

TERAPEUTICKÉ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY V LÉČBĚ A VE VÝVOJI

OLDŘICH FARSA

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno
farsao@vfu.cz

Došlo 14.5.12, přepracováno 20.8.12, přijato 27.9.12.

Klíčová slova: bioléčiva, terapeutické monoklonální protilátky, antineoplastika, léčiva autoimunitních nemocí, antiinfektiva, vaskulární růstové faktory, tumor nekrotizující faktor, interleukiny

Obsah

1. Úvod
2. Monoklonální protilátky k léčbě nádorových onemocnění
3. Monoklonální protilátky proti autoimunitním onemocněním a proti odmítnutí transplantovaného orgánu
4. Antibakteriální a protivirové monoklonální protilátky
5. Závěr

1. Úvod

Monoklonální protilátky pro humánní použití jsou bioléčiva^{1–4} charakteru imunoglobulinu nebo fragmentu imunoglobulinu s definovanou specifitou, produkované jedním klonem buněk^{5,6}. Váží se specificky na konkrétní proteiny, působící jako antigeny, tzv. epitopy⁷. Tato peptidová léčiva mají značně propracované názvosloví. Charakteristická je pro ně koncovka -mab z angl. monoclonal antibody (monoklonální protilátka). Koncovce předchází kmen dle zdrojového organismu, tj. toho, z něhož pocházejí geny, které byly použity k přepisu peptidických řetězců protilátky. Možnosti jsou následující: a – potkan, axo – potkaní – myší hybrid, e – křeček, i – primát, o – myš, u – člověk, xi – chimérický, zu – humanizovaný. Jak chimérický, tak i humanizované protilátky obsahují střídající se lidské a zvířecí sekvence. Rozdíl mezi nimi je definován tak, že u chimérických protilátek jsou celé variabilní domény těžkých a lehkých řetězců lidské protilátky nahrazeny doménami nehumánními, jež jsou nositeli požadované antigenní specifity, zatímco humanizovaná protilátka má 3 krátké hypervariabilní sekvence (oblasti podmiňující komplementa-

ritu) z nehumánních variabilních domén v každém řetězci uměle vloženy do variabilní domény lidské protilátky^{5,6}. Tomuto kmenu předchází předkmen dle cílové tkáně, systému či organismu, kde má působit. Předkmen -b(a)- značí látku působící na bakterie, -c(i)- v kardiovaskulárním systému, -f(u)- na houbová onemocnění, -k(i)- na interleukiny, -l(i)- značí imunomodulační působení, -n(e)- v nervovém systému, tento předkmen je však zatím ještě předmětem diskuse, předkmen -s(o)- značí působení na kost, -tox(a)- na toxiny, -t(u)- na nádory a -v(i)- na virové infekce. Zpravidla se používá jediné písmeno (souhláska). Začíná-li však kmen na souhlásku (např. x nebo z), doplní se přídatná samohláska, aby se předešlo problémům s výslovností. Předponu, kterou název začíná, je možno volit libovolně, musí však přispívat k dobré vyslovitelnosti názvu a jeho dostatečné odlišnosti od názvů jiných léčiv⁸. První monoklonální protilátkou, zavedenou do terapeutické praxe, byl muromonab (Orthoclone OKT3®), myší protilátka proti antigenu CD3 (viz níže), užívaná donedávna pro léčbu odmítnutí transplantovaného orgánu u pacientů s transplantovanou ledvinou, srdcem nebo játry. Registrován v USA byl již r. 1986 a jeho užívání vedlo k dramatickému poklesu počtu odmítnutí transplantovaných orgánů. Postupně byl vytlačen monoklonálními protilátkami s nižším výskytem nežádoucích účinků (basiliximab, alemtuzumab) a stažen ze světového trhu r. 2009 (cit.⁹).

2. Monoklonální protilátky k léčbě nádorových onemocnění

Bevacizumab (Avastin®) je humanizovaná myší monoklonální protilátka působící jako inhibitor angiogeneze či neovaskularizace, tj. novotvorby cév nebo cévám podobných útvarů v nádoru. Kmen -ci- v jejím názvu odkazuje právě na fungování léčiva v „cirkulačním“ systému, i když bychom zde očekávali spíše -t(u)-. Obdobné pojetí názvu se uplatňuje i u dalších monoklonálních protilátek inhibujících neovaskularizaci. Zásobení krví je pro nádory stejně důležité jako pro jiné tkáně, bez něj se růst zastavuje a nádor odumírá. Novotvorba cév u dospělých jedinců probíhá jen u nádorových onemocnění nebo jiných patologických stavů (např. diabetická retinopatie), proto je inhibice angiogeneze velmi vhodným mechanismem léčby nádorů a léčiva takto působící mají šanci nijak nepoškodovat zdravé tkáně. Bevacizumab je protilátka typu imunoglobulinu G₁ cílená přímo proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (VEGF). VEGF je pro-angiogenní faktor, váže se na dva podtypy receptoru označované jako VEGFR-1 (Flt-1) a VEGFR-2 (Flk-1/KDR), čímž aktivuje receptorovou tyrosinkinasu (RTK) a indukuje angiogenezi. VEGF a jeho receptory jsou často nadexprimovány u ná-

