

Piotr J. Wysocki

Klinika Onkologiczna, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Mechanizmy działania przeciwciał monoklonalnych w nowotworach litych

Monoclonal antibodies in medical oncology — mechanism of action

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. n. med. Piotr J. Wysocki
 Klinika Onkologiczna
 Centrum Onkologii — Instytut
 im. Marii Skłodowskiej-Curie
 ul. Wawelska 15, 02-034 Warszawa
 e-mail: pwysocki@coi.pl

STRESZCZENIE

Wprowadzenie przeciwciał monoklonalnych do arsenału terapii systemowych stanowiło niewątpliwą przełom w onkologii. W przypadku wielu nowotworów leki te umożliwiły znaczącą poprawę rokowania chorych. Chociaż pierwotnie zakładano, że przeciwnowotworowy mechanizm działania przeciwciał będzie polegał wyłącznie na wiązaniu i unieczynnianiu określonych białek (receptorów) na powierzchni komórek nowotworowych, okazało się, że efekt biologiczny tych leków jest znacznie bardziej skomplikowany. W ostatnim czasie coraz większe znaczenie przypisuje się mechanizmom immunologicznym jako istotnym czynnikom wpływającym na efektywność przeciwnowotworową przeciwciał. Wykorzystanie przeciwciał monoklonalnych w celowanej immunoterapii oraz opracowanie technologii umożliwiających sprzężanie przeciwciał z lekami cytotoksycznymi otworzyło nową erę w molekularnie ukierunkowanym leczeniu nowotworów. Niniejszy artykuł omawia mechanizmy działania przeciwciał monoklonalnych stosowanych w leczeniu nowotworów litych.

Słowa kluczowe: przeciwciała monoklonalne, onkologia, nowotwór, ADCC, mechanizm

ABSTRACT

Introduction of monoclonal antibodies into the armamentarium of systemic therapies has marked a breakthrough in oncology. In the case of several cancer types, monoclonal antibodies have significantly improved patients' prognosis. Initially, antibodies were supposed to interact solely with surface molecules (receptors) acting as cytostatic drugs. However, it turned out that these immunologic agents attract and activate immune mechanisms involving antibody-dependent cellular cytotoxicity or complement activation.

Key words: monoclonal antibodies, oncology, cancer, ADCC, mechanism

Onkologia w Praktyce Klinicznej
 2014, tom 10, nr 4, 175–183
 Copyright © 2014 Via Medica
 ISSN 1734-3542
 www.opk.viamedica.pl

Onkol. Prak. Klin. 2014; 10, 4: 175–183

Wstęp

Pod koniec XIX wieku Paul Ehrlich po raz pierwszy opisał możliwość istnienia przeciwciał. Zdefiniował je jako potencjalne magiczne naboje (*magic bullets*), które mogłyby być wykorzystywane w leczeniu celowanym między innymi nowotworów, umożliwiając jednocześnie oszczędzanie zdrowych tkanek [1]. Pierwsze próby stosowania przeciwciał uzyskanych od zwierząt immunizowanych zdefiniowanymi antygenami okazały się jednak porażką. Surowica zwierząt nie tylko nie umożliwiała osiągnięcia zakładanych efektów klinicznych, ale przede wszystkim prowadziła do poważnych powikłań,

takich jak na przykład choroba posurowicza czy ciężkie reakcje nadwrażliwości. Ponowne zainteresowanie terapeutycznym zastosowaniem przeciwciał pojawiło się w połowie lat 70. ubiegłego wieku, kiedy to Kohler i Milstein opisali technikę produkcji mysich przeciwciał na podstawie hybrydom (fuzja mysich limfocytów B z komórkami nowotworowymi) [2]. Technologia ta pozwalała na uniesmiertelnienie produkujących przeciwciała komórek plazmatycznych uzyskanych od immunizowanych myszy. Jednocześnie umożliwiała ona także wyselekcjonowanie klonów komórek produkujących przeciwciała o zdefiniowanej swoistości i wysokim powinowactwie do określonych antygenów.

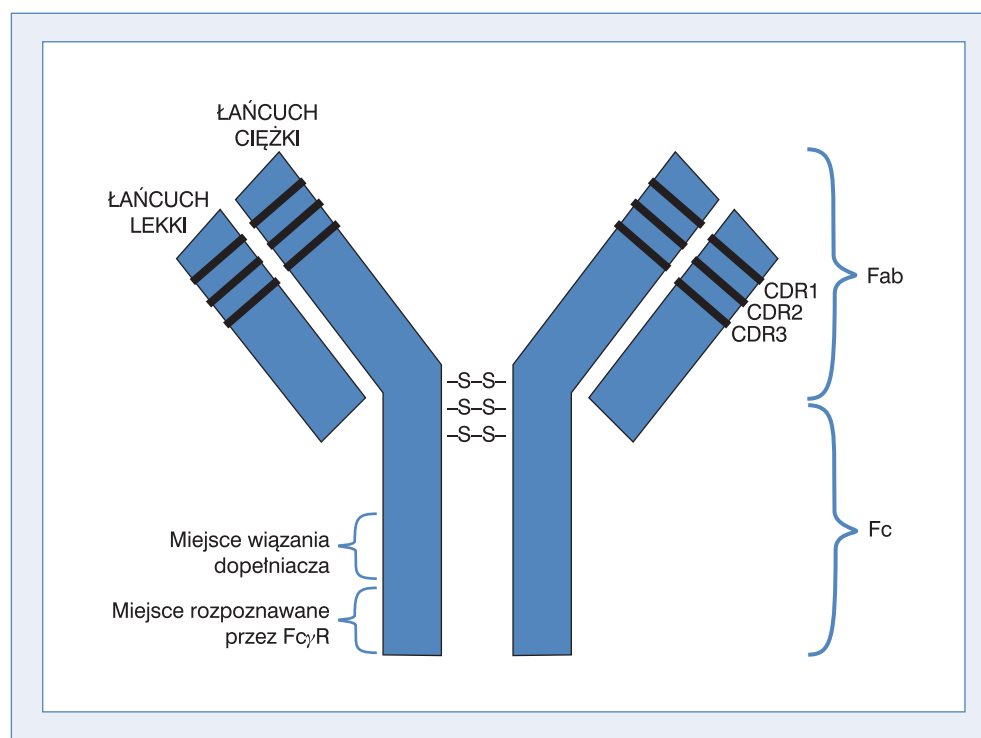
Niezadowalająca efektywność terapeutyczna pierwszych przeciwciał wynikała z wysokiej immunogenności białka mysiego, które w organizmie chorego indukowało przeciwciała neutralizujące [3]. Postęp w zakresie biologii molekularnej i biotechnologii umożliwił produkcję rekombinowanych przeciwciał, w których sekwencja mysia była sukcesywnie zastępowana przez sekwencję ludzką [4]. Dzięki temu możliwa stała się produkcja wysoce swoistych, bezpiecznych przeciwciał dla celów terapii nowotworów.

