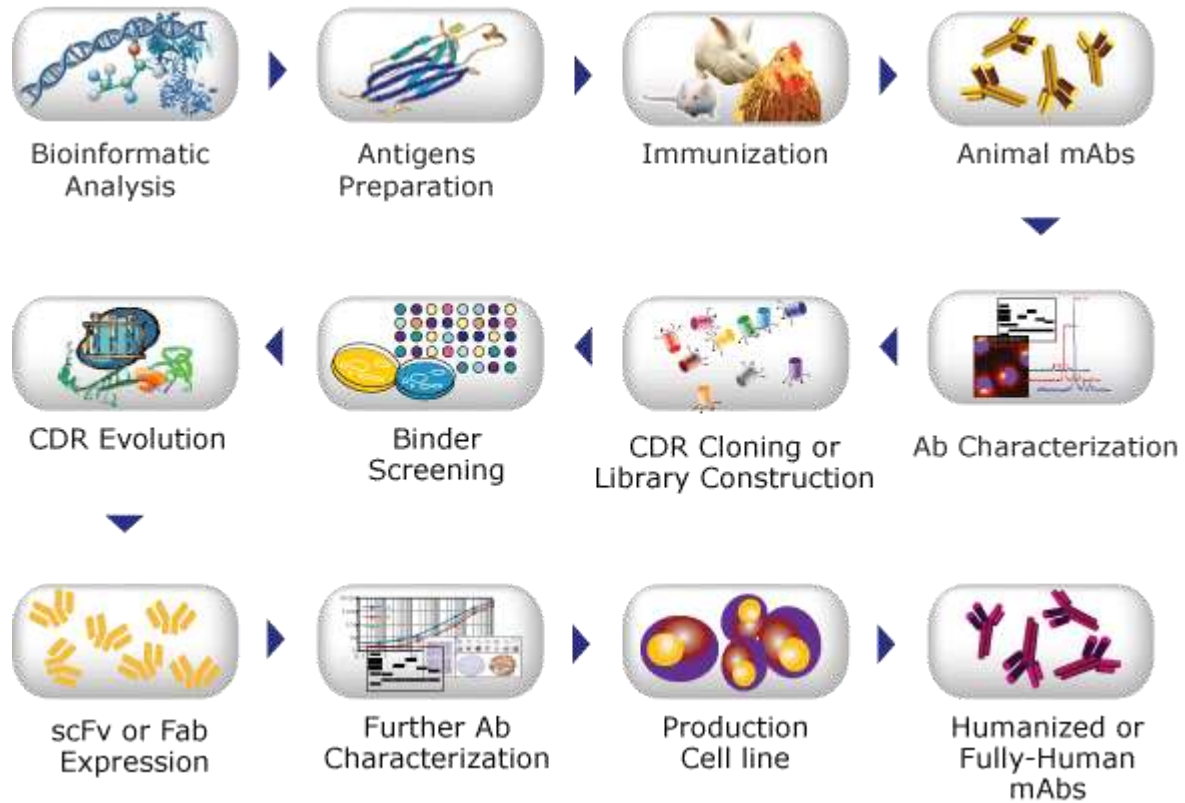


Figure 2 | **Antibody engineering.** Mouse hybridoma technology generates mouse monoclonal antibodies. Genetic engineering has fostered the generation of chimeric, humanized and human antibodies. Cloning of mouse variable genes into human constant-region genes generates chimeric antibodies. Humanized antibodies are generated by the insertion of mouse complementarity-determining regions (CDRs) onto human constant and variable domain frameworks; however, additional changes in the framework regions have, in several cases, been shown to be crucial in maintaining identical antigen specificity^{75,76}. Fully human antibodies can be generated by the selection of human antibody fragments from *in vitro* libraries (see BOX 2 and FIG. 3a), by transgenic mice (FIG. 3b) and through selection from human hybridomas.



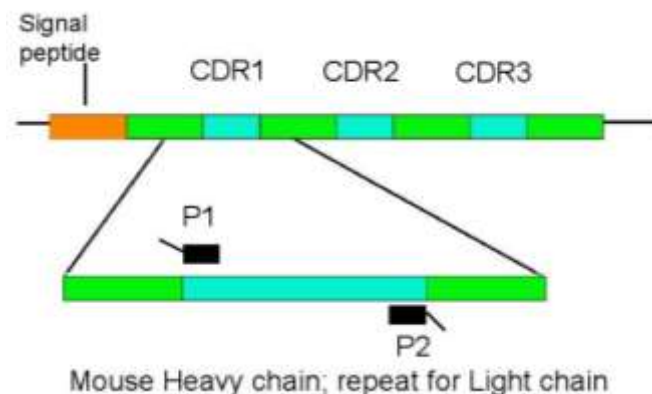
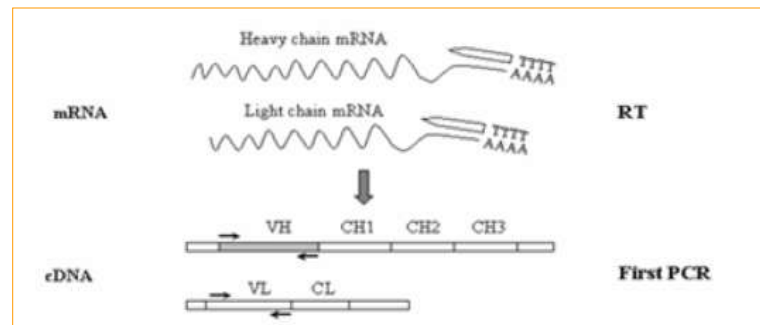
Humanizacija z zamenjavo CDR

Iz hibridomske celične linije glodalcev izoliramo cDNA za L- in H-verigo. Njuni variabilni regiji pomnožimo s PCR.