dorů, proto byla angiogeneze navržena jako cíl zásahu protinádorové terapie již v 70. letech. Receptor VEGFR-2 je selektivně exprimován na nádorových endoteliálních buňkách, jež jsou současně v přímém kontaktu s krví, čímž představuje slibný terapeutický cíl, protože léčivo je schopno se k němu krví dostat. Protilátky proti izoformě Flk-1 *in vitro* antagonizovaly vazbu VEGF na receptor, přenos signálu prostřednictvím VEGFR-2 a VEGF indukovaný růst endoteliálních buněk, což přineslo oprávněná očekávání antiangiogenní, antitumorové a antimetastatické aktivity¹⁰. Bevacizumab byl r. 2004 povolen v USA jako léčivo metastazujícího kolorektálního karcinomu v kombinaci s fluorouracilem; později i proti nemalobuněčnému plicnímu karcinomu (2006). V EU je v kombinaci s paklitaxelem léčivem první volby u metastazujícího nádoru prsu a v případech, kdy se léčba jinou možnou chemoterapií včetně samotných anthracyklinů a taxanů nepovažuje za vhodnou, se kombinuje s kapecitabinem¹¹. V EU je přípravek registrován rovněž od r. 2004. V USA bylo použití k léčbě nádorů prsu zrušeno v r. 2010 (cit.¹²). Účinnost, samostatně nebo v kombinacích, byla prokázána i u řady dalších nádorů včetně neuroendokrinních (nádory vycházející z nervového a hormonálního systému mohou být funkční (sekreční) nebo nefunkční, funkční se obvykle symptomaticky léčí analogy somatostatinu; v metastazujícím stadiu špatně odpovídají na chemoterapii¹³). Přípravuje se rekombinantně na ovariálních buňkách čínských křečků. Podává se v nitrožilní infúzi¹¹. Ve 2.–3. fázi klinického zkoušení je ramucirumab (IMC-1121B), protilátka proti receptoru VEGFR-2. Je testován ve 3. fázi na nádor prsu, žaludku, adenokarcinom gastroesofageální spojky, nádor jater a metastazující kolorektální karcinom a ve 2. fázi na několik dalších nádorů. Funguje samozřejmě rovněž jako inhibitor angiogeneze¹⁴. Trastuzumab (Herceptin®) je klinicky využívaná chimérická humánní-myší monoklonální protilátka proti receptoru podtypu HER-2, patřícího do rodiny receptorů epidermálního růstového faktoru (EGFR/HER). Signální mechanismy EGFR se účastní řízení přežívání buněk, vývojového cyklu buněk, angiogeneze, pohybu buněk a buněčné invaze čili metastazování. Rodina EGFR/HER obsahuje 4 strukturálně velmi podobné receptory: EGFR/HER-1, HER-2, HER-3 a HER-4. Jde o transmembránové glykoproteiny obsahující doménu, u EGFR, HER-3 a HER-4 vážící extracelulární ligand, a intracelulární receptorovou tyrosinkinasovou (RTK) doménu. Jejich nadexprese nebo konstitutivní aktivace může spustit nádorový proces včetně angiogeneze a metastazování. Takto vzniklé lidské nádory mnoha typů mají špatnou prognózu. Receptor HER-2 neváže žádné známé ligandy, ale je aktivován heterodimerizací s ostatními členy rodiny EGFR. Ačkoliv ligandy pro EGFR, HER-2, HER-3 a HER-4 byly všechny detegovány např. u nádoru prsu, HER-2 a EGFR se ukázaly být nejslibnějšími terapeutickými cíli. V raných klinických studiích léčby metastazujícího nádoru prsu na samotný trastuzumab pozitivně reagovalo 26 % HER-2 pozitivních nemocných a 35 % nemocných, u nichž byla imunohistochemicky nalezena nadexprese HER-2. Kombinace s konvenčními

chemoterapeutiky toto procento zvýšila až na 50 % a prodloužila střední délku přežívání z 20,3 měsíce na 25,1 měsíce¹⁵. Pro léčbu nádoru prsu byl trastuzumab schválen FDA (USA) v roce 1998 a EMA (EU) r. 2000 jako vůbec první protinádorová monoklonální protilátka. Podává se po předchozím zjištění HER-2 pozitivity pacienta. Vyrábí se rekombinantně na kulturách buněk ovarií čínského křečka¹⁶. Cetuximab (Erbix®), užívaný v terapii od r. 2004, je chimérická humánní-myší monoklonální protilátka typu IgG₁ o M_r asi 170 000, cílená proti receptoru EGFR/HER-1. Aktivace tohoto receptoru vede mj. k aktivaci tzv. KRAS (Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homologue). Jedná se o krátký peptid, vážící GTP, jež se účastní transdukce signálu v buňce a stimuluje řadu dalších intracelulárních proteinů, což vyvolává proliferaci, přežívání buněk (potlačení apoptózy) a angiogenezi. Nádory mohou obsahovat i mutantní formy KRAS, jež jsou na EGFR nezávislé. Z toho důvodu se před nasazením protilátek proti EGFR/HER-1 imunochémicky prokazuje přítomnost „divokého“, na EGFR závislého typu KRAS. Afinita vazby cetuximabu na EGFR receptor je přibližně 5 až 10krát vyšší než u endogenních ligandů. Cetuximab blokuje vazbu endogenních ligandů EGFR receptoru, což má za následek inhibiči funkce receptoru. Cetuximab byl schválen FDA i EMA k terapii metastazujícího kolorektálního karcinomu, exprimujícího EGFR^{14,17}. Panitumumab (Vectibix®) je plně humánní protilátka typu IgG₂ rovněž proti EGFR/HER-1. Užívá se k léčbě metastazujícího kolorektálního karcinomu¹⁴. Rovněž prakticky užívaný rituximab (MabThera®, Rituxan®) je chimérická myší monoklonální protilátka typu IgG₁ proti molekule CD20. M_r rituximabu je 144 187. Jde o dimer složený z γ - a κ -řetězce spojených disulfidickým můstkem¹⁸. CD20 je transmembránový neglykosylovaný fosfoprotein o M_r asi 33 000 až 37 000 exprimovaný na povrchu B lymfocytů od stadia pre-B až po zralé B lymfocyty, včetně aktivovaných a paměťových B-buněk, a na nádorových B buňkách. Nevyskytuje se však na normálních plazmatických B lymfocytech. Nádorové B buňky se tvoří při chronické lymfocytární leukémii (CLL); obecně je spojována s nižší mírou genové exprese povrchové molekuly CD20) a při non-Hodgkinských lymfomech, což jsou tumory, u kterých je ve více než v 90 % případů genová exprese povrchové molekuly CD20 vysoká¹⁹. Molekuly CD20 se neodlučují od buněčného povrchu ani nejsou po navázání protilátky internalizovány, tj. vnořeny dovnitř buňky. Rituximab se užívá především k léčbě CLL, což je nejčastější forma leukémie na západní polokouli, a též v léčbě non-Hodgkinských lymfomů v kombinaci s jinými antineoplastiky (fludarabin, cyklofosfamid aj.) nebo i samostatně²⁰. Osvědčil se a v USA byl schválen i pro terapii středně těžké až těžké reumatoidní artritidy v případech, kdy nezbírají anti-TNF léčiva (srv. níže)²¹. V EU i USA užívaný ofatumumab (Arzerra®) je lidská monoklonální protilátka typu IgG₁, která se specificky váže na určité epitopy zahrnující jak malé, tak velké extracelulární klíčky molekuly CD20. Vazba ofatumumabu na proximální membránový epitop molekuly CD20 indukuje nábor a aktivaci metabo-

