

## Rola przeciwciał monoklonalnych w transporcie leków do komórek nowotworowych

Marzena Szwed<sup>1</sup>, Agnieszka Marczak<sup>1</sup>, Aneta Rogalska<sup>1</sup>  
Agnieszka Matusiak<sup>2</sup>, Zofia Józwiak<sup>1</sup>

*Pomimo wieloletnich badań dotyczących terapii przeciwnowotworowej niezmienną pozycję w leczeniu nowotworów zajmują małowcząsteczkowe cytostatyki. Ich działanie ogranicza jednak krótki czas półtrwania, mała selektywność i liczne działania niepożądane. Pośród szerokiej gamy chemioterapeutyków najpopularniejsze wydają się być antracykliny, ostatnio coraz częściej stosowane w skojarzeniu z taksanami. Skuteczność oraz selektywność leków istotnie zwiększają makrocząsteczki, stosowane w terapii nowotworowej jako nośniki leków przeciwnowotworowych. Rolę przenośników leków mogą pełnić między innymi przeciwciała monoklonalne (mAb – monoclonal antibody). W niniejszej pracy przedstawiono potencjalne możliwości wykorzystania przeciwciał monoklonalnych i ich immunokoniugatów w leczeniu nowotworów litych i białaczek. Przeciwciała monoklonalne mogą być stosowane jako wolne makrocząsteczki, połączenia lek – przeciwciało, czy immunokoniugaty lek – przeciwciało – biopolimer. Do syntezy immunokoniugatów stosowane są przeciwciała chimeryczne, humanizowane oraz ludzkie. W artykule omówiono kilka wybranych koniugatów przeciwciał monoklonalnych z różnego typu lekami. Szczególną uwagę zwrócono na antracykliny, zarówno te stosowane w terapii od wielu lat, jak i nowe preparaty liposomalne. Omówiono także bardziej złożony system dostarczania leków – terapię ADEPT (Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy). Jej założeniem jest dostarczenie do komórek nowotworowych przeciwciała, połączonego kowalencyjnie ze specyficznym enzymem, którego zadaniem jest przekształcenie proleku w jego aktywną postać.*

*Dane prezentowane w artykule wskazują na coraz szerszy udział przeciwciał monoklonalnych i ich koniugatów z lekami nie tylko w badaniach klinicznych, ale także w terapii nowotworowej. Ponadto, koniugaty dają pacjentom nadzieję na mniej uciążliwą, bardziej selektywną, jak i skuteczniejszą formę terapii.*

### The role of monoclonal antibodies in the transport of drugs to cancer cells

*Despite the everlasting research into anticancer therapy, low-molecular cytostatics retain their unchallenged position. However, their activity is limited by low time-life, poor selectivity and a number of side effects. Among a wide variety of oncolytics the anthracyclines must be regarded as important, especially because they are increasingly used in combination with taxanes. The efficacy and the selectivity of these drugs is significantly increased by the macromolecules which are used as carriers of anticancer agents. Monoclonal antibodies (mAbs) may be attractive as such drug carriers. In this paper we present the potential role of monoclonal antibodies and their immunoconjugates in the treatment of solid tumors and leukaemias. We also show that monoclonal antibodies may be used as single agents, drug-antibody conjugates, or drug-antibody-polymer immunoconjugates.*

*Recent advances in antibody engineering have led to the production of chimeric mAbs, then humanized mAbs and, finally, human mAbs. Our review also presents the current status of knowledge on immunoconjugates of traditional anthracyclines and their new liposomal derivatives and discusses a more complex drug delivery system – ADEPT (Antibody directed enzyme prodrug therapy) the aim of which is to provide therapy with specific pro-drugs which are converted to their active form by the conjugant enzyme.*

*We present indications for the wider application of monoclonal antibodies and their drugs conjugates not only in clinical trials, but in everyday treatment raise hopes for the development of less toxic and more selective and effective forms of therapy.*

**Słowa kluczowe:** przeciwciała monoklonalne, immunokoniugaty, terapia ADEPT, leki przeciwnowotworowe

**Key words:** monoclonal antibodies, immunoconjugates, ADEPT therapy, anticancer drugs

<sup>1</sup> Katedra Termobiologii, Instytut Biofizyki

<sup>2</sup> Zakład Gastroimmunologii

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej

Instytut Mikrobiologii i Immunologii

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

## Wstęp

W leczeniu nowotworów czołową pozycję zajmują małowcząsteczkowe chemiostatyki, będące podstawą chemioterapii. Związki te mogą swobodnie przenikać przez dwuwarstwą lipidową, a jednocześnie ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie, w nieograniczony sposób przemieszczać się w ustroju. Ich mała masa cząsteczkowa, oraz procesy detoksykacji zachodzące w komórce sprawiają, że związki te szybko wnikają do komórek, ale równie szybko są z nich usuwane, co znacznie obniża skuteczność chemioterapii [1]. Wadą stosowanych obecnie cytostatyków jest także ich mała selektywność. Działają one zarówno na komórki nowotworowe, jak i zdrowe. Leki podane w postaci wlewów dożylnych lub doustnie, krążąc po organizmie, wywołują liczne działania niepożądane. Uboczne efekty chemioterapii mogą być wynikiem między innymi uszkodzeń błony śluzowej przewodu pokarmowego (zaburzenia wchłaniania, nudności, wymioty, biegunka), narządów eliminujących leki (zwłóknienie, marskość wątroby, niewydolność nerek), oraz uszkodzeń szpiku kostnego (leukopenia, trombocytopenia, niedokrwistość). Występują również reakcje miejscowe, takie jak zapalenie żył, czy bóle mięśniowe. Wiele leków powoduje także toksyczność swoistą [2]. Przykładem grupy leków wywołujących szczególnie duże zmiany w organizmach pacjentów są antybiotyki antracyklinowe, stosowane od wielu lat w leczeniu licznych nowotworów, zarówno białaczek, jak i guzów łitych. Pomimo dużej skuteczności, działają one jednak jak obosieczny miecz, gdyż powodują kardiomiopatię poantracyklinową [3]. Działania uboczne antracyklin związane są między innymi z wolnymi rodnikami, tworzonymi w wyniku jednoelektronowej redukcji tych leków. Reaktywność utleniająco-redukującą warunkuje układ chinonu, obecny w strukturze antracyklin. W wyniku przeniesienia elektronu z NADH lub NADPH na układ chinonu antybiotyk zostaje przekształcony w semichinon. Szybkiej regeneracji semichinonu towarzyszy redukcja tlenu i powstawanie reaktywnych form tlenu o różnej toksyczności, takich jak anionorodnik nadtlenkowy, nadtlenek wodoru czy wyjątkowo toksyczny rodnik hydroksylowy. Szczególnie narażone na działanie rodników tlenowych jest serce, którego komórki mają obniżony poziom enzymów antyoksydacyjnych: katalazy, peroksydazy glutationowej (GSH-Px), dysmutazy nadtlenkowej (SOD) [4]. Jak groźne są te działania uboczne, świadczyć może raport Amerykańskiego Towarzystwa Kardiologicznego, dotyczący prewencji rozwoju niewydolności serca. W dokumencie tym antracykliny uznano za jeden z ważniejszych czynników ryzyka w patogenezie dysfunkcji mięśnia sercowego. Rokowanie w kardiomiopatii wywołanej antracyklinami jest gorsze niż w pozawałowej niewydolności serca. Prawdopodobieństwo rozwoju niewydolności serca wzrasta wraz z łączną podaną dawką leku. Doksorubicyna (DOX) w stężeniu powyżej 550 mg/m<sup>2</sup> powoduje istotne i nieodwracalne zmiany w komórkach mięśnia serca. Bardzo często dochodzi do przerwania leczenia antracyklinami z uwagi na zbyt duże ryzyko śmierci [5].

