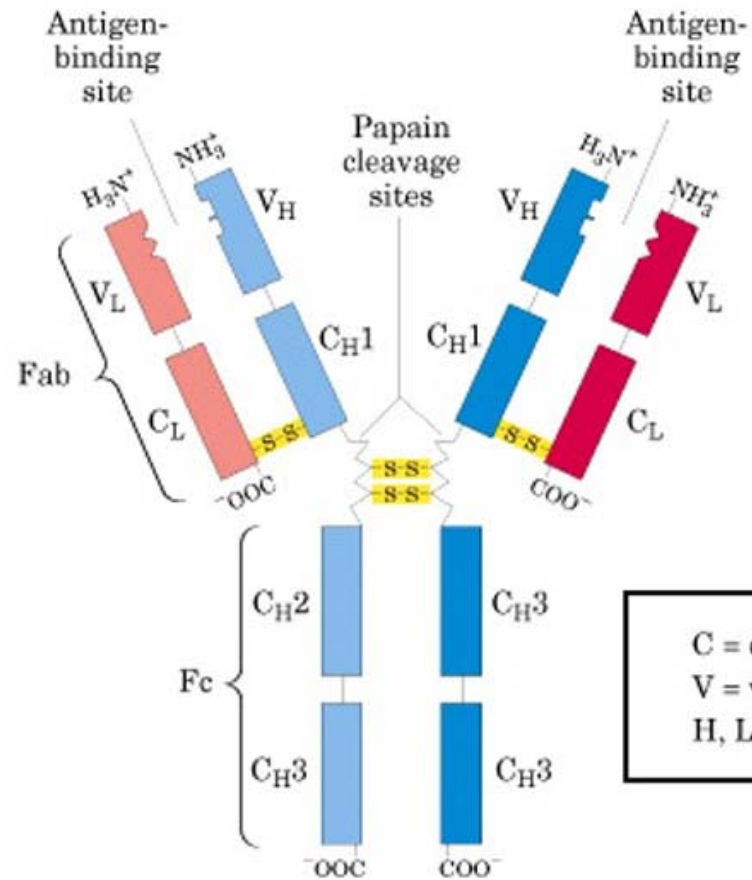


# UPORABA MONOKLONSKIH PROTITELES-Farmakoterapija



# PROTITELESA



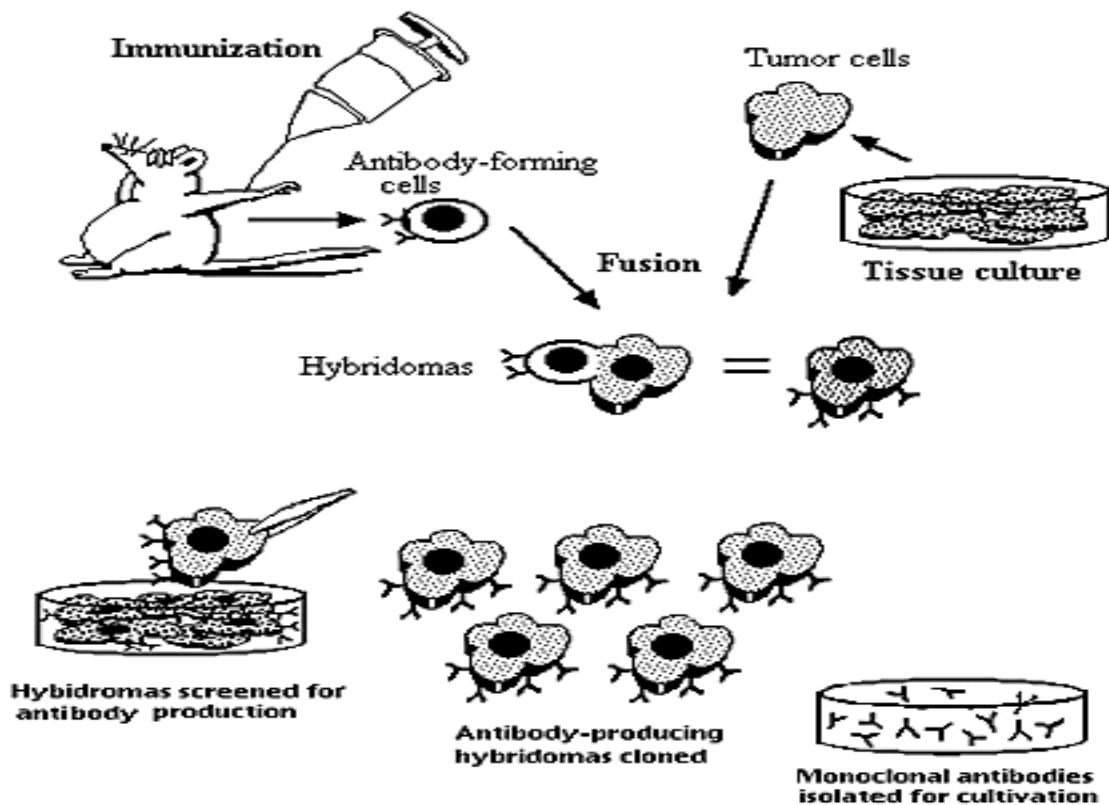
- 5 izotipov: IgA, IgG, IgE, IgD, IgM
- fragmenti: Fc, Fv, scFv, F(ab)<sub>2</sub>
- CDR regije
- monoklonska/poliklonska
- končnica mab, omab, ximab, zumab



