

Małgorzata Kubczak

Małgorzata Rogalińska✉

Katedra Cytobiochemii Uniwersytet Łódzki,
Łódź

✉Katedra Cytobiochemii Uniwersytet Łódzki,
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; tel: (42)
635 44 89, e-mail: mrogalin@biol.uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 12 października 2016 r.
Artykuł zaakceptowano 11 listopada 2016 r.

Słowa kluczowe: przeciwciała monoklonalne,
antygen CD20, nanoprzeciwciała, terapia anty-
nowotworowa

Wykaz skrótów: ADCC (ang. *antibody dependent cell cytotoxicity*) – cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał; CDC (ang. *complement dependent cytotoxicity*) – cytotoksyczność zależna od układu dopełniacza; CDR (ang. *complementarity-determining region*) – rejon determinujący dopasowanie; dAbs (ang. *domain antibodies*) – przeciwciała domenowe; FDA (ang. *Food and Drug Administration*) – Agencja ds. Żywności i Leków; mAbs (ang. *monoclonal antibodies*) – przeciwciała monoklonalne; scFV (ang. *single-chain variable fragment*) – jednołańcuchowy rejon zmienny; VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu śródbłonnka naczyń; VHH (ang. *variable fragments of heavy chain antibodies*) – zmienne fragmenty ciężkich łańcuchów przeciwciał

STRESZCZENIE

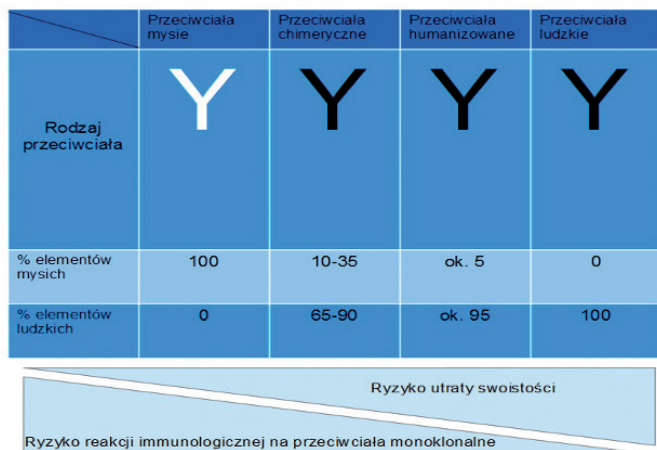
W latach 90 ubiegłego stulecia rozpoczęła się era terapii ukierunkowanych wykorzystujących głównie przeciwciała monoklonalne wytworzone w organizmach rodziny szczurowaty. Obecnie podczas terapii skutki uboczne stały się wyzwaniem w polepszeniu aktywności tych leków biologicznych. Pomysłem na ulepszenie działania przeciwciał monoklonalnych okazała się humanizacja przeciwciał, która prowadzi do polepszenia ich właściwości antynowotworowych jednocześnie obniżając ich skutki uboczne. Natomiast okazuje się, że u pacjentów wrażliwych na terapię z użyciem przeciwciał monoklonalnych mogą one także wpływać na zaburzenia immunologiczne, co może mieć wpływ na ludzkie zdrowie. Nowym pomysłem związanym z przeciwciałami monoklonalnymi było zaprojektowanie niewielkich cząsteczek zwanych nanoprzeciwciałami, które wykazują możliwość wnikania do komórki. Nanoprzeciwciała przenikające do komórki mogą łączyć się w jej wnętrzu z celami molekularnymi, a wnikając do jądra komórkowego mogą wpływać na różnice w ekspresji genów komórek nowotworowych. Przeprowadzone badania z użyciem nanoprzeciwciał wskazują, że bezpośrednie ukierunkowane ich działanie może przyczynić się do polepszenia efektywności leczenia antynowotworowego ludzi.

WPROWADZENIE

Historia wykorzystania surowic odpornościowych w terapii nowotworowej sięga XIX wieku, wówczas Hericourt i Richet podawali pacjentom z mięsakiem kości surowicę zwierząt immunizowanych komórkami nowotworowymi [1]. Pierwsza publikacja dotycząca otrzymywania przeciwciał powstała w 1973 roku. Jej autorzy opisali metodę hybryd mysich komórek i szpiczaka mnogiego z ludzkimi limfocytami B [2]. W 1975 roku innym badaczom Kohlerowi i Milsteinowi [3] udało się ostatecznie opracować technikę pozyskiwania przeciwciał monoklonalnych, za którą otrzymali w 1984 roku nagrodę Nobla. Aby uzyskać żądany rodzaj przeciwciał inkubowano mysie limfocyty z antygenem i otrzymywano komórki plazmatyczne. Następnie doprowadzano do fuzji aktywowanych komórek plazmatycznych z komórkami szpiczaka mnogiego myszy. Doprowadziło to do powstania hybryd, które produkowały przeciwciała monoklonalne. Powstałe chimeryczne komórki nabywały cechy komórek nowotworowych, dochodziło do nieograniczonych podziałów. Dzięki specyficznym warunkom hodowli udawało się uzyskać linię komórek hybrydowych bez innych zanieczyszczeń. Plazmocyty, które nie uległy fuzji umierały, ponieważ w pożywce brak było czynników wzrostu i cytokin niezbędnych do proliferacji komórek B. Aby eliminować komórki szpiczaka wybrano linię komórek z defektem metabolicznym. Polegał on na braku genu dla enzymu fosforybozylotransferazy hipokantynowo-guaninowej (HGPRT), który jest niezbędny w szlaku rezerwowym syntezy puryn. W obecności aminopteryny, inhibitora syntezy puryn komórek szpiczaka, które nie uległy fuzji ginęły [4].

BUDOWA PRZECIWCIAŁ

Przeciwciała monoklonalne swoją budową przypominają immunoglobuliny klasy IgG, przeciwciała te przypominają kształtem literę „Y” (Ryc. 1) i zbudowane są z 4 łańcuchów polipeptydowych, dwóch ciężkich oraz dwóch lekkich. Masa cząsteczkowa przeciwciał waha od 150 do 970 kDa [4]. Za połączenie obu łańcuchów ciężkich oraz łańcuchów ciężkich z lekkimi odpowiadają mostki disiarczkowe. Każdy łańcuch przeciwciał zawiera część stałą (C) i zmienną (V). Część zmienna odpowiada za wiązanie epitopu z paratopem umiejscowionym na przeciwciele. W strukturze immunoglobulin można wyróżnić fragmenty Fab (ang. *antigen binding fragment*) oraz Fc (ang. *fragment crystalline*). W skład fragmentu Fab wchodzić całe łańcuchy lekkie oraz związane mostkami disiarczkowymi fragmenty łańcuchów ciężkich. Część zmienna każdego z tych łańcuchów tworzona jest przez trzy regiony hiperzmiennie odpowiedzialne za wysoką specyficzność przeciwciała i jego wiązanie do antygeny oraz cztery przylegające



Rycina 1. Schemat przedstawiający proces humanizowania mysich przeciwciał monoklonalnych z uwzględnieniem prawdopodobieństwa utraty swoistości oraz wystąpienia reakcji immunologicznej na podane przeciwciało monoklonalne.

do nich regiony zřbrowe. Fragmenty Fc składają się z części stałej obu łańcuchów ciężkich; odpowiadają za aktywację układu dopełniacza oraz wiązanie z antygenami komórkowymi [5].