Podstawowym założeniem wykorzystania przeciwciał monoklonalnych w onkologii był ich potencjał do neutralizacji białek (głównie receptorów) błonowych regulujących wzrost komórek nowotworowych. Z założenia samodzielna blokada aktywności receptorów dla czynników wzrostu powinna prowadzić do zahamowania wzrostu komórek oraz apoptozy, bez potrzeby aktywacji mechanizmów immunologicznych.

Budowa przeciwciał monoklonalnych

Przeciwciała (immunoglobuliny) są zbudowane z 4 łańcuchów polipeptydowych: 2 lekkich i 2 ciężkich połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi (ryc. 1). Stosowane w praktyce klinicznej rekombinowane przeciwciała monoklonalne są przeciwciałami klasy IgG. W obrębie IgG wyróżnia się 4 podklasy (IgG1–IgG4).

W łańcuchach lekkich i ciężkich przeciwciała można wyróżnić części zmienne leżące w odcinku N-końcowym oraz części stałe zlokalizowane w odcinku C-końcowym. W obrębie przeciwciała można wyróżnić fragmenty Fab (wiążące antygen), składające się z łańcucha ciężkiego oraz lekkiego, oraz fragment Fc (rozpoznawany przez receptory Fc γ R), składający się z łańcuchów ciężkich. We fragmencie Fc znajdują się odcinki odpowiedzialne za aktywację dopełniacza, a także za wiązanie z komórkowymi receptorami dla fragmentu Fc przeciwciał (Fc γ R). Swoistość przeciwciała wynika bezpośrednio z konfiguracji przestrzennej części zmiennych łańcuchów ciężkich i lekkich. Zależy ona od kolejności aminokwasów w tych częściach łańcuchów. Część zmienna składa się z 3 regionów hiperzmiennych tak zwanych regionów warunkujących komplementarność (CDR, *complementarity-determining regions*) i przylegających do nich 4 regionów zrębowych. Swoistość przeciwciał jest uzależniona od sekwencji aminokwasów w regionach hiperzmiennych bowiem to właśnie one stanowią miejsce bezpośrednio wiążące antygen [5]. W przeciwciałach chimericznych region zmienny, w całości pochodzenia mysiego jest powiązany z ludzkim szkieletem immunoglobuliny (ryc. 2). Z kolei w przeciwciałach humanizowanych mysie sekwencje zlokalizowane są tylko w regionach hiperzmiennych. Najbardziej zaawansowanymi technologicznie rekombinowanymi immunoglobulinami są przeciwciała ludzkie, które w ogóle nie zawierają se-



Rycina 1. Budowa przeciwciała klasy IgG

kwencji mysiej. Sukcesywna eliminacja mysiej sekwencji od przeciwciał chimerycznych do ludzkich zdecydowanie zmniejszała ich immunogenność oraz poprawiała właściwości farmakokinetyczne [6].

Mechanizmy działania przeciwciał

Generalnie mechanizmy warunkujące aktywność przeciwnowotworową przeciwciał rozpoznających antygeny nowotworowe można podzielić na immunozależne oraz immunoniezależne. Mechanizmy nieangażujące procesów immunologicznych polegają głównie na aktywacji apoptozy lub zahamowaniu szlaków transdukcji sygnału w wyniku związania receptorów błonowych na powierzchni komórki nowotworowej. Z kolei mechanizmy immunozależne związane z aktywnością układu immunologicznego to cytotoksyczność zależna od przeciwciał (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) i cytotoksyczność zależna od dopełniacza (CDC, *complement-dependent cytotoxicity*). Osobną grupę przeciwciał stanowią przeciwciała ukierunkowane na określone białka supresorowe [punkty kontrolne (*check-points*)] na powierzchni komórek immunologicznych oraz przeciwciała eliminujące białka obecne w mikrośrodowisku guza.