W ostatniej dekadzie dużo uwagi poświęcono badaniom mającym na celu polepszenie skuteczności chemioterapii poprzez zwiększenie selektywności cytostatyków i ograniczenie ich skutków ubocznych. Dużym postępem w tej dziedzinie było zastosowanie różnego typu wielkocząsteczkowych przenośników leków. Zadaniem przenośników jest dostarczenie leków w dużym stężeniu do komórek nowotworowych przy jednoczesnej redukcji toksyczności ogólnoustrojowej [6]. Wykorzystanie makrocząsteczek jako elementów składowych systemu dostarczania leków (DDS – Drug Delivery System) przedstawił w 1975 r. Ringsdorf [7]. Zaproponowana metoda podawania leków wzbudziła tak duże zainteresowanie, że w 2003 r. Amerykańska Agencja Rządowa zajmująca się rejestracją leków (FDA – Federal Drug Administration) po raz pierwszy w historii dopuściła do obrotu rynkowego więcej produktów biotechnologicznych niż konwencjonalnych, małowcząsteczkowych leków [8].

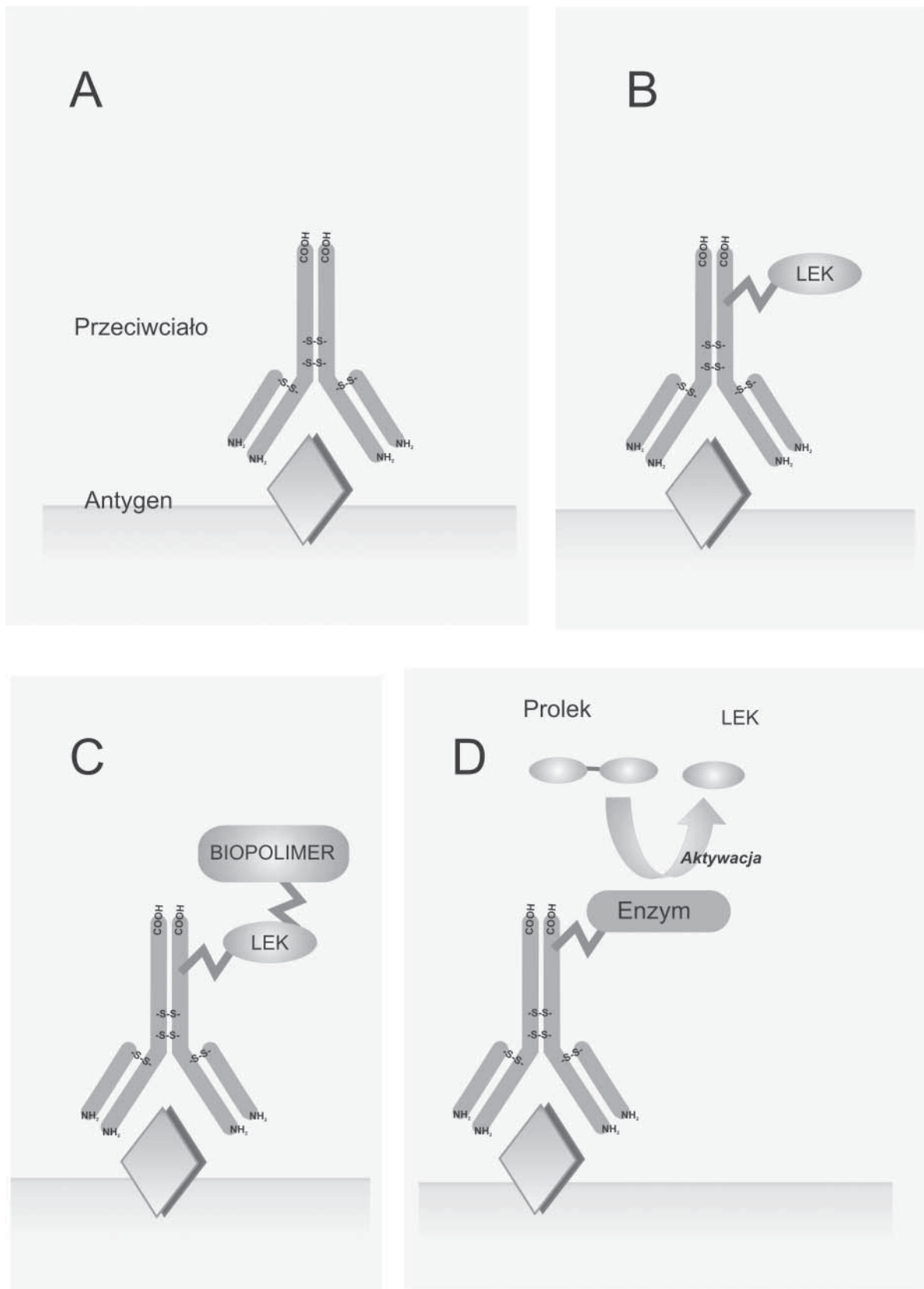
W metodach otrzymywania przenośników wykorzystuje się różne makrocząsteczki, takie jak peptydy, białka, polimery, zarówno naturalne, jak i syntetyczne, które połączone są z lekiem za pomocą wiązania chemicznego [9]. Dużą nadzieję na zwiększenie selektywności leków wzbudziło odkrycie antygenów na powierzchni komórek nowotworowych. Antygeny te po przyłączeniu do właściwych receptorów komórek guza, blokują przekazywanie sygnałów do ich wnętrza, a w konsekwencji hamują rozwój komórek nowotworowych [10]. Przykładem spektakularnego osiągnięcia w dziedzinie immunoterapii przeciwnowotworowej było zastosowanie trastuzumabu (Herceptin<sup>TM</sup>), przeciwciała anti – HER2. Trastuzumab selektywnie przyłącza się do receptora epidermalnego czynnika wzrostowego 2 (HER2/neu), obecnego na powierzchni komórek nowotworowych raka piersi [11].