# *POSTOPEK IZDELAVE MONOKLONSKIH PROTITELES*

- PRIPRAVA MIŠJIH PROTITELES
- REKOMBINANTNE OBLIKE MONOKLONSKIH PROTITELES  
(HIMERNA IN HUMANIZIRANA PROTITELESA, scFv, Fv, Fab)
- PRIPRAVA PROTITELES S POMOČJO FAGNEGA PRIKAZ

# PRIPRAVA MIŠJIH MONOKLONSKIH PROTITELES



1. priprava antigena
2. imunizacija
3. fuzija
4. izolacija
5. kultiviranje

## Monoclonal Antibody Production

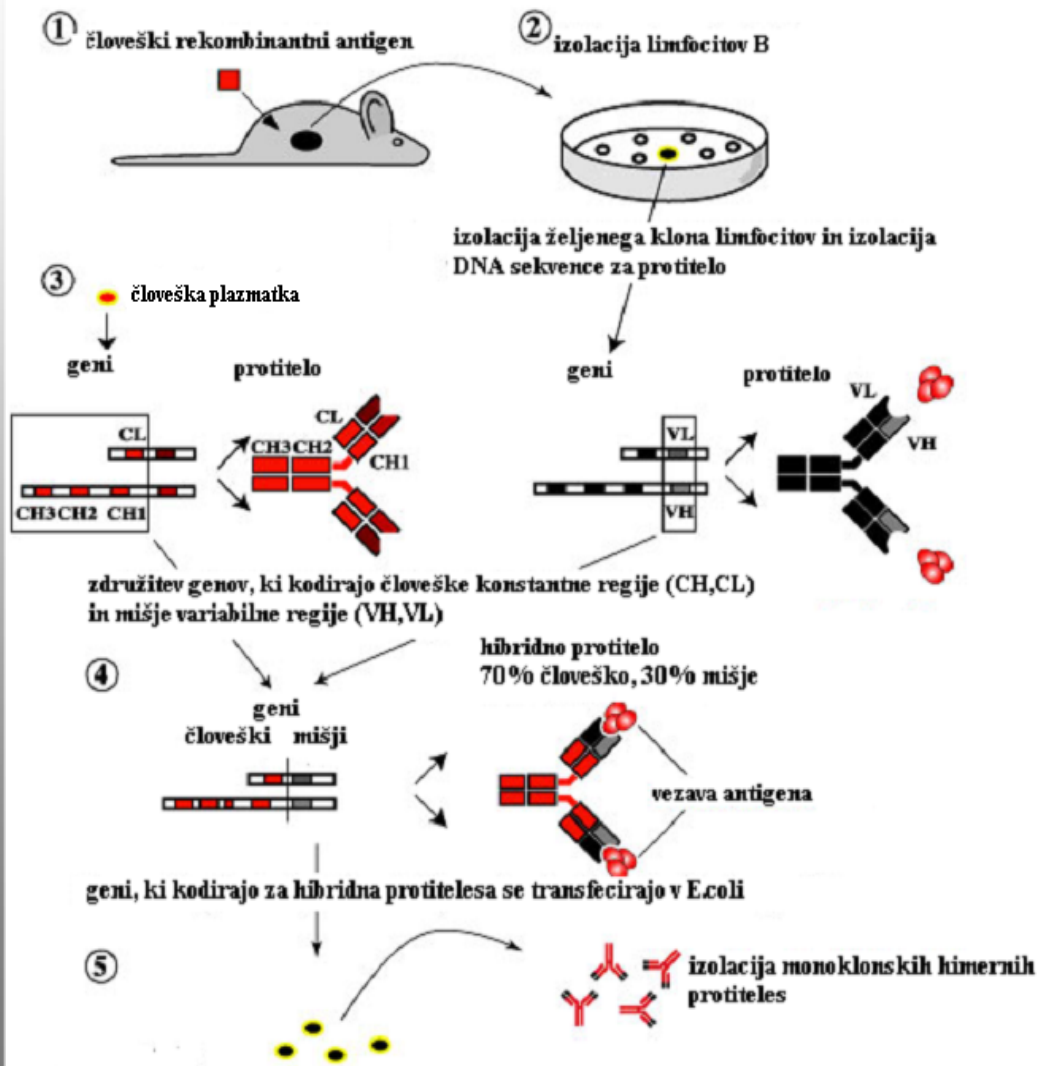
# HIMERNA IN HUMANIZIRANA PROTITELESA

Himerna protitelesa:

60-70% človeška

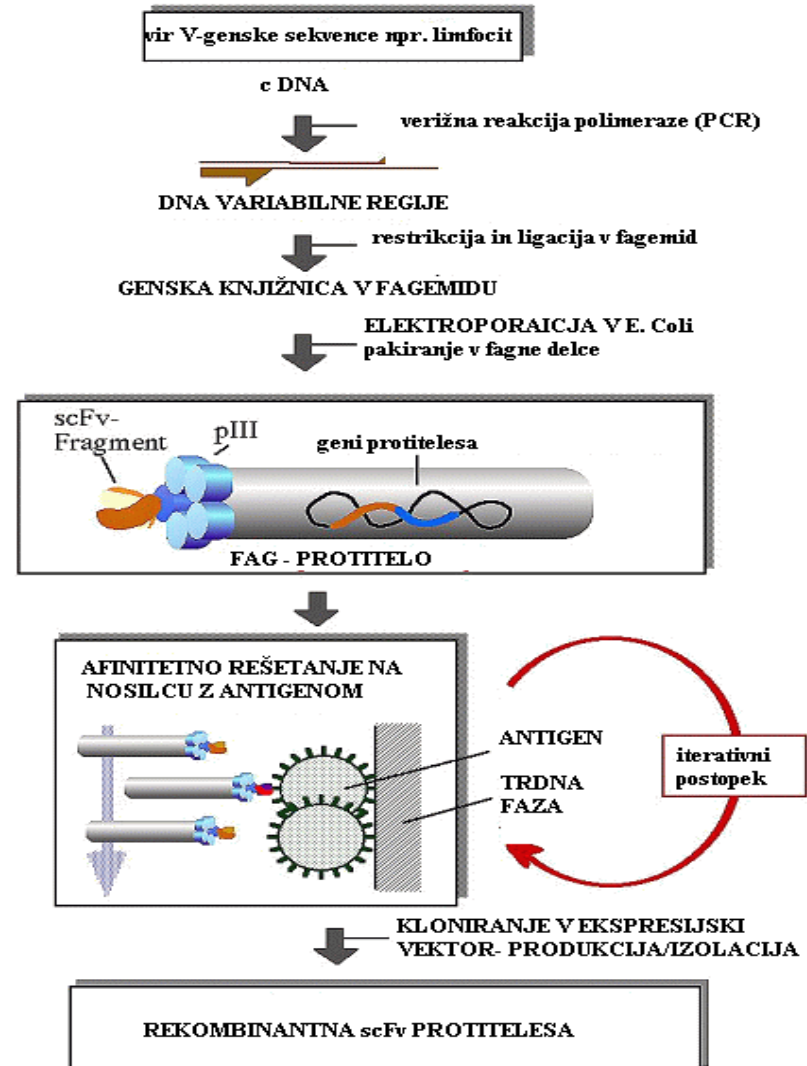
Humanizirana protitelesa:

90-95% človeška



# PRIPRAVA PROTITELES S POMOČJO FAGNEGA PRIKAZA

imunizacija in izolacija limfocitov -  
izolacija mRNA, reverzna transkripcija v cDNA -  
pomnoževanje s PCR -  
ligacija z vektorjem -  
transformacija *E. coli* z vektorjem, ki nosi DNA imunoglobulina, ki je nastal po imunizaciji -  
superinfekcija s pomožnim fagom, da pride do izločanja fagov -  
obogatitev fagov, ki se specifično vežejo iz velikega ozadja približno  $10^9$  klonov -  
kloniranje specifično obogatene populacije iz *E. coli* -  
preizkušanje vezave protiteles z ELISA ali prenosom po Westernu -  
ponovno kloniranje in ekspresija scFv protiteles v *E. coli*





# OMEJITVE IN STRANSKI UČINKI ZDRAVLJENJA

- Intravenska aplikacija zaradi proteinske narave protiteles
- Počasnejša distribucija, zmanjšana sposobnost prehoda v tumorsko tkivo
- Imunogenost
- Prisotnost antigenov tudi na normalnem tkivu, navzkrižna reaktivnost protiteles z antigeni normalnih celic