Na podlagi nukleotidnih zaporedij določimo meje CDR in sintetiziramo 3 pare oligonukleotidov za pomnoževanje posameznih CDR (3 L, 3 H). Oligonukleotidi nosijo na 5'-koncu podaljšek 12 b, komplementarnih človeškemu zaporedju, v katerega želimo CDR vgraditi.

V 6 zaporednih reakcijah uvedemo na mesta človeških zaporedij pomnožena glodalska zaporedja, ki kodirajo za CDR. Tako humanizirane variabilne regije prenesemo v ekspresijski vektor in izrazimo v sesalskih celicah ali v *E. coli*.

Postopek je zamuden in drag, zato se že uveljavljajo kombinatorične knjižnice (mRNA iz celic B neimuniziranih donorjev) na osnovi predstavitve na fagih.



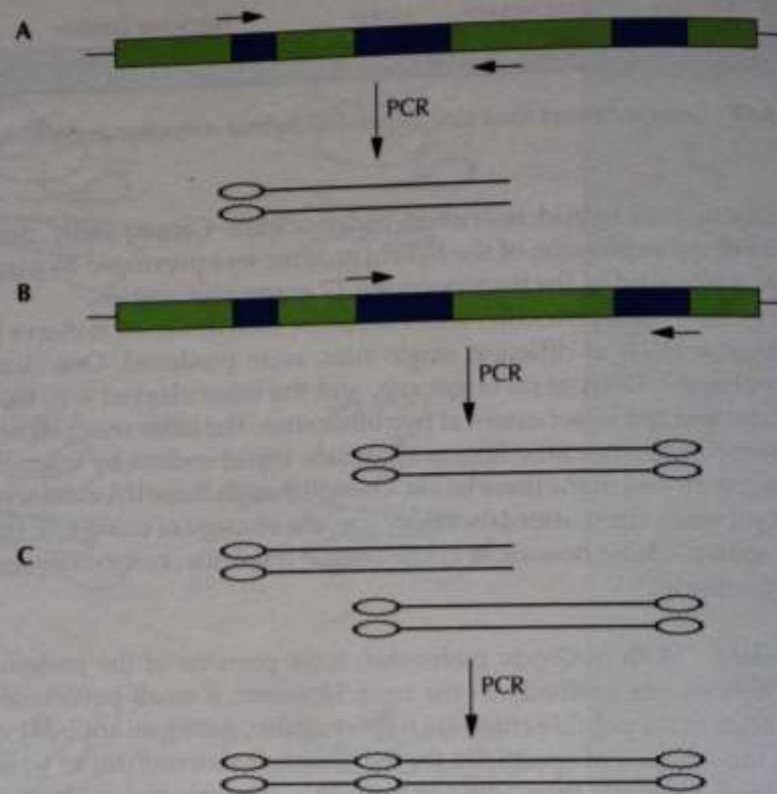


Figure 8.21 Schematic representation of the method used to introduce mutations into the three CDR genes of the variable region of a heavy antibody chain. The framework region sequences are in green, and the CDR sequences are in blue. The first PCR (A) introduces random mutations into the DNA encoding CDR1; the second PCR (B) introduces random mutations into the DNA encoding CDR2 and CDR3; the third PCR (C) combines the DNA that was amplified in A and B. The circled portion of the DNA indicates the place where random mutations were introduced.

Proizvodnja Ab v rastlinah

Prednosti proizvodnje v rastlinah:

- stabilna integracija genskega konstrukta v genom (bakterije: plazmidi, ki se lahko izgubijo);
- zorenje proteina in sestavljanje kvartarne strukture je podobno kot v živalskih celicah;
- možnost shranjevanja pri sobni temperaturi (proteini v semenih);
- cena (ocenjeni proizvodni stroški na gram Ab: 5000 USD v hibridomskih celicah, 1000 USD v bakterijskih celicah, 10-100 USD v rastlinah).

Proizvesti je mogoče tako IgG kot IgM, Fab, scFv → plantibodies' za diagnostično in terapevtsko uporabo, pa tudi kot obramba rastlin proti patogenom (npr. virusom).