Tematem niniejszego artykułu są immunokoniugaty, czyli połączenia przeciwciał monoklonalnych (mAb) z lekami przeciwnowotworowymi. Dzięki zwiększonej ekspresji receptorów oraz obecności specyficznych antygenów na powierzchni komórek nowotworowych, leki połączone z przeciwciałem mogą być selektywnie dostarczane do komórek nowotworowych.

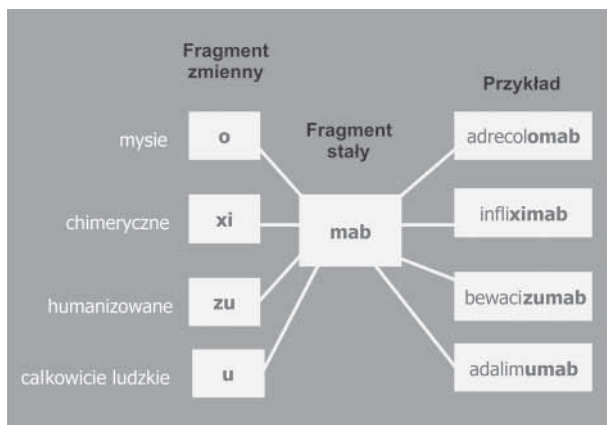
## Immunokoniugaty – podstawowe założenia

Przeciwciała w leczeniu nowotworów mogą być podawane chorym jako pojedyncze cząsteczki, oraz w formie koniugatów lek – przeciwciało, albo lek – przeciwciało – biopolimer. Głównym celem stosowanych koniugatów jest zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia leku (Ryc. 1). Ciekawym rozwiązaniem jest również strategia ADEPT, w której przeciwciało wykorzystywane jest do przenoszenia enzymów, które uwalniają lek z nieaktywnych proleków [12].

Początkowo stosowano tylko przeciwciała mysie, które były jednak bardzo immunogenne dla człowieka [10]. Obecnie dostępne są znacznie mniej immunogenne przeciwciała chimeryczne, humanizowane, oraz ludzkie. Dzięki temu FDA dopuściło kilka przeciwciał monoklonalnych do zastosowania klinicznego. Są to między



**Ryc. 1.** Różnorodne wykorzystanie mAb w terapii przeciwnowotworowej. A. Przeciwciało monoklonalne; B. Bezpośrednie przyłączenie leku do przeciwciała; C. Zastosowanie biopolimeru jako nośnika dla leku w immunokoniugacji; D. Enzym, będący składnikiem koniugatu przekształca prolek w jego aktywną formę – terapia ADEPT (na podstawie [13], zmodyfikowany)



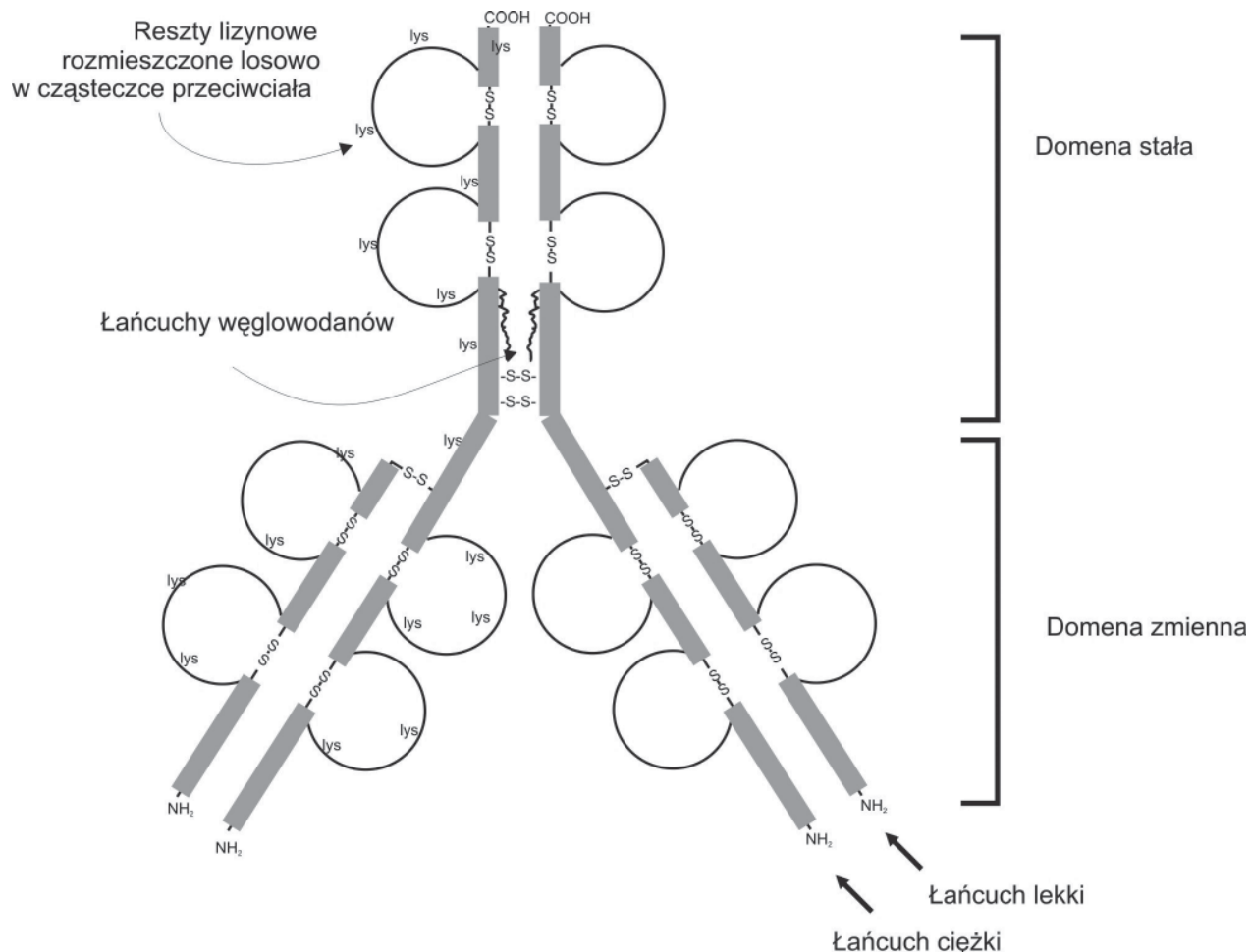
Ryc. 2. Międzynarodowe nazewnictwo przeciwciał monoklonalnych