lické cesty komplementu na povrchu buňky, která vede k cytotoxicitě závislé na komplementu a následné lýze nádorových buněk. Je prokázáno, že ofatumumab způsobuje významnou lýzu buněk s vysokou hladinou exprese ochranných molekul komplementu. Ofatumumab rovněž vykazoval indukci lýzy buněk s vysokou i nízkou expresí CD20, a buněk rezistentních na rituximab. Navíc vazba ofatumumabu umožnila nábor NK buněk (natural killers, podtřída lymfocytů typu T), které umožňují navození buněčné smrti prostřednictvím buňkami zprostředkované na protilátkách závislé cytotoxicity. Přípravuje se rekombinantně na buněčných kulturách z geneticky modifikovaných myších buněk. Používá se k léčbě CLL a non-Hodgkinských lymfomů samostatně nebo v kombinacích²². Ibritumomab tiuxetan (Zevalin®) je rovněž prakticky užívanou protilátkou proti antigenu CD20. Jedná se o myši monoklonální protilátku, konjugovanou chelátem radioaktivního ⁹⁰Y. Jde vlastně o radioterapeutikum, které je díky konjugaci se specifickou protilátkou cíleně distribuováno do nádoru (takových léčiv je v terapii a ve výzkumu více, limitovaný rozsah článku však neumožňuje zabývat se jimi podrobněji). Zevalin je určen k léčbě CD20 pozitivního folikulárního B non-Hodgkinského lymfomu²³. K terapii leukémií se prakticky užívá také alemtuzumab (Mabcampath®), který však působí zcela odlišným mechanismem. Jedná se o humanizovanou protilátku typu IgG₁ proti antigenu CD52. Alemtuzumab byl vytvořen včleněním šesti oblastí podmiňujících komplementaritu (hypervariabilní sekvence), pocházejících z potkaní monoklonální protilátky typu IgG_{2a}, do molekuly lidského imunoglobulinu IgG₁. CD52 je glykoprotein o pouhých 12 aminokyselinových zbytcích v sekvenci, díky rozsáhlému sacharidovému seskupení připojenému na Asn3 však dosahuje M_r 21 000–28 000. Zbytky kyseliny neuraminové (sialové) na koncích sacharidových řetězců udělují glykopeptidu záporný náboj. Na C-konci má pak glykosylfosfatidylinositolovou lipidickou kotvu, kterou je připojen k vnější straně buněčné membrány. CD52 je vysoce exprimován na membránových lipidových raftech všech lymfocytů B a T ve většině stádií jejich diferenciaci (kromě plazmatických buněk), dále je mají makrofágy, eosinofily, přirozené zabíječe a dendritické buňky. Tento antigen byl nalezen též na malém procentu (< 5 %) granulocytů, ale ne na erytrocytech nebo krevních destičkách. Vyskytuje se také v některých buňkách mužského pohlavního ústrojí. Fyziologické funkce CD52 nejsou ještě zcela objasněny, je však známo, že způsobuje lýzu hlavně lymfocytů vazbou na CD52 zejména tam, kde je CD52 vysoce exprimován. Tato lýza je patrně zprostředkována fixací komplementu a protilátkově podmíněnou cytotoxicitou. Alemtuzumab je vyhrazen pro léčbu pacientů s chronickou lymfocytickou leukémií B-buněk (B-CLL), pro něž není vhodná kombinovaná chemoterapie obsahující fludarabin²⁴. Zatím ve 2. fázi klinického zkoušení je katumaxomab (Removab®), trojfunkční potkaní-myší hybridní monoklonální protilátka typu IgG₂ specificky cílená proti epiteliální buněčné adhezni molekule (EpCAM) a proti antigenu CD3. Je produkována potkaní-myší buněčnou linií hybrid-hybridom.

