

Razvoj i terapijski potencijal bispecifičnih protutijela

Širac, Tea

Professional thesis / Završni specijalistički

2023

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:163:522101>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-08**



Repository / Repozitorij:

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



Razvoj i terapijski potencijal bispecifičnih protutijela

Širac, Tea

Professional thesis / Završni specijalistički

2023

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:163:522101>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-16**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Tea Širac

Razvoj i terapijski potencijal bispecifičnih
protutijela

Specijalistički rad

Zagreb, 2023.

PSS studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček

Specijalistički rad obranjen je dana 04.04.2023. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Toma Keser
2. izv. prof. dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček
3. doc. dr. sc. Nikica Mirošević Skvrce

Rad ima 101 list.

PREDGOVOR

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

Sažetak

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju

Razvoj i terapijski potencijal bispecifičnih protutijela

Cilj istraživanja

Cilj ovog specijalističkog rada je opisati svojstva bispecifičnih protutijela odobrenih za kliničku uporabu i onih u kliničkim istraživanjima, analizirati metode njihove proizvodnje te dati uvid u terapijske mogućnosti ovih protutijela.

Materijali i metode

Rad daje pregled razvoja bispecifičnih protutijela te njihove terapijske primjene. Pregledom znanstvene literature detaljnije su opisane metode za ispravno povezivanje lakih i teških lanaca. Opisana su do sad odobrena bispecifična protutijela te njihova terapijska primjena. Navedena su i protutijela koja se nalaze u različitim fazama razvoja.

Rezultati

Bispecifična protutijela kombiniraju dva ili više elemenata, koji prepoznaju antigene, u jednu cjelinu sa sposobnošću vezanja na dva ili više ciljeva. Djelovanjem na više meta istovremeno povećava se učinkovitost terapije te smanjuje potreba za učestalom primjenom lijeka. Kako bi se povezali različiti teški i laki lanci u jednu molekulu, razvijene su nove metode. Neke od tih metoda su kvadroma tehnologija, metoda "dugme u rupu", zajednički laki lanac, CrossMAB tehnologija, SEED, WuxyBody i dr. Zahvaljujući ovim metodama danas je za kliničku primjenu odobreno sedam bispecifičnih protutijela, a osim njih u pretkliničkim ispitivanjima nalazi se više od 180 bispecifičnih protutijela, dok ih je u različitim fazama kliničkih ispitivanja više od 50.

Zaključak

Razvojem biotehnologije i genetičkog inženjerstva otkrivene su nove metode ispravnog povezivanja lakih i teških lanaca koje su omogućile razvoj funkcionalnih bispecifičnih protutijela koja se koriste u kliničkoj praksi. Bispecifična protutijela pokazala su znatan napredak u učinkovitosti u odnosu na dosadašnju terapiju. Napredak je vidljiv u ishodima liječenja, vremenu potrebnom za postizanje terapijskog odgovora te u vremenu do pogoršanja bolesti. Osim boljih rezultata liječenja, bispecifična protutijela su se pokazala i kao isplativija nego dosadašnja terapija.

Summary

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Department of Biochemistry and Molecular Biology

The Development and Therapeutic Potential of Bispecific Antibodies

Objective

The aim of this expert thesis is to describe the properties of bispecific antibodies approved for clinical use and those in clinical trials, to analyse the methods of their production and to provide insight into the therapeutic possibilities of such antibodies.

Materials and methods

The thesis provides an overview of the development of bispecific antibodies and their therapeutic applications. The review of the scientific literature describes in more detail the methods for the correct linking of light and heavy chains. The thesis describes the approved bispecific antibodies and their therapeutic use, as well as those that are in different stages of development.

Results

Bispecific antibodies combine two or more antigen-recognizing elements into a single molecule with the ability to link to two or more targets. By acting on multiple targets simultaneously, the effectiveness of the therapy increases and the need for frequent drug administration is reduced. In order to link different heavy and light chains into one molecule, new methods have been developed. Some of these methods are quadroma technology, buttonhole technique, common light chain, CrossMAb technology, SEED, WuxyBody, etc. Thanks to these methods, today there are seven bispecific antibodies approved for clinical use; in addition to these, there are more than 180 bispecific antibodies approved in preclinical trials, as well as more than 50 in different stages of clinical trials.

Conclusion

The development of biotechnology and genetic engineering has facilitated the discovery of new methods for correct linking of light and heavy chains that have enabled the development of functional bispecific antibodies used in clinical practice. Bispecific antibodies have shown significant improvement in efficacy compared to previous therapy. Progress is evident in treatment outcomes, in the time it takes to achieve a therapeutic response, and in the time to disease worsening. In addition to better treatment results, bispecific antibodies have also been shown to be more cost-effective than the previous therapy.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Protutijela.....	2
1.1.1. Mehanizam djelovanja protutijela	4
1.2. Monoklonska protutijela.....	6
1.3. Bispecifična protutijela.....	8
1.3.1. Povijesni pregled razvoja bispecifičnih protutijela.....	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	12
3. MATERIJAL I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI.....	14
3.1. Bispecifična protutijela koja nisu slična imunoglobulinu G.....	15
3.1.1. Bispecifični usmjerivači T-stanica (<i>engl.</i> Bispecific T-cell Engager, <i>BiTE</i> [®]).....	18
3.1.2. Bispecifična protutijela dvostrukog afiniteta (<i>engl.</i> Dual Affinity Re-Targeting antibodies, DART).....	19
3.1.3. Usporedba <i>BiTE</i> [®] i DART.....	20
3.1.4. Tandemska dijatijela (<i>engl.</i> tandem diabodies, TandAbs).....	20
3.2. Bispecifična protutijela slična imunoglobulinu G	22
3.2.1. Ekspresija i proizvodnja bispecifičnih protutijela sličnih imunoglobulinu G.....	22
3.2.2. Kvadroma tehnologija	24
3.2.3. Metoda "dugme u rupu" (<i>engl.</i> "knobs into holes").....	25
3.2.4. Alternativne metode povezivanja teških lanca	26
3.2.5. Metode za ispravno povezivanje lakog lanca	28
3.2.6. Metoda ko-kulture	29
3.2.7. CrossMAb.....	30
3.2.8. WuxiBody.....	31
3.3. Mehanizam djelovanja bispecifičnih protutijela.....	32
3.4. Terapijska primjena bispecifičnih protutijela	34
3.4.1. Blinatumomab.....	34
3.4.2. Emicizumab	39

3.4.3. Catumaksomab	45
3.4.4. Amivantamab.....	47
3.4.5. Faricimab	49
3.4.6. Tebentafusp.....	52
3.4.7. Mosunetuzumab.....	53
3.4.8. Teklistamab.....	54
3.5. Bispecifična protutijela u fazi razvoja	57
3.6. Bispecifična protutijela u terapiji infekcije HIV-om	63
3.7. Pokušaji razvoja bispecifičnog protutijela za terapiju Alzheimerove bolesti	65
4. RASPRAVA	68
5. ZAKLJUČAK.....	76
6. LITERATURA	78
7. ŽIVOTOPIS.....	91

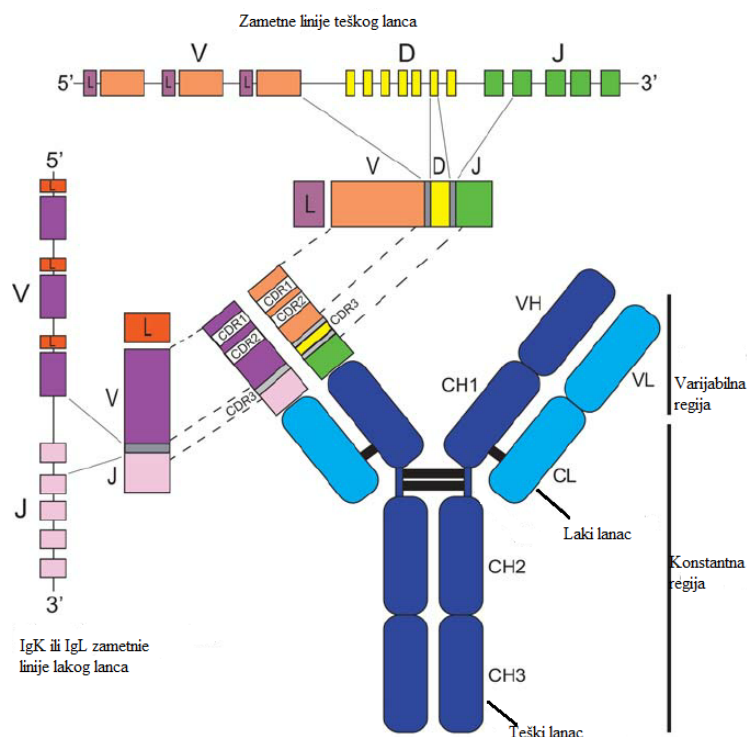
1. UVOD

1.1. Protutijela

Plazma stanice sintetiziraju protutijela i izlučuju ih u izvanstaničnu tekućinu. Protutijela se zatim vežu na antigen tvoreći imunokompleks koji ne može izravno uništiti antigen. Protutijela služe kao biljeg za raspoznavanje cilja drugim obrambenim mehanizmima (6). Dijele se na monoklonska i poliklonska protutijela. Monoklonska protutijela nastaju iz pojedinačnog klona B-limfocita, imaju identične paratope koji se vežu za isti epitop određenog antigena. Za razliku od njih poliklonska protutijela se vežu na različite epitope pojedinog antigena ili na različite antigene koji su bili prisutni u imunizirajućem agensu, a izlučuju ih B- limfociti različitih staničnih linija (108,98).

Protutijela su glikoproteini građeni od dva istovrsna laka i dva istovrsna teška lanca međusobno povezana disulfidnim vezama koje su važne za stabilizaciju i postizanje ispravne konformacije. Svako protutijelo ima NH₂- kraj varijabilne regije i COOH- kraj konstantne regije. Iako je osnova svih protutijela ista, variranjem primarnog slijeda aminokiselina dobiva se golem broj različitih konfiguracija. Elektroforezom ljudskog seruma otkriveno je pet vrsta imunoglobulina IgG, IgM, IgE, IgA i IgD, a daljnjim ispitivanjem utvrđeno je pet vrsta teških lanaca (α , γ , δ , μ i ϵ) molekulske mase od 50 do 77 kDa. Oko 110 aminokiselina koje počinju na amino-kraju teškog lanca čine varijabilnu regiju teškog lanca (*engl.* variable domain of a heavy chain, VH). Ona zajedno s varijabilnom regijom lakog lanca (*engl.* variable domain of a light chain, VL) čine vezno mjesto za antigen. Ostatak lanca manje je varijabilan i naziva se konstantna regija (*engl.* constant domain of a heavy chain, CH). Teški lanci svih imunoglobulina sadrže jednu varijabilnu regiju i tri (IgG, IgA, IgD), odnosno četiri konstantne regije (IgM, IgE) koje se označavaju CH1, CH2, CH3, CH4 (6,89). Laki lanac se sastoji od 220 aminokiselina. Kao i kod teškog lanca, 110 aminokiselina koje počinju od amino-kraja čine varijabilnu regiju. Preostalih 110 aminokiselina čini konstantnu regiju lakog lanca (*engl.* constant domain of a light chain, CL) te se na temelju tog slijeda laki lanci dijele na κ i λ lanac. Pojedino protutijelo ima dva istovrsna laka lanca, nije moguće da ima i κ i λ lanac. Omjer tih lanaca u ljudskom serumu je $2/3 \kappa : 1/3 \lambda$. Hipervarijabilne regije (*engl.* Complementarity Determining Region, CDR) kratki su odsječci varijabilne regije koji čine vezno mjesto za antigen (paratop). Tri se hipervarijabilne regije nalaze u varijabilnoj regiji lakog lanca i tri u varijabilnoj regiji teškog lanca. CDR3 regija nalazi se u središnjem dijelu paratopa i najodgovornija je za specifičnost (6,108). Ispitivanjem genske pozadine imunoglobulina uočeno je da više gena kodira za jedan polipeptidni lanac. Imunoglobulinski

geni smješteni su na trima kromosomima. Na kromosomu 14 je lokus koji sadrži gene za imunoglobulinski teški lanac, a na kromosomima 2 i 22 nalaze se lokusi za κ odnosno λ laki lanac. Ovi se geni, kao i mnogi drugi strukturni geni, sastoje od egzona i introna. Za varijabilnu regiju lakog lanca u genomu se nalazi jedan varijabilni (*engl.* variable, V_L) i jedan vezni gen (*engl.* joining, J_L), dok se za teški lanac između gena V_H i J_H nalazi i kod za gen za različitost (*engl.* diverse D_H). Ispred svakog varijabilnog dijela nalazi se vodeći niz koji je važan za unutarstanično sklapanje. Za razliku od varijabilne regije, konstantna regija obaju lanaca kodirana je po jednim genom za svaku domenu, a teškom se lancu pridružuje još i gen za zglobnu regiju. Tijekom diferencijacije limfocita B prvo nastaje teški lanac povezivanjem jednog D_H i jednog J_H gena kojima se zatim priključuje i gen V_H . Laki lanac nastaje povezivanjem J_L i V_L , zatim se ovako stvorene kombinacije povezuju na gen C za laki odnosno teški lanac i nastaje imunoglobulin. Osim proteinskog dijela protutijela sadrže i oligosaharide koji su uglavnom vezani za konstantnu regiju teškog lanca, sekretijsku komponentnu i lanac J (slika 1). Oligosaharidi imaju određenu ulogu u sekreciji protutijela iz plazma stanica te u vezanju za površinu različitih stanica (npr. vezanje IgE za mastocite). Utječu i na poluvijek imunoglobulinskih molekula u plazmi. (6,98,108).



Slika 1. Struktura protutijela (preuzeto i prilagođeno iz 13)

Svako protutijelo možemo podijeliti u dva funkcionalna dijela. Dio molekule kojim se protutijelo veže na antigen naziva se Fab fragmentom (*engl.* antigen binding fragment), a drugi dio, putem kojeg stupa u interakciju s ostalim elementima imunskog sustava (komponentama komplementa, fagocitima), naziva se Fc-fragmentom (*engl.* crystallizable fragment). Takvom interakcijom protutijela sudjeluju u neutralizaciji i uništavanju antigena odnosno stanica koje nose antigen.

Otkrićem strukture protutijela i razvojem hibridoma tehnologije i tehnologije genetičkog i proteinskog inženjerstva došlo je do razvoja bioloških lijekova, mahom rekombinantnih proteina, kao što su monoklonska protutijela, bispecifična protutijela, konjugati lijek-protutijelo, radioaktivno obilježeni konjugati protutijela, Fab i Fc fuzijski protein (6).

1.1.1. Mehanizam djelovanja protutijela

Visoka specifičnost protutijela te različiti mehanizmi djelovanja omogućuju dobru terapiju raznih bolesti. Mehanizmi djelovanja protutijela su neutralizacija, citotoksičnost ovisna o protutijelu (*engl.* antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), citotoksičnost ovisna o komplementu (*engl.* complement-dependent cytotoxicity, CDC), stanična fagocitoza ovisna o protutijelu (*engl.* antibody dependent cellular phagocytosis, ADCP). Osim navedenih mehanizama, protutijela mogu biti i prijenosnici lijeka u kemoterapiji i radioterapiji (slika 2).

Neutralizacijom protutijela blokiraju patofiziološke učinke ciljnih molekula. Protutijelo se veže za ligand ili receptor na površini stanice te blokiraju ciljni signalni put. Blokadom signalnog puta može doći do gubitka stanične aktivnosti, inhibicije proliferacije stanice te do aktivacije pro-apoptoznih mehanizama (120).

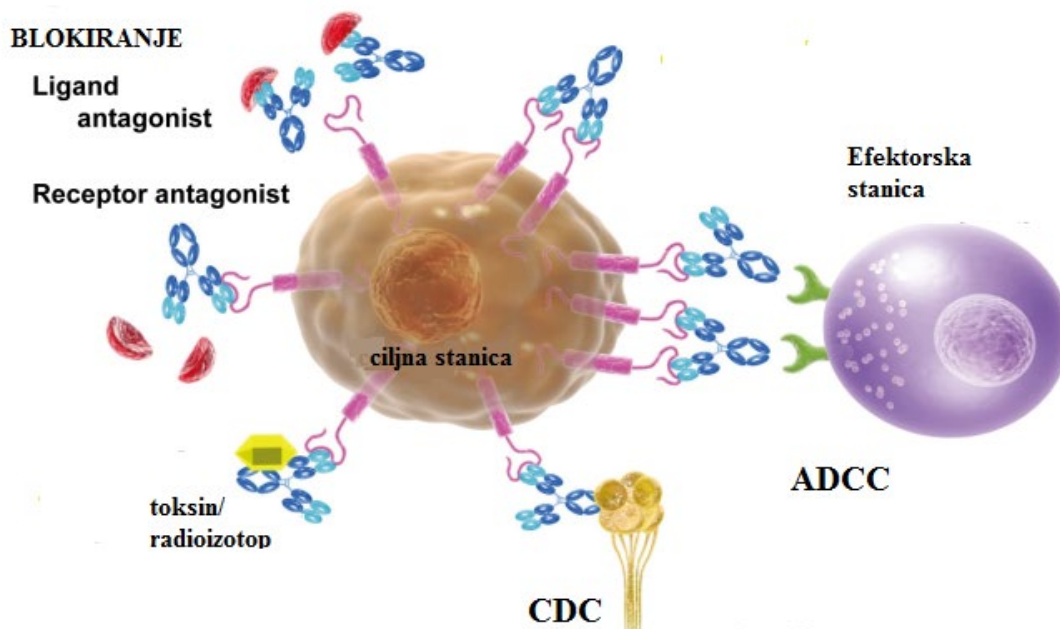
Za aktivaciju citotoksičnosti ovisne o protutijelu, protutijelo se svojom varijabilnom regijom mora vezati za specifični antigen koji je eksprimiran na površini ciljne stanice. Protutijelo zatim regrutira imunosne efektorske stanice (najčešće NK stanice) koje na svojoj površini imaju receptore kojima se vežu na Fc podjedinicu protutijela. Tako aktivirane imunosne stanice uzrokuju lizu ciljne stanice (48, 109).

Citotoksičnost posredovana komplementom započinje vezanjem varijabilne regije protutijela na antigen što uzrokuje konformacijsku promjenu Fc fragmenta te se on veže sa C1q

komplementsku komponentu. Na taj način započinje aktivacija sustava komplementa koja završava stvaranje kompleksa koji napada membranu (*engl.* membrane attack complex, MAC) te on uzrokuje lizu ciljne stanice (95, 132).

Stanična fagocitoza ovisna o protutijelu djelomično nalikuje na staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelu. U ovom se slučaju protutijelo nakon vezanja antigena varijabilnom regijom, veže svojim Fc fragmentom na FcγRIIA na površini makrofaga. Nakon aktivacije makrofagi uzrokuju fagocitozu tumorske stanice (57).

Protutijela se mogu koristiti kao nosači kada su konjugirana s lijekovima, radioizotopima ili toksinima koje prenose direktno do tumorske stanice. Prednost ovakve terapije je ciljano djelovanje na tumorske stanice bez oštećenja ostalih stanica (120).



Slika 2. Mehanizam djelovanja protutijela (preuzeto i prilagođeno iz 120)

1.2. Monoklonska protutijela

Monoklonska protutijela su laboratorijski proizvedena protutijela koje služe kao zamjenska protutijela koja mogu obnoviti, pojačati ili oponašati djelovanje imunskog sustava. Danas se koriste za liječenje brojnih bolesti. U početku su se protutijela proizvodila injektiranjem antigena u eksperimentalne životinje, nakon čega se njihov serum pročišćavao i izolirala su se protutijela. Laboratorijska proizvodnja započela je 1975. kad su Kohler i Milstein razvili hibridoma tehniku. Hibridoma stanice nastaju fuzijom besmrtnih mijeloma stanica i B stanica iz slezene koje proizvode protutijela. Dobivena hibridoma stanica proizvodi veliku količinu monoklonskih protutijela čiji je afinitet potrebno ispitati kako bi se omogućio probir specifičnih monoklonskih protutijela visokog afiniteta (8, 94). Ovo otkriće dovelo je do proizvodnje velikog broja monoklonskih protutijela te je 1986. muronomab-CD3 odobren kao prvo monoklonsko protutijelo za upotrebu kod ljudi. Muronomab-CD3 je protutijelo mišjeg podrijetla te ga je ljudski organizam prepoznao kao strano tijelo i stvorio na njega protutijela. Osim prethodno navedene imunogenosti ovo protutijelo uzrokovalo je i proliferaciju T-limfocita te posljedično citokinsku oluju. Danas se monoklonska protutijela za kliničku primjenu proizvode tehnologijom rekombinantne DNA u ekspresijskim sustavima sisavaca kako bi se izbjegla imunogenost (8).

Monoklonska protutijela su molekule istovjetne imunoglobulinu G koje su građene od dva istovrsna teška i dva laka lanca povezana disulfidnim mostovima. Monoklonsko protutijelo se sastoji od Fab fragmenta koji služi za vezanje antigena i Fc fragmenta koji se veže na receptore na površini imunskih stanica. Fc fragment je odgovoran i za vezanje na neonatalni Fc receptor (*engl.* Neonatal Fc Receptor, FcRn), receptor koji osigurava dulje poluvrijeme života u plazmi te prolazak kroz placentu (97).