innymi: trastuzumab, rituximab, bewacizumab, cetuximab [14]. Z uwagi na dużą liczbę przeciwciał stworzono specjalny system nazewnictwa. Wszystkie przeciwciała monoklonalne mają wspólną końcówkę – mab. W przypadku przeciwciała mysiego dodaje się literę „o”, chimerycznego „xi”, humanizowanego „zu”, a ludzkiego „u”, co przedstawia Rycina 2 [10].

Początki prac nad immunokoniugatami były bardzo trudne. Przez długi czas nie cieszyły się one dużym zaufaniem. Przyczyną takiego stanu rzeczy były zbyt małe stę-

żenia leków dostarczane tą drogą do komórek nowotworowych. Dlatego stosowano połączenia przeciwciał tylko z substancjami o wysokiej toksyczności ogólnoustrojowej lub z pierwiastkami promieniotwórczymi [11]. Ponadto pierwsze koniugaty przeciwciał z lekami przeciwnowotworowymi dość wolno docierały do nowotworu. Po jednym dniu od podania pojawiały się w pobliżu naczyń krwionośnych guza, a dopiero po 3 dniach obserwowano je w komórkach nowotworowych. Przyczyną niepowodzeń były także same antygeny. Występują one nie tylko na powierzchni komórek nowotworowych, ale także na zdrowych, co powoduje, że przeciwciała jako nośniki nie są w pełni selektywne. Ponadto komórki nowotworowe charakteryzują się dużą heterogennością, co także może zmniejszyć selektywność koniugatu [15]. Stąd też prowadzone są liczne badania mające na celu otrzymanie skutecznego przenośnika, który charakteryzowałby się wysoką selektywnością, a jednocześnie niską immunogennością.

Większość przeciwciał, wykorzystywanych jako przenośniki leków, należy do grupy immunoglobulin klasy IgG, które występują w największej ilości w ustroju człowieka. Częsteczką IgG jest symetryczną glikoproteiną, kształtem przypominającą literę Y. Zbudowana jest z dwóch lekkich i dwóch ciężkich łańcuchów, połączonych mostkiem disulfidowym (Ryc. 3). Łańcuch ciężki jest



Ryc. 3. Struktura IgG, przedstawiająca potencjalne miejsca biorące udział w reakcji koniugacji (na podstawie [17], zmodyfikowany)

glikozylowany i zawiera domenę stałą (*constant domain*) oraz domenę zmienną (*variable domain*) o wysokim powinowactwie do antygeny [13].

W cząsteczce przeciwciała istnieje kilka potencjalnych miejsc, biorących udział w reakcji koniugacji. Jedną z najczęściej wykorzystywanych pozycji jest grupa  $\epsilon$  – aminowa reszty lizyny (Ryc. 3). Reszta  $\text{NH}_2$  lizyny tworzy wiązanie amidowe z pochodnymi karbodiimidowymi, które do takiego koniugatu mogą wprowadzać grupy tiolowe, do których przyłączane są leki. Jednakże zbyt duża liczba modyfikacji grup  $\epsilon$  – aminowych lizyny może doprowadzić do zmiany właściwości immunoglobuliny. Ponadto, modyfikacja w obrębie lizyny ma jeszcze jeden niekorzystny efekt. Na skutek neutralizacji ładunku dodatniego, zmienia się rozpuszczalność przeciwciała. Inny sposób tworzenia koniugatów polega na wprowadzeniu reszty cukrowej w rejonie zawiasa przeciwciała. Jest to fragment niezwiązany z miejscem wiążącym antygen, dzięki czemu ta modyfikacja nie zmienia swoistości wiązania antygen – przeciwciała. Reszta cukrowa może pośredniczyć w przyłączaniu np. aldehydów [16]. Kolejnym miejscem dołączenia leku jest mostek disulfidowy, obecny w cząsteczce przeciwciała. Odpowiedzialny jest on za zachowanie stabilnej struktury immunoglobuliny. Przyłączenie leku do mostka disulfidowego jest o tyle korzystne, że nie wpływa na swoistość przeciwciała [17].

Niezwykle obiecujące wydaje się być użycie w terapii tzw. przeciwciał monoklonalnych bispecyficznych (o podwójnej swoistości). Jedno ramię skierowane jest przeciwko antygenom na powierzchni guza. Drugie, ma na celu zwiększenie skuteczności antynowotworowej – np. poprzez skierowanie go przeciwko antygenom na powierzchni komórek efektorowych układu immunologicznego [18].

### **Łączniki stosowane podczas syntezy immunokoniugatów**

Przy projektowaniu koniugatów ważne jest, aby lek ulegał aktywacji nie w układzie krwionośnym, ale dopiero po dotarciu do guza. Niezwykle istotny jest więc wybór łącznika między lekiem a nośnikiem [13]. Jedną z najprostszych metod uzyskania połączenia pomiędzy przeciwciałem a lekiem jest bezpośrednia reakcja i utworzenie wiązania peptydowego. Przykładem może być metotreksat (MTX), który posiada wolną grupę karboksylową i może wiązać się z grupą aminową lizyny budującej przeciwciała [19]. Możliwe jest także utworzenie wiązania disulfidowego, co znalazło swoje zastosowanie m.in. w koniugatach przeciwciał z toksynami roślinnymi. Uwolnienie leku z takiego połączenia odbywa się dopiero w środowisku wewnątrzkomórkowym. Koniugat metotreksatu z poli-D lizyną, w którym udział bierze wiązanie disulfidowe, jest degradowany najprawdopodobniej we wnętrzu aparatu Golgiego.

