

# Monoklonska protutijela: humanizacija i imunogenost

---

Milčić, Ela

Professional thesis / Završni specijalistički

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:912991>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ela Milčić

MONOKLONSKA PROTUTIJELA: HUMANIZACIJA I IMUNOGENOST

Specijalistički rad

Zagreb, 2016.

PSS studij: Razvoj lijekova

Mentor(i) rada: Izv. prof. dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček

Specijalistički rad obranjen je dana 02. rujna 2016. na Farmaceutsko – biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Karmela Barišić
2. Doc. dr. sc. Sandra Šupraha Goreta
3. Dr. sc. Beata Halassy, znanstv. savj.

Rad ima 106 listova

## **Sažetak**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

**Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju**

### **Monoklonska protutijela: humanizacija i imunogenost**

#### **Cilj istraživanja**

Cilj ovog specijalističkog rada je pružiti sveobuhvatan pregled terapijskih monoklonskih protutijela, kako odobrenih za terapijsku primjenu, tako i onih u razvoju, s posebnim osvrtom na njihovu imunogenost i humanizaciju te napraviti pregled suvremenih metoda koje se koriste za dobivanje i analizu monoklonskih protutijela i njihovih inačica sa što većim udjelom humanih sekvenci kako bi se smanjila njihova imunogenost.

#### **Materijali i metode**

Ovim radom dan je opći pregled liječenja monoklonskim protutijelima te njihov povijesni razvoj. Pregledom znanstvene literature detaljnije su opisane karakteristike pojedinih skupina monoklonskih protutijela i terapijska primjena. Iznesen je pregled dosadašnjih saznanja i metoda za dobivanje monoklonskih protutijela te problemi imunogenosti na koje se nailazilo prilikom njihove primjene. Opisana je imunogenost pojedinih skupina monoklonskih protutijela, utjecaj imunogenosti na njihovu terapijsku uspješnost te kako je humanizacija utjecala na smanjenje njihove imunogenosti. Razmotreni su svi čimbenici koji mogu dovesti do imunogenosti monoklonskih protutijela te načini i metode koje se koriste za njezino predviđanje i umanjivanje. Ujedno su opisana monoklonska protutijela i njihove inačice nove generacije s terapijskim potencijalom i optimiziranim svojstvima, kao i metode za njihovo dobivanje.

#### **Rezultati**

Uvođenjem humanih sekvenci u monoklonska protutijela smanjuje se njihova imunogenost. Iako mišja monoklonska protutijela imaju veliku ulogu u dijagnostici, kao strana tijela u ljudskom tijelu u većini slučajeva izazivaju imunosnu reakciju zbog svog imunogenog potencijala te je njihova upotreba ograničena. Kimerizacijom se smanjila imunogenost monoklonskih protutijela, iako i kimerna protutijela mogu izazvati nastanak protutijela na lijek. Također imaju dulje vrijeme poluživota od mišjih te mogu imati efektorske funkcije. Daljnje smanjenje imunogenosti se postiglo dodatnom humanizacijom monoklonskih

protutijela te su humanizirana monoklonska protutijela značajno pridonijela današnjem terapijskom uspjehu monoklonskih protutijela.

Suprotno očekivanjima, potpuna humanizacija ne dovodi do izostanka imunogenosti, a stopa imunosne reakcije kod primjene humanih protutijela se ne razlikuje značajno od humaniziranih. Imunosni odgovor je usmjeren na dijelove monoklonskih protutijela životinjskog porijekla, no imunogenost humaniziranih i humanih protutijela potječe od regija koje određuju komplementarnost (engl. *complementarity determining region*, CDR), dok postoji tolerancija na humani okvir varijabilnog dijela monoklonskih protutijela u kojima se nalaze CDR regije. Imunogeni potencijal se može ukloniti modifikacijom CDR regija, ali time se smanjuju afinitet i specifičnost vezanja monoklonskog protutijela te se mogu stvoriti novi epitopi.

Ne postoje ispitivanja *in vitro* i ispitivanja na životinjama koja mogu adekvatno ocijeniti imunogenost te su i dalje relevantni jedino podaci iz kliničkih ispitivanja i praćenja bolesnika. Postojeći podaci o imunogenosti dobiveni su različitim metodama različite osjetljivosti te je otežana usporedba podataka za različita terapijska protutijela.

Na imunogenost mogu utjecati brojni drugi čimbenici osim stupnja humanizacije, poput obrasca glikozilacije i prisutnosti agregata, koji se moraju istražiti, predvidjeti i minimizirati prilikom razvoja monoklonskih protutijela.

## **Zaključak**

Imunogenost monoklonskih protutijela se ne može apsolutno izbjeći, može se samo svesti na minimum. Pojava imunosnog odgovora uvelike ovisi o primijenjenom lijeku, ali i o pojedincu na kojega se primjenjuje lijek te ne postoji univerzalna formula već terapiju treba individualizirati i racionalizirati. Kod izostanka imunogenosti ne može se uvijek utvrditi uzrok – to može biti odlika ciljanog antigena, stanja bolesnika, doze ili jedinstveno svojstvo monoklonskog protutijela.

Monoklonska protutijela danas imaju široku primjenu, a razvojem monoklonskih protutijela nove generacije i raznih inačica njihova će se primjena širiti. Stoga se imunogenost mora dobro poznavati, mora postojati mogućnost za njeno adekvatno ispitivanje te ne smije ograničiti primjenu monoklonskih protutijela.

## **Summary**

**University of Zagreb**

**Faculty of Pharmacy and Biochemistry**

**Department of Biochemistry and Molecular Biology**

### **Monoclonal antibodies: humanization and immunogenicity**

#### **Objectives**

The aim of this work is to provide a comprehensive overview of therapeutic monoclonal antibodies, both of the ones approved for therapeutic use, as well as of those in development, with special emphasis on their immunogenicity and humanization. The aim is also to provide an overview of contemporary methods used to obtain and analyze monoclonal antibodies and their variants with a greater proportion of human sequence as means of reduction of their immunogenicity.

#### **Materials and Methods**

A general overview of the monoclonal antibodies treatment and their historical development was presented. The scientific literature was used for the review of the characteristics of individual groups of monoclonal antibodies and their therapeutic use. An outline was provided of current knowledge and methods for the production of monoclonal antibodies and of immunogenicity problems encountered during their use. The immunogenicity of certain groups of monoclonal antibodies was described, the impact of immunogenicity on their therapeutic success and how humanization affected the reduction of immunogenicity. All the factors that can lead to immunogenicity of monoclonal antibodies and means and methods used for its prediction and minimization were considered. In addition, the next generation variants of monoclonal antibodies were described with special emphasis on their therapeutic potential and optimized properties, as well as methods for obtaining them.

#### **Results**

Introduction of human sequences into monoclonal antibodies decreases their immunogenicity. Although murine monoclonal antibodies have an important role in diagnostic purposes, their use is limited – as foreign bodies in human body in most cases they cause an immune response due to their immunogenic potential. Chimerization reduces the immunogenicity of monoclonal antibodies even though chimeric antibodies can cause the formation of anti-drug

antibodies. They also have a longer half-life than murine and can have effector functions. Further reduction of immunogenicity was achieved by further humanization of monoclonal antibodies. Humanized monoclonal antibodies significantly contributed to today's therapeutic success of monoclonal antibodies.

Contrary to expectations, complete humanization does not lead to the absence of immunogenicity, and the rate of the immune response to a fully human antibody is not significantly different from the rate of the immune response to a humanized antibody. The immune response is directed towards the parts of the monoclonal antibodies of animal origin. However, the immunogenicity of the humanized and fully human antibodies originates from the complementarity determining regions (CDR), while there is a tolerance to the human framework of variable domain of monoclonal antibodies which contains CDRs. Immunogenic potential can be further decreased by modifying CDR regions, however this also reduces the affinity and specificity of a monoclonal antibody and can cause a generation of new epitopes.

There are no *in vitro* and animal tests that can adequately evaluate the immunogenicity of monoclonal antibodies and the only results that are still relevant are results obtained from clinical studies and monitoring of the patients. Comparison of data for different therapeutic antibodies remains difficult since the available data on immunogenicity were obtained by different methods of variable sensitivity.

Immunogenicity can be affected by many other factors besides the degree of humanization, like glycosylation and the presence of aggregates. These factors must be examined, predicted and minimized when developing monoclonal antibodies.

## **Conclusion**

Immunogenicity of monoclonal antibodies cannot be completely eliminated, it can only be reduced to a minimum. The presence of the immune response is largely dependent on the applied medicine, but also on the individual to which the medicine is applied. There is no universal formula and the treatment should be individualized and rationalized. In the absence of immunogenicity it is not always possible to determine the cause - it may be a feature of the target antigen, the state of the patient, the applied dose or a unique feature of the monoclonal antibody.

Today monoclonal antibodies are widely used, and the development of monoclonal antibodies of the next generation and their variants will expand their application. Therefore, immunogenicity should be well studied, there should be a possibility for its adequate testing and it should not limit the use of monoclonal antibodies.

*Specijalistički rad izrađen je pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Gordane Maravić Vlahoviček, na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju, Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*

*Željela bih zahvaliti svim talentiranim, optimističnim, pametnim, strpljivim, entuzijastičnim i dobrim ljudima koji oplemenjuju svijet i moj život – uz vas učim, rastem i razvijam se.*



## Sadržaj specijalističkog rada

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Uvod i pregled područja istraživanja .....</b>                               | <b>1</b>  |
| <b>2. Cilj istraživanja .....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>3. Materijal i metode - Sustavni pregled saznanja o temi.....</b>               | <b>5</b>  |
| 3.1 Monoklonska protutijela.....   | 5         |
| 3.1.1 Protutijela.....   | 5         |
| 3.1.2 Imunoglobulini G kao monoklonska protutijela .....                           | 6         |
| 3.2 Vrste, razvoj i primjena monoklonskih protutijela.....                         | 15        |
| 3.2.1 Mišja monoklonska protutijela .....  | 15        |
| 3.2.2 Kimerna monoklonska protutijela.....   | 16        |
| 3.2.3 Humanizirana monoklonska protutijela.....                                    | 17        |
| 3.2.4 Humana monoklonska protutijela.....  | 18        |
| 3.2.5 Konjugati protutijela i lijeka .....   | 31        |
| 3.2.6 Inačice monoklonskih protutijela.....  | 33        |
| 3.2.7 Liječenje monoklonskim protutijelima .....                                   | 38        |
| 3.3 Imunogenost proteinskih lijekova i monoklonskih protutijela.....               | 48        |
| 3.3.1 Imunosna reakcija na lijek .....   | 48        |
| 3.3.2 Čimbenici koji utječu na imunogenost monoklonskih protutijela .....          | 49        |
| 3.3.3 Utjecaj imunogenosti na farmakokinetiku i terapijski odgovor.....            | 54        |
| 3.3.4 Ispitivanje imunogenosti.....  | 56        |
| 3.4 Strategije za smanjenje imunogenosti monoklonskih protutijela .....            | 62        |
| 3.4.1 Utjecaj kakvoće lijeka i redukcije agregacije na smanjenje imunogenosti..... | 63        |
| 3.4.2 Smanjenje imunogenosti humanizacijom monoklonskih protutijela.....           | 65        |
| 3.4.3 Smanjenje imunogenosti informatičkim metodama .....                          | 71        |
| <b>4. Rasprava .....</b>   | <b>74</b> |
| <b>5. Zaključci.....</b>   | <b>85</b> |
| <b>6. Literatura.....</b>  | <b>87</b> |
| <b>7. Životopis.....</b>   | <b>94</b> |

## 1. Uvod i pregled područja istraživanja

Monoklonska protutijela su zbog svojih mnogih prednosti danas najbrže rastuća skupina lijekova značajnog terapijskog potencijala i široke primjene. Više od 45 monoklonskih protutijela je odobreno za primjenu u terapijske svrhe, a u posljednje tri godine ih se oko 500 nalazilo u kliničkom razvoju (1, 2, 3, 4). Od toga se tijekom 2015. godine njih 39 nalazilo u fazama 2/3 ili 3 kliničkih ispitivanja (5). Koriste se u liječenju tumora, autoimunih, kardiovaskularnih i infektivnih bolesti, astme i za sprječavanje odbacivanja transplantata te u dijagnostici *in vivo*, a očekuje se da će se razvojem novih monoklonskih protutijela primjena širiti i na druga terapijska područja (6).

Moguće je razviti monoklonsko protutijelo za gotovo svaki antigen, a specifičnost vezanja protutijela na ciljani antigen visokim afinitetom je osnova za njihovu upotrebu u terapijske svrhe. Osim specifičnosti i selektivnosti koja za posljedicu ima relativnu sigurnost primjene (7), daljnje prednosti su povoljna farmakokinetička svojstva, efektorske funkcije i mogućnost stvaranja konjugata protutijela i lijeka te raznih inačica (8).

Monoklonska protutijela bila su među prvim terapijskim molekulama dobivenima modernim biotehničkim postupcima. Iako su danas brzo rastuća skupina terapeutika, i dalje nailaze na mnoge poteškoće. S ciljem optimizacije monoklonskih protutijela i povećanja djelotvornosti nastoji se smanjiti njihova imunogenost, povećati afinitet vezanja na antigen te poboljšati efektorske funkcije i farmakokinetička svojstva (6).

Sva monoklonska protutijela imaju imunogeni potencijal. Prva monoklonska protutijela bila su u potpunosti mišjeg porijekla, a njihov nastanak je omogućilo otkriće tehnologije hibridoma stanica 1975. godine (9). Iako mišja monoklonska protutijela imaju veliku ulogu u

dijagnostici, kao strana tijela u ljudskom tijelu u većini slučajeva izazivaju imunosnu reakciju zbog svog imunogenog potencijala.

Imunogenost predstavlja problem za terapijsku uspješnost monoklonskih protutijela jer stvaranje protutijela na monoklonsko protutijelo dovodi do bržeg klirensa protutijela, smanjenja djelotvornosti te povećanog rizika od nuspojava (10).

Razvoj monoklonskih protutijela s ciljem smanjenja njihove imunogenosti teče paralelno s razvojem molekularno-bioloških tehnika, od otkrića prvih mišjih, preko kimernih i humaniziranih, do danas potpuno humanih protutijela. Ni potpuna humanizacija, suprotno prvotnim očekivanjima, nije dovela do njenog potpunog izostanka (11).

Uzroci nastanka imunosnog odgovora ne leže samo u sekvencama monoklonskih protutijela koje nisu humanog porijekla, već ovise o mnogo čimbenika te još uvijek nisu najbolje razjašnjeni (12). Na imunogeni potencijal monoklonskih protutijela utječu i sustavi za ekspresiju zbog različitih obrazaca glikozilacije, put primjene lijeka, doza, trajanje liječenja, istodobna terapija, stanje bolesnika, onečišćenja zaostala iz postupka proizvodnje, formulacija lijeka i degradacijski produkti, a jedan od glavnih čimbenika koji izazivaju neželjenu imunosnu reakciju je prisutnost agregata protutijela (12, 13).

Problem u ocjeni imunogenosti predstavljaju raspoložive metode za ispitivanje imunogenosti, koje se razlikuju u specifičnosti i osjetljivosti čime je otežana usporedba različitih terapeutika i interpretacija rezultata. Nepostojanje standardizirane i validirane metode za ispitivanje imunogenosti proteinskih lijekova otežava njenu ocjenu. Kao posljedica, različite studije istog lijeka bilježe različite stupnjeve imunogenosti za taj lijek (14).

Glavni cilj u razvoju monoklonskih protutijela nove generacije i njihovih inačica je postizanje većeg afiniteta i smanjenje imunogenosti. Trenutno se u različitim fazama razvoja nalaze oblici nove generacije s terapijskim potencijalom i optimiziranim svojstvima poput bispecifičnih monoklonskih protutijela, bispecifičnih scFv-fragmenata koji aktiviraju T-

limfocite, IgG-scFv fuzijskih protutijela i protutijela s jednom domenom, tzv. sdAb (engl. *single-domain antibody*) odnosno nanotijela (engl. *nanobodies*) porijeklom iz deva čije su humanizirane inačice u fazi 2 kliničkih ispitivanja (15), a pretpostavljena terapijska uspješnost ovih oblika će se tek pokazati.

## **2. Cilj istraživanja**

Cilj ovog specijalističkog rada je pružiti sveobuhvatan pregled terapijskih monoklonskih protutijela, kako odobrenih za terapijsku primjenu, tako i onih u razvoju, s posebnim osvrtom na njihovu imunogenost i humanizaciju te napraviti pregled suvremenih metoda koje se koriste za dobivanje i analizu monoklonskih protutijela i njihovih inačica sa što većim udjelom humanih sekvenci kako bi se smanjila njihova imunogenost.

Hipoteza 1: Uvođenjem humanih sekvenci u monoklonska protutijela smanjuje se njihova imunogenost.

Hipoteza 2: Potpuna humanizacija ne dovodi do potpunog izostanka imunogenosti.

Hipoteza 3: Na imunogenost mogu utjecati brojni čimbenici koji se moraju istražiti, predvidjeti i minimizirati.

### **3. Materijal i metode - Sustavni pregled saznanja o temi**

#### **3.1 Monoklonska protutijela**

##### **3.1.1 Protutijela**

Imunosni sustav izgrađuju organi i stanice razmješteni po čitavom tijelu. Njihova osnovna funkcija je zaštita organizma od oštećenja i stranih tvari. Imunost se dijeli na prirodenu i stečenu imunost, a osnovne komponente stečene imunosti su stanična i humoralna imunost. Kod stanične imunosti stanice imunosnog sustava, uglavnom T-limfociti, štite organizam od mikroorganizama, stranih stanica, uključujući tumorske stanice i transplantate, te stanica zaraženih virusima. Kod humoralne imunosti protutijela inaktiviraju strane tvari i sudjeluju u njihovom uništavanju (16).

Protutijela ili imunoglobulini su glikoproteinske molekule koje izlučuju plazma stanice (8). Plazma stanice nastaju aktivacijom, proliferacijom i diferencijacijom B-limfocita nakon dolaska u doticaj s epitopima antigena. Protutijela se specifično vežu na antigenske determinante odnosno epitope, a dio protutijela odgovoran za vezanje na epitop se naziva paratop (17). Specifičnost vezanja paratopa na epitop je osnova za upotrebu protutijela u terapijske svrhe (7).

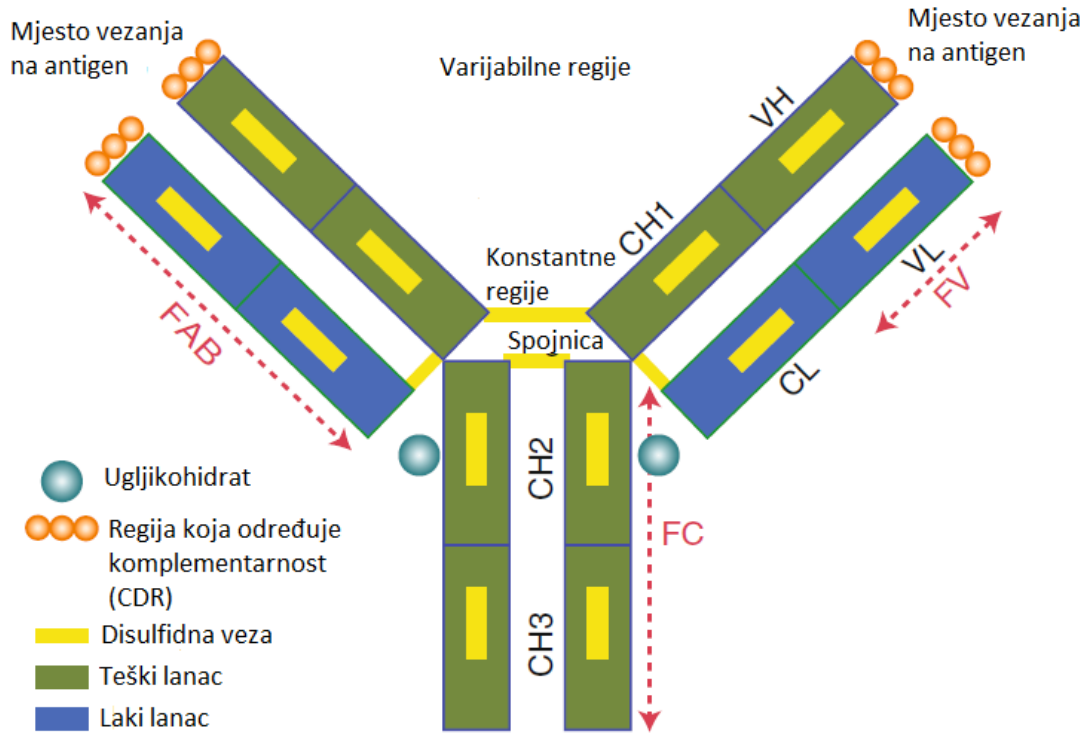
Protutijela su građena od polipeptidnih lanaca – dva teška lanca i dva laka lanca, koji su povezani disulfidnim mostovima te imaju oblik slova Y (Slika 1). Lake i teške lance kodiraju geni triju lokusa. Na kromosomu 14 se nalazi lokus koji sadrži gene za imunoglobulinski teški lanac, a na kromosomima 2 i 22 imunoglobulinski kappa odnosno lambda lokusi koji sadrže gene za lake lance (17). Postoji pet glavnih razreda tj. izotipova protutijela, IgG, IgM, IgA,

IgE i IgD, a međusobno se razlikuju u teškom lancu. U tijelu je najzastupljeniji izotip IgG (8, 17).

Razlikujemo monoklonska i poliklonska protutijela. Monoklonska protutijela su protutijela nastala iz pojedinačnog klona B-limfocita, tj. plazma stanice. Imaju identične paratope te se vežu na pojedinačni epitop pojedinačnog antigena. Poliklonska protutijela su protutijela koja se vežu na različite epitope antigena ili čak na različite antigene koji su bili prisutni u imunizirajućem agensu, a izlučuju ih B-limfociti različitih staničnih linija. Imunosni odgovor na antigene u tijelu je poliklonski (8, 18). Poliklonski serum se već dugo koristi u pasivnoj imunizaciji ljudi. Antigenom se imunizira životinja koja izlučuje protutijela, uglavnom imunoglobuline G, a poliklonski serum predstavlja skup nasumičnih protutijela koja su usmjerena na više epitopa različitih antigena (19). Otkriće tehnologije hibridoma stanica je 1975. godine omogućilo proizvodnju i izolaciju monoklonskih protutijela za koju su Milstein i Köhler dobili Nobelovu nagradu 1984., a od tada je razvijeno mnogo drugih tehnika za njihovu proizvodnju (20).

### **3.1.2 Imunoglobulini G kao monoklonska protutijela**

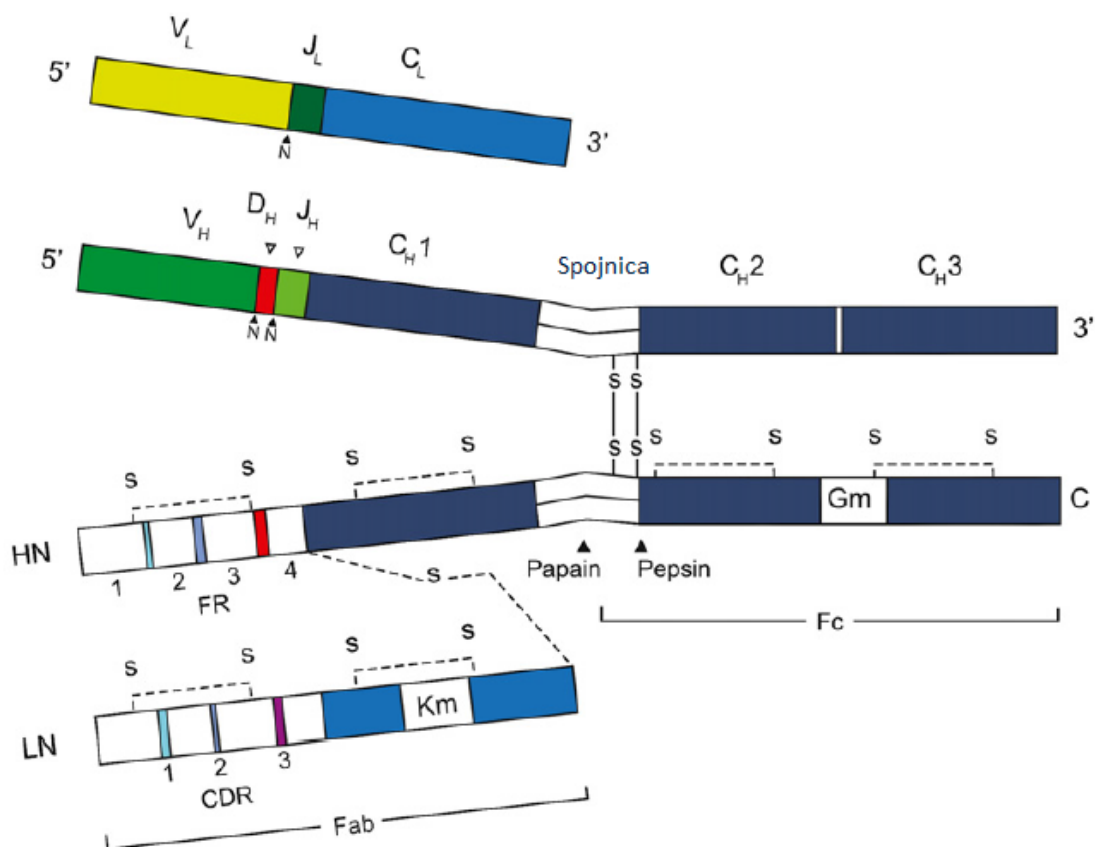
Monoklonska protutijela koja se koriste u terapijske svrhe uglavnom pripadaju skupini imunoglobulina G (8). Humani imunoglobulini G se dijele na četiri podrazreda, IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4. Svako monoklonsko protutijelo se sastoji od konstantne (engl. *constant*, C) i varijabilne (engl. *variable*, V) regije. S obzirom da je građeno od dva teška i dva laka polipeptidna lanca, razlikujemo varijabilnu regiju teškog (engl. *variable heavy*, VH) i varijabilnu regiju lakog lanca (engl. *variable light*, VL) te konstantnu regiju teškog (engl. *constant heavy*, CH1, CH2 i CH3) i konstantnu regiju lakog lanca (engl. *constant light*, CL) (Slika 1).



**Slika 1. Struktura imunoglobulina G** (preuzeto i prilagođeno iz 7)

Varijabilna regija teškog i lakog lanca čini Fv-fragment (engl. *fragment variable*). Sastoji se od tri hipervarijabilne sekvence 1, 2 i 3 koje su odgovorne za vezanje na epitop antigena, a poznatije su kao regija koja određuje komplementarnost (engl. *complementarity determining region*, CDR). CDR leži u takozvanom „okviru“ (engl. *framework*, FW) (Slika 2) (7, 17).