Protutijela se prema porijeklu dijele u četiri klase mišja, kimerna, humanizirana i humana. Prvo su proizvedena mišja protutijela koja se dobivaju hibridoma tehnikom. Naš ih organizam često prepoznaje kao strano tijelo, dolazi do imunosne reakcije i ona se uklanjaju. Imaju kratko poluvrijeme života jer se ne vežu na FcRn. Razvojem molekularne biologije i genetičkog inženjerstva omogućena je proizvodnja kimernih protutijela. Ova rekombinantna protutijela se sastoje od mišje varijabilne regije i humane konstantne regije. Protutijela su približno 65% ljudskog i 35% mišjeg porijekla. U usporedbi s mišjim protutijelima imaju dulje vrijeme poluživota i smanjenu imunogenost, ali i dalje mogu izazvati imunosni

odgovor. Prvi korak njihove proizvodnje je imunizacija miša antigenom i izolacija B-limfocita koji proizvode protutijela. Ti limfociti se fuzioniraju s mijeloma stanicama, nastaju hibridoma stanice koje proizvode protutijela koja zatim ispituju na željeni antigen. Nakon probira, izoliraju se nukleotidni sljedovi za varijabilne regije lakih i teških lanca te se spajaju s nukleotidnim sljedovima za teške lance ljudskog imunoglobulina. Slijedi transfekcija stanica sisavaca rekombinantnom DNA te se izabire klon koji pokazuje najvišu razinu ekspresije kimernih protutijela. Takav se klon potom uzgaja u kulturi stanica kako bi proizvodio protutijela (94). Idući korak prema razvoju potpuno ljudskog protutijela bila su humanizirana protutijela koja su 95% ljudskog podrijetla. Kod ovih protutijela samo je hipervarijabilna regija mišjeg podrijetla dok je ostatak protutijela ljudski čime se smanjila imunogenost protutijela. Dva su moguća načina proizvodnje ovih protutijela. Prvi način je humanizacija kimernog protutijela mijenjanjem nukleotidnih sljedova u varijabilnoj regiji. Ciljanom mutagenezom mijenja se određeni slijed aminokiselina pri čemu se ne smije mijenjati specifičnost vezanja antigena. Drugi način je umetanje mišje CDR regije u okvir varijabilne regije humanog monoklonskog protutijela. Zadnji tip protutijela su humana protutijela. Proizvodnju ovakvih protutijela omogućio je razvoj knjižnica bakteriofaga i primjena transgeničnih životinja kod kojih su njihovi geni za imunoglobuline potpuno inaktivirani te one stvaraju humana protutijela. Ova vrsta protutijela najbolje je podnošljiva od svih prethodno navedenih te ima najdulji poluvijek života (8, 132).

Monoklonska se protutijela mogu primijeniti kao konjugirana ili nekonjugirana. Nekonjugirana monoklonska protutijela funkcioniraju samostalno te se kao takva najčešće koriste u terapiji karcinoma. Ona se vežu na antigene na površini stanica raka te na taj način privlače stanice imunskog sustava koje zatim unište stanice raka. Drugi mehanizam njihova djelovanja je ciljanje kontrolnih točaka imunskog sustava. Konjugirana protutijela su protutijela koja prenose kemoterapeutske agense ili radioaktivne čestice do ciljnog mjesta u organizmu. Posebna vrsta terapijskih protutijela su bispecifična protutijela (8, 21).















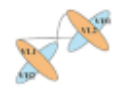


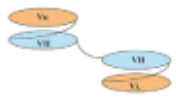

1.3. Bispecifična protutijela

Razvojem molekularne biologije i otkrićem signalnih puteva bolesti uočeno je da je često više signalnih puteva odgovorno za nastanak bolesti. Stoga je započelo istraživanje bispecifičnih protutijela koja bi mogla djelovati na više mjesta istodobno. Iako je takav koncept imao veliki terapijski potencijal prijenos koncepta u terapiju pokazao se vrlo izazovnim. Primjerice preusmjeravanje i aktivacija T-stanica prvi put je opisana 1980-ih, ali terapijska primjena započela je tek 2009 (71). Za razliku od monoklonskih protutijela koja se mogu vezati samo na jedan epitop, bispecifična protutijela kombiniraju dva ili više elemenata, koji prepoznaju antigene, u jednu cjelinu sa sposobnošću vezanja na dva ili više ciljeva. Ova su protutijela adapteri ili linkeri između ciljne i efektorske stanice, na primjer mogu se vezati na receptor na tumorskim stanicama i istodobno aktivirati imunostanice. Glavna prednost primjene bispecifičnih protutijela u bolestima kao što su rak, upalne i autoimune bolesti je njihova sposobnost da selektivno djeluju na imunostanice kako bi se one vezale na antigene specifične za određenu bolest. Mehanizam djelovanja bispecifičnih protutijela sličan je onome monoklonskih protutijela i obuhvaća staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelu, citotoksičnost posredovanu kompleksom, staničnu fagocitozu ovisnu o protutijelu, apoptozu i djelovanje na stanične receptore kako bi se aktivirali ili inhibirali signalni putevi. Djelovanjem na više meta istovremeno povećava se učinkovitost terapije te smanjuje potreba za učestalom primjenom lijeka. Potrebno je manje kliničkih ispitivanja te se smanjuju troškovi proizvodnje jer jedna molekula zamjenjuje dvije (62, 67).

Postoje različiti formati bispecifičnih protutijela koji se razlikuju u veličini, simetriji, prisutnosti, odnosno odsutnosti Fc-domene, broju mjesta za vezanje antigena i broj antigena koji se mogu vezati istovremeno (slika 3). Bispecifična se protutijela na temelju svoje strukture mogu podijeliti u tri skupine. Prvu skupinu čine protutijela koja se sastoje od dva fragmenta koja vežu antigen i međusobno su povezana fleksibilnim linkerom, a nedostaje im Fc regija. Drugu skupinu čine bispecifična protutijela koja nalikuju imunoglobulinu G, struktura im je asimetrična što znači da se krakovi vežu na različite mete i imaju različitu strukturu. U treću skupinu ubrajamo bispecifična protutijela koja su slična imunoglobulinu G i imaju simetričnu strukturu te je drugo vezno mjesto spojeno s lakim ili teškim lancem. Velika molekularna masa bispecifičnih protutijela sličnih imunoglobulinu G olakšava njihovo pročišćavanje, poboljšava stabilnost i topivost, produljuje serumsko poluvrijeme života te poboljšava biološku aktivnost. Bispecifična protutijela koja nisu slična imunoglobulinu G

postišu svoj terapijski učinak samo vezanjem za antigen jer im nedostaje Fc fragment. Ona su laka za proizvodnju, imaju nisku imunogenost, ali im je poluvrijeme života kratko (71, 132).

Jedan od izazova bio je povezivanje različitih teških i lakih lanaca u jednu molekulu te je bilo potrebno razviti nove tehnike koje su omogućile stvaranje funkcionalnih protutijela. Neke od tih tehnika su prikaz faga, kvadroma tehnologija, metoda "dugme u rupu", zajednički laki lanac, CrossMAb tehnologija i dr., što će biti navedeno u kasnijim poglavljima (115).

<p>DEEK</p>  <p>MCLA-128</p>	<p>ART-Ig</p>  <p>ERY974</p>	<p>CrossMAb</p>  <p>RG7716</p>	<p>DuoBody</p>  <p>JNJ-63709178</p>	<p>Ortho-Fab</p>  <p>LY3164530</p>
<p>SEED</p>  <p>C225-GA/AG</p>	<p>Knobes-into-holes</p>  <p>M802</p>	<p>DAF</p>  <p>MEHD7945A</p>	<p>Wuxibody</p>  <p>WBP3248</p>	<p>DVD-Ig</p>  <p>ABT-165</p>
<p>FIT-Ig</p>  <p>EMB01</p>	<p>TcBIgG</p>  <p>FGFR1×KLB</p>	<p>Triomab</p>  <p>Catumaxomab</p>	<p>XmAb</p>  <p>Plamotamab</p>	<p>DART</p>  <p>Flotetuzumab</p>
<p>TandAbs</p>  <p>AFM13</p>	<p>Bi-Nanobody</p>  <p>TS-152</p>	<p>BiTE</p>  <p>Blinatumomab</p>	<p>HLE-BiTE</p>  <p>AMG 673</p>	

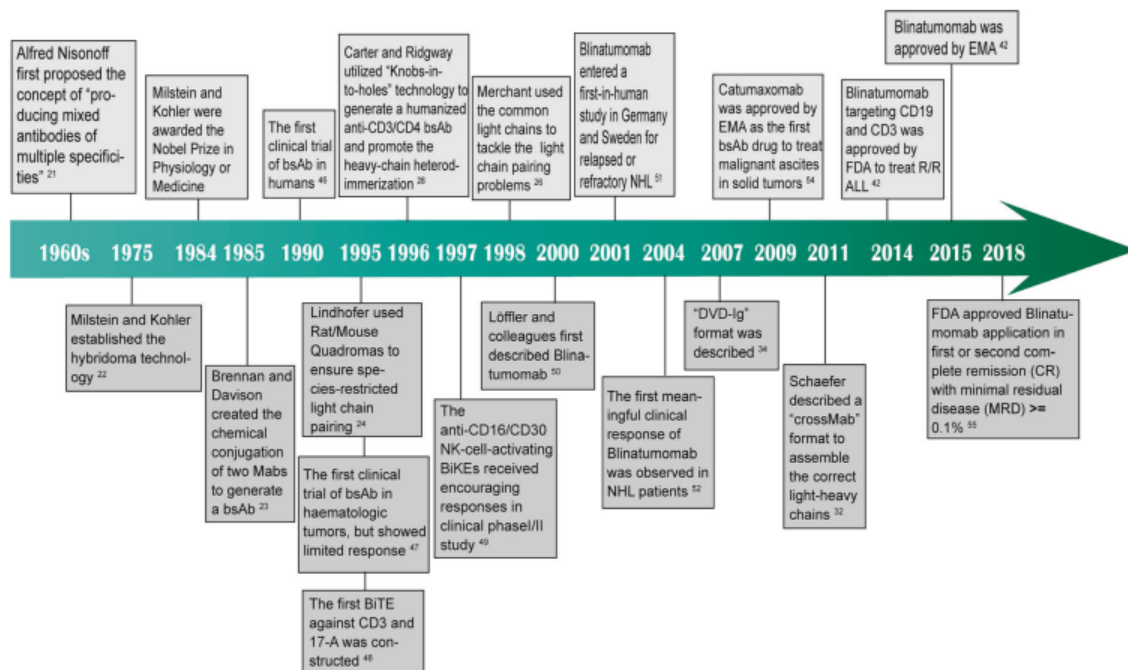
Slika 3. Vrste bispecifičnih protutijela (preuzeto i prilagođeno iz 57)

1.3.1. Povijesni pregled razvoja bispecifičnih protutijela

Nisonoff i Rivers su 1961. prvi iznijeli koncept proizvodnje višespecifičnih protutijela miješanjem različitih fragmenata protutijela. Prvo su razvijene hibridoma tehnologija i metode kemijske rekombinacije 1975., odnosno 1985. Tada je proizvodnja bispecifičnih protutijela ovisila je o fuziji hibridoma stanica kako bi nastala kvadroma stanica ili kemijskoj heterokonjugaciji $F(ab')_2$ molekula iz dva različita monoklonska protutijela. Međutim, ove metode nisu davale dovoljno dobre rezultate jer kemijska konjugacija može inaktivirati, razmotati ili agregirati bispecifična protutijela, dok kvadroma tehnologija ima niski prinos zbog neispravnog povezivanja lanaca protutijela. Prvotno je problem neispravnog povezivanja lanaca riješen 1995. stvaranjem kimerne kvadroma tehnologije u kojoj dolazi do fuzije mišjih štakorskih hibridoma stanica. 1998. otkrivena je metoda zajedničkog lakog lanca. Međutim, i dalje je ostao problem neispravnog povezivanja teških lanaca i imunogenosti te bispecifična protutijela nisu zaživjela u kliničkoj primjeni. Razvoj genetičkog inženjerstva omogućio je uklanjanje ovih problema te je došlo do uzleta u proizvodnji bispecifičnih protutijela. Proizvodnja bispecifičnih protutijela ovisila je o tehnologiji rekombinantne DNA, omogućujući generiranje kimernih ili humaniziranih protutijela uz kontrolu veličine, afiniteta, bispecifičnosti, vremena poluživota, stabilnosti, topljivosti i biodistribucije kako bi se ispunili različiti zahtjevi ciljnih proizvoda. Kao rezultat toga, stabilnije i homogenije bispecifične platforme s manjom imunogenošću korištene su za proizvodnju komercijalno održivih biofarmaceutika. Godine 1996. Ridgway i suranici predstavili su metodu "dugme u rupu" (*engl.* "knobs-into-holes") koja je omogućila ispravno povezivanje teških lanaca. Kasnije je razvijena i CrossMAb metoda kojom je smanjen udio neželjenih nusprodukata neispravnog povezivanja lakih i teških lanaca. S napretkom genetičkog inženjerstva, kao i pojavom brojnih metoda, kao što su prikaz faga, proteinskog inženjerstva i transgenih miševa proizvedeno je više od sto različitih oblika bispecifičnih protutijela čime je omogućena svestranost u kliničkoj primjeni. Ovi novi oblici zaobilaze prethodne probleme proizvodnje kao što su nestabilnost, niske stope prinosa i imunogenost.

Prvo kliničko ispitivanje bispecifičnog protutijela provedeno je 1990. godine kada su Nitta i suradnici koristili dva kemijski konjugirana monoklonska protutijela za liječenje pacijenata s malignim gliomom (anti-CD3 monoklonsko protutijelo OKT3 i anti-glioma monoklonsko protutijelo NE150). 1995. prvi put je bispecifično protutijelo primijenjeno na hematološke

tumore intravenskom primjenom anti-CD3×CD19 bispecifičnog protutijela kod bolesnika s ne-Hodgkinovim limfomom (NHL) otpornim na kemoterapiju. Ovim ispitivanjem uočena je ograničena sistemska toksičnost, dok kliničkog odgovora nije bilo, osim povećane razine faktora tumorske nekroze TNF- α i CD8⁺ T stanica u serumu. 1997. bispecifično protutijelo koje aktivira stanice ubojice vežući se na Fc γ R III (CD16) i Hodgkinov antigen CD30, za liječenje refraktorne Hodgkinove bolesti, pokazalo je ohrabrujuće antitumorsko djelovanje u kliničkom ispitivanju faze I/II. Koristeći prednosti tehnologije rekombinantne DNA, prvi opis blinatumomaba objavili su Löffler i suradnici, zaobišli su probleme niskog prinosa, nedefiniranih nusproizvoda i kompliciranih postupaka pročišćavanja. Godinu dana kasnije, blinatumomab je ušao u prvu studiju na ljudima u Njemačkoj i Švedskoj, gdje je 21 pacijent s relapsom ili refraktornim NHL-om dobio kratkotrajne intravenske infuzije. Tek je 2004. zabilježen prvi značajni odgovor na blinatumomab kod pacijenata oboljelih od NHL pri dozi od 15 μ g/m². Na temelju relativno visoke stope potpune remisije od 30% i umjerenih nuspojava, FDA je odobrila blinatumomab (Blinicyto®) za liječenje bolesnika s R/R akutnom limfocitnom leukemijom 2014, a EMA u prosincu 2015 (slika 4). Između 2007. i 2009. provedeno je nekoliko kliničkih ispitivanja faze I/II catumaksomaba te je on 2009. postao prvo bispecifično protutijelo koje je EMA odobrila za terapiju malignog ascitesa (71, 72).



Slika 4. Povijesni pregled razvoja bispecifičnih protutijela (preuzeto i prilagođeno iz 72)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog specijalističkog rada je opisati svojstva bispecifičnih protutijela odobrenih za kliničku uporabu i onih u kliničkim istraživanjima, analizirati metode njihove proizvodnje te dati uvid u terapijske mogućnosti ovih protutijela.

Hipoteze istraživanja su:

1. Bispecifična protutijela pružaju bolji terapijski odaziv i prosječno preživljenje za terapiju karcinoma, autoimunih i upalnih bolesti;
2. Bispecifična protutijela daju bolje rezultate u kraćem vremenskom razdoblju i uz manje troškove u odnosu na dosadašnju terapiju;
3. Primjena bispecifičnih protutijela moguća je za širok raspon bolesti.

3. MATERIJAL I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

3.1. Bispecifična protutijela koja nisu slična imunoglobulinu G

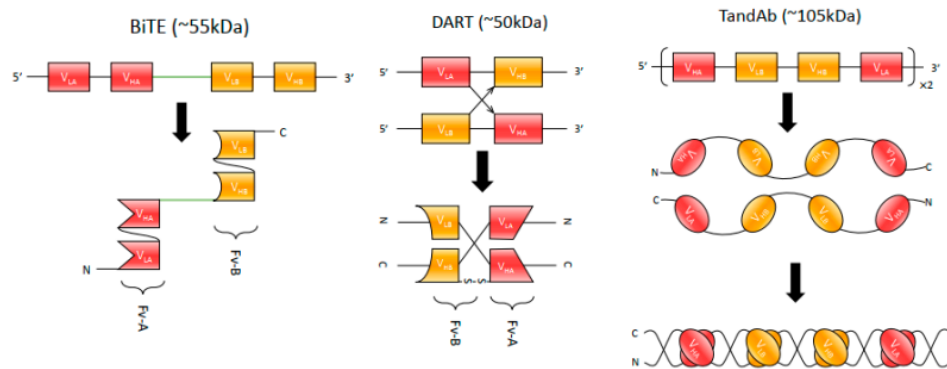
Protutijela koja nisu slična imunoglobulinu G sastoje se samo od dva jednolančana varijabilna fragmenta (*engl.* single chain fragment variable, scFv) povezana linkerom, dok im Fc regija nedostaje. ScFv je minimalistički oblik protutijela nastao fuzijom varijabilne regije lakog i teškog lanca imunoglobulina G pomoću peptidnih veza. Genetičkim inženjerstvom moguće je postići povećanje afiniteta i promjenu specifičnosti scFv. Duljina linkera, koji spaja dva scFv, kritični je parametar za ispravno smatanje polipeptidnog lanca te je procijenjeno da bi idealna duljina bila 35Å. Osim duljine, važan je i aminokiselinski sastav peptidnog linkera. Preporučuje se da to bude hidrofilni slijed kako bi se izbjeglo interkaliranje peptida unutar ili između varijabilnih domena tijekom smatanja peptida. Najčešće se koriste glicin i serin koji poboljšavaju fleksibilnost te se mogu kombinirati s nabijenim ostacima kao što su glutamat i lizin kako bi se poboljšala topivost. Molekulska masa ovakvih protutijela je oko 25 kDa. Važni čimbenici pri razvoju scFv protutijela su tip protutijela, svojstva linkera i kapacitet proizvodnje (1, 14).

Jednolančane varijabilne fragmente moguće je proizvoditi u različitim ekspresijskim sustavima pri čemu mogu nastati proteini ispravne strukture, ali i proteini koje je potrebno renaturirati. Najčešće korišten ekspresijski sustav je *Escherichia coli*. Jedna od mogućnosti je direktna ekspresija scFv u citoplazmi *E. coli* bez upotrebe signalnih proteina pri čemu je prinos proteina velik, ali nastaju netopljivi agregati koje je potrebno renaturirati *in vitro* kako bi se omogućilo ispravno smatanje proteina. Inkluzijska tjelešca nastaju jer scFv protutijela imaju hidrofobne ostatke koji se nalaze u hidrofobnom varijabilnom ili konstantnom fragmentu i kada se takvi proteini izlože otapalu, dolazi do agregacije. Zamjena hidrofobnih ostataka hidrofilnima omogućuje ispravno smatanje proteina *in vivo*. Ovaj problem je moguće izbjeći i primjenom signalnih peptida koji usmjeravaju sekreciju scFv protutijela u periplazmatski prostor koji se nalazi između unutarnje i vanjske membrane gram negativnih bakterija (1, 23).

Jednolančane varijabilne fragmente moguće je proizvoditi i primjenom kombinatorijskih knjižnica bakteriofaga. Geni za scFv kloniraju se u bakteriofagni vektor i spajaju se s genima koji kodiraju za proteine omotača bakteriofaga. *E. coli* se zarazi rekombinantnim bakteriofagom koji se zatim replicira unutar bakterije, a proteini protutijela se eksprimiraju na površini čestice bakteriofaga. Tako dobivena knjižnica bakteriofaga se afinitetnom selekcijom probire kako bi se identificirao željeni scFv. Bakteriofag, koji nosi željeni scFv, će se vezati za antigen koji se nalazi na nepokretnoj fazi i ostat će vezan nakon ispiranja. Postupak je potrebno ponoviti nekoliko puta kako bi se dobio visok prinos željenih scFv. S obzirom na izvor gena knjižnice bakteriofaga se dijele na imunosne, naivne i sintetske. Imunosne knjižnice se dobivaju kloniranjem gena ili cDNA varijabilne regije protutijela dobivenih iz plazma stanica imuniziranih životinja ili ljudi. Protutijela dobivena u ovoj knjižnici visokog su afiniteta za pojedini antigen. Naivna, neimunosna, knjižnica dobiva se iz neimuniziranih B stanica. Protutijela nastala u neimunosnoj knjižnici nemaju specifični afinitet te nije potrebno stvarati novu knjižnicu za svaki antigen. Pogodne su za proizvodnju protutijela koja je teško dobiti hibridoma tehnikom, pogotovo za ona koja se vežu na neimunogene ili toksične antigene. Sintetske knjižnice se dobivaju kombiniranjem genskih sekvenci zametne linije te onih za CDR3 regiju. Stvorene su kako bi se proizvodila protutijela visokog afiniteta (1, 74). Osim knjižnica faga, za proizvodnju scFv protutijela koriste se i ribosomske knjižnice koje predstavljaju *in vitro* metodu izolacije scFv. DNA knjižnica scFv protutijela prepisuje se i prevodi *in vitro* te nastaje kompleks mRNA- ribosom- scFv protein koji se zatim ispituje na imobilizirani antigen. mRNA koja se specifično veže na antigen se zatim eluira i slijedi obrnuta transkripcija u DNA i umnažanje PCR-om. DNA se dalje može modificirati i koristiti za ekspresiju proteina ili se može koristiti za drugi ciklus ribosomske knjižnice. Korištenjem ove metode proizvodi se velik broj protutijela specifičnih za ispitivani antigen (1,107).