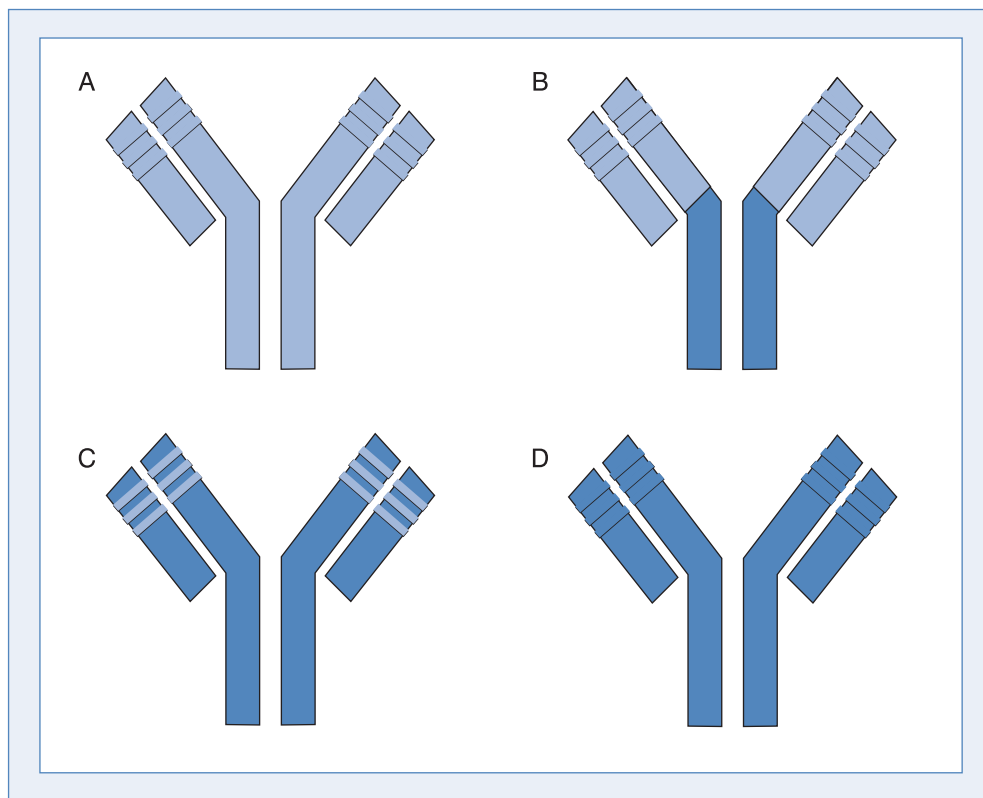
Mechanizmy immunoniezależne

Blokada szlaków sygnałowych

Przeciwciała monoklonalne mogą blokować sygnały niezbędne do stymulacji przeżycia i wzrostu komórek nowotworowych poprzez:

- eliminację liganda;
- blokadę miejsca wiążącego ligand na receptorze;
- modyfikację aktywności receptora lub
- blokadę jego dimeryzacji.

Zdefiniowanie, który z wymienionych nakładających się mechanizmów ukierunkowanych na receptor błonowy jest najbardziej istotny, stanowi niezwykle trudne zadanie. Wydaje się, że mechanizmy te mają kluczowe znaczenie dla przeciwnowotworowej aktywności przeciwciał ukierunkowanych na receptory rodziny ErbB [receptory ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER, *human epidermal growth factor receptor*)], w tym HER1 (EGFR, ErbB1), HER2 (ErbB2) oraz HER3 (ErbB3). Przeciwciała anty-EGFR są kompetywnymi antagonistami, które przyłączają się do domeny wiążącej ligand ze znacznie większym powinowactwem niż naturalne ligandy. W konsekwencji uniemożliwiają wiązanie liganda przez EGFR i prowadzą do zmniejszenia ilości EGFR na powierzchni komórki nowotworowej poprzez indukcję internalizacji receptorów.



Rycina 2. Generacje przeciwciał monoklonalnych. A. mysiej, B. chimeryczne, C. humanizowane, D. ludzkie

To z kolei powoduje zahamowanie aktywności szlaków sygnałowych związanych z EGFR, a odpowiedzialnych za stymulację procesów komórkowych warunkujących wzrost i progresję nowotworu. Przeciwciała swoiste dla określonych ligandów, takich jak naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) czy ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B (RANKL, *receptor activator for nuclear factor κ B ligand*), mają za zadanie wiązanie i eliminację tych czynników, w wyniku czego dochodzi do ograniczenia ich biodostępności i zniesienia potencjału stymulacji docelowych receptorów. W zależności od funkcji określonego liganda osiągnięty efekt kliniczny może być wielokierunkowy, na przykład w przypadku VEGF jego eliminacja ma nie tylko efekt antyangiogeny, ale również immunostymulujący [7].

Koniugaty przeciwciał

Próby poprawy efektywności cytotoksycznej, a tym samym aktywności klinicznej przeciwciał monoklonalnych skupiały się wokół tworzenia koniugatów z substancjami toksycznymi — radioizotopami i chemioterapeutykami [8, 9]. Takie koniugaty pozwalają na dostarczenie toksycznych związków bezpośrednio do docelowej komórki nowotworowej z pominięciem zdrowych tkanek. W celu zminimalizowania toksyczności koniugaty tworzy się na podstawie substancji charakteryzujących się krótkim czasem półtrwania (stąd tendencja do projektowania koniugatów opartych na przeciwciałach podklas IgG3 i IgG4).

Opracowano dwa radioimmunokoniugaty — ibritumomab tiuksetan i tositumomab — które zarejestrowano do leczenia nawrotowych chłoniaków nieziarniczych. Oba przeciwciała wiążą się z cząsteczką CD20 na komórkach chłoniaka B-komórkowego. Ibritumomab tiuksetan jest przeciwciałem klasy IgG1 związanym z ^{90}Y , a tositumomab przeciwciałem IgG2 zawierającym ^{131}I [10].

Koniugaty przeciwciał z cytotoksycznymi substancjami chemicznymi to gemtuzumab ozogamycin i trastuzumab-emtanzyna (TDM1). Gemtuzumab ozogamycin jest humanizowanym przeciwciałem podklasy IgG4 wiążącym się z cząsteczką CD33 obecną na powierzchni komórek ostrej białaczki szpikowej [11]. Gemtuzumab powiązany jest z pochodną kalichecyny γ 1 poprzez łącznik. Z kolei TDM1 składa się z trastuzumabu powiązanego linkerem z emtanzyną [12]. Emtanzyna — pochodna maftanzyny (DM1, *maytansine derivate*) — jest substancją o działaniu cytotoksycznym i antymitotycznym podobnym do alkaloidów barwinka, ale charakteryzującą się ponad 100-krotnie wyższą aktywnością antymitotyczną. Kompleks TDM1-HER2 ulega internalizacji i degradacji we wnętrzu komórki nowotworowej. Oddzielona od TDM1 w wyniku procesu degradacji emtanzyna prowadzi do toksycznej śmierci komórki nowotworowej.