**Slika 2. Detaljnja struktura imunoglobulina G.** Gornji teški i laki lanac prikazuju strukturu protutijela na razini nukleotida. Donji teški i laki lanac prikazuju strukturu protutijela na razini proteinskih sekvenci. H – teški lanac, L – laki lanac, N – amino kraj peptida, C – karboksilni kraj peptida, S-S – disulfidni most, Gm i Km – alotipovi, spojnica – engl. *hinge* (preuzeto i prilagođeno iz 17)

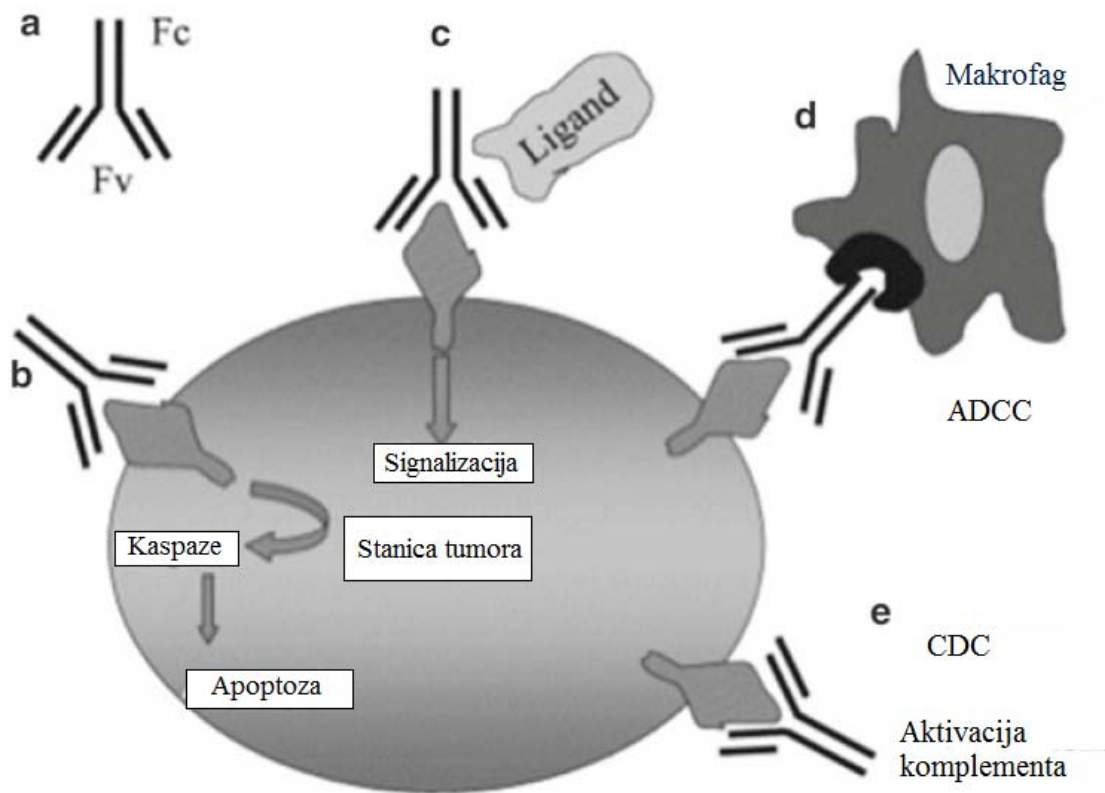
S obzirom da i laki i teški lanac sadrže hipervarijabilne sekvence, kovalentna veza teškog i lakog lanca spaja šest regija koje određuju komplementarnost. Svaka CDR regija odgovara varijabilnim (V), raznovrsnim (D) i spajajućim (J) regijama gena (engl. *variable, diverse, joining, VDJ*). Regije koje određuju komplementarnost L1, L2, H1 i H2 kodiraju V geni, CDRL3 kodiraju V-J geni, a CDRH3 kodiraju V-D-J geni koji se spajaju tijekom somatske rekombinacije (Slika 2) (17). Somatskom rekombinacijom se nasumično kombiniraju varijabilne, raznovrsne i spajajuće genske sekvence, a nasumičnost somatske rekombinacije te spajanje različitih lakih i teških lanaca stvara ogromnu raznolikost koja omogućuje prepoznavanje gotovo svake strane makromolekule (21).

Tretiranje monoklonskog protutijela proteolitičkim enzimom papainom dovodi do stvaranja takozvanog Fc-fragmenta (engl. *crystallizable fragment*), koji tvore konstantne regije teškog lanca CH2 i CH3, te dva Fab-fragmenta (engl. *antigen binding fragment*), koji tvore konstantne regije teškog i lakog lanca CH1 i CL i varijabilna regija Fv, dok tretiranje proteolitičkim enzimom pepsinom dovodi do stvaranja Fc-fragmenta i dimernog F(ab)<sub>2</sub>-fragmenta (Slika 2). Kako je navedeno, CDR regija Fv-fragmenta odgovorna je za vezanje monoklonskog protutijela na epitop, dok Fc-fragment reagira s receptorima različitih stanica. Stoga je Fc-fragment odgovoran za efektorsku funkciju IgG-a, ali i raspodjelu u tijelu (17).

Protutijela su glikoproteinske molekule, a šećeri, koji se tijekom posttranslacijskih modifikacija uglavnom dodaju na Fc-fragment, utječu na njihovu funkciju. Osim što stabiliziraju strukturu glikoproteina, utječu i na vezanje na receptore efektorskih stanica te na medijatore imunskog sustava (17). Fc-fragment može aktivirati staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima (engl. *antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC*) i citotoksičnost ovisnu o komplementu (enlg. *complement-dependent cytotoxicity, CDC*) te se modifikacijom Fc-fragmenta može mijenjati navedena aktivnost. Također, Fc-fragment je odgovoran za vezanje na FcRn (engl. *neonatal Fc receptor*), receptor odgovoran za raspodjelu

monoklonskih protutijela u tijelu te se modifikacijom Fc-fragmenta može utjecati na njihovu farmakokinetiku (17, 22).

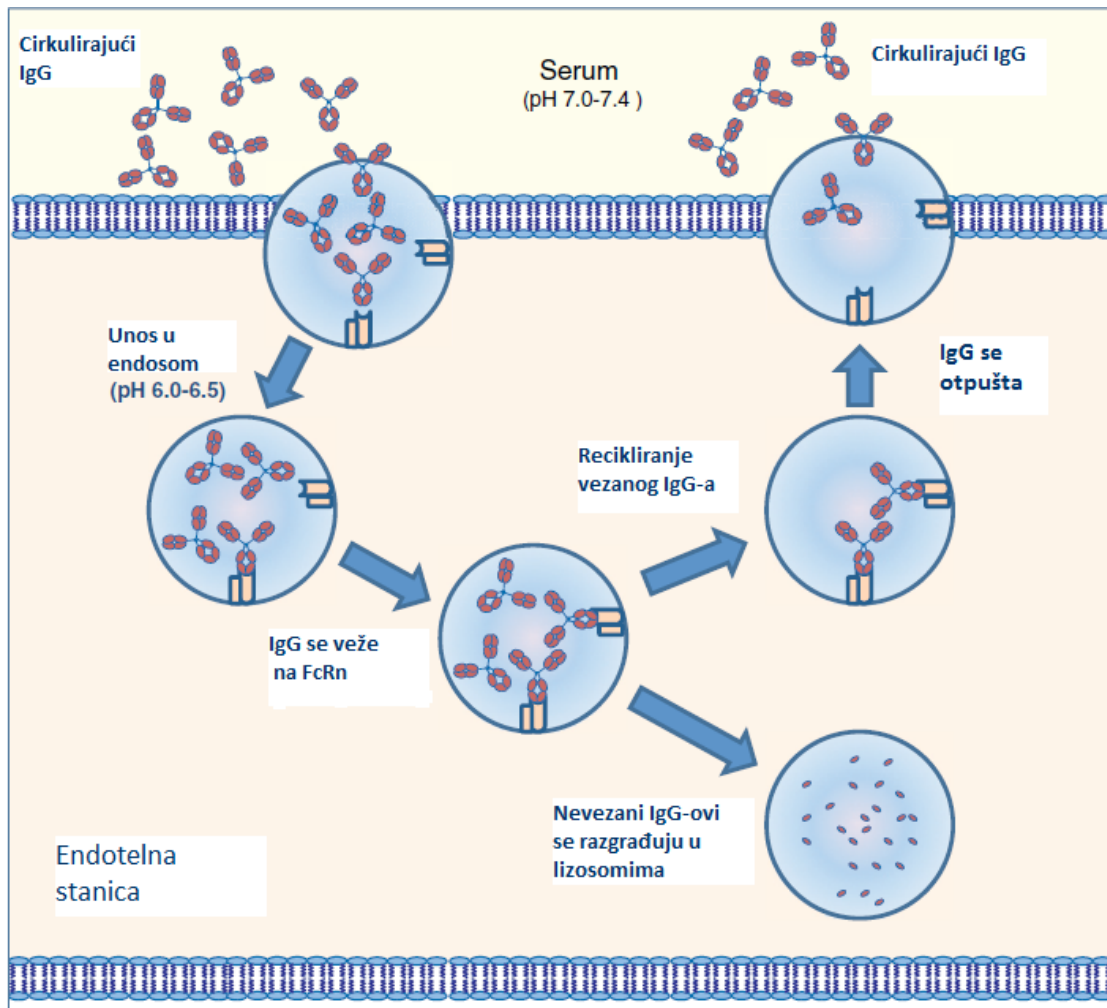
Protutijela specifično prepoznaju epitop antigena te se na njega vežu. Osim direktnog djelovanja na antigen koje uključuje njegovu inaktivaciju, monoklonsko protutijelo može imati efektorske funkcije i djelovati posredno aktiviranjem citotoksičnosti ovisne o komplementu i stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (Slika 3). Najjednostavniji način je vezanjem protutijela na antigen čime protutijelo sprječava aktivnost antigena i njegovo vezanje na receptore. Antigen može biti topivi ligand koji cirkulira u plazmi, a primjeri terapijskih protutijela koja se vežu na takve ligande su infliksimab, adalimumab i certolizumab koji se vežu na faktore nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) ili bevacizumab koji se veže na faktor rasta krvožilnog endotela. Protutijela se mogu vezati i na receptore na površini stanica i time sprječavati njihovu interakciju s ligandima ili multimerizaciju, potaknuti internalizaciju receptora ili apoptozu. Primjeri takvih protutijela uključuju cetuksimab koji se veže na receptor epidermalnog faktora rasta 1 i trastuzumab koji se veže na receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (Slika 3) (11, 23).



**Slika 3. Mehanizmi djelovanja monoklonskih protutijela na stanicu tumora.** a. monoklonsko protutijelo: b. može imati direktan učinak na apoptozu ili programiranu smrt stanice, c. može se vezati na receptor na površini stanica i time spriječiti njihovu interakciju s ligandom, d. može aktivirati staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima, e. može aktivirati citotoksičnost ovisnu o komplementu (preuzeto i prilagođeno iz 24)

Citotoksičnost ovisnu o komplementu i staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima mogu aktivirati razredi IgM i IgG, a unutar razreda IgG podrazredi IgG1 i IgG3. Stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima započinje vezanjem protutijela na antigen i Fc-fragmenta protutijela na površinu efektorske stanice tj. na njezin Fc $\gamma$  receptor, čime se aktiviraju prirodno ubilačke stanice (engl. *natural killer*, NK), monociti ili makrofagi (8). Citotoksičnost ovisna o komplementu započinje vezanjem C1q kompleksa na Fc-fragment čime se potiče kaskada reakcija imunskog sustava što dovodi do uništavanja ciljane stanice (Slika 3) (17).

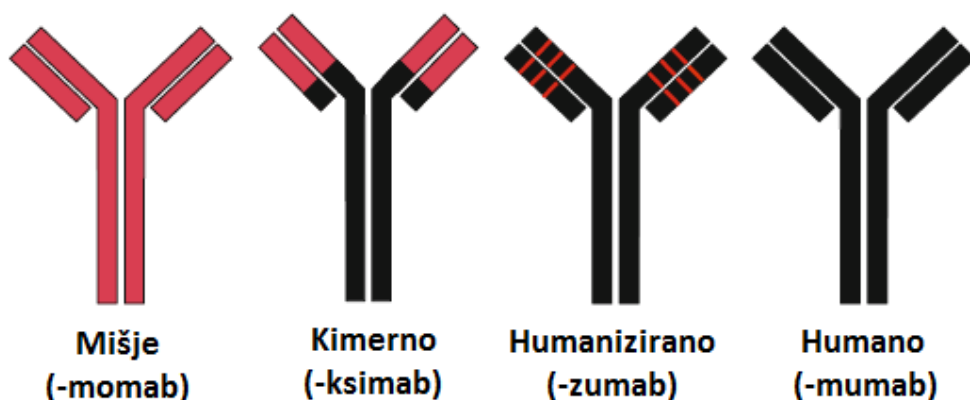
Vrijeme poluživota imunoglobulina G u plazmi je u prosjeku 21 dan. To vrijedi za sva tri podrazreda imunoglobulina G, osim podrazreda IgG3 čije je vrijeme poluživota oko sedam dana (7). Prosječno vrijeme poluživota od 21 dan je daleko dulje nego kod drugih razreda imunoglobulina i drugih terapijskih proteina, a za to je odgovorno vezanje na FcRn receptor. FcRn receptor se veže na Fc-fragment monoklonskog protutijela. Nakon što protutijelo uđe u stanicu pinocitozom, u endosomu se veže na FcRn receptor pri nižem pH. Kada dođu na staničnu površinu, vezana protutijela se otpuštaju pri višem pH krvi (22). Monoklonska protutijela koja se ne vežu na FcRn receptor prolaze razgradnju u lizosomima. Vezanjem na FcRn receptor monoklonsko protutijelo se reciklira, odnosno odgađa se razgradnja i produljuje vrijeme poluživota. Podrazred IgG3 se slabije veže na FcRn receptor te je zbog toga njegovo vrijeme poluživota u plazmi kraće i nije pogodan za primjenu u terapijske svrhe (8).



**Slika 4. Vezanje na FcRn receptor** (preuzeto i prilagođeno iz 8).

S obzirom da podrazred IgG1 ima više povoljnih svojstava, učestalo se koristi kao monoklonsko protutijelo u terapijske svrhe (25). Danas je registrirano više od 45 monoklonskih protutijela u Europskoj uniji i Sjedinjenim Američkim Državama, a zbog njihovog iznimnog potencijala mnoga druga su u različitim fazama razvoja (5). Poznajemo četiri vrste monoklonskih protutijela koja se koriste u terapijske svrhe (Slika 5). Mišja (nastavak –momab, npr. ibritumomab) su najstarija, 100% mišjeg porijekla, a dobivaju se tehnologijom hibridoma stanica. Iduća generacija su kimerna monoklonska protutijela (nastavak –ksimab, npr. infliksimab) koja se sastoje od humane konstantne i varijabilne mišje

regije te im je sličnost sekvenci ljudskim protutijelima 60-70%. Humanizirana protutijela (nastavak –zumab, npr. palivizumab) su 90-95% humana, a mišjeg porijekla je samo regija koja određuje komplementarnost. Humana ili potpuno humanizirana protutijela (nastavak –mumab, npr. adalimumab) su u 100% sekvenci slična ljudskima (7), a njihov razvoj je tekao paralelno s otkrićem naprednih molekularno-bioloških tehnika.



**Slika 5. Vrste monoklonskih protutijela koja se koriste u terapijske svrhe** (preuzeto i prilagođeno iz 7)

Danas se u terapijske svrhe, osim cjelovitih monoklonskih protutijela, koriste i njihove inačice poput fuzijskih proteina i Fab-fragmenata. Fuzijski proteini nastali su kombiniranjem fragmenata monoklonskih protutijela i drugih bioloških molekula. Fragmenti monoklonskih protutijela poput Fab ili scFv (engl. *single chain Fv*) zbog svoje male molekularne mase i nemogućnosti vezanja za FcRn receptore pokazuju kraće vrijeme poluživota u usporedbi s ishodišnim molekulama, dok je farmakokinetika Fc-fragmenata slična kao kod cjelovitog imunoglobulina G (18). Fuzijski proteini se uglavnom sastoje od Fc-fragmenta monoklonskog protutijela i drugih terapijskih molekula, poput receptora ili citokina, kojima se na taj način povećava stabilnost i vrijeme poluživota (18, 22).

Monoklonska protutijela mogu poslužiti i kao prijenosnik lijeka ili radionuklida, a takve kombinacije se nazivaju konjugatima protutijela i lijeka (engl. *antibody drug conjugate*, ADC), odnosno radioimunoterapeutici (engl. *radioimmunotherapy*, RIT). Kovalentno vezan lijek ili radionuklid na monoklonsko protutijelo koristi se za liječenje tumora, dok monoklonsko protutijelo osigurava selektivno vezanje za receptore na površini ciljanih stanica. Kod tumora su ciljani antigeni zastupljeniji na površini stanica te selektivnost monoklonskih protutijela smanjuje nuspojave u odnosu na primjenu samih citotoksičnih lijekova i radionuklida (26). Konjugati s lijekovima i inačice monoklonskih protutijela detaljnije su obrađeni u poglavljima 3.2.5 i 3.2.6.

Danas kada su na raspolaganju mnoge tehnike za proizvodnju monoklonskih protutijela i njihovih inačica, odluka koje monoklonsko tijelo će se razviti ovisi o njegovoj namjeni. Primjerice, poželjno je da protutijela koja se koriste u dijagnostičke svrhe imaju visok afinitet vezanja, kratko vrijeme poluživota te da nemaju efektorske funkcije, dok istovremeno vrijedi suprotno za monoklonska protutijela koja se koriste dugotrajno, u terapijske svrhe; za njih je poželjno da imaju dulje vrijeme poluživota te po mogućnosti specifične efektorske funkcije (27).

## **3.2 Vrste, razvoj i primjena monoklonskih protutijela**

### **3.2.1 Mišja monoklonska protutijela**

Mišja monoklonska protutijela dobivaju se tehnologijom hibridoma stanica otkrivenom 1975. godine. Hibridoma stanice nastaju fuzijom mijeloma stanica, tumorskih B-limfocita koji su postali besmrtni, i stanica slezene, odnosno B-limfocita koji proizvode protutijela (9). Da bi B-limfociti proizvodili protutijela, miš se mora imunizirati određenim antigenom. Metoda se



temelji na činjenici da će B-limfocit proizvoditi samo jedno specifično protutijelo. S druge strane, mijeloma stanice moraju nositi selekcijski biljeg. Tim stanicama nedostaje enzim hipoksantin-gvanin fosforibozil-transferaza što im onemogućuje preživljavanje u mediju koji sadrži hipoksantin, aminopterin i timidin (tzv. HAT-medij) jer ne mogu proizvoditi nukleotide (20). S obzirom da stanice slezene sadrže navedeni enzim, ali imaju kratak životni vijek, samo hibridoma stanice će preživjeti u HAT-mediju (9). Dobivena kultura stanica sadrži mnogo različitih klonova B-limfocita koji proizvode različita protutijela usmjerena na isti antigen (9). Stanice se potom razdvajaju, ispituju na proizvodnju željenih monoklonskih protutijela te se željene stanice uzgajaju u mediju gdje proizvode veće količine protutijela (6). Tehnika hibridoma stanica se pokazala kao dobra metoda za stvaranje specifičnih protutijela usmjerenih na određeni antigen (9).

Kada se primijene kod ljudi, vrijeme poluživota mišjih monoklonskih protutijela u plazmi je jedan do dva dana, daleko kraće od imunoglobulina G koji se nalaze u ljudskoj plazmi. S obzirom da se smatra da je za vrijeme poluživota u plazmi odgovorno vezanje na FcRn receptor, za kratko vrijeme poluživota mišjih monoklonskih protutijela u ljudskoj plazmi je odgovoran mali afinitet vezanja mišjih monoklonskih protutijela za ljudski FcRn receptor (8, 18). Mišja monoklonska protutijela ujedno predstavljaju strana tijela ljudskom tijelu čime mogu izazvati imunosnu reakciju i brzo se odstraniti (10).

### **3.2.2 Kimerna monoklonska protutijela**

Evolucija molekularno-bioloških tehnika i to izolacija gena za imunoglobuline G, tehnologija rekombinantne DNA i transfekcija gena omogućila je razvoj iduće generacije, kimernih protutijela (27). Ova protutijela su rekombinantni proteini, a sastoje se od humane konstantne i mišje varijabilne regije. Specifičnost vezanja na antigen je ista kao i kod mišjih, no humana

Fc-regija omogućuje dulje vrijeme poluživota *in vivo* u usporedbi s mišjima te slične efektorske funkcije, aktivaciju komplementa i staničnu toksičnost ovisnu o protutijelu (7, 27). Konvencionalna metoda za nastanak kimernog protutijela podrazumijeva spajanje mišje DNA koja kodira varijabilni dio monoklonskog protutijela i DNA ljudskog porijekla koja kodira konstantni dio te ekspresiju u kulturi stanica sisavaca. Prvi korak je isti kao i kod nastanka mišjih monoklonskih protutijela. Miš se imunizira antigenom te se izoliraju B-limfociti koji proizvode protutijela. B-limfociti i mijeloma stanice fuzijom daju hibridoma stanice koje se ispituju na proizvodnju željenih monoklonskih protutijela te potom izoliraju. Iz stanica koje proizvode željena protutijela se izoliraju nukleotidni sljedovi za varijabilne teške i lake lance i spajaju s nukleotidnim sljedovima za konstantne teške i lake lance imunoglobulina iz ljudskih stanica. Slijedi transfekcija stanica sisavaca rekombinantnom DNA te se selektira klon koji pokazuje visoku razinu ekspresije kimernih imunoglobulina. Takav se klon potom uzgaja u kulturi stanica kako bi proizvodio protutijela (27, 28).

### **3.2.3 Humanizirana monoklonska protutijela**

Humanizirana monoklonska protutijela su razvijena nakon kimernih kao daljnji korak u humanizaciji monoklonskih protutijela. Ona su u velikoj mjeri humana, dok je jedino CDR-regija mišjeg porijekla (10).

Humanizirana monoklonska protutijela se mogu proizvesti humanizacijom kimernog protutijela. Nakon dobivanja kimernog monoklonskog protutijela, pribjegava se daljnjoj humanizaciji mijenjanjem nukleotidnih sljedova u varijabilnoj regiji. Ciljanom mutagenезom se mijenja određeni broj aminokiselina bez utjecaja na specifičnost vezanja na antigen (29). Postupak mora biti selektivan kako bi se zadržala specifičnost vezanja protutijela na antigen, tj. ne smije doći do promjene u regijama koje određuju komplementarnost nego se

mutagenezom DNA mijenja okvir Fv-regije, što dovodi do promjena u slijedu aminokiselina (30).

Druga metoda za dobivanje humaniziranih monoklonskih protutijela je metoda umetanja mišjih CDR-regija u humana monoklonska protutijela odnosno u okvir varijabilne regije. Iz mišjeg protutijela se izolira DNA koja kodira za regije koje određuju komplementarnost te se uvodi u DNA koja kodira za humano monoklonsko protutijelo, a vektor koji nosi rekombinantnu DNA se potom eksplicira u kulturi stanica sisavaca (30, 31, 32, 33).

### **3.2.4 Humana monoklonska protutijela**

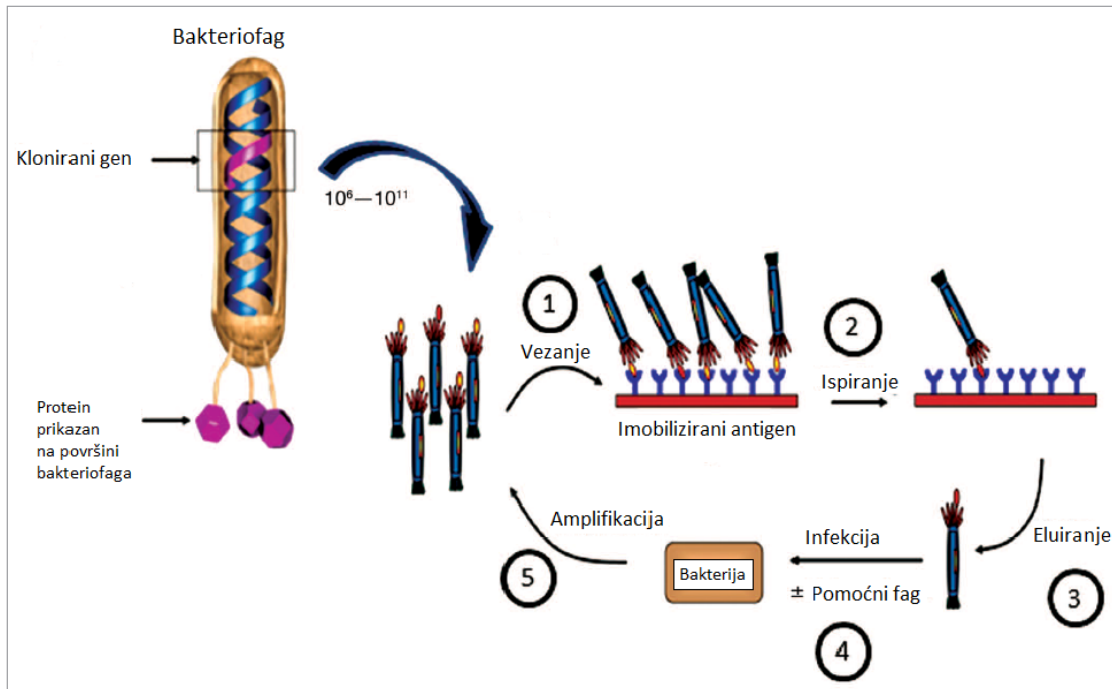
Iako se još u 80-im godinama 20. stoljeća pretpostavljalo da će potpuno humana monoklonska protutijela biti superiornija mišjim zbog manje imunogenosti i bolje efektorske funkcije, nije bilo moguće uspješno razviti terapijsko humano monoklonsko protutijelo. Istraživači su nailazili na poteškoće pri imunizaciji *in vitro* kako bi dobili humane hibridoma stanice, a zbog etičkih ograničenja nije bila moguća imunizacija *in vivo*. Ljudske hibridoma stanice su ujedno bile nestabilne i proizvodile su male količine imunoglobulina M (27). Daljnji pokušaji transformacije B-limfocita u tumorske infekcijom virusima, fuzijom s humanim mijeloma stanicama i proizvodnjom heterohibridoma kod kojih se mišje mijeloma stanice spajaju s ljudskim B-limfocitima također su nailazili na stanoviti neuspjeh. Uglavnom je fuzija stanica bila otežana, prinos protutijela nizak, kultura stanica nestabilna te bi znalo doći do gubitka proizvodnje protutijela (34).

Otkriće novih molekularno-bioloških tehnika, i to kombinatorijskih knjižnica bakteriofaga i proizvodnje transgeničnih životinja, omogućilo je razvoj potpuno humanih monoklonskih protutijela. Ova monoklonska protutijela ne sadrže mišje sekvence. Adalimumab je bilo prvo humano monoklonsko protutijelo dobiveno iz kombinatorijskih knjižnica bakteriofaga, a

registriran je 2002. godine, dok je panitumumab prvo humano monoklonsko protutijelo dobiveno iz transgeničnih životinja i registriran je 2006. godine (adalimumab i panitumumab su detaljnije opisani u poglavlju 3.2.7.1.).

#### **3.2.4.1 Kombinatorijske knjižnice bakteriofaga**

Otkriće mogućnosti kloniranja strane DNA u filamentozne bakteriofage 1985. je omogućilo razvoj kombinatorijskih knjižnica bakteriofaga (35). Princip metode je da se DNA sekvence željenih peptida ili proteina, nakon kloniranja u genom bakteriofaga, ekspimiraju kao fuzijski proteini na površini bakteriofaga čime fenotip reflektira genotip (Slika 6) (36). Razvoj metode lančane reakcije polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) potkraj 1980. godina je omogućio kloniranje komplementarne DNA (cDNA) varijabilnih regija imunoglobulina te time kombinatorijske knjižnice bakteriofaga predstavljaju repertoar B-limfocita jedinke od koje je cDNA dobivena (35). Neposredan produkt kombinatorijskih knjižnica su fragmenti protutijela, uglavnom Fab ili scFv.



**Slika 6. Kombinatorijske knjižnice bakteriofaga** (preuzeto i prilagođeno iz 36)

Do danas je razvijen veliki broj knjižnica koje se razlikuju u dizajnu, porijeklu, raznolikosti i načinu stvaranja. No s obzirom na izvor gena, može se proizvesti nekoliko glavnih vrsta knjižnica. Takozvane imunodne knjižnice se dobivaju kloniranjem gena ili cDNA varijabilnih regija protutijela plazma stanica imuniziranih ili inficiranih pojedinaca, pa su tako iz limfnih čvorova inficiranih pojedinaca uspješno dobiveni B-limfociti koji su poslužili za stvaranje imunodne knjižnice za herpes simplex virus (37). Ovako dobiveni B-limfociti su prošli afinitetnu maturaciju *in vivo*, proces u kojem B-limfociti zbog somatske hipermutacije stvaraju protutijela s povećanim afinitetom tijekom ponavljane izloženosti antigenu (17). Iako ovako dobivena knjižnica sadrži protutijela visokog afiniteta za željeni antigen dobivena afinitetnom maturacijom, za svaki željeni antigen se mora stvoriti nova knjižnica uz uvjet da takav antigen izaziva imunodnu reakciju u tijelu, tj. da ne postoji imunodna tolerancija (36). Ujedno, iako bi se ovom metodom trebao dobiti veliki broj željenih klonova, takav pristup zbog etičkih razloga i tehničkih ograničenja uglavnom nije moguć.