# LASTNOSTI IDEALNEGA PRIPRAVKA S PROTITELESI

- izkazuje monospecifičnost do tarčnega antigena
- ne kaže navzkrižne reaktivnosti do drugih vezanih ali topnih antigenov
- sproži hiter in močan imunski odziv
- sterilen in apirogen, brez neželenih proteinov, DNA, mikroorganizmov in endotoksinov
- ne povzroči nastanka protiteles proti terapevtskim protitelesom
- prosto, nevezano protitelo ne povzroči aktivacije komplementa po klasični ali alternativni poti
- se ponovljivo pridobiva iz stabilnih celičnih klonov





# MEHANIZEM DELOVANJA MONOKLONSKIH PROTITELES

- **Direktna inhibicija rasti**
  - Blokada receptorjev za rastne faktorje in mitogene citokine
  - Protitelesa proti Fas, APO-1, integrinom inducirajo apoptozo
- **Citotoksičnost povzročena s komplementom**
  - Proteolitična kaskada komponent komplementa-nastanek MAC
- **S protitelesi povzročena celična citotoksičnost**
  - Vezava celic z receptorji za Fc del na vezana protitelesa-fagocitoza ali liza tumorskih celic

Leto odobritve	Monoklonsko protitelo	Tarča zdravila	Vrsta	Indikacije
1986	Muronomab (Orthoclone OKT3®)	CD3 na membrani limfocitov T	mišje IgG2a	zavrnitev presajenih organov
1994	Abciximab (ReoPro®)	receptor GP IIb/IIIa za strjevanje krvi na membrani trombocitov	himerno Fab	strjevanje krvi po operaciji srca
1995 Nemčija	Edrecolomab (Panorex®)	Ep-CAM (17-1A)	himerno IgG1	rak debelega črevesa in danke
1997	Daclizumab (Zenepax®)	receptor za IL-2 na aktiviranih limfocitih T (CD25)	humanizirano IgG1	zavrnitev presajenih ledvic
1997	Rituximab (Rituxan®)	CD20 na membrani limfocitov B	himerno IgG1	ne-Hodgkinov limfom
1998	Basiliximab (Simulect®)	receptor za IL-2 na aktiviranih limfocitih T (CD25)	himerno IgG1	zavrnitev presajenih ledvic
1998	Palivizumab (Synagis®)	protein F RSV	humanizirano IgG1	zaščita pred okužbo z RSV
1998	Infliximab (Remicade®)	TNF	himerno IgG1	revmatoidni artritis, Chronova bolezen
1998	Trastuzumab (Herceptin®)	receptor za HER2	humanizirano IgG1	mestazirajoči rak dojke
2000	Gemtuzumab (Mylotarg®)	CD33 na levkemijskih celicah	humanizirano IgG4-toksin konjugat	akutna mieloidna levkemija
2001	Alemtuzumab (MabCampath®)	CD52 na limfocitih T in B	humanizirano IgG1	kronična limfocitna levkemija
2002	<sup>90</sup> Y-ibritumomab (Zevalin®)	CD20 na membrani limfocitov B	mišje IgG1-radionuklid konjugat	ne-Hodgkinov limfom
2002	Adilimumab (Humira®)	TNF	človeško IgG1	revmatoidni artritis
2003	Omalizumab (Xolair®)	IgE	humanizirano IgG1	astma
2003	<sup>131</sup> I-tositumimab (Bexxar®)	CD20 na membrani limfocitov B	mišje IgG1-radionuklid konjugat	ne-Hodgkinov limfom
2003	Efalizumab (Raptiva®)	CD11a	humanizirano IgG1	psoriza
2004	Bevacizumab (Avastin®)	VEGFR	humanizirano IgG1	rak debelega črevesa in danke
2004	Cetuximab (Erbix®)	EGFR	himerno IgG1	rak debelega črevesa in danke



## *MYLOTARG™ (Gemtuzumab ozogamicin)*

- Rekombinantno človeško protitelo IgG4 in citotoksični protitumorski antibiotik calicheamicin
- Zdravljenje CD33+ akutne mieloične levkemije
- CD33: od sialične kisline odvisen vezavni protein na površini levkemičnih mieloblastov in nezrelih celic mielomonocitne vrste
- Internalizacija kompleksa antigen-protitelo in sprostitvev calicheamicina v lizosomih, vezava v mali žleb DNA in prekinitev DNA ter smrt celice
- 50% protiteles povezanih preko bifunkcionalnega linkerja s 4-6 molekulami calicheamicina, 50% protiteles je prostih