TERAPIA Z WYKORZYSTANIEM PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH

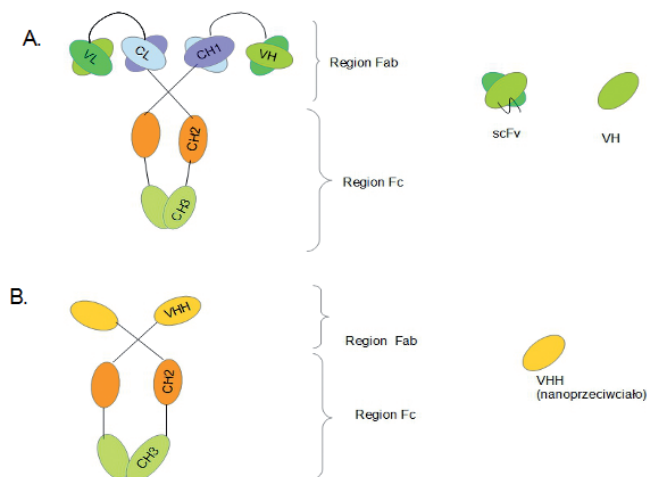
Sukces terapii z użyciem przeciwciał monoklonalnych polega głównie na tym, że wykazują one zdolność wiązania z wysoką specyficznością docelowego epitopu. Pierwsze doniesienia o działaniu terapii z użyciem przeciwciał pojawiły się w 1980 roku przy użyciu przeciwciał mysich, jednak ich stosowanie nie było w pełni efektywne. Powodem tego mogła być reakcja obronna ludzkiego układu immunologicznego na przeciwciała mysie. Rozwój inżynierii genetycznej pozwolił na konstruowanie przeciwciał chimerycznych oraz humanizowanych. Jednym ze sposobów na otrzymywanie tego typu przeciwciał jest zastąpienie DNA regionu stałego obu łańcuchów przeciwciała analogicznym DNA ludzkim. Nowo powstałe przeciwciało chimeryczne ma jedynie regiony zmienne pochodzenia obcogatunkowego, natomiast w 75% jest przeciwciałem humanizowanym. Innym rozwiązaniem jest modyfikacja genetyczna zastępująca elementy mysie przeciwciała (z wyłączeniem regionów hiperzmiennych) fragmentami ludzkich przeciwciał. Uzyskane w ten sposób przeciwciała w 95% są pochodzenia ludzkiego. Pozwala to minimalizować prawdopodobieństwo rozpoznania przeciwciał monoklonalnych jako obce (Ryc. 1). Ponadto udowodniono, że okres półtrwania przeciwciał chimerycznych i humanizowanych jest zbliżony do czasu półtrwania ludzkich IgG [6]. Naukowcy nie poprzestali na tych osiągnięciach. Obecnie projektuje się tzw. przeciwciała domenowe, które pozbawione są łańcuchów lekkich i zawierają jedynie fragmenty łańcuchów ciężkich z regionami hiperzmiennymi. Innym pomysłem na unowocześnienie terapii przeciwciałami jest konstruowanie przeciwciał klasy Fab. Nie zawierają one regionów Fc, a jedynie miejsce wiążące antygen. Badacze opracowują również metodę otrzymywania nanoprzeciwciał, czyli wyizolowanych z łańcuchów ciężkich regionów hiperzmiennych, które mogą być dodatkowo humanizowane [7].

Z uwagi na rozwój terapii ukierunkowanej celem działania leków stają się coraz częściej białka wewnątrzkomórkowe zaangażowane w przekazywanie sygnału, czynniki transkrypcyjne czy białka strukturalne. Rozwój biologii molekularnej umożliwił badaczom projektowanie nowej klasy przeciwciał, tzw. TransMabs, które mają zdolność do przenikania przez błonę komórkową. Było to niemożliwe w przypadku tradycyjnych przeciwciał ze względu na ich masę cząsteczkową. Standardowe metody dostarczania przeciwciał do wnętrza komórki polegały na mikroiniekcji i wprowadzaniu do komórki wektorów genowych kodujących białka przeciwciał, bądź transportu przeciwciał z wykorzystaniem liposomów. Wszystkie te metody mogą zaburzać strukturę i funkcję komórek zwiększając ich śmiertelność. Ponadto metody wprowadzania obcych genów do komórki są stosowane powszechnie w terapii genowej. W rozwiązaniu tego problemu pomogła obserwacja formowania autoprzeciwciał skierowanych w kierunku DNA oraz nukleoprotein. Autoprzeciwciała mogą przenikać przez błonę komórkową bez względu na jej hydrofobowość nie uszkadzając jej struktury. Badacze skupili się na opracowaniu metody, która umożliwiłaby połączenie przeciwciała penetrującego błonę komórkową z białkiem fuzyjnym zawierającym domenę błonową ułatwiającą wnikanie przeciwciała do wnętrza komórki [8].

NANOPRZECIWCIAŁA

Terapia z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych cieszy się niezmiennym powodzeniem od blisko 30 lat [9]. Obecnie FDA zatwierdziło 25 przeciwciał monoklonalnych do użytku w praktyce klinicznej, kolejne znajdują się w II lub III fazie badań klinicznych [10]. Przeciwciała znalazły zastosowanie jako leki w różnych chorobach, np. w nowotworach czy chorobach autoimmunologicznych. Obecnie badacze pracują nad uzyskaniem przeciwciał drugiej i trzeciej generacji. Niemal wszystkie przeciwciała monoklonalne zatwierdzone do użytku przez FDA są podobne do przeciwciał IgG o masie cząsteczkowej ok 150 kDa. Podstawowym problemem przy stosowaniu takich przeciwciał jest ich mała zdolność do penetracji tkanek, co może mieć znaczenie w leczeniu guzów litych. Innym utrudnieniem przy stosowaniu molekuł o takiej masie jest ich słabe powinowactwo lub jego całkowity brak do niektórych antygenów na powierzchni komórki, np. duże przeciwciała nie są w stanie wiązać się z glikoproteiną otoczki wirusa HIV. Aby zmniejszać rozmiary przeciwciał monoklonalnych zaczęto projektować rekombinowane regiony części Fab (ok 57 kDa). Są to zwykle jedno łańcuchowe fragmenty Fv (scFv) stanowiące regiony V_H oraz V_L połączone krótkim polipeptydem (ok. 27 kDa) lub przeciwciała złożone jedynie z łańcuchów ciężkich lub lekkich, tzw. przeciwciała domenowe [9] (Ryc. 2).