Mechanizmy immunozależne

Cytotoksyczność zależna od przeciwciał

W przypadku ADCC przeciwciało klasy IgG najpierw wiąże się z określonym antygenem na powierzchni komórki nowotworowej poprzez fragment zmienny Fab, a następnie fragment stały Fc jest rozpoznawany przez receptory Fc γ R komórek efektorowych. Na ludzkich leukocytach występują 3 typy receptorów Fc γ R: Fc γ RI o wysokim powinowactwie, wiążący się z IgG w formie monomeru, oraz Fc γ RII i Fc γ RIII o niskim powinowactwie, wiążące się z agregatami IgG oraz kompleksami immunologicznymi. W konsekwencji rozpoznania fragmentu Fc przeciwciała związanego z określonym antygenem receptory Fc γ RI i Fc γ RIII pobudzają funkcje efektorowe komórek immunologicznych. Komórki naturalni zabójcy (NK, *natural killers*), które są głównymi komórkami odpowiedzialnymi za efekt ADCC, posiadają na swojej powierzchni receptory Fc γ RIIc oraz Fc γ RIIIa. Do tej pory nie zdefiniowano roli Fc γ RIIc, ale jednoznacznie wykazano, że aktywacja Fc γ RIIIa uruchamia funkcje cytotoksyczne komórek NK (ADCC oraz sekrecja cytokin) [13]. Cytotoksyczność ADCC zależna od komórek NK uwarunkowana jest sekrecją enzymów cytotoksycznych — perforyn, granzymów oraz ekspresją FasL (liganda stymulującego proapoptotyczny receptor Fas na powierzchni komórek nowotworowych). Dodatkowo cytokiny uwalniane przez NK hamują proliferację komórek nowotworowych oraz angiogenezę. Stymulacja receptorów Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIa na powierzchni makrofagów aktywuje zarówno proces fagocytozy komórek nowotworowych opłaszczonych przeciwciałami, jak i produkcję cytotoksycznych proteaz, wolnych rodników tlenowych oraz cytokin [14].

Aktywacja procesów ADCC zależy od izotypu zastosowanych przeciwciał monoklonalnych. Przeciwciała IgG1 oraz IgG3 wiążą się bardzo wydajnie z receptorami Fc γ R, podczas gdy wiązanie przeciwciał IgG2 oraz IgG4 do tych receptorów jest słabe. Z tego też powodu przeciwciała monoklonalne IgG1 i IgG3, oprócz bezpośredniego efektu przeciwnowotworowego uwarunkowanego blokadą funkcji określonych receptorów błonowych, aktywują (w odróżnieniu od IgG2 i IgG4) cytotoksyczne mechanizmy immunologiczne. Wykorzystywanie w praktyce klinicznej przede wszystkim przeciwciał IgG1 wynika ze znacznie dłuższego czasu półtrwania tych immunoglobulin (23 dni) w porównaniu z IgG3 (8 dni) [15].

Najmocniejszym dowodem klinicznym na istnienie mechanizmu ADCC w przypadku niektórych przeciwciał jest znaczenie wariantów genów kodujących receptory Fc γ R (polimorfizm *Fc γ R*) w odpowiedzi na leczenie [16, 17]. W przypadku kilku podklas genów *Fc γ R* zidentyfikowano polimorfizmy (w tym w *Fc γ RIIIa* i *Fc γ RIIIa*), które istotnie modyfikują powinowactwo tych receptorów do fragmentów Fc przeciwciał [15]. W obrębie genu

FcγRIIIa mutacje punktowe w pozycji 559 powodują zmianę 158 aminokwasu — w miejscu waliny pojawia się fenylalanina. Receptor *FcγRIIIa-158V/V* ma zdecydowanie większe powinowactwo do IgG1, IgG3 i IgG4 niż powstały w wyniku podmiany aminokwasów receptor *FcγRIIIa-158F/F* [18]. W przypadku genu *FcγRIIIa* ulegającego ekspresji na makrofagach mutacja punktowa powodująca zamianę argininy na histydynę w pozycji 131 zwiększa powinowactwo receptora do IgG2 [13]. Tym samym, u chorych z receptorami *FcγRIIIa-158V/V* oraz *FcγRIIIa-131H/H* można się spodziewać większej aktywności procesów ADCC indukowanych rekombinowanymi przeciwciałami monoklonalnymi.

W swoich badaniach Cartron i wsp. [16] oceniali znaczenie polimorfizmu *FcγRIIIa* u 49 chorych na chłoniaka grudkowego CD20+, u których stosowano pierwszą linię chemioterapii z rytuksymabem. Znamienne wyższe odsetki odpowiedzi klinicznych obserwowano u chorych z receptorami Fc o wysokim powinowactwie (*FcγRIIIa-158V/V*) w porównaniu z pozostałymi chorymi zarówno po 2, jak i po 12 miesiącach obserwacji — odpowiednio 100% vs. 67%; $p = 0,03$ oraz 90% vs. 51%; $p = 0,03$.