EpCAM je povrchový glykoprotein humánních buněk, exprimovaný u některých „normálních“, zejména ale u nádorových buněk. Tento „pankarcinomatický“ antigen, popsán již roku 1979, se vyskytuje např. prakticky u 100 % ovariálních karcinomů rezistentních na chemoterapii. Molekula CD3 je jedním z modulů pro přenos signálu exprimovaných na zralých T-buňkách. Jedná se o složku receptoru T-buňky. Tento receptor má strukturu multimerního komplexu a je umístěn na povrchu buňky. Za normálních okolností je zodpovědný za rozpoznání antigenu, který je součástí tzv. velkého komplexu histokompatibility (MHC). Pokud se však ligand, jako je katumaxomab, naváže na CD3, T-lymfocyt je stimulován k provedení svých efektorových funkcí (uvolnění cytokinů a/nebo cytotoxicita). Protinádorová aktivita katumaxomabu byla prokázána jak *in vitro*, tak *in vivo*. Efektivní zabíjení buněk tumoru zprostředkované katumaxomabem *in vitro* bylo pozorováno u cílových buněk s nízkou a vysokou expresí antigenu EpCAM nezávisle na typu tumoru. Protinádorová aktivita katumaxomabu byla potvrzena *in vivo* na modelu karcinomu ovaria myši s narušenou imunitou, kde byl rozvoj tumoru opožděn intraperitoneální léčbou katumaxomabem a lidskými mononukleárními buňkami z periferní krve. Katumaxomab je určen k intraperitoneální léčbě maligního ascitu u pacientů s EpCAM pozitivními karcinomy, kde není k dispozici standardní terapie nebo již není dále účinná²⁵.

3. Monoklonální protilátky proti autoimunitním onemocněním a proti odmítnutí transplantovaného orgánu

Jako léky k terapii reumatoidní artritidy, zánětlivých střevních (ulcerativní kolitida, Crohnova choroba), lupénky a dalších zánětlivých onemocnění, u nichž se předpokládá autoimunitní etiologie, se vedle poměrně nepočetné skupiny léčiv charakteru malých molekul užívají protilátky proti tumor-nekrotizujícímu faktoru α (tumour necrosis factor α ; TNF- α). TNF- α je známější a prostudovanější formou TNF (druhou je TNF- β , zvaný též lymfotoxin). TNF- α je peptid složený ze 157 zbytků aminokyselin. Působí jako mediátor imunitních procesů včetně aktivace makrofágů a proliferace T-lymfocytů. Další jeho funkce, od níž pochází i jeho název, je cytotoxický efekt, jenž se projevuje u mnoha typů nádorových buněk. TNF- α je exprimován na aktivovaných makrofázích a T-lymfocytech. Štěpením jeho extracelulární domény proteasami se uvolňuje rozpustný trimerní TNF- α . Obě formy, membránová i volná rozpustná, jsou schopny vazby na receptory (TNFR1 a TNFR2). Prostřednictvím vazby na TNFR je TNF- α mediátorem apoptózy i zánětu a podílí se též na regulaci imunitních funkcí aktivací nukleárního faktoru κ B (NF- κ B), drah MAPK a signálních drah buněčné smrti. Jako typický prozánětlivý cytokin hraje TNF- α významnou roli v ochraně proti infekci a poranění prostřednictvím normálních imunitních odpovědí, avšak dlouhodobě zvýšené hladiny

TNF- α souvisejí s patogenezi mnoha autoimunitních a zánětlivých onemocnění²⁶. V novější době se proto výzkum související s TNF- α soustřeďuje daleko více na jeho úlohu při stimulaci zánětu, zejména u reumatoidní artritidy, ulcerativní kolitidy, Crohnovy nemoci, ankylozující spondylitidy (častý typ revmatického onemocnění obratlů) aj.²⁷ Předmětem zájmu jsou látky blokující účinky TNF- α , na prvním místě monoklonální protilátky proti němu. Tyto protilátky mají cíleně působit proti nadměrným hladinám TNF- α v synoviální tekutině kloubů, ve střevní mukóze apod. a přinést pacientům, trpícím příslušnými autoimunitními zánětlivými chorobami, úlevu. Látky dále uvedené v této podkapitole jsou všechny prakticky užívány k léčbě. Infliximab (Remicade®) je myší/humánní chiméra, kde jsou variabilní oblasti myší protilátky napojeny na konstantní oblasti lidského IgG₁. Podává se nitrožilně každých 6–8 týdnů. Protože se jedná o protilátku chimerní, dochází k tvorbě protilátek proti němu častěji, než u humánních protilátek uvedených níže. Tyto protilátky, řazené do skupiny HACA (humánní protichimerní protilátky; human anti-chimeric antibodies), jsou často schopny infliximab neutralizovat, a tak snížit nebo zcela eliminovat jeho účinnost²⁶. Adalimumab (Humira®) je rekombinantní humánní protilátka typu IgG₁ o M_r asi 148 000, vyráběná na kultuře buněk ovarií čínské křečka. Je indikována k léčbě polyartikulární juvenilní idiopatické artritidy, v podstatě jedné z forem reumatoidní artritidy, vyskytující se u dětí a mladistvých²⁷, v kombinaci s methothrexatem. Podává se injekčně jednou za dva týdny. Protože látky, působící proti TNF, zhoršují obranyschopnost organismu vůči infekcím, je třeba před začátkem terapie vyloučit přítomnost alespoň těch závažných, u tohoto léčiva konkrétně tuberkulózy²¹. Golimumab (Simponi®) je rekombinantní humánní protilátka typu IgG₁ vyráběná myší hybridomovou buněčnou kulturou. Její M_r je asi 150 000 a vyskytuje se v řadě různých glykosylovaných forem. V roce 2009 bylo povoleno jeho užívání k léčbě reumatoidní artritidy, psoriatické artritidy („kloubní forma“ lupénky) a ankylozující spondylitidy v USA, Kanadě i EU. Podává se subkutánně jednou měsíčně pomocí speciálního předplněného pera a aplikaci zvládne pacient sám po předchozím zcviku^{28,29}. Certolizumab pegol (Cimzia®, původně CDP870) je rekombinantní, humanizovaný Fab' fragment protilátky proti TNF (tj. fragment protilátky, obsahující domény nezbytné pro vazbu na antigen, ne však část interagující s efektořem⁷), konjugovaný s polyoxoethylenovým (PEG) řetězcem o M_r asi 40 000. M_r proteinové části je pak 47 696. Je to zatím jediná klinicky užívaná pegylovaná monoklonální protilátka, určená k léčbě zánětlivých onemocnění. Oblasti podmiňující komplementaritu (hypervariabilní oblasti) z myší protilátky byly vloženy do rámce fragmentu Fab' lidského IgG₁ spolu s několika dalšími zbytky variabilní domény, jež byly nezbytné pro zajištění afinity. Následná pegylace je místně specifická, PEG řetězec je navázán na atom síry thiolové skupiny Cys adicí N-[ω -(2-hydroxyethyl)polyoxoethylenyl]maleinimidu na tuto SH skupinu, a tedy je ve výsledku připojen pomocí sukcinimidového „můstku“ s PEG řetězcem na dusíku 1 a sulfidovou sírou