Bispecifična protutijela koja nisu slična imunoglobulinu G su bispecifični usmjerivači T stanica (*engl.* Bispecific T-cell Engager, BiTE[®]), bispecifična protutijela dvostrukog afiniteta (*engl.* Dual-Affinity Re-Targeting antibodies, DART) i tandemska diatijela (*engl.* tandem diabodies, TandAbs) (slika 5). Proizvode se ekspresijom jednog do dva polipeptidna lanca u nižim eukariotskim i prokariotskim ekspresijskim sustavima, pri čemu se dobiva visok prinos protutijela uz nisku cijenu. U odnosu na bispecifična protutijela slična imunoglobulinu G, ova protutijela imaju manju imunogenost, proizvodnja je jednostavnija te bolje prodiru u tkiva. Nedostatak im je kratko vrijeme poluživota jer u plazmi nisu zaštićeni od kataboličkog

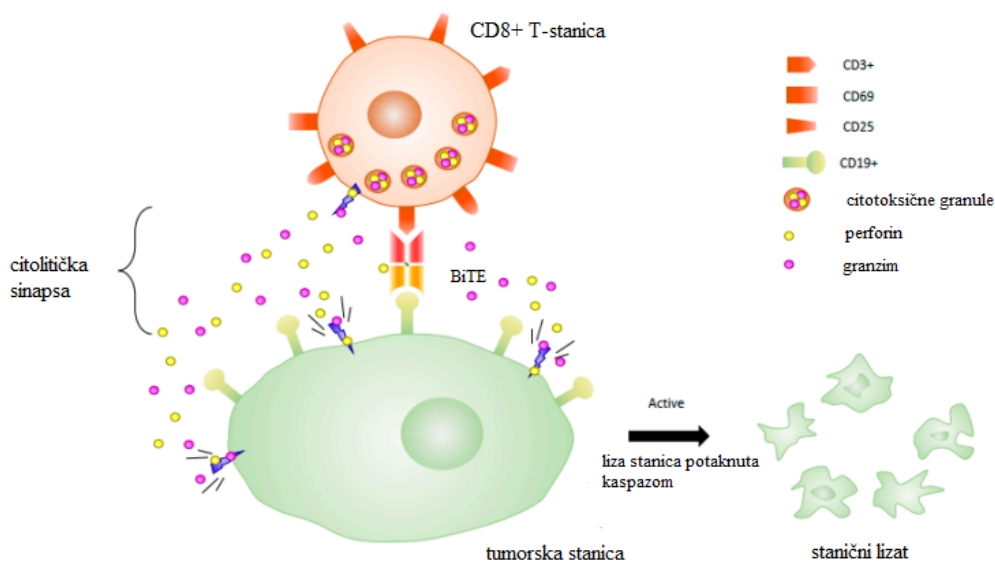
djelovanja neonatalnog Fc receptora. Prevođenje u Fc-fuzijski protein ili povezivanje s humanim serumskim albuminom može poboljšati stabilnost i spriječiti agregacija što je važno za klinički razvoj i terapijsku primjenu. (14, 116).



Slika 5. Bispecifična protutijela koja nisu slična imunoglobulinu G (preuzeto i prilagođeno iz 133)

3.1.1. Bispecifični usmjerivači T-stanica (*engl.* Bispecific T-cell Engager, *BiTE*[®])

Bispecifični usmjerivači T-stanica su jednolančana bispecifična protutijela koja aktiviraju i preusmjeravaju T-stanice prema tumorskim stanicama. Sastoje se od jednolančanih varijabilnih fragmenata dva različita monoklonska protutijela koji su međusobno povezani peptidnom vezom. Veličina ovako nastalog protutijela je približno 55 kDa. Jedan se scFv veže se na CD3 ϵ podjedinicu T-stanice, dok se drugi veže za antigen na tumorskoj stanici. Dolazi do aktivacije T-stanice, stvori se citolitička sinapsa između T-stanice i tumorske stanice te posljedično dolazi do lize tumorske stanice uzrokovane perforinom i granzimom koji ispušta T-stanica (slika 6). Perforin stvara pore na površini tumorske stanice kroz koje prolazi granzim i uzrokuje lizu tumorskih stanica. Aktivacija T stanica pomoću BiTE[®] ovisna je o prisutnosti antigena na površini tumorskih stanica (46, 102).



Slika 6. Mehanizam djelovanja BiTE[®] protutijela (preuzeto i prilagođeno iz 133)

BiTE[®] se proizvode u bioreaktorima u staničnim linijama sisavaca pri čemu nastaju velike količine rekombinantnih scFv. Mala veličina, visoka fleksibilnost i veza visokog afiniteta između efektorskih i ciljnih stanica najvažnije su karakteristike BiTE[®] i smatraju se odgovornima za izvrsnu učinkovitost ove vrste bispecifičnih protutijela. Molekulska masa od samo 55 kDa upućuje da se najvjerojatnije izlučuju renalno. Ne mogu se vezati za FcRn zbog čega imaju kratko vrijeme poluživota (1-4h) te ih je potrebno kontinuirano primjenjivati

pomoću infuzije. Dodatkom Fc domene raste molekulska masa te se poluvrijeme života produljuje na 7 dana. Osim sa Fc domenom, BiTE[®] se može povezati i sa serumskim albuminom kako bi se povećalo poluvrijeme života (46, 67).

Usporedbom fuzijskog protutijela antiCD33xCD3 BiTE-Fc s običnim BiTE[®] pokazano je da je učinkovitost BiTE-Fc koji se primjenjuje svaka 4 dana jednaka onoj svakodnevno primijenjenog običnog BiTE[®]. Ista studija pokazala je da je učinkovitost BiTE-albumin kompleksa koji se primjenjuje svaka 4 dana manja od one svakodnevno primijenjenog BiTE[®] (133).

3.1.2. Bispecifična protutijela dvostrukog afiniteta (*engl. Dual Affinity Re-Targeting antibodies, DART*)

DART protutijela imaju dva jedinstvena vezna mjesta koja su nastala heterodimerizacijom dvaju scFv fragmenata. Jedan se varijabilni fragment sastoji od varijabilne regije teškog lanca A i varijabilne regije lakog lanca B, dok se drugi varijabilni fragment sastoji od varijabilne regije teškog lanca B i varijabilne regije lakog lanca A. Takva kombinacija omogućuje DART protutijelu da oponaša prirodne interakcije unutar imunoglobulina G. Vežu se za antigene na površini tumorskih stanica, aktiviraju imunosne stanice koje zatim uzrokuju smrt tumorskih stanica. DART mogu istovremeno djelovati na više mjesta u signalnim putevima pojedine tumorske stanice te spriječiti njenu daljnju proliferaciju i potaknuti apoptozu. Međulančane i kovalentne veze između dva scFv fragmenta osiguravaju stabilnu vezu između mete i efektorske stanice. Stabilnost je moguće povećati dodatkom cisteina na C krajeve teških lanaca pri čemu se formiraju disulfidne veze. DART protutijelo je veličine 50 kDa te stoga, kao i BiTE[®] protutijela, ima kratko vrijeme poluživota. Dodatkom Fc regije povećava se molekulska masa DART protutijela i produljuje njegovo vrijeme poluživota (4, 83).

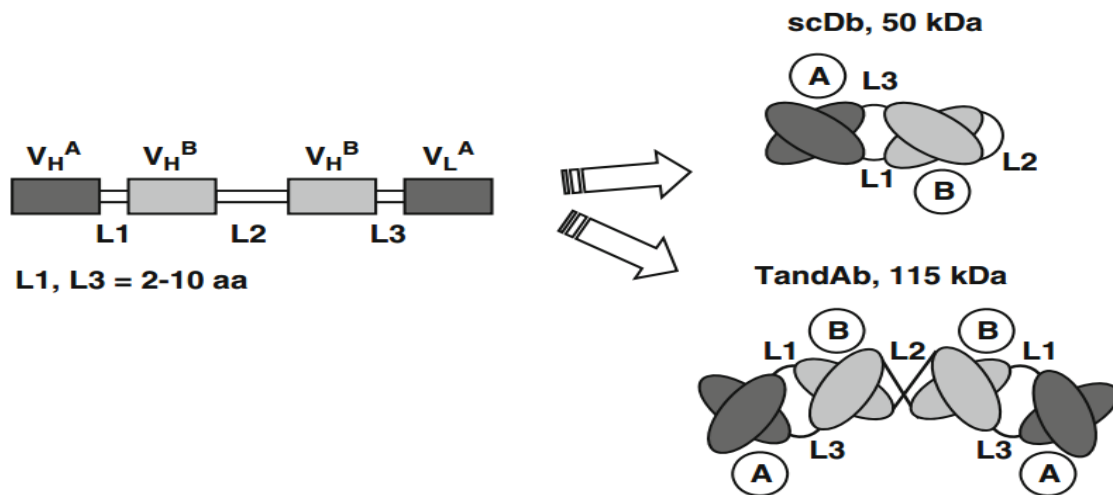
3.1.3. Usporedba BiTE[®] i DART

Moore i suradnici su u svom radu usporedili djelovanje BiTE[®] i DART protutijela. Prvi korak je bila usporedba CD3XCD19 DART i CD3XCD19 BiTE[®] aktivacije T-stanica. CD19XCD3 BiTE[®] molekule pokazale su potentnu aktivnost protiv CD19 staničnih linija s EC₅₀ 10-100 pg/mL. DART molekule su dale još bolje rezultate i pokazale se kao potentnije od BiTE[®]. Snažnije djelovanje DART molekula zapaženo je kod nefrakcioniranih mononuklearnih stanica u perifernoj krvi, pročišćenih T-stanica te protiv limfoma B-stanica. Ovakvi rezultati posljedica su strukturne razlike između DART i BiTE[®] protutijela. Aktivacija i usmjeravanje T-stanica da unište stanice tumora jača je kod primjene DART protutijela zbog većeg afiniteta DART protutijela za ciljna mjesta. Aktivacija T-stanica ovisna je o poluvremenu interakcije antigen/receptor. DART protutijela se brzo ponovno vežu na antigen, poluvrijeme interakcije antigen/receptor je dulje što uzrokuje pojačanje citotoksičnog djelovanja T-stanica. Još jedan od faktora koji utječe na učinkovitost DART protutijela je orijentacija veznih mjesta. DART protutijela imaju fiksnu udaljenost i orijentaciju između dva vezna mjesta, dok BiTE[®] ima veliku fleksibilnost mjesta vezanja T-stanica u odnosu na mjesto vezanja antigena. Samo su neke orijentacije pogodne za aktivaciju T-stanica stoga čvrsta i kompaktna struktura DART protutijela omogućuje povoljniju orijentaciju veznih mjesta, dok BiTE[®] treba više vremena da zauzme ispravnu orijentaciju (84).

3.1.4. Tandemska dijatijela (*engl. tandem diabodies, TandAbs*)

Jedan od najjednostavnijih oblika bispecifičnih protutijela su tandemska dijatijela. Sastoje se od četiri fragmenta varijabilne regije teških i lakih lanaca povezanih linkerima koji su eksprimirani kao jedan genski produkt (slika 7). Duljina linkera 1 i 3 određuje polimerizaciju scFv, a duljina linkera 2 određuje fleksibilnost pokreta između dvije domene koje vežu antigen. To su tetravalentna bispecifična protutijela, što znači da su bivalentna za svaki antigen čime se jača veza s antigenom i poboljšava terapijski učinak (139). Molekulska masa im je oko 105 kDa što im omogućuje da izbjegnu klirens prvim prolaskom kroz jetru te im je vrijeme poluzivota dulje od BiTE[®] i DART protutijela. Također, bolje prodiru u tkiva u odnosu na ostala scFv bispecifična protutijela (63). Bakterije nisu dobar ekspresijski sustav jer prilikom izlučivanja u periplazmu dolazi do nepravilnog smatanja i agregacije tandemskih dijatijela. Bolji izbor su ekspresijski sustavi staničnih kultura sisavaca (stanice jajnika

kineskog hrčka, *engl.* Chinese Hamster Ovary cells, CHO; humane embrijske bubrežne stanice *engl.* Human Embryonic Kidney cells 293, HEK293) jer tako proizvedena tandemska dijatijela 5 do 15 puta jače aktiviraju citotoksične stanice od onih proizvedenih u *E. coli*. Danas se ova protutijela najčešće koriste za usmjeravanje stanica ubojica i makrofaga prema stanicama tumora (63, 139).



Slika 7. Tandemsko dijatijelo (preuzeto i prilagođeno iz 63)

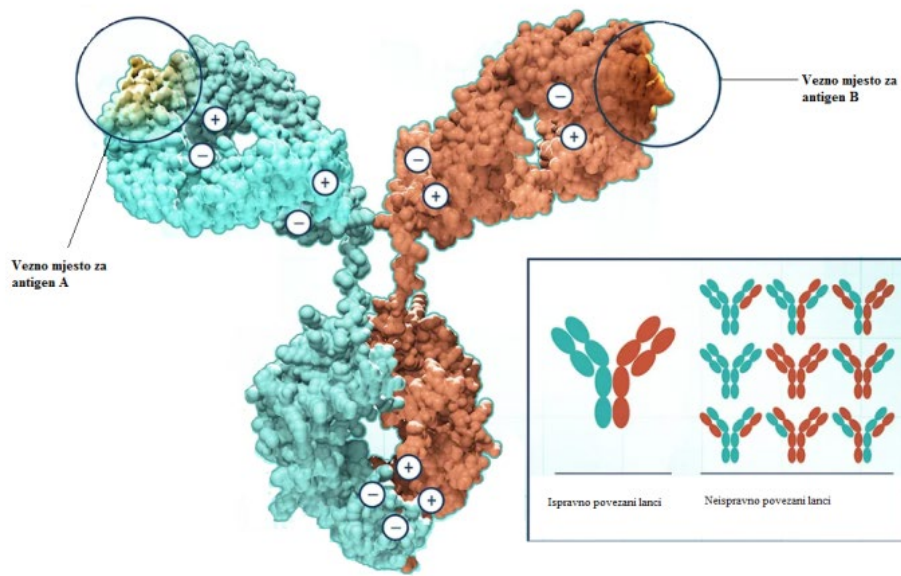
3.2. Bispecifična protutijela slična imunoglobulinu G

Bispecifična protutijela slična imunoglobulinu G dijele se na temelju simetrije na simetrična i asimetrična bispecifična protutijela. Najveći problem pri proizvodnji asimetričnih bispecifičnih protutijela je kako osigurati da se fragmenti protutijela povežu na ispravan način jer za razliku od klasičnih protutijela imaju dva različita teška lanca i dva različita laka lanca. Nasumično povezivanje četiri polipeptidna lanca rezultira sa šesnaest različitih kombinacija od kojih samo dvije čine funkcionalno protutijelo. Neželjeni nusprodukti nastaju zbog homodimerizacije ili heterodimerizacije teških lanaca te zbog mogućnosti povezivanja s oba laka lanca. Moguće ih je ukloniti kompliciranim postupkom afinitetne kromatografije, a kako bi se to izbjeglo razvijene su nove metode koje omogućuju ispravno povezivanje lanaca. Kvadroma tehnologija, metoda "dugme u rupu", korištenje zajedničkog teškog ili lakog lanca, Cross Mab metoda i metode ko-kulture implementirane su kako bi se povećala kvaliteta i prinos bispecifičnih protutijela (57,71,116). Simetrična bispecifična protutijela nastaju fuzijom druge jedinice koja veže antigen na kraj lakog ili teškog lanca (slika 8). Tijekom proizvodnje ovog tipa bispecifičnih protutijela nastaje manje nusprodukata jer se samo produžava lanac te nije potrebno povezivati različite lance. Ipak, nastaje puno više agregata nego kod asimetričnih protutijela zato što su lanci dulji i fleksibilniji. Simetrična bispecifična protutijela proizvode se WuxiBody tehnologijom (opisanom u poglavlju 3.2.8.) kojom je moguće proizvesti i asimetrična bispecifična protutijela (44).

3.2.1. Ekspresija i proizvodnja bispecifičnih protutijela sličnih imunoglobulinu G

Proizvodnja ovog tipa protutijela puno je kompleksnija u odnosu na bispecifična protutijela koja nisu slična imunoglobulinu G. Titar protutijela ovisi o odabiru stabilnog ekspresijskog sustava i temperaturi sustava koja utječe na ekspresiju i ispravno povezivanje protutijela. Stanice sisavaca najčešće su korišten ekspresijski sustav jer omogućuju proizvodnju visokog titra protutijela. CHO stanice koriste se za proizvodnju protutijela jer imaju visok prinos, mala je mogućnost kontaminacije te su kompatibilne s ljudskim imunskim sustavom. Prinos monoklonskih protutijela u ovakvim stanicama je veći od 3 g/L dok je on za bispecifična protutijela 1-3 g/L, a u nekim slučajevima i manji od toga. Za proizvodnju asimetričnog bispecifičnog protutijela potrebna su najmanje dva plazmida kako bi se omogućila uspješna heterodimerizacija teških lanaca i jedan plazmid za laki lanac, ako se koristi zajednički laki

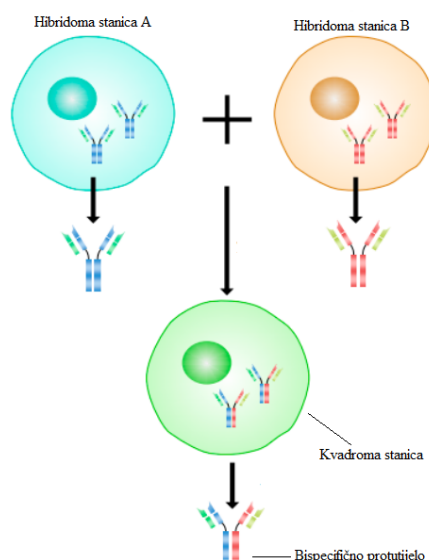
lanac, odnosno dva plazmida u slučaju kad su laki lanci različiti. Zatim se iz transfeciranih stanica vrši probir klonskih staničnih linija koje će omogućiti proizvodnju velikih količina protutijela. Zbog velikog broja potrebnih plazmida metoda prolazne transfekcije gena ne daje zadovoljavajuće rezultate, prinos proteina je mali u usporedbi sa stabilnom transfekcijom gena. Postoji još mogućnost korištenja jednog plazmida koji sadrži gene za sve lake i teške lance protutijela te se eksprimira u CHO stanicama. Titar ovako dobivenih protutijela iznosio je 0,6-2,2% dok je postotak ispravno sparenih protutijela 74-98% (75, 133).



Slika 8. Bispecifično protutijelo slično imunoglobulinu G (preuzeto i prilagođeno iz 10)

3.2.2. Kvadroma tehnologija

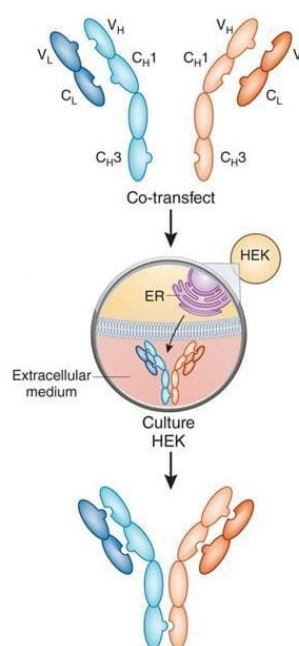
Kvadroma tehnologija se koristi za proizvodnju asimetričnih bispecifičnih protutijela. Fuzijom dvije različite hibridoma stanične linije, koje proizvode monoklonska protutijela specifična za željeni antigen, nastaje kvadroma stanica. Kvadroma stanica proizvodi bispecifična protutijela koja sadrže lake i teške lance monoklonskih protutijela. Ovom metodom nije moguće proizvesti dovoljno kvalitetnih bispecifičnih protutijela jer zbog nasumičnog povezivanja lakih i teških lanaca nastaje samo 1/10 željenih bispecifičnih protutijela (133). Kako bi se povećao prinos, razvijena je kimerna kvadroma tehnologija u kojoj dolazi do fuzije hibridoma staničnih linija miša i štakora pri čemu se povezuju mišja IgG2a i štakorska IgG2b protutijela (slika 9). Prinos kimernog miš/štakor bispecifičnog protutijela značajno je porastao zbog prioritnog povezivanja teškog i lakog lanca iste vrste te zbog učinkovitog heterolognog povezivanja teških lanca različitih vrsta. Kimerna bispecifična protutijela pročišćavaju se primjenom protein A afinitetne kromatografije jer stafilokokni protein A sadrži pet homolognih domena na koje se veže IgG. Monoklonska IgG2b štakorska protutijela se ne vežu za protein A i odmah se ispiru s kolone, dok se mišja monoklonska IgG2a protutijela i kimerna bispecifična protutijela vežu za protein A. Mišji se teški lanci u bispecifičnom protutijelu eluiraju pri pH 5,8 dok se monoklonska mišja protutijela eluiraju pri pH 3,5 te ih je moguće odvojiti gradijentom pH od pH 5 do 3,5. Bispecifična protutijela dobivena ovom metodom imaju funkcionalan Fc fragment te se još nazivaju Triomabs[®] (116, 126).



Slika 9. Kvadroma tehnologija (preuzeto i prilagođeno iz 133)

3.2.3. Metoda "dugme u rupu" (*engl.* "knobs into holes")

Genetičko inženjerstvo i razvoj DNA rekombinantne tehnologije dovelo je do razvoja novih strategija povezivanja teških lanaca. Ridgway i suradnici 1996. predstavili su metodu "dugme u rupu" koja je inspirirana Crickovom metodom pakiranja bočnih lanaca aminokiselina između dvije α -uzvojnice. Kod ove metode modificirani ljudski geni, koji kodiraju za protutijela, transfeciraju se u stanice sisavaca (slika 10). Prednost ove metode je što nastaju bispecifična protutijela ljudskog podrijetla sa smanjenom imunogenosti (116, 133). Mala aminokiselina -CH3 domene jednog lanca zamijenjena je velikom aminokiselinom (T336Y) kako bi se formiralo "dugme" (*engl.* knob), dok se velika aminokiselina -CH3 domene drugog lanca zamijenjena malom aminokiselinom (Y407T) kako bi se stvorila rupa (*engl.* hole). Nastale domene čine par te dolazi do heterodimerizacije. Dodatne mutacije optimiziraju povezivanje teških lanaca i povećavaju stabilnost bispecifičnog protutijela. Dvije takve mutacije nastaju na mjestu velike aminokiseline S354A i T166W te četiri mutacije na mjestu male aminokiseline Y349C, T366S, L368A, Y407V (116). Povećanju stabilnosti doprinosi i mutacija L351C koja omogućuje stvaranje disulfidnih mostova. Mjesta mutacija su određena i ispitana prema tri kriterija: udaljenosti između α -ugljika trebaju biti oko 5,0–6,8 Å, što je prosječna udaljenost pronađena u prirodno formiranim disulfidnim vezama, ali može doseći i do 7,6 Å; aminokiselinski ostatci trebaju se razlikovati od onih na CH3 kraju nemodificiranih protutijela; stvaranje disulfidnih veza između cisteinskih ostataka mora biti konformacijski povoljno. Do homodimerizacije dolazi samo u lancima s "rupom". Problem nastaje kad se koriste laki lanci koji ne preferiraju jedan od teških lanaca, a moguće ga je riješiti uporabom protutijela koja imaju zajedničku sekvencu lakog lanca. Korištenjem ove metode 90% lanaca se ispravno spari te je prinos puno veći nego kvadroma tehnologijom (2, 27, 114).