Obserwacje Cartrona i wsp. zostały poszerzone w kolejnym badaniu, w którym oceniano zarówno polimorfizm *FcγRIIIa*, jak i *FcγRIIIa* w grupie 87 chorych na chłoniaka grudkowego leczonych rytuksymabem, z których 15 w pierwszej linii już otrzymywało to przeciwciało, a 72 było poddanych chemioterapii jeszcze przed erą rytuksymabu [17]. W badanej populacji u 15% chorych stwierdzono obecność wariantów genetycznych receptora *FcγRIIIa* o wysokim powinowactwie. Chorzy z takimi receptorami mieli znamienne wyższy odsetek odpowiedzi niż chorzy z pozostałymi genotypami *FcγRIIIa* — po 12 miesiącach: 75% vs. 26%; $p = 0,002$. Odsetek 2-letnich przeżyć wolnych od progresji (PFS, *progression-free survival*) również był wyższy u chorych z receptorami o wysokim powinowactwie (45% vs. 14%; $p = 0,023$). W wyniku analizy polimorfizmu *FcγRIIIa* stwierdzono, że 23% chorych posiadało *FcγRIIIa* o wysokim powinowactwie. Tacy chorzy charakteryzowali się znamienne wyższymi odsetkami odpowiedzi (w 12. miesiącu 55% vs. 26%, $p = 0,027$) oraz 2-letniego PFS (37% vs. 14%; $p = 0,011$) w porównaniu z chorymi z receptorami o niskim powinowactwie.

Podobne obserwacje poczyniono w przypadku cetuksymabu. W retrospektywnej analizie obejmującej 69 chorych otrzymujących cetuksymab w monoterapii wykazano, że pacjenci posiadający receptory *FcγRIIIa* i/lub *FcγRIIIa* o wysokim powinowactwie (genotyp *FcγRIIIa-131H/H* i/lub *FcγRIIIa-158V/V*) charakteryzowali się znamienne dłuższym PFS (5,5 vs. 3,0 miesiąca, $p = 0,005$) w porównaniu z pozostałymi chorymi (niezależnie od statusu *KRAS*). Znaczenie predykcyjne polimorfizmu *FcγRIIIa* i/lub *FcγRIIIa* było porównywalne ze znaczeniem prawidłowego statusu *KRAS* [19].

Cytotoksyczność zależna od dopełniacza

Cytotoksyczność zależna od dopełniacza stanowi kolejny mechanizm efektorowy przeciwciał monoklonalnych. Podobnie jak w przypadku ADCC potencjał przeciwciał do aktywacji CDC jest zależny od ich podklasy. Przeciwciała IgG3, a następnie IgG1 najbardziej efektywnie aktywują klasyczną kaskadę dopełniacza. Oba izotypy wiążą C1q, co prowadzi do tworzenia C3b na powierzchni komórki opłaszczanej przeciwciałem w miejscu aktywacji dopełniacza [20]. Obecność C3b na powierzchni komórki kontroluje proces tworzenia kompleksu uszkodzającego błonę (MAC, *membrane attack complex*) C5–C9, który wbudowuje się w błonę cytoplazmatyczną, doprowadzając do lizy komórki. Enzymatyczna aktywność C3b oraz tworzenie MAC są kontrolowane przez szereg białek błonowych ulegających nadekspresji w komórkach nowotworowych — CD35 (receptor dopełniacza typu 1), CD46 (błonowe białko kofaktorowe), CD55 (białko hamujące aktywność enzymatyczną C3b) oraz CD59 (białko hamujące tworzenie MAC) [6]. Potwierdzono, że obecność tych białek uniemożliwia lizę komórki w mechanizmie aktywacji dopełniacza przez przeciwciało IgG1 [21]. Z powodu powszechnej nadekspresji w komórkach nowotworowych białek hamujących proces CDC wydaje się, że mechanizmy zależne od dopełniacza nie są istotnym elementem aktywności przeciwnowotworowej przeciwciał monoklonalnych. Chociaż C3b ulega inaktywacji na powierzchni komórek nowotworowych, jego inaktywowana forma może być rozpoznana przez komórki układu immunologicznego posiadające receptor dla C3 i tym samym może wzmacniać proces fagocytozy zależny od *FcγR* lub ADCC [6, 22].

Stymulacja powstawania naturalnych przeciwciał swoistych przeciwko antygenom nowotworowym

Podczas kongresu Amerykańskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej w 2013 roku zaprezentowano wyniki badań wskazujących na możliwość stymulacji naturalnych antygenowo-swoistych mechanizmów humoralnych w wyniku stosowania trastuzumabu. Analiza surowic uzyskanych od chorych na HER2-dodatniego raka piersi uczestniczących w badaniu NCCTG-N9831 oceniającym skuteczność leczenia uzupełniającego trastuzumabem wykazała, że u części chorych otrzymujących rekombinowane przeciwciało anti-HER2 pojawiają się naturalne przeciwciała skierowane przeciwko temu receptorowi. U pacjentek, u których stwierdzono naturalne przeciwciała anti-HER2, obserwowano trend w kierunku niższego ryzyka nawrotu choroby (HR = 0,23) w porównaniu z pozostałymi chorymi leczonymi trastuzumabem [23]. Z kolei analiza surowic uzyskanych od chorych na przerzutowego HER2-dodatniego raka piersi leczonych trastuzumabem w skojarzeniu z chemioterapią w ramach dwóch badań NCCTG wykazała, że u tych chorych zwiększa się miano przeciwciał nie tylko swoistych dla

HER2, ale również swoistych dla innych antygenów nowotworowych, takich jak IGF2BP2 czy p53. U chorych, u których stwierdzono wzrost miana wymienionych przeciwciał, obserwowano lepszą odpowiedź na leczenie [24].