v pol. 3 (cit.³⁰). Proteinová část je vyráběna rekombinantně na *Escherichia coli*. Certolizumab pegol se váže na obě formy TNF- α a neutralizuje je. Následně inhibuje signální cesty přes receptory p55 a p75, což bylo prokázáno *in vitro*³¹. Připojení PEG řetězce prodloužilo eliminační poločas přibližně na dva týdny, takže stačí léčivo podávat jen každé 2–4 týdny. Podává se intravenózně, nebo lépe subkutánně. Pegylace též patrně přispívá k přednostní distribuci látky do zánětlivých tkání, což bylo pozorováno na zvířecích modelech. Certolizumab pegol postrádá Fc část, takže nevyvolává komplementem ani buňkami zprostředkovanou cytotoxicitu. Rovněž není neutralizován křížovou reakcí s protilátkami proti infliximabu³⁰. Léčivo je schváleno v USA, Kanadě a EU pro léčbu středních až těžších forem reumatoidní artritidy, v USA a Švýcarsku též pro terapii Crohnovy nemoci. Dle provedených klinických studií 3. fáze léčivo samotné nebo v kombinaci s methothrexatem přináší pacientům významnou úlevu již v prvním týdnu léčby; v případech zmíněné kombinace významně větší než methothexat kombinovaný s placebem³². Sadu „anti-TNF“ léčiv doplňuje etanercept (Enbrel®), což není monoklonální protilátka jako taková, ale rozpustný dimerní fúzní protein, v němž je část humánní p75 TNF receptor, obsahující vazebné místo pro TNF- α , napojena na Fc (tj. efektorový) fragment humánního IgG₁. Toto biolécivo se však spolu s dalšími modifikovanými receptorovými molekulami, užívanými k léčbě autoimunitních nemocí, již vymyká zaměření tohoto článku. Kanakinumab (ACZ885, Ilaris®) je plně humánní monoklonální protilátka cílená, jak předkmen -ki- naznačuje, proti interleukinům (IL), konkrétně tato proti interleukinu 1 β (IL-1 β). Kanakinumab je vyráběn rekombinantní DNA technologií v myších hybridomech Sp2/0. Jeho mechanismus účinku je založen na potlačení signalizace IL-1 β , což vede k potlačení zánětu u pacientů s autoimunitními nemocemi. IL-1 β je prozánětlivý cytokin, jenž funguje jako mediátor periferní imunitní odpovědi při infekci a zánětu, ale hraje svou roli též u autoimunitních onemocnění, diabetu, neurologických onemocnění a bolesti. Kanakinumab je schválen v USA i EU (prozatím) jako léčivo vzácných autoimunitních nemocí, jež je možno považovat za projevy tzv. periodického syndromu asociovaného s kryopyrinem (CAPS). Z tohoto důvodu bylo léčivo původně schváleno FDA i EMA v režimu tzv. orphan drugs (tzv. léčiv-sirotků), což zahrnuje mj. podporu jejich vývoje z veřejných zdrojů i registraci na základě menšího množství klinických dat, než je obvyklé. Látka je v klinických testech na reumatoidní artritidu, juvenilní idiopatickou artritidu, astma a diabetes³³. Ustekinumab (Stellara®) je plně lidská IgG_{1k} monoklonální protilátka proti IL-12 a IL-23. Je připravována technologií rekombinantní DNA na buněčné kultuře myšího myelomu. Váže se na protein p40, podjednotku, která je stejná u obou zmíněných cytokinů. IL-12 a IL-23 jsou heterodimerické cytokiny, které jsou secernovány aktivovanými buňkami interagujícími s antigenem, jako jsou makrofágy a dendritické buňky. IL-12 a IL-23 se účastní imunologických pochodů tím, že se podílejí na aktivaci natural killer (NK) buněk a diferenciaci a aktivaci lymfocytů T podtypu