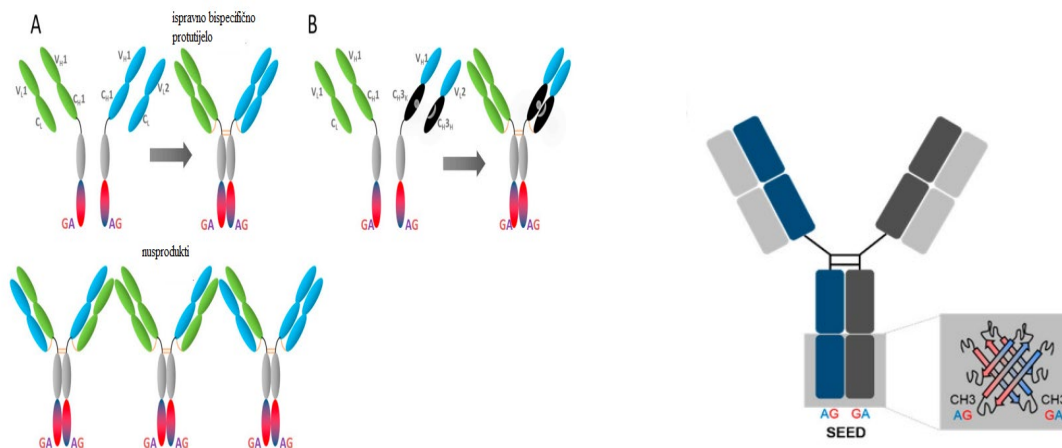
Slika 10. Metoda "dugme u rupu" (preuzeto i prilagođeno iz 114)

3.2.4. Alternativne metode povezivanja teških lanca

Heterodimerizacija teških lanaca bispecifičnih protutijela, posebice unutar CH3 domene, obuhvaća različite strategije dizajna kao što su steričke mutacije, elektrostatske interakcije i razlike naboja teških lanaca kako bi se olakšalo pročišćavanje. Ove metode se često kombiniraju kako bi se postigla heterodimerizacija teških lanaca bispecifičnog protutijela uz minimalno stvaranje homodimera (32).

Standardna razmjena modificiranih domena (*engl. Strand-exchange engineered domain, SEED*) jedna je od metoda koja omogućuje ispravno povezivanje teških lanaca. Fc heterodimerizacija potaknuta je isprepletanjem segmenta β -lanca u CH3 domeni ljudskog imunoglobulina G i A što rezultira tvorbom dva hibridna lanca SEED-GA i SEED-AG. IgG i IgA CH3 derivati stvaraju komplementarne sekvence koje omogućuju heterodimerizaciju komplementarnih teških lanca te onemogućuju stvaranje homodimera koji nisu komplementarni. Točke križanja odabrane su strukturnim poravnanjem IgA i IgG domena duž njihovih dviju osi simetrije (slika 11). Zajedničke točke križanja korištene su za promjenu redoslijeda i sastava izmjeničnih β -lanaca (32, 68). Tijekom razvoja ovih protutijela uočeno je da se mjesta vezanja FcRn i Proteina A nalaze unutar spoja CH2 i CH3 IgG protutijela, dok kod IgA nisu prisutna. Vezanjem na FcRn produljuje se vrijeme poluživota, a vezanje na Protein A koristi se za pročišćavanje. Molekularni modeli sugerirali su da je interakcija s FcRn smanjena u SEED-AG. Farmakokinetičkim ispitivanjima na miševima te mjerenjem vremena zadržavanja proteina A zaključeno je da modulirana SEED bispecifična protutijela imaju sličan profil kao konvencionalna SEED bispecifična protutijela. Terapijska procjena ove tehnike demonstrirana je usporedbom monovalentnog i bivalentnog anti-EGFR SEED-a s anti-EGFR protutijelom. Utvrđeno je slično vrijeme poluživota, stabilnost i potencijal za posredovanjem efektorskim funkcijama (57, 68).

Jedan od načina uklanjanja homodimernih nusprodukata tijekom pročišćavanja protutijela je ugradnja dvije mutacije u CH3 domenu jednog teškog lanca. Teški lanci ostaju gotovo nepromijenjeni čime se izbjegava imunogenost. Poznato je da IgG3 ne može vezati protein A. Prijenosom dvije IgG3 aminokiseline, arginina i fenilalanina, na IgG1 CH3 podjedinicu na položajima H435R i Y436F sprječava se vezanje ove podjedinice na protein A (68).



Slika 11. (A) Mogući SEED produkti, (B) Bispecifično CH3KiH SEED protutijelo dobiveno zamjenom domena (preuzeto i prilagođeno iz 32 i 68)

DEKK metoda stvaranja bispecifičnih protutijela se temelji na zajedničkom lakom lancu i stabilnoj strukturi IgG1. Za stvaranje protutijela potrebna je dvostruka mutacija dvaju teških lanaca. Parovi DEKK sastoje se od zamjena L351D i L368E u jednom lancu te zamjena L351K i T366K u drugom lancu. Stvaranjem solnih mostova između lizinskih ostataka, kao i nativnih i supstituiranih aminokiselinskih ostataka na suprotnom CH3 povećava se stabilnost DEKK heterodimera. MCL-128, bispecifično DEKK protutijelo koje se veže na Her2 i Her3 receptore nalazi se u kliničkim ispitivanjima za rak dojke, pluća, želudca i drugih karcinoma (57, 68).

Kappa-lambda ($\kappa\lambda$) metoda razlikuje se od ostalih jer teški lanci ostaju nepromijenjeni. Fiksni teški lanac veže se s κ - i λ - lakim lancem te se selektira vezanje za antigen pomoću prikaza faga. K- lanac se ispituje na "antigen A", a λ - lanac se ispituje na "antigen B". Teški lanac se proizvodi u CHO ili HEK293 stanicama zajedno s κ - i λ - lakim lancem. Pročišćavanje se provodi u tri koraka pomoću proteina-A, κ - i λ - selekcijskih kolona te se omogućuje izolacija čistih κ - λ protutijela. Oko 50% proizvedenih protutijela je pogrešno spareno (14, 68).

XmAb bispecifična platforma kombinira interakcije naboja, konformacijske promjene CH3 domene i vodikove veze kako bi se poboljšala termostabilnost bispecifičnih protutijela. Heterodimeri nastaju zamjenom bočnih lanaca aminokiselina u nativnom lancu IgG1. Aminokiselinama 364K i 370S zamijenjeni su bočni lanci pri čemu nastaje par S364K-K370S koji je povezan vodikovim vezama. Nastanak ovog para pogoduje stvaranju heterodimera

Nadalje, supstitucija L368D/K370S omogućava nastanak solnih mostova. Ova mjesta su izabrana na temelju minimalne površine izloženosti kako nastale promjene ne bi utjecale na vezanje na receptor. Zbog promjene strukture i mutacije parova naboja onemogućeno je stvaranje homodimera. Nastala bispecifična protutijela imaju različitu izoelektričnu točku od homodimera što olakšava njihovo pročišćavanje ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom (82).

3.2.5. Metode za ispravno povezivanje lakog lanca

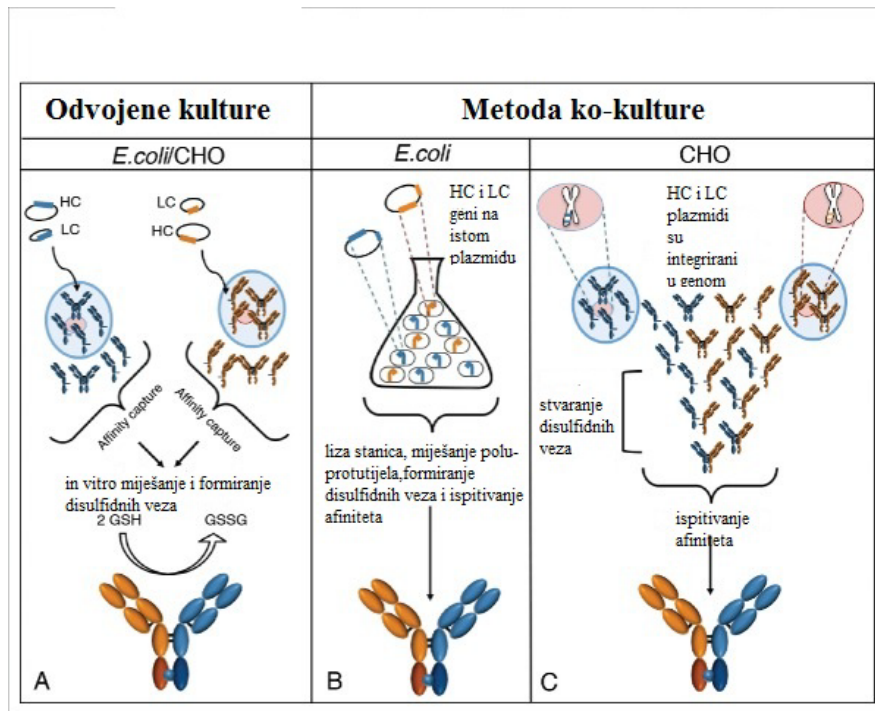
Unatoč prethodno navedenim metodama koje dovode do heterodimerizacije i ispravnog povezivanja teških lanaca i dalje ostaje problem ispravnog povezivanja lakih lanaca. Dva različita laka lanca daju četiri moguće kombinacije od kojih je samo jedna željeno bispecifično protutijelo. Metoda zajedničkog lakog lanca omogućuje stvaranje bispecifičnog protutijela korištenjem istog lakog lanca u oba Fab kraka protutijela. Temelji se na činjenici da protutijela naspram različitih antigena nastala metodom prikaza faga dijele istu varijabilnu regiju te posljedično u knjižnicama faga imamo mali broj različitih lakih lanaca. Nakon selekcije na različite antigene odabiru se identični laki lanci koji se kombiniraju s teškim lancima modificiranim metodom "dugme u rupu" kako bi nastalo funkcionalno bispecifično protutijelo. Krahl i suradnici opisali su identifikaciju zajedničkog lakog lanca pomoću transgenih štakora koji sadrže potpuno humanizirane varijabilne regije protutijela. Teški lanci odabrani iz kombinatorijske knjižnice kvasca kombinirani su s nasumično odabranim lakim lancima ili lakim lancima terapijskih protutijela. Selekcijom na različite antigene stvoreno je nekoliko bispecifičnih protutijela sa zajedničkim lakim lancem. Zajednički laki lanac koristi se sve češće kako bi se prevladali problemi stabilnosti, prinosa i imunogenosti bispecifičnih protutijela. Međutim, ovaj pristup može smanjiti mogućnost modificiranja protutijela čime se ograničava njihova optimizacija koja je potrebna kako bi se poboljšala svojstva protutijela kao što su izoelektrična točka ili konstanta disocijacije. Emicizumab, bispecifično protutijelo koje se koristi u terapiji hemofilije, prvo je odobreno protutijelo nastalo korištenjem metode zajedničkog lakog lanca (69, 114).

3.2.6. Metoda ko-kulture

Problem pogrešnog povezivanja lakih lanaca Spiess i suradnici pokušali su riješiti kombinacijom dvaju polovičnih protutijela koja dobivamo ekspresijom u različitim staničnim linijama. Polovična protutijela potrebno je prvo pročistiti, a zatim pomiješati u omjeru 1:1 kako bismo dobili bispecifična protutijela. Nedostatak ove metode je potreba za dvjema različitim kulturama i dva procesa pročišćavanja što uzrokuje povećanje troškova te raste rizik od kontaminacije. Primjenom metode ko-kulture moguće je izbjeći ove probleme (117).

U stanice *E. coli* ubacuju se plazmidi s genima za polovično protutijelo A i B. Potrebno je istovremeno uzgojiti podjednak broj stanica s genima za polovično protutijela A i B kako bi se dobilo što više ispravnih bispecifičnih protutijela. Polovična protutijela su modificirana metodom "dugme u rupu" kako bi se spriječila homodimerizacija teških lanaca. Transformirane stanice *E. coli* inokuliraju se zajedno u tekući medij pri standardnim uvjetima rasta kako bi se povećao broj stanica. Nakon razdoblja rasta smanjuje se razina fosfata u mediju te se dodaje izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid kako bi se inducirala proizvodnja polovičnih protutijela. Razdoblje indukcije traje 23-72h nakon čega se stanice liziraju, a polovična protutijela se otpuštaju u zajednički medij gdje se mogu slobodno heterodimerizirati (slika 12). Štoviše, oksidativno okruženje stvoreno lizom stanica omogućuje pravilno stvaranje disulfidnih veza između polovičnih protutijela. Cjelovita protutijela pročišćavaju se protein-A kromatografijom nakon čega se preostala polovična protutijela uklanjaju kromatografijom temeljenom na hidrofobnim interakcijama (112).

Druga mogućnost je primjena metode s CHO staničnim linijama koja se u nekim točkama razlikuje od metode s *E. coli*. U CHO stanicu se transfekcijom ubacuje DNA s genima za teški lanac i druga DNA s genima za laki lanac polovičnog protutijela kako bi se izbjeglo pogrešno sparivanje. Dvije stabilne stanične linije uzgajaju se u istom mediju pri čemu je ključno prilagoditi omjer dvaju CHO staničnih linija na temelju titra protutijela i stope rasta stanica kako bi se maksimizirala proizvodnja oba polovična protutijela s molarnim omjerom 1:1. Prije izolacije polovičnih protutijela dodaje se reducirani glutation (GSH) koji sprječava homodimerizaciju polovičnih protutijela i potiče stvaranje disulfidnih mostova čime se povećava prinos bispecifičnih protutijela. Ova metoda ima nisku cijenu, kompatibilna je s mnogim metodama heterodimerizacije teških lanaca što ju čini pogodnom za proizvodnju širokog spektra bispecifičnih protutijela (112, 133).

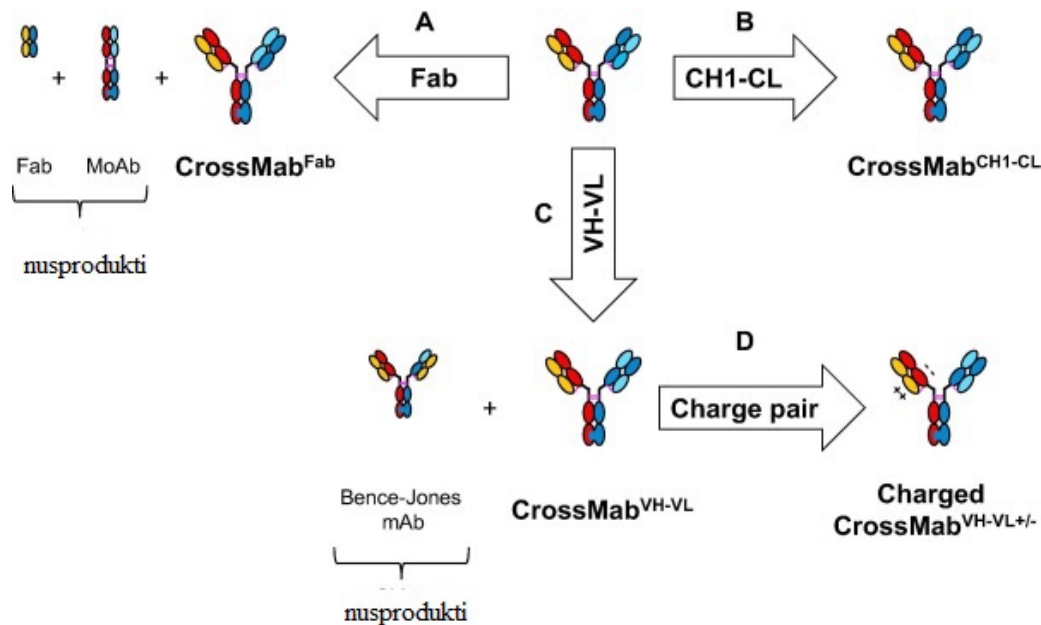


Slika 12. Metoda ko-kulture (preuzeto i prilagođeno iz 112)

3.2.7. CrossMab

CrossMab metodu je razvio Roche. Ona omogućuje ispravno povezivanje lakih lanaca bispecifičnog protutijela bez uporabe dodatnih linkera kada se kombinira s metodama "dugme u rupu" i SEED. Ova protutijela moguće je proizvesti konvencionalnim metodama koje se koriste i za proizvodnju uobičajenih protutijela, štoviše njihov prinos, kvaliteta i stabilnost mogu se uspoređivati s onima IgG protutijela. CrossMab protutijela osim klasičnih bivalentnih bispecifičnih protutijela mogu biti i trovalentna ili tetravalentna. Ispravno povezivanje lanca moguće je postići zamjenom cijelog Fab kraka teškog lanca sa srodnim lakim lancem jedne polovice bispecifičnog protutijela (CrossMab Fab), moguće je izmijeniti samo varijabilne domene VL-VH (CrossMab VH-VL) ili konstantne CH1-CL domene (CrossMab CH1-CL) unutar Fab fragmenta (slika 13). Najbolja se pokazala izmjena konstantnih domena jer ne nastaju nikakvi nusprodukti i prinos je najveći. Izmjenom cijelog Fab fragmenta nastaju nefunkcionalno monovalentno protutijelo i nefunkcionalni Fab fragment koje je potrebno ukloniti posebnim kromatografskim tehnikama. Kod funkcionalnog CrossMab VH-VL povezane su VH-CL i VL-CH1, međutim tijekom ove

izmjene može nastati tzv. Bence- Jones nusprodukt kod kojeg dolazi do povezivanja VL-CL jednog lakog lanca s ukriženim VL-CH1, odnosno dva različita laka lanca se međusobno povežu. Ovu pojavu moguće je spriječiti uvođenjem suprotnih naboja u dvije konstantne regije CH1 i CL prije ukrštavanja (57, 65, 116).

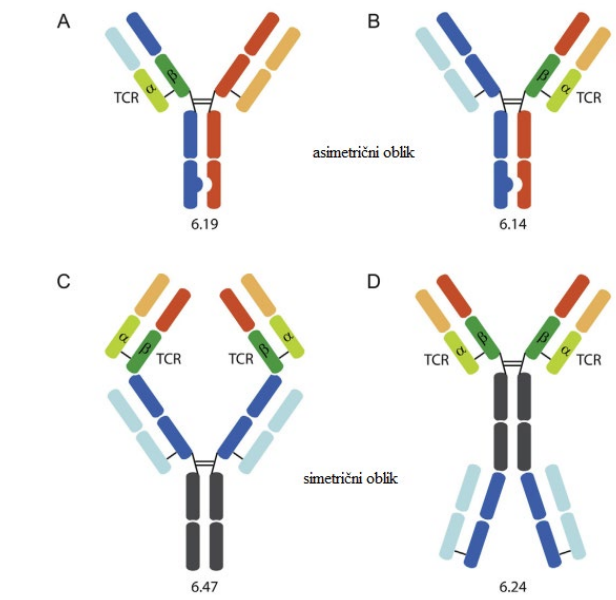


Slika 13. CrossMAB tehnika (preuzeto i prilagođeno iz 65)

3.2.8. WuxiBody

WuxiBody je inovativna platforma za proizvodnju bispecifičnih protutijela koju je razvio WuXi Biologics. CH1/CL regija jednog monoklonskog protutijela zamjenjuje se s konstantnom domenom receptora za T-stanice, na taj se način osigurava ispravno povezivanje srodnih lakih i teških lanaca. Ovom tehnologijom moguće je razviti simetrična i asimetrična bispecifična protutijela (slika 14). Heterodimerizacija asimetričnih WuXiBody protutijela osigurana je metodom "dugme u rupu". Primjenom ove metode razvoj lijeka se skraćuje za 6 do 18 mjeseci te se značajno smanjuju troškovi proizvodnje. WuXiBody platforma omogućuje povezivanje gotovo bilo kojeg para sekvenci monoklonskih protutijela u bispecifično protutijelo, a njegova strukturna fleksibilnost čini platformu prikladnom za izgradnju različitih formata različite valencije (dva, tri, četiri vezna mjesta). Ova protutijela imaju dugo vrijeme poluzivota te se očekuje da će im imunogenost biti niska zato što se većinski sastoje od jednostavne ljudske sekvence. Konstantna domena receptora za T-stanice

ima nisku izoelektričnu točku (pI) te stoga nastalo bispecifično protutijelo ima značajno nižu pI u odnosu na prvotno monoklonsko protutijelo. Na temelju tog svojstva, asimetrična WuXiBody protutijela se pomoću ionsko-izmjenjivačke kromatografije odvajaju od nusprodukata (49).



Slika 14. Asimetrična (A i B) i simetrična (C i D) WuXiBody protutijela (preuzeto i prilagođeno iz 49)

3.3. Mehanizam djelovanja bispecifičnih protutijela

Bispecifična protutijela zbog svoje strukture najčešće djeluju jednim od navedenih mehanizama (slika 15):

1. Aktivacija i preusmjerenje imunskih stanica

Bispecifično protutijelo jednim epitopom veže antigen na tumorskoj stanici, dok se drugim veže za antigen na imunskoj stanici. Dolazi do aktivacije imunostane stanice (najčešće T-limfociti ili stanice ubojice) i uništenja stanica tumora. Najčešće ciljno mjesto na imunskim stanicama je CD3 (57,67).

2. Blokiranje više signalnih puteva istovremeno

Tumorske stanice mogu postati imune na djelovanje lijeka promjenom signalnih puteva ili aktiviranjem unutarstaničnih signala kroz homo- ili heterodimerizaciju između samih članova porodice HER. Bispecifična protutijela mogu istovremeno

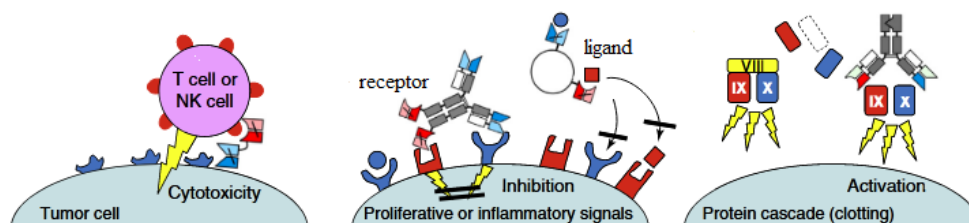
blokirati dva ili više signalnih puteva te na taj način spriječiti imunost tumorskih stanica i poboljšati terapijski učinak (11, 67).