Kod stvaranja neimunodne, naivne knjižnice, koriste se geni neimuniziranih pojedinaca. Broj pozitivnih klonova je manji, ali se takve knjižnice mogu koristiti za stvaranje sintetskih ili polusintetskih imunodnih knjižnica kod kojih se dalje povećava raznolikost dobivenih protutijela metodama *in vitro*. Iz sintetskih i polusintetskih knjižnica se može izolirati fragment protutijela visokog afiniteta za gotovo svaki antigen, zaobilazeći moguću imunodnu toleranciju, te se eliminira potreba za stvaranjem nove knjižnice za svaki željeni antigen (36).

Da bi se stvorila klasična kombinatorijska knjižnica protutijela na površini bakteriofaga, potrebno je izolirati gene. Geni se kloniraju u bakteriofag pomoću vektora i spajaju se s genima koji kodiraju za proteine omotača bakteriofaga. Najčešće se koriste bakteriofagi iz skupine filamentoznih bakteriofaga (M13, Fd, fl) s pripadajućim proteinima omotača, primjerice pIII od bakteriofaga M13 (36). Danas uspješniji pristup odvaja ekspresiju protutijela od replikacije bakteriofaga. Geni koji kodiraju za fuzijski protein protutijela i proteina omotača se uvode u zaseban hibridni vektor, takozvani fagmid (hibrid plazmida i bakteriofaga), koji se uvodi u stanicu *E. coli*. *E. coli* se zarazi bakteriofagima koji se repliciraju u bakteriji te se fuzijski proteini ugrađuju u omotač bakteriofaga. Jednom stvorena, cijela knjižnica bakteriofaga se probire kako bi se identificiralo željeno protutijelo tj. željeni fragment, uglavnom putem afinitetne selekcije (engl. *biopanning*). Princip metode je da će se bakteriofag, ukoliko nosi željeni fragment, vezati na antigen koji je vezan na nepokretnu fazu te će ostati vezan nakon ispiranja (Slika 6). Postupak selekcije se provodi u nekoliko ciklusa kako bi se izolirao visoki postotak bakteriofaga koji nose fragmente protutijela za željeni antigen. Nakon što se izolira bakteriofag željenog afiniteta, njime se može ponovo zaraziti *E. coli* kako bi se dobio veliki broj kopija. Naposljetku se željena protutijela ispituju dodatnim testovima poput ELISA metode (engl. *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) (36, 38, 39).

Gen koji kodira za željeni protein se izrezuje iz genoma bakteriofaga te se može klonirati u prikladan ekspresijski sustav radi dobivanja većih količina. Zbog ograničenja u sklapanju

ljudskih proteina u *E. coli*, u bakteriji je moguće eksprimirati samo fragmente poput scFv-a i Fab-a (40), dok je dobivanje cijelog imunoglobulina G u *E. coli* moguće samo u rijetkim slučajevima (41). Jednom kada se stvori kombinatorijska knjižnica bakteriofaga, ona se može koristiti za dobivanje novih protutijela. Nakon odabira kandidata sa željenim svojstvima, moguće je stvoriti kombinatorijske knjižnice s  $10^6$  do  $10^{11}$  inačica ishodišnog proteina među kojima se može izabrati ona s najboljim svojstvima; sekvenciranjem gena se dobiva informacija za dodatne postupke genetičkog inženjerstva kako bi se primjerice povećao afinitet kroz stvaranje druge generacije knjižnica s mutiranim protutijelima (36).

Raznolikost ovih knjižnica se temelji na kloniranju i kombinaciji različitih gena. Nakon izolacije mRNA, koja je moguća od više različitih osoba, i sinteze cDNA, stvaranje knjižnice kloniranjem se provodi u dva ili tri koraka. U postupku kloniranja u dva koraka amplificirani geni za lake lance se kloniraju u bakteriofagni vektor, a u drugom koraku se u vektor kloniraju geni za teške lance (42). U postupku kloniranja u tri koraka stvaraju se odvojeno knjižnice za varijabilne lake i teške lance. Teški varijabilni lanci se potom izrezuju i kloniraju u vektor koji već sadrži gene za varijabilni laki lanac (43, 44).

Umnažanje i sklapanje PCR-om (engl. *PCR assembly*) je još jedna metoda kloniranja. Geni za varijabilne lake i teške lance se amplificiraju PCR-om te spajaju prije kloniranja u vektor. S obzirom da CDRH3 regija najviše pridonosi raznolikosti protutijela, spajanje PCR-om može biti kombinirano s randomizacijom CDRH3 regija prilikom amplifikacije čime se dobivaju polusintetske knjižnice (45).

Iako nasumičnost somatske rekombinacije, spajanje različitih lakih i teških lanaca i jedinstven genetički kod svake jedinke stvaraju ogromnu raznolikost koja omogućuje prepoznavanje gotovo svake strane makromolekule kod klasičnih kombinatorijskih knjižnica, raznolikost je ipak ograničena na onu koju omogućuje imunski sustav. Naime, genetički mehanizmi omogućavaju dovoljnu raznolikost u smislu stvaranja protutijela koja odgovaraju

funkcionalnom zahtjevu za vezanje na antigen te time stvaraju adekvatan imunosni odgovor, no također je vjerojatno da ti isti mehanizmi ograničavaju prirodnu raznolikost protutijela u usporedbi s raznolikošću koju može stvoriti u potpunosti nasumičan proces (21).

Radi povećanja raznolikosti stvorene su sintetske kombinatorijske knjižnice. Sintetske knjižnice nastaju umetanjem oligonukleotida DNA koji modificiraju genske sekvence CDR-ova varijabilnih domena. S obzirom da raznolikost leži u CDR-ovima, te iako je imunosni odgovor jako kompleksan, moguće je koristiti jedinstven okvir varijabilnih regija kako bi se osigurala stabilnost i olakšalo kloniranje, a da se pri modificiranju samo CDR-ova unutar okvira dobiju sintetske knjižnice koje mogu prepoznati gotovo sve antigene (46). Uvođenjem genske raznolikosti u samo četiri CDR regije unutar hipervarijabilne regije, postupak se pojednostavljuje, a bez promjene afiniteta (47). Ovakvom metodom je moguće dobiti jednu kombinatorijsku knjižnicu koja može proizvesti preko  $10^{10}$  jedinstvenih protutijela što je približno jednako ili nadmašuje broj protutijela dobivenih iz ljudskog tijela (46). Navodi se i da današnje knjižnice mogu postići raznolikost od čak  $10^{11}$  do  $10^{12}$  klonova i time premašiti veličinu individualnih humanih repertoara B-limfocita, a mogu se dizajnirati i računalnim metodama (37), koje su detaljnije objašnjene u poglavlju 3.4.3. Ovakve sintetske knjižnice omogućuju stvaranje protutijela istog afiniteta kao i protutijela dobivena hibridoma tehnologijom, ali puno brže i u kontroliranijim uvjetima (48).

Metoda kombinatorijskih knjižnica bakteriofaga ima mnogo prednosti. Osim što se njome dobivaju potpuno humana monoklonska protutijela, nije potrebna imunizacija životinja jer se cijeli postupak odvija *in vitro* te se mogu dobiti i protutijela za toksične antigene koji se ne mogu koristiti za imunizaciju životinja (6), ili za one za koje postoji imunosna tolerancija (36, 49). Također, fragmenti protutijela mogu se koristiti za stvaranje cijelih imunoglobulina sa željenim efektorskim funkcijama (50). Osim kombinatorijskih knjižnica bakteriofaga, za dobivanje humanih monoklonskih protutijela uspješno su razvijene i bakterijske i ribosomske



knjižnice te knjižnice kvasca (29, 49), no unatoč razvoju drugih metoda, knjižnice bakteriofaga su i dalje najčešće korištena metoda za dobivanje humanih monoklonskih protutijela. Ova metoda je postala najuspješnija selekcijska metoda *in vitro* za humana protutijela jer je robusna, jeftina i brza te ima visoku protočnost (engl. *high throughput*) i veliki potencijal za automatizaciju (37, 49, 51).

Nedostaci ove metode su nemogućnost dobivanja cjelovitih imunoglobulina i izostanak glikozilacije u fragmentima protutijela (49), mogući nizak afinitet protutijela koji zahtijeva daljnju optimizaciju (35) te moguća imunogenost na nasumične kombinacije teških i lakih lanaca koje nisu prisutne *in vivo* (52). Iako se ovom metodom dobivaju protutijela koja sadrže u potpunosti humane sekvence, ona s obzirom na način dobivanja nisu u potpunosti prirodna ljudska protutijela.

#### **3.2.4.2 Ekspresija monoklonskih protutijela**

Odabir sustava za ekspresiju monoklonskih protutijela ili njihovih inačica ovisi o samom protutijelu ili inačici koje se žele dobiti te njihovoj funkciji, potrebnoj količini te o troškovima proizvodnje. Isto tako ovisi o raspoloživosti prikladnog ekspresijskog sustava i njegovim posttranslacijskim modifikacijama. Postoje mnogi različiti ekspresijski sustavi koji su se razvijali zajedno s razvojem monoklonskih protutijela i raznih tehnologija za njihovo dobivanje. Oni mogu biti prokariotski ili eukariotski, biljni ili životinjski, jednostanični ili višestanični (transgenični) organizmi, limfoidni ili nelimfoidni (15).

Proizvodnja prvih mišjih monoklonskih protutijela je u samim počecima bila ograničena dostupnošću prikladne mijelomske stanične linije te slabim prinosom i genetičkom nestabilnošću hibridoma stanica (6). Ujedno su stvaranje i probir hibridoma stanica imuniziranih životinja vremenski zahtjevni te je moguć probir samo dijela protutijela koji

nastane tijekom adaptivnog imunskog odgovora (49) (adaptivan imunski odgovor je detaljnije opisan u poglavlju 3.3).

Pri proizvodnji monoklonskih protutijela treba uzeti u obzir količine koje se žele proizvesti. Kada se proizvode monoklonska protutijela u terapijske svrhe, pogotovo za dugotrajnu primjenu, uglavnom su potrebne velike količine u odnosu na manje količine potrebne za eksperimentalne svrhe, što produljuje vrijeme proizvodnje i povećava troškove. Kombinacija različitih čimbenika koje treba uzeti u obzir utječe na mogućnost ekspresijskog sustava da proizvede visoke volumene monoklonskih protutijela. Da bi se uspješno provela transkripcija gena koji kodiraju za monoklonsko protutijelo, potreban je prikladan ekspresijski vektor. Stanična linija mora uspješno provesti translaciju mRNA, spojiti i modificirati protutijelo, proizvesti veće količine s minimalnom akumulacijom nepravilno složenih protutijela te mora imati dovoljan kapacitet za izlučivanje proizvedenih protutijela (53).

Monoklonska protutijela su velike proteinske molekule koje sadrže mnogo disulfidnih mostova i molekula koje se dodaju tijekom posttranslacijskih modifikacija, poput ugljikohidrata glikozilacijom. Dodavanje šećera glikozilacijom može uvelike utjecati na funkciju protutijela *in vivo*, poput aktiviranja ADCC-a i CDC-a (8), vezanja na FcRn receptor (22) ili izazivanja imunskog reakcije (54).

Kod kombinatorijskih knjižnica bakteriofaga nastaju scFv-fragmenti protutijela kojima nedostaje Fc-regija te izostaju efektorske funkcije, no za ekspresiju fragmenata protutijela male molekulske mase poput scFv-a ili Fab-a bez efektorskih funkcija i s ograničenom farmakokinetičkom aktivnošću može biti dovoljna ekspresija u bakterijskom sustavu. *E. coli* je dobro poznata bakterija koja može proizvesti velike količine fragmenata, a bakterijski sustavi su ujedno jeftiniji od drugih ekspresijskih sustava (40). Nedostatak ovih sustava je što bakterijama nedostaju mehanizmi za glikozilaciju proteina te će fragmenti biti neglikozilirani (27, 55). Kako bi se produljilo vrijeme poluživota u ljudskom tijelu, na dobiveni fragment se

može vezati polietilen glikol (55), tj. provodi se postupak takozvane pegilacije. S obzirom da je zbog nepravilnih disulfidnih mostova i time slaganja lakih i teških lanaca teško proizvesti cjelovita glikozilirana monoklonska protutijela u bakterijama (27), ukoliko se ona žele dobiti, treba pribjeći ekspresiji u odgovarajućem ekspresijskom sustavu – kulturi stanica sisavaca ili proizvodnji u transgeničnim životinjama (35). Stanice kvasca, kukaca, bakulovirusni sustavi ili biljne stanice također pokazuju različite obrasce glikozilacije te monoklonska protutijela ekspimirana u ovim sustavima sadrže ugljikohidrate različite od onih proizvedenih u stanicama sisavaca (27, 56).

Novi ekspresijski vektori, identifikacija pogodnih mjesta za integraciju gena te nove metode za uzgoj stanica su dovele do toga da je, od početaka proizvodnje monoklonskih protutijela, kultura stanica sisavaca najprikladniji sustav za proizvodnju visokih prinosa humanih protutijela (55). Danas su najčešće upotrebljavane stanice limfoidnog porijekla poput mišjih mijeloma stanica (NS0 ili SP2/0), kod kojih je olakšana transfekcija i imaju visok prinos, ili nelimfoidnog porijekla poput stanica jajnika kineskog hrčka (engl. *Chinese hamster ovary*, CHO) ili HeLa stanica (od humanog cervikalnog karcinoma). Kultura stanica sisavaca proizvodi uglavnom sigurna i učinkovita protutijela s vremenom poluživota u serumu sličnim onima kod prirodnih protutijela porijeklom iz ljudskog tijela. Većina protutijela odobrenih za primjenu su ekspimirana u NS0 ili CHO stanicama, a obje linije stanica proizvode protutijela sa zadovoljavajućim efektorskim funkcijama i vremenom poluživota (55). Ipak, postoje razlike u obrascu glikozilacije među navedenim stanicama, a način glikozilacije protutijela je ključan kod stvaranja imunodne reakcije na humana protutijela. Dok mišje stanice mogu dodati šećere na određena mjesta protutijela koji mogu izazvati imunodnu reakciju u tijelu ljudi, humane i CHO stanice ne posjeduju enzime za takvu glikozilaciju (57). CHO stanice uspješno provode posttranslacijske modifikacije kompleksnih proteina, a glikozilacija je slična kao kod prirodnih protutijela porijeklom iz ljudskog tijela (53).

Danas se humana monoklonska protutijela mogu eksprimirati i u kulturi stanica ljudskih B-limfocita. Preduvjet je da se B-limfociti transformiraju odnosno postanu besmrtni kako bi mogli opstati i lučiti monoklonska protutijela. To se može postići infekcijom stanica Epstein-Barrovim virusom (EBV) koje zadržavaju svojstva B-limfocita, uključujući ekspresiju i sekreciju imunoglobulina. Nedostatak ove metode je da su potrebni B-limfociti donora koji je bio izložen antigenu no ovaj problem se može nadići razvojem sistema za senzitivaciju na specifičan antigen *in vitro*. Moguća je stimulacija i proliferacija B-limfocita *in vitro* pomoću citokina, no ti B-limfociti imaju kratak životni vijek (34). Također, limfoblastoidne stanice transformirane EBV-om su često genetički nestabilne i mogu prestati proizvoditi protutijela (34), imaju mali prinos te je selekcija protutijela sa željenom specifičnošću ograničena (29).

U tijelu naivni B-limfociti, stimulirani antigenom, prolaze V-D-J rekombinaciju, promjenu razreda i somatsku rekombinaciju te se, oponašajući te uvjete, *in vitro* može stvoriti ekspresijski sustav stanica sisavaca koji na svojoj površini prikazuje protutijela i može poslužiti za probir monoklonskih protutijela za terapijske svrhe (49). Princip metode je sličan kao kod knjižnica bakteriofaga te fenotip reflektira genotip, ali se na površini stanica sisavaca ujedno prikazuju cjelovita humana protutijela. Nakon što se odaberu protutijela željenog afiniteta, željeni geni se mogu uvesti u klasičan ekspresijski sustav za proizvodnju većih količina monoklonskih protutijela. Stanice koje se uglavnom koriste za knjižnice su CHO, COS (stanice nalik fibroblastima iz bubrega majmuna) ili najčešće HEK-293 (humane embrionalne stanice bubrega) zbog jednostavnosti transfekcije, visokog prinosa i humanog obrasca glikozilacije. U ove stanice se mogu uvoditi geni B-limfocita pojedinaca koji nisu bili u doticaju s antigenima te stvoriti naivne knjižnice, kao i pojedinaca koji su bili u doticaju s antigenom i stvoriti imunosne knjižnice. Pokazalo se da veće knjižnice protutijela mogu po pitanju molekularne raznolikosti oponašati prirodni ljudski repertoar (često oko  $10^9$  ili manji), dok kod knjižnica bakteriofaga taj repertoar može biti veći ( $1-9 \times 10^9$ ), a taj problem se može

nadići ako se koriste B-limfociti imuniziranih pojedinaca. S obzirom da nije uvijek moguće dobiti B-limfocite imuniziranih pojedinaca, nastojalo se postići somatsku hipermutaciju u uvjetima *in vitro*. Aktivacijom inducirana citidin-deaminaza je enzim koji u tijelu dovodi do somatske hipermutacije i promjene razreda imunoglobulina čime se stvaraju imunoglobulini visokog afiniteta, a pokazalo se da u uvjetima *in vitro* CHO, COS i HEK-293 stanice prolaze somatsku hipermutaciju posredovanu citidin-deaminazom. Time se bitno olakšava proizvodnja, selekcija i maturacija protutijela *in vitro* te su ove knjižnice obećavajuće za proizvodnju cjelovitih protutijela s povoljnom specifičnošću, afinitetom i stabilnošću, a smatra se da će s daljnjim razvojem ekspresijskih vektora i staničnih linija sisavaca potencijal dalje rasti (49). Također se ponovo istražuju humani B-limfociti koji ekspimiraju imunoglobuline na svojoj površini i izlučuju ih u supernatant te se time omogućuje njihova selekcija. Ti B-limfociti, zbog moguće afinitetne maturacije *in vitro*, mogu proizvoditi protutijela povećanog afiniteta, a retroviralnom transdukcijom se onemogućuje njihova terminalna diferencijacija te se immortaliziraju (34).

#### **3.2.4.3 Transgenični miševi**

Uz kombinatorijske knjižnice bakteriofaga, druga metoda za dobivanje potpuno humanih monoklonskih protutijela je stvaranje transgenične životinje. Sličnost gena za imunoglobuline između miša i čovjeka je dovoljno velika pa se mogu proizvesti transgenični miševi koji sadrže gene za humane imunoglobuline umjesto mišjih. S druge strane postoji dovoljna različitost među vrstama zbog koje miševima nedostaje imunosna tolerancija na ljudske proteine, što omogućuje nastanak imunosnog odgovora i time nastanak humanih monoklonskih protutijela na mnogo antigena (1). Nastala protutijela su cjeloviti imunoglobulini G, imaju potpuno humanu sekvencu te visok afinitet i specifičnost vezanja.

Prednost transgeničnih miševa je i afinitetna maturacija B-limfocita *in vivo* (6, 11, 17, 58). Ujedno se takva protutijela mogu jednostavno proizvesti koristeći uobičajenu hibridoma tehnologiju (59).

1980.-ih su zahvaljujući napretku mnogih molekularno-bioloških tehnika – mikroinjektiranju oocita i manipulaciji embrijskim stanicama te korištenju raznih vektora, isprva plazmida i kozmida, a potom bakterijskih umjetnih kromosoma (engl. *bacterial artificial chromosome*, BAC) i umjetnih kromosoma kvasca (engl. *yeast artificial chromosome*, YAC), uspješno integrirani veći fragmenti DNA te su stvoreni transgenični miševi s genima za imunoglobulin G uglavnom mišjeg ili štakorskog porijekla. Nakon ovog uspjeha su 1990.-ih stvoreni miševi s genima za ljudske imunoglobuline koji se uvode u germinativnu liniju. Ovime je omogućeno da miševi proizvode plazma stanice koje luče humane imunoglobuline jer su humane sekvence kompatibilne s mišjim faktorima uključenima u rekombinaciju gena, hipermutaciju, promjenu razreda imunoglobulina i afinitetnu maturaciju (1, 60).

Da bi se proizveli ovakvi transgenični miševi, potrebne su dvije modifikacije mišjeg genoma – inaktivacija mišjeg gena za imunoglobulin G te stabilno uvođenje humanog gena za imunoglobulin G. Za to je potrebno više generacija transgeničnih miševa koji nose željene ljudske gene te tzv. *knockout* miševa kod kojih su utišani željeni mišji geni. Takvi miševi se križaju kako bi se dobilo potomstvo sa željenim svojstvima. Da bi se dobio transgenični miš koji proizvodi isključivo humane imunoglobuline, potrebno je izmijeniti šest svojstava u organizmu. U miša se moraju uvesti ljudski geni za teške lance te ljudski geni za lake kappa i lambda lance, a ujedno se moraju utišati mišji geni za teške lance te geni za lake kappa i lambda lance. Najvećoj raznolikosti protutijela pridonose lokusi na 14. i 2. kromosomu za teške i kappa lake lance tj. rekombinacija između različitih V, D i J segmenata tih kromosoma. Ovi lokusi također sadrže regulatorne elemente koji kontroliraju ekspresiju protutijela, promjenu razreda imunoglobulina i afinitetnu maturaciju (59). Stoga je za

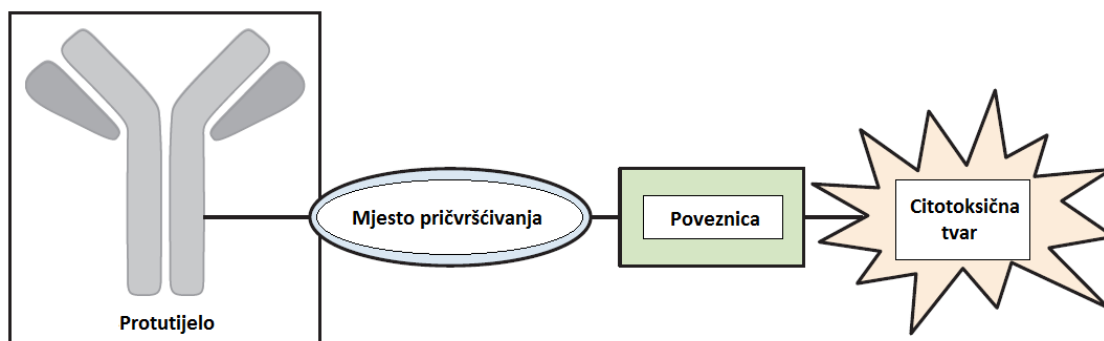
proizvodnju humanih monoklonskih protutijela u miševima dovoljno koristiti transgenične miševе s četiri svojstva (ljudski geni za teške i lake kappa lance te utišani mišji geni za teške i lake kappa lance) (35, 61) ili one s pet svojstava koji imaju sve karakteristike kao i oni s četiri uz dodatno ljudske gene za laki lambda lanac (62). U ispitivanjima se pokazalo kako svega 5% proizvedenih protutijela proizlazi iz neutišanih mišjih lambda lokusa te prisustvo plazma stanica koje proizvode kimerna protutijela s humanim teškim i mišjim lakim lancima ne sprječava izolaciju plazma stanica koje luče humana monoklonska protutijela (58).

Transgenični miševi se imuniziraju na klasičan način, a zreli B-limfociti se izoliraju iz mišjeg tkiva. Prednost ove metode je što se, da bi se dobila humana monoklonska protutijela, koristi konvencionalna i dobro uhodana hibridoma tehnologija. B-limfociti se spajaju s mijeloma stanicama te se nastale hibridoma stanice uzgajaju u mediju gdje proizvode veće količine protutijela (1, 58, 62). Danas odobrena monoklonska protutijela ili ona u kliničkim ispitivanjima iz transgeničnih miševa dobivena su uporabom nekoliko mišjih linija, poput *XenoMouse*, *UltiMab*, *TransChromo* i *VelocImmune* (1), a detaljnije su opisana u poglavlju 3.2.7.1.

Prednost ove metode je ujedno ta da se, nakon što se izabere kandidat s najpoželjnijim svojstvima, može ići u daljnji klinički razvoj, bez potrebe za daljnjim koracima optimizacije poput povećanja afiniteta, što je često slučaj kod monoklonskih protutijela dobivenih iz bakteriofaga (35). S druge strane, kombinatorijske knjižnice bakteriofaga pružaju kontroliranije uvjete za izolaciju vodeće molekule (engl. *lead*) i kontrolu nad specifičnošću i afinitetom monoklonskog protutijela (8).

### 3.2.5 Konjugati protutijela i lijeka

Konjugati protutijela i lijeka (ADC) (Slika 7) imaju zanimljiv mehanizam za liječenje tumora jer se citotoksična tvar nalazi stabilno vezana na monoklonsko protutijelo u cirkulaciji, ali se otpušta pri selektivnom vezanju monoklonskog protutijela na receptore na površini ciljanih stanica (7, 8, 25).



**Slika 7. Konjugati protutijela i lijeka** (preuzeto i prilagođeno iz 25)

Uspješnost konjugata protutijela i lijeka ovisi o sve tri sastavnice takve kombinacije i njihovoj optimizaciji – samom protutijelu, lijeku vezanom za protutijelo i poveznici. Monoklonsko protutijelo se, kao i kod svih ostalih terapija, mora vezati s velikim afinitetom i specifičnošću na ciljani antigen, koji je visoko zastupljen na površini tumorskih stanica, a manje na zdravim stanicama. Ujedno se mora voditi računa o svim drugim svojstvima, primjerice imunogenom potencijalu samog monoklonskog protutijela, vezanju na FcRn-receptor, itd. Primjerice, kod trastuzumab emantzina, koji pripada podrazredu imunoglobulina G1, također se pokazala dodatna antitumorska aktivnost zbog poticanja stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima, ali još uvijek nije razjašnjen doprinos ADCC-a uspješnosti terapije (25).

Poveznica mora biti bifunkcionalna, s mjestom pričvršćivanja na monoklonsko protutijelo i na lijek, a mjesta pričvršćivanja na protutijelu i broj veza s poveznicom i lijekom utječu na omjer

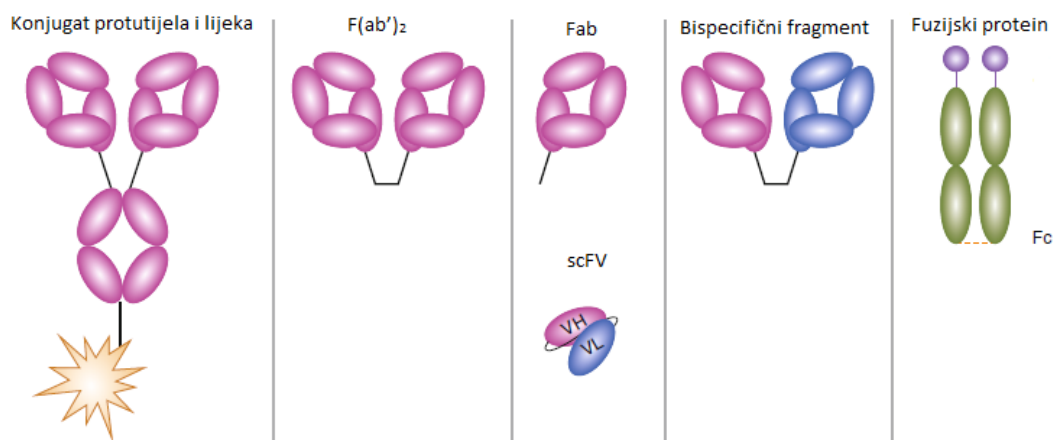


lijeka i protutijela, što dalje utječe na uspješnost terapije. Mala količina lijeka umanjuje djelotvornost dok velika količina lijeka negativno utječe na farmakokinetiku. S obzirom da ipak mali postotak ADC-a uspješno dopre do tumorskog tkiva, što za posljedicu ima mali postotak citotoksične tvari koji uđe u stanicu, ključno je da citotoksična tvar ima visoku toksičnost i djelotvornost u uništavanju tih stanica, uglavnom ili onemogućavanjem mitoze ili razgradnjom DNA. Poveznica ujedno mora imati visoku stabilnost u cirkulaciji kako ne bi došlo do otpuštanja lijeka na mjestima koja nisu ciljana i time do nuspojava, a istovremeno otpuštati lijek nakon što se monoklonsko protutijelo veže za ciljani antigen. Stopa internalizacije nakon vezanja protutijela na antigen uvelike utječe na uspješnost liječenja, a na internalizaciju utječu mnogi čimbenici poput svojstava ciljanog epitopa i afiniteta protutijela za epitop. Istražuju se i ADC-ovi kod kojih nije potrebna internalizacija, poput fotosenzibilizatora vezanih na monoklonska protutijela koja se primjenjuju prije zračenja i pospješuju uništavanje tumorskog tkiva (25).