Najlepszym rozwiązaniem wydają się być specjalne łączniki, stabilne w osoczu, które ulegają degradacji wewnątrz lub w pobliżu komórek nowotworowych, pod wpływem np. katepsyn. Łączniki takie to zazwyczaj kilku-

aminokwasowe peptydy lub samoodłączające się związki, które uwalniają leki w kwaśnym środowisku nowotworu, w wyniku enzymatycznej proteolizy lub spontanicznej eliminacji [9].

### **Leiki przeciwnowotworowe przenoszone w immunokoniugatach**

W 2000 r. FDA zarejestrowała pierwszy immunokoniugat. Było to połączenie humanizowanego przeciwciała anty – CD33 i kalicheamycyny [gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®)]. Immunokoniugat zastosowano do leczenia ostrej białaczki szpikowej u chorych w wieku powyżej 60 lat, którzy byli niewrażliwi na terapię innymi chemioterapeutykami [20]. Odłączenie leku ma miejsce w kwaśnym środowisku endosomu. Niestety taki immunokoniugat kalicheamycyny charakteryzuje się małą efektywnością i rzadko bywa stosowany jako jedyny składnik chemioterapii [13].

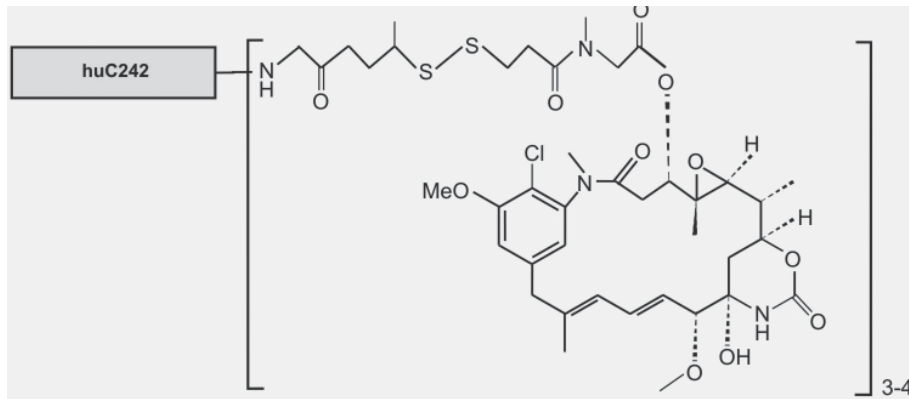
### **Inhibitory mikrotubul**

Do związków o wysokiej toksyczności, które często są składowymi koniugatów z przeciwciałami, należą inhibitory mikrotubul. Do grupy tej można zaliczyć inhibitory depolimeryzacji mikrotubul (np. paklitaksel), oraz ich antagonistów np. alkaloidy *Vinca*, aurystatyny i majtanzynoidy [21].

Majtanzyna wyizolowana po raz pierwszy w 1972 r. z etiopskiego krzewu *Maytenus errata*, jest 19 pierścieniową laktosaminą, należącą do grupy antybiotyków ansamycynowych. Majtanzyna odwracalnie wiąże się z tubuliną i w konsekwencji doprowadza do zatrzymania mitozy. W strukturze analogów majtanzynoidów niezmiennym elementem jest estrowy łańcuch przy węglu C3, który najprawdopodobniej odpowiedzialny jest za cytotoksyczne właściwości tych związków. Większość połączeń majtanzynoidów z przeciwciałami odbywa się za pośrednictwem krótkowęglowych łączników, w których niezbędnym elementem jest obecność wiązania disulfidowego. Kwaśne środowisko endosomu, bądź lizosomu sprzyja odłączeniu się leku i umożliwia jego aktywację w komórkach nowotworowych [22].

Inny związek z tej grupy, cantuzumab, zbudowany jest z majtanzynoidu (DM1), połączonego wiązaniem disulfidowym z grupą  $\epsilon$ -aminową lizyny humanizowanego przeciwciała C242 (Rys. 4), dla którego docelowym antygenem jest CanAg. Najbardziej prawdopodobnym mechanizmem uwalniania leku jest odłączenie leku w kwaśnym środowisku endosomu [13].

Do immunokoniugatów majtanzynoidów należy także huN901-DM1, w którym humanizowane przeciwciała, wykazujące powinowactwo do antygeny CD56, połączone jest z majtanzynoidem DM1. Badania dotyczące tego koniugatu, będące obecnie w I/II fazie badań klinicznych, potwierdziły jego toksyczne działanie w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc [23]. W raku prostaty natomiast bardzo dobre efekty uzyskuje się stosując koniugat MLN-2704, w którym humanizo-



Ryc. 4. Budowa cantuzumabu (nuC242-DM1) (na podstawie [13])

wane przeciwciało, skierowane przeciwko antygenowi PSMA, jest związane z majtanzynoidem DM1 [24].

Znane są także koniugaty z aurystatynami, np. z jedynometylowaną aurystatyną E (MMAE – *monomethyl auristatin E*). Są one około 50-200 razy bardziej toksyczne niż alkaloidy *Vinca*. Ich działanie polega na hamowaniu polimeryzacji tubulin, co zapobiega formowaniu się aparatu mitotycznego. Do otrzymania koniugatów z tym lekiem wykorzystuje się chimeryczne, monoklonalne przeciwciało cAC10, które reaguje z antygenem CD30+. Lek jest selektywnie odłączany od przeciwciała przez specyficzne enzymy proteolityczne, np. katepsynę B [25].

#### Antagoniści kwasu foliowego

Metotreksat (MTX) był jednym z pierwszych leków cytostatycznych, który został skoniugowany z przeciwciałem. Używając przeciwciała T101 oraz peptydowego łącznika otrzymano połączenie, w którym na 1 mol przeciwciała przypadało 10-15 moli leku. Niestety okazało się, że taki koniugat był 100 razy mniej cytotoksyczny niż wolny lek. Wykazano, że immunokoniugaty zawierające pochodne hydroksyloaminowe są mniej cytotoksyczne, z powodu degradacji wiązania estrowego w cząsteczce przeciwciała. Inny antymetabolit kwasu foliowego – aminopteryna (AMN), ze względu na zbyt wysoką toksyczność ogólnoustrojową, może być stosowana tylko w postaci koniugatów. Porównanie toksycznego działania immunokoniugatów: anty-receptory lektynowe (anty – Ly 2.1) z aminopteryną oraz z metotreksatem wykazało, że immunokoniugaty AMN są mniej cytotoksyczne, niż wolna forma tego leku, ale o wiele bardziej toksyczne niż ich metotreksatowe odpowiedniki. Ponadto koniugaty aminopteryny wydają się skuteczniej hamować proliferację komórek nowotworowych i przerzutowanie grasiczaka niż MTX [17].