3. Prisilno stvaranje proteinskih kompleksa

Bispecifična protutijela mogu povezati dva specifična proteina u funkcionalni kompleks koji može zamijeniti djelovanje proteina koji nedostaje. Ovaj mehanizam se koristi za terapiju hemofilije gdje bispecifično protutijelo veže faktor IXa i X kako bi se nadomjestio nedostatak faktora VIII (11,67).

4. Blokiranje imunskih kontrolnih točaka

Imunosne kontrolne točke (PD1, CTLA-4, LAG-3) inhibiraju aktivnost imunskih stanica. Kada protutijela blokiraju imunostne točke, imunostne stanice se mogu ponovno aktivirati. Bispecifična protutijela mogu istovremeno blokirati više imunostnih točaka te se zbog takvog mehanizma djelovanja najčešće koriste za terapiju solidnih tumora. (11, 57).



Aktivacija i preusmjeravanje imunskih stanica (Triomab, BiTE, DART, TandAB) Blokiranje više signalnih puteva istovremeno (DVD-Ig, IgG-scFv, 2in1-IgG, CrossMab...) Prisilno stvaranje proteinskih kompleksa (KiH, zajednički laki lanac- IgG)

Slika 15. Mehanizam djelovanja bispecifičnih protutijela (preuzeto i prilagođeno iz 67)

3.4. Terapijska primjena bispecifičnih protutijela

Bispecifična protutijela odobrena za primjenu kod ljudi su blinatumomab, emicizumab, amivantamab, faricimab, tebentafusp, mosunetuzumab, teklistamab te catumaksomab čije je odobrenje povučeno.

3.4.1. Blinatumomab

Blinatumomab je 2014. odobrio FDA kao drugu liniju za terapiju akutne limfocitne leukemije tipa B bez Philadelphia kromosoma. Godinu dana kasnije registriran je za primjenu u Europskoj uniji. Na tržištu se nalazi pod trgovačkim imenom BLINCYTO® u obliku praška koji sadrži 38,5 µg blinatumomaba. Molekulska masa mu je 54 kDa, a sastoji se od 504 aminokiseline. Proizvodi se u CHO stanicama tehnologijom rekombinantne DNA. To je BiTE® protutijelo konstruirano da povezuje CD19 pozitivne B-stanice sa CD3 pozitivnim T-stanicama, pri čemu se pokreće signalna kaskada koja aktivira T-stanice i proizvodnju citokina koji stvaraju citolitičku sinapsu. T-stanice zatim otpuštaju citolitičke proteine perforin i granzim u sinapsu, što uzrokuje apoptozu tumorskih stanica. CD19 je eksprimiran već u ranim fazama razvoja B-stanica te ga nalazimo kod više od 90% stanica karcinoma B-stanica, stoga je idealna meta protutijela za liječenje leukemija i limfoma B-stanica (47).

EMA je odobrila primjenu blinatumomaba za sljedeće indikacije:

1. kao monoterapija za liječenje odraslih osoba s recidivirajućom ili refraktornom CD19 pozitivnom, akutnom limfoblastičnom leukemijom (ALL) prekursora B limfocita. Bolesnici s Philadelphia kromosom pozitivnim ALL-om prekursora B limfocita trebali bi imati neuspješno liječenje s najmanje 2 inhibitora tirozin kinaze (*engl.* tyrosine kinase inhibitor, TKI) i nemati druge mogućnosti liječenja
2. kao monoterapija za liječenje odraslih osoba s Philadelphia kromosom negativnim, CD19 pozitivnim ALL-om prekursora B limfocita u prvoj ili drugoj potpunoj remisiji s minimalnom rezidualnom bolešću (MRB) većom ili jednakom 0,1%
3. kao monoterapija za liječenje pedijatrijskih bolesnika u dobi od navršene 1 godine ili starijih s Philadelphia kromosom negativnim, CD19 pozitivnim ALL-om prekursora B limfocita koji je refraktoran ili recidivirajući nakon primanja najmanje dvije

prethodne terapije ili recidivirajući nakon prethodnog liječenja alogenom transplantacijom hematopoetskih matičnih stanica

4. kao monoterapija za liječenje pedijatrijskih bolesnika u dobi od 1 godine ili starijih s visokorizičnim prvim recidivom Philadelphia kromosom negativnog, CD19 pozitivnog ALL-a prekursora B limfocita, kao dio konsolidacijskog liječenja (35).

Farmakokinetika

Farmakokinetika je linearna u rasponu doza od 5 do 90 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dan}$. Nakon kontinuirane venske infuzije, koncentracija u serumu postiže stanje ravnoteže (C_{ss}) unutar jednog dana i ostaje stabilna. Povećanje srednje vrijednosti C_{ss} približno je proporcionalno povećanju doze u testiranom rasponu doza. Nakon prestanka primjene infuzije, koncentracija se brzo smanjuje kinetikom prvog reda.

Srednja vrijednost volumena distribucije V_D bazirana na terminalnoj fazi V_Z , uz kontinuiranu intravensku infuziju blinatumomaba, procijenjena je na 4,52L. Volumen distribucije sličan je volumenu plazme iz čega možemo zaključiti da je blinatumomab većinom distribuiran u vaskularnom prostoru.

Metabolički put blinatumomaba nije poznat, ali se pretpostavlja da se razgradi u male peptide i aminokiseline kroz kataboličke puteve. Klirens je vrlo brz i iznosi 2,72L/h, a poluvrijeme života je kratko i iznosi 2,11h.

Koncentracija blinatumomaba u urinu određivana je kod deset pacijenata koji su primili 60 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dan}$ putem kontinuirane infuzije. U 80% ispitanika koncentracija u urinu bila je ispod (200 pg/mL). Količina nepromijenjenog blinatumomaba u urinu iznosila je 0,2% iz čega je vidljivo da bubrežna eliminacija ima ograničen doprinos izlučivanju ovog protutijela. Istraživanja su pokazala da dob, tjelesna težina, spol i površina tijela ne utječu na farmakokinetiku.

Službena ispitivanja na bolesnicima s oštećenom funkcijom jetre i bubrega nisu provedena (35, 142).

Doziranje

Primjenjuje se u dva ciklusa pri čemu jedan ciklus traje 28 dana, a razmak između dva ciklusa mora biti 14 dana. Bolesnicima kod kojih se postigne remisija nakon dva ciklusa liječenja moguće je uvesti još tri dodatna ciklusa konsolidacijskog liječenja blinatumomabom.

Prvih sedam dana prvog ciklusa primjenjuje se doza od 9 µg putem kontinuirane infuzije, a zatim se do kraja liječenja primjenjuje doza od 28 µg na dan. Pacijenta je potrebno hospitalizirati prvih devet dana prvog ciklusa i prva dva dana drugog ciklusa kako bi se motrili simptomi sindroma otpuštanja citokina i neurotoksičnosti. Sat prije započinjanja svakog ciklusa mora se intravenski primijeniti 20mg deksametazona. Kako bi se spriječio recidiv ALL-om u središnjem živčanom sustavu preporučuje se profilaktičko liječenje intratekalnom kemoterapijom odnosno kemoterapijom koja se primjenjuje u tekućinu između ovojnice kralježničke moždine i mozga.

U slučaju teških i po život opasnih toksičnosti kao što su sindrom otpuštanja citokina, sindrom lize tumora, neurološka toksičnost ili povišeni jetreni enzimi potrebno je privremeno ili trajno prekinuti liječenje (35).

Klinička ispitivanja

Kliničko ispitivanje faze I provedeno je 2001. na ispitanicima koji su imali R/R indolentni ne-Hodgkinov limfom (NHL) i kroničnu limfocitnu leukemiju. Blinatumomab je primijenjen kratkom infuzijom nakon čega je došlo do značajne toksičnosti, uključujući i neurotoksičnost te je ispitivanje moralo biti ranije prekinuto. U naknadno provedenoj fazi I ispitivanja (MT103-104) blinatumomab je primijenjen u obliku kontinuirane infuzije. U ispitivanje je bilo uključeno 76 pacijenata s indolentnim NHL-om povećanje doza kretalo se 0,5-90 µg/m²/dan te je primjena trajala 4-8 tjedana. 73% od ukupnog broja ispitanika doživjelo je neki neurološki događaj, dok je njih 21% doživjelo neurološki događaj trećeg stupnja. Maksimalna tolerirana doza iznosila je 60 µg/m²/dan. Autori ove studije zaključili su da profilaktička primjena kortikosteroida dovodi do smanjenja broja prekida terapija zbog neurotoksičnosti (35).

Neželjeni događaji

Gotovo 99% pacijenata koji su primjenjivali blinatumomab doživjelo je neku nuspojavu, približno 62% ispitanika doživjelo je ozbiljnu nuspojavu, dok je njih 19,1% doživjelo nuspojavu opasnu po život, a 12,4% ispitanika doživjelo je nuspojave zbog kojih su morali prekinuti terapiju. Najznačajnije nuspojave su sindrom otpuštanja citokina i neurotoksičnost koja uključuje encefalopatiju, konvulzije, tremor, zbunjenost, ataksiju. Kod 50% pacijenata zabilježena je neurotoksičnost, dok je kod približno 15% pacijenata zabilježena neurotoksičnost trećeg ili višeg stupnja (encefalopatija, napadaji, poremećaj govora, poremećaj svijesti, konfuzija i dezorijentacija te poremećaji koordinacije i ravnoteže). Ovi događaji javljaju se devet dana od početka primjene lijeka. Sindrom otpuštanja citokina javio se kod oko 11% pacijenata. Ostale česte nuspojave su povišena temperatura, infekcije i mišićna supresija, sindrom lize tumora (35).

Sindrom otpuštanja citokina očituje se simptomima sličnim prehladi, hipotenzijom, simptomima sindroma povećane propusnosti kapilara te multiorganskim zatajenjem. Javlja se početkom prvog ciklusa zbog ekspanzije T stanica i otpuštanja citokina. Rizik je povećan kod bolesnika s težom slikom bolesti. Pojavu ovog sindroma moguće je izbjeći povećanjem doze u dva koraka te primjenom deksametazona prije početka terapije (35).

Neurotoksičnost nastaje kao posljedica otpuštanja neurotoksičnih citokina i kemokina nakon aktivacije T stanica. Javlja se unutar devet dana od primjene blinatumomaba te ju je moguće liječiti primjenom deksametazona ili prekidom terapije. Prije primjena blinatumomaba potrebno je napraviti neurološki pregled pacijenta te pratiti znakove neurološke toksičnosti tijekom primjene lijeka. U slučaju napada, preporučuje se liječenje antikonvulzivima (35).

Usporedba učinkovitosti terapije blinatumomabom i kemoterapije

Kliničko ispitivanje faze III (NCT02013167) provedeno je u 101 centru u 21 državi. U ispitivanju su sudjelovale osobe starije od 18 godina s Philadelphia kromosom negativnom akutnom limfocitnom leukemijom tip B. Kako bi pacijenti bili uključeni u studiju, bolest je morala biti otporna na primarnu induksijsku terapiju ili na djelovanje intenzivnom kombiniranom kemoterapijom, prvi recidiv s remisijom koja traje kraće od 12 mjeseci, drugi ili veći relaps ili recidiv u bilo kojem trenutku nakon alogenske transplantacije matičnih stanica. Dodatni kriteriji prihvatljivosti uključivali su više od 5% blasta u koštanoj srži i

status uspješnosti Eastern Cooperative Oncology Group skale od 2 ili manje. Eastern Cooperative Oncology Group skala se koristi za procjenu općeg stanja pacijenta te njegove sposobnosti obavljanja svakodnevnih aktivnosti. U onkologiji se koristi za procjenu sposobnosti pacijenta da podnese terapiju. Ključni kriteriji isključenja bili su drugi aktivni karcinomi, klinički relevantno patološko stanje središnjeg živčanog sustava, izolirana ekstramedularna bolest, autoimuna bolest, akutna bolest presatka protiv domaćina (*engl.* Graft Versus Host Disease, GVHD) stupnja 2 ili više ili aktivna kronična GVHD, transplantacija alogениh matičnih stanica unutar 12 tjedana prije randomizacije, autologna transplantacija matičnih stanica 6 tjedana prije randomizacije, kemoterapija ili radioterapija unutar 2 tjedna prije randomizacije te imunoterapije unutar 4 tjedna prije randomizacije.

Ispitanici koji ispunjavaju uvjete bili su nasumično raspoređeni u omjeru 2:1 u dvije skupine ovisno jesu li primali blinatumomab ili standardnu kemoterapiju. Randomizacija je provedena prema dobi (< 35 ili > 35), prethodno primjenjivanoj terapiji te prethodnoj alogenoj transplantaciji matičnih stanica. Ispitanici su trebali primiti do dva ciklusa indukcijske terapije; osim toga, u svakoj skupini, ispitanici u morfološkoj remisiji ($\leq 5\%$ blasta koštane srži) trebali su primiti do tri ciklusa konsolidacijske terapije, a ispitanici s kontinuiranom morfološkom remisijom trebali su primiti do 12 mjeseci terapije održavanja. Indukcijska i konsolidacijska terapija blinatumomabom provedena je u ciklusima koji su trajali šest tjedana, od čega je ispitanik četiri tjedna primao terapiju, a dva tjedna nije. Prije primjene blinatumomaba ispitanici su dobili profilaktičku terapiju deksametazonom. Kod ispitanika koji su primali standardnu kemoterapiju ispitivači su birali između četiri režima fludarabina, visoke doze citozin arabinozida te faktor koji stimulira koloniju granulocita (*engl.* Granulocyte Colony Stimulating Factor, GCSF) sa ili bez antraciklina.

Nakon provedenog ispitivanja i statističke obrade podataka utvrđeno je da terapija blinatumomabom uzrokuje znatno dulje ukupno preživljavanje u odnosu na standardnu kemoterapiju. Rizik od smrtnog ishoda bio je 29% manji, a preživljavanje 3,7 mjeseci dulje u odnosu na standardnu kemoterapiju. Kompletна remisija s potpunim hematološkim oporavkom te kompletна remisija s djelomičnim ili nepotpunim hematološkim oporavkom bila je češća kod ispitanika koji su primali blinatumomab, a medijan trajanja remisije bio je dulji. Nakon prilagodbe na razlike u izloženosti liječenju između dvije skupine, pokazano je da je učestalost nuspojava bila niža kod skupine koja je primala blinatumomab. Učestalost neuroloških nuspojava trećeg ili višeg stupnja bila je podjednaka kod obje skupine ispitanika.

Sindrom otpuštanja citokina zabilježen je samo u skupini koja je primjenjivala blinatumomab, ali nije zahtijevao prekid terapije. Opće zdravstveno stanje i ocjena kvalitete života poboljšali su se u skupini koja je primala blinatumomab, a pogoršali u skupini koja je primala kemoterapiju, s omjerom rizika za pogoršanje u analizi ovisnosti događaja o vremenu od 0,67. Omjeri opasnosti za druge ishode koji utječu na kvalitetu života bili su od 0,59 do 0,80 u korist blinatumomaba, s gornjim granicama intervala pouzdanosti od 95% koji su bili manji od 1,0 u svim podskalama i pojedinačnim stavkama, osim za nesanicu (60).

3.4.2. Emicizumab

Emicizumab (trgovačko ime HEMLIBRA®) je humanizirano imunoglobulinu G slično bispecifično protutijelo koje se koristi za rutinsku profilaksu epizoda krvarenja kod bolesnika s hemofilijom A kod kojih su prisutni inhibitori faktora VIII te kod bolesnika s teškim oblikom hemofilije A kod kojih nisu pronađeni inhibitori faktora VIII. Primjenu za navedenu indikaciju su 2018. odobrile EMA i FDA. Primjenjuje se kod svih dobnih skupina. Povezuje aktivirane faktore IX i X te na taj način uspostavlja hemostazu koja je narušena zbog nedostatka aktiviranog faktora VIII.

Hemofilija se može liječiti i primjenom rekombinantnog faktora VIII, međutim mogu se javiti inhibitori faktora VIII koji smanjuju njegov učinak. Emicizumab strukturno nije sličan faktoru VIII pa inhibitori faktora VIII ne utječu na njegovo djelovanje. U modelu krvi s hemofilijom A emicizumab je povećao stabilnost ugrušaka u prisustvu koncentrata aktiviranog protrombinskog kompleksa (aPCC) stoga njihova istovremena primjena može povećati rizik od trombotičkih događaja (12, 36).

Sličnosti i razlike faktora VIII i emicizumaba

Iako emicizumab oponaša djelovanje faktora VIII, ove dvije molekule razlikuju se u strukturi te imaju različite biokemijske učinke (tablica 1).

Tablica 1. Sličnosti i razlike faktora VIII i emicizumaba (86)

Faktor VIII	Emicizumab
Heterodimerni protein s molekulskom masom od približno 280 kDa i normalnom plazmatskom koncentracijom od 0,4 nM.	Humanizirano bispecifično protutijelo molekulske mase 150kDa. Ciljna plazmatska koncentracija je približno 0,4 μ M.
Poluvrijeme života je 12 sati	Poluvrijeme života je 30 dana
Potrebna je prethodna aktivacija proteolizom posredovanom trombinom kako bi se postigla kofaktorska aktivnost	Nije potrebna aktivacija molekule
FVIIIa pokazuje punu aktivnost kofaktora; potiče vezanje FIXa na fosfolipide, stabilizira aktivno mjesto FIXa, i konačno premošćuje FIXa do FX	Pokazuje djelomičnu aktivnost kofaktora povezujući faktor IXa s faktorom X. Proces također ovisi o pravilno usklađenim ciljnim proteinima na površini fosfolipida
Plazmatska koncentracija faktora VIII značajno je niža od koncentracija faktora IX i X što znači da je aktivnost tenaze ograničena količinom stvorenog faktora VIIIa	Plazmatska koncentracija emicizumaba je 0,4 μ M te je puno veća od koncentracije endogenog faktora IXa i X. Količina stvorenog faktora IXa ograničava stvaranje faktora X
Katalitička učinkovitost FIXa u prisutnosti FVIIIa 11 puta je veća od one FIXa u prisutnosti emicizumaba	Katalitička učinkovitost FIXa u prisutnosti emicizumba 11 puta je manja od one FIXa u prisutnosti faktora VIII
Faktor VIIIa ima visok afinitet za svoje ciljne čimbenike. U nedostatku fosfolipidnog dvosloja, faktor VIIIa se veže na faktor IXa s afinitetom od 15 nM i na faktor X s afinitetom od 0,3 μ M. Nasuprot tome, faktor VIIIa pokazuje samo slabo ili nikakvo vezanje za faktor IX i faktor Xa	Sličnim afinitetom se veže za prekursorske faktore IX i X te za njihove aktivirane oblike faktore IXa i Xa.

Farmakokinetika

Emicizumab nakon subkutane primjene ima farmakokinetiku proporcionalnu dozi u rasponu doza 0,3 - 6 mg/kg kada se primjenjuje jednom tjedno. Kada je, kod pacijenata s hemofilijom A, kao inicijalna doza primjenjena udarna doza koja iznosi 1-3 mg/kg plazmatska koncentracija emicizumaba postigla je stanje dinamičke ravnoteže nakon 12 tjedana. Nakon višestruke subkutane primjene doze od 3 mg/kg jednom tjedno tijekom prva četiri tjedna kod ispitanika s hemofilijom A, srednja vrijednost najnižih plazmatskih koncentracija emicizumaba dosegla je $52,6 \pm 13,6$ µg/ml u 5. tjednu (12, 36).

Poluvrijeme apsorpcije iznosi 1,6 dana. Kod zdravih ispitanika apsolutna bioraspoloživost nakon primjene doze od 1 mg/kg iznosila je 80,4 - 93,1%. Slični farmakokinetički profili primijećeni su i nakon subkutane primjene u abdomen, nadlakticu i bedro te se emicizumab može naizmjenično primjenjivati na tim mjestima (12).

Volumen distribucije u stanju dinamičke ravnoteže nakon primjene jedne intravenske doze emicizumaba od 0,25 mg/kg kod zdravih ispitanika iznosio je 106 mL/kg odnosno 7,4 L za odraslu osobu od 70 kg). Prividni volumen distribucije (V/F) kod ispitanika s hemofilijom A nakon višekratnih subkutanih doza emicizumaba, procijenjen na temelju populacijske farmakokinetičke analize, iznosio je 10,4 L. Prosječni prividni klirens emicizumaba kod ispitanika oboljelih od hemofilije A iznosio je 0,27 L/dan, a srednje prividno poluvrijeme eliminacije je približno 27 dana (12, 36).

Na farmakokinetiku ne utječe dob, rasa, prisutnost inhibitora faktora VIII, blago ili umjereno oštećenje jetre te blago ili umjereno oštećenje bubrega. Prividni klirens i volumen distribucije emicizumaba rastu s povećanjem tjelesne težine, stoga je potrebno prilagoditi dozu tjelesnoj masi pacijenta. Hiperkoagulabilnost se može pojaviti kada se emicizumab primjenjuje istodobno s rekombinantnim FVIIa ili FVIII. Do trombotičkih događaja može doći i kada se istovremeno primjenjuju sistemski antifibrinolitici i aktivirani koncentrat protrombinskog kompleksa ili rekombinantni FVIIa kod bolesnika koji primaju emicizumab. Stoga je potrebno razmotriti prekid terapije aktiviranim koncentratom protrombinskog kompleksa i rekombinantnim FVIIa prije početka primjene emicizumaba (12).

Doziranje

Terapija započinje udarnom dozom od 3 mg/kg koja se primjenjuje jednom tjedno tijekom četiri tjedna. Nakon primjene udarne doze primjenjuje se doza održavanja 1,5 mg/kg jednom tjedno ili 3 mg/kg svaka dva tjedna ili 6 mg/kg svaka četiri tjedna. Primjenjuje se supkutano u abdomen, vanjski dio nadlaktice ili bedro (36).