Mjesto i način pričvršćivanja poveznice i lijeka na monoklonsko protutijelo također značajno utječe na stabilnost, djelotvornost i sigurnost ADC-a (8). Nasumična konjugacija kemijskim putem stvara heterogenu skupinu ADC-ova s različitim omjerima lijeka i protutijela. Iako se takav pristup pokazao uspješnim kod lijekova Adcetris<sup>®</sup> i Kadcyła<sup>®</sup>, koji su detaljnije obrađeni u poglavlju 3.2.7.1, u razvoju iduće generacije ADC-ova napori su usmjereni na stvaranje homogenih protutijela usmjerenom konjugacijom tako da se mjesta konjugacije dobivaju mutacijom ili insercijom aminokiselina na određenim mjestima protutijela. Takva protutijela imaju određeni omjer lijeka i protutijela te svi ADC-ovi imaju sličnu aktivnost *in vivo* i povoljna farmakokinetička svojstva što im daje dobar terapijski potencijal. O terapijskom potencijalu ove skupine monoklonskih protutijela svjedoči činjenica da ih se trenutno oko 30 nalazi u kliničkom razvoju te su obećavajuća skupina u području liječenja tumora, ali i drugih bolesti (25).

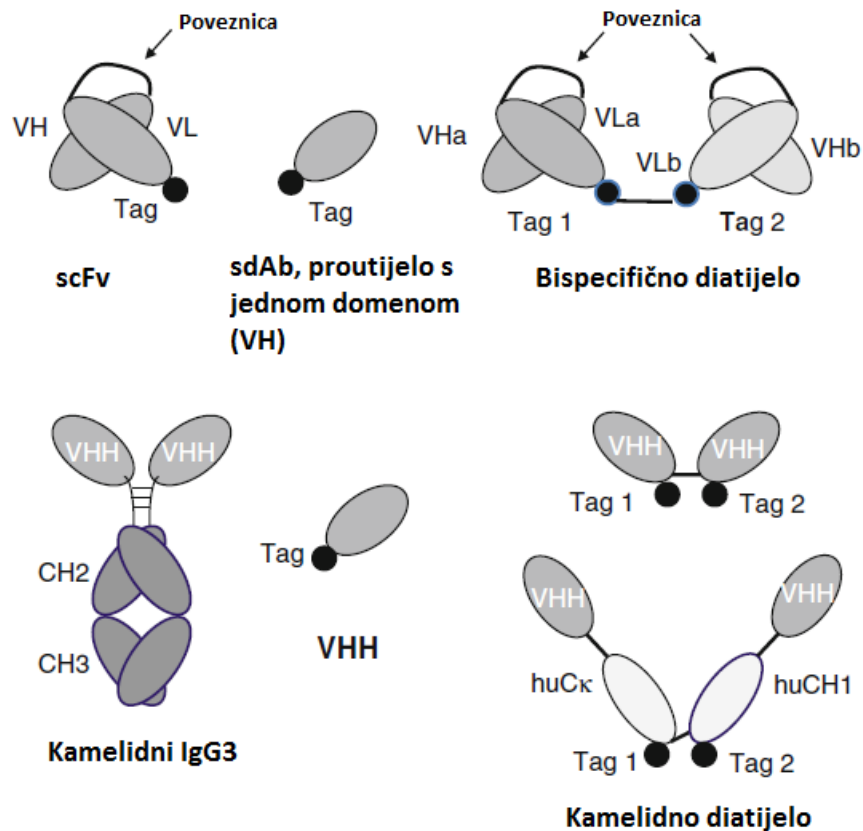
### 3.2.6 Inačice monoklonskih protutijela

Do sada su nam poznate inačice monoklonskih protutijela poput Fab-fragmenata, fuzijskih proteina koji se sastoje od konstantne regije Fc i receptora ili scFv-fragmenata koji su također fuzijski proteini varijabilne regije teškog i lakog lanca povezani kratkim peptidima (Slika 8). Fragmenti protutijela u određenim slučajevima mogu imati prednosti nad cjelovitim monoklonskim protutijelima. Primjerice, zbog svoje veličine mogu brže i ravnomjernije prodirati u tumorsko tkivo, stoga se i na fragmente protutijela mogu vezati različite tvari poput lijekova, citotoksičnih proteina ili radionuklida (63, 64).



**Slika 8. Konjugati i inačice monoklonskih protutijela** (preuzeto i prilagođeno iz 7)

U raznim fazama razvoja i ispitivanja su i mnoge druge inačice monoklonskih protutijela. Jedno od njih je diatijelo (engl. *diabody*), bivalentni dimer scFv-fragmenta (Slika 9), koji se dalje može povezati s još jednim bivalentnim dimerom scFv-fragmenta tvoreći bispecifično tandemsko diatijelo (7).



**Slika 9. Inačice monoklonskih protutijela nove generacije (preuzeto i prilagođeno iz 29)**

U fazama istraživanja su i bispecifični scFv-fragменти koji aktiviraju T-limfocite (engl. *Bispecific T-cell engagers*, BiTEs), fuzijski proteini koji se sastoje od dva scFv fragmenta različitih protutijela, a vežu se na receptore tumorskih stanica i na CD3 receptore na površini T-limfocita potičući staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima (15).

Bispecifična monoklonska protutijela su proteini koji su izgrađeni od fragmenata dvaju različitih monoklonskih protutijela te se vežu na dva različita antigena. S obzirom na mehanizam djelovanja, najviše se koriste u liječenju tumora vežući se istovremeno na tumorsku i citotoksičnu stanicu (15, 20). S obzirom da Fc-fragment može imati efektorsku funkciju, takva protutijela mogu biti i trifunkcionalna. Prvo registrirano bispecifično monoklonsko protutijelo je katumaxomab koji je dobio odobrenje 2009. godine, a zbog

mehanizma djelovanja se može smatrati i trifunkcionalnim. To je štakorsko-mišje hibridno IgG2 protutijelo proizvedeno u hibridoma-hibridnoj štakorsko-mišjoj staničnoj liniji, a indiciran je za liječenje malignog ascitesa intraperitonealnom primjenom kod odraslih s EpCAM (engl. *epithelial cell adhesion molecule*) pozitivnim karcinomima. Djeluje tako da se veže za receptor CD3 na površini T-limfocita te na adhezijske molekule epitelnih stanica (EpCAM), dok treće funkcionalno mjesto vezivanja u Fc regiji katumaksomaba omogućava interakciju s drugim imunskim stanicama putem Fc $\gamma$  receptora. Time se stanice dovode u neposrednu blizinu čime se potiče zajednička imunosa reakcija protiv tumorskih stanica koja uključuje različite mehanizme djelovanja kao što su aktivacija T-limfocita, stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima, citotoksičnost ovisna o komplementu i fagocitoza, što rezultira uništavanjem tumorskih stanica (65). Ovakav mehanizam djelovanja, zbog vezanja na više meta i sinergističkog učinka, ima puno potencijala za daljnji razvoj terapijskih monoklonskih protutijela te su mnoga bispecifična protutijela sličnog mehanizma djelovanja u razvoju. Od posebnog interesa su bispecifična monoklonska protutijela koja bi se mogla koristiti za liječenje neuroloških oboljenja poput Alzheimerove bolesti, multiple skleroze i tumora mozga. Istražuju se bispecifična protutijela koja se vežu na receptore endotelnih stanica krvno-moždane barijere ili na inzulinske receptore čime bi se omogućio prijenos monoklonskih protutijela u mozak, a određena ispitivanja na životinjama su se pokazala uspješnima (8).

Korak dalje su IgG-scFv fuzijska protutijela, tetravalentna bispecifična monoklonska protutijela kod kojih je scFv-fragment spojen na konstantni dio bispecifičnog monoklonskog protutijela te se i scFv i protutijelo vežu za različite antigene (15).

U inačice monoklonskih protutijela nove generacije spadaju i protutijela s jednom domenom, tzv. sdAb (engl. *single-domain antibody*) ili nanotijela (engl. *nanobodies*). Ideja za razvoj nanotijela započinje nakon uspješne izolacije VH-fragmenata eksprimiranih u bakterijskim

stanicama (Slika 9) za koje se pokazalo da se s visokim afinitetom vežu na ciljani antigen (29). Drugo važno otkriće je otkriće protutijela kamelida (životinje iz porodice Camelidae – deve, ljame, alpake i sl.), takozvanih protutijela teških lanaca (engl. *heavy-chain antibodies*), koja se sastoje samo od varijabilne regije teškog lanca (VHH) i dvije konstantne regije teškog lanca (CH2 i CH3) (Slika 9). S obzirom da se kod ovih protutijela pokazalo da je za vezanje na antigen odgovorna samo varijabilna regija teškog lanca, nanotijela su klonirane i u kulturi stanica eksprimirane inačice samo varijabilne regije teških lanaca (15, 66). Da bi se dobilo nanotijelo, kamelidi se imuniziraju te se izoliraju B-limfociti koji su prošli afinitetnu maturaciju. Izolirana DNA se umnaža PCR-om te se DNA za VHH klonira u bakteriofagni vektor i, kao kod ostalih knjižnica bakteriofaga, varijabilne regije teškog lanca se eksprimiraju na površini bakteriofaga. No, za razliku od imunogenih knjižnica bakteriofaga gdje se parovi varijabilnih lakih i teških lanaca razdvajaju, zasebno umnažaju te kasnije spajaju kako bi se obuhvatio cijeli repertoar varijabilnih regija imunizirane jedinke, kod VHH-a to nije potrebno te je jednostavnije dobiti cijeli repertoar varijabilnih regija (66). Ipak, s obzirom na problem imunogenosti i nastojanja da se taj rizik smanji, nanotijela se humaniziraju, a trenutno se nekoliko takvih nanotijela nalazi u kliničkim ispitivanjima (15).

Prednosti nanotijela su, osim navedenih, dobra ekspresija u stanicama bakterija, povoljna farmakokinetička svojstva poput dobre topivosti, visoke stabilnosti i aktivnosti pri visokim temperaturama te visok afinitet i specifičnost, što ih čini vrlo zanimljivima za daljnja istraživanja (29, 66, 67). Stoga su u postupcima istraživanja stvaranje veće, bivalentne inačice nanotijela (Slika 9), a istražuju se i konjugati nanotijela i lijeka za liječenje tumora (66). Zbog vrlo male veličine se očekuje da će bolje prodirati u tkiva i da će se vezati na epitope koji su nedostupni cjelovitim monoklonskim protutijelima (29), a u ispitivanjima *in vitro* i *in vivo* se pokazalo da ova protutijela mogu prijeći krvno-moždanu barijeru (8). Također se pokazalo da

protutijela teških lanaca mogu prepoznati neučestale ili skrivene epitope, a zbog visoke stabilnosti se razmatra i oralna primjena (67).

Osim protutijela iz kamelida, otkriveni su goveđi imunoglobulini G koji imaju vrlo dugačku CDR3 regiju varijabilnog teškog lanca, a njihova specifična struktura im omogućuje vezanje na antigen na specifičan način, drugačiji od humanih ili mišjih, te ih čini zanimljivima za daljnja istraživanja (67).

Treba spomenuti da je od posebnog interesa i u različitim fazama ispitivanja još jedna inačica monoklonskih protutijela, takozvano minitijelo (engl. *minibody*), koje se sastoji od fragmenta scFv povezanog s konstantnom regijom CH3 protutijela. Jedno takvo minitijelo, inačica cetuksimaba, je ispitano *in vitro* i *in vivo* na ksenograftnim miševima (miševi kojima su presađene ljudske stanice, tkiva ili organi) dajući dobre rezultate. Kimerno monoklonsko protutijelo cetuksimab se veže na receptor epidermalnog čimbenika rasta i koristi za liječenje solidnih tumora, a opisano je detaljnije u poglavlju 3.2.7.1. No s obzirom na njegovu veličinu, stopa penetracije u tumorsko tkivo je niska, a ekspresija u kulturi stanica sisavaca, koja je potrebna da bi se dobilo cjelovito monoklonsko protutijelo, povećava troškove proizvodnje. Stoga je, da bi se nadišli navedeni problemi, razvijeno scFv-CH3 minitijelo. Varijabilna regija lakog i teškog lanca međusobno su povezane kratkim peptidom od 18 aminokiselina te je scFv dalje povezan s CH3 na mjestu spojnice. scFv-CH3 minitijelo se eksprimira u bakterijskim stanicama čime su troškovi proizvodnje manji, a veličina i mala molekulska masa omogućuju brzo i jednostavno prodiranje u tkiva (68).

U ovom ispitivanju, osim što se pokazalo da je minitijelo pokazalo sličnu antitumorsku aktivnost kao i cjeloviti cetuksimab uz puno manje troškove proizvodnje, ujedno se pokazalo da su duljina i redosljed aminokiselina u peptidnoj poveznici bitni za stabilnost i topivost minitijela te da orijentacija varijabilnih regija lakog i teškog lanca utječu na topivost, čime se utječe na prirodu same inačice. U teoriji, optimizirana minitijela bi se trebala specifičnije

vezati za stanice tumora i imati veću stopu penetracije u stanice u odnosu na cjelovita monoklonska protutijela te su obećavajući antitumorski lijekovi u razvoju (68).

### **3.2.7 Liječenje monoklonskim protutijelima**

#### ***3.2.7.1 Monoklonska protutijela odobrena za primjenu***

Danas je više od 45 monoklonskih protutijela odobreno za primjenu ili su u postupku registracije, a navedena su u Tablici 1. U Tablici 1 su također navedene inačice monoklonskih protutijela odobrene za primjenu. Prvo terapijsko mišje monoklonsko protutijelo za primjenu kod ljudi je bio muromonab-CD3 (Orthoclone OKT<sup>®</sup>3) koji je dobio odobrenje 1986., ali je registracija ukinuta i u EU i u SAD-u. Indikacija muromonaba je bila prevencija odbacivanja bubrežnog presatka. Muronomab reagira s CD3 receptorima cirkulirajućih T-limfocita i dovodi do njihove prolazne aktivacije. Dolazi do lučenja citokina i sprječava se daljnja proliferacija i diferencijacija T-limfocita čime je onemogućena reakcija s presatkom. Iako učinkovito monoklonsko protutijelo u navedenoj indikaciji, postoje određeni nedostaci kod njegove primjene, a kao glavni se navodi brzi klirens (69).

Jedino cjelovito mišje monoklonsko protutijelo trenutno registrirano u EU i SAD-u je ibritumomab tiuksetan (Zevalin<sup>®</sup>) indiciran za liječenje limfoma. Ibritumomab tiuksetan je radioimunoterapeutik, odnosno konjugat protutijela i radionuklida, i to rekombinantno mišje IgG1 kapa-monoklonsko protutijelo radioaktivno označeno izotopom itrij-90. Ibritumomab tiuksetan se specifično veže na antigen CD20 koji se nalazi na površini zloćudnih, ali i normalnih B-limfocita. Izotop itrij-90 čisti je  $\beta$ -emiter i ima sposobnost uništavanja ciljanih i susjednih stanica (70). Tositumomab-I131, još jedan radioimunoterapeutik, i to mišje monoklonsko protutijelo za koje je vezan radioaktivni jod I-131, bio je odobren u indikaciji

ne-Hodgkinovog limfoma, ali je registracija također ukinuta. Novoodobrena je inačica mišjeg monoklonskog protutijela blinatumomab (Blincyto<sup>®</sup>), čija je struktura bispecifični tandemski scFv-fragment, u indikaciji akutne limfoblastične leukemije.

**Tablica 1. Monoklonska protutijela odobrena za primjenu ili u postupku registracije u EU i SAD-u (prilagođeno prema 2, 3, 4)**

| INN (naziv lijeka)                    | Tip               | Terapijsko područje      | Meta                      | Indikacija*                             | Godina odobrenja (EU, SAD)       |
|---------------------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|---|----------------------------------|
| obiltoksaksimab (Anthim)              | kimerni IgG1      | infekcije                | <i>Bacillus anthracis</i> | antraks                                 | u postupku                       |
| elotuzumab (Empliciti <sup>®</sup> )  | humanizirani IgG1 | onkologija               | SLAMF7                    | multipli mijelom                        | EU – 2016<br>SAD – 2015          |
| daratumumab (Darzalex <sup>®</sup> )  | humani IgG1       | onkologija               | CD38                      | multipli mijelom                        | EU – u<br>postupku<br>SAD – 2015 |
| necitumumab (Portrazza <sup>®</sup> ) | humani IgG1       | onkologija               | EGFR                      | karcinom nemalih stanica pluća          | EU – 2016<br>SAD – 2015          |
| idarucizumab (Praxbind <sup>®</sup> ) | humanizirani Fab  | poremećaji krvi          | dabigatran                | dabigatranom izazvana anitkoagulacija   | EU – 2015<br>SAD – 2015          |
| alirocumab (Praluent <sup>®</sup> )   | humani IgG1       | kardiovaskularne bolesti | PCSK9                     | povišeni kolesterol                     | EU – 2015<br>SAD – 2015          |
| mepolizumab (Nucala <sup>®</sup> )    | humanizirani IgG1 | upalne bolesti           | IL-5                      | eozinofilna astma                       | EU – 2015<br>SAD – 2015          |
| dinutuksimab (Unituxin <sup>®</sup> ) | kimerni IgG1      | onkologija               | GD2                       | neuroblastom                            | EU – 2015<br>SAD – 2015          |
| evolocumab (Repatha <sup>®</sup> )    | humani IgG2       | kardiovaskularne bolesti | PCSK9                     | povišeni kolesterol                     | EU – 2015<br>SAD – 2015          |
| sekukinumab (Cosentyx <sup>®</sup> )  | humani IgG1       | upalne bolesti           | IL-17a                    | psorijaza                               | EU – 2015<br>SAD – 2015          |
| nivolumab (Opdivo <sup>®</sup> )      | humani IgG4       | onkologija               | PD1                       | melanom, karcinom nemalih stanica pluća | EU – 2015<br>SAD – 2014          |



|   |   |                                   |                                  |  |                         |
|---|---|-----------------------------------|----------------------------------|--|-------------------------|
| pembrolizumab<br>(Keytruda®)              | humanizirani<br>IgG4                    | onkologija                        | PD1                              | melanom  | EU – 2015<br>SAD – 2014 |
| blinatumomab<br>(Blinicyto®)              | mišji<br>bispecifični<br>tandemski scFv | onkologija                        | CD19,<br>CD3                     | akutna limfoblastična<br>leukemija                         | EU – 2015<br>SAD – 2014 |
| ramucirumab<br>(Cyramza®)                 | humani IgG1                             | onkologija                        | VEGFR2                           | karcinom želuca  | EU – 2014<br>SAD – 2014 |
| vedolizumab<br>(Entyvio®)                 | humanizirani<br>IgG1                    | upalne<br>bolesti                 | $\alpha$ 4 $\beta$ 7<br>integrin | ulcerozni kolitis,<br>Crohnova bolest                      | EU – 2014<br>SAD – 2014 |
| siltuksimab<br>(Sylvant®)                 | kimerni IgG1                            | upalne<br>bolesti                 | IL-6                             | Castlemanova bolest  | EU – 2014<br>SAD – 2014 |
| obinutuzumab<br>(Gazyva®)                 | humanizirani<br>IgG1                    | onkologija                        | CD20                             | kronična limfocitna<br>leukemija                           | EU – 2014<br>SAD – 2013 |
| ado-trastuzumab<br>emtanzin<br>(Kadcyla®) | humanizirani<br>IgG1-<br>imunokonjugat  | onkologija                        | HER2                             | karcinom dojke   | EU – 2013<br>SAD – 2013 |
| raksibacumab<br>(Raksibacumab®)           | humani IgG1                             | infekcije                         | <i>Bacillus<br/>anthracis</i>    | antraks  | EU – /<br>SAD – 2012    |
| pertuzumab<br>(Perjeta®)                  | humanizirani<br>IgG1                    | onkologija                        | HER2                             | karcinom dojke   | EU – 2013<br>SAD – 2012 |
| brentuksimab<br>vedotin<br>(Adcetris®)    | kimerni IgG1-<br>imunokonjugat          | onkologija                        | CD30                             | Hodgkinov limfom,<br>anaplastični<br>velikostanični limfom | EU – 2012<br>SAD – 2011 |
| belimumab<br>(Benlista®)                  | humani IgG1                             | upalne<br>bolesti                 | BLyS                             | sistemska lupus<br>eritematosus                            | EU – 2011<br>SAD – 2011 |
| ipilimumab<br>(Yervoy®)                   | humani IgG1                             | onkologija                        | CTLA-4                           | metastatski melanom  | EU – 2011<br>SAD – 2011 |
| denosumab<br>(Prolia®, Xgeva®)            | humani IgG2                             | bolesti<br>kostiju,<br>onkologija | RANK-L                           | osteoporoza, gubitak<br>kostiju                            | EU – 2010<br>SAD – 2010 |
| tocilizumab<br>(RoActemra®,<br>Actemra®)  | humanizirani<br>IgG1                    | upalne<br>bolesti                 | IL6R                             | reumatoidni artritis                                       | EU – 2009<br>SAD – 2010 |
| ofatumumab<br>(Arzerra®)                  | humani IgG1                             | onkologija                        | CD20                             | kronična limfocitna<br>leukemija                           | EU – 2010<br>SAD – 2009 |
| kanakinumab                               | humani IgG1                             | upalne                            | IL1b                             | Muckle-Wellsov   | EU – 2009               |

|   |   |                         |                        |  |                              |
|---|---|-------------------------|------------------------|--|------------------------------|
| (Ilaris <sup>®</sup> )                              |   | bolesti                 |                        | sindrom  | SAD – 2010                   |
| golimumab<br>(Simponi <sup>®</sup> )                | humani IgG1                                     | upalne<br>bolesti       | TNF $\alpha$           | reumatoidni i<br>psorijatični artritis,<br>ankilozantni<br>spondilitis | EU – 2009<br>SAD – 2009      |
| ustekinumab<br>(Stelara <sup>®</sup> )              | humani IgG1                                     | upalne<br>bolesti       | IL12/23                | psorijaza  | EU – 2009<br>SAD – 2009      |
| certolizumab<br>pegol<br>(Cimzia <sup>®</sup> )     | humanizirani<br>Fab, pegiliran                  | upalne<br>bolesti       | TNF $\alpha$           | Crohnova bolest  | EU – 2009<br>SAD – 2008      |
| katumaksomab<br>(Removab <sup>®</sup> )             | bispecifičan<br>štakorsko-mišji<br>kimerni IgG2 | onkologija              | EPCAM/<br>CD3          | maligni ascites  | EU – 2009<br>SAD – /         |
| ekulizumab<br>(Soliris <sup>®</sup> )               | humanizirani<br>IgG2/4                          | hemoliza                | C5                     | Paroksizmalna noćna<br>hemoglobinurija                                 | EU – 2007<br>SAD – 2007      |
| ranibizumab<br>(Lucentis <sup>®</sup> )             | humanizirani<br>IgG1 Fab                        | neovasku-<br>larizacija | VEGF                   | makularna<br>degeneracija  | EU – 2007<br>SAD – 2006      |
| panitumumab<br>(Vectibix <sup>®</sup> )             | humani IgG2                                     | onkologija              | EGFR                   | kolorektalni karcinom  | EU – 2007<br>SAD – 2006      |
| natalizumab<br>(Tysabri <sup>®</sup> )              | humanizirani<br>IgG4                            | upalne<br>bolesti       | $\alpha$ 4<br>integrin | multipla skleroza  | EU – /<br>SAD – 2004         |
| bevacizumab<br>(Avastin <sup>®</sup> )              | humanizirani<br>IgG1                            | onkologija              | VEGF                   | kolorektalni karcinom  | EU – 2005<br>SAD – 2004      |
| cetuksimab<br>(Erbix <sup>®</sup> )                 | kimerni IgG1                                    | onkologija              | EGFR                   | kolorektalni karcinom  | EU – 2004<br>SAD – 2004      |
| efalizumab<br>(Raptiva <sup>®</sup> )               | humanizirani<br>IgG1                            | upalne<br>bolesti       | CD11                   | psorijaza  | EU – 2004#<br>SAD –<br>2003# |
| omalizumab<br>(Xolair <sup>®</sup> )                | humanizirani<br>IgG1                            | upalne<br>bolesti       | IgE                    | astma  | EU – 2005<br>SAD – 2003      |
| tositumomab-<br>I131<br>(Bexxar <sup>®</sup> )      | mišji IgG2a                                     | onkologija              | CD20                   | nehodgkinov limfom   | EU – /<br>SAD –<br>2003#     |
| ibritumomab<br>tiuksetan<br>(Zevalin <sup>®</sup> ) | mišji IgG1                                      | onkologija              | CD20                   | nehodgkinov limfom   | EU – 2004<br>SAD – 2002      |

|  |  |                                  |              |  |                                  |
|--|--|----------------------------------|--------------|--|----------------------------------|
| adalimumab<br>(Humira®)                                    | humani IgG1                            | upalne<br>bolesti                | TNF $\alpha$ | reumatoidni i<br>psorijatični artritis,<br>ankilozantni<br>spondilitis | EU – 2003<br>SAD – 2002          |
| alemtuzumab<br>(Lemtrada®,<br>MabCampath®,<br>Campath-1H®) | humanizirani<br>IgG1                   | onkologija                       | CD52         | kronična mijeloidna<br>leukemija                                       | EU – 2001#<br>SAD –<br>2001#     |
|  |  | upalne<br>bolesti                |              | multipla skleroza  | EU – 2013<br>SAD – u<br>postupku |
| gemtuzumab<br>ozogamicin<br>(Mylotarg®)                    | humanizirani<br>IgG4-<br>imunokonjugat | onkologija                       | CD33         | akutna mijelodina<br>leukemija   | EU – /<br>SAD –<br>2000#         |
| trastuzumab<br>(Herceptin®)                                | humanizirani<br>IgG1                   | onkologija                       | HER2         | karcinom dojke   | EU – 2000<br>SAD – 1998          |
| infliksimab<br>(Remicade®)                                 | kimerni IgG1                           | upalne<br>bolesti                | TNF $\alpha$ | Crohnova bolest  | EU – 1999<br>SAD – 1998          |
| palivizumab<br>(Synagis®)                                  | humanizirani<br>IgG1                   | virusna<br>bolest                | RSV          | respiratorni sincicijski<br>virus                                      | EU – 1999<br>SAD – 1998          |
| basiliksimumab<br>(Simulect®)                              | kimerni IgG1                           | transplan-<br>tacija             | IL2R         | prevencija odbacivanja<br>bubrežnog presatka                           | EU – 1998<br>SAD – 1998          |
| dakilzumab<br>(Zenapax®)                                   | humanizirani<br>IgG1                   | transplan-<br>tacija             | IL2R         | prevencija odbacivanja<br>bubrežnog presatka                           | EU – 1999#<br>SAD –<br>1997#     |
| rituksimumab<br>(MabThera®,<br>Rituxan®)                   | kimerni IgG1                           | onkologija                       | CD20         | nehodgkinov limfom   | EU – 1998<br>SAD – 1997          |
| abciksimab<br>(Reopro®)                                    | kimerni IgG1<br>Fab                    | kardiovas-<br>kularne<br>bolesti | GPIIb/IIIa   | prevencija stvaranja<br>krvnih ugrušaka kod<br>angioplastike           | EU – 1995†<br>SAD – 1994         |
| muromonab-CD3<br>(Orthoclone<br>OKT®3)                     | mišji IgG2a                            | transplan-<br>tacija             | CD3          | odbacivanje bubrežnog<br>presatka                                      | EU – 1986†<br>SAD –<br>1986#     |

\* Ovo nije opsežan popis indikacija; za više informacija pogledati informacije o lijeku

# Registracija ukinuta

† Nacionalno odobrenje u određenim zemljama prema prethodno važećem postupku, registracija ukinuta

Kimerizacija je razvijena 1984. godine (20), a rituksimab je bilo prvo registrirano cjelovito kimerno monoklonsko protutijelo 1997. godine, iako je još 1994. godine prvi put odobren za primjenu kimerni Fab-fragment abciksimab (Reopro<sup>®</sup>) za prevenciju stvaranja krvnih ugrušaka kod angioplastike. Rituksimab (MabThera<sup>®</sup>, Rituxan<sup>®</sup>) je odobren za liječenje ne-Hodgkinovog limfoma; veže se isključivo na transmembranski antigen CD20, neglikozilirani fosfoprotein smješten na pre-B stanicama i zrelim B-limfocitima koji je izražen u >95% svih B-staničnih ne-Hodgkinovih limfoma (71).