#### Immunokoniugaty antracyklin

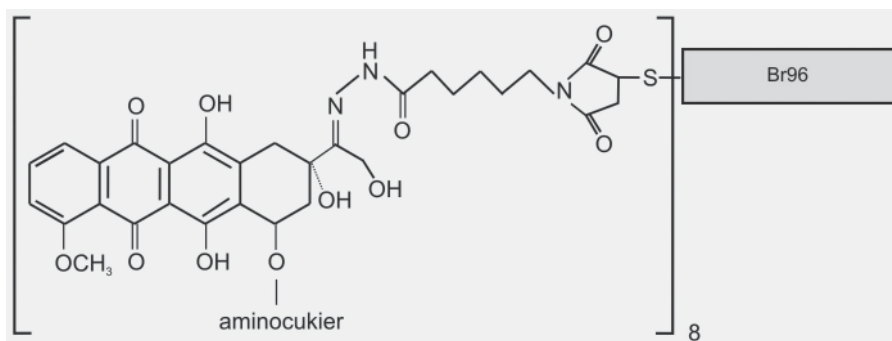
Do otrzymywania immunokoniugatów antracyklin używana jest najczęściej doksorubicyna i daunorubicyna (DNR). Różnią się one zakończeniem łańcucha bocznego w pozycji C-9, którym w przypadku DOX jest pierwszorzędowa grupa alkoholowa, natomiast w daunorubicynie

jest to grupa metylowa [26]. We wczesnej fazie badań immunokoniugatów z antracyklinami najbardziej rozpowszechnione były 3 sposoby ich syntezy:

- 1) utlenienie reszty cukrowej antracykliny, skoniugowanie jej z resztą lizynową przeciwciała oraz powstanie zasady Shiffa;
- 2) połączenie grupy aminowej reszty cukrowej antracykliny z resztą lizyny przeciwciała za pomocą aldehydu glutarowego;
- 3) połączenie grupy aminowej reszty cukrowej antracykliny z resztą lizyny cząsteczki przeciwciała poprzez ugrupowanie karbodiimidowe [17].

Aktywność koniugatów była zależna od stopnia utlenienia leków podczas ich syntezy. Najskuteczniejsze okazały się koniugaty daunorubicyny, uzyskiwane za pomocą aldehydu glutarowego, jako łącznika. Działanie przeciwnowotworowe tych koniugatów, między innymi na komórki białaczki typu PC – 5, było większe niż wolnego leku. Innym sposobem dołączenia daunorubicyny do przeciwciała monoklonalnego jest zastosowanie łącznika cis-akonitylowego. Pierwszym etapem syntezy koniugatu było utlenienie reszty cukrowej leku, a następnie redukcja tego ugrupowania, przy jednoczesnym utlenieniu grupy aminowej do etylowanej tiaminy. Pochodna estrowa daunorubicyny – akonitolowa daunorubicyna była dołączana do immunoglobuliny T 101, skierowanej przeciw antygenowi CD5. Otrzymany immunokoniugat, nawet przy stosunku molowym: lek – przeciwciało 25:1 w pełni zachowywał aktywność przeciwnowotworową. Badania prowadzone na zwierzętach wykazały, że spośród 25 zwierząt u 14 obserwowano pozytywną odpowiedź w postaci regresji guza, natomiast u 3 osobników stwierdzono obniżoną wrażliwość na immunokoniugat [17].

W przypadku DOX szczególnym zainteresowaniem cieszy się przeciwciało Br64, skierowane przeciwko antygenom Y Lewisa. Porównując cytotoksyczny efekt doksorubicyny wolnej i skoniugowanej z tym przeciwciałem na komórki raka piersi MCF-7 oraz komórki raka płuc L2897 wykazano, że koniugat był bardziej skuteczny niż wolna postać leku [27]. Prowadzono również liczne badania dotyczące immunokoniugatów antracyklin, do syntezy których użyto różnego typu łączników. Dołączenie heterobifunkcyjnych związków, np. kaprylo-maleimido-



Ryc. 5. Budowa immunokonjugatu DOX z przeciwciałem Br96 (na podstawie [13])

wych, do DOX, połączonej z przeciwciałem łącznikiem hydrazonowym, doprowadziło do powstania disulfidowych lub tioeterowych koniugatów. W warunkach *in vivo* obserwowano spadek specyficzności immunokonjugatów do antygeny na powierzchni komórek guza po czterech godzinach od ich podania, z powodu uwalniania się DOX z koniugatu.

Przeciwciało Br64, ze względu na oddziaływanie z receptorami komórek mięśnia sercowego, zastąpiono przeciwciałem Br96, o niższym powinowactwie do komórek zdrowych (Ryc. 5) [13]. Badania oddziaływań koniugatu DOX z komórkami prawidłowymi, które posiadają antygeny podobne do antygenów Lewis Y (np. komórki serca, czy komórki wątroby), wykazywały w nich znacznie niższy poziom DOX, podanej w formie koniugatu, aniżeli wolnego leku. Natomiast immunokonjugat szczególnie dobrze sprawdza się w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuc i raka piersi [27].

Do syntezy koniugatów próbowano również wykorzystać antygen Midkin. Jest on rozpoznawalny przez receptor czynnika wzrostu, zależny od heparyny i występuje w zwiększonej ilości na powierzchni wielu guzów litych. Przeciwciało anti-Midkin połączono z DOX za pomocą łącznika maleimidowego. Badania wykonane na komórkach linii raka wątroby (HepG2) (*Human hepatocellular*) wykazały małą toksyczność koniugatu. Stwierdzono, że otrzymane immunokonjugaty łączyły się z N-terminalną częścią antygeny Midkin, zamiast z aktywną jednostką receptora znajdującą się w jego domenie C-terminalnej [28].