Przeciwciała domenowe (dAbs, nanoprzeciwciała), to molekuły o masie od 11 do 15 kDa. Powstały w laboratorium Grega Wintera (Cambridge, UK) pod koniec lat 80. Były to mysie regiony V_H , które wykazywały powinowactwo do lizozymu. Już wcześniej dowiedziono, że łańcuchy ciężkie i lekkie mogą pojawiać się we krwi obwodowej osobno, a nie jako integralna część przeciwciała. Dzieje się tak w szpiczaku mnogim i chorobie łańcuchów ciężkich. Ssaki z



Rycina 2. Różnice w budowie przeciwciał klasy IgG ludzkich (A) i wielbłądzych (B). Schemat przedstawiający przeciwciała monoklonałnej nowej generacji.

rodziny wielbłądowatych produkują przeciwciała, które pozbawione są łańcuchów lekkich oraz domeny CH1 [11]. W budowie i strukturze przeciwciał wielbłądowatych można zauważyć pewne różnice, które mają wpływ na ich funkcje (Ryc. 2). Domena przeciwciała VHH przyjmuje strukturę beta kartki, dzięki której trzy regiony hiper zmienne położone są w jednym końcu. Sugeruje się, że taka konformacja ułatwia rozpoznawanie i wiązanie antygeny. Badania kryształograficzne ujawniły również zmiany w sekwencji reszt aminokwasowych. Pętle CDR1 i CDR3 są dłuższe niż w klasycznych przeciwciałach, dodatkowo, region CDR1 jest bardziej zasobny w reszty cysteiny. W obrębie tego regionu tworzone są mostki disiarczkowe niezbędne w utrzymaniu prawidłowej struktury pętli [12]. Zmiany sekwencji dotyczą również pętli CDR2. W klasycznych przeciwciałach jest ona zachowana w ewolucji. W sekwencji przeciwciała w ramach tej pętli obserwuje się obecność aminokwasów hydrofobowych, które biorą udział w oddziaływaniach z łańcuchem lekkim. Przeciwciała wielbłądowatych nie zawierają łańcuchów lekkich. Ponadto występują w postaci monomerów. W pętli CDR2 stwierdzono obecność aminokwasów hydrofilowych, co zwiększa rozpuszczalność tych przeciwciał. W obrębie łańcucha ciężkiego VHH zlokalizowano trzy regiony hiperzmienne w odróżnieniu od sześciu obecnych w klasycznych przeciwciałach. Dlatego też paratop tych przeciwciał jest mniejszy. Dzięki zmianom w regionach CDR1 i CDR3 i wydłużeniu pętli zwiększa się rozmiar paratopu. Dane literaturowe wskazują, że za wiązanie antygeny w 60-80% odpowiada region CDR3 [13].

Za hydrofilowość łańcuchów ciężkich VHH odpowiadają substytucje aminokwasów hydrofilowych w miejsce aminokwasów hydrofobowych. Zamiany wykryto w pozycji reszt Val37, (wymiana na Tyr lub Phe), Gly44 (Glu lub Gln), Leu45 (Arg lub Cys) oraz Trp47 (Gly lub Ser, Leu lub Phe). Badacze sugerują, że obecność reszt aminokwasów hydrofilowych oraz wydłużenie pętli regionów hiperzmiennych zwiększa rozpuszczalność przeciwciał. Reiter i wsp. dowiedli, że wymiana w pozycji 44 reszty glicyny na resztę lizyny doprowadzała do powstania monomeru przeciwciała i zwiększała rozpuszczalność cząsteczki [14].

Z uwagi na coraz większe zainteresowanie użyciem przeciwciał domenowych w medycynie opracowuje się coraz wydajniejsze metody ich pozyskiwania. Dotychczas aby otrzymać takie przeciwciała należało immunizować zwierzę przez okres 6-7 tygodni, następnie pobrać krew bądź przeprowadzić biopsję węzła chłonnego w celu izolacji limfocytów. W 2012 roku Tillib i wsp. uzyskali przeciwciała skierowane przeciwko czynnikowi wzrostu śródbłonnka naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) transfekując komórki jajowe chomika chińskiego plazmidem z wbudowanym fragmentem cDNA ludzkiego VEGF. Po wyizolowaniu i oczyszczeniu białka immunizowano nim wielbłądy dwugarbne. Z pobranej krwi wydzielono limfocyty, a z nich następnie wyizolowano RNA. Kolejnym krokiem było uzyskanie cDNA przy pomocy reakcji odwrotnej transkryptazy RT-PCR, klonowanie dostępnych zestawów w wektorze fagowym oraz przeprowadzenie identyfikacji przeciwciał dla docelowego antygeny [7].

Aby całkowite koszty wytworzenia przeciwciał domenowych były jak najniższe potrzebne są wydajne systemy ekspresji. Produkcja przeciwciał jest możliwa w komórkach bakteryjnych (dominują systemy z wykorzystaniem *Escherichia coli*), drożdżowych oraz ssaczych. Odnotowano wysoką wydajność produkcji dAb w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*. Z hodowli o pojemności 10 litrów otrzymano ponad 1 g/ml przeciwciał [15]. Dzięki metodom inżynierii genetycznej udało się uzyskać przeciwciała domenowe w mleku krowim [16], jajach [17] oraz w roślinach [18]. Zaobserwowano, że w roślinach produkujących ten rodzaj przeciwciał dochodziło do immunomodulacji aktywności enzymów [19].

Ze względu na unikalne cechy przeciwciał domenowych, monomeryczność oraz niewielki rozmiar stają się one atrakcyjnym narzędziem walki z chorobami. Przeciwciała charakteryzują się wysoką zdolnością do penetracji tkanek oraz do wiązania się z antygenami niedostępnymi dla większych przeciwciał. Mogą one być wykorzystane jako transportery leków, ponieważ łatwo wiążą się z toksynami i radioizotopami. Mają zdolność do przenikania przez barierę krew-mózg. Ze względu na oporność na działanie proteaz oraz wychwyt i transport zależny od regionu Fc (w przeciwciałach VHH delekcja regionu Fc) mają wydłużony czas półtrwania. Ze względu na wspomniany już dłuższy okres półtrwania przeciwciała domenowe znajdują zastosowanie jako „wspomagacze”. W fazie badań klinicznych znajduje się konstruktor antagonisty receptora dla interleukiny 1 w połączeniu z przeciwciałem domenowym skierowanym na albuminę. Połączenie związku z przeciwciałem znacznie wydłuża okres półtrwania i tym samym poprawia działanie leku. Coraz większą popularnością cieszą się przeciwciała bispecyficzne. W tworzonych koniugatach jedno przeciwciało odpowiada za rozpoznanie i wiązanie z docelowym antygenem, natomiast drugie może przyciągać komórki efektorowe układu immunologicznego. Drugie przeciwciało może łączyć się np. z receptorem Fc gamma RIII na komórkach NK aktywując tym samym cytotoksyczność komórkową [20].