Interakcije

Interakcije drugih lijekova i emicizumaba nisu opisane.

Testovi koji se temelje na unutarnjem putu zgrušavanja ne bi se trebali koristiti za praćenje aktivnosti emicizumaba zato što ovi testovi mjere ukupni put zgrušavanja uključujući i vrijeme potrebno da trombin aktivira faktor VIII u VIIIa. Stoga ovi testovi pokazuju skraćeno vrijeme zgrušavanja kod primjene emicizumaba koji ne zahtijeva aktivaciju trombinom. Testovi na koje utječe emicizumab su aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (aPTV), Bethesda testovi za određivanje titra inhibitora faktora VIII, jednostupanjski testovi za određivanje pojedinačnih faktora koagulacije koji se temelje na aPTV-u, test za utvrđivanje otpornosti na aktivirani protein C koji se temelji na aPTV-u te aktivirano vrijeme zgrušavanja (ACT) (36, 86).

Klinička ispitivanja

Djelotvornost emicizumaba u profilaksi hemofilije A sa ili bez prisutnosti inhibitora faktora VIII ispitana je u četiri kliničke studije HAVEN 1, 2, 3, 4.

U HAVEN 1 studiju bilo je uključeno 109 ispitanika koji su bolovali od hemofilije A s inhibitorima faktora VIII, a 94% ispitanika imalo je teški oblik hemofilije A. Ispitanici koji su prethodno primali lijekove koji zaobilaze aktivnost faktora VIII za liječenje epizode krvarenja podijeljeni su u dvije skupine u omjeru 2:1. U skupini A su se nalazili ispitanici koji su primali profilaksu emicizumabom, dok su u skupini B bili oni koji nisu primala profilaksu emicizumabom. U skupini C nalazili su se ispitanici koji su prethodno primali profilaksu lijekovima koji zaobilaze aktivnost faktora VIII te su tijekom ispitivanja primali profilaksu emicizumabom. U skupini D bili su ispitanici koji su prethodno bili uključeni u neintervencijsku studiju, ali se nisu stigli uključiti u skupine A i B prije njihova zatvaranja. Ispitanici iz skupina A, C i D primali su emicizumab subkutano u dozi od 3 mg/kg tijekom

četiri tjedna, a zatim u dozi od 1,5 mg/kg. Ispitanici iz skupine B nisu primali profilaksu, nakon najmanje 24 tjedna bez profilakse mogli su prijeći na primjenu emicizumaba.

Primarni cilj ispitivanja bio je ocijeniti terapijski učinak tjedne profilakse emicizumabom u odnosu na liječenje bez profilakse kod ispitanika koji su prethodno primali lijekove koji zaobilaze aktivnost faktora VIII za liječenje epizoda krvarenja. Pratio se broj epizoda krvarenja koje su zahtijevale liječenje faktorima koagulacije tijekom vremena (najmanje 24 tjedna ili do datuma prekida primjene). Ostali ciljevi randomizirane usporedbe skupina A i B bili su djelotvornost tjedne profilakse emicizumabom u smanjivanju svih krvarenja, spontanih krvarenja, krvarenja u zglobove i krvarenja u ciljne zglobove (zглоbove kod kojih se ponavlja krvarenje). Osim prethodno navedenih ispitivanja, ispitivana je i djelotvornost tjedne profilakse emicizumabom u usporedbi s prethodnom primjenom lijekova koji zaobilaze aktivnost faktora VIII (skupina A i C).

Skupina A koja je primala emicizumab imala je značajno manje epizoda krvarenja u odnosu na skupinu B koja nije primala nikakvu profilaksu. Više od polovice ispitanika koji su primili emicizumab nije imalo ni jednu epizodu krvarenja. Intraindividualne usporedbe pokazale su da je među pacijentima koji su sudjelovali u neinterventnoj studiji godišnja stopa krvarenja značajno smanjena ($p < 0,0001$) profilaksom emicizumabom u usporedbi s prethodnom primjenom lijekova koji zaobilaze aktivnost faktora VIII kao terapije ili profilakse. Profilaktička primjena emicizumaba dovela je do poboljšanja kvalitete života. Kod adolescenata koji su prethodno liječeni lijekovima koji zaobilaze aktivnost faktora VIII ($n=13$), došlo je do poboljšanja u odnosu na početnu vrijednost u procjeni kvalitete života specifične za hemofiliju (*engl.* Haemophilia-A-Quality of Life, Haem-A-QoL) U 25. tjednu, 50-52% ispitanika koji su primali profilaksu emicizumabom naspram 7% ispitanika koji nisu primali profilaksu postiglo je poboljšanja u odnosu na početnu vrijednost u ukupnim rezultatima Haem-A-QoL. Za rezultate u domeni fizičkog zdravlja Haem-A-QoL, 72% primatelja emicizumaba koji su prethodno bili liječeni lijekovima koji zaobilaze aktivnost faktora VIII i 38% onih koji su prethodno bili liječeni profilaktičkim lijekovima koji zaobilaze aktivnost faktora VIII postiglo je poboljšanja u odnosu na početnu vrijednost, u usporedbi s 29% ispitanika koji nisu primali nikakvu profilaksu (12,36,90).

HAVEN 2 studija ispitivala je učinkovitost primjene emicizumaba kod djece mlađe od 12 godina koja boluju od hemofilije A uz prisustvo inhibitora FVIII. U ispitivanju je sudjelovalo 85 djece koja su prethodno primjenjivala lijekove koji zaobilaze djelovanje FVIII kao terapiju

ili profilaksu. Emicizumab su primjenjivali u dozi od 3 mg/kg tijekom četiri tjedna te zatim u dozi od 1,5 mg/kg jednom na tjedan. Studija je pokazala da se primjenom emicizumaba značajno smanjuje rizik od krvarenja te većina ispitanika nije imala ni jednu epizodu krvarenja. Intraindividualna usporedba pokazala je da je među ispitanicima u dobi <12 godina koji su primjenjivali emicizumab u dozi od 1,5 mg/kg jednom tjedno stopa liječenih krvarenja smanjena za 98% u usporedbi s prethodnim tretmanom lijekovima koji zaobilaze djelovanje FVIII. Kao i u prethodnim skupinama došlo je do poboljšanja rezultata Haem-A-QoL. Udio ispitanika koji nisu propustili dnevne obaveze u prethodna 4 tjedna bio je 28% na početku terapije, dok je nakon 25 tjedana terapije iznosio čak 83% (36).

U HAVEN 3 studiju bilo je uključeno 152 ispitanika koji su bolovali od hemofilije A bez prisustva inhibitora FVIII. Skupina A je dobivala emicizumab subkutano u dozi od 3 mg/kg tijekom četiri tjedna a zatim u dozi od 1,5 mg/kg. Skupina B je dobivala subkutano emicizumab u dozi od 3 mg/kg svaka dva tjedna te skupina C nije dobivala nikakvu profilaksu. U skupini D nalazili su se pacijenti koji su prethodno primjenjivali faktor VIII kao profilaksu, oni su dobivali emicizumab subkutano u dozi od 3 mg/kg tijekom četiri tjedna, a zatim u dozi od 1,5 mg/kg. Nakon 25 tjedana primjene uspoređeni su rezultati pojedinih skupina. Skupina koja je primala emicizumab kao profilaksu je imala značajno manje epizoda svih tipova krvarenja u odnosu na skupinu koja nije dobivala profilaksu. Prema intraindividualnoj usporedbi, godišnja stopa krvarenja bila je značajno smanjena ($p < 0,001$) kod profilakse emicizumabom u usporedbi s prethodno primjenjivanom profilaksom FVIII u neinterventnoj studiji. U 25. tjednu primjene ispitanici koji su primjenjivali emicizumab u dozi od 1,5 mg/kg svaki tjedan te oni koji su primjenjivali 3 mg/kg svaka dva tjedna imali su poboljšanje od 12,5 odnosno 16,0 bodova u odnosu na skupinu koja nije primjenjivala profilaksu u ukupnim rezultatima Haem-A-QoL. 94% ispitanika preferira terapiju emicizumabom u odnosu na ostale mogućnosti liječenja zbog rjeđe i jednostavnije primjene te zbog smanjene učestalosti krvarenja (12,36).

HAVEN 4 studija ispitivala je učinkovitost terapije emicizumabom kada se primjenjuje svaka četiri tjedna. Postignuta je klinički značajna kontrola krvarenja u odraslih i adolescenata u dobi od ≥ 12 godina s hemofilijom A te kod više od polovice ispitanika nije zabilježeno krvarenje. U 25. tjednu ispitivanja kod 68% pacijenata srednja vrijednost promjene u odnosu na početnu vrijednost rezultata fizičkog zdravlja Haem-A-QoL bila je $-15,41$, što je premašilo prag ≥ 10 bodova. Prosječni udjeli propuštenih školskih i radnih

dana u prethodna 4 tjedna bili su 5% i 12% na početku, odnosno 1% i 3% u 25. tjednu. Rezultati istraživanja EmiPref pokazali su da su svi pacijenti u proširenoj kohorti HAVEN 4 preferirali emicizumab u odnosu na svoje prethodno liječenje (12).

3.4.3. Catumaksomab

Catumaksomab (trgovačko ime Removab®) je prvo bispecifično trifunkcionalno protutijelo koje je EMA 2009. odobrila za terapiju malignog ascitesa. Zbog komercijalnih razloga odobrenje je 2013. povučeno s američkog tržišta, a 2017. i s europskog. Danas se ispituje njegova učinkovitost u terapiji karcinoma želuca, jajnika i epitela. Sastoji se od fragmenata lakog i teškog lanca mišjeg protutijela koje se veže na CD3 antigen na površini T limfocita te fragmenata lanaca štakorskog monoklonskog protutijela koje se veže na EpCAM antigen koji se nalazi na površini mnogih tumorskih stanica. Ovi lanci se kvadroma tehnologijom povezuju u jedno bispecifično protutijelo koje se osim na navedene mete veže i na Fc receptor. Korištenje fragmenata lakog i teškog lanca različitih vrsta smanjuje mogućnost pogrešnog povezivanja lanaca jer se laki i teški lanac iste vrste vežu većim afinitetom u odnosu na lance različitih vrsta. Fc fragment catumaksoomaba veže se na aktivacijske receptore FcγRI, FcγRIIa i FcγRIII, dok se za inhibicijski FcγRIIb receptor ne veže. Posljedično dolazi do aktivacije makrofaga, NK stanica i dendritičnih stanica što rezultira kompleksnim imunskim odgovorom. Nakon vezanja catumaksomaba na antigene dolazi do lize posredovane T-stanicama, fagocitoze, stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelu te citotoksičnosti posredovane citokinima što uzrokuje lizu tumora (57,109).

Farmakokinetika

Farmakokinetika je ispitivana tijekom i nakon intraperitonealnih infuzija sa 10, 20, 50 i 150 µg catumaksomaba. Prosječna maksimalna koncentracija u plazmi je 0,5 ng/mL. Srednje prividno poluvrijeme eliminacije je 2,5 dana. Razina catumaksomaba u plazmi je padala nakon postignute maksimalne vrijednosti nakon svake doze (104).

Nuspojave

Podnošljivost catumaksomaba je dobra s prihvatljivom toksičnošću. Česte nuspojave su povišena tjelesna temperatura, mučnina, povraćanje, dispneja, hipotenzija ili hipertenzija (104).

Klinička ispitivanja

Multicentrično kliničko ispitivanje faze I/II provedeno je 2007. na pacijentima s teškim oblikom karcinoma jajnika kako bi se utvrdila maksimalna tolerabilna doza i sigurnosni profil catumaksomaba. Ispitivanje je provedeno u dozama od 10, 20, 50, 150 i 200 µg koje bi se primjenjivale svaka 3 dana, a primjena je ponovljena jedan do pet puta. Dvoje od sedam ispitanika doživjelo je neželjene reakcije ovisne o dozi koje su uključivale opstrukciju debelog crijeva i povišenje GGT-a. Neželjene reakcije javile su se pri primjeni lijeka u dozi od 200 µg te su stoga doze od 10, 20, 50 i 150 µg preporučene doze faze II kliničkog ispitivanja. Najčešće nuspojave bile su povišena tjelesna temperatura, mučnina, povraćanje, abdominalna bol. Ovom ispitivanju slijedilo je randomizirano otvoreno kliničko ispitivanje faza II/III koje je provedeno 2010. U ispitivanju je sudjelovalo 129 osoba koje su imale karcinom jajnika i 129 osoba koje su imale neovarijalni karcinom, a imali su epitelne EpCAM pozitivne tumore. U obje skupine ispitanici su randomizirani u omjeru 2:1 na one kojima je provedena paracenteza te na one kojima je provedena paracenteza u kombinaciji s catumaxomabom. Krajnja točka, preživljavanje bez punkcije, bilo je značajno duže u skupini koja je primala catumaksomab u usporedbi s kontrolnom skupinom (medijan 46 dana naspram 11 dana; $p < 0,0001$). Sekundarna krajnja točka, medijan vremena do sljedeće paracenteze, također je poboljšana s catumaksomabom (77 naspram 13 dana; HR 0,169; 95% CI 0,114–0,251) posebno u bolesnika s karcinomom želuca (118 prema 15 dana; HR 0,143; 95% CI – 0,05% CI 0,359). Ispitanici koji su primjenjivali catumaksomab imali su i manje znakova i simptoma ascitesa. Burges i suradnici su u svom ispitivanju mjerili TNF α i IL-6 na početku i nakon terapije. 74% ispitanika imalo je normalne razine oba imunološka markera u serumu na početku, ali nakon infuzije udio ispitanika s povišenim vrijednostima IL-6 i TNF α bio je 80% odnosno 60% (18, 70).

Humana antimišja protutijela (*engl.* Human Anti-Mouse Antibody, HAMA) izmjerena su u studiji raka jajnika faze I/II. Svi ispitanici su bili negativni na HAMA na početku studije, ali do kraja liječenja 14 od 15 ispitanika premašilo je gornju granicu normale vrijednosti HAMA.

Nakon provedenih kliničkih ispitivanja utvrđeno je da catumaksomab ima visok terapijski potencijal i prihvatljiv sigurnosni profil. Primjenjuje se intraperitonealno u dozama 10-150 µg četiri do pet puta u razmaku od 10-14 dana. (109).

3.4.4. Amivantamab

Amivantamab (trgovačko ime Rybrevant®) je humano bispecifično protutijelo slično imunoglobulinu G1 koje se koristi za terapiju karcinoma nemalih stanica pluća. Odobrile su ga EMA i FDA 2021. Karcinom nemalih stanica pluća (*engl.* Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) čini 80-85% svih karcinoma pluća. Podtipovi NSCLC-a su adenokarcinom, karcinom skvamoznih stanica i karcinom velikih stanica. 10-15% oboljelih od NSCLC-a imaju karcinom kod kojeg je prisutna mutacija na receptoru za epidermalni faktora rasta (*engl.* Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR). Taj receptor je receptorska proteintirozin-kinaza koja je važna za diobu i rast stanica. Petogodišnja stopa preživljavanja osoba oboljelih od NSCLC-a kod kojih je prisutna ova mutacija, a koji su liječeni s inhibitorima EGFR tirozin-kinaze, manja je od 20%. Kako bi se povećala stopa preživljavanja, potrebno je istražiti nove metode liječenja (128, 137).

Mete ovog protutijela su receptor epidermalnog faktora rasta i epitelno-mezenhimalni tranzicijski faktor (*engl.* mesenchymal epithelial transition factor, MET). EGFR i MET signalni putevi utječu na rast tumorskih stanica. Osim što utječe na rast tumora, aktivacija MET signalnog puta uzrokuje otpornost tumora na inhibitore EGFR tirozin-kinaze (87). Amivantamab se veže na izvanstaničnu Sema domenu MET receptora, blokira vezanje β -lanca faktora rasta hepatocita (*engl.* Hepatocyte Growth Factor, HGF) te na taj način sprječava dimerizaciju i aktivaciju receptora. Proizvodi se u staničnim linijama jajnika kineskog hrčka (CHO) s niskom razinom fukozilacije što uzrokuje nastanak protutijela koja se visokim afinitetom vežu na Fc γ RIIIa na površini imunskih stanica te dolazi do stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelu. Amivantamab ima više mehanizama djelovanja koje možemo podijeliti na Fc neovisne (blokiranje EGFR i MET signalnog puta inaktivacijom receptora) te na Fc posredovane mehanizme (ADCC) koji su ključni za maksimalnu inhibiciju tumora. Vezanje Fc fragmenta amivantamaba na Fc γ receptor na površini NK stanica uzrokuje ADCC, dok vezanje tog istog fragmenta na Fc γ receptor na površini makrofaga i monocita dovodi do otpuštanja citokina i trogocitoze. Trogocitoza, koja smanjuje modulaciju EGFR i MET receptora i njihovu nizvodnu signalizaciju, smatra se dominantnim mehanizmom djelovanja amivantamaba (87,121). Ispitivanje djelotvornosti amivantamaba provedeno je na Ba/F3 staničnim linijama kod kojih je eksprimirano pet različitih insercija u egzonu 20 gena za EGFR. Pokazano je da primjena amivantamaba dovodi do internalizacije

EGFR i MET receptora, inhibicije njihovih signalnih puteva, indukcije ADCC i apoptoze te posljedično do inhibicije proliferacije tumorskih stanica (121).

Farmakokinetika

Farmakokinetika ovog protutijela je linearna u rasponu doza od 350 mg pa do maksimalne doze koja iznosi 1750 mg, dok je pri dozama nižim od 350 mg farmakokinetika nelinearna. Volumen distribucije iznosi 5,13 L, klirens mu je 360 mL/ dan, a vrijeme poluživota je 11,3 dana. Volumen distribucije i klirens se povećavaju s povećanjem tjelesne težine te je stoga potrebno prilagoditi dozu. Osobe čija je tjelesna težina veća od 80 kg primjenjuju dozu od 1400 mg, dok osobe koje imaju manje od 80 kg primjenjuju 1050 mg. Dob, spol, klirens kreatinina 29-276 mL/min i blago oštećenje jetre nisu pokazali klinički značajan učinak na farmakokinetiku. Nakon primjene lijeka primijećena je vrlo mala količina antiamivantamab protutijela koja nemaju utjecaj na učinkovitost i sigurnost lijeka (121, 137).

Klinička ispitivanja

U prvom kliničkom ispitivanju faze I koje je provedeno na ljudima (CHRYSALIS) amivantamab je primjenjivan kao monoterapija kod osoba oboljelih od NSCLC s insercijom u egzonu 20 gena za EGFR, a kod kojih je došlo do progresije nakon primjene kemoterapije na bazi platine. U ispitivanje je bila uključena 81 oboljela osoba te 114 osoba koje su činile kontrolnu skupinu. Primali su intravenski amivantamab jednom tjedno tijekom prva četiri tjedna, a zatim svaka dva tjedna. Pacijenti s manje od 80 kg dobivali su 1050 mg, a oni teži od 80 kg 1400 mg. U ovoj kohortnoj studiji učinkovitosti troje pacijenata imalo je potpuni odgovor na terapiju, 29 pacijenata imalo je djelomični odgovor, kod 39 osoba bolest je ostala stabilna, dok je kod 8 osoba došlo do pogoršanja. Median vremena prije pogoršanja bolesti iznosio je 8,3 mjeseci, dok je median vremena života osoba koje primaju terapiju u odnosu na osobe u kontrolnoj skupini 22,8 mjeseci. Kod 40% pacijenata došlo je do nestanka tumora. Median vremena koje je prošlo prije ponovnog rasta tumora iznosio je 11,1 mjeseci (121,128).

U ovoj studiji izuzete su osobe koje su imale metastaze na mozgu jer zbog svoje veličine amivantamab ne može proći krvno moždanu barijeru. Kako bi se riješio ovaj problem, provode se klinička ispitivanja u kojima se istovremeno primjenjuju amivantamab i lazertinib. Lazertinib je EGFR inhibitor koji zbog svoje male molekulske mase lako prolazi

krvno moždanu barijeru te na taj način kompenzira nedostatke amivantamaba. Ova kombinacija ispitivana je u CHRYSALIS-2 studiji u koju su uključene osobe oboljele od NSCLC s delecijom egzona 19 u genu za EGFR i L858R mutacijom, čija je bolest napredovala nakon terapije s osimertinibom i kemoterapijom na bazi platine. Pacijenti su dobivali 1050 mg ili 1400 mg amivantamaba i 240 mg lazertiniba. Rezultati 1b faze studije pokazuju da je kod 41% osoba došlo do značajnog poboljšanja bolesti. Stopa kliničke koristi, koja uključuje potpuni odgovor, djelomični odgovor ili stabilnu bolest unutar 11 tjedana ili duže, iznosila je 69%. Osam od dvanaest pacijenata koji su imali dobar odgovor te pet od dvanaest pacijenata sa stabilnom bolešću nastavlja s primjenom terapije (128, 137).

Neželjeni događaji

Najčešće neželjene reakcije koje se javljaju nakon primjene amivantamaba su osip, reakcija na mjestu primjene infuzije, paronihija, mišićno-koštana bol, dispneja, mučnina, edem, kašalj, umor, stomatitis, zatvor, povraćanje i pruritus. Najčešće promjene laboratorijskih nalaza bile su sniženi limfociti, albumin, fosfati, kalij i natrij te povišena glukoza, alkalna fosfataza i gamaglutamil transferaza. Ozbiljne nuspojave javile su se kod 30% ispitanika, najčešće su se javljali plućna embolija, dispneja, mišićno-koštana bol, upala pluća i slabost mišića. Klinički značajne nuspojave koje su se javljale u < 10% ispitanika uključuju očnu toksičnost, pneumonitis i toksičnu epidermalnu nekrolizu (121,128).