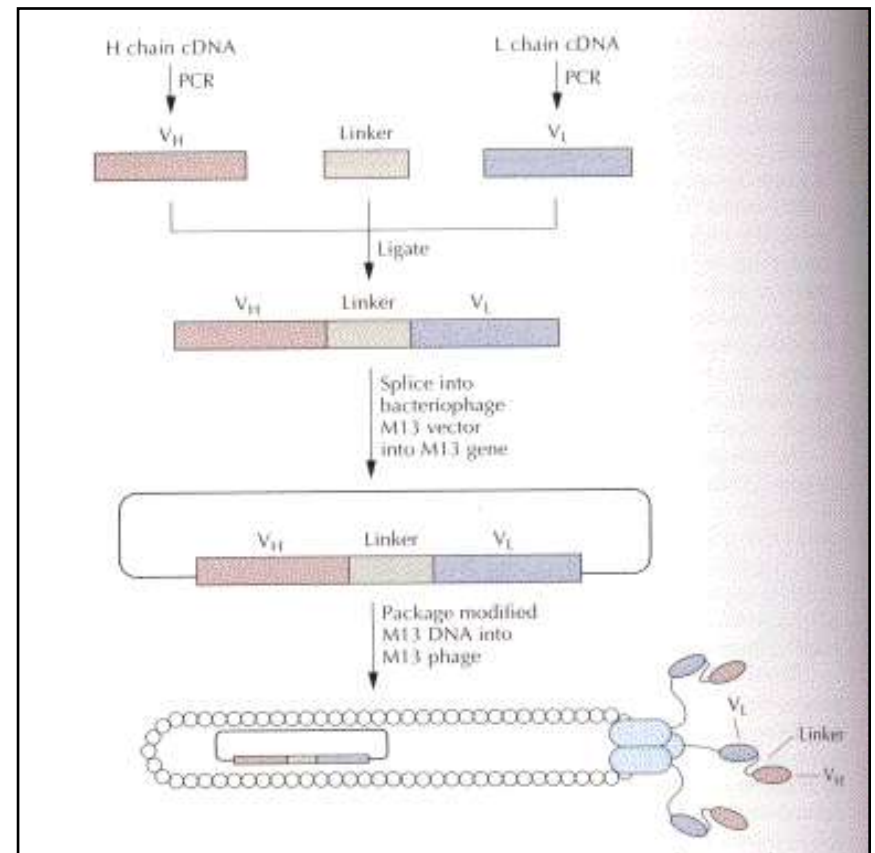
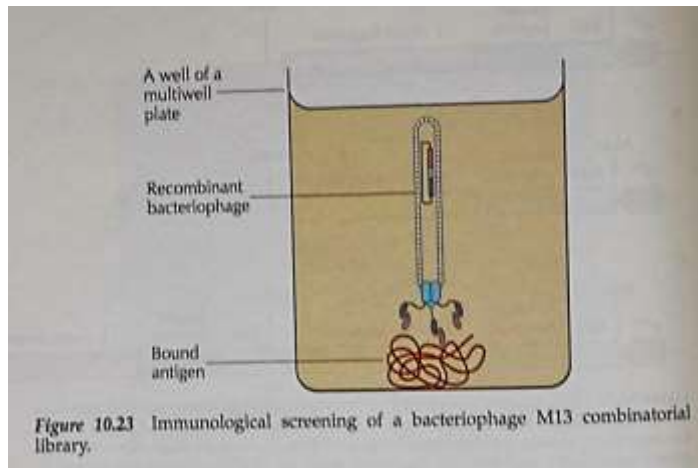
Nekaj primerov Ab, proizvedenih v rastlinah:

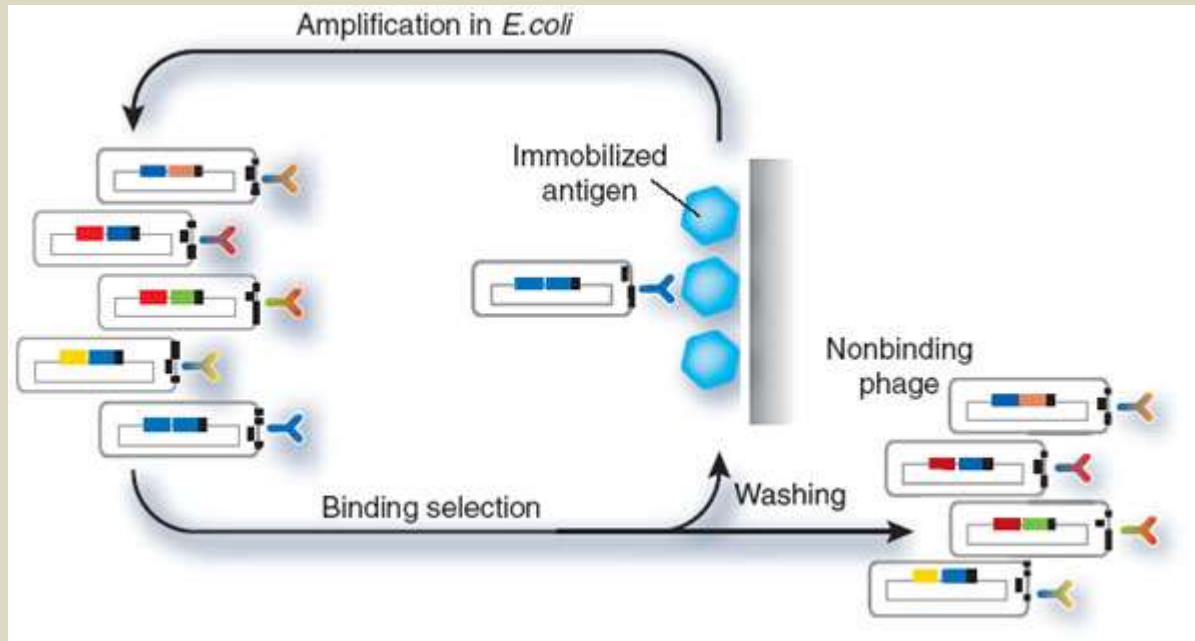
Host plant	Antigen
Tobacco	Phosphonate ester
Tobacco	(4-Hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl
Tobacco	Phytochrome
Tobacco	Artichoke mottled crinkle virus
Tobacco	Human creatine kinase
Tobacco	<i>Streptococcus mutans</i> cell surface antigen SA I/II
Tobacco	Fungal cutinase
Tobacco	Oxazolone
Tobacco	Abscisic acid
Tobacco	Cell surface protein from mouse B-cell lymphoma
Tobacco	Human carcinoembryonic antigen
Tobacco	Tobacco mosaic virus
Tobacco	Gibberellin
Tobacco	Beet necrotic yellow vein virus coat protein
Tobacco	<i>Stolbar phytoplasma</i> membrane protein
Tobacco	Root rot nematode surface glycoprotein
Petunia	Dihydrofolate reductase
Soybean	Herpes simplex virus
Pea	Abscisic acid
Pea	Human cancer cell surface antigen