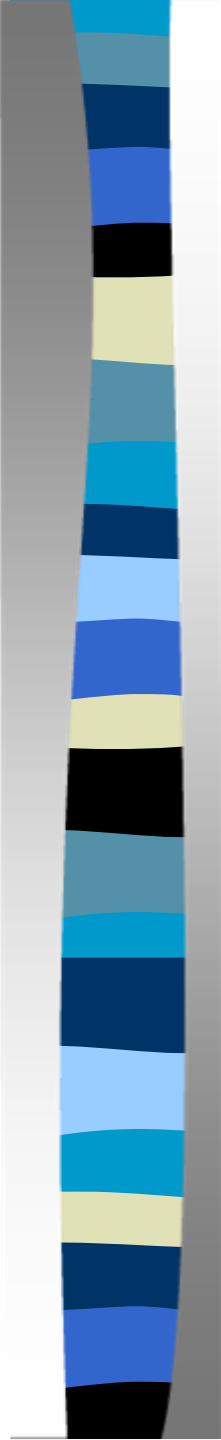
## *CAMPATH<sup>®</sup> (Alemtuzumab)*

- Rekombinantno človeško monoklonsko protitelo IgG1 anti-CD52
- CD52: normalni in maligni limfociti T in B, monociti, makrofagi in celice moškega reprodukativnega sistema
- Zdravljenje B-celične kronične limfocitne levkemije (B-CLL), pri bolnikih, ki se zdravijo z alkilanti in ne odzivajo na fludarabin
- Sproži s protitelesi povzročeno citotoksičnost ter odstranitev malignih celic iz krvi kostnega mozga in ostalih organov
- Signifikantna vezava tudi v koži in reprodukativnem traktu
- Oportunistične infekcije, infuzijske reakcije, hematološka toksičnost



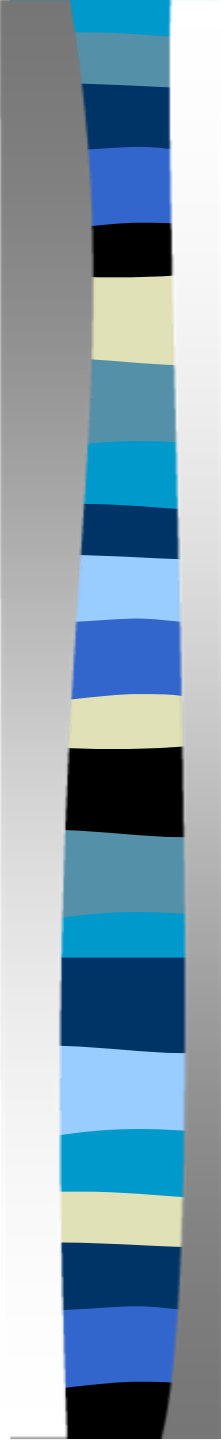
## *PANOREX<sup>®</sup> (Edrecolomab)*

- Mišje monoklonsko protitelo proti antigenu CO 17-1A na površini epiteljskih celic
- Adjuvantna terapija kolorektalnega karcinoma v stadiju Dukes'C
- CO 17-1A uvrščamo med adhezijske molekule EpCAM, izražen na vseh epiteljskih celicah debelega črevesa, vendar v večjih količinah ter v prosti obliki na rakavih celicah
- Sproži se s protitelesi posredovana celična citotoksičnost predvsem mononuklearnega fagocitnega sistema, ki jo lahko povečamo z imunomodulatorji IL-2, GM-CSF, IFN- $\gamma$



# *HERCEPTIN<sup>®</sup> (Trastuzumab)*

- Humanizirano monoklonsko protitelo IgG1
- Zdravljenje metastaznega raka dojke, kjer je povečana ekspresija HER2 (kot monoterapija ali v kombinaciji s paklitakselom)
- HER2- receptor za EGF in ga kodira gen HER2/neu, HER2/c-erb-B2, katerega ekspresija je povečana v 20-30% primarnih rekov na dojki
- Inhibira proliferacijo celic, s prekomerno ekspresijo HER2 ter sproži od protiteles posredovano citotoksičnost
- Kardiotoksičnost, infuzijski simptomi, preobčutljivostne reakcije, pulmonalne motnje
- Se izloča z mlekom in kontraindiciran v času dojenja