Zastosowanie przeciwciał domenowych może być uzasadnione w trakcie leczenia zakażeń wywoływanych przez wirusy o wysokiej zmienności genetycznej, np. przez wirusa HIV. Przeciwciała te cechują się wysoką stabilnością, łatwo je modyfikować, utrzymują aktywność nawet po przechowywaniu w warunkach mrożenia czy denaturacji cieplnej. Niektóre z nich mogą być przyjmowane doustnie. Dużą ich zaletą jest to, że nie wywołują odpowiedzi immunologicznej z powodu ich ludzkiego pochodzenia [11].

SPECYFIKA DZIAŁANIA PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH

Warunkiem skuteczności terapii z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych jest ich związanie się z docelowym antygenem na powierzchni komórki, np. nowotworowej. Dobry cel dla przeciwciała monoklonalnego to taki, który ulega wysokiej ekspresji na komórkach zmienionych nowotworowo i niskiej na komórkach prawidłowych oraz którego poziom frakcji rozpuszczalnej w surowicy jest bardzo niski lub w ogóle nie występuje. Przeprowadzone badania z wykorzystaniem techniki *in vitro* oraz w organizmach zwierząt wskazują, że działanie przeciwciał obejmuje: indukowanie apoptozy poprzez wpływ na szlaki sygnalizacyjne, cytotoksyczność zależną od układu dopełniacza oraz cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał [7] (Ryc 3).

INDUKCJA APOPTOZY

Proces programowanej śmierci komórki jest zaburzony w wielu schorzeniach. Może być zahamowany w procesie nowotworzenia lub wręcz odwrotnie, zachodzić zbyt intensywnie, np. w chorobach autoimmunologicznych. Indukcja lub zahamowanie apoptozy stała się więc główną strategią w walce z tymi chorobami. Wykazano, że przeciwciała monoklonalne mogą w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* wpływać na indukcję apoptozy. Dzieje się tak na skutek blokowania przez przeciwciała receptorów, które odbierają sygnały o przeżyciu bądź śmierci komórki. Ponadto przeciwciała wiążąc się z określonym antygenem (receptorem) mogą

hamować jego dimeryzację, a co za tym idzie wpływać negatywnie na przekazywanie sygnałów w komórce [21]. Innym mechanizmem, który wiąże się z indukcją apoptozy jest nasilenie sygnału apoptotycznego poprzez sieciowanie receptorów. Przykładem receptorów, które wiążą się z przeciwciałami jest rodzina ErbB (m. in. EGFR, ang. *epidermal growth factor receptor*, receptor dla czynnika wzrostu naskórka). Przeciwciała te łączą się z domeną wiążącą ligand z dużo większym powinowactwem niż naturalne ligandy. Doprowadza to do obniżenia ilości komórek nowotworowych i hamowania szlaków sygnalizacyjnych związanych z EGFR, a co za tym idzie wzrostu i proliferacji komórek [22].

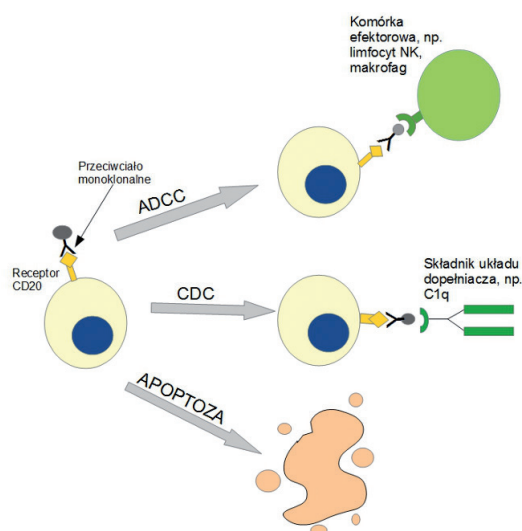
CYTOTOKSYCZNOŚĆ ZALEŻNA OD UKŁADU DOPEŁNIACZA (CDC, ang. *complement mediated cytotoxicity*)

Zjawisko aktywowania układu dopełniacza przez przeciwciała jest znane badaczom od blisko 100 lat. Dziś wiadomo, że niektóre przeciwciała monoklonalne działają efektywnie aktywując komplement [23]. Aby jednak do tego doszło muszą być spełnione określone warunki. Są to: odpowiednie stężenie antygeny na powierzchni, jego orientacja w błonie komórkowej, także to, czy jest monomeryczny czy polimerem. Warunkiem aktywacji dopełniacza może być wprowadzenie odpowiedniego izotypu przeciwciała oraz charakter komórki, w tym np. zdolność do produkcji cząsteczek hamujących działanie układu dopełniacza. Różnice w aktywowaniu komplementu mogą pojawić się nawet wtedy, gdy przeciwciała są izotypami i skierowane są w kierunku tego samego antygeny. Przykładem takim może być CD20 i dedykowane mu przeciwciała monoklonalne. Rituksimab należący do I klasy przeciwciał anti-CD20 tworzy wiązania krzyżowe między tetramerycznymi antygenami i aktywuje układ dopełniacza [24]. Z kolei obinutuzumab, przeciwciała klasy II anti-CD20 nie tworzy tego typu wiązań i nie aktywuje układu dopełniacza tak silnie jak rituksimab [25].

Wiązanie antygeny z przeciwciałem i aktywacja komplementu nie zawsze kończy się lizą komórki. W badaniach prowadzonych na komórkach przewlekłej białaczki limfocytowej wykazano, że po utworzeniu kompleksu antygen-przeciwciała i aktywacji komplementu może dojść do „obciążenia” całego kompleksu z powierzchni błony. Brak docelowego antygeny na błonie limfocytów transformowanych nowotworowo skutkuje opornością na leczenie wybranym przeciwciałem monoklonalnym. Wciąż niewiele wiadomo na temat stężenia poszczególnych składników układu dopełniacza. Uważa się, że duże znaczenie ma cytotoksyczność zależna od komplementu, którą obserwuje się w nowotworach hematologicznych; w mniejszym stopniu odgrywa rolę w eliminacji guzów litych [6].