Protitelesa na površini fagov

Za pripravo večjih količin protiteles fagi λ niso primerni, saj se fagi lizirajo celice, ki jih okužijo. Uporabimo raje nitaste fage (M13 ali fd) in fragmente protiteles izrazimo na površini. Testiramo lahko z ELISA, identificiramo klon z najmočnejšo vezavo, nato pa DNA prenesemo v ekspresijski vektor in izrazimo v večjih količinah.

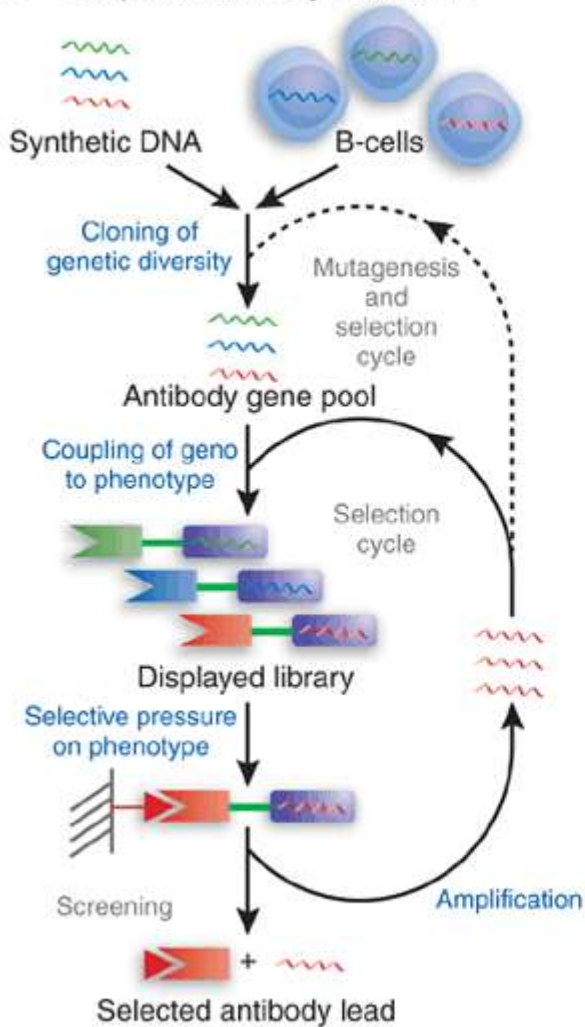
Postopek deluje s Fv, pa tudi scFv (V_L -linker- V_H – skupaj 25 kDa).