## *RITUXAN<sup>®</sup> (Rituximab)*

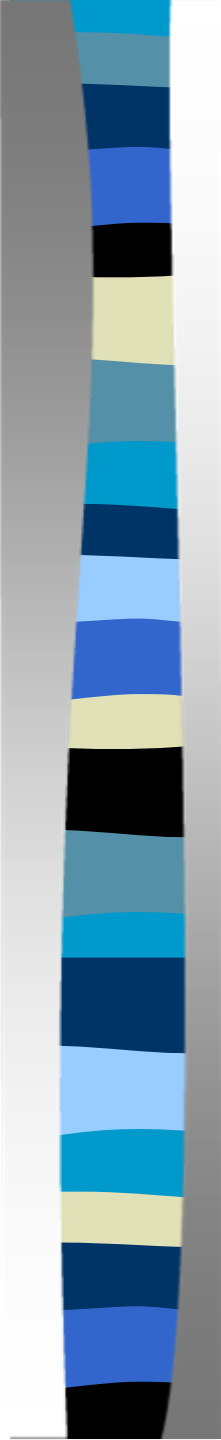
- Himerno monoklonsko protitelo IgG1 anti-CD20 na površini limfocitov B
- Terapija ne-Hodgkinovega limfoma limfocitov B CD20+
- CD20- hidrofoben transmembranski protein na zrelih limfocitih B, pre-B celicah in sodeluje pri aktivaciji celičnega ciklusa in diferenciacije
- Sproži od komplemента odvisno celično citotoksičnost ter tudi od protiteles posredovano celično citotoksičnost
- Infuzijske reakcije, sindrom lize tumorja (TLS), reakcije na koži in sluznicah, limfopenije



## *ZEVALIN<sup>®</sup> (Ibritumomab, IDEC-Y2B8)*

- Mišje monoklonsko protitelo IgG1 anti CD20, imunokonjugat s tioureo stabilno povezanega protitelesa in linker-kelatorja tiuxetana, ki zagotavlja visoko afiniteto, konformacijsko restrikcijo kelacijskega mesta za  $^{111}\text{In}$  ali  $^{90}\text{Y}$
- Deluje enako kot Rituximab, hkrati pa beta sevalec  $^{90}\text{Y}$  inducira poškodbe celice s tvorbo prostih radikalov v tarčni in sosednjih celicah
- Aplicira se v 4 korakih:
  - i.v. infuzija  $\geq 4$  h rituximaba, 10 min infuzija  $^{111}\text{In}$ -ibritumomaba ter sledi rentgensko slikanje, po 7-9 dneh po prvi dozi rituximaba sledi ponovna i.v. infuzija  $\geq 4$  h rituximaba in 10 min infuzija  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomaba
- mielosupresija





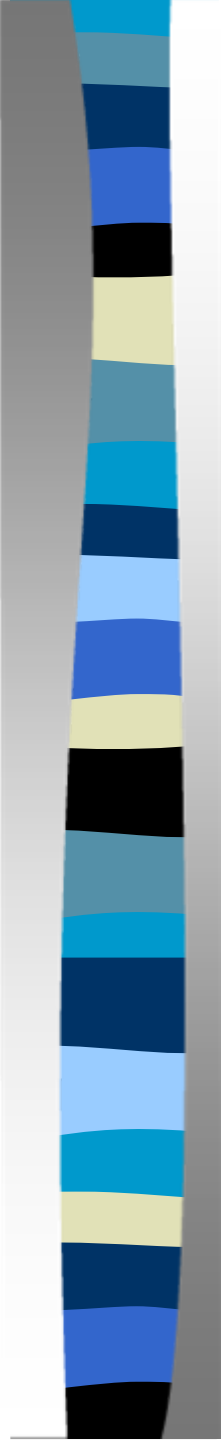
## *BEXXAR<sup>®</sup> (<sup>131</sup>I-tositumomab)*

- Z radioaktivnim jodom označeno monoklonsko protitelo IgG2a anti-CD20 na površini limfocitov B
- zdravljenje bolnikov s CD20+ folikularnim, ne-Hodgkinovim limfomom z ali brez transformacije, ki so odporni na rituximab
- Indukcija apoptoze, s komplementom posredovana citotoksičnost, s protitelesi posredovana celična citotoksičnost, poškodbe povzročene z ionizirajočim sevanjem



## *AVASTIN<sup>®</sup> (Bevacizumab, rhuMAb-VEGF)*

- Humanizirano rekombinantno protitelo IgG1 anti-VEGF
- V kombinaciji s kemoterapevtikom 5-fluorouracilom je indiciran za zdravljenje metastatskega raka debelega črevesa in danke
- Zmanjšana rast mikrovaskulature in inhibicija progresije metastatskih bolezni



## *ERBITUX<sup>®</sup> (Cetuximab)*

- Rekombinantno himerno monoklonsko protitelo anti –EGFR
- V kombinaciji z irinotekanom je indiciran za zdravljenje EGFR+ metastatskega raka debelega črevesa in danke bolnikov, ki so odporni na irinotekan
- Vezava na EGFR, HER1, c-ErbB-1 zavre vezavo EGF in TGF $\alpha$  ter povzroči inhibicijo celične rasti, indukcijo apoptoze ter zmanjšano nastajanje metaloproteinaz in VEGF