3.4.5. Faricimab

Faricimab (trgovačko ime Vabysmo®) je bispecifično protutijelo koje inhibira djelovanje vaskularnog endotelnog faktora rasta (*engl.* Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) i angiopoetina-2. Odobrile su ga EMA i FDA 2022. Koristi se za liječenje neovaskularne starosne makularne degeneracije i dijabetičkog makularnog edema, bolesti koje su vodeći uzrok sljepoće u razvijenim zemljama. Neovaskularna starosna makularna degeneracija nastaje zbog stvaranja koroidalnih neovaskularizacija ispod makule zbog čega dolazi do sub- i intraretinalnog nakupljanja eksudata te posljedično do formiranja fibroznih ožiljaka. Dijabetički makularni edem zadebljanje je u području makule. Hiperglikemija uzrokuje promjene u mikrovaskulaturi retine, dolazi do poremećaja hemoretinalne barijere i nakupljanja tekućine između slojeva retine. Zbog ograničene mogućnosti ekspanzije tog prostora nastaju reverzibilne promjene retinskog tkiva koje mogu prijeći u ireverzibilne promjene što izaziva progresivno oštećenje vida i na kraju sljepoću. Vaskularni endotelni

faktor rasta ključna je molekula uključena u patološku povećanu neoangiogenezu i vaskularnu permeabilnost koje su uočene kod ovih bolesti. Osim VEGF meta u terapiji ovih bolesti je i signalni put koji uključuje angiopoetin-endotelni tirozin-kinazni receptor. Ovaj signalni put odgovoran je za regulaciju vaskularne homeostaze, modulaciju permeabilnosti krvnih žila, neoangiogenezu i upalne procese. Angiopoetin se javlja u dvije izoforme Ang-1 i Ang-2 koje imaju sličan afinitet za receptor Tie-2. Angiopoetin-1 stabilizira krvne žile, dok angiopoetin-2 djeluje kao antagonistički regulator endotelnih stanica, destabilizira krvne žile te ih na taj način čini osjetljivima na djelovanje VEGF i proupalnih citokina (89, 111).

Faricimab je bispecifično protutijelo koje se sastoji od anti-Ang-2 Fab fragmenta, anti-VEGF-A Fab fragmenta te od modificirane Fc regije. Proizveden je CrossMAb tehnologijom kako bi istovremeno blokiralo djelovanje VEGF i Ang-2. Model "dugme u rupu" osigurava heterodimerizaciju pri čemu svaka molekula ima jednu anti-Ang-2 domenu i jednu anti-VEGF domenu. U veznom mjestu za FcRn modificirane su tri kritične aminokiseline I253A , H310A i H435A (*engl.* triple A mutation) kako bi se smanjilo vrijeme izloženosti lijeku i njegove nuspojave. To je uzrokovalo i smanjenje viskoznosti te se na taj način olakšala primjena intravitrealnih injekcija. Pretklinička su ispitivanja pokazala da zajednička primjena anti-Ang-2 i anti-VEGF bispecifičnog protutijela značajno smanjuje broj lezija krvnih žila, propusnost, edem retine i gubitak neurona u odnosu na monoterapiju (89).

Doziranje

Za liječenje neovaskularne starosne makularne degeneracije faricimab se primjenjuje intravitrealno u dozi od 6 mg svaka četiri tjedna. Nakon početne četiri doze potrebno je napraviti optičku koherentnu tomografiju i procjenu oštine vida nakon 8 i 12 tjedana kako bi se odredilo kojim od sljedeća tri režima će se lijek primjenjivati 8. i 44. tjedan, 24., 36. i 48. tjedan ili 20., 28., 36. i 44. tjedan (43).

Kod dijabetičkog edema makule postoje dva režima primjene faricimaba. Kod prvog režima faricimab se primjenjuje intravitrealno u dozi od 6 mg svaka četiri tjedna u najmanje četiri doze. Nakon četvrte doze mjeri se debljine makule, a ovisno o rezultatima liječenje se nastavlja u intervalima od četiri ili osam tjedana. U drugom režimu liječenja prvih šest doza faricimaba primjenjuje se 6 mg svaka četiri tjedna, a zatim se nastavlja s primjenom 6 mg svakih 8 tjedana tijekom idućih 28 tjedana (43).

Farmakokinetika

Maksimalna plazmatska koncentracija postiže se 2 dana nakon primjene. Koncentracija se povećava proporcionalno s povećanjem doze do 3 mg, uz usporedivu izloženost nakon 3 i nakon 6 mg. Metabolizam i eliminacija faricimaba nisu do kraja razjašnjeni, pretpostavlja se da se djelovanjem lizosoma razgrađuje na manje peptide i aminokiseline koji se zatim izlučuju putem bubrega. Srednje vrijeme poluživota mu je 7,5 dana (43, 89).

Klinička ispitivanja

Učinkovitost i sigurnost faricimaba kod neovaskularne starosne makularne degeneracije ispitana je u dvije randomizirane, multicentrične, dvostruko maskirane, kontrolirane studije TENAYA i LUCERNE. U ispitivanje je bilo uključeno 1329 pacijenata koji su u omjeru 1:1 podijeljeni na one koji su primali faricimab prema prethodno opisanom režimu te na one koji su primali 2 mg aflibercepta svakih osam tjedana nakon tri inicijalne doze. Obje su studije pokazale neinferiornost faricimaba u odnosu na aflibercept na primarnoj krajnjoj točki, definiranoj kao srednja promjena u odnosu na početnu vrijednost najbolje korigirane vidne oštine (*engl.* Best-Corrected Visual Acuity, BCVA). Primarna analiza krajnje točke bila je usporedba neinferiornosti za prosječnu promjenu BCVA između aflibercepta i faricimaba. Donja granica intervala pouzdanosti od 95% za srednju promjenu BCVA ne može biti niža od minus 4 slova da bi se proglasila neinferiornost. U obje studije, pacijenti liječeni faricimabom imali su neinferiornu srednju promjenu u odnosu na početnu vrijednost BCVA u usporedbi s pacijentima liječenim afliberceptom (43, 89, 111).

YOSEMITE i RHINE randomizirane su, multicentrične, dvostruko maskirane, kontrolirane studije u kojima se ispitala učinkovitost i sigurnost faricimaba u terapiji dijabetičkog makularnog edema. Ispitanici su podijeljeni u tri skupine. Ispitanici prve skupine primjenjivali su aflibercept u dozi od 2 mg svakih osam tjedana nakon prvih pet mjesečnih doza. U druge dvije skupine ispitanici su primali faricimab prema prethodno opisanim režimima. U obje studije pokazana je neinferiornost faricimaba u odnosu na usporednu kontrolu (aflibercept) na primarnoj krajnjoj točki, definiranoj kao srednja promjena u odnosu na početnu vrijednost u BCVA u 1. godini (prosjek mjerenja 48, 52 i 56 tjedna). Primarna analiza krajnje točke bila je usporedba neinferiornosti za prosječnu promjenu BCVA između skupine koja je primala aflibercept te skupina koje su primala faricimab. Donja granica intervala pouzdanosti od 97,5% za srednju promjenu BCVA ne može biti niža od minus 4

slova da bi se proglasila neinferiornost. U obje studije, pacijenti liječeni faricimabom imali su prosječnu promjenu BCVA u odnosu na početnu vrijednost koja nije bila inferiorna u odnosu na bolesnike liječene afliberceptom što znači da faricimab djeluje jednako kao i dosadašnja terapija (43, 89, 111).

3.4.6. Tebentafusp

Tebentafusp (trgovačko ime Kimmtrak®) je bispecifično protutijelo koje se koristi kao monoterapija za liječenje odraslih bolesnika koji imaju humani leukocitni antigen-A (*engl.* human leukocyte antigen, HLA-A) 02:01 pozitivni, neoprerabilni ili metastatski uvealni melanom. Primjenu za navedenu indikaciju su 2022. odobrile EMA i FDA. To je fuzijski protein koji se sastoji od T-staničnog receptora (*engl.* T cell receptor, TCR) koji je povezan s efektorskom domenom protutijela usmjerenom na CD3 (*engl.* cluster of differentiation 3). TCR se veže za kompleks gp100-humani leukocitni antigen-A na površini tumorskih stanica uvealnog melanoma. Efektorska domena se veže za CD3 receptor na poliklonskim T-stanicama, nastaje imunosna sinapsa koja dovodi do preusmjerenja i aktivacije poliklonskih T-stanica. Aktivirane poliklonske T-stanice ispuštaju citokine i citolitičke proteine što dovodi do lize tumorskih stanica (37, 91).

Farmakokinetika

Farmakokinetika je linearna i proporcionalna dozi u rasponu doza od 20µg do 68µg. Volumen distribucije je usporediv s volumenom krvi te iznosi oko 5,25 L. Tebentafusp se katabolički razgrađuje na male peptide i aminokiseline (37).

Doziranje

Preporučena doza lijeka je 20 µg prvi dan, 30 µg osmi dan, 68 µg petnaesti dan te potom 68 µg jednom tjedno. Liječenje se nastavlja dok je korist veća od toksičnosti (37).

Neželjeni događaji

Većina neželjenih učinaka javila se tijekom prva četiri tjedna primjene, nakon čega se smanjio njihov intenzitet i učestalost. Sindrom otpuštanja citokina javio se kod 89% bolesnika. Od ostalih neželjenih učinaka zabilježeni su osip, povišena tjelesna temperatura, svrbež, mučnina i umor. Neželjeni učinci se mogu smanjiti postupnim povećanjem doze (91).

Klinička ispitivanja

Ispitivanje IMCgp100-202 bilo je randomizirano, multicentrično ispitivanje u koje je uključeno 378 ispitanika sa HLA-A 02:01 pozitivnim metastatskim uvealnim melanomom koji prethodno nisu primali sistemsku terapiju. Ispitanici su bili podijeljeni na one koji primaju tebentafusp te na one koji su primali lijek prema odabiru ispitivača (pembrolizumab, ipilimumab ili dakarbazin). Ispitanici koji su primali tebentafusp postigli su ukupno preživljavanje od 21,7 mjeseci, a kontrolna skupina je postigla ukupno preživljavanje od 16 mjeseci. Preživljenje bez progresije bolesti također je bilo duže kod ispitanika koji su liječeni tebentafuspom s medijanom preživljavanja bez progresije od 3,3 mjeseca, u usporedbi s medijanom preživljavanja bez progresije od 2,9 mjeseci u kontrolnoj skupini (91).

3.4.7. Mosunetuzumab

Mosunetuzumab (trgovačko ime Lunsumio®) je bispecifično protutijelo koje se koristi za liječenje odraslih bolesnika s relapsnim ili refraktornim folikularnim limfomom koji su primili najmanje dvije prethodne sistemske terapije. To je humanizirano bispecifično protutijelo slično imunoglobulinu G1 koje se veže za CD20 na površini B-stanica te za CD3 na površini T-stanica. Primjenu ovog bispecifičnog protutijela odobrila je EMA 2022. godine. Pretklinička ispitivanja su pokazala da mosunetuzumab izaziva brzu i dugotrajnu aktivaciju i proliferaciju T-stanica koje uzrokuju lizu B-stanica koje na svojoj površini imaju CD20 (17, 38).

Farmakokinetika

Farmakokinetička izloženost mosunetuzumabu povećavala se približno proporcionalno dozi unutar ispitivanog raspona doza od 0,05 do 60mg. Maksimalna koncentracija lijeka u plazmi iznosi 17,9 µg/mL, a postiže se prvog dana drugog ciklusa. Procijenjeni volumen distribucije lijeka nakon intravenske primjene iznosi 5,49 L. Na temelju populacijske farmakokinetičke analize, procijenjena srednja vrijednost klirensa u stanju dinamičke ravnoteže iznosila je 1,08 L/dan, a početnog klirensa 0,584 L/dan. Procijenjeno vrijeme eliminacije iznosi 16,1 dan (38).

Doziranje

Mosunetuzumab se primjenjuje tijekom osam ciklusa, a bolesnicima koji su nakon osam ciklusa postigli djelomičan odgovor ili stabilnu bolest uvodi se još dodatnih devet ciklusa.

Preporuča se primjena premedikacije za sprječavanje sindroma otpuštanja citokina i reakcije na infuziju. U prvom i drugom ciklusu svi bolesnici dobivaju premedikaciju intravenski kortikosteroid (20mg deksametazona ili 80mg metilprednizolona) čija primjena mora završiti jedan sat prije infuzije lijeka. Premedikaciju prije trećeg ciklusa dobivaju bolesnici kod kojih je pri primjeni prethodne doze nastupio sindrom otpuštanja citokina. Dobivaju 50-100mg difenhidraminklorida ili ekvivalent oralnog ili intravenskog kortikosteroida te antipiretik (38).

Preporučena doza za pojedini ciklus navedena je u Tablici 2.

Tablica 2. Doziranje mosunetuzumaba

Dan liječenja		Doza lijeka
1. ciklus	1. dan	1 mg
	8. dan	2 mg
	15. dan	60mg
2. ciklus	1. dan	60mg
3. ciklus	1. dan	30mg

Neželjeni događaji

Najčešći neželjeni učinci su glavobolja, nesanica, hipofosfatemija i vrtoglavica. Od ozbiljnih nuspojava zabilježeni su sindrom otpuštanja citokina, neutropenija i pneumonija. Devet od 218 bolesnika prekinulo je liječenje zbog neželjenih događaja (17).

3.4.8. Teklistamab

Teklistamab (trgovačko ime Tecvayli®) je bispecifično protutijelo koje se koristi za liječenje odraslih bolesnika s relapsnim i refraktornim multiplim mijelomom koji su primili najmanje tri prethodne terapije, a kod primjene zadnje terapije je došlo do progresije bolesti. Njegovu primjenu su odobrile EMA i FDA 2022. godine. To je humanizirano bispecifično IgG4-PAA (imunoglobulin G4-prolin, alanin, alanin) protutijelo koje ciljano djeluje na antigen za sazrijevanje B-stanica (*engl.* B-cell maturation antigen, BCMA) i receptore CD3 na površini T-stanica. Preusmjerava aktivirane T-stanice na BCMA pozitivne stanice multiplog mijeloma što uzrokuje smrt stanica tumora (39, 59).

Farmakokinetika

Nakon supkutane primjene farmakokinetika je proporcionalna dozi u rasponu doza od 0,08-3,0 mg/kg. Stanje dinamičke ravnoteže postignuto je nakon sedme tjedne doze održavanja. Maksimalna koncentracija u stanju dinamičke ravnoteže iznosila je 25,3 µg/mL, a postignuta je nakon 48,9 sati. Srednja vrijednost biorasploživosti nakon supkutane primjene iznosila je 69% u odnosu na biorasploživost nakon intravenske primjene. Srednja vrijednost volumena distribucije iznosila je 4,13 L. Na farmakokinetiku nisu utjecali dob (24-84 godine), spol, blago do umjereno oštećenje bubrega i blago oštećenje jetre (39).

Doziranje

Preporučena doza teklistamaba je 1,5 mg/kg putem supkutane injekcije jednom tjedno. Prije primjene preporučene doze potrebno je primijeniti dvije titracijske doze. Prvi dan se primjenjuje titracijska doza od 0,06 mg/kg, a treći dan od 0,3 mg/kg. Prva doza održavanja se primjenjuje peti dan. Ovakvim režimom primjene smanjuje se incidencija i težina sindroma otpuštanja citokina. Primjena premedikacije tijekom razdoblja postupnog povećavanja doze također smanjuje rizik od sindroma otpuštanja citokina. Kao premedikacija se koriste kortikosteroid (oralna ili intravenska formulacija deksametazona u dozi od 16 mg), antihistaminik (oralna ili intravenska formulacija difenhidramina u dozi od 50 mg) te antipiretik (oralna ili intravenska formulacija paracetamola u dozi od 650 do 1000 mg) (39).

Neželjeni učinci

Najčešći neželjeni učinci bilo kojeg stupnja težine opaženi kod bolesnika bili su hipogamaglobulinemija (75%), sindrom otpuštanja citokina (72%), neutropenija (71%), anemija (55%), bol u mišićima i kostima (52%), umor (41%), trombocitopenija (40%), reakcija na mjestu injiciranja (38%), infekcija gornjih dišnih putova (37%), limfopenija (35%), proljev (28%), pneumonija (28%), mučnina (27%), pireksija (27%), glavobolja (24%), kašalj (24%), konstipacija (21%) i bol (21%).

U 65% bolesnika koji su primali teklistamab prijavljeni su ozbiljni neželjeni učinci, koji su uključivali pneumoniju (16%), COVID-19 (15%), sindrom otpuštanja citokina (8%), sepsu (7%), pireksiju (5%), bol u mišićima i kostima (5%), akutno oštećenje bubrega (4,8%), proljev (3,0%), celulitis (2,4%), hipoksiju (2,4%), febrilnu neutropeniju (2,4%) i encefalopatiju (2,4%) (59).

Klinička ispitivanja

Djelotvornost teklistamaba u monoterapiji ispitivana je na bolesnicima s relapsnim ili refraktornim multiplim mijelomom u otvorenom, multicentričnom ispitivanju faze 1/2 u kojem je sudjelovala jedna skupina. U to su ispitivanje bili uključeni bolesnici koji su prethodno primili najmanje tri terapije, uključujući inhibitor proteasoma i imunomodulacijski lijek te monoklonsko protutijelo na CD38. Lijek su primali prema prethodno opisanom režimu doziranja. U ispitivanju je sudjelovalo 165 bolesnika, od čega je 78% bilo refraktorno na prethodno navedene tri skupine lijekova. Uz medijan praćenja od 14,1 mjesec, ukupna stopa odgovora bila je 63,0%, pri čemu je 65 bolesnika (39,4%) imalo potpuni odgovor ili bolji. Utvrđeno je da ukupno 44 bolesnika (26,7%) ima negativni nalaz na minimalnu rezidualnu bolest (*engl.* minimal residual disease, MRD); stopa negativnog nalaza na MRD među pacijentima s potpunim odgovorom ili boljim bila je 46%. Medijan trajanja odgovora bio je 18,4 mjeseca. Medijan trajanja preživljenja bez progresije bio je 11,3 mjeseca. Uobičajene nuspojave uključivale su sindrom otpuštanja citokina (72,1%), neutropeniju (70,9), anemiju (52,1%) i trombocitopeniju (40,0%). Infekcije su bile česte (76,4%). Neurotoksični događaji javili su se kod 24 bolesnika (14,5%) (59).

3.5. Bispecifična protutijela u fazi razvoja

U nastanak autoimunih bolesti uključene su imunosne stanice i proupalni citokini. Trenutno dostupna terapijska protutijela ne daju zadovoljavajuće rezultate te se u malom broju slučajeva postiže remisija. Stoga se istražuju nova bispecifična protutijela koja bi djelovanjem na dva različita antigena blokirala više signalnih puteva istovremeno. Prepreku za razvoj učinkovitih bispecifičnih protutijela čini razvoj imunogenosti koja nastaje zbog strukture bispecifičnih protutijela, prisutnih onečišćenja, načina primjene te stadija bolesti. Imunogenost je moguće izbjeći smanjenjem aktivacije B limfocita, uklanjanjem epitopa bispecifičnog protutijela za vezanje na B limfocite i uvođenjem epitopa za regulatorne T limfocite.

Trenutno je odobreno sedam bispecifičnih protutijela, više od 180 ih je u pretkliničkim ispitivanjima, a više od 50 ih se nalazi u različitim fazama kliničkih ispitivanja. Neka od bispecifičnih protutijela koja se nalaze u različitim fazama razvoja su Lutikizumab, APVO210, Obexelimab, MEDI7352, BITS7201A, COVA322, Tibulizumab, Romilkimab, ALX-0761, MEDI0700, MGD010, ABT-122 (129) Glofitamab, Epcoritamab, Elranatamab, Ivonescimab, Zanidatamab (11).

Lutikizumab je humani imunoglobulin s dvostrukom varijabilnom domenom (*engl.* human dual variable domain immunoglobulin, DVD-Ig) koji veže i inhibira IL-1 α i IL-1 β . Nalazi se u kliničkim ispitivanjima za terapiju osteoartritisa. Ispitivanje na mišjim modelima pokazalo je da smanjuje napredovanje osteoartritisa neutralizacijom IL-1 α i IL-1 β . Ispitivanje faze I koje se provodilo na zdravim osobama i oboljelima od osteoartritisa koljena pokazalo je da je lutikizumab dobro podnošljiv, najčešći neželjeni događaj bila je reakcija na mjestu primjene te glavobolja. Kod pacijenata s osteoartritisom zapaženo je smanjenje upalnih biomarkera u serumu. Međutim, u dvostruko slijepoj, placebo kontroliranoj randomiziranoj studiji provedenoj na 350 pacijenata lutikizumab nije pokazao značajno smanjenje boli i poboljšanje funkcije u odnosu na placebo (19, 42).

Obexelimab je imunoglobulinu G slično bispecifično protutijelo koje se svojom varijabilnom domenom veže za CD19, dok se inhibitornom Fc regijom veže za Fc γ RIIb na površini B limfocita te na taj način suprimira urođeni i adaptivni put aktivacije B limfocita. Ispituje se za liječenje sistemskog eritemskog lupusa i bolesti vezanih uz imunoglobulin G4. Kliničko ispitivanje faze I provedeno je 2017. na zdravim pojedincima. Prilikom ovog ispitivanja nije

zabilježen ni jedan ozbiljni neželjeni događaj, dok je kod 33% pacijenata zabilježen razvoj protutijela na lijek. Uočeno je da obexelimab inhibira djelovanje B limfocita, ali ih ne uništava. Ispitivanje faze II provedeno je na oboljelima od sistemskog eritemskog lupusa, poboljšanje je trajalo do 225. dana u 42% pacijenata koji su primali obexelimab u usporedbi s 28,6% pacijenata koji su primali placebo. Obexelimab je i u ispitivanju provedenom na osobama oboljelim od bolesti povezanih s IgG4 pokazao obećavajuće rezultate (141).

Romilkimab je DVD-Ig bispecifično protutijelo koje veže IL-4 i IL-13 i neutralizira ih. Ispitivan je za liječenje idiopatske plućne fibroze. Romilkimab se pokazao kao dobro podnošljiv lijek u ispitivanju provedenom na zdravim pojedincima koji su subkutano primali 10 do 300 mg romilkimaba. Pacijenti oboljeli od idiopatske plućne fibroze podijeljeni su u dvije skupine, jedni su dobivali 200 mg romilkimaba jednom tjedno, dok su drugi dobivali 200 mg svaka dva tjedna. Ozbiljne nuspojave češće su se javljale u skupini koja je primala lijek jednom tjedno. U odnosu na placebo, romilkimab nije pokazao značajno poboljšanje u liječenju te su ispitivanja za liječenje IPF prekinuta. Osim za IPF, ispitivanja su provedena i za liječenje sklerodermije jer su animalni modeli pokazali da primjena anti IL-4 i anti IL-13 protutijela sprječava nastanak dermalne fibroze. Ispitivanjem faze II uočeno je da romilkimab značajno smanjuje fibrozu kože u odnosu na placebo (3, 141).