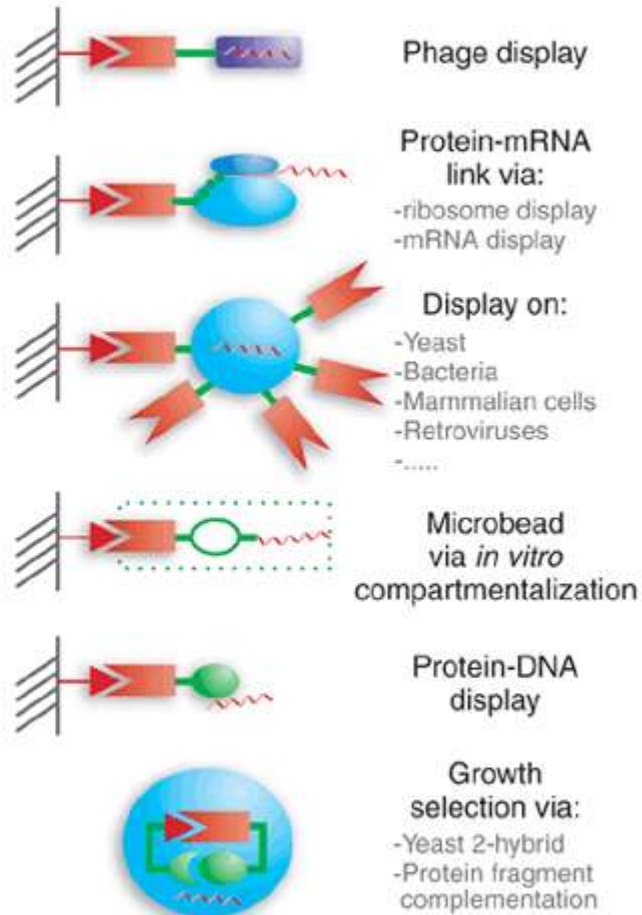


Nature Chemical Biology 4, 326 - 329 (2008)

a Steps in antibody selection



b Selection platforms



Katja Riis

Preurejanje CDR za pripravo obsežnih kombinatoričnih knjižnic scFv: mRNA izoliramo iz več različnih tkiv, kjer sicer poteka sinteza Ab, neimuniziranih posameznikov.

Pomnožimo posamezne CDR in produkte kombiniramo s segmenti, ki zapisujejo za preostale dele scFv. Dobimo lahko 2×10^9 različnih scFv.