Bezpośrednia aktywacja limfocytów
— hamowanie punktów kontrolnych

Ucieczka komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego stanowi jeden z kluczowych mechanizmów pozwalających na rozwój i progresję procesu nowotworowego. Istnieje szereg zdefiniowanych mechanizmów umożliwiających komórkom nowotworowym uniknięcia rozpoznania przez komórki efektorowe, między innymi ekspresja molekuł supresyjnych na powierzchni komórek nowotworowych [np. liganda typu pierwszego dla receptora programowanej śmierci (PD-L1, *programmed death ligand 1*)]. Komórki efektorowe obecne w mikrośrodowisku nowotworu mają na swojej powierzchni receptor immunosupresyjny — PD-1 (receptor indukujący apoptozę). W momencie gdy aktywowane limfocyty T rozpoznają antygen nowotworowy na powierzchni guza, a receptor PD-1 wiąże PD-L1 na powierzchni komórki nowotworowej, dochodzi do inaktywacji i apoptozy komórek limfocytów, zanim zdążą uruchomić mechanizmy cytotoksyczne [25, 26]. Również naturalnie występujące mechanizmy regulujące swoistą odpowiedź immunologiczną, które zapobiegają niepożądanemu hamowaniu aktywacji limfocytów T, odgrywają istotną rolę w supresji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Kluczową cząsteczką w tym procesie jest antygen limfocytów cytotoksycznych typu 4 (CTLA4, *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) hamujący aktywność limfocytów T CD8+ w trakcie kontaktu z komórkami dendrytycznymi w węzłach chłonnych. Im wyższa wyjściowa aktywność cytotoksycznych limfocytów T, tym wyższa podatność tych komórek (wyższa ekspresja CTLA4) na sygnały indukujące stan anergii/tolerancji [27]. Zdefiniowanie znaczenia molekuł o działaniu immunosupresyjnym obecnych zarówno na powierzchni komórek efektorowych, jak i w mikrośrodowisku guza wskazało potencjalne punkty uchwytu dla terapii celowanych i doprowadziło do stworzenia przeciwciał monoklonalnych anti-CTLA4, anti-PD1 i anti-PD-L1 [28–30].

Mechanizmy działania przeciwciał monoklonalnych stosowanych w leczeniu nowotworów litych

Trastuzumab

Trastuzumab jest humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym podklasy IgG1, które wiąże receptor HER2 ulegający nadekspresji w około 20% przypadków

raka piersi. Przywiązanie się trastuzumabu do domeny IV HER2 powoduje zahamowanie funkcji sygnałowej tego receptora i blokuje postęp cyklu komórkowego na fazie G1/S, w wyniku czego dochodzi do zahamowania wzrostu komórki nowotworowej [31]. Związanie receptora HER2 przez trastuzumab prowadzi do internalizacji i degradacji kompleksu HER2–trastuzumab [32], co powoduje zmniejszenie ilości HER2 na powierzchni komórki nowotworowej. Z uwagi na budowę trastuzumabu (podklasy IgG1) aktywność kliniczna tego przeciwciała jest uwarunkowana również mechanizmami immunologicznymi (ADCC).

Pertuzumab

Pertuzumab to humanizowane przeciwciało podklasy IgG1, które wiąże się z domeną II receptora HER2. Tworzenie heterodimerów przez HER2 z HER3 jest uwarunkowane aktywnością domeny II receptora ErbB2. Pertuzumab, wiążąc się z domeną II, uniemożliwia tworzenie heterodimerów HER2:HER3 i tym samym blokuje aktywność sygnałową HER2, który w formie monomeru nie posiada fosforylowanej domeny wewnątrzkomórkowej. Nie zdefiniowano roli pertuzumabu w blokowaniu aktywności heterodimerów HER2 z innymi receptorami rodziny naskórkowego czynnika wzrostu. Pertuzumab stosowany jednocześnie z trastuzumabem potęguje efekt hamowania aktywności sygnałowej HER2 i potęguje aktywność kliniczną trastuzumabu. Wykazano również, że pertuzumab jako przeciwciało monoklonalne podklasy IgG1 aktywuje mechanizm ADCC [33–35].

Rytuksymab

Rytuksymab jest chimerycznym przeciwciałem podklasy IgG1 ukierunkowanym na cząsteczkę CD20 ulegającą ekspresji na powierzchni większości limfocytów B, w tym na komórkach chłoniaka grudkowego czy chłoniaka z rozlanych komórek. W badaniach przedklinicznych związanie CD20 przez rytuksymab prowadziło do zahamowania cyklu komórkowego oraz apoptozy [15]. Rola cząsteczki CD20 nie jest do końca poznana, chociaż początkowo wydawało się, że stanowi ona kanał wapniowy odgrywający rolę w kontroli wzrostu komórek B [36]. W tej chwili zakłada się, że kluczowym mechanizmem przeciwnowotworowym rytuksymabu jest aktywacja ADCC, a nie bezpośrednia indukcja apoptozy.

Cetuksymab

Cetuksymab jest przeciwciałem monoklonalnym podklasy IgG1 o budowie chimerycznej. Wiąże się on z domeną zewnątrzkomórkową receptora EGFR na powierzchni komórek nowotworowych. Jako kompetytyw-

ny antagonistą EGFR uniemożliwia wiązanie ligandów takich jak transformujący czynnik wzrostu alfa (TGF α , *transforming growth factor alpha*) czy naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*), w wyniku czego dochodzi do zahamowania funkcji tego receptora [37]. Zablokowanie aktywności sygnałowej EGFR prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1. Kompleks EGFR–cetuksymab ulega internalizacji i degradacji [38]. Ze względu na to, że cetuksymab jest przeciwciałem podklasy IgG1, jego aktywność kliniczna jest częściowo uwarunkowana aktywacją nieswoistych mechanizmów immunologicznych — ADCC.

Panitumumab

Panitumumab to przeciwciałem ludzkiej podklasy IgG2. Podobnie jak cetuksymab uniemożliwia wiązanie ligandów przez EGFR. Powinowactwo panitumumabu do receptora jest praktycznie takie samo jak cetuksymabu. W konsekwencji również panitumumab efektywnie hamuje funkcje EGFR oraz doprowadza do jego internalizacji i degradacji, czego efektem jest zahamowanie cyklu komórkowego. Z uwagi na podklasę (IgG2) panitumumab nie aktywuje mechanizmu ADCC zależnego od komórek NK [39].