CYTOTOKSYCZNOŚĆ KOMÓRKOWA ZALEŻNA OD PRZECIWCIAŁ (ADCC, ang. *antibody dependent cellular cytotoxicity*)

Dzięki możliwości wiązania przeciwciał monoklonalnych z receptorem FcγR obecnym na powierzchni wielu komórek efektorowych układu immunologicznego (limfocyty NK, granulocyty, monocyty/makrofagi) dochodzi do cytotoksyczności zależnej od przeciwciał. Pobudzenie komórek



Rycina 3. Możliwe działanie przeciwciał monoklonalnych po związaniu się z docelowym antygenem.

NK prowadzi do wydzielania enzymów: perforyn, granzymów, a także pobudza ekspresję liganda FasL dla receptora Fas obecnego na powierzchni komórek [26,27]. Aktywacja makrofagów stymuluje proces fagocytowania komórek opłaszczonych przeciwciałami oraz produkcję proteaz, cytokin oraz wolnych rodników tlenowych. Przeciwciała rozpoznają docelowy antygen i wiążą się z nim za pomocą regionu Fab. Następnie dochodzi do rozpoznania regionu Fc przez receptory Fc gamma typu R. Na limfocytach występują 3 typy receptorów tej rodziny: Fc gamma RI, RII oraz RIII. Związanie przeciwciała z regionem Fc gamma RI i RIII powoduje pobudzenie komórek efektorowych układu immunologicznego. Z kolei wiązanie z Fc gamma RII stymuluje sygnał supresyjny. Aktywność ADCC zależy od izotypu użytego przeciwciała. Wykazano, że przeciwciała IgG1 oraz IgG3 wiążą się do Fc gamma R lepiej niż IgG2 oraz IgG4 [28]. Na skuteczność terapii mają również wpływ polimorfizmy genów dla receptorów. Mutacja punktowa w pozycji 559 genu dla Fc gamma RIIIa powoduje zamianę reszt aminokwasowych z Val na Phe w pozycji 158. Receptor, w którym dochodzi do takiej wymiany wykazuje mniejsze powinowactwo do przeciwciał. Z kolei mutacja i podstawienie His zamiast Arg w Fc gamma RIIIa zwiększa powinowactwo receptora do IgG2 [29].

MECHANIZM ODDZIAŁYWAŃ RECEPTORA CD20 Z RITUKSIMABEM

CD20 to integralne białko błonowe o masie cząsteczkowej 33-35 kDa, które nie ulega glikozylacji i odgrywa ważną rolę w niezależnym od napięcia transporcie jonów wapnia [30]. Występuje w dość dużym stężeniu na komórkach limfocytów linii B i dzięki temu jest atrakcyjnym celem terapii w leczeniu jednostek chorobowych. Analiza sekwencji cDNA genu kodującego receptor CD20 wykazała wysoką analogię sekwencji ludzkiego i mysiego odpowiednika CD20, szczególnie w domenach transbłonowych. W dużej pętli, zlokalizowanej w przestrzeni zewnątrz błonowej, zauważa się mniejszą homologię. Stwierdzono różnicę w sekwencji 16-48 reszt aminokwasowych. CD20 posiada 4 domeny transbłonowe, N- i C- koniec łańcucha polipeptydowego znajduje się w przestrzeni wewnątrzkomórkowej. Ponadto między trzecią a czwartą domeną transbłonową w przestrzeni zewnątrz błonowej znajduje się duża pętla zbudowana z 142-182 reszt aminokwasowych. Jest ona ważna, ponieważ umożliwia wiązanie przeciwciał monoklonalnych, np. rituksimabu. Receptor CD20 tworzy oligomery na powierzchni błony [31,32].

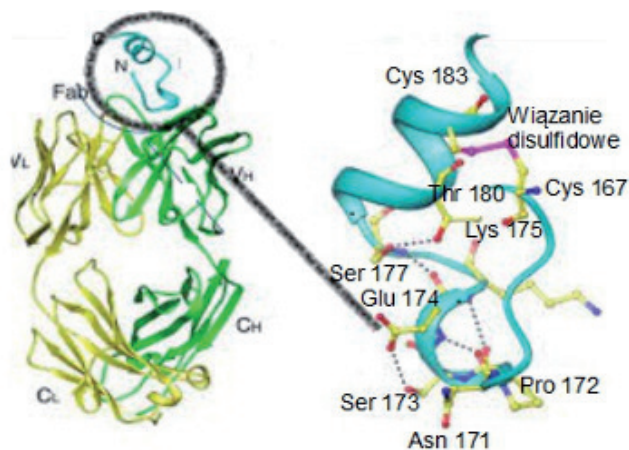
Rituksimab jest pierwszym lekiem przeciwnowotworowym o charakterze przeciwciała monoklonalnego dopuszczonym przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*, Agencja ds. żywności i leków) w leczeniu pacjentów. Jest pierwszym lekiem celowanym stosowanym w terapii antynowotworowej. Choć początkowo był stosowany w leczeniu chłoniaka nieziarnicznego o niskim stopniu zaawansowania, znalazł także zastosowanie w leczeniu innych nowotworów hematologicznych, a także chorób autoimmunologicznych. Dokładny mechanizm działania rituksimabu nie został dotychczas w pełni poznany. Uważa się, że może aktywować układ dopełniacza, stymulować cytotoksyczność komórko-

wą zależną od przeciwciał, a także indukować apoptozę zaburzając sygnalizację komórkową [31].

Aby lepiej zrozumieć mechanizm wiązania przeciwciała z receptorem CD20 należy przyjrzeć się budowie molekularnej regionu Fab. Region ten charakteryzuje się dość dobrą gęstością elektronową, wyłączając reszty aminokwasowe od Ser 135 do Gly 141. Zbudowany jest z czterech domen o strukturze beta kartki. Łańcuch lekki zawiera reszty aminokwasowe od Leu 1 do Leu 213, które tworzą domeny V_L i C_L . Z kolei domeny V_H i C_H są tworzone przez reszty aminokwasowe His 1-His 224 łańcucha ciężkiego. Dowiedziono, że kąt między regionami V_H i C_H oraz V_L i C_L wynosi ok. 139 stopni. W strukturze regionu Fab rituksimabu występują cztery wiązania disiarczkowe; między Cys 23 i Cys 87, Cys 133 i Cys 183, Cys 22 i Cys 96 oraz Cys 148 i Cys 204. Miejsce odpowiedzialne za wiązanie się z antygenem CD20 obejmuje pętle L3, H1, H2 i H3 występujące w regionach CDR. Pętle te tworzą dużą kieszeń, która ułatwia akomodację peptydowi epitopowemu [33].