CD4+. Dysregulace IL-12 a IL-23 jsou spojeny s chorobami, zprostředkovanými změnou imunity, jako je psoriáza. Ustekinumab zabraňuje IL-12 a IL-23, aby se podílely na aktivaci imunitních buněk intracelulární signalizací a stimulací sekrece dalších cytokinů. Předpokládá se, že ustekinumab tímto mechanismem přerušuje signalizaci a cytokinové kaskády, které jsou významnou součástí patogeneze lupénky. Užívá se k léčbě středně těžké až těžké lupénky tam, kde selhaly jiné prostředky. Látka se podává podkožní injekcí, interval mezi prvními dvěma dávkami je 4 týdny, další se aplikují vždy po 12 týdnech³⁴. Tocilizumab (RoActemra®) se rovněž zapojuje do inhibice zánětu zprostředkovaného interleukiny. Jde o humanizovanou monoklonální protilátku typu IgG₁ o M_r 144 986 proti lidskému receptoru interleukinu 6 (IL-6). Vyrábí se rekombinantní technologií na kultuře ovariálních buněk čínské křečka. IL-6 je prozánětlivý cytokin produkovaný různými typy buněk včetně lymfocytů T a B, monocytů a fibroblastů. IL-6 se účastní mnoha fyziologických procesů, jako je aktivace T-buněk, indukce sekrece imunoglobulinů, indukce syntézy jaterních proteinů akutní fáze a stimulace hemopoézy. IL-6 se podílí na patogenezi onemocnění včetně zánětlivých onemocnění, osteoporózy a nádorů. Tocilizumab se váže specificky jak na rozpustnou, tak i membránovou část receptorů IL-6 (sIL-6R a mL-6R). Inhibuje přenos signálu zprostředkovaného sIL-6R a mL-6R. Tocilizumab je indikován k léčbě středně těžké až těžké reumatoidní artritidy a juvenilní idiopatické artritidy, zpravidla v kombinaci s methotrexatem³⁵. Basiliximab (Simulect®) je protilátka rovněž zapojená v inhibici zánětu zprostředkovaného interleukiny. Jde o rekombinantní myši/lidskou chimérickou monoklonální protilátku proti α řetězci receptoru pro interleukin-2 (antigen CD25), který se vyskytuje na povrchu T-lymfocytů jako odpověď na antigenní podnět. Léčivo je vyráběno na myši myelomové buněčné linii rekombinantní DNA technologií. Basiliximab se specificky váže s vysokou afinitou na antigen CD25 u aktivovaných T-lymfocytů s expresí vysoce afinních receptorů pro interleukin-2 (IL-2R). Tímto způsobem je zabráněno navázání IL-2, což je kritický signal pro proliferaci T-buněk u buněčné imunitní odpovědi v procesu odmítnutí transplantovaného orgánu. Úplná a trvalá blokáda receptorů IL-2 je obvykle do 4–6 týdnů po podání, pak, během 1–2 týdnů, se tvorba antigenu CD25 vrací k hodnotám před terapií. Basiliximab nepůsobí myelosupresi³⁶. Basiliximab je registrován jako léčivo k prevenci odmítnutí transplantovaných orgánů, zejména ledvin a jater. Byly do něj vkládány značné naděje jako do potenciálního léčiva ulcerativní kolitidy, klinické zkoušení je však nepotvrdilo³⁷.

4. Antibakteriální a protivirotové monoklonální protilátky

Raxibacumab (Pending®) je humánní monoklonální protilátka, určena k boji se sněti slezinnou (anthraxem). Tento imunoglobulin G_{1 λ} (IgG_{1 λ}) je cílen proti