Od dawna podejmowane są próby mające na celu poprawę indeksu terapeutycznego stosowanych cytostatyków. Poza ingerencją w budowę chemiczną leków i poszukiwaniami nowych pochodnych o lepszych właściwościach farmakokinetycznych, powstają preparaty o powolnym uwalnianiu substancji czynnej. Do jednych z najbardziej interesujących nośników dla leków należą liposomy. Obecnie w postaci liposomalnej dostępne są: daunorubicyna (DaunoXome), doksorubicyna (Doxil oraz Myocet), a z leków nie będących cytostatykami amfoterycyna B (Ambisome – Heksal) [29]. Preparat Doxil od kilkunastu już lat stosowany jest w klinikach onkologicznych, zarówno w Stanach Zjednoczonych, jak i w Unii Europejskiej. W celu zwiększenia jego efektywności połączono DOX ze specyficznym przeciwciałem 2C5 (2C5-DOXLCL). W porównaniu z preparatem Doxil, w drugim etapie

badania klinicznych 2C5-DOXLCL okazał się od 3 do 8 razy bardziej efektywny w komórkach nowotworowych linii raka piersi (MCF-7, BT – 20, 4T1), raka prostaty (PC-3) oraz szpiczaka LL-3 [30]. Obiecująco zakończyły się także próby na myszach z guzem mózgu człowieka U-78 MG, gdzie immunokonjugat 2C5-DOXLCL był bardziej cytotoksyczny i zwiększał wewnątrzkomórkowy poziom leku w tkance guza [31].

### Przekształcenie proleku w formę aktywną – terapia ADEPT

Znacznie bardziej selektywną metodą chemioterapii jest terapia ADEPT, opisana przez Bagshawe i wsp. [32]. Zasadniczym celem tej terapii jest przekształcenie w komórkach nowotworowych mało toksycznych proleku w aktywną formę, z udziałem enzymów kowalencyjnie przyłączonych do monoklonalnych przeciwciał. Pierwszy etap polega na wprowadzeniu enzymu skoniugowanego z przeciwciałem monoklonalnym, rozpoznającym specyficzne antygeny obecne na powierzchni komórek nowotworowych. Następnie aplikuje się nieaktywną formę leku, która jest enzymatycznie przekształcana w postać aktywną. Konwersję proleku przeprowadza związany z przeciwciałem enzym [33] (Ryc. 1D). Warunkiem koniecznym pozytywnej terapii jest wybór enzymu o wysokiej specyficzności do proleku, który dokona przekształcenia go w aktywną formę bez wywołania odpowiedzi immunologicznej. W terapii ADEPT najczęściej stosowane są enzymy, które nie występują naturalnie w miejscu docelowym, np. bakteryjna  $\beta$ -laktamaza, czy karboksypeptydaza G2 (Tab. I). Ważne jest także zachowanie odstępu czasowego pomiędzy podaniem koniugatu przeciwciało-enzym i proleku, co pozwala to na dotarcie immunokonjugatu do tkanki nowotworowej.

Oprócz enzymów do przeciwciał mogą być dołączone cytokiny. Są to zazwyczaj małowcząsteczkowe białka lub peptydy, warunkujące wzajemne oddziaływanie i wpływające na funkcje różnych komórek organizmu. Cytokiny uczestniczą głównie w regulacji proliferacji, różnicowania i aktywacji komórek układu immunologicznego. Ponadto cytokiny, np. TNF  $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ), interferon  $\gamma$ , interleukina-2, stabilizują immunokonjugat w osoczu, wydłużając przy tym jego czas półtrwania, a jednocześnie pobudzają do działania komórki efektorowe układu immunologicznego [14].

Tab. I. Wybrane enzymy biorące udział w terapii ADEPT (na podstawie [34], zmodyfikowany)

Nazwa enzymu	Działanie	Prolek	Lek w formie aktywnej
Fosfataza alkaliczna	Hydroliza grup fosforanowych	Fosforan etopozydu Fosforan doksorubicyny	Etopozyd Doksorubicyna
Karboksypeptydaza G2	Cięcie pomiędzy resztą glutamylową, a zasadami aromatycznymi	Kwas 4-[(2-mezylksyetylo)-(2-chloroetylo) amino] benzoilglutaminowy	Kwas 4-[(2-mezylksyetylo)-(2-chloroetylo) amino]-benzoesowy
B – laktamaza	Cięcie w obrębie łańcucha laktaminowego	Hydrazyd deacetylwinblastyny	Cefalosporyna, alkaloid Vinca
Deaminaza cytozyny	Deaminacja cytozyny do uracylu	5-fluorocytozyna	5-fluorouracyl
Karboksypeptydaza A	Cięcie peptydów z ugrupowaniem $\alpha$ -glutamylowym	$\alpha$ -alanina metotreksatu	Metotreksat

## Podsumowanie

Prezentowane w pracy dane wskazują, że immunoterapia wpisuje się coraz silniej w kanon technik terapeutycznych, stosowanych we współczesnej onkologii. Na razie, w zdecydowanej większości przypadków, pełni ona jedynie rolę wspomagającą dla leczenia konwencjonalnego (chemioterapii, radioterapii i postępowania chirurgicznego). Do syntezy immunokoniugatów stosuje się związki o wysokiej toksyczności ogólnoustrojowej, takie, jak kalicheamycyna, majtanzynoidy, antracykliny, toksyny bakteryjne, czy grzybicze. W formie immunokoniugatów wydają się efektywnie działać zarówno na białaczki, jak i na guzy lite. Dla uniknięcia nieswoistego łączenia się z tkankami, cytostatyki poddaje się licznym modyfikacjom. Aby ograniczyć odpowiedź ze strony układu immunologicznego, przeciwciała wykorzystywane do reakcji koniugacji z lekami są zazwyczaj chimeryczne lub humanizowane. Immunokoniugaty, w skład których wchodzi cząsteczki polimerów, np. HPMA albo łączniki tetrapeptydowe (Gly–Phe–Leu–Gly), są często odłączane przy udziale lizosomalnych enzymów, np. katepsyny B. Połączenia te znajdują się obecnie w I lub II fazie badań klinicznych i ciągle trwają badania nad poszerzeniem ich profilu toksyczności. Najpoważniejszym objawem ubocznym po leczeniu immunokoniugatami jest zespół przesiąkania naczyniowego (VLS – *vascular leak syndrome*), który charakteryzuje się zwiększoną przepuszczalnością naczyń krwionośnych. Efekt ten jest zależny od stosowanej dawki. VLS występuje w wyniku uszkodzenia i śmierci komórek śródbłonna, wywołanych bezpośrednio aktywnością enzymatyczną toksyn lub niekontrolowanym uwolnieniem leku z cząsteczki immunokoniugatu. Niewątpliwie jednak można stwierdzić, że terapia z wykorzystaniem immunokoniugatów zmierza w swych głównych założeniach do zniesienia uciążliwych dla pacjenta i niepożądanych efektów ubocznych, które towarzyszą standardowym metodom leczenia chorób nowotworowych.