# PROTITELESA V KLINIČNIH FAZAH TESTIRANJA

FAZA 3			
Cea-Vac	Titan Pharmaceuticals, South San Francisco, CA	Anti-CEA mišje monoklonsko protitelo; protitumorsko cepivo	Rak debelega črevesa in danke, NSCLC, dojke, jeter
Epratuzumab (LymphoCide)	Immunomedics, Morris Plains, NJ	Himerno monoklonsko protitelo anti-CD22; protitumorsko delovanje; imunosupresant	Ne-Hodgkinov limfom
Mitumomab	ImClone Systems, New York, NY	Mišje monoklonsko protitelo	SCLC; melanom
Lintuzumab (Zamyl)	Protein Design Labs, Fremont, CA	Himerno monoklonsko protitelo	Akutna mielogena levkemija; mielodisplastični sindrom
MDX-210	Medarex, Princeton, NJ; Immuno-Designed Molecules, Havana, Cuba	Bispecifično himerno monoklonsko protitelo; anti-HER-2/neu-anti-Fc gamma RI	Rak jajčnikov, prostate, debelega črevesa in danke, rak dojke in ledvic
IGN-101	Igeneon, Vienna, Austria	Mišje monoklonsko protitelo	NSCLC, rak ledvic, jeter, debelega črevesa in danke, želodca in požiralnika

**F A Z A 2**

M D X -0 1 0	Medarex	Humanizirano anti-HER -2 monoclonalno protitelo; protitumorsko delovanje; imunostimulans	Rak prostate, melanom; infekcije
M A b , A M E	Applied Molecular Evolution, San Diego, CA	Himerno monoclonalno protitelo; protitumorsko delovanje; imaging agent; antirevmatik; ophthalmologic; cardiovascular	Sarkom, rak debelega črevesa in danke; revmatoidni artritis; psoriazni artritis
A B X -E G F	Abgenix, Fremont, CA	Človeško monoclonalno protitelo; antagonist EGFR; prodobljen s Xenomouse tehnologijo	NSCLC, rak ledvic, debelega črevesa in danke ter prostate
E M D 7 2 0 0 0	Merck KGaA, Darmstadt, Germany	Himerno monoclonalno protitelo	Rak želodca, maternice, NSCLC, rak glave in vratu, rak jajčnikov
A polizum ab	Protein Design Labs	Himerno monoclonalno protitelo	ne-Hodgkinov limfom; kronična limfocitna levkemija
L abetuzum ab	Immunomedics	Himerno monoclonalno protitelo; imunokonjugat; protitumorsko delovanje	Rak debelega črevesa in danke, rak dojke, SCLC, rak jajčnikov, pankreasa, ščitnice in jeter
ior-t1	Center of Molecular Immunology, Havana, Cuba	Mišje monoclonalno protitelo; protitumorsko delovanje; antipsoriatik; antiartritik	T-celični limfom; psoriaza; revmatoidni artritis
M D X -2 2 0	Immuno-Designed Molecules	Himerno monoclonalno protitelo; protitumorsko delovanje	Rak prostate, debelega črevesa in danke
M R A	Chugai Pharmaceutical, Tokyo, Japan	Himerno monoclonalno protitelo; antiartritik; protitumorsko delovanje; motnje in vnetja GIT	Revmatoidni artritis; mielom; Crohnova bolezen; Castlemanova bolezen
H -1 1 scFv	Viventia Biotech, Toronto, Canada	Humanizirano monoclonalno protitelo; protitumorsko delovanje	ne-Hodgkin limfom; melanom
O regovom ab	AltaRex, Waltham, MA	Mišje monoclonalno protitelo; imunokonjugat; protitumorsko delovanje	Rak jajčnikov
huJ591 M Ab, B Z L	Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA; BZL Biologics, Framingham, MA	Himerno monoclonalno protitelo; protitumorsko delovanje	Rak prostate in splošno
V isilizum ab	Protein Design Labs	Himerno monoclonalno protitelo; imunosupresant; protitumorsko delovanje; motnje in vnetja GIT	Zavrnitev presajenih organov, kostnega mozga; T-celični limfom; ulcerativni kolitis; mielodisplastični sindrom; sistemski lupus eritematozus
T riG em	Titan Pharmaceuticals	Mišje monoclonalno protitelo; protitumorsko delovanje	Melanom; NSCLC; rak možganov
T riA b	Titan Pharmaceuticals	Mišje monoclonalno protitelo; protitumorsko delovanje	Rak dojke; NSCLC; rak debelega črevesa in danke
R 3	Center of Molecular Immunology	Himerno monoclonalno protitelo; protitumorsko delovanje; sredstvo za slikanje; imunokonjugat	Rak glave in vratu; diagnoza raka
M T -2 0 1	Micromet, Munich, Germany	Humanized monoclonal antibody; anticancer immunologic	Rak prostate, debelega črevesa in danke, želodca, NSCLC
G -2 5 0,	Johnson & Johnson	Himerno monoclonalno	Rak ledvic