„protektivnímu antigenu“, jenž je součástí anthraxového toxinu. Byl úspěšně testován na králících a šimpanzích nakažených vdechovanými spory *Bacillus anthracis* a prošel úspěšně 3. fází klinického zkoušení, byť netypicky na zdravých dobrovolnících. Šlo o tzv. bezpečnostní studii. Byla prokázána jeho účinnost po vystavení zkoumaného subjektu anthraxovým sporám, a to i když bakteriální toxin byl již uvolněn do krve. Stal se součástí strategických zásob civilní obrany USA (Strategic National Stockpile, SNS) pro případ bioterorismu³⁸. Další níže uvedená antiinfektiva zatím nepřekročila hranice klinického zkoušení. Tefibazumab (Aurexis®) je humanizovaná monoklonální protilátka typu imunoglobulinu G₁ (IgG₁), vyvinutá jako léčivo infekcí způsobených odolnými kmeny *Staphylococcus aureus*. Váže se na tzv. agregační faktor A (clumping factor A; CfA) exprimovaný na povrchu mikroba. CfA patří mezi povrchové adhesiny buňky *S. aureus* typu MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), u nichž byla prokázána schopnost interagovat s vysokou afinitou a specifitou s hostitelskými tkáněmi nebo i implantáty. CfA je adhesin vážící se na fibrinogen, považovaný za primární faktor přispívající k mikrobiální kolonizaci implantovaných materiálů nebo poškozených endoteliálních povrchů. U tefibazumu byla ukončena 2. fáze klinického testování proti stafylokokové bakteriémii a cystické fibróze kolonizované zlatým stafylokokem³⁹. Pagibaximab (BSYX-A110) je chimérická monoklonální protilátka proti stafylokokové lipoteichové kyselině (LTA) – důležité složce buněčné stěny stafylokoků. LTA je zakotvena v buněčné membráně lipofilním koncem „liposacharidové kotvy“ – jedná se o molekulu glycerolu esterifikovanou dvěma zbytky delší mastné kyseliny, přičemž třetí hydroxyl glycerolu je připojen na disacharidovou jednotku ze dvou molekul glukosy, na niž je dále navázána polymerní jednotka z molekul fosfatidylglycerolu, esterifikovaných v pol. 2 D-Ala. Počet monomerních jednotek v řetězci se pohybuje mezi 18 a 50 (cit.⁴⁰). LTA inhibuje fagocytózu bakterií *in vitro*, indukuje kaskádu cytokinů a zdá se být nezbytná pro přežívání stafylokoků, též napomáhá průniku stafylokoků přes hematoencefalickou bariéru. Pagibaximab byl testován v použití jako prevence stafylokokové sepse u nedonošených novorozenců s velmi nízkou porodní váhou. Její účinnost byla ověřena zaslepenou klinickou studií¹⁴. Za zástupce protivirotových monoklonálních protilátek lze považovat bavituximab (Tarvacin®). Jde o chimérickou protilátku proti fosfatidylserinu navázanému na plazmatický β_2 -glykoprotein I. Fosfatidylserin (PS I), lipidická látka, v níž jsou první a druhý hydroxyl glycerolu esterifikovány mastnými acyly, a na třetím je přes fragment kyseliny fosforečné navázán Ser přes svůj hydroxyl v poloze 3, je nejrozšířenějším anionickým fosfolipidem buněčných membrán a je přítomen také na obálkách nebo i neobalených virionech mnoha různých virů. PS je normálně uložen intracelulárně, u buněk zasažených virem, kde probíhá replikace, u samotných virionů a u nádorů ale „trčí“ do extracelulárního prostoru, u vaskularizovaných nádorů z lumenálního povrchu endotelu dovnitř do lumen cévy. Toto anomální chování

PS pravděpodobně souvisí se ztrátami intracelulárních Ca^{2+} iontů, k nimž u postižených buněk dochází. Externalizace PS může být také prvním příznakem počínající apoptosy hostitelské buňky. Bavituximab byl navržen jako léčivo hepatitidy C a HIV infekcí a též nádorových onemocnění. Hlavními mechanismy jeho účinku protivirotického působení se zdají být přímé odstranění virionů z krve a protilátkou podmíněná cytotoxicita pro virové buňky⁴¹. Do nynějška proběhlo, nebo právě probíhá 15 klinických studií na jeho účinky proti hepatitidě C a/nebo HIV infekci a různým nádorům (prsů, nemalobuněčnému nádoru plic, nádoru jater, prostaty, slinivky) v USA, Indii, Gruzii, na Ukrajině a v Rusku⁴².

5. Závěr

Bioléčiva zaznamenávají v posledních desetiletích nebyvalý rozvoj. Na pomyslné špičce tohoto trendu se nacházejí právě terapeutické monoklonální protilátky. Od roku 2007 se do klinického zkoušení dostává každoročně kolem 40 nových monoklonálních protilátek. Většina z nich ovšem všemi třemi fázemi klinických testů neprojde, do závěru schvalovacího řízení (nejčastěji u FDA nebo EMA) postoupí ročně asi dvě látky¹⁴. Ostatní buď zůstávají v klinickém zkoušení, přičemž se poměrně často mění onemocnění, vůči němuž se účinnost zkouší, nebo jsou trvale či dočasně opuštěny. Důvody pro ukončení klinického zkoušení mohou být ekonomicko-organizačního rázu; vývojem bioléciv v jeho předklinických a raných klinických fázích se totiž často zabývají menší firmy, které v případě úspěchu nabízejí licenci k prodeji velkým farmaceutickým společnostem, dostatečně kapitálově silným na to, aby zabezpečily klinické studie a registrační proces. Někdy je také biolécivo získáno silnější firmou akvizicí celé původní společnosti, která látku vyvíjela. Ne vždy se ovšem takový proces podaří. Častějším důvodem k zastavení vývoje bývá ale buď nedostatečná (či neprokázaná) klinická účinnost, nebo neakceptovatelné nežádoucí účinky, případně obojí. Obojí též souvisí s imunogenicitou: proti monoklonálním protilátkám se totiž vytvářejí „protilátky proti protilátkám“, které mohou účinek těchto terapeutik neutralizovat, a navíc způsobují nežádoucí účinky, související s tvorbou cytokinů. Podle zdrojového organismu, z něhož léčivo pochází, se takové protilátky označují jako lidské protimýši (human anti-mouse antibodies, HAMA), lidské protipotkaní (human anti-rat antibodies, HARA), lidské protichimérické (human anti-chimeric antibodies, HACA), existují ovšem i lidské protihumánní protilátky (human anti-human antibodies, HAHA). Čím více „zvířecí“ terapeutická protilátka je, tím vyšší imunogenní potenciál lze předpokládat. Proto je vyvíjeno stále více humánních a humanizovaných monoklonálních protilátek (MAb). Zatímco v 80. letech bylo 80 % všech MAb v klinickém vývoji myšního původu, po r. 2000 tento podíl klesl pod 7 % (cit.⁴³). Evropský ani český lékopis s použitím čistě zvířecích protilátek v léčbě lidí už nepočítají^{5,6}. Humanizace však s sebou nese nejen snížení nežádoucí imu-

nogenicity, ale často též účinnosti, takže vyvstává oprávněná obava, že budou-li do předklinického a klinického hodnocení soustavně zařazovány pouze humanizované a humánní formy, dojde k přehlédnutí mnoha nadějných terapeutických cílů⁴³.