Bewacyzumab

Bewacyzumab jest humanizowanym przeciwciałem podklasy IgG1 swoistym dla VEGF. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu wiąże się z receptorami VEGFR-1 oraz VEGFR-2 zlokalizowanymi na powierzchni komórek śródbłonka naczyniowego. Pobudzenie VEGFR-1/2 na powierzchni tych komórek odpowiada za proces angiogenezy [40]. W modelach przedklinicznych bewacyzumab blokował proliferację, przeżycie i migrację komórek śródbłonka, zmniejszał zależną od VEGF przepuszczalność naczyń krwionośnych oraz normalizował zaburzenia w strukturze unaczynienia [41, 42]. W konsekwencji bewacyzumab prowadził do zmniejszenia ciśnienia śródtkankowego i poprawiał przepływ krwi w obrębie sieci naczyniowej guza, co umożliwiało lepszą penetrację guza przez leki cytotoksyczne stosowane razem z bewacyzumabem. Zmniejszenie hipoksji w mikrośrodoisku guza zmniejsza chemiooporność komórek nowotworowych i osłabia lokalne mechanizmy immunosupresji [43–45].

Denosumab

Denosumab jest ludzkim przeciwciałem monoklonalnym podklasy IgG2, które wiąże i eliminuje ligand receptora RANK — RANKL. Receptor RANK ulega ekspresji na powierzchni osteoklastów oraz komórek dendrytycznych, zaś RANKL jest odpowiedzialny za dojrzewanie i aktywację osteoklastów w mikrośrodo-

wisku kostnym w przebiegu przerzutów do kości [46]. Denosumab powoduje zahamowanie procesów osteolizy i przyczynia się do zmniejszenia ryzyka i nasilenia powikłań kostnych (SRE, *skeletal-related events*) u chorych z przerzutami nowotworów litych do kości. Ponieważ RANK ulega ekspresji również na powierzchni nowotworowych komórek macierzystych, stosowanie denosumabu może przyczyniać się do ograniczenia wielkości tej chemioopornej populacji komórek inicjujących w guzach nowotworowych.

Ipilimumab

Ipilimumab jest przeciwciałem podklasy IgG1 wiążącym się z CTLA-4 na powierzchni aktywowanych komórek T. Blokada CTLA-4 w wyniku zastosowania ipilimumabu wzmacnia aktywność i proliferację limfocytów T, prowadząc w konsekwencji do zwiększonego nacieku tych komórek w mikrośrodoisku guza. Po zastosowaniu ipilimumabu u chorych na czerniaka obserwowano wzrost odsetka aktywowanych, efektorowych limfocytów T zarówno cytotoksycznych (CD8+), jak i pomocniczych (CD4+) oraz limfocytów T pamięci. Z uwagi na nieswoiste działanie ipilimumabu (stymulacja limfocytów T w obrębie węzłów chłonnych niezależnie od ich swoistości antygenowej) lek ten może aktywować również limfocyty T rozpoznające autoantygeny. To zjawisko jest odpowiedzialne za typowe działania niepożądane ipilimumabu, którymi są narządowe reakcje autoimmunologiczne [47].

Podsumowanie

Wprowadzenie przeciwciał monoklonalnych do arsenału terapii systemowych stanowiło niewątpliwą przełom w onkologii. W przypadku wielu nowotworów leki te umożliwiły znamienne poprawę rokowania chorych. Zgodnie z pierwotnymi założeniami aktywność przeciwnowotworowa przeciwciał miała mieć charakter cytostatyczny (blokada receptorów błonowych, hamowanie angiogenezy prowadzące do upośledzenia wzrostu i proliferacji komórek nowotworowych), a nie cytotoksyczny. Okazało się jednak, że w odróżnieniu od innych terapii ukierunkowanych molekularnie (takich jak drobnocząsteczkowe inhibitory kinaz) przeciwciała wywierają efekt cytotoksyczny na drodze aktywacji reakcji immunologicznych (ADCC, aktywacja dopełniacza). Zdefiniowanie roli procesów immunologicznych w mechanizmie działania przeciwciał monoklonalnych wskazało nowe, obiecujące kierunki rozwoju tej technologii. Obecnie na etapie wczesnych badań klinicznych ocenia się nowe terapie oparte na przeciwciałach, które mają znacznie efektywniej niż do tej pory aktywować reakcje immunologiczne zależne od przeciwciał. Ocenia się między innymi zmodyfikowany cetuksymab, który dzięki

zmianom w glikozylacji ma wielokrotnie większe powinowactwo do receptorów Fc i bardzo silnie aktywuje reakcję ADCC. Analizuje się również możliwości zwiększenia efektywności ADCC poprzez stosowanie dodatkowych przeciwciał (m.in. anty-CD137), prowadzących do maksymalnej aktywności cytotoksycznej komórek NK.

Zdefiniowanie znaczenia molekuł immunosupresyjnych obecnych na limfocytach (CTLA-4, PD-1) oraz na komórkach nowotworowych (PD-L1) doprowadziło do powstania koncepcji celowanej immunoterapii, której znaczenie w praktyce klinicznej będzie w najbliższych latach bardzo szybko rosło.

Największym jednak osiągnięciem w dziedzinie przeciwciał monoklonalnych ostatniego okresu jest opracowanie technologii sprzęgania leków cytotoksycznych z przeciwciałami, co doprowadziło do rejestracji pierwszych strategii celowanej chemioterapii charakteryzujących się wysoką aktywnością przeciwnowotworową przy bardzo korzystnym profilu toksyczności.