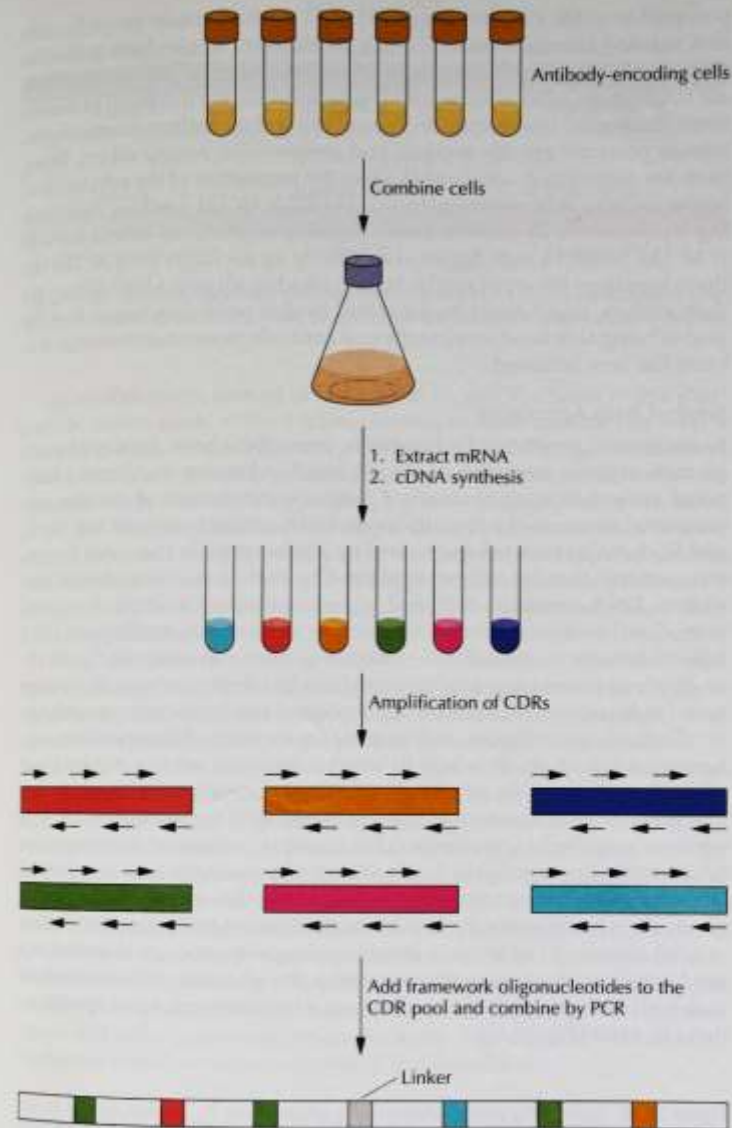
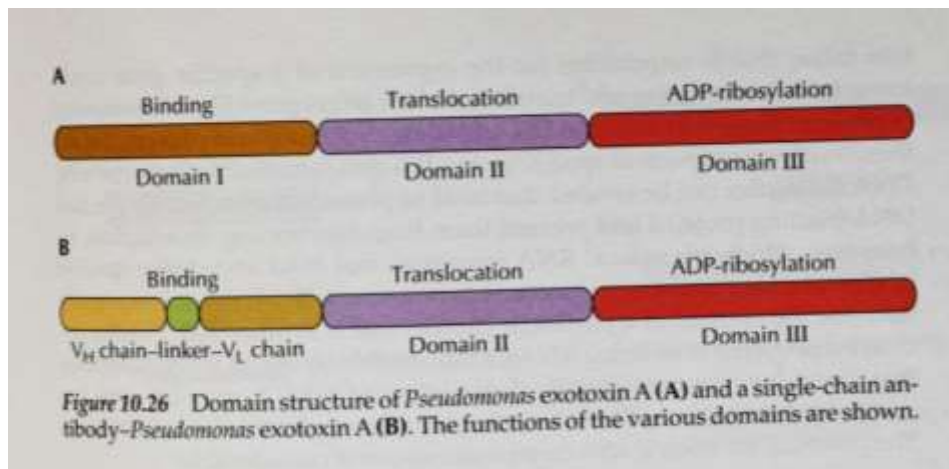
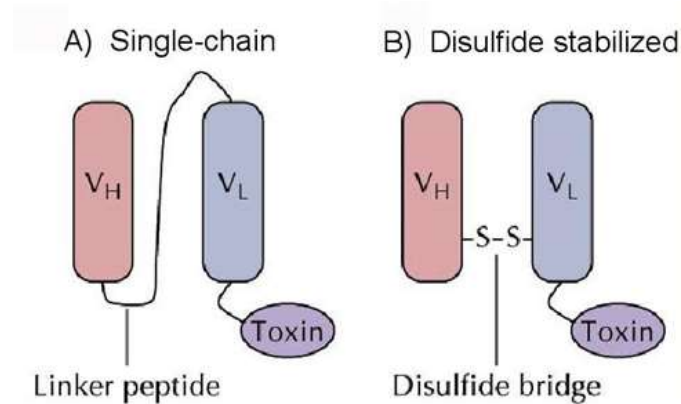
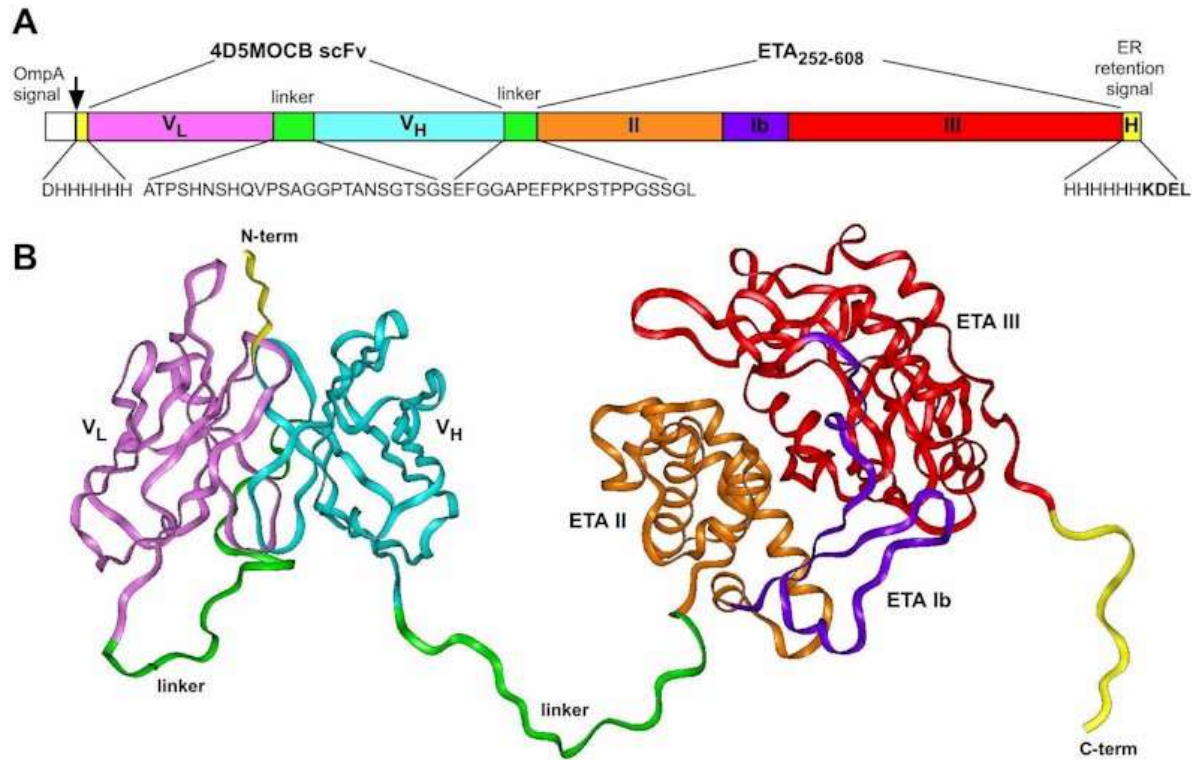


Figure 10.24 Construction of a large library of single-chain antibodies. B cells from several nonimmunized individuals were collected and pooled; the mRNA was isolated and used to program the synthesis of cDNA, oligonucleotide primers containing DNA sequences that included small portions of the framework region sequence were added to the cDNA preparation, and all six CDRs were amplified separately by PCR. The amplified CDRs from all six PCRs were mixed together with oligonucleotides encoding the framework regions and the linker, and genes encoding the variable L and H domains were synthesized by overlap extension PCR. One of the many possible single-chain antibodies that were synthesized is shown.