Rituksimab wykazuje wysokie powinowactwo do antygeny CD20; może wiązać się już przy stężeniu 5 nM [34]. Dzięki badaniom krystalograficznym udało się poznać mechanizm wiązania antygeny CD20 z regionem Fab rituksimabu (Ryc. 3). Kluczowymi resztami aminokwasowymi w tworzeniu wiązania okazały się Ala 170 i Pro 172 występujące w motywie ANPS antygeny [30]. Wiążą się one do dużej kieszeni tworzonej przez pętle L3, H1, H2 i H3 występujące w sekwencjach hiperzmiennych regionów Fab rituksimabu. W tworzenie kompleksu antygen-przeciwciała zaangażowane są przede wszystkim łańcuchy ciężkie regionów Fab przeciwciała, natomiast mniejszą rolę zdają się odgrywać łańcuchy lekkie. Z badań eksperymentalnych wynika, że interakcje antygen-przeciwciała zachodzą głównie dzięki tworzeniu wiązań wodorowych oraz oddziaływań van der Waalsa. Wykazano, że łańcuch boczny reszty Asn171 tworzy 2 wiązania wodorowe z resztami Ser 99 oraz Trp 106 w pętli H3. Natomiast reszta Ser 173 łączy się wiązaniem wodorowym z łańcuchem bocznym reszty Asp 33 w pętli H1. Kluczowym aminokwasem w oddziaływaniach przeciwciała z antygenem jest reszta Pro 172. Aminokwas ten tworzy wiązanie wodorowe z resztą Asn 33 umiejscowioną w pętli H1. Podczas formowania kompleksu Pro jest lokowana w dolnej części kieszeni którą tworzą: reszty aminokwasowe pętli H2 (Ala 50, Tyr 52, Asp 57, Ser 59) oraz reszta Asn 33 z pętli H1. Reszta prolina oddziałuje z resztami aminokwasowymi regionu Fab zarówno o naturze hydrofilowej jak i hydrofobowej. Uważa się, że jej pozycja w heliksie oraz sztywna konformacja zapewniają utrzymanie unikatowej struktury, co ułatwia rozpoznawanie i wiązanie rituksimabu (Ryc. 4).

Wyniki badań krystalograficznych wskazują, że w kieszeni, w miejscu wiązania reszty Pro może wiązać się także reszta Ser. Badania wykazały, że takie podstawienie uniemożliwia utworzenie kompleksu antygen-przeciwciała na skutek zaburzeń struktury przestrzennej cząsteczki. Wyniki jednoznacznie wskazują na kluczową rolę reszty Pro w oddziaływaniach z regionem Fab przeciwciała monoklonalnego [30,31].



Rycina 4. Model przedstawiający miejsce wiązania rituksimabu z antygenem CD20. Powiększenie obrazuje miejsce tworzenia wiązania z przeciwciałem w obrębie antygeny CD20.

Dzięki badaniom krystalograficznym udało się także wykazać, że motyw ANPS jest głęboko schowany w kieszeni tworzonej przez pętle CDR regionów Fab. Reszta Ala 170 jest umiejscowiona we wgłębieniu hydrofobowym budowanym przez reszty Trp 47, Trp 90, Asn 93 i Pro 95 pętli L3. Miejsce wiązania reszty Ala jest bardzo wąskie. Ponadto, na skutek występowania zawady przestrzennej nie jest możliwe oddziaływanie tego aminokwasu z innymi aminokwasami o bardziej rozbudowanym łańcuchu bocznym. Wykazano jednak, że podobnie jak w przypadku reszt proliny 172 Ala może być zastąpiona resztą Ser. Nie bez znaczenia pozostają także reszty aminokwasowe z motywu ANPS, Asn 171 i Ser 173. Oba aminokwasy są istotne z uwagi na tworzone przez nie wiązania wodorowe oraz udział w oddziaływaniach van der Waalsa. Wśród aminokwasów tworzących wiązania wodorowe z resztami aminokwasowymi rituksimabu należy wymienić Glu 168, Pro 160, Asn 171, Pro 172, Ser 173 oraz Lys 175. Dla tworzenia kompleksu antygen-przeciwciało istotne są również siły van der Waalsa. W antygenie CD20 za te oddziaływania z regionem Fab rituksimabu odpowiadają reszty Ala 170, Glu 174, Asn 176 i Ser 179 [31].

Wyniki badań wskazują jednoznacznie, że motywem kluczowym w tworzeniu wiązań z przeciwciałem jest ANPS. Pojawiają się jednak doniesienia sugerujące istotny udział innych sekwencji w tworzeniu tego kompleksu. W C-końcu dużej pętli zewnątrz błonowej antygeny znajduje się fragment łańcucha peptydowego (Tyr182, Cys183, Tyr184, Ser185, Ile186), któremu przypisuje się udział w formowaniu kompleksu z rituksimabem mimo, że żadna z tych reszt aminokwasowych nie wiąże się bezpośrednio z regionem Fab. Reszta Cys 183 tworzy mostek disiarczkowy z resztą Cys 167 tworząc unikalną kolistą strukturę. Należy przy tym podkreślić, że w badaniach zdolności wiązania z przeciwciałem monoklinalnym cząsteczek linearnych oraz kolistych wykazano, że tylko struktury koliste mogą wiązać się z przeciwciałem. Na podstawie otrzymanych wyników badań sugeruje się, że tworzony motyw YCYSI przyczynia się do rozpoznawania i wiązania rituksimabu nie na drodze bezpośred-

nich oddziaływań z regionem Fab lecz przez utrzymywanie właściwej struktury antygeny CD20 [32].

NOWE PODEJŚCIE TERAPEUTYCZNE Z WYKORZYSTANIEM NANOPRZECIWCIAŁ

Unikatowe właściwości fizykochemiczne oraz farmakokinetyczne sprawiają, że nanoprzeciwciała mogą znaleźć zastosowanie w immunoterapii i diagnostyce. Ze względu na wysokie powinowactwo oraz specyficzność zastępują one wykorzystywane do niedawna konwencjonalne przeciwciała [35]. Nanoprzeciwciała mogą być łączone ze znacznikami fluorescencyjnymi tworząc tzw. chromociała i przez to ułatwiać badanie zawartości, translokacji i wzajemnych oddziaływań białek. Nowa generacja przeciwciał znajduje także zastosowanie w znakowaniu białek szlaków sygnalizacyjnych a nawet markerów nowotworowych [36,37]. Powstały systemy, dzięki którym możliwe stało się dostarczanie do komórek nanoprzeciwciał nagich (tzw. antagonistów receptorów) lub związanych z domenami efektorowymi i nanocząsteczkami niosącymi leki (Tab. 1). Domeną efektorową może być region Fc lub toksyny bakteryjne. Z kolei nanocząsteczkami, do których dołączane są nanoprzeciwciała mogą być micelle lub liposomy, w których transportowane są chemioterapeutyki [10].