Od tada ih je odobreno još sedam, većinom u indikacijama za liječenje tumora (dinutuksimab, brentuksimab vedotin, katumaksomab i cetuksimab), jedno za prevenciju odbacivanja bubrežnog presatka (basiliksimumab), a dva za upalne bolesti (siltuksimumab i infliksimumab).

Daklizumab je 1997. godine bilo prvo registrirano humanizirano monoklonsko protutijelo koje se koristilo u prevenciji odbacivanja bubrežnog presatka, ali je registracija ukinuta. Nedugo nakon toga, 1998. godine, je odobren palivizumab, humanizirani IgG1, indiciran za prevenciju ozbiljne bolesti donjeg dišnog sustava koja je prouzrokovana respiratornim sincicijskim virusom (RSV) kod djece s visokim rizikom pojave RSV bolesti (72), i trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>). Trastuzumab je indiciran za liječenje ranog raka dojke, metastatskog raka dojke i metastatskog raka želuca. Veže se na receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2), čija je povećana ekspresija uočena kod primarnih karcinoma dojke i kod raka želuca te inhibira proliferaciju ljudskih tumorskih stanica i snažan je posrednik stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (73). Nakon 15 godina od registracije trastuzumaba, odobren je za primjenu i ado-trastuzumab emtanzin (Kadcyla<sup>®</sup>), trastuzumab kovalentno povezan s inhibitorom mikrotubula preko stabilne tioeterske poveznice, u indikaciji za liječenje bolesnika s HER2 pozitivnim lokalno uznapredovalim ili metastatskim rakom dojke koji su prethodno primali trastuzumab i taksan (74).

Od ukupno više od 20 do danas registriranih humaniziranih monoklonskih protutijela, registracija je ukinuta za daklizumab (na zahtjev nositelja odobrenja), gemtuzumab ozogamicin (nije se pokazao uspješnijim od same kemoterapije), alemtuzumab (MabCampath<sup>®</sup>) je bio odobren za liječenje kronične mijeloidne leukemije i registracija je ukinuta na zahtjev nositelja odobrenja, a nova registracija u indikaciji multiple skleroze je u EU odobrena 2013. godine pod nazivom lijeka Lemtrada<sup>®</sup>) i efalizumab (na zahtjev nositelja odobrenja). 7 humaniziranih monoklonskih protutijela je odobreno u indikacijama za liječenje tumora (trastuzumab, bevacizumab, pertuzumab, ado-trastuzumab emtanzin, obinutuzumab, pembrolizumab i elotuzumab), 6 u indikacijama za liječenje upalnih bolesti (alemtuzumab u indikaciji multiple skleroze, omalizumab, natalizumab koji je u EU odobren za liječenje multiple skleroze, ali ne i Crohnove bolesti kao u SAD-u, certolizumab pegol, tocilizumab i vedolizumab), ekulizumab je indiciran za liječenje paroksizmalne noćne hemoglobinurije, ranibizumab za makularnu degeneraciju, palivizumab za prevenciju RSV-a, a mepolizumab za liječenje astme.

Adalimumab (Humira<sup>®</sup>) je bilo prvo humano monoklonsko protutijelo, registrirano 2002. godine, a dobiven je iz kombinatorijskih knjižnica bakteriofaga. Adalimumab se specifično veže na faktor tumorske nekroze i neutralizira biološku funkciju TNF-a blokirajući njegovu interakciju s površinskim staničnim TNF-receptorima. Također modulira biološke odgovore koje inducira ili regulira TNF, uključujući promjene u razinama adhezijskih molekula koje su odgovorne za migraciju leukocita. Isprva je odobren za liječenje reumatoidnog artritisa, ali danas se koristi u više od deset indikacija za liječenje upalnih bolesti (75).

Metodom kombinatorijskih knjižnica bakteriofaga dobiveno je još nekoliko humanih monoklonskih protutijela – belimumab (Benlysta<sup>®</sup>) odobren za liječenje sistemskog lupusa eritematosusa, ramucirumab (Cyramza<sup>®</sup>) odobren za liječenje karcinoma želuca i raksibacumab koji je registriran u SAD-u za liječenje antraksa (36).

Panitumumab (Vectibix<sup>®</sup>) je bio prvo humano monoklonsko protutijelo za terapijske svrhe dobiveno iz transgeničnih miševa i to uporabom transgeničnih miševa soja *XenoMouse*, a iz istog soja je dobiven i denosumab (Prolia<sup>®</sup>, Xgeva<sup>®</sup>) koji se danas koriste u terapijske svrhe. Panitumumab je registriran 2006. godine za liječenje metastatskog kolorektalnog karcinoma, a veže se na receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR). Ostala monoklonska protutijela dobivena iz transgeničnih miševa su kanakinumab (Ilaris<sup>®</sup>), ustekinumab (Stelara<sup>®</sup>), ofatumumab (Arzerra<sup>®</sup>), golimumab (Simponi<sup>®</sup>), ipilimumab (Yervoy<sup>®</sup>), sekukinumab (Cosentyx<sup>®</sup>) i nivolumab (Opdivo<sup>®</sup>). Nedavno su u Europi ili SAD-u registrirana četiri humana monoklonska protutijela, a sva četiri su dobivena iz transgeničnih životinja – evolocumab i alirocumab za liječenje povišenih razina kolesterola u krvi, necitumumab za liječenje karcinoma nemalih stanica pluća i daratumumab za liječenje multiplog mijeloma (1).

Do sada registrirane inačice monoklonskih protutijela su četiri Fab-fragmenta i to abciksimab, kimerni Fab koji se koristi za sprječavanje zgrušavanja krvi, ranibizumab, humanizirani Fab indiciran za liječenje makularne degeneracije, certolizumab pegol, humanizirani i pegilirani Fab koji se veže na TNF i idarucizumab, koji je Fab-fragment, za liječenje antikoagulacije izazvane dabigatranom (7, 29), te jedan scFv-fragment, blinatumomab, opisan ranije u poglavlju.

Također, do sada su registrirana tri konjugata protutijela i lijeka za primjenu kod ljudi, a jedan od njih, gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg<sup>®</sup>), je povučen s obzirom se nije pokazao uspješnijim od same kemoterapije (25). Dva na tržištu trenutno dostupna ADC-a su brentuksimab vedotin (Adcetris<sup>®</sup>), monoklonsko protutijelo protiv CD30 kovalentno vezano za antimikrotubularnu tvar monometil auristatin E, indiciran za liječenje Hodgkinovog limfoma i anaplastičnog velikostaničnog limfoma (76) i trastuzumab emantzin (Kadcyla<sup>®</sup>), opisan ranije u poglavlju.

### 3.2.7.2 Monoklonska protutijela u razvoju

Iako biološki terapeutici još uvijek imaju mali udio među odobrenim lijekovima, zadnjih godina pokazuju najbrži rast od 9,2% (15). Više od 45 monoklonskih protutijela je odobreno za primjenu, a u posljednje tri godine ih se oko 500 nalazilo u kliničkom razvoju (1, 2, 3, 4). Od toga su u 2014. godini ukupno 33 protutijela bila u fazama 2/3 ili 3 kliničkih ispitivanja, njih 23 za indikacije koje ne uključuju tumore i 10 u indikacijama za liječenje tumora. Sva 23 protutijela u netumorskim indikacijama su humanizirana ili humana, a u indikacijama za liječenje tumora od 10 monoklonskih protutijela u fazi 3 kliničkih ispitivanja našlo se jedno kimerno i dva mišja, tj. jedno mišje cjelovito i jedan mišji Fv-imunotoksin (77). Već tijekom 2015. godine njih 39 se nalazi u fazama 2/3 ili 3 kliničkih ispitivanja, od toga 27 u indikacijama koje ne uključuju tumore i njih 12 u indikacijama za liječenje tumora (5). Od 12 protutijela za liječenje tumora, jedno je kimerno, jedno cjelovito mišje, jedno je mišji dsFv-imunotoksin (engl. *disulfide-linked Fv*, dsFv), a jedno je scFv-fragment. Od ostalih osam, pet je cjelovitih humanih i jedno je cjelovito humanizirano monoklonsko protutijelo, a dva su humanizirana konjugata protutijela i lijeka. Od 27 monoklonskih protutijela u indikacijama koje ne uključuju tumore, jedno je kimerno i ostala su humanizirana i humana.

Od 500 monoklonskih protutijela koja se nalaze u kliničkom razvoju u posljednje tri godine, njih oko 60% je u indikacijama za liječenje tumora, 10% za imunosne poremećaje, 7% za poremećaje mišićno-koštanog sustava i 4% za infektivne bolesti. Ostale indikacije uključuju poremećaje dišnog sustava, kožne bolesti, hematološke, kardiovaskularne i poremećaje središnjeg živčanog sustava, itd. (1).

Jedno od njih je humanizirano monoklonsko protutijelo ibalizumab koje je usmjereno na glikoprotein CD4 na površini T-limfocita, koreceptor za ulazak virusa HIV-a u stanicu. Ovakav mehanizam je jedinstven među do sad poznatim terapijama za HIV i smanjuje

vjerojatnost za pojavu križne rezistencije. Rezultati faze Ib ukazuju na povoljnu učinkovitost i sigurnost, a zbog povoljnih farmakokinetičkih svojstava primjenjuje se intravenski jednom tjedno (15).

Napori u razvoju novih monoklonskih protutijela su također usmjereni na bakterijske infekcije, pogotovo s obzirom na sve veću bakterijsku rezistenciju na antibiotike. Jedno takvo monoklonsko protutijelo, humanizirani tefibazumab, je usmjereno na liječenje infekcije bakterijom *Staphylococcus aureus*, dok je kimerno monoklonsko protutijelo pagibaksimab usmjereno na liječenje stafilokoknih infekcija. U razvoju se nalazi i humano monoklonsko protutijelo panobacumab, pentamerski imunoglobulin M za liječenje upale pluća uzrokovane bakterijom *Pseudomonas aeruginosa* (15).

Monoklonskim protutijelima koja će se u budućnosti koristiti u liječenju nastavit će pridonositi i ona dobivena iz transgeničnih životinja. U 2014. se u različitim fazama kliničkih ispitivanja nalazilo 33 potpuno humanih monoklonskih protutijela dobivenih iz transgeničnih miševa (1). Liječenje smjesama protutijela je noviji pristup u liječenju monoklonskim protutijelima, a u tim smjesama se nalaze monoklonska protutijela usmjerena na više antigena ili na više epitopa jednog antigena (8). Tu je prednost transgeničnih životinja ta da, između ostalog, različite životinjske vrste proizvode protutijela visokog afiniteta za isti antigen što može poslužiti za buduće terapije smjesama protutijela, a tome mogu pridonijeti i nedavna otkrića različitih drugih životinjskih vrsta i linija za proizvodnju humanih monoklonskih protutijela visokog afiniteta, npr. OmniRat, Omni-Mouse, Kymouse, Harbour Mouse, MeMo miševi i zečevi (1). Veliki doprinos će svakako imati i inačice monoklonskih protutijela koje su opisane ranije, a čije se mnoge molekule nalaze u raznim fazama razvoja i ispitivanja.



### **3.3 Imunogenost proteinskih lijekova i monoklonskih protutijela**

#### **3.3.1 Imunosna reakcija na lijek**

Svi biološki lijekovi mogu izazvati imunosnu reakciju, a imunogenost bioloških lijekova se definira kao njihova sposobnost da induciraju imunosni odgovor (14). Za razliku od cjepiva, kod kojih je postizanje imunosnog odgovora i stvaranje protutijela na imunogen željeni ishod, kod ostalih bioloških terapeutika, uključujući monoklonska protutijela, imunosna reakcija na lijek je neželjena reakcija koja može utjecati na sigurnost i djelotvornost lijeka te imati posljedice na zdravlje pacijenta (13).

Imunosni odgovor na proteinske lijekove je adaptivan te nastaju protutijela na lijek, isprva imunoglobulini M niskog afiniteta te potom imunoglobulini G visokog afiniteta (11, 14). Nastajanje imunosnog odgovora je složeno te je opisano nekoliko načina. Protutijela mogu nastati direktnom aktivacijom naivnih B-limfocita specifičnih za lijek, a takva protutijela pripadaju imunoglobulinima M visokog afiniteta i imunoglobulinima G niskog afiniteta i karakteristična su za primarni kontakt s antigenom. U ponovljenom kontaktu s istim antigenom, specifičnih limfocita B je u organizmu više, zreli su te se lako i učestalo susreću s antigenom putem specifičnih imunoglobulina na svojoj površini. Antigen se potom neutralizira te B limfocit služi kao stanica koja prezentira antigen, odnosno epitope specifičnim limfocitima T. Aktivirani limfociti T potom daju pomoć daljnjoj aktivaciji spomenutog limfocita B, što dovodi do pojačanja imunosne reakcije. Prisutnost agregata uvelike utječe na imunogenost lijeka odnosno na pojavu protutijela na lijek, a smatra se da B-limfociti prepoznaju ponavljajuće proteinske strukture koje su zastupljenije u agregatima, a koje su inače svojstvene bakterijama i virusima (16, 56, 78, 79).

Prilikom liječenja biološkim lijekovima koji su imunogeni nastaju i neutralizirajući IgG1 i IgG4 visokog afiniteta što upućuje na aktivaciju T-limfocita. Mehanizam aktivacije T-limfocita uključuje stanice koje prezentiraju antigen (engl. *antigen presenting cell*, APC) koje unose antigen endocitozom, obrade ga te ga pomoću glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) razreda II prikazuju na svojoj površini. Receptori T-limfocita reagiraju s kompleksom antigena i glavnog kompleksa tkivne podudarnosti razreda II te se aktiviraju. Aktivirani pomagački T-limfociti (CD4<sup>+</sup>) prikazuju antigen na svojoj površini i luče citokine što dovodi do diferencijacije B-limfocita u plazma stanice koje počinju lučiti protutijela na lijek. Neki B-limfociti postaju memorijski te u ponovnom doticaju s antigenom dovode do brzog stvaranja plazma stanica (11, 56, 79).

Promjena razreda imunoglobulina, tj. promjena izotipa, događa se u zrelim B-limfocitima. Tijekom afinitetne maturacije dolazi do V-D-J rekombinacije i stvaranja specifičnih protutijela za određeni antigen. Kod promjene razreda, primjerice iz imunoglobulina M u imunoglobuline G, dolazi do promjene konstantnog dijela protutijela dok varijabilni dio ostaje isti (49). Time se promjenom razreda ne mijenja specifičnost protutijela za određeni antigen, no promjenom konstantnog dijela mijenjaju se druga svojstva protutijela, primjerice efektorske funkcije. To omogućuje različitim stanicama kćerima koje potječu od iste aktivirane B-stanice da proizvode protutijela različitih razreda i podrazreda (17, 80).

### **3.3.2 Čimbenici koji utječu na imunogenost monoklonskih protutijela**

Jako je puno čimbenika koji utječu na imunogenost bioloških lijekova. Biološki lijekovi su kod nekih pojedinaca imunogeniji nego kod drugih što ovisi o karakteristikama lijeka, ali i pojedinca. Molekule glavnog kompleksa tkivne podudarnosti, koji je odgovoran za imunosnu reakciju, su visoko polimorfni proteini. Svaka jedinka eksprimira svega nekoliko molekula

glavnog kompleksa tkivne podudarnosti, no u ljudskoj populaciji je identificirano više od tisuću alela za razred II MHC-a. Aleli glavnog kompleksa tkivne podudarnosti se razlikuju u specifičnosti vezanja proteina. Stoga se, ovisno o genotipu i sposobnosti specifičnog vezanja proteina, jedinke razlikuju u sposobnosti da razviju imunski odgovor na terapijski protein, odnosno očekuje se da te razlike utječu na pojavu imunogenosti (16, 79). S obzirom na kompleksnost imunskog sustava i veliku razliku među pojedincima, imunogenost će se različito manifestirati u populaciji. Na to upućuje i činjenica da, ukoliko postoji poremećaj u imunskom sustavu, imunski se reakcija može javiti i na vlastiti protein. Bitan faktor kod pojave imunski reakcije na lijek je sam ustroj imunskog sustava tj. samo stanje bolesnika, primjerice postojanje podležće bolesti. Kod imunokompromitiranih bolesnika, npr. s rakom ili pri imunosupresivnoj terapiji, je manja vjerojatnost nastanka protutijela na lijek nego kod bolesnika s normalnim imunskim statusom (11, 13).

Na imunogenost utječe i konkomitantna terapija, a istodobno primijenjen lijek može i smanjiti i pojačati imunski odgovor. Na imunsku reakciju na lijek utječe lučenje citokina kao glasnika kod aktivacije T-limfocita te se suprimiranjem njihovog lučenja može smanjiti imunski odgovor, primjerice ciklosporinom ili metotreksatom (11). Metotreksat se često primjenjuje s adalimumabom i infliksimabom jer smanjuje njihovu imunogenost. Kada se adalimumab primjenjuje sam, imunski odgovor se javlja u 12,4% bolesnika u odnosu na 5,5% bolesnika liječenih istovremeno s metotreksatom. To je slučaj i s infliksimabom primijenjenim u indikaciji psorijatičnog artritisa; kod monoterapije dolazi do stvaranja pet puta više protutijela na lijek u odnosu na kombiniranu terapiju s metotreksatom (13).

Bitan čimbenik je režim liječenja. Iako su učestalija primjena i više doze često povezane sa snažnijim imunskim odgovorom, također je zabilježeno da je dugotrajno liječenje višim dozama manje imunogeno od povremenog doziranja i manjih doza. No u tim slučajevima je i viša koncentracija ispitivanog lijeka u plazmi ili je manja koncentracija protutijela na lijek

zbog stvaranja imunokompleksa te se ovakvi rezultati trebaju interpretirati s oprezom (14, 78). S druge strane, monoklonska protutijela koja se doziraju povremeno će s većom vjerojatnošću izazvati imunosnu reakciju nego ona koja se doziraju ponavljano u pravilnim vremenskim razmacima (81). Veća vjerojatnost imunosne reakcije kod bolesnika koji se liječe povremeno nego kod onih koji se liječe dugotrajno je posljedica toga da je prijašnje izlaganje terapijskom proteinu dovelo do prvih faza imunosnog odgovora – odgovor sličan onome kod cijepljenja (13).

Na imunogenost utječe i dob bolesnika pa tako mlađi bolesnici imaju veću stopu stvaranja protutijela na lijek u odnosu na starije bolesnike (13).

Put primjene lijeka je bitan faktor kod pojave imunogenosti. Intravenski put primjene nije uvijek prikladan za dugoročno liječenje iz više razloga. Primjena infuzijom zahtijeva dugotrajnu primjenu u bolnicama, a može biti povezana s blagim do vrlo ozbiljnim nuspojavama (69). Ipak, zabilježen je viši stupanj imunogenosti kod lijekova koji se primjenjuju subkutano i intramuskularno u odnosu na one koji se primjenjuju intravenski, a smatra se da je razlog tome što se kod subkutane i intramuskularne primjene lijek akumulira na jednom mjestu i sporije distribuira, a u koži su prisutne i stanice koje prezentiraju antigen (13, 56).

Osim o samom pojedincu kojem je primijenjen lijek, pojava imunogenosti ovisi i o karakteristikama primijenjenog lijeka. Glikozilacija je posttranslacijska modifikacija proteina koja može utjecati na karakteristike lijeka i time i imunogenost, a postoje velike razlike u obrascu glikozilacije među stanicama koje se koriste za ekspresiju monoklonskih protutijela (13). Šećer kovalentno vezan na protein može utjecati na strukturu proteina (omogućavajući proteinu pravilno slaganje), funkciju (omogućavajući adheziju) ili stabilnost (neglikozilirani proteini su podložni bržoj razgradnji), što sve može indirektno utjecati na imunogenost (56). Prokariotske stanice, poput učestalo korištene *E. coli*, proizvode neglikozilirana protutijela

kraćeg vremena poluživota, a primjerice neglikozilirani interferon-beta proizveden u *E. coli* je imunogeniji od onog proizvedenog u stanicama sisavaca (78). Zabilježeno je da je prisutnost galaktozo-alfa-1,3-galaktoze na Fab-fragmentu cetuksimaba bila odgovorna za anafilaktičku reakciju posredovanu imunoglobulinom E. Promjenom stanične linije tj. uvođenjem proizvoda dobivenog iz stanica jajnika kineskog hrčka (CHO) koji nema enzim alfa-1,3-galaktozil-transferazu, problem imunogenosti je značajno smanjen (11, 81). Postoje i druge posttranslacijske modifikacije koje mogu dovesti do pojave imunogenosti poput glikacije, deamidacije ili oksidacije bočnih lanaca aminokiselina (11, 54).

I eukariotske stanice pokazuju međusobno različite obrasce glikozilacije. Kako je već opisano u poglavlju 3.2.4.2, mišje stanice mogu dodati šećere na određena mjesta protutijela koji mogu izazvati imunosnu reakciju u tijelu ljudi, dok humane i CHO stanice ne posjeduju enzime za takvu glikozilaciju (57). Štoviše, CHO stanice uspješno provode posttranslacijske modifikacije kompleksnih proteina, a glikozilacija je slična kao kod prirodnih imunoglobulina porijeklom iz ljudskog tijela (53). Povoljna glikozilacija dovodi do nastanka protutijela na monoklonska protutijela u manjoj mjeri ili do njihovog izostanka (55). O glikozilaciji se posebice mora voditi računa prilikom uvođenja novih sustava za ekspresiju s atipičnim obrascima glikozilacije koji mogu pridonijeti većem riziku od pojave imunogenosti nego kod poznatih ekspresijskih sustava (81).

Na imunogenost utječe meta monoklonskih protutijela. Monoklonska protutijela koja se vežu na antigene na površini stanica imaju veću imunogenost od onih koji se vežu na cirkulirajuće mete (56). Mehanizam nije u potpunosti razjašnjen, ali pretpostavlja se da dolazi do internalizacije antigena, obrade te prikazivanja na površini stanica (11). Ujedno, kada se vežu na površinu stanica, protutijela stvaraju agregate koje prepoznaje imunosni sustav. S druge strane, monoklonska protutijela koja se vežu na antigene na površini stanica s ciljem imunosupresije također suprimiraju imunosni odgovor (78). Monoklonska protutijela imaju i

svojstva koja mogu direktno pridonijeti njihovoj imunogenosti; osim što mogu aktivirati T-limfocite i time kaskadu reakcija imunskog sustava, mogu i pojačati imunosnu reakciju zahvaljujući Fc-fragmentu koji je odgovoran za aktivaciju komplementa, aktivaciju makrofaga itd. (78).

Osim prisutnosti agregata, koja se učestalo navodi kao jedan od glavnih čimbenika koji izazivaju neželjenu imunosnu reakciju (12), na imunosnu reakciju mogu utjecati i onečišćenja zaostala iz postupka proizvodnje ili adjuvansi (13, 81). Na ove probleme se uvelike može utjecati poboljšanjem formulacije i proizvodnih postupaka (11), a ovo je od poglavito velikog značaja kod biosličnih lijekova, ali i kod promjena u proizvodnji. Fluktuacije u postupku proizvodnje, poput promjena u vrijednosti pH ili temperature, mogu dovesti do značajnijih posljedica kod primjene gotovog lijeka. Kada se optimizira proces proizvodnje bioloških lijekova, mora se voditi računa o posljedicama promjena – mogućoj pojavi agregacije, promijenjenoj glikozilaciji ili degradaciji (13, 53).

Mnogi čimbenici povezani s kakvoćom lijeka mogu imati utjecaj na njegov imunogeni potencijal. Pomoćne tvari u gotovom lijeku mogu indirektno djelovati na imunogenost jer mogu pridonijeti stvaranju neoepitopa ili mogu djelovati kao adjuvansi. Tijekom postupka proizvodnje terapijski proteini su podvrgnuti različitim stresovima. Protein prolazi kroz visoku koncentraciju i povišenu temperaturu u bioreaktorima ili fermentorima, a tijekom razdvajanja, pročišćavanja i formulacije kroz veliki raspon pH-vrijednosti i naboja, smično naprezanje (engl. *shear stress*) i dolazi u kontakt s različitim medijima i materijalima. Primjerice, u "*bulk*" otopini (otopina velikog volumena koja je kao krajnji produkt proizvodnje spremna za primarno pakiranje) može doći do interakcija lijeka s površinom spremnika u kojem se otopina čuva te može doći do oksidacije i/ili agregacije. Izlaganje svjetlu također izaziva stres, primjerice tijekom vizualne inspekcije proizvoda, te različiti

temperaturni rasponi i pomicanje prilikom čuvanja lijeka i transporta, što najviše utječe na otopine i može dovesti do degradacije molekula (56).

### 3.3.3 Utjecaj imunogenosti na farmakokinetiku i terapijski odgovor

Imunogenost može utjecati na sigurnost primjene lijeka kao i na njegov farmakokinetički profil (11). Posljedice imunogenosti mogu biti razne, od blažih reakcija preosjetljivosti na mjestu primjene do ozbiljnih nuspojava te do smanjenja ili čak potpunog gubitka terapijskog odgovora (13). S obzirom da B-limfociti imaju sposobnost identificiranja epitopa unutar antigena i time mogu razlikovati dva vrlo slična antigena, isti mehanizam omogućava protutijelu vezanje na različite antigene koji imaju slične ili iste epitope, a to se naziva križna reaktivnost (17). Stvaranje križnoreaktivnih neutralizirajućih protutijela na endogene proteine može dovesti do ozbiljnih medicinskih stanja poput trombocitopenije i aplazije. Takve nuspojave su rijetke, ali ozbiljne te zahtijevaju pomnu ocjenu rizika od imunogenosti (79, 56), iako se uglavnom ne očekuju kod monoklonskih protutijela (81).