Piśmiennictwo

- Weiner G.J. Monoclonal antibody mechanisms of action in cancer. *Immunol. Res.* 2007; 39: 271–278.
- Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *J. Immunol.* 2005; 174: 2453–2455.
- Meeker T.C., Lowder J., Maloney D.G. i wsp. A clinical trial of anti-idiotypic therapy for B cell malignancy. *Blood* 1985; 65: 1349–1363.
- Adams G.P., Weiner L.M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol.* 2005; 23: 1147–1157.
- Sharkey R.M., Goldenberg D.M. Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA Cancer J. Clin.* 2006; 56: 226–243.
- Clynes R. Antitumor antibodies in the treatment of cancer: Fc receptors link opsonic antibody with cellular immunity. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2006; 20: 585–612.
- Gabrilovich D.I., Ishida T., Nadaf S. i wsp. Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 2963–2970.
- Reff M.E., Heard C. A review of modifications to recombinant antibodies: attempt to increase efficacy in oncology applications. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2001; 40: 25–35.
- Wu A.M., Senter P.D. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat. Biotechnol.* 2005; 23: 1137–1146.
- Cheson B.D. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphomas. *Curr. Drug Targets* 2006; 7: 1293–1300.
- van der Velden V.H., Boeckx N., Jedema I. i wsp. High CD33-antigen loads in peripheral blood limit the efficacy of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) treatment in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2004; 18: 983–988.
- LoRusso P.M., Weiss D., Guardino E. i wsp. Trastuzumab emtansine: a unique antibody-drug conjugate in development for human epidermal growth factor receptor 2-positive cancer. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17: 6437–6447.
- van Sorge N.M., van der Pol W.L., van de Winkel J.G. FcγR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens* 2003; 61: 189–202.
- Iannello A., Ahmad A. Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies. *Cancer Metastasis Rev.* 2005; 24: 487–499.
- Strome S.E., Sausville E.A., Mann D. A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related effects. *Oncologist* 2007; 12: 1084–1095.
- Cartron G., Dacheux L., Salles G. i wsp. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 2002; 99: 754–758.
- Weng W.K., Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 3940–3947.
- Koene H.R., Kleijer M., Algra J. i wsp. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 1997; 90: 1109–1114.
- Bibeau F., Lopez-Crapez E., Di Fiore F. i wsp. Impact of Fc{gamma}RIIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 1122–1129.
- Presta L.G. Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 2008; 20: 460–470.
- Golay J., Lazzari M., Facchinetti V. i wsp. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* 2001; 98: 3383–3389.
- Di Gaetano N., Cittera E., Nota R. i wsp. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J. Immunol.* 2003; 171: 1581–1587.
- Knutson K.L., Perez E.A., Ballman K.V. i wsp. Generation of adaptive HER2-specific immunity in HER2 breast cancer patients by addition of trastuzumab to chemotherapy in the adjuvant setting: NCCTG (Alliance) study N9831. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31 (supl.): abstr. 522.
- Clynes R., Knutson K.L., Ballman K.V. i wsp. Combination trastuzumab and chemotherapy to induce immunity to multiple tumor antigens in patients with HER2-positive metastatic breast cancer: NCCTG (Alliance) studies N0337 and N98-32-52. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31 (supl.): abstr. 521.
- Dong H., Strome S.E., Salomao D.R. i wsp. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 2002; 8: 793–800.
- Hirano F., Kaneko K., Tamura H. i wsp. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res.* 2005; 65: 1089–1096.
- O'Day S.J., Hamid O., Urba W.J. Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4): a novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies. *Cancer* 2007; 110: 2614–2627.
- Brahmer J.R., Tykodi S.S., Chow L.Q. i wsp. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366: 2455–2465.
- Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F. i wsp. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363: 711–723.
- Topalian S.L., Hodi F.S., Brahmer J.R. i wsp. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366: 2443–2454.
- Albanell J., Codony J., Rovira A. i wsp. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003; 532: 253–268.
- Rudnick S.I., Lou J., Shaller C.C. i wsp. Influence of affinity and antigen internalization on the uptake and penetration of Anti-HER2 antibodies in solid tumors. *Cancer Res.* 2011; 71: 2250–2259.
- Adams C.W., Allison D.E., Flagella K. i wsp. Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab. *Cancer Immunol. Immunother.* 2006; 55: 717–727.
- El-Sahwi K., Bellone S., Cocco E. i wsp. In vitro activity of pertuzumab in combination with trastuzumab in uterine serous papillary adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* 2010; 102: 134–143.
- Kristjansdottir K., Dizon D. HER-dimerization inhibitors: evaluating pertuzumab in women's cancers. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2010; 10: 243–250.
- Johnson P., Glennie M. The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells. *Semin. Oncol.* 2003; 30: 3–8.
- Harding J., Burtess B. Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today (Barc.)* 2005; 41: 107–127.
- Vallbohmer D., Lenz H.J. Epidermal growth factor receptor as a target for chemotherapy. *Clin. Colorectal Cancer* 2005; 5 (supl. 1): S19–S27.
- Jefferis R. Antibody therapeutics: isotype and glycoform selection. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2007; 7: 1401–1413.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* 2004; 9 (supl. 1): 2–10.
- Wang Y., Fei D., Vanderlaan M., Song A. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis* 2004; 7: 335–345.

42. Heldin C.H., Rubin K., Pietras K., Ostman A. High interstitial fluid pressure — an obstacle in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2004; 4: 806–813.
43. Gabrilovich D., Ishida T., Oyama T. i wsp. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 1998; 92: 4150–4166.
44. Gabrilovich D.I., Ishida T., Nadaf S. i wsp. Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 2963–2970.
45. Laxmanan S., Robertson S.W., Wang E. i wsp. Vascular endothelial growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through Id pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 334: 193–198.
46. Castellano D., Sepulveda J.M., Garcia-Escobar I. i wsp. The role of RANK-ligand inhibition in cancer: the story of denosumab. *Oncologist* 2011; 16: 136–145.
47. Mackiewicz-Wysocka M., Zolnierek J., Wysocki P.J. New therapeutic options in systemic treatment of advanced cutaneous melanoma. *Expert Opin. Investig Drugs* 2013; 22: 181–190.