Pojawia się coraz więcej doniesień z których wynika, że użycie nanoprzeciwciał może być szansą na polepszenie efektywności leczenia chorób nowotworowych. Potencjalnymi celami terapii są białka występujące na powierzchni komórki, cytokiny, a nawet białka wewnątrzkomórkowe. Przeprowadzone badania na limfocytach T ujawniły, że podanie nanoprzeciwciał skierowanych na ektoenzymy leukocytów powodowało zablokowanie ich właściwości enzymatycznych oraz cytotoksyczność indukowaną przez NAD [38]. Inne wyniki badań sugerują, że użycie nanoprzeciwciał skierowanych na białko proapoptotyczne Bax hamuje apoptozę wywołowaną stresem oksydacyjnym. Przeciwciało to,

Tabela 1. Specyfika działania nanoprzeciwciał na cele molekularne.

Docelowe białka	Specyfika działania nanoprzeciwciał
Białka transmembranowe	
EGFR	antagoniści receptora EGFR, przeciwciała związane z domenami efektorowymi (Fc, toksyny bakteryjne) lub z lekami
HER2	przeciwciała związane z domenami efektorowymi (Fc, toksyny bakteryjne)
HGFR (c-Met)	antagoniści receptora HGFR, przeciwciała skoniugowane z lekami
CXCR7	antagoniści receptora CXCR7
CEA	przeciwciała związane z domenami efektorowymi (Fc, toksyny bakteryjne)
MUC-1	przeciwciała skoniugowane z lekami
VEGFR2	antagoniści receptorów VEGFR2, przeciwciała związane z domenami efektorowymi (Fc, domen bakteryjne)
Białka zewnątrzkomórkowe	
HGF	antagoniści receptora HGF
chemokiny	antagoniści receptorów dla chemokin

może znaleźć zastosowanie w terapii chorób neurodegeneracyjnych, np. chorobie Alzheimera [39].

Coraz częściej przygotowuje się nanoprzeciwciała skierowane na białka transbłonowe, istotne w procesie nowotworzenia. Do takich białek zalicza się EGFR, czy c-Met, które należą do rodziny receptorów kinaz tyrozynowych [40]. Udało się stworzyć nanoprzeciwciała blokujące receptor chemokin CXCR7. Badania wykazały, że jego zwiększona zawartość jest skorelowana z występowaniem raka piersi czy płuc [41].

Oprócz receptorów czynników wzrostu i chemokin potencjalnymi celami w terapii antynowotworowej mogą być inne białka, np. MUC-1. Jest to glikoproteina macierzy zewnątrzkomórkowej specyficzna nowotworowo. Zwiększoną zawartość tego białka wykryto w nowotworach pochodzenia epidermalnego m.in. piersi czy jelita grubego [42]. Innym przykładem może być antygen CEA. W komórkach prawidłowych jego poziom jest bardzo niski. Wzmogoną zawartość tego antygenu obserwuje się w nowotworach pochodzenia epidermalnego. Nad stworzeniem nanoprzeciwciała anty-CEA pracuje m.in. zespół Cortez-Retamozo [43].

Jednym z kluczowych czynników promujących wzrost i przerzutowanie nowotworów jest czynnik wzrostu śródbłónki naczyń; VEGF. W praktyce klinicznej pojawiły się przeciwciała monoklonalne skierowanych na VEGF, np. bevacizumab. Wykazano skuteczność tego przeciwciała w hamowaniu rozwoju nowotworu płaskonabłonkowego płuc. W terapii antynowotworowej bevacizumab był podawany głównie jako dodatek do standardowych chemioterapii [44].

Nowym celem terapii nowotworowej stał się receptor VEGF, VEGFR2. Wydaje się, że blokowanie aktywności tego białka może przyczyniać się do hamowania tworzenia nowych naczyń dla nowotworu. W eksperymentach prowadzonych na szczurach podawano im przeciwciało DC101 skierowane na VEGFR2. DC101 wykazywało większe powinowactwo do receptora niż VEGF i silnie hamowało rozwój guza [45]. Natomiast w badaniach prowadzonych na ludzkich komórkach nie stwierdzono skuteczności tego przeciwciała. Z tego powodu zaprojektowano przeciwciało wiążące się z ludzkim VEGFR2 o nazwie ramucirumab [46]. Ramucirumab jako jedyny blokował specyficznie VEGFR2 przy stężeniu ok. 1 nM. Wykazywał przy tym 8-krotnie większe powinowactwo do receptora w odróżnieniu od naturalnego liganda [47].