Dok je relativno jednostavno okarakterizirati rijetke, ali ozbiljne nuspojave poput reakcija preosjetljivosti, teže je ocijeniti stvaranje protutijela na monoklonska protutijela. Imunosna reakcija na monoklonska protutijela može biti anti-idiotipska, kada se protutijela vežu na mjesto vezanja protutijela tj. paratop, ili vezujuća (engl. *binding*) kod koje se protutijela na lijek vežu na druge dijelove terapijskih proteina. Najveća klinička posljedica imunogenosti su promijenjena farmakokinetika i smanjenje ili izostanak terapijskog odgovora za što su uglavnom odgovorna anti-idiotipska odnosno neutralizirajuća (engl. *neutralizing*) protutijela (11). Prosječno vrijeme poluživota terapijskih imunoglobulina G je 21 dan, ali pojava neutralizirajućih protutijela dovodi do bržeg klirensa monoklonskih protutijela (22). Primjerice, zabilježeno je da kontinuirana intravenska primjena može dovesti do stvaranja

neutralizirajuće anti-idiotipske imunodne reakcije. Do takve reakcije ponekad dolazi prilikom ponavljane intravenske primjene većih doza imunoglobulina, a s obzirom na vrijeme poluživota monoklonskih protutijela i ograničenu bioraspoloživost tj. mali volumen distribucije, potrebno je učestalo doziranje (69). No, i vezujuća protutijela mogu indirektno utjecati na djelotvornost lijeka utječući na farmakokinetiku jer imunokompleksi, koje predstavljaju kompleksi monoklonskog protutijela i protutijela na lijek, imaju veći klirens odnosno brže se odstranjuju iz tijela. S obzirom da se protutijela na lijek vežu na slobodan lijek u plazmi, koncentracije lijeka i protutijela na lijek su obrnuto proporcionalne (14, 56, 82).

Prolazna mala povišenja protutijela na lijek nisu od kliničkog značaja, ali od većeg je značaja pojava viših koncentracija koje interferiraju s aktivnošću terapijskog proteina i mijenjaju kliničku sliku. Ako protutijelo nosi epitop za CD4+ T-limfocite koji se prikazuje pomoću MHC-a II, takav imunodni odgovor predstavlja najveći problem jer se ne smanjuje tijekom vremena te utječe na djelotvornost i sigurnost terapijskog monoklonskog protutijela (11).

U više ispitivanja je dokazano smanjenje ili gubitak terapijskog odgovora zbog stvaranja protutijela na lijek, bez obzira na početni dobar odgovor na terapiju (82). Primjerice, kod liječenja bolesnika s Crohnovom bolešću infliksimabom, a bez istovremene primjene metotreksata, protutijela na lijek su se javila kod 61% bolesnika. Kod tih su bolesnika zabilježene niže koncentracije lijeka u plazmi, pojava alergijskih reakcija i smanjen terapijski odgovor (14). U drugom je ispitivanju zabilježeno da su se kod bolesnika liječenih adalimumabom protutijela na lijek javila kod 17% bolesnika, a ona su utjecala na sniženje razina adalimumaba ili terapijski neuspjeh. Ujedno je 84% bolesnika koji nisu razvili protutijela na lijek primalo metotreksat (14). S druge strane, gubitak terapijskog odgovora ne mora uvijek biti posljedica stvaranja protutijela na lijek što je izraženo kod liječenja tumora. Nakon određenog vremena se kod gotovo svih bolesnika javlja progresija bolesti i gubitak



terapijskog odgovora te je teško procijeniti je li on posljedica progresije tumora ili stvaranja protutijela na lijek (81).

S obzirom na kliničke posljedice stvaranja protutijela na monoklonska protutijela, imunosni odgovor se može raščlaniti na zanemariv (engl. *negligible*), prihvatljiv (engl. *tolerable*) i znatan (engl. *marked*). Zanemariv je onaj kod kojeg se protutijela na lijek javljaju u manje od 2% bolesnika, prihvatljiv kod kojeg se javljaju u 2-15%, a znatan je imunosni odgovor kod kojeg se protutijela na lijek javljaju u više od 15% bolesnika (10). Imunosni odgovor na terapijska protutijela se vjerojatno javlja kod većine pojedinaca, no nije kod svih jednako izražen, odnosno nije izražen na način koji bi značajno utjecao na farmakokinetički profil (82), a neki pojedinci će razviti toleranciju (14). Ujedno je imunogenost postupan proces i mijenja se tijekom vremena pri čemu se imunosna reakcija na biološki lijek može povećavati, smanjivati ili nestati s nastavkom liječenja (14, 81).

### **3.3.4 Ispitivanje imunogenosti**

Ispitivanje i ocjena imunogenosti su vrlo kompleksni, a uključuju kako aspekt kvalitete terapijskog protutijela, tako i pretklinički i klinički aspekt (13). Odabir metode ispitivanja imunogenosti je bitan faktor za procjenu utjecaja imunogenosti monoklonskog protutijela. Kompleksnost ispitivanja protutijela koja se formiraju na monoklonsko protutijelo je jedna od većih prepreka u procjeni kliničkog značaja imunogenosti (14).

Metode ispitivanja se razlikuju u specifičnosti i osjetljivosti, a za praćenje klinički značajne imunogenosti je ključna robusna, selektivna, osjetljiva i dobro validirana metoda, kako u pretkliničkim tako i u kliničkim ispitivanjima. Ne postoje standardizirane i validirane metode za ispitivanje imunogenosti proteinskih lijekova te je malo pripravaka protutijela koji bi poslužili kao referentni standardi. Osjetljivost metode, pa tako i incidencija lažno negativnih

rezultata, razlikuju se među uobičajeno korištenim metodama (79). Raznolik je i imunosni odgovor – može doći do stvaranja imunoglobulina M niskog afiniteta i imunoglobulina G1 visokog afiniteta, a trenutno dostupne metode ne mogu detektirati sva moguća protutijela (14). Ujedno, jedna metoda nije dostatna da bi se ocijenila imunogenost biološkog lijeka. Potreban je test probira (engl. *screening*) kako bi se utvrdila prisutnost protutijela, te potom daljnja karakterizacija nastalih protutijela kojom se određuju titar, izotip i specifičnost protutijela, odnosno radi li se o vezujućim ili neutralizirajućim protutijelima. Posljedica svega toga je da različite studije istog lijeka bilježe različite stope stvaranja protutijela na lijek (14, 78).

Zbog kompleksnosti ocjene imunogenosti i nekonzistentnosti dosadašnjih ispitivanja, a s obzirom na značaj imunogenosti kod mokolonskih protutijela, Europska agencija za lijekove (European Medicines Agency, EMA) je 2012. godine izdala smjernice o ispitivanju imunogenosti monoklonskih protutijela i njihovih inačica, koje upućuju na mnoge teškoće na koje se nailazi prilikom njenog ispitivanja (81).

Često korišten test za ispitivanje imunogenosti je ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) te je većina postojećih podataka o protutijelima na lijek dobivena ovom metodom (7). ELISA je visoko protočan (engl. *high throughput*), dobro poznat i relativno jeftin test, no nedostatak direktne ELISA metode je nespecifično vezanje i mogući lažno pozitivni rezultati (82), a problem predstavlja i primjenjivost detekcijskog reagensa koji je u ovom slučaju antihumani reagens na humano protutijelo (83). Druga imunokemijska metoda je radioimunotest (engl. *radioimmunoassay*, RIA), metoda koja je među osjetljivijima za otkrivanje malih količina protutijela. Ukoliko je prisutan, imunoglobulin G iz seruma je imobiliziran na nepomičnoj fazi te reagira s radioaktivno označenim lijekom. Prednost ove metode je što je osjetljiva (engl. *low background*) i može detektirati imunoglobuline G1 i G4 pri klinički značajnim koncentracijama, no nedostatak je upotreba radioaktivnog materijala

(82). Radioimunoprecipitacija (engl. *radioimmunoprecipitation assay*, RIPA) je imunoprecipitacijska metoda koja koristi radioaktivno označen antigen, a stvoreni imunokompleksi antigena i protutijela (u ovom slučaju radioaktivno označenog lijeka i protutijela na lijek) se uklanjaju iz otopine uz pomoć netopivog oblika vezujućeg proteina, npr. proteina A ili G (84).

Većina imunokemijskih metoda koje se koriste za detekciju protutijela na lijek koriste antiimunoglobulinske reagense kao što su protutijela na imunoglobuline ili proteini A i G, stoga EMA navodi da imunokemijske metode poput ELISA-a ili RIPA-e često nisu prikladne jer se antiimunoglobulinski reagensi vežu na sam lijek tj. monoklonsko protutijelo, osim ako se ne prilagode na način da savladaju navedeni problem (81).

U zamjenu se mogu koristiti primjerice dvostrana ELISA (enlg. *two-site (bridging) ELISA*) ili elektrokemiluminiscencija (engl. *electrochemiluminescence*, ECL). Dvostrana ELISA je unaprijeđena ELISA kod koje se lijek veže na matriks, potom se dodaje serum bolesnika te se za detekciju koristi biotinizirani oblik lijeka. Navodi se da je dvostrana ELISA u odnosu na ishodišnu metodu visoko specifična i osjetljiva, ali da ujedno pogoduje otkrivanju imunoglobulina M dok može previdjeti imunoglobuline G4 (82). Ujedno se kao nedostatak ove metode navodi da postoji mogućnost interakcije s lijekom iz uzorka ukoliko se on nalazi u suvišku, što odgađa detektiranje protutijela na lijek (83). Prednost elektrokemiluminiscencije je što ne zahtijeva antiimunoglobulinske reagense, no s druge strane navodi se da može biti manje osjetljiva i da je moguće da neće detektirati imunoglobuline G4 koji mogu nastati u nekim slučajevima te se stoga, da bi je se učinilo prikladnom za ispitivanje protutijela na lijek, mora optimizirati (81).

Metoda SPR (engl. *surface plasmon resonance*), koja s većom osjetljivošću detektira vrlo male koncentracije protutijela na lijek i protutijela niskog afiniteta, se razvija kao superiornija metoda za detekciju protutijela. Ova metoda mjeri vezanje na imobilizirani ligand u stvarnom

vremenu i koristi se za karakterizaciju interakcija antigena i protutijela (83). Interakcija biomolekule imobilizirane na čip (u ovom slučaju lijeka) i molekule iz otopine koja se na nju veže (u ovom slučaju protutijela na lijek) prati se bez potrebe za označavanjem molekula pomoću promjena u refraktnom indeksu na granici dva materijala koje izaziva interakcija vezanja tih dviju molekula (85). Visoko osjetljive metode poput ove mogu biti kritične jer je u određenim ispitivanjima dokazano da i nizak titar neutralizirajućih protutijela može imati klinički značajne posljedice (79), a i da imunosna reakcija u kojoj se isprva javljaju imunoglobulini M niskog afiniteta može dalje voditi stvaranju snažne i dugotrajne imunosne reakcije uzrokovane imunoglobulinima višeg afiniteta (83). Prednost metode SPR je da ne zatijeva antiimunoglobulinske reagense, brza je i detektira brzo disocirajuća protutijela koja se ne mogu detektirati drugim metodama. S druge strane, SPR detektira proteine koji se vežu na obloženi čip te će se trebati potvrditi da je protutijelo uzrokovalo signal. SPR je u usporedbi s metodom ELISA osjetljivija metoda za detekciju protutijela niskog afiniteta, ali ujedno može biti manje osjetljiva metoda za detektiranje protutijela visokog afiniteta. Nedostatak je što je to metoda niskog protoka kojom se može obrađivati mali broj uzoraka istovremeno i nema mogućnost automatiziranog uzorkovanja te visoki troškovi (81, 83).

Kada su koncentracije monoklonskog protutijela u plazmi visoke, mogu interferirati s detekcijom protutijela na lijek (22, 81). Može doći do stvaranja imunokompleksa monoklonskog protutijela i protutijela na lijek, a pogotovo ukoliko je višak lijeka prisutan u serumu u odnosu na količinu stvorenih protutijela. U tom slučaju će se zbog bržeg klirensa smanjiti količina lijeka u plazmi, no neće se detektirati protutijela na lijek jer će biti vezana dovodeći do lažno negativnih rezultata (81) ili će procjena o postojećim protutijelima na lijek biti daleko manja (82). To je posebice od značaja kod lijekova koji se primjenjuju dugotrajno, a to je većina bioloških lijekova. Preporučuje se prvo provesti mjerenje razine lijeka, a ne protutijela na lijek. Ako mjerenje pokaže niske koncentracije lijeka u plazmi, treba se ispitati

prisutnost protutijela na lijek (14). Predložene su i metode disocijacije monoklonskog protutijela i protutijela na lijek kako bi se razdvojili kompleksi, ali to ne smije utjecati na vjerodostojnost ispitivanja (81).

Općenito, metoda ispitivanja neutralizirajućih protutijela je uglavnom modificirana *in vitro* bioanaliza (ispitivanje učinkovitosti) kojom se mjeri smanjenje aktivnosti bioloških lijekova protutijelima na lijek (78); međutim, neutralizirajuća protutijela koja nastaju na terapijsko monoklonsko protutijelo i sprječavaju vezanje monoklonskog protutijela na ciljanu metu najviše pridonose smanjenju kliničke djelotvornosti, stoga EMA preporučuje da bi se za ispitivanje trebalo izabrati kompetitivno vezanje za ligand (81).

Ujedno je bitno i vrijeme uzorkovanja krvi jer monoklonska protutijela imaju relativno dugo vrijeme poluživota te mogu interferirati s protutijelima na lijek i dati lažno negativne rezultate. Da bi se to izbjeglo, uzorkovanje seruma provodi se odgođeno, odnosno nakon što se dovoljno smanjila koncentracija lijeka u plazmi. S druge strane, to također može dovesti do lažno negativnih rezultata jer se do tog vremena može smanjiti i koncentracija protutijela na lijek (81).

Također treba uzeti u obzir da lažno pozitivne ili lažno negativne rezultate mogu dati i druga protutijela i proteini iz tijela, kao što su cirkulirajući receptori koji su meta monoklonskog protutijela, imunokompleksi, Fc-receptori itd. Uzorci za ispitivanje bi se prvo trebali neutralizirati na receptore za monoklonska protutijela ili prilagoditi na druge načine kako bi se izbjegla interferencija i postigli prihvatljivi pozadinski signali, osjetljivost i specifičnost (78, 81, 82).

Jednom kada se napravi test probira i dobiju se pozitivni rezultati na protutijela na lijek, treba napraviti test kojim će se potvrditi dobiveni rezultat, a on često može nailaziti na iste poteškoće kao i test probira (81).

Za ispitivanje imunogenosti monoklonskih protutijela je ključna pozitivna kontrola. Ukoliko nije dostupan pozitivan serum ili pročišćeno protutijelo na lijek jer je monoklonsko protutijelo u ranim fazama razvoja, koristi se serum životinja, a izbor životinjske vrste ima važnu ulogu. Primati razvijaju anti-idiotipska protutijela usmjerena na CDR ili okvir varijabilne regije humaniziranih i humanih monoklonskih protutijela, što je slično odgovoru kod ljudi te mogu poslužiti kao pozitivna kontrola dok ostale životinjske vrste razvijaju protutijela usmjerena na konstantni dio monoklonskih protutijela. Valja napomenuti kako je uz pozitivnu bitna i negativna kontrola – kako bi se potvrdila specifičnost, koriste se monoklonska protutijela koja daju odstupajuće rezultate (81).

Životinjski modeli uglavnom nisu dobri za procjenu imunogenosti kod ljudi jer je imunosna tolerancija specifična za svaku vrstu. Ljudski su proteini strani životinjskom tijelu te će pokazati veću imunogenost nego u ljudskom tijelu (16, 79). MHC sekvence se razlikuju među pojedincima i vrstama te se razlikuje i sposobnost prepoznavanje antigena. Terapeutske proteini za liječenje ljudi mogu biti nativni proteini (primjerice inzulin ili hormoni) te da bi ljudski organizam razvio imunosnu reakciju, mora izostati tolerancija dok je životinjskom tijelu takav protein stran (79).

Postoje alternativne metode za ispitivanje imunogenosti poput aktivacije T-limfocita *in vitro* i ispitivanja na genetički modificiranim životinjskim modelima. Te metode mogu pridonijeti u procjeni imunogenog potencijala ili odabiru kandidata za daljni razvoj, ali potrebno je pomno praćenje imunogenosti tijekom kliničkih ispitivanja te postmarketinško praćenje jer nijedna od tih metoda ne predviđa u potpunosti ljudski imunosni odgovor (22, 79, 81).

### 3.4 Strategije za smanjenje imunogenosti monoklonskih protutijela

Monoklonska protutijela bila su među prvim terapijskim molekulama dobivenima modernim biotehnološkim postupcima. Iako se u njihovo daljnje istraživanje s ciljem optimizacije ulaže puno truda te ih je sve više u razvoju, često nailaze na poteškoće koje otežavaju njihovu primjenu, a jedna od njih je svakako imunogenost. Postoji više strategija za smanjenje imunogenosti proteinskih lijekova. Uvođenje humanih sekvenci kao zamjena za lijekove koji se dobivaju iz neljudskih izvora (npr. inzulin ili monoklonska protutijela) ili poboljšanje proizvodnih procesa kako bi se smanjila onečišćenja ili prisutnost agregata, što je obrađeno dalje u potpoglavljima ovom poglavlju, su uspješne metode, ali s obzirom na dosadašnja saznanja često je nemoguće u potpunosti predvidjeti imunogeni potencijal lijeka (78). Iako su mogućnosti za smanjenje imunogenosti mnogobrojne, prilikom postupka se ne smiju uništiti struktura, funkcija i stabilnost lijeka. Zadržavanje djelotvornosti uz redukciju imunogenosti je vrlo velik izazov, pogotovo za biološke lijekove poput monoklonskih protutijela čija funkcija leži u sekvencama koje imunosnom sustavu predstavljaju epitope. Uklanjanje epitopa terapijskih proteina mijenjanjem strukture pokazalo se učinkovitim u smanjenju imunogenosti, ali je često dovelo i do smanjenja djelotvornosti lijeka. Slična sudbina je i s pegiliranim lijekovima. Iako je pegilacija učinkovita kod smanjivanja imunogenosti terapijskih enzima, kod ostalih bioloških lijekova uzrokuje drastično smanjenje djelotvornosti (79).

Kako je već ranije opisano, monoklonska protutijela imaju i svojstva koja mogu direktno pridonijeti njihovoj imunogenosti i pojačati imunosnu reakciju zahvaljujući Fc-fragmentu koji je odgovoran za aktivaciju komplementa, aktivaciju makrofaga itd., stoga se modifikacijom Fc-fragmenta može modificirati funkcija monoklonskog protutijela i time smanjiti imunogenost (22, 78).

Danas postoje i bioinformatičke metode čije je područje rada imunologija (tzv. imunoinformatika), a njihovi napori su uglavnom usmjereni na što preciznije predviđanje imunogenosti i prepoznavanje epitopa za T-limfocite i B-limfocite monoklonskih protutijela te njihovo uklanjanje (16). Ove metode su detaljnije opisane u potpoglavlju 3.4.3.

#### **3.4.1 Utjecaj kakvoće lijeka i redukcije agregacije na smanjenje imunogenosti**

Smanjenje pojave agregata je bitan pristup za smanjenje imunogenosti s obzirom da su agregati mnogo više imunogeni od topivih proteina, a teško ih je kontrolirati jer više faktora pridonosi njihovoj pojavi. Na pojavu agregata u gotovom lijeku utječe struktura samog terapijskog proteina te različiti oblici stresa, a različiti agregati istog terapijskog proteina čiji je nastanak izazvan različitim oblicima stresa mogu imati različit imunogeni potencijal. Isto tako na imunogenost izazvanu agregatima utječe broj, veličina i orijentacija epitopa. Iz aspekta kakvoće, prisutnost agregata se može smanjiti poboljšanjem formulacije, primjerice povećanjem topivosti, i smanjenim izlaganjem lijeka stresnim uvjetima, primjerice poboljšanjem uvjeta čuvanja lijeka (56).

Kod dizajniranja same molekule mogu se mutirati određene sekvence koje su pokazale sklonost agregaciji i degradaciji i koje time pridonose imunogenosti. No kako je već navedeno, valja voditi računa o funkcionalnosti terapijskog proteina, kao i o tome da se prilikom uklanjanja epitopa ne stvore novi epitopi koji će povećati imunogenost (79). Problem kod uklanjanja regija koje su sklone agregaciji je činjenica da CDR, koji je odgovoran za vezanje na antigen, sadrži i regije sklone agregaciji (56).

Najveći utjecaj na smanjenje imunogenosti je vidljiv kroz odabir same terapijske molekule. Ukoliko je odabrana željena terapijska molekula imunogena, mogućnost utjecaja na imunogenost iz aspekta kakvoće je ograničena. Zato je bitno da se izabere ili dizajnira



molekula koja ima dobru topivost i kemijsku stabilnost te koja nije sklona agregaciji što joj omogućava bolju ekspresiju, posttranslacijske modifikacije, mogućnost procesiranja i rok valjanosti (56). S druge strane, utjecaj kakvoće na pojavu imunogenosti nije zanemariv te iz aspekta kakvoće, najbolji način da se spriječi imunogenost je optimizacija proizvodnje, formulacije i metoda pročišćavanja kako bi se stvorio topiv, neagregirajući, nativni protein bez kontaminirajućih adjuvansa (86). Ocjena rizika iz aspekta kakvoće, s obzirom na moguć utjecaj na molekulu i njen imunogeni potencijal, uključuje ekspresijski sustav i posttranslacijske modifikacije (koji su obrađeni ranije u radu), onečišćenja, korake procesiranja, formulaciju i pakiranje lijeka te naposljetku degradacijske produkte (56).

Napredak u procesnoj tehnologiji je smanjio onečišćenja zaostala iz postupka proizvodnje i onečišćenja inačicama samog lijeka (engl. *process- and product-related impurities*), koji mogu djelovati kao adjuvansi i signali opasnosti u stvaranju imunosne reakcije (56, 87). Kod bioloških lijekova „upstream“ procesi određuju vrstu onečišćenja koja može zaostati u gotovom lijeku, stoga se moraju optimizirati koraci poput fermentacije i izoliranja željenog proteina. Iako se proteini nakon izoliranja pročišćavaju, potpuno uklanjanje onečišćenja je gotovo nemoguće. Stoga se onečišćenja iz postupka proizvodnje poput proteina iz stanica domaćina, endotoksina ili DNA uglavnom svode na razine ispod onih koje se smatraju faktorom rizika. Primjerice, u prvom koraku pročišćavanja najčešće korištena metoda je afinitetna kromatografija kod koje se Fc-regija monoklonskog protutijela veže na protein A. Protein A je protein iz stanične stijenke bakterije *Staphylococcus aureus* i kao takav ima imunogeni potencijal, a postoji mogućnost da završi u daljnjem postupku proizvodnje zbog ispiranja s kromatografske kolone zajedno s monoklonskim protutijelom. Stoga je dokaz o nepostojanju proteina A u gotovom lijeku dio regulatornog zahtjeva za dobivanje odobrenja za lijek (56).

S druge strane, inačice same terapijske molekule poput necjelovitih proteina te hidroliziranih, agregiranih, oksidiranih ili nepravilno glikoziliranih oblika lijeka se teže uklanjaju te se u određenom postotku nalaze u krajnjoj "bulk" otopini. S obzirom da terapijski protein može proći kroz mnoge posttranslacijske modifikacije što može dovesti do stvaranja novih epitopa, ponekad je teško razlikovati onečišćenja inačicama samog lijeka iz proizvodnog postupka i degradacijske produkte. Primjerice, oksidacija, agregacija, fragmentacija ili hidroliza monoklonskih protutijela se mogu dogoditi u bilo kojem koraku proizvodnje, kao i prilikom čuvanja i uporabe lijeka te ih je vrlo bitno kontrolirati iz aspekta kakvoće. Iz tih razloga je vrlo bitna optimalna formulacija lijeka jer dobro dizajnirane i robusne formulacije mogu rezultirati boljom stabilnošću prilikom čuvanja lijeka (88), a na očuvanje kvalitete lijeka utječu i poboljšanja u pakiranju lijeka i uvjetima distribucije (56).

#### **3.4.2 Smanjenje imunogenosti humanizacijom monoklonskih protutijela**

Prva monoklonska protutijela bila su u potpunosti mišjeg porijekla. Ova monoklonska protutijela kao strana tijela u ljudskom tijelu u većini slučajeva izazivaju imunosnu reakciju, od akutne alergijske reakcije do visokog titra neutralizirajućih protutijela na monoklonska protutijela koja se nazivaju HAMA (engl. *human anti-mouse antibodies*) (7, 10). Kako bi se smanjila imunogenost, a s pretpostavkom da ljudske sekvence nisu strane ljudskom tijelu kao što su one životinjskog porijekla, u monoklonskim protutijelima se nastoji smanjiti udio sekvenci koje nisu ljudskog porijekla odnosno povećati sadržaj ljudskih sekvenci (79).

Nakon razvoja i registracije muromonaba sredinom 80-ih godina 20. stoljeća, prošlo je 8 godina prije nego što je registrirano iduće monoklonsko protutijelo. Imunogenost mišjih monoklonskih protutijela glavni je faktor koji je pridonio ovom razmaku i ograničio njihovu primjenu. Pojava protutijela na mišja monoklonska protutijela može dovesti do bržeg klirensa

protutijela, smanjenja učinkovitosti te povećanog rizika od alergijskih reakcija poput relativno blagih reakcija na mjestu primjene ili povišene tjelesne temperature do ozbiljnih anafilaktičkih reakcija (58). Nastanak HAMA je povezan s nastankom imunokompleksa i s njima povezanim nuspojavama poput serumske bolesti ili anafilaktičke reakcije (69). Uz imunogenost, nedostatak ovih protutijela je izostanak efektorskih funkcija kao što su stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima ili citotoksičnost ovisna o komplementu koje su od važnosti kod uništavanja malignih stanica te kratko vrijeme poluživota zbog nemogućnosti vezanja na FcRn receptor (8).

Zabilježeno je da je 50% bolesnika razvilo HAMA nakon jednokratnog doziranja muromonaba-CD3 (89). Kod višestrukog doziranja, koje je uglavnom potrebno kada se monoklonska protutijela koriste u terapijske svrhe, HAMA odgovor se znatno povećava. Ujedno će se pojaviti protutijela na lijek kod pojedinaca kod kojih se takav odgovor nije javio nakon prve doze. Zabilježeno je da 90% bolesnika razvije HAMA prilikom liječenja mišjim monoklonskim protutijelima (10). Prisutnost protutijela na mišja monoklonska protutijela će odmah neutralizirati naredne primijenjene doze. Stoga je u praksi terapijska učinkovitost mišjih monoklonskih protutijela ograničena na primjenu prve i ponekad druge doze, ukidajući mogućnost za daljnje liječenje. Uslijed navedenog je većina mišjih monoklonskih protutijela doživjela klinički neuspjeh (14).

Primjena kimernih monoklonskih protutijela je značajno smanjila imunogenost u odnosu na mišja monoklonska protutijela (10), iako i kimerna protutijela mogu izazvati nastanak protutijela na lijek, tzv. HACA (engl. *human anti-chimeric antibodies*). Kimerna monoklonska protutijela ujedno imaju dulje vrijeme poluživota od mišjih te mogu imati efektorske funkcije (8). Razvojem kimernih monoklonskih protutijela smanjena je imunogenost s obzirom da je manji dio protutijela mišjeg porijekla. Ujedno je HAMA odgovor u velikoj mjeri usmjeren na epitope na Fc-regiji protutijela, a smatralo se da je

varijabilna regija manje imunogena. I u praksi je uočena smanjena imunogenost; ispitivanja su pokazala da aktivnost pomagačkih T-limfocita nije usmjerena na humani konstantni dio imunoglobulina zbog postojanja imunosne tolerancije (11).

Rana klinička ispitivanja s kimernim monoklonskim protutijelima su pokazala da su uglavnom sigurna. Stopa imunosnog odgovora na primijenjenu prvu dozu kimernih monoklonskih protutijela je bila 5% u usporedbi s, u nekim slučajevima, 80% na prvu dozu mišjih. Ipak, ponavljane doze su povisile stopu imunosnog odgovora kod većine bolesnika. Kod nekih kimernih monoklonskih protutijela su protutijela na lijek zabilježena kod 61% bolesnika (14).