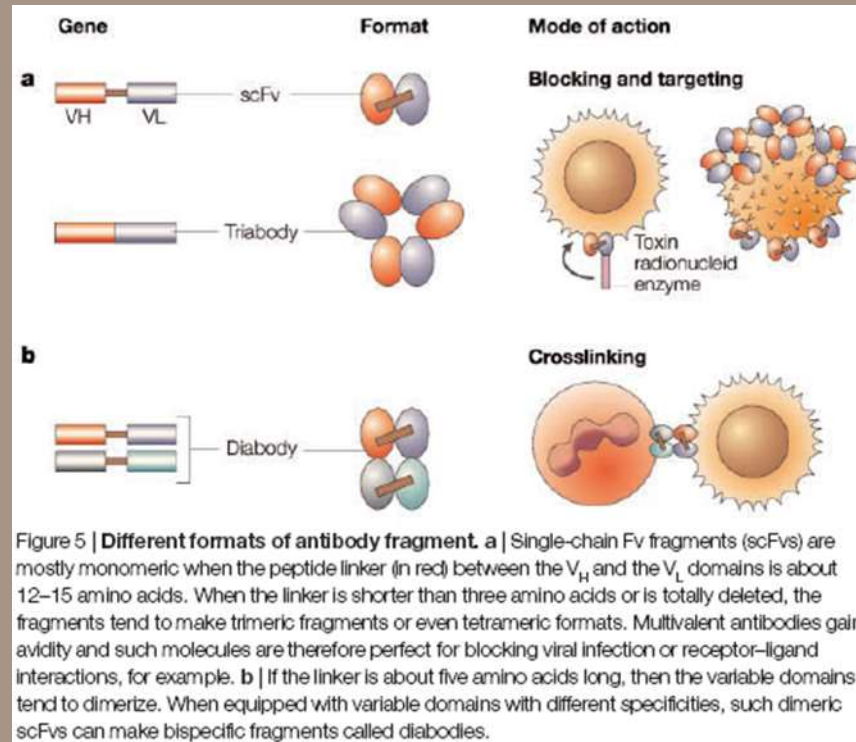
Na protitelesa lahko vežemo dodatne efektorske proteine, npr. toksin. Če sta bili verigi VL in VH povezani preko S-S, je bil takšen imunotoksin nekajkrat bolj stabilen od enoverižne oblike. Kot toksin najpogosteje uporabljajo eksotoksin A iz bakterije *Pseudomonas* (66 kDa, 3 domene) a tudi diftetijatoksin ali ricin.





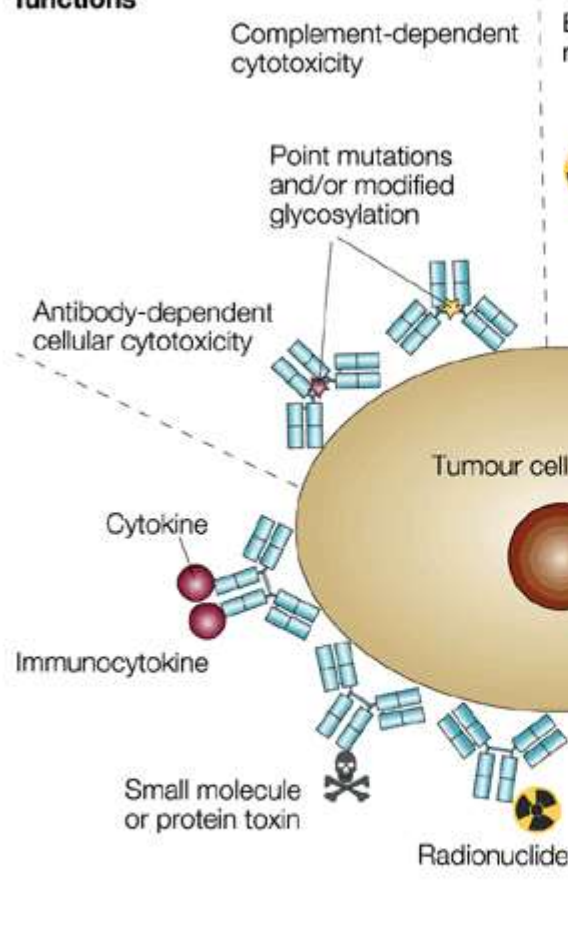
Imunotoksin proti rakavim celicam:

Na scFv, ki je usmerjen proti celicam karcinoma glave in vratu so vezali fragment eksotoksina A (ETA) iz bakterije *Pseudomonas*.