PIŚMIENNICTWO

1. Sosińska-Mielczarek K, Jassem J (2005) Przeciwciała monoklonalne w leczeniu nowotworów litych. *Onkologia w praktyce klinicznej* 4: 225-232
2. Schwaber J, Cohen EP (1973) Human x mouse somatic cell hybrid clone secreting immunoglobulins of both parental types. *Nature* 17: 444-447
3. Kohler G., Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497
4. Zieliński M, Plucienniczak A (2009) Przeciwciała monoklonalne – zastosowanie w medycynie. *Biotechnologia* 85: 113-122
5. von Mehren M, Adams GP, Weiner LM (2003) Monoclonal antibody therapy for cancer. *Annu Rev Med* 54: 343-369
6. Weiner GJ (2015) Building better monoclonal antibody-based therapeutic. *Nat Rev Cancer* 15: 361-370
7. Tillib SV, Ivanova TI, Lyssuk T, Larin SS, Kibardin A, Korobko EV, Vikhrev PN, Gnuchev NV, Georgiev GP, Korobko IV (2012) Nanobodies for detection and blocking of bioactivity of human vascular endothelial growth factor A165. *Biochemistry* 77: 659-665
8. Muller S, Zhao Y, Brown TL, Morgan AC, Kohler H (2005) TransMabs: cell-penetrating antibodies, the next generation. *Expert Opin Biol Ther* 5: 237-241
9. Holt LJ, Herring C, Jespers LS, Woolven BP, Tomlinson IM (2003) Domain antibodies: proteins for therapy. *TRENDS in Biotechnology* 21: 484-490
10. Kijanka M, Dorresteyn B, Oliveira S, van Bergen P (2015) Nanobody-based therapy of solid tumors. *Nanomedicine* 10: 161-174
11. Dimitrov DS (2009) Engineered CH2 domains (nanobodies). *mAbs* 1: 26-28
12. De Genst E, Saerens D, Muyldermans S, Conrath K (2006) Antibody repertoire development in camelids. *Dev Comp Immunol* 30: 187-198
13. Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, de Baetselier P, de Genst E, Kinne J, Leonhardt H, Magez S, Nguyen VK, Revets H, Rothbauer U, Stijlemans B, Tilib S, Wernery U, Wyns L, Hassanzadeh-Ghassabeh G, Saerens D (2009) Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol* 128: 178-183
14. Nguyen VK (2000) Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J* 19: 921-930
15. Frenken LG (2000) Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* 78: 11-21
16. Houdebine LM (2002) Antibody manufacture in transgenic animals and comparisons with other systems. *Curr Opin Biotechnol* 13: 625-629
17. Ivarie R (2003) Avian transgenesis: progress towards the promise. *Trends Biotechnol*. 21: 14-19
18. Stoger E (2002) Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. *Curr Opin Biotechnol* 13: 161-166
19. Jobling SA (2003) Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. *Nat Biotechnol* 21: 77-80
20. Saerens D, Ghassabeh GH, Muyldermans S (2008) Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharm* 8: 600-608
21. Salzmann S, Seher A, Trebing J, Weisenberger D, Rosenthal A, Siegmund D, Wajant H (2013) Fibroblast growth factor inducible (Fn14)-specific antibodies concomitantly display signaling pathway-specific agonistic and antagonistic activity. *J Biol Chem* 288: 13455-13466
22. Yarden Y, Pines G (2012) The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nature reviews. Cancer* 12: 553-556
23. Wang SY, Weiner G (2008) Complement and cellular cytotoxicity in antibody therapy of cancer. *Expert opinion on biological therapy* 8: 759-768
24. Teeling JL (2006) The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol* 177: 362-371
25. Alduaij W (2011) Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood* 117: 4519-4529
26. Beum PV (2011) Loss of CD20 and bound CD20 antibody from opsonized B cells occurs more rapidly because of trogocytosis mediated by Fc receptor-expressing effector cells than direct internalization by the B cells. *J Immunol* 187: 3438-3447
27. Wang SY (2009) Depletion of the C3 component of complement enhances the ability of rituximab-coated target cells to activate human NK cells and improves the efficacy of monoclonal antibody therapy in an *in vivo* model. *Blood* 114: 5322-5330
28. Weng WK, Levy R (2003) Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 21: 3940-394

29. van Sorge NM, van der Pol WL, van de Winkel JG (2003) Fc gamma polymorphisms: implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue antigens* 61: 189-202
30. Binder M, Otto F, Mertelsmann R, Veelken H, Trepe M (2006) The epitope recognized by rituximab. *Blood* 108: 1975-1978
31. Perosa F, Favoino F, Caragnano E, Dammacco F (2006) Generation of biologically active linear and cyclic peptides has revealed a unique fine specificity of rituximab and its possible cross-reactivity with acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b precursor. *Blood* 107: 1070-1077
32. Du J, Wang H, Zhong C, Peng B, Zhang M, Li B, Huo S, Guo Y, Ding J (2007) Structural Basis for Recognition of CD20 by Therapeutic Antibody Rituximab. *J Biol Chem* 282: 15073-15080
33. Al-Lazikani B, Lesk AM, Chothia C (1997) Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* 273: 927-948
34. Reff ME, Heard C (2001) A review of modifications to recombinant antibodies: attempt to increase efficiency in oncology application. *Crit Rev Oncol Hematol* 40: 25-35
35. Siontorou CG (2013) Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. *Int J Nanomed* 8: 4215-4227
36. Kirchhofer A, Helma J, Schmidthals K (2010) Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nat Struct Mol Biol* 17: 133-138
37. Caussinus E, Kanca O, Affolter M (2012) Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nat Struct Mol Biol* 19: 117-121
38. Koch-Nolte F, Reyelt J, Schössow B (2006) Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyl-transferase ART2.2 *in vivo*. *FASEB J* 21: 3490-3498
39. Gueorguieva D, Li S, Walsh N, Mukerji A, Tanha J, Pandey S. Identification of single-domain (2006) Bax-specific intrabodies that confer resistance to mammalian cells against oxidative-stress-induced apoptosis. *FASEB J* 20: 2636-2638
40. Roovers RC, Laeremans T, Huang L (2007) Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR nanobodies. *Cancer Immunol Immunother* 56: 303-317
41. Miao Z, Luker KE, Summers BC (2007) CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth *in vivo* and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15735-15740
42. Sadeqzadeh E, Rahbarizadeh F, Ahmadvand D, Rasaee MJ, Parhamifar L, Moghimi SM (2011) Combined MUC1-specific nanobody-tagged PEG-polyethylenimine polyplex targeting and transcriptional targeting of tBid transgene for directed killing of MUC1 over-expressing tumour cells. *J Control Release* 156: 85-91
43. Cortez-Retamozo V, Backmann N, Senter PD (2004) Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res* 64: 2853-2857
44. Sullivan LA, Brekken RA (2010) The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition. *Mabs* 2: 165-175
45. Witte L, Hicklin DJ, Zhu Z (1998) Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (Flk1/KDR) as an antiangiogenic therapeutic strategy. *Cancer Metastasis Rev* 17: 155-1561
46. Huang J, Tan Y, Tang Q (2010) A high-affinity human/mouse cross-reactive monoclonal antibody, specific for VEGFR-2 linear and conformational epitopes. *Cytotechnology* 62: 61-71
47. Fontanella C, Ongaro E, Bolzonello S, Guardascione M, Fasola G, Aprile G (2014) Clinical advances in development of novel VEGFR2 inhibitors. *Ann Transl Med* 2: 123

Evolution of monoclonal antibodies in cancer treatment

Małgorzata Kubczak, Małgorzata Rogalińska✉

Department of Cytobiochemistry, Lodz University, 141/143 Pomorska St., 90-236 Łódź, Poland

✉e-mail: mrogalin@biol.uni.lodz.pl

Key words: monoclonal antibodies, CD20 antigen, nanoantibodies, anticancer therapy

ABSTRACT

Since late 90s of last century the new age of directed therapy began using mainly biological constructs produced in rodents called monoclonal antibodies. The side effects of monoclonal antibodies were a challenge for pharmaceutical companies to improve the biological properties of these biological drugs. The humanization of monoclonal constructs was an idea to improve monoclonal antibodies next generation activity cancer cell reduction in humans. Moreover for some other patients sensitive for monoclonal antibodies therapy could also potentially induce immunological differences that might imply on human health. The new idea related to monoclonal antibodies was to design a small molecule constructs of nanoantibodies with ability to enter into cells. Such small molecules could find their targets inside human cells, even in nuclei leading to differences in cancer cells expression. The existing knowledge on monoclonal antibodies as well as directed activity of nanoantibodies could improve anticancer treatment efficacy of diseases.