S obzirom da zamjena mišjih konstantnih regija ljudskima uvelike dovodi do smanjenja imunogenosti, ali da je ona i dalje prisutna, u razvoju se nastojalo dalje humanizirati varijabilne regije monoklonskih protutijela kako bi se u potpunosti uklonio imunogeni potencijal. Humanizirana protutijela, kod kojih se na humanom protutijelu nalaze mišje regije koje određuju komplementarnost, su dalje smanjila rizik od imunogenosti zadržavajući terapijsku aktivnost mišjeg ili kimernog protutijela (16). Metoda stvaranja humaniziranih protutijela iz mišjih, umetanjem mišjih CDR regija u humana monoklonska protutijela odnosno u okvir varijabilne regije, je značajno pridonijela današnjem terapijskom uspjehu monoklonskih protutijela (10).

Predložen je i daljnji korak humanizacije i smanjenja imunogenosti humaniziranih monoklonskih protutijela. Umjesto regija koje određuju komplementarnost, koriste se samo dijelovi koji određuju specifičnost (engl. *specificity determining residues*, SDR). SDR je minimalni dio CDR-a potreban za vezanje na antigen koji se umeće u humani okvir umjesto CDR-a. Time se dalje povećava humani udio u humaniziranom protutijelu, odnosno može se smanjiti udio epitopa za T-limfocite u mišjim regijama koje određuju komplementarnost čime se potencijalno smanjuje imunogenost varijabilne regije. Međutim, učinak dodatne

humanizacije humaniziranih monoklonskih protutijela na klinički značajnu imunogenost još nije ocijenjen u kliničkim ispitivanjima (30).

Humanizirana protutijela nose puno manji rizik od nastanka imunosne reakcije od mišjih i kimernih. Dok je oko 40% kimernih monoklonskih protutijela izazvalo znatan imunosni odgovor, on se pojavljuje u svega 9% humaniziranih monoklonskih protutijela (10). U ispitivanju epitopa za pomagačke T-limfocite *in vitro*, varijabilne regije kimernog protutijela cetuksimaba su izazvale znatan imunosni odgovor, što je u skladu s pretpostavkom da je prisustvo epitopa za CD4+ T-limfocite povezano s imunogenim potencijalom. No kada je humanizirana inačica varijabilne regije ispitana istom metodom, izostao je znatan imunosni odgovor, što upućuje na to da je za imunogeni potencijal odgovoran okvir varijabilne regije mišjeg porijekla. Daljnja ispitivanja su pokazala da je, jednom kada je reducirana imunogenost okvira tj. kada je okvir varijabilne regije humanog porijekla, za imunogeni potencijal odgovorna regija koja određuje komplementarnost (11).

U ocjeni objedinjenih podataka iz ispitivanja imunogenosti monoklonskih protutijela do 2005. godine (10) je kod 44 ispitanih mišjih monoklonskih protutijela u 84% slučajeva zabilježen znatan imunosni odgovor, u 7% prihvatljiv, a u 9% zanemariv. Kod zanemarivog imunosnog odgovora, dva od četiri monoklonska protutijela su se koristila u dijagnostičke, a ne terapijske svrhe. Ispitano je i 15 kimernih monoklonskih protutijela. U 40% slučajeva je zabilježen znatan imunosni odgovor, u 27% prihvatljiv, a u 33% zanemariv. Kod 22 ispitana humanizirana protutijela (a u ovoj kategoriji su se zajedno našla i humanizirana i potpuno humana monoklonska protutijela), u 9% slučajeva je zabilježen znatan imunosni odgovor, u 36% prihvatljiv, a u 55% zanemariv. Valja napomenuti kako su izabrani samo reprezentativni radovi za do tada sva poznata protutijela, bilo registrirana ili tek u različitim fazama razvoja, a morali su sadržavati jasne podatke o stvorenim protutijelima na monoklonska protutijela, dovoljan broj ispitanika te je morala postojati konzistentnost podataka među različitim

radovima. Ovom usporedbom se pokazalo da humanizacija smanjuje imunogenosti monoklonskih protutijela, iako se direktna usporedba različitih monoklonskih protutijela ne preporučuje jer može dovesti do krivih zaključaka.

Prilikom daljnjeg razvoja i postupka humanizacije monoklonskih protutijela se očekivalo da takva protutijela neće izazivati imunosne reakcije, ali se pokazalo da ni potpuna humanizacija nije garancija izostanka imunogenosti (16, 78). Ipak, kod humaniziranih i humanih monoklonskih protutijela je značajno smanjen imunogeni potencijal u odnosu na ranija kimerna protutijela te pokazuju svojstva slična endogenim humanim imunoglobulinima G (8). To ujedno potvrđuje i činjenica da je u novije vrijeme većina monoklonskih protutijela za terapijske svrhe humanizirana ili humana (16, 22).

Humana i humanizirana monoklonska protutijela mogu potaknuti stvaranje protutijela koja se nazivaju HAHA (engl. *human anti-human antibodies*). Potpuno humana monoklonska protutijela dobivena iz sintetskih knjižnica bakteriofaga mogu nositi potpuno nove epitope i dovesti do stvaranja protutijela na lijek koja mogu umanjiti očekivane prednosti humanog protutijela. Pojava imunogenosti ne izostaje ni kod humanih monoklonskih protutijela dobivenih iz transgениčnih miševa. Primjerice golimumab, dobiven iz transgениčnih miševa, izaziva imunosnu reakciju u 12-16% bolesnika (35).

Već je spomenuto da je za imunogeni potencijal odgovorna regija koja određuje komplementarnost. V-D-J geni, koji se nasumično spajaju tijekom somatske rekombinacije, stvaraju ogromnu raznolikost CDR regije koja omogućuje prepoznavanje gotovo svake strane makromolekule, a dodatna raznolikost se stvara prilikom somatske hipermutacije tijekom afinitetne maturacije (11, 21). Očekuje se da s određenom učestalošću dolazi do pojave imunogenih epitopa u CDR regijama jer sam imunosni sustav ne može stvoriti toleranciju na svaku novu proteinsku sekvencu te može doći do imunosne reakcije, odnosno ljudski imunosni sustav nije savršen i ako izostane tolerancija, može stvoriti anti-idiotipska

protutijela usmjerena na varijabilni dio vlastitih protutijela. U serumu zdravih ljudi se svaki dan stvaraju anti-idiotipska protutijela, a ona su srodna protutijelima koja nastaju na lijek, odnosno to su protutijela usmjerena na varijabilni dio protutijela odgovoran za vezanje (11, 14).

Ispitana je pretpostavka da imunogenost leži u CDR regijama, i to u sve tri regije i teškog i lakog lanca. U ispitivanju imunogenosti ukupno osam humaniziranih i humanih protutijela, nijedna regija monoklonskog protutijela nije imala imunogeniji potencijal od CDR regije. Štoviše, imunosni sustav ljudi razvija toleranciju na humani okvir varijabilne regije. U ispitivanju je u potpunosti izostao znatan imunosni odgovor pomagačkih T-limfocita na sam okvir varijabilne regije, dok je on bio prisutan na CDR regije (11). Imunogeni potencijal se može ukloniti modifikacijom CDR regija, ali se time znatno smanjuju afinitet i specifičnost vezanja monoklonskog protutijela. Ujedno je teško pretpostaviti sve epitope za pomagačke T-limfocite, a modifikacijom CDR regija se mogu stvoriti i novi epitopi (16).

Postoje pokušaji stvaranja tolerancije kod bolesnika kako bi izostao imunosni odgovor na primjenu monoklonskog protutijela u terapijske svrhe. Treba se stvoriti tolerogena inačica monoklonskog protutijela koja neće izazvati imunosnu reakciju u tijelu bolesnika, a to se postiže stvaranjem ograničenog broja mutacija u CDR regiji koja je odgovorna za vezanje. Nekoliko mutacija može drastično smanjiti sposobnost vezanja, ali time i pružiti tolerogenu verziju koja se može davati bolesniku prije započinjanja liječenja monoklonskim protutijelom. Jednom kada se bolesniku počne davati terapijsko monoklonsko protutijelo, ono zbog imunodne tolerancije ne bi trebalo izazivati imunosnu reakciju (90).

Imunogenost na isti način ne izostaje niti kod inačica monoklonskih protutijela – fuzijskih proteina, diatijela, konjugiranih monoklonskih protutijela itd., a mjesto fuzije može sadržavati nove epitope koje imunosni sustav može prepoznati kao strane (13, 14).

### 3.4.3 Smanjenje imunogenosti informatičkim metodama

Informatika protutijela (engl. *antibody informatics*) se razvila kao znanost koja olakšava dizajniranje i modeliranje terapijskih protutijela s ciljem poboljšanja njihovih svojstava uzimajući u obzir puno čimbenika, a koristi saznanja molekularno-bioloških metoda koje se svakodnevno razvijaju i unaprjeđuju te omogućuju dobivanje velike količine podataka o monoklonskim protutijelima – njihovim sekvencama, afinitetu, strukturi, funkciji itd., što bi trebalo ubrzati pronalazak novih terapijskih protutijela. Informatika protutijela nastoji naći rješenja za poteškoće na koje se svakodnevno nailazi prilikom razvoja monoklonskih protutijela, poput poteškoća u pronalasku dovoljno specifičnog protutijela željenog afiniteta za određeni antigen, nepovoljnog farmakokinetičkog profila, sklonosti agregaciji i smanjene stabilnosti te nastoji optimizirati protutijela inženjerstvom, predvidjeti epitope za T-limfocite i ukloniti ih kako bi se smanjila imunogenost, a da se pri tome zadrži djelotvornost (56, 67).

Dizajniranje protutijela *in silico* se koristi za dizajniranje protutijela s poboljšanim svojstvima, primjerice za povećanje afiniteta. U jednom provedenom ispitivanju su se, nakon određivanja 3D strukture interakcije protutijela i antigena rendgenskom kristalografijom, regije koje određuju komplementarnost podvrgnule mutagenezi *in silico* te je stvoreno puno različitih modela. Odabrano je svega nekoliko mutanata na temelju izračuna interakcijske energije između protutijela i antigena te su takva protutijela eksprimirana, a vezanje je ispitano SPR-om kako bi se ocijenile pretpostavke dobivene putem modela te se pokazalo da određeni mutanti imaju povećan afinitet, s najvećim povećanjem od 4,6 puta. Razvijeni su i alternativni računalni pristupi kako bi se izbjegla rendgenska kristalografija, a koriste fizikalno-kemijska obilježja interakcija epitop-paratop prethodno dobivena iz poznatih 3D struktura. Ovaj pristup je primijenjen na protutijelu 4E11, križno reaktivnom neutralizirajućem protutijelu na virus



dengue, gdje je postignuto povećanje afiniteta od 450 puta, a povećan afinitet dokazan je i povećanom neutralizirajućom aktivnošću *in vitro* (67).

Modeliranje protutijela je metoda koja nastoji odrediti odnos sekvenci i strukture iz slijeda aminokiselina te se često koristi za dobivanje modela s tercijskom strukturom interakcije protutijela i antigena, i igra važnu ulogu u postupku dizajniranja *in silico* te u razumijevanju funkcije proteina. Kod modeliranja protutijela se koriste dostupne baze podataka protutijela poput IEDB (engl. *Immune Epitope Database*), koja sadrži objavljene podatke o protutijelima i epitopima za T-limfocite, stanicama domaćina i sojevima, imunogenu itd., ili DIGIT (engl. *Database of ImmunoGlobulin with Integrated Tools*), koja sadrži sekvence teških i lakih lanaca, te mnoge druge (67). Prvi uvid u odnos sekvenci i strukture je dobiven nakon otkrića 6 hipervarijabilnih regija na lakim i teškim lancima (CDR) i određivanja povezanosti između sekvenci aminokiselina i 3D strukture na mjestu vezanja za antigen. Otkrivene su kanonske strukture koje su ponavljajuće konformacije hipervarijabilnih regija glavnih lanaca, određenih duljinom petlje i malim brojem ključnih ostataka koji su, putem vodikovih veza ili sposobnosti stvaranja određenih konformacija, primarno odgovorni za konformaciju glavnog lanca hipervarijabilnih petlji. Stoga modeliranje, inženjerstvo i humanizacija protutijela djelomično ili u potpunosti ovise o kanonskim strukturama i sposobnosti da ih se predvidi (67). S obzirom na sekvence protutijela nepoznate strukture, može se stvoriti prihvatljiv model za regije okvira i hipervarijabilne petlje koristeći tehniku homolognog modeliranja jer pet hipervarijabilnih regija, L1, L2, L3, H1 i H2, uglavnom imaju mali broj konformacija te postoji velika vjerojatnost da imaju konformaciju glavnog lanca koja odgovara poznatoj kanonskoj strukturi, a da H3 ima konformaciju glavnog lanca sličnu onoj poznate strukture.

Aminokiselinski slijed i struktura regija okvira su uglavnom evolucijski visoko očuvani te se mogu točno modelirati, bez većih poteškoća. Problem kod modeliranja H3-petlji je što su sekvence i strukture visoko varijabilne zbog V-D-J rekombinacije. Ovaj učinak je u većini

slučajeva teško ili nemoguće modelirati i postavlja gornju granicu točnosti modeliranja ove regije. Modeliranje H3-petlje se nastoji poboljšati na mnogo načina, ali i dalje ima lošiju preciznost od ostatka modela, često ograničavajući mogućnost primjene. Ovaj problem je ključan kod modeliranja devinih VHH domena jer one imaju specifičan repertoar H3 petlji, često dugačkih i sa specifičnim konformacijama, te postojeće metode za predviđanje teško postižu dobre rezultate. Drugi problem je promjena konformacije vezanjem antigena na CDR. Vezanje antigena može dovesti do konformacijskih promjena cijelog protutijela. Ipak su uočene samo male konformacijske promjene većine petlji, ali zato H3 regije srednjih i dugih petlji postižu drastične konformacijske promjene jer većina CDR H3-petlji ima direktan kontakt s antigenom. Najveći izvori pogrešaka kod modeliranja protutijela su, osim modeliranja H3-petlje i predviđanja potencijalnih konformacijskih promjena nakon vezanja antigena, identifikacija pogodnih predložaka i rekonstrukcija točnog spajanja VH- i VL-regija; različiti načini spajanja VH- i VL-domena također imaju snažan utjecaj na oblik mjesta za vezanje antigena i specifičnost za antigen, a odabir predložka iz homolognih struktura nije jednostavan te je za visoku točnost modeliranja ključno iskustvo stručnjaka kako bi se izabrao i poboljšao pogodan predložak (67).

## 4. Rasprava

Većina monoklonskih protutijela i njihovih inačica pokazuje određeni stupanj imunogenosti, a imunogenost može uvelike utjecati na terapijski odgovor i na njihovu primjenu. Stoga su ispitani mnogi faktori koji mogu dovesti do pojave imunogenosti kako bi se imunogeni potencijal monoklonskih protutijela uklonio ili bar sveo na neznatan. Ispitane su karakteristike monoklonskih protutijela, od formulacije i prisustva agregata do strukture, odnosno udjela sekvenci mišjeg ili humanog porijekla, potom stanje bolesnika kome se lijek primjenjuje, režim liječenja itd. Smatra se da su za imunogeni potencijal monoklonskih protutijela uvelike zaslužne sekvence mišjeg porijekla koje ljudskom tijelu predstavljaju strana tijela i očekuje se da će imunski sustav na njih reagirati. Stoga se u razvoju monoklonskih protutijela za primjenu kod ljudi nastojalo uvesti što veći broj humanih sekvenci. Tako su se od monoklonskih protutijela prve generacije, koja su u potpunosti mišjeg porijekla, do danas razvila monoklonska protutijela koja nose u potpunosti humane sekvence.

Mišja monoklonska protutijela rijetko pokazuju zanemarivu imunogenost, a često se HAMA razvije u većine bolesnika. Visoka imunogenost mišjih monoklonskih protutijela ograničava njihovu primjenu s obzirom da je, kada se monoklonska protutijela koriste u terapijske svrhe, uglavnom potrebno višestruko doziranje. S obzirom da pojava protutijela na lijek može dovesti do bržeg klirensa i time smanjene učinkovitosti, ali i povećanog rizika od nuspojava, a da mišjim monoklonskim protutijelima ujedno nedostaju i druge povoljne karakteristike koje imaju monoklonska protutijela s konstantnom regijom humanog porijekla, većina je mišjih monoklonskih protutijela doživjela klinički neuspjeh. Od više od 45 monoklonskih protutijela danas odobrenih za primjenu kod ljudi, samo je jedno od njih cjelovito mišje monoklonsko protutijelo.

S obzirom da je HAMA odgovor u velikoj mjeri usmjeren na epitope na Fc-regiji protutijela, primjena kimernih monoklonskih protutijela je značajno smanjila imunogenost u odnosu na mišja s obzirom da je manji dio protutijela mišjeg porijekla, iako i kimerna protutijela mogu izazvati nastanak protutijela na lijek. Osim smanjene imunogenosti, kimerna protutijela imaju druge povoljnije karakteristike poput duljeg vremena poluživota te mogućih efektorskih funkcija zbog konstantne regije humanog porijekla. Iako je, za razliku od mišjih, stopa imunosnog odgovora na primjenu prve doze mala, ponavljane doze također povisuju stopu imunosnog odgovora. S obzirom da zamjena mišjih konstantnih regija ljudskima uvelike dovodi do smanjenja imunogenosti, ali da je ona i dalje prisutna, u razvoju se nastojalo dalje humanizirati varijabilne regije monoklonskih protutijela kako bi se u potpunosti uklonio imunogeni potencijal.

Humanizirana protutijela su dalje smanjila rizik od imunogenosti zadržavajući terapijsku aktivnost mišjih ili kimernih protutijela te značajno pridonijela današnjem terapijskom uspjehu monoklonskih protutijela. Ipak, ne može se pretpostaviti niska imunogenost svih humaniziranih monoklonskih protutijela; određena humanizirana protutijela pokazuju visoku imunogenost koja bi, u teoriji, bila karakterističnija za mišja ili kimerna monoklonska protutijela.

Prilikom daljnjeg razvoja i postupka humanizacije se očekivalo da takva protutijela neće izazivati imunosnu reakciju, ali se pokazalo da imunogenost ne izostaje ni kod potpuno humanih monoklonskih protutijela. Štoviše, stopa imunosnog odgovora kod primjene humanih monoklonskih protutijela je slična kao kod humaniziranih. Ovakav rezultat se isprva može činiti iznenađujuć, ali nije nelogičan jer se pokazalo da imunogeni potencijal humaniziranih i humanih monoklonskih protutijela leži u CDR regijama, a da je imunosni sustav razvio toleranciju na humani okvir varijabilnog dijela monoklonskih protutijela u kojima leže CDR regije.

Iako ni potpuna humanizacija nije garancija izostanka imunogenosti, većina monoklonskih protutijela odobrenih u terapijske svrhe su humanizirana ili humana s manjim imunogenim potencijalom od ranijih kimernih monoklonskih protutijela te pokazuju svojstva slična endogenim humanim imunoglobulinima G. Iako je humanizacijom kimernih monoklonskih protutijela došlo do smanjenja imunogenosti, ona je svedena samo na smanjenje postotka bolesnika sa znatnim imunosnim odgovorom. No, ona je vrlo bitna kada je u pitanju dugotrajna primjena monoklonskih protutijela u terapijske svrhe te se humanizacija favorizira. Na to također upućuje činjenica da je danas većina monoklonskih protutijela ili njihovih inačica u raznim fazama razvoja humanizirana ili humana. Ipak, ne smije se podcijeniti značaj kimernih monoklonskih protutijela – njih osam i jedan fragment su trenutno odobreni za primjenu kod ljudi, većinom u indikacijama za liječenje tumora, a u raznim fazama razvoja se, iako s manjim udjelom, nalaze razna druga kimerna monoklonska protutijela.

S obzirom da ne izazivaju sva monoklonska protutijela klinički značajne imunosne reakcije, trebalo bi se moći proizvesti protutijela s minimalnim imunogenim potencijalom. Prvi korak je određeni stupanj humanizacije, ali s obzirom da humanizacija nije garancija izostanka imunosnog odgovora usmjerenog na varijabilni dio, trebaju se identificirati i modificirati mogući epitopi varijabilnog dijela monoklonskih protutijela za CD4+ T-limfocite. Danas postoje mnoge metode za određivanje epitopa za CD4+ T-limfocite u aminokiselinskom slijedu proteina. Većina tih metoda su informatičke metode, algoritmi stvoreni na temelju utvrđenih obrazaca vezanja epitopa protutijela na razred II MHC-a. No i ovakve metode imaju tendenciju predvidjeti preveliku količinu epitopa u sekvenci ili ne uspiju točno procijeniti sve epitope (11, 78). Problem je i što uklanjanjem epitopa postoji mogućnost stvaranja novih epitopa, a može doći i do smanjenja afiniteta i specifičnosti monoklonskog protutijela čime izostaje i njegova terapijska korist. Ujedno se uspjeh uklanjanja epitopa mora ocijeniti u kliničkim ispitivanjima jer ne postoji adekvatan sistem *in vitro* koji može zamijeniti ocjenu *in*

*vivo*. Takav problem će postojati dok god ne bude sistema *in vitro* za dobru međusobnu usporedbu modificiranih protutijela u odnosu na ishodišne.

Produkti imunskog sustava imaju veliku raznolikost – svaki pojedinac može stvoriti jako veliki broj različitih protutijela čiji broj se povećava tijekom afinitetne maturacije, te još veći broj receptora T-limfocita (79). Zbog tako velike raznolikosti adaptivni imunski sistem može prepoznati većinu struktura te je gotovo nemoguće ukloniti sve moguće epitope koje prepoznaju T-limfociti. U serumu zdravih ljudi, odnosno onih koji ne boluju od autoimunih bolesti, svaki se dan stvaraju protutijela usmjerena na protutijela koja normalno nastaju u tijelu. Iako postoje mnogi mehanizmi koji sprječavaju imunsku reakciju na vlastita protutijela, i dalje ih je moguće detektirati. Takva protutijela su srodna protutijelima koja nastaju na lijek tj. to su anti-idiotipska protutijela usmjerena na varijabilni dio odgovoran za vezanje. Stoga je za očekivati da će se pojaviti anti-idiotipska protutijela i na humana monoklonska protutijela, pogotovo ako se primjenjuju u većim količinama kroz dulji period i ako protutijelo nosi epitop za CD4+ T-limfocite koji se prikazuje pomoću glavnog kompleksa tkivne podudarnosti razreda II – takav imunski dogovor predstavlja najveći problem jer se ne smanjuje tijekom vremena te utječe na djelotvornost i sigurnost terapije (11).

Od velikog značaja kod procjene imunogenosti je odabir metode za njeno ispitivanje. Kako u pretkliničkim, tako i u kliničkim ispitivanjima ključne su robusne, selektivne, osjetljive i dobro validirane metode, a u ovom trenutku ne postoje standardizirane i validirane metode za ispitivanje imunogenosti monoklonskih protutijela. U dosadašnjim ispitivanjima imunogenosti monoklonskih protutijela korištene su različite metode koje se razlikuju u specifičnosti i osjetljivosti te su zabilježeni vrlo različiti stupnjevi imunogenosti u različitim ispitivanjima istog lijeka. S obzirom da i ista monoklonska protutijela pokazuju različite stupnjeve imunogenosti ovisno o primijenjenoj dozi i vjerojatno stanju bolesnika (14), ispitivanja različitih osjetljivosti pogotovo onemogućavaju usporedbu dobivenih rezultata za

različita monoklonska protutijela. S obzirom da osjetljivost metode nije jedini faktor koji utječe na detekciju protutijela na lijek, već da su bitni faktori i vrijeme uzorkovanja krvi, moguće prisustvo interferirajućih tvari, dostupnost pozitivne kontrole itd., usporedba rezultata imunogenosti između različitih protutijela dobivena u različitim ispitivanjima ne može dati dobre rezultate, a direktna usporedba tj. provođenje takvih ispitivanja na bolesnicima uglavnom nije moguće.

Danas se umjesto metode ELISA sve više koristi metoda SPR koja s većom osjetljivošću detektira vrlo male koncentracije protutijela na lijek i protutijela niskog afiniteta. U jednom ispitivanju panitumumaba su u skupini ispitivanom metodom SPR zabilježena protutijela na lijek kod 4,1% bolesnika, dok su u skupini ispitivanom metodom ELISA zabilježena protutijela kod samo 0,3% bolesnika (83). U skupini ispitivanom SPR-om je većina protutijela bila niskog afiniteta i samo su neka imala neutralizirajuću aktivnost te nije postojala korelacija između stvaranja protutijela na lijek i kliničkih posljedica ili gubitka djelotvornosti lijeka. No visoko osjetljive metode poput ove mogu biti kritične jer u nekim slučajevima i nizak titar neutralizirajućih protutijela može imati klinički značajne posljedice, ali i imunosna reakcija u kojoj se isprva javljaju imunoglobulini M niskog afiniteta može dalje voditi stvaranju snažne i dugotrajne imunosne reakcije uzrokovane imunoglobulinima višeg afiniteta. No s obzirom da SPR metoda u usporedbi s metodom ELISA može biti manje osjetljiva za detektiranje protutijela visokog afiniteta, u idealnim bi se uvjetima za ispitivanje imunogenosti trebale koristiti obje metode i uspoređivati dobiveni rezultati.

Trenutno dostupne *in vitro* i računalne metode za dizajn terapijskih protutijela mogu poslužiti za odabir vodeće molekule, ali nisu dovoljne za predviđanje imunosnog odgovora za koji su ključna rana *in vivo* te potom klinička ispitivanja (25, 81). Iako životinjski modeli mogu donekle pružiti uvid u mogući imunogeni potencijal monoklonskih protutijela, ne mogu pretpostaviti imunogenost u ljudima jer će monoklonska protutijela biti strana njihovom tijelu.

Čak ni primati i transgenične životinje ne daju vjerodostojne rezultate i potrebno je pomno praćenje imunogenosti tijekom kliničkih ispitivanja te praćenje nakon stavljanja lijeka u promet kako bi se ocijenio ljudski imunosni odgovor.

Osim odabira metode, usporedba između različitih monoklonskih protutijela ili različitih vrsta monoklonskih protutijela je otežana jer se radi o usporedbi strukturno različitih monoklonskih protutijela koja mogu biti usmjerena na različite antigene ili epitope unutar antigena, odobrena u različitim indikacijama, primijenjena različitim bolesnicima ili skupinama bolesnika s različitim imunosnim statusom, u različitim dozama pri različitim režimima liječenja sa ili bez istovremeno primijenjenih drugih lijekova itd. Primjerice dva različita humanizirana protutijela, trastuzumab i daklizumab, primijenjena različitim bolesnicima u različitim dozama i s različitim indikacijama, jedno za liječenje tumora, a drugo za odbacivanje presatka, bilježe stupnjeve imunogenosti od 0,1% odnosno 34% (7). Zbog toga direktna usporedba različitih skupina monoklonskih protutijela s određenim udjelom humanih sekvenci može dovesti do krivih zaključaka.

Iako se humanizacija monoklonskih protutijela koja se koriste u terapijske svrhe favorizira jer je humanizacija okvira u kojima leže CDR regije uvelike utjecala na smanjenje imunogenog potencijala, nije nužno da sva monoklonska protutijela za primjenu u ljudi budu humanizirana ili humana uzimajući u obzir cijenu humanizacije. U slučaju kratkoročne primjene, kada se monoklonska protutijela ne koriste u terapijske nego u dijagnostičke svrhe, produljeno vrijeme poluživota može biti i nedostatak. No kada se monoklonsko protutijelo koristi u terapijske svrhe i potrebno je višekratno doziranje, veći je rizik ne odlučiti se na razvoj humaniziranog ili humanog monoklonskog protutijela.

Osim što imunogenost ovisi o karakteristikama monoklonskog protutijela i udjelu humanih sekvenci, ona ovisi i o pojedincu kojemu je lijek primijenjen. Monoklonska protutijela su kod nekih pojedinaca imunogenija nego kod drugih, a za to je vjerojatno odgovorna razlika u



molekulama glavnog kompleksa tkivne podudarnosti među pojedincima. U ljudskoj populaciji je identificirano više od tisuću alela za razred II MHC-a, stoga ovisno o genotipu i sposobnosti specifičnog vezanja proteina, pojedinci se razlikuju u sposobnosti da razviju imunosni odgovor na terapijski protein te će se imunogenost različito manifestirati u populaciji. Na to upućuje i činjenica da, ukoliko postoji poremećaj u imunosnom sustavu, imunosna se reakcija može javiti i na nativni protein.