LITERATURA

1. Beneš L.: Chem. Listy 101, 18 (2007).
2. Chrástilová Z., Macková M., Šotola J., Král V.: Chem. Listy 101, 25 (2007).
3. Vetchý D., Vetchá M.: Remedica 20, 74 (2010).
4. Fusek M., Káš R., Ruml T.: Bioléciva. VŠCHT, Praha 2008.
5. European Directorate for Quality of Medicines and Health Care: European Pharmacopoeia – 7th Edition with Supplement 7.5 (Council of Europe 2011).
6. Ministerstvo zdravotnictví ČR: Český lékopis 2009. Grada, Praha 2009.
7. Rick N.: Drugs: From Discovery to Approval, 2. vyd. Wiley-Blackwell, Hoboken 2009.
8. World Health Organization: International Nonproprietary Names (INN) for biological and biotechnological substances (a review), INN Working Document 05.179 (WHO 2010).
9. Mahmud N., Klipa D., Ahsan N.: Mabs 2, 148 (2010).
10. Skobe M., Rockwell P., Goldstein N., Vosseler S., Fusenig N. E.: Nat. Med. 11, 1222 (1997).
11. http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000582/WC500029271.pdf, staženo 11. 5. 2012.
12. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/125085s0238lbl.pdf, staženo 13. 8. 2012.
13. Li J., Saif M. W.: Biol.: Targets Ther. 3, 429 (2009).
14. Reichert J. M.: Mabs 3, 76 (2011).
15. O'Donovan N., Crown J.: Anticancer Res. 27, 1285 (2007).
16. Friedländer E., Barok M., Szöllosi J., Vereb G.: Immunol. Lett. 116, 126 (2008).
17. http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000558/WC500029119.pdf, staženo 11. 5. 2012.
18. http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=Search&actionHandle=getAll3DMViewFiles&nextPage=jsp%2Fcommon%2FChemFull.jsp%3FcalledFrom%3D&chemid=0174722317&formatType=_3D, staženo 10. 5. 2012.
19. Beers S. A., Chan C. H., French R. R., Cragg M. S., Glennie M. J.: Semin. Hematol. 47, 107 (2010).
20. Keating G. M.: Drugs 70, 1445 (2010).
21. Agarwal S. K.: J. Manag. Care Pharm. 17, S14 (2011).
22. Veliz M., Pinilla-Ibarz J.: J. Blood Med. 2, 71 (2011).
23. http://www.emea.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/

- human/000547/WC500049469.pdf, staženo 13. 8. 2012.
24. http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000353/WC500025270.pdf, staženo 26. 4. 2012.
 25. Seimetz D.: *J. Cancer* 2, 309 (2011).
 26. Shim H.: *Exp. Mol. Med.* 43, 539 (2011).
 27. Baraliakos X., Braun J.: *Best Pract. Res., Clin. Rheumatol.* 25, 825 (2011).
 28. Mazumdar S., Greenwald D.: *Mabs* 1, 422 (2009).
 29. http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000992/WC500052368.pdf, staženo 29. 4. 2012.
 30. Veronese F. M., Mero A.: *Biodrugs* 22, 315 (2008).
 31. Goel N., Stephens S.: *Mabs* 2, 137 (2010).
 32. Mease P. J.: *Rheumatology* 50, 251 (2011).
 33. Dhimolea E.: *Mabs* 2, 3 (2010).
 34. Martin P. L., Bugelski P. J.: *Br. J. Pharmacol.* 166, 806 (2012).
 35. Navarro-Millán I., Singh J. A., Curtis J. R.: *Clin. Ther.* 34, 788 (2012).
 36. McKeage K., McCormack P. L.: *Biodrugs* 24, 55 (2010).
 37. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01061996?intr=BASILIXIMAB&rank=16>, staženo 14. 8. 2012.
 38. Mazumdar S.: *Mabs* 1, 531 (2009).
 39. John J. F. jr.: *Curr. Opin. Mol. Ther.* 8, 455 (2006).
 40. Xia G., Kohler T., Peschel A.: *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 148 (2010).
 41. Soares M. M., King S. W., Thorpe P. E.: *Nat. Med.* 14, 1357 (2008).
 42. <http://clinicaltrials.gov/search/intervention=tarvacin+OR+Bavituximab>, staženo 11. 5. 2012.
 43. Getts D. R., Getts M. T., McCarthy D. P., Chastain E. M. L., Miller S. D.: *Mabs* 2, 682 (2010).

O. Farsa (*Department of Chemical Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **Therapeutic Monoclonal Antibodies in Treatment and Development**

This review is devoted to the therapeutic use of monoclonal antibodies, which are probably the most important group of biological drugs. Their classification into anti-tumour drugs, therapeutics for chronic inflammatory diseases and anti-infectives, chemical structure and nomenclature are given. The targets of the drugs, such as growth factors, microbial surface and cell wall components, various surface antigens of white blood cells, endothelial cells, tumour necrosis factor and, last but not least, interleukins and their receptors are discussed in detail. In addition to compounds authorized and used in the current treatment practice, also some important biological drugs at any stage of clinical development are presented. Finally, problems related to the formation of anti-drug antibodies in the patient organism are also mentioned.