FAZA 1			
CDP-860	Celltech, Slough, England	Humanizirano monoklonsko protitelo anti-PDGF- $\beta$ ; protitumorsko delovanje; kardiovaskularno delovanje	Rak; restenoza
BrevaRex MAb	AltaRex	Mišje monoklonsko protitelo; protitumorsko delovanje	Mielom, rak dojke
AR54	AltaRex	Mišje monoklonsko protitelo; protitumorsko delovanje	Rak jajčnikov
IMC-1C11	ImClone Systems	Himerno monoklonsko protitelo; protitumorsko delovanje	Rak debelega črevesa in danke
GlioMAb-H	Viventia Biotech	Humanizirano monoklonsko protitelo; sredstvo za slikanje; protitumorsko delovanje	Diagnoza raka; rak možganov
ING-1	Xoma, Berkeley, CA	Himerno monoklonsko protitelo; protitumorsko delovanje	Rak dojke, pljuč (splošno), jajčnikov, prostate
Anti-LCG MAbs	eXegenics, Dallas, TX	Monoklonsko protitelo; protitumorsko delovanje; sredstvo za slikanje	Rak pljuč; diagnoza raka
MT-103	Micromet	Mišje monoklonsko protitelo; protitumorsko delovanje	B-celični limfom, non-Hodgkinov limfom, kronična mielogena levkemija; akutna mielogena levkemija
KSB-303	KS Biomedix, Guildford, England	Himerno monoklonsko protitelo; protitumorsko delovanje	Diagnoza raka; rak debelega črevesa in danke
Therex	Antisoma, London, England	Himerno monoklonsko protitelo; protitumorsko delovanje	Rak dojke
KW-2871	Kyowa Hakko, Tokyo, Japan	Himerno monoklonsko protitelo; protitumorsko delovanje	Melanom
Anti-HMI.24	Chugai	Himerno monoklonsko protitelo; protitumorsko delovanje	Mielom
Anti-PTHrP	Chugai	Himerno monoklonsko protitelo; protitumorsko delovanje; osteoporoza	Maligna hiperkalciemija; kostni rak
2C4 antibody	Genentech	Himerno monoklonsko protitelo	Rak dojke
SGN-30	Seattle Genetics, Seattle, WA	Monoklonsko protitelo; protitumorsko delovanje; terapija multiple skleroze; imunosupresant; imunokonjugat	Hodgkinov limfom
TRAIL-RI MAb, CAT	Cambridge Antibody Technology, Cambridge, England	Humanizirano monoklonsko protitelo in mimetik liganda TRAIL	Rak
Prostate cancer antibody	Biovation, Aberdeen, Scotland	Monoklonsko protitelo	Rak prostate
H22xKi-4	Medarex	Himerno monoklonsko protitelo	Hodgkinov limfom
ABX-MA1	Abgenix	Humanizirano monoklonsko protitelo; protitumorsko delovanje	Melanom
Imuteran	Nonindustrial source	Monoklonsko protitelo	Rak dojke in jajčnikov



# SMERNICE NADALJNEGA RAZVOJA

- izboljšanje učinkovitosti produkcije
  - *In vivo* produkcija in sistemska dostava terapevtskih protiteles z gensko spremenjenimi celicami
  - Uporaba človeških hibridomov (Karpas707H)
- kemična sklopitev protiteles in toksinov ali radionuklidov
- točkaste mutacije v Fc fragmentu, ki izboljšajo vezavo na Fc $\gamma$ RIII
- protitelo-citokin fuzijski proteini (imunocitokini)
- liposomske formulacije s pritrjenimi protitelesnimi fragmenti (imunoliposomi)
- ciljanje tumorske neovaskulature (endosialin in endoglin) in angiogenih rastnih faktorjev (VEGF) in receptorjev

# SMERNICE NADALJNEGA RAZVOJA

- uporaba konjugatov protitelo-encim za ciljano dostavo encimov do tumorskih mest, ki pretvarjajo predzdravila specifično v tumorskem tkivu v aktivne oblike učinkovin
- predhodno tarčno usmerjanje s pomočjo fuzijskega proteina Fv fragment-streptavidin
- bispecifična protitelesa