Bitan faktor kod pojave imunosne reakcije na lijek je sam ustroj imunosnog sustava tj. samo stanje bolesnika. Stoga na imunogenost utječe i indikacija monoklonskog protutijela, odnosno skupina bolesnika kojoj je ono primijenjeno. Kod imunokompromitiranih bolesnika, s primjerice rakom ili pri imunosupresivnoj terapiji, je manja vjerojatnost nastanka protutijela nego kod bolesnika s normalnim imunosnim statusom. Na to upućuje i činjenica da se u liječenju tumora koriste mišje monoklonsko protutijelo ibritumomab tiuksetan i mišji bispecifični tandemski scFv blinatumomab. Iako se mišja monoklonska protutijela generalno smatraju vrlo imunogenima, imunogenost ne predstavlja problem kod bolesnika s tumorom. Štoviše, u kliničkim ispitivanjima s blinatumomabom je manje od 1% bolesnika razvilo protutijela na lijek (91). Također je još nekoliko mišjih monoklonskih protutijela i njihovih inačica u fazama 2/3 ili 3 kliničkih ispitivanja, sva u indikacijama za liječenje tumora, dok je u indikacijama koje ne uključuju tumore od 27 monoklonskih protutijela u istim fazama kliničkih ispitivanja jedno kimerno i ostala su humanizirana i humana. Ujedno, kod tumora se nakon određenog vremena kod gotovo svih bolesnika javlja progresija bolesti i gubitak terapijskog odgovora te je teško procijeniti je li ono posljedica progresije tumora ili stvaranja protutijela na lijek.

Isto je i s kimernim protutijelima; iako u teoriji nose veći imunogeni potencijal od humaniziranih i humanih protutijela, njih devet je trenutno odobreno za primjenu kod ljudi što čini 20% ukupno odobrenih monoklonskih protutijela, a od toga njih pet u indikacijama za

liječenje tumora. No od 39 monoklonskih protutijela i njihovih inačica trenutno u fazama 2/3 ili 3 kliničkih ispitivanja, samo su dva kimerna.

Osim uvođenja humanih sekvenci, postoje i brojni drugi faktori o kojima se mora voditi računa kod proizvodnje monoklonskih protutijela jer uvelike mogu utjecati na imunogenost. Jedan od njih je i odabir ekspresijskog sustava jer se pokazalo da postoje razlike u obrascu glikozilacije među stanicama koje se koriste za ekspresiju monoklonskih protutijela i njihovih inačica. Primjerice, iako je ekspresija u *E. coli* isplativija nego u kulturi stanica sisavaca, izostanak glikozilacije može dovesti do imunogenosti tako dobivenih fragmenata monoklonskih protutijela. Postoje i razlike u obrascu glikozilacije među različitim stanicama sisavaca koje se moraju uzeti u obzir prilikom odabira staničnog sustava za ekspresiju.

Svakako se mora voditi računa i o kakvoći lijeka. Prisutnost agregata jedan je od glavnih čimbenika koji izazivaju imunosnu reakciju, a na smanjenje pojave agregata se može utjecati promjenom strukture terapijskog proteina, ali i promjenom formulacije, primjerice poboljšanjem topivosti. Iz aspekta kakvoće, najbolji način da se spriječi imunogenost je optimizacija proizvodnje, formulacije i metoda pročišćavanja kako bi se stvorio topiv, neagregirajuć, nativni protein bez kontaminirajućih adjuvansa. S obzirom da i promjena u formulaciji može dovesti do pojave imunogenosti, o tome poglavito treba voditi računa kod biosličnih lijekova, ali i kod promjena u proizvodnji. Kada se optimizira proces proizvodnje bioloških lijekova, mora se voditi računa o posljedicama promjena – mogućoj pojavi agregacije, promijenjenoj glikozilaciji ili degradaciji. Iz tih razloga je vrlo bitna optimalna formulacija lijeka jer dobro dizajnirane i robusne formulacije mogu rezultirati boljom stabilnošću prilikom čuvanja lijeka, a na očuvanje kvalitete lijeka utječu i materijali koji se koriste za pakiranje lijeka te uvjeti čuvanja i distribucije lijeka.

Put primjene lijeka je bitan faktor kod pojave imunogenosti. Zabilježen viši stupanj imunogenosti kod lijekova koji se primjenjuju subkutano i intramuskularno u odnosu na one

koji se primjenjuju intravenski je posljedica prisutnosti najmoćnijih stanica koje prezentiraju antigen, tzv. dendritičkih stanica, upravo u koži ili akumulacije lijeka na jednom mjestu i njegove sporije distribucije (13). No ne postoji put pri kojem se neće pojaviti imunosna reakcija na lijek.

Imunogenost je ovisna i o primijenjenoj dozi. Iako se učestalija primjena i više doze mogu povezati sa snažnijim imunosnim odgovorom, također je zabilježeno da je dugotrajno liječenje višim dozama manje imunogeno od povremenog doziranja i manjih doza, no donošenje zaključaka na temelju ovih rezultata je diskutabilno – ovakvi rezultati mogli bi biti posljedica činjenice da je kod većih doza i viša koncentracija ispitivanog lijeka u plazmi ili je manja koncentracija protutijela na lijek zbog stvaranja imunokompleksa te se na temelju ovakvih rezultata ne može donijeti zaključak da su više doze lijeka manje imunogene bez daljnjih ispitivanja. S druge strane, monoklonska protutijela koja se doziraju povremeno će s većom vjerojatnošću izazvati imunosnu reakciju nego ona koja se doziraju ponavljano u pravilnim vremenskim razmacima. Veća vjerojatnost imunosne reakcije kod bolesnika koji se liječe povremeno nego kod onih koji se liječe dugotrajno je posljedica toga da je prijašnje izlaganje terapeutskom proteinu dovelo do prvih faza imunosnog odgovora – odgovor sličan onome kod cijepljenja. Pokušaj stvaranja tolerancije kod bolesnika tolerogenom inačicom protutijela kako bi izostao imunosni odgovor na primjenu monoklonskog protutijela u terapijske svrhe se čini kao učinkovit pristup, ali nedostaci su što postoji potreba za proizvodnjom dvije inačice, a to poskupljuje liječenje. S obzirom da ideja još nije provedena u djelo, nema kliničkih podataka o uspješnosti ovog pristupa.

Imunogenost ne izostaje niti kod inačica monoklonskih protutijela – fuzijskih proteina, diatijela, konjugiranih monoklonskih protutijela itd. Za varijabilne regije inačica se mogu primijeniti ista pravila kao i kod cjelovitih monoklonskih protutijela, a mjesto fuzije dodatno može sadržavati nove epitope koje imunosni sustav može prepoznati kao strane (13, 14). Kod

razvoja monoklonskih protutijela i njihovih inačica bi se trebalo voditi saznanjima o već postojećim monoklonskim protutijelima, ali s obzirom na slabije kliničko iskustvo s monoklonskim protutijelima nove generacije i njihovim inačicama, postoji veća percepcija rizika iz aspekta imunogenosti te zahtijevaju pomnije praćenje (81). No prilikom razvoja inačica monoklonskih protutijela se također došlo do vrlo korisnih saznanja. Primjerice kod minitijela, scFv-CH3 inačice cetuksimaba, se pokazalo da priroda peptidne poveznice određena duljinom i redosljedom aminokiselina utječe na prirodu minitijela, a time vjerojatno i na imunogeni potencijal, kao i orijentacija varijabilnih regija lakog i teškog lanca.

Mnoge su inačice monoklonskih protutijela nove generacije manje od samih monoklonskih protutijela što im olakšava proizvodnju i penetraciju u tkiva. S druge strane im je vrijeme poluživota kraće i nemaju efektorske funkcije posredovane konstantnim dijelom protutijela te će se njihova terapijska uspješnost tek pokazati. No s obzirom na njihov veliki broj u razvoju, čini se da prednosti ovih inačica nadilaze nedostatke. S druge strane, i dalje postoji velika usmjerenost na proizvodnju cjelovitih, uglavnom humaniziranih i humanih monoklonskih protutijela što upućuje na njihove i dalje velike terapijske potencijale (15). U praksi će se tek pokazati jesu li monoklonska protutijela nove generacije dobivena novim ili modificiranim metodama i različite inačice uspješnije u liječenju različitih bolesti i imaju li smanjenu imunogenost. Bez obzira na ovaj ishod, razvoj metoda za njihovo dobivanje ubrzava i pospješuje stvaranje novih monoklonskih protutijela i inačica s terapijskim potencijalom koja eventualno mogu doprijeti do skrivenih ili do sada nedostupnih epitopa, a smanjenjem troškova proizvodnje se povećava dostupnost terapije.

Iako su korištene metode ispitivanja imunogenosti različite i nestandardizirane, one su sve osjetljivije i preciznije, zahtjevi sve stroži, a klinički podaci o imunogenosti sve su brojniji. Imunogenost je u praksi učestala pojava, a kliničke posljedice su razne – od blažih reakcija preosjetljivosti na mjestu primjene do smanjenja, ili čak potpunog gubitka, terapijskog

odgovora. Najčešća posljedica imunogenosti je smanjenje djelotvornosti lijeka koja se ponekad može prebroditi povećanjem doze. Ponekad stvaranje protutijela na monoklonsko protutijelo uzrokuje pojavu nuspojava zbog kojih je nužan prekid liječenja određenim protutijelom. Kada se pojavi imunogenost na određeni lijek, postoji mogućnost prebacivanja na drugi lijek koji ima isti ili sličan mehanizam djelovanja, ali i na one koji za metu imaju druge molekule. Na imunogenost utječe i konkomitantna terapija, a istodobno primijenjen lijek može smanjiti imunosni odgovor te ga je u tom slučaju poželjno dodati u terapiju.

Kada se govori o imunogenosti, u obzir se moraju uzeti svi navedeni faktori. Hoće li stvaranje protutijela na monoklonsko protutijelo imati klinički značajne posljedice ovisi o mjestu vezanja protutijela na monoklonsko protutijelo (neutralizirajuća u odnosu na vezujuća protutijela), afinitetu vezanja i titru stvorenih protutijela (81). Bitno je napomenuti da je imunosna reakcija na biološki lijek postupan proces i mijenja se tijekom vremena; protutijela na lijek se mogu prolazno pojaviti i nestati s nastavkom liječenja, ali se imunosni odgovor može i održati ili pojačavati. Stoga je teško donositi zaključke bez pomnog kliničkog praćenja, a zaključci o pojedincu se ne mogu ekstrapolirati na populaciju. Iako se veliki napori ulažu u predviđanje i smanjenje imunogenosti, različite stope imunosnog odgovora i među novoodobrenim protutijelima za terapijsku primjenu pokazuju da ne postoji univerzalna formula.

## 5. Zaključci

Uvođenjem humanih sekvenci u monoklonska protutijela smanjuje se njihova imunogenost. Mišja monoklonska protutijela imaju najveći imunogeni potencijal te je njihova upotreba ograničena. Kimerizacijom se smanjila imunogenost monoklonskih protutijela, a daljnje smanjenje se postiglo humanizacijom.

Potpuna humanizacija ne dovodi do izostanka imunogenosti, a stopa imunosne reakcije kod primjene humanih protutijela se ne razlikuje značajno od humaniziranih. Imunosni odgovor je usmjeren na dijelove monoklonskih protutijela životinjskog porijekla, no imunogenost humaniziranih i humanih protutijela leži u regijama koje određuju komplementarnost, dok postoji tolerancija na humani okvir varijabilnog dijela monoklonskih protutijela u kojima leže CDR regije. Imunogeni potencijal se može ukloniti modifikacijom CDR regija, ali time se smanjuju afinitet i specifičnost vezanja monoklonskog protutijela te se mogu stvoriti novi epitopi.

Ne postoje *in vitro* ispitivanja i ispitivanja na životinjama koja mogu adekvatno ocijeniti imunogenost te su i dalje relevantni jedino podaci iz kliničkih ispitivanja i praćenja bolesnika. Postojeći podaci o imunogenosti dobiveni su različitim metodama različite osjetljivosti te je otežana usporedba podataka za različita terapijska protutijela.

Na imunogenost mogu utjecati brojni drugi čimbenici osim stupnja humanizacije, poput obrasca glikozilacije i prisutnosti agregata, koji se moraju istražiti, predvidjeti i minimizirati prilikom razvoja monoklonskih protutijela.

Imunogenost se ne može apsolutno izbjeći, može se samo svesti na minimum. Pojava imunosnog odgovora uvelike ovisi o pojedincu kome je lijek primijenjen te ne postoji univerzalna formula već terapiju treba individualizirati i racionalizirati. Kod izostanka

imunogenosti se ne može se uvijek utvrditi uzrok – to može biti odlika ciljanog antigena, stanja bolesnika, doze ili jedinstveno svojstvo monoklonskog protutijela.

Monoklonska protutijela danas imaju široku primjenu, a razvojem monoklonskih protutijela nove generacije i raznih inačica će se njihova primjena širiti. Stoga se imunogenost mora dobro poznavati, mora se moći adekvatno ispitati te ne smije ograničiti njihovu primjenu.

## 6. Literatura

1. Brüggemann M, Osborn M, Ma B, *et al.* Human antibody production in transgenic animals. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2015;63:101–108.
2. Taylor and Francis Group. Journals: Therapeutic monoclonal antibodies approved or in review in the European Union or the United States. *Available at: <http://www.tandf.co.uk/journals/pdf/announcements/kmab-antibodies.pdf>. Accessed February 29, 2016.*
3. European Medicines Agency: Human medicines. *Available at: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/epar\\_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/epar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124). Accessed February 29, 2016.*
4. FDA U.S. Food and Drug Administration: FDA approved drug products. *Available at: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>. Accessed February 29, 2016.*
5. Reichert J. Antibodies to watch in 2015. *mAbs* 2015;7:1-8.
6. Liu J. The history of monoclonal antibody development – progress, remaining challenges and future innovations. *Annals of Medicine and Surgery* 2014;3:113-116.
7. Davis J, Deng R, Boswell C. Monoclonal antibodies: from structure to therapeutic application. *U: Crommelin D, Sindelar R, Meibohm B (ur.) Pharmaceutical Biotechnology*. New York- Springer Science+Business Media, 2013;143-178.
8. Buss N, Henderson S, McFarlane M, Shenton J, de Haan L. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Current Opinion in Pharmacology* 2012;12:615–622.
9. Köhler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495-497.
10. Hwang W, Foote J. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* 2005;36:3–10.
11. Harding F, Stickler M, Razo J, DuBridg R. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. *mAbs* 2010;2:256-265.
12. Deehan M, Garcês S, Kramer D, *et al.* Managing unwanted immunogenicity of biologicals. *Autoimmunity Reviews* 2015;14:569–574.
13. Jahn E, Schneider C. How to systematically evaluate immunogenicity of therapeutic proteins – regulatory considerations. *New Biotechnology* 2009;25:280-286.
14. Wolbink G, Aardenb L, Dijkmans BAC. Dealing with immunogenicity of biologicals: assessment and clinical relevance. *Current Opinion in Rheumatology* 2009; 21:211–215.
15. Elvin J, Coustonb R, van der Walleb C. Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *International Journal of Pharmaceutics* 2013;440:83–98.



16. Flower D. Advances in predicting and manipulating the immunogenicity of biotherapeutics and vaccines. *Biodrugs* 2009;23: 231-240.
17. Schroeder H, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010;125:S348-S348.
18. Lobo E, Hansen R, Balthasar J. Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004;93:2645–2668.
19. Casadevall A. Passive antibody administration (immediate immunity) as a specific defense against biological weapons. *Emerging Infectious Diseases* 2002;8:833-841.
20. Ribatti D. From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application: an historical reappraisal. *Immunology Letters* 2014;161:96–99.
21. Bond C, Wiesmann C, Marsters J, Sidhu S. A Structure-Based Database of Antibody Variable Domain Diversity. *Journal of Molecular Biology* 2005;348:699–709.
22. Lee J. ADME of monoclonal antibody biotherapeutics: knowledge gaps and emerging tools. *Bioanalysis* 2013;16:2003–2014.
23. Chames P, Regenmortel M, Weiss E, Baty D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology* 2009;157:220–233.
24. Jarboe J, Gupta A, Saif W. Therapeutic human monoclonal antibodies against cancer. *U: Steinitz M (ur.) Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols. Pharmaceutical Biotechnology. Springer Science+Business Media* 2014;61-77.
25. Perez H, Cardarelli P, Deshpande S, *et al.* Antibody–drug conjugates: current status and future directions. *Drug Discovery Today* 2014;19:869-881.
26. Prabhu S, Boswell C, Leipold D, *et al.* Antibody delivery of drugs and radionuclides: factors influencing clinical pharmacology. *Therapeutic delivery* 2011;2(6):769-91.
27. Chintalacheruvu K, Morrison S. Chimeric antibodies: production and applications. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 1995;8:73–82.
28. Lacy M, Gunnell M, Laurenzana E, Owens M. Engineering and characterization of a mouse/human chimeric anti-phencyclidine monoclonal antibody. *International Immunopharmacology* 2008;8:1–11.
29. Teillaud J. From whole monoclonal antibodies to single domain antibodies: think small. *U: Saerens D, Muyldermans S (ur.) Single Domain Antibodies: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Springer Science + Business Media, LLC* 2012;3-13.
30. Bennett M, Karki S, Moore G, *et al.* Engineering fully human monoclonal antibodies from murine variable regions. *Journal of Molecular Biology* 2010;396:1474–1490.
31. Kashmiri S, Pascalis R, Gonzales N, Schlom J. SDR grafting — a new approach to antibody humanization. *Methods* 2005;36:25–34.
32. Choi Y, Hua C, Sentman C, Ackerman M, Bailey-Kellogg C. Antibody humanization by structure-based computational protein design. *mAbs* 2015;7:1045-1057.

33. Hou S, Li B, Wang L, *et al.* Humanization of an anti-CD34 monoclonal antibody by complementarity-determining region grafting based on computer-assisted molecular modelling. *The Journal of Biochemistry* 2008;144:115–120.
34. Kwakkenbos M, Bakker A, Helden P, *et al.* Genetic manipulation of B cells for the isolation of rare therapeutic antibodies from the human repertoire. *Methods* 2014;65:38–43.
35. Lonberg N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. *Current Opinion in Immunology* 2008;20:450–459.
36. Nixon A, Sexton D, Ladner R. Drugs derived from phage display. *mAbs* 2014;6:73–85.
37. Diebold P, Keller A, Haase S. Generation of “Lymph Node Derived Antibody Libraries” (LYNDAL) for selecting fully human antibody fragments with therapeutic potential. *mAbs* 2014;6:130–142.
38. Breitling F, Dübel S, Seehaus T, Klewinghaus I, Little M. A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 1991;104:147–153.
39. McCafferty J, Griffiths A, Winter G, Chiswell D. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990;348:552–554.
40. Andersen D, Reilly D. Production technologies for monoclonal antibodies and their fragments. *Current Opinion in Biotechnology* 2004;15:456–462.
41. Mazor Y, Van Blarcom T, Mabry R, Iverson BL, Georgiou G. Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 2007;25:563–565.
42. Little M, Welschof M, Braunagel M, Hermes I, Christ C, Keller A. Generation of a large complex antibody library from multiple donors. *Journal of Immunological Methods* 1999;231:3-9.
43. De Haard H, Van Neer N, Reurs A, *et al.* A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *The Journal of Biological Chemistry* 1999;274:18218-18230.
44. Azzazy H, Highsmith E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry* 2002;35:425–445.
45. Akamatsu Y, Cole M, Tso J, Tsurushita N. Construction of a human Ig combinatorial library from genomic V segments and synthetic CDR3 fragments. *Journal of Immunology* 1993;151:4651-4659.
46. Fellouse F, Esaki K, Birtalan S, *et al.* High-throughput Generation of Synthetic Antibodies from Highly Functional Minimalist Phage-displayed Libraries. *Journal of Molecular Biology* 2007;373:924–940.
47. Fisher R, Ultsch M, Lingel A, *et al.* Structure of the complex between HER2 and an antibody paratope formed by side chains from tryptophan and serine. *Journal of Molecular Biology* 2010;402:217–229.

48. Adams J, Nelson B, Sidhuhuman S. Recombinant genetic libraries and human monoclonal antibodies. *U: Steinitz M. (ur.) Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols. Pharmaceutical Biotechnology. Springer Science+Business Media 2014;149-170.*
49. Chang-Fei Q, Guan-Cheng L. Mammalian cell display technology coupling with AID induced SHM in vitro: an ideal approach to the production of therapeutic antibodies. *International Immunopharmacology 2014;23:380–386.*
50. Bradbury A, Marks J. Antibodies from phage antibody libraries. *Journal of Immunological Methods 2004;290:29– 49.*
51. Dübel S. Recombinant therapeutic antibodies. *Applied Microbiology and Biotechnology 2007;74:723–729.*
52. Magadán Mompó S, González-Fernández A. Antigen-specific human monoclonal antibodies from transgenic mice. *U: Steinitz M (ur.) Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols. Pharmaceutical Biotechnology. Springer Science+Business Media 2014;245-276.*
53. Birch J, Racher A. Antibody production. *Advanced Drug Delivery Reviews 2006;58:671–685.*
54. Ducancel F, Muller B. Molecular engineering of antibodies for therapeutic and diagnostic purposes. *mAbs 2012;4:445-57.*
55. Chadd H, Chamow S. Therapeutic antibody expression technology. *Current Opinion in Biotechnology 2001;12:188–194.*
56. Singh S. Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences 2011;100:354–387.*
57. Quagliaroli D. Do YB2/0 cells produce alien sugars? *Biochemistry 2013;78:1371-1373.*
58. Lonberg N. Human antibodies from transgenic animals. *Nature Biotechnology 2005;23:1117-1125.*
59. Jakobovits A. Production of fully human antibodies by transgenic mice. *Current Opinion in Biotechnology 1995;6:561-566.*
60. Storb U. Transgenic mice with immunoglobulin genes. *Annual Review of Immunology 1987;51:151-174.*
61. Bruggemann M, Taussig M. Production of human antibody repertoires in transgenic mice. *Current Opinion in Biotechnology 1997;8:455-458.*
62. Nicholson I, Zou X, Popov A, Cook G, Corps E, Humphries S *et al.* Antibody repertoires of four- and five-feature translocus mice carrying human immunoglobulin heavy chain and kappa and lambda light chain yeast artificial chromosomes. *Journal of Immunology 1999; 163:6898-906.*
63. Chari R. Targeted delivery of chemotherapeutics: tumor-activated prodrug therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews 1998;31:89–104.*

64. Gattenlohner S, Jorißen H, Huhn M, *et al.* A human recombinant autoantibody based immunotoxin specific for the fetal acetylcholine receptor inhibits rhabdomyosarcoma growth *in vitro* and in a murine transplantation model. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010;1-11.
65. European Medicines Agency (EMA): Removab Product information. Available at: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000972/human\\_med\\_001024.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000972/human_med_001024.jsp&mid=WC0b01ac058001d124). Accessed June 27, 2015.
66. Muyldermans S, Baral T, Cortez Retamozzo V, *et al.* Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009;128:178–183.
67. Shirai H, Prades C, Vita R, *et al.* Antibody informatics for drug discovery. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014;1844:2002–2015.
68. Young Pil K, Dongsun P, Jae Jin K, *et al.* Effective therapeutic approach for head and neck cancer by an engineered minibody targeting the EGFR receptor. *PLoS ONE* 2014;9:1-16.
69. Kaur J, Badyal D, Khosla P. Monoclonal antibodies: pharmacological relevance. *Indian Journal of Pharmacology* 2007;39:5-14.
70. European Medicines Agency (EMA): Zevalin Product information. Available at: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000547/human\\_med\\_001178.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000547/human_med_001178.jsp&mid=WC0b01ac058001d124). Accessed June 27, 2015.
71. European Medicines Agency (EMA): MabThera Product information. Available at: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000165/human\\_med\\_000897.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000165/human_med_000897.jsp&mid=WC0b01ac058001d124). Accessed June 27, 2015.
72. European Medicines Agency (EMA): Synagis Product information. Available at: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000257/human\\_med\\_001070.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000257/human_med_001070.jsp&mid=WC0b01ac058001d124). Accessed March 2, 2016.
73. European Medicines Agency (EMA): Herceptin Product information. Available at: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000278/human\\_med\\_000818.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000278/human_med_000818.jsp&mid=WC0b01ac058001d124). Accessed June 27, 2015.
74. European Medicines Agency (EMA): Kadcylya Product information. Available at: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002389/human\\_med\\_001712.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002389/human_med_001712.jsp&mid=WC0b01ac058001d124). Accessed June 27, 2015.
75. European Medicines Agency (EMA): Humira Product information. Available at: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000481/human\\_med\\_000822.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000481/human_med_000822.jsp&mid=WC0b01ac058001d124). Accessed June 27, 2015.
76. European Medicines Agency (EMA): Adcetris Product information. Available at: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002455/human\\_med\\_001588.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002455/human_med_001588.jsp&mid=WC0b01ac058001d124). Accessed June 27, 2015.
77. Reichert J. Antibodies to watch in 2014. *mAbs* 2014;6(1):5-14.

78. Schellekens H, Jiskoot W. Immunogenicity of therapeutic proteins. *U: Crommelin D, Sindelar R, Meibohm B (ur.) Pharmaceutical Biotechnology. New York- Springer Science+Business Media, 2013;133-141.*
79. Chirino A, Ary M, Marshall S. Minimizing the immunogenicity of protein therapeutics. *Drug Discovery Today 2004;9:82-90.*
80. Stavnezer J, Amemiya C. Evolution of isotype switching. *Seminars in Immunology 2004;16:257–275.*
81. European Medicines Agency (EMA): Guideline on immunogenicity assessment of monoclonal antibodies intended for *in vivo* clinical use. *Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2012/06/WC500128688.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/06/WC500128688.pdf). Accessed May 20, 2015.*
82. Vincent F, Morand E, Murphy K, Mackay F, Mariette X, Marcelli C. Antidrug antibodies (ADAb) to tumour necrosis factor (TNF)-specific neutralising agents in chronic inflammatory diseases: a real issue, a clinical perspective. *Annals of the Rheumatic Diseases 2013;72:165–178.*
83. Nechansky A. HAHA – nothing to laugh about. Measuring the immunogenicity (human anti-human antibody response) induced by humanized monoclonal antibodies applying ELISA and SPR technology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2010;51:252–254.*
84. Lawrence N, Oger J, Aziz T, Palace J, Vincent A. A sensitive radioimmunoprecipitation assay for assessing the clinical relevance of antibodies to IFN- $\beta$ . *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry 2003;74:1236–1239.*
85. Sikarwar B, Sharma P, Srivastava A, *et al.* Surface plasmon resonance characterization of monoclonal and polyclonal antibodies of malaria for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics 2014;60:201–209.*
86. Patten PA, Schellekens H. The immunogenicity of biopharmaceuticals. Lessons learned and consequences for protein drug development. *Developmental Biology 2003;112:81–97.*
87. Shukla A, Hubbard B, Tressel T, Guhanb S, Low D. Downstream processing of monoclonal antibodies — application of platform approaches. *Journal of Chromatography B 2007;848:28–39.*
88. Singh S, Rathore N, McAuley A, Rathore A. Best practices for formulation and manufacturing of biotech drug products. *BioPharm International 2009;22:32–48.*
89. Normal D, Chatenoud L, Cohen D, Goldman M, Shield C. Consensus statement regarding OKT3-induced cytokine-release syndrome and human antimouse antibodies. *Transplantation Proceedings 1993;25:89-92.*
90. Gilliland L, Walsh L, Frewin M, *et al.* Elimination of the immunogenicity of therapeutic antibodies. *Journal of Immunology 1999;162:3663-71.*

91. U.S. Food and Drug Administration (FDA): Blincyto Prescribing Information. *Available at:*  
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.DrugDetails>. Accessed June 28, 2015.