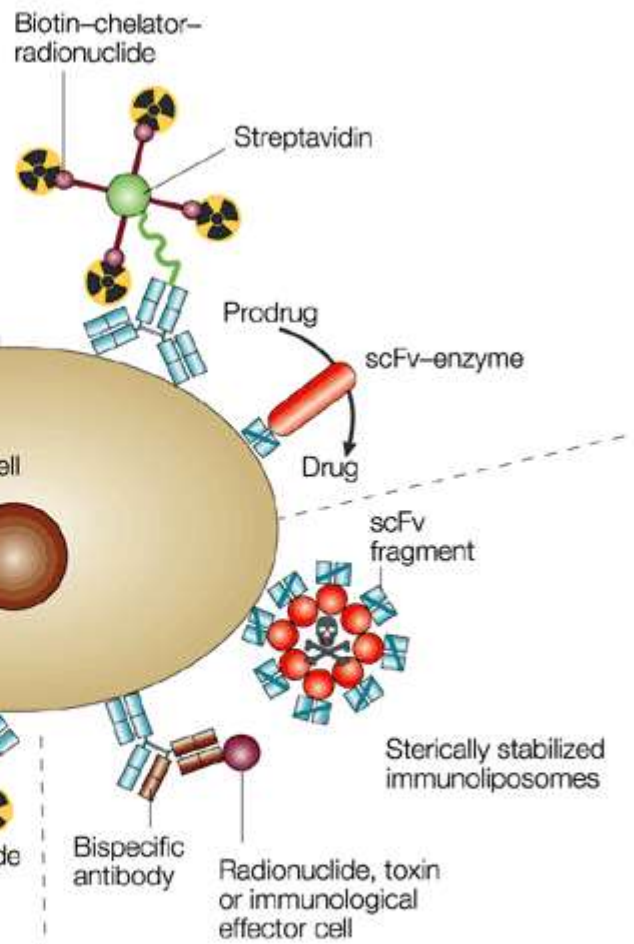
Nature Reviews Drug Discovery 2, 52–62 (2003)

a Enhancing effector functions



b Direct arming

d Pre-targeting



c Indirect arming

recombinant antibodies

drug	main indication	incidences in D	applicant	first approval in EU/D
Abciximab (ReoPro®)	anti coagulant for treatment of myocard infarcts	130,000	Centocor Europe B.V.	05/1995
Votumumab (Humaspect®)	detection of colon carcinomas	23,000 men and 28,800 women per year (RKI, 1995) 3,175 million men and 3,10 million women worldwide (WHO 1997)	Organon Teknika	11/1996
Rituximab (Mabthera®)	treatment of CD20-positive B-cell lymphomas	140,000 (in Europe)	Roche	1998
Basiliximab (Simulect®)	prevention of transplant rejection (kidney transplantation)	2,128 kidney transplantations in 1995	Novartis	10/1998
Daclizumab (Zenapax®)	prevention of transplant rejection (kidney transplantation)	2,128 kidney transplantations in 1995	Roche Registration Ltd., UK	02/1999
Palivizumab (humanised IgG)	monoclonal antibody against Respiratory Syncytial Virus (RSV) subtypes A and B	n.a.	Abbott Laboratories Ltd., UK	05/1999
Infliximab (Remicade®)	anti- TNF-alpha- antibody for treatment of immune and inflammatory diseases	prevalence 1% of the population	Centocor (marketed by Schering-Plough)	08/1999
Trastuzumab (anti-HER2-antibody; Herceptin®)	breast cancer; HER2-receptor found with 30% of all cases	47,000 new cases; 19,000 deaths due to breast cancer	Roche	09/2000
Alemtuzumab (Campath®)	anti-CD52-antibody for therapy of chronic lymphocytic leukemia (CLL) when alkylating cytostatics fail	9,900 new leukemias	Millenium & Illex UK Ltd.	03/2001
Adalimumab (Humira®)	anti-TNF-alpha- antibody for therapy of rheumatoid arthritis	prevalence 1% of the population	Abbott	03/2003
Cetuximab (Erbix®)	chimeric IgG antibody against epidermal growth factor receptor (EGFR) for treatment of colon carcinoma	n.a.	ImClone, Merck KGaA	02/2004

končnica zdravila	kategorija
~ksimab	himerno protitelo
~umab	človeško protitelo
~zumab	humanizirano protitelo
~ra	antagonist receptorja
~cept	fuzijski protein

npr. biološka zdravila proti artritisu:
infliksimab, kanakinumab, tocilizumab, anakinra, etanercept

Trastuzumab

Herceptin – prvo humanizirano mAb za zdravljenje raka dojke

Pri 25-30 % žensk z agresivnim metastatskim rakom dojke se prekomerno izraža HER2, receptor 2 za epidermalni rastni faktor. Če se res, ugotovijo z imunohistokemijskim testom.

Razvoj zdravila je potekal v podjetju Genentech. Najprej so pridobili mišje mAb z visoko afiniteto proti HER2 in ga humanizirali. Na človeškem ogrodju so mišji CDR-ji. Proizvodnja poteka v celicah CHO v suspenzijski kulturi.

Protitelo je glikozilirano zelo podobno kot bi bilo v človeških celicah in je kljub humanizaciji ohranilo visoko afiniteto vezave ($K_d=5 \times 10^{-9}$ M) ter specifičnost.

Klinični testi so potekali na >800 pacientkah. Praviloma je Herceptin je sprožil and Ab odvisno citotoksičnost in inhibiral delitev celic, ki prekomerno izražajo EGF. Pri pacientkah z metastazami je bil najbolj učinkovit v kombinaciji s kemoterapijo.

Zdravilo pakirajo v vakuumu in prodajajo kot rumenkast prah v enotah po 440 mg. V bolnišnici ga raztopijo in bolnicam dozirajo i.v. v obdobju 30 min. Nekatere pacientke so kot stranski učinek imele težave s srcem, zato je potrebno natančno spremljanje delovanje srca, predvsem pri starejših ali tistih, ki so imeli težave že prej.

Removab, prvo odobreno bispecifično protitelo