**Mgr Marzena Szwed**

Katedra Termobiologii, Instytut Biofizyki  
Uniwersytet Łódzki  
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź  
e-mail: szwedma@biol.uni.lodz.pl

## Piśmiennictwo

- Das M, Mohanty C, Sahoo SK. Ligand-based targeted therapy for cancer tissue. *Expert Opin Drug Deliv* 2009; 6: 285-304.
- Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur J Pharm Biophar* 2009; 3: 3409-19.
- Polyzos A, Gogas H, Markopoulos CI i wsp. Salvage chemotherapy with oxaliplatin and capecitabine for breast cancer patients pretreated with anthracyclines and taxanes. *Anticancer Res* 2009; 29: 2851-56.
- Mordente A, Meucci E, Silvestrini A i wsp. New developments in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Curr Med Chem* 2009; 16: 1656-72.
- Szmit S, Szczylik C. Doksorubicyny pegylowane, a ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych. *Wsp Onkol* 2009; 13: 1-8.
- Łubgan D, Marczak A, Distel L i wsp. Transferrin conjugates in the anticancer therapy. *Post Biochem* 2006; 52: 72-9.
- Nevozhay D, Kańska U, Budzyńska R i wsp. Współczesny stan badań nad koniugatami i innymi systemami dostarczania leków w leczeniu schorzeń nowotworowych i innych jednostek chorobowych. *Post Hig Med Dośw* 2007; 61: 350-60.
- Duncan R, Vicent MJ, Greco F i wsp. Polymer-drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 189-99.
- Rogalska A, Marczak A, Szwed M i wsp. Rola peptydów w selektywnym dostarczaniu antracyklin do komórek nowotworowych. *Post Biol Kom* 2009; 36: 465-82.
- Sosińska-Mielcarek K, Jassem J. Przeciwciała monoklonalne w leczeniu nowotworów litych. *Onkol Prakt Klin* 2005; 1: 225-32.
- Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2: 750-63.
- Juillerat-Jeaneret L, Schmitt F. Chemical modification of therapeutic drugs or drug vector systems to achieve targeted therapy: looking for the grail. *Med Res Rev* 2007; 27: 574-90.
- Kratz F, Muller IA, Ryppa C i wsp. Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. *Chem Med Chem* 2008; 3: 20-53.
- Friedlos F, Davies L, Scanlon I. Three new prodrugs for suicide gene therapy using carboxypeptidase G2 elicitor. *Cancer Res* 2002; 62: 1724-9.
- Chen J, Jaracz S, Zhao X. i wsp. Antibody-cytotoxic agent conjugates for cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv* 2005; 2: 873-90.
- Hamann PR, Hinman LM, Beyer CF i wsp. An anti-MUC1 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of solid tumors. Choice of linker and overcoming drug resistance. *Bioconjugate Chem* 2005; 16: 346-53.
- Garnett MC. Targeted drug conjugates: principles and progress. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 53: 171-216.
- Vallera DA, Chen H, Sicheneder AR i wsp. Genetic alteration of a bispecific ligand-directed toxin targeting human CD19 and CD22 receptors resulting in improved efficacy against systemic B cell malignancy. *Leukemia Res* 2009; 33: 1233-42.
- Ryser HJ, Shen WC. Conjugation of methotrexate to poly (L-lysine) as a potential way to overcome drug resistance. *Cancer* 1980; 45:1207-11.
- Sumi M, Ichikawa N, Nasu K i wsp. Gemtuzumab ozogamicin-induced long-term remission in a woman with acute myelomonocytic leukemia and bone marrow relapse following allogeneic transplantation. *Int J Hematol* 2009; 90:643-47
- Nakagawa-Kyoko G, Nakamura S, Bastow KF i wsp. Antitumor agents 256. Conjugation of paclitaxel with other antitumor agents: Evaluation of novel conjugates as cytotoxic agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17: 2894-98.



22. Cassady JM, Chan KK, Floss HG i wsp. Recent developments in the maytansinoid antitumor agents. *Chem Pharm Bull* 2004; 52: 1-26.
23. Ishitsuka K, Jimi S, Goldmacher VS i wsp. Targeting CD56 by the maytansinoid immunoconjugate IMGN901 (huN901-DM1): a potential therapeutic modality implication against natural killer/T cell malignancy. *Br J Haematol* 2008; 141:129-31.
24. Henry MD, Wen S, Silva MD i wsp. Prostate-specific membrane antigen-targeted monoclonal antibody-chemotherapeutic conjugate designed for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 7995-8001.
25. Francisco JA, Cerveny CG, Meyer DL i wsp. cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood* 2003; 15: 1458-65.
26. Szulawska A, Czyż M. Molekularne mechanizmy działania antracyklin. *Post Hig Med Dośw* 2006; 60: 78-100.
27. Muldoon LL, Neuwelt EA. Br96-DOX immunoconjugate targeting of chemotherapy in brain tumor models. *J Neurooncol* 2003; 65: 49-62.
28. Inoh K, Muramatsu H, Torii S i wsp. Doxorubicin-conjugated anti-midkine monoclonal antibody as a potential anti-tumor drug. *Jpn J Clin Oncol*. 2006; 36: 207-11.
29. Potemski P, Płuźańska A. Doksorubicyna liposomalna – właściwości i zastosowania kliniczne. *Onkologia Polska* 1999; 2: 127-32.
30. Tamer A, Torchilin E, Torchilin VP. Enhanced cytotoxicity of monoclonal anticancer antibody 2C5-modified doxorubicin-loaded PEGylated liposomes against various tumor cell lines. *Eur J Pharm Sci* 2007; 32: 159-68.
31. Bhawna G, Torchilin VP. Monoclonal antibody 2C5-modified doxorubicin-loaded liposomes with significantly enhanced therapeutic activity against intracranial human brain U-87 MG tumor xenografts in nude mice. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 1215-23.
32. Bagshawe KD, Surinder KS, Burke PJ i wsp. Developments with targeted enzymes in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 1999;11: 579-83.
33. Rooseboom M, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. *Pharmacol Rev* 2004; 56:53-102.
34. McCarron PA, Olwill SA, Marouf WMY i wsp. Antibody conjugates and therapeutic strategies. *Mol Interv* 2005; 5:368-80.

Otrzymano: 10 marca 2010 r.

Przyjęto do druku: 7 kwietnia 2010 r.