COVA322 je bispecifično protutijelo koje djeluje kao inhibitor TNF- α i interleukina 17A te se ispituje njegova učinkovitost i sigurnost u terapiji psorijaze. COVA322 je tzv. *fynomer*-protutijelo nastalo fuzijom fynomera, koji visokim afinitetom veže interleukin 17A, na adalimumab, humano anti-TNF protutijelo. Fynomeri su mali globularni proteini veličine 7 kDa koji sadrže SH3 domenu ljudske kinaze Fyn i mogu se dizajnirati da s velikim afinitetom vežu različite mete, za njih se smatra da ne uzrokuju sindrom otpuštanja citokina. U pretkliničkim ispitivanjima koja su provedena na Javanskim makakijima primjenom COVA322 smanjen je upalni odgovor uz zadovoljavajući sigurnosni profil. Ispitivanje učinkovitosti i farmakokinetike kod ljudi je prekinuto zbog lošeg sigurnosnog profila (125).

Tibulizumab je tetravalentno bispecifično protutijelo koje se veže za faktor aktivacije B-limfocita (*engl.* B-cell activating factor, BAFF) i interleukin 17. BAFF i IL-17 su uključeni u imunopatologiju na naizgled neovisne načine. Međutim, BAFF utječe na stečeni i urođeni imunski odgovor aktivacijom B-limfocita i poticanjem proliferacije Th17 stanica. IL-17 je, pak, središnji efektorski citokin za proupalne učinke posredovane BAFF-om. Tibulizumab je dizajniran kako bi spriječio prekomjernu aktivaciju i proliferaciju B-limfocita u osoba

oboljelih od reumatoidnog artritisa, sistemskog eritemskog lupusa te Sjögrenova sindroma. U prekliničkim ispitivanjima provedenim na Javanskim makakijima tibulizumab se pokazao kao dobro podnošljiv lijek s malo ozbiljnih nuspojava. Suprimirao je razvoj B-limfocita bez njihova uništenja. Klinička ispitivanja faze I provedena su na oboljelima od reumatoidnog artritisa i Sjögrenova sindroma (9).

BITS7201A je bispecifično protutijelo slično imunoglobulinu G koje neutralizira interleukine 13 i 17. Ispitivanje faze I provedeno je na zdravim osobama i oboljelima od blagog oblika alergijske astme. Sigurnost i podnošljivost ovog protutijela su bile zadovoljavajuće, ali ispitivanje je prekinuto zbog stvaranja velikog broja protutijela na lijek (141).

ABT122 je DVD-Ig bispecifično protutijelo koje neutralizira TNF- α i interleukin-17A. Ovo protutijelo ispitivano je na oboljelima od reumatoidnog i psorijatičnog artritisa koji nisu reagirali na terapiju metotreksatom. Ispitivanjem je utvrđena zadovoljavajuća sigurnost ovog lijeka. Učinkovitost je bila bolja u odnosu na placebo, međutim nije primijećena razlika u učinkovitosti ABT122 i adalimumaba. U drugoj studiji ABT122 pokazao je zadovoljavajuću podnošljivost, a učinkovitost se zadržala tijekom 36 tjedana (141).

AMG211 je BiTE[®] protutijelo koje se veže za karcinoembrionalni antigen (*engl.* Carcino Embryonic Antigen, CEA) i CD3 ϵ podjedinicu humanog receptora T stanica. U prvom ispitivanju na ljudima utvrđeno je da je maksimalna tolerabilna doza 5 mg. Farmakokinetika mu je linearna, ovisna o dozi. U 28% oboljelih od raka želuca postignuta je stabilna bolest, to je ujedno i najbolji odgovor postignut ovom terapijom. Kako bi se ispitala njegova svojstva, AMG211 je označen izotopom cirkonija ⁸⁹Zr. PET skenom je utvrđeno da je akumulacija AMG211 u tumoru ovisna o dozi. Akumulacija u tumoru je CEA specifična te se AMG211 u tumoru zadržava do 24h, dok se iz cirkulacije brzo eliminira. Ovim ispitivanjem je potvrđeno da je intaktni AMG 211 vezan na membranu neophodan kako bi AMG 211 inducirao ubijanje tumorskih stanica posredovano citotoksičnim T-stanicama. Iako je ekspresija CEA ključna za djelovanje AMG211, nije jedini faktor koji utječe na protutumorsku citotoksičnost (129).

RO6958688 je bispecifično protutijelo slično imunoglobulinu G dobiveno CrossMAB tehnologijom. Sastoji se od dva vezna mjesta za karcinoembrionalni antigen, veznog mjesta za CD3 i utišane Fc regije. U prekliničkim modelima, RO6958688 je povećao infiltraciju T-stanica unutar tumora i stvorio visokoupalno tumorsko mikrokruženje, pokazujući iznimno

jak antitumorski kapacitet. Ubrzava lizu tumorskih stanica jer omogućava vezanje više T-stanica istovremeno na jednu tumorsku stanicu. U kliničkom ispitivanju faze I 80 pacijenata dobilo je lijek u rasponu doza od 0,05 mg do 600 mg. Najčešći neželjeni učinci bili su vrućica, reakcija na mjestu primjene infuzije i proljev. Nadalje, u ispitivanju faze Ib RO6958688 je primijenjen zajedno s anti-PD-L1 protutijelom kod 38 pacijenata. Kod dvoje se javio djelomični odgovor na terapiju, dok je kod pet ispitanika postignuta stabilna bolest. Anti-PD-L1 protutijelo, atezolizumab, pojačalo je antitumorsko djelovanje RO6958688, uz zadovoljavajući sigurnosni profil (136).

Pasotuksizumab je BiTE[®] protutijelo koje se veže za specifični antigen na membrani epitelnih stanica prostate (*engl.* Prostate-Specific Membrane Antigen, PSMA) i CD3 na površini T limfocita. PSMA je glutamat karboksipeptidaza II, transmembranski protein s folat-hidrolaznom aktivnošću koji proizvode epitelne stanice prostate. Pojačana se ekspresija javlja kod karcinoma prostate neovisnog o androgenima. U pretkliničkim ispitivanjima pasotuksizumab se vezao za PSMA na površini stanice i na T-limfocite, što je potaknulo lizu stanica ovisnu o antigenu, aktivaciju T-limfocita i otpuštanje citokina. U ksenografskom modelu karcinoma prostate pasotuksizumab je usporio rast tumora te uzrokovao remisiju. Zbog dobrih rezultata pretkliničkih ispitivanja provedeno je ispitivanje faze I na oboljelima od karcinoma prostate čiji rast nije usporila niska koncentracija testosterona. Ispitivani su subkutani i intravenski put primjene. Najčešći neželjeni učinci kod ispitanika bili su povišena tjelesna temperatura i reakcija na mjestu primjene, a svi su ispitanici imali barem jedan neželjeni događaj. Maksimalna tolerabilna doza kod subkutane primjene iznosi 172 µg, dok kod intravenske primjene nije određena jer je istraživanje ranije prekinuto zbog nedostatka financijskih sredstava. Maksimalna koncentracija nakon subkutane primjene prvog dana postiže za 5,95-23,5 h dok se petnaestog dana postiže za 3,95 do 6,08 h. Svi ispitanici koji su subkutano primjenjivali pasotuksizumab u više od jednog ciklusa liječenja razvili su protutijela na lijek. Smatra se da je do toga došlo zbog visokih koncentracija pasotuksizumaba na mjestu primjene. Primjena topikalnih glukokortikoida i sistemskih kortikosteroida nije utjecala na razvoj protutijela na lijek te je ispitivanje subkutanog puta primjene zaustavljeno. U skupini koja je pasotuksizumab primala infuzijom nisu primijećena protutijela, najvjerojatnije zbog niže koncentracije lijeka na mjestu primjene te manja izloženost lijeka limfnom sustavu nego kod subkutane primjene. Klinički odgovor zabilježen je kod oba načina primjene. U skupini koja je pasotuksizumab primala subkutano medijan najboljeg ukupnog odgovora bio je pad vrijednosti prostata specifičnog antigena (PSA), koji

se koristi kao tumorski marker, za 25%, pri čemu je kod oko trećine ispitanika zabilježen početni pad vrijednosti PSA za više od 50%. Razina PSA se s vremenom vratila na vrijednosti veće od početnih zbog razvoja neutralizirajućih protutijela. Niti jedan ispitanik nije pokazao potpuni ili djelomični odgovor prema RECIST 1.1 kriterijima za mjerenje odgovora tumora na terapiju. Gotovo jedna petina ispitanika postigla je stanje stabilne bolesti, s vremenom bez progresije od 0 do 11 mjeseci; medijan vremena do progresije iznosio je približno 3 mjeseca. U skupni koja je pasotuksizumab primala infuzijom zabilježena je redistribucija limfocita na početku terapije što ukazuje na aktivaciju T-limfocita. Smanjenje PSA ovisilo je o dozi, kod ispitanika koji su primali 20, 40 i 80 µg na dan razina PSA smanjila se za više od 50%. Od 11 ispitanika najbolji ukupni odgovor prema RECIST 1.1 kriterijima bio je stabilna bolest kod tri ispitanika i nepotpuni odgovor/neprogresivna bolest kod tri ispitanika. Kod ispitanika kod kojih je došlo do progresije, medijan vremena do progresije bio je 98 dana, odnosno 165, 84, 84, 168 i 292 dana u skupinama s 5, 10, 20, 40 i 80 µg na dan. Uočeno je smanjenje broja cirkulirajućih tumorskih stanica ovisno o dozi pri dozi ≥ 20 µg na dan. Jedan ispitanik koji je primio najvišu dozu imao je gotovo potpunu remisiju i doživio je kliničku korist uz značajno poboljšanje kvalitete života tijekom gotovo 19 mjeseci. Kod troje ispitanika pojavili su se simptomi sindroma otpuštanja citokina koji su bili potpuno reverzibilni te nije došlo do oštećenja organa (56, 136).

Glofitamab je bispecifično protutijelo koje se veže na CD-20 na površini B-stanica te na CD3 na površini T-stanica. Ispituje se njegovo djelovanje na difuzni limfom velikih B-stanica. U ispitivanju faze I sudjelovao je 171 ispitanik, a ispitanici su prethodno primali intenzivnu terapiju na koju je većina bila otporna. Ispitanici su primali lijek u ciklusima od 14 ili 21 dan. Ukupna stopa odgovora bila je 65,7%, a kod 57% ispitanika došlo je do kompletne remisije koja je najdulje trajala 27, 4 mjeseca. Kod bolesnika s agresivnim limfomom primjenjivana je doza od ≥ 10 mg pri čemu je postignuta ukupna stopa odgovora kod 61% ispitanika i kompletna remisija kod 49%. Sindrom otpuštanja citokina zabilježen je kod 50,3% ispitanika. U ovom ispitivanju glofitimab je pokazao dobre rezultate te su u tijeku daljnja ispitivanja (7, 15).

Epcoritamab je bispecifično protutijelo slično imunoglobulinu G koje se veže na CD20 na površini B-stanica te na CD3 na površini T-stanica. Ispituju se njegova djelotvornost i sigurnost kod oboljelih od difuznog limfoma velikih B-stanica. Primjenjuje se subkutano. Provedeno je ispitivanje faze I u kojemu je utvrđena maksimalna tolerabilna doza te

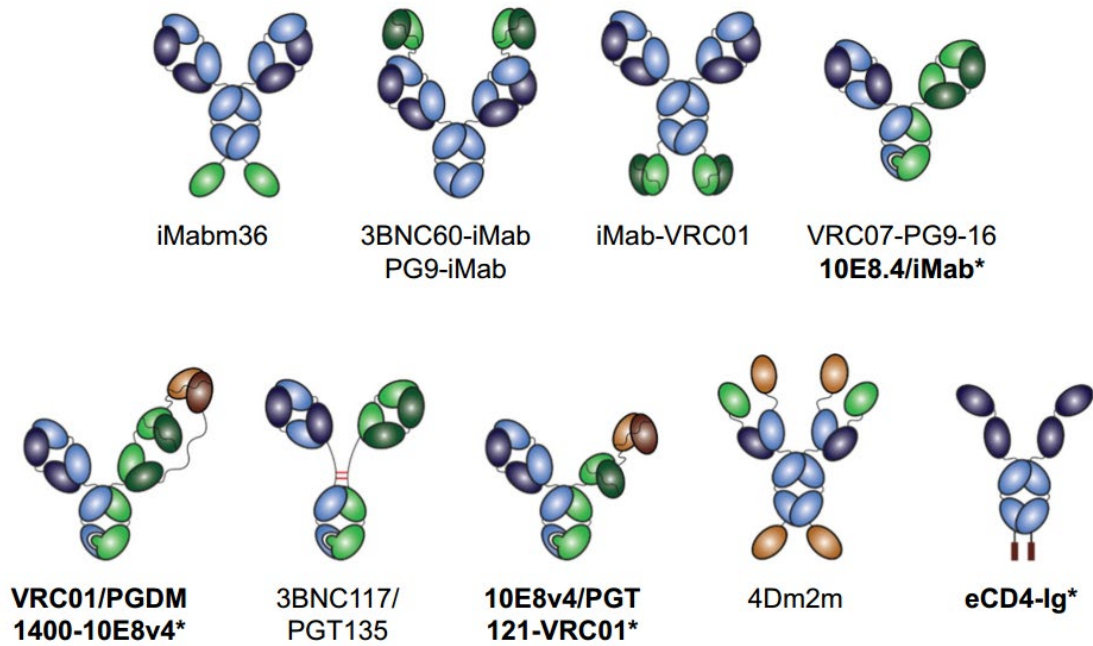
preporučena doza za primjenu u ispitivanju faze II. Šezdeset osam pacijenata primalo je epcoritamab u rasponu doza 0,0128-60 mg u ciklusima od 28 dana. Nisu zabilježeni štetni učinci ovisni o dozi te maksimalna tolerabilna doza nije utvrđena. Doza od 48 mg preporučena je za primjenu u daljnjim fazama ispitivanja. Najčešći ozbiljni neželjeni učinci bili su povišena tjelesna temperatura (68%), sindrom otpuštanja citokina (59%) i reakcija na mjestu primjene (47%). Ukupna stopa odgovora bila je 68%, a kod 48% ispitanika došlo je do kompletne remisije u rasponu doza od 12 mg do 60 mg. Četrdeset osam pacijenata je imalo relapsno-refraktorni difuzni limfom velikih B-stanica. Primjenom doze od 48 mg, ukupna stopa odgovora kod ovih ispitanika bila je 88%, a kompletna remisija zabilježena je kod 38% ispitanika. U ovom ispitivanju epcoritamab je pokazao dobro djelovanje s malo nuspojava (7).

Elranatamab je bispecifično protutijelo koje se veže za BCMA na površini stanica multiplog mijeloma te za CD3 na površini T-stanica. Ispituje se njegovo djelovanje i sigurnost kod oboljelih od relapsno-refraktornog multiplog mijeloma. Primjenjuje se subkutano kako bi se smanjio rizik od ozbiljnih neželjenih događaja. Ispitivanje faze II provedeno je na 123 pacijenta s relapsno-refraktornim multiplim mijelomom. Elranatamab su primali subkutano u dozi od 76 mg jednom tjedno. Ukupna stopa odgovora bila je 61% pri medijanu praćenja od 6,8 mjeseci. Najčešća nuspojava bio je sindrom otpuštanja citokina koji se javio kod 57,9% ispitanika, najčešće je bio prvog ili drugog stupnja (96).

Zanidatamab je bispecifično protutijelo slično imunoglobulinu G1 koje se veže za ECD2 i ECD4 epitope na receptoru humanog epidermalnog faktora rasta 2 (*engl.* Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, HER2). Ima potencijalno imunomodulacijsko i antineoplastično djelovanje. Ispituje se njegova sigurnost i djelotvornost kod pacijenata oboljelih od solidnih tumora s eksprimiranim HER2. U prvom dijelu ispitivanja faze I ispitanici su primali zanidatamab u rasponu doza od 5mg/kg do 30 mg/kg u intervalima od jednog, dva ili tri tjedna. Maksimalna tolerabilna doza nije određena jer nije zabilježena toksičnost povezana s dozom. Određena je preporučena doza za daljnja ispitivanja 20 mg/kg svaka 2 tjedna. U drugom dijelu ispitivanja faze I pratili su se neželjeni učinci. Najčešće se javila diareja i reakcija na mjestu primjene infuzije (10).

3.6. Bispecifična protutijela u terapiji infekcije HIV-om

Virus humane imunodeficijencije (*engl.* Human Immunodeficiency Virus, HIV) je retrovirus koji napada CD4⁺ limfocite što dovodi do njihova propadanja te posljedično do narušavanja stanične, a dijelom i humoralne imunosti. Liječi se primjenom vrlo djelotvorne antiretroviralne terapije (*engl.* Highly Active AntiRetroviral Therapy, HAART), a to je kombinacija triju ili više lijekova čiji je cilj gotovo u potpunosti zaustaviti replikaciju virusa. Kako ova terapija ima brojne nedostatke, ispituju se različita monoklonska i bispecifična protutijela koja bi omogućila izlječenje s manjim brojem nuspojava. Ispitivana su brojna neutralizirajuća protutijela od kojih su neka u različitim fazama kliničkih ispitivanja. Ibalizumab je prvo monoklonsko protutijelo protiv HIV-1 koje je 2018. odobrila FDA. Primjenjuje se kod pacijenata čiji su virusi rezistentni na više antiretrovirusnih lijekova. Monoklonsko protutijelo PRO 140 se nalazi u kliničkom ispitivanju faze IIb/III koje se provodi na teško oboljelima od HIV-a. Ova protutijela nužno je kombinirati s antiretroviralnim lijekovima kako bi se izbjegao nastanak rezistencije. Ove prepreke potaknule su razvoj bispecifičnih i višespecifičnih protutijela koja se mogu istovremeno vezati na više epitopa na površni HIV-a te istodobno neutralizirati različite sojeve HIV-1 i spriječiti razvoj rezistencije. Provode se ispitivanja različitih metoda dizajniranja bispecifičnih protutijela. Primjer potencijalnog bispecifičnog protutijela za neutralizaciju HIV-a je iMabm36 koji je nastao vezanjem m36 domene protutijela na C-kraj teškog lanca ibalizumaba. Inhibira ulazak HIV-1 u stanice vezanjem na CD4 (ibalizumab) te blokira vezno mjesto ko-receptora gp120 pomoću m36 domene protutijela. Duljina i fleksibilnost linkera utječe na jačinu djelovanja protutijela. Pojačano antiviralno djelovanje iMabm36 posljedica je istovremenog blokiranja dvaju mogućih mjesta ulaska HIV-1 u limfocite. Studija, u kojoj su različiti scFv fragmenti čija je meta gp120 vezani na N- ili C- kraj teškog lanca ibalizumaba, pokazala je da vezanje i sposobnost neutralizacije HIV-1 jako varira te da je potrebno za svaki scFv fragment prilagoditi mjesto vezanja i duljinu linkera. Identifikacija i razvoj ovih bispecifičnih protutijela i dalje je empirijski proces. Ispitivanje je provedeno i na CrossMAb protutijelima koja se vežu na četiri glavna epitopa na ovojnici HIV-1, važna za neutralizaciju virusa: CD4 vezno mjesto, V3 glikan, V1V2 i MPER regiju. Dobivena bispecifična protutijela neutralizirala su 95-97% cirkulirajućeg HIV-1, a najbolji rezultati dobiveni su s VRC07-PG9-16 protutijelom koje je neutraliziralo panel virusa s medijanom IC₅₀ od 0,055 µg/mL (slika 16) (28, 41, 92).



Slika 16. Različiti oblici multispecifičnih protutijela za terapiju i prevenciju HIV-1
(preuzeto i prilagođeno iz 92)

Bispecifična protutijela mogla bi postići bolje ili isto antiviralno djelovanje kao kombinacija više monoklonskih protutijela, ali bi troškovi proizvodnje, transporta, skladištenja, administrativnih postupaka bili jednaki onima za jedno protutijelo. Međutim, razvoj bispecifičnih protutijela puno je kompleksniji, na primjer kod scFv bispecifičnih protutijela dolazi do nestabilnosti veze scFv-protutijelo, agregacije, razvoja imunogenosti i lošeg farmakokinetičkog profila jer se protutijelo razlikuje od standardnih IgG protutijela. CrossMAb protutijela sličnija su imunoglobulinu G i kod njih je manji rizik za razvoj imunogenosti, međutim proizvodni proces je puno složeniji i nastaje više nusprodukata. Uzevši u obzir probleme pri proizvodnji i složeni postupak pročišćavanja bispecifičnih protutijela njihov je konačni prinos manji nego monoklonskih protutijela. Stoga je potrebno bolje razumijevanje specifičnosti protutijela kako bi se omogućio razvoj novih metoda proizvodnje kojima nastaju visokoučinkovita bispecifična protutijela koja se mogu primjenjivati za liječenje HIV-1 kod ljudi. Danas su neka od tih protutijela u različitim fazama kliničkih ispitivanja (41, 92).

3.7. Pokušaji razvoja bispecifičnog protutijela za terapiju Alzheimerove bolesti

Monoklonska protutijela za prevenciju i terapiju Alzheimerove bolesti nisu zaživjela u kliničkoj praksi. Dizajnirana su da potiču neutralizaciju ili fagocitozu amiloidnih plakova ili topivih amiloida β i oligomera amiloida β koji su najneurotoksičniji oblik peptida. Međutim, infuzija velike doze monoklonskih protutijela koja se vežu na topive amiloide β smanjuje njihovo uklanjanje iz organizma jer se u krvnim žilama nakuplja imunoglobulin G-amiloid β imunokompleks čije je poluvrijeme eliminacije 30 dana za razliku od slobodnih peptida čiji je poluvrijeme eliminacije tri sata. Nadalje, samo mala količina protutijela prelazi krvno-moždanu barijeru te nije jasno smanjuju li protutijela količinu amiloida β u mozgu. Taylor i suradnici predlažu primjenu bispecifičnih protutijela kako bi se ubrzalo uklanjanje imunokompleksa iz krvotoka (122). Intravenskom infuzijom bi se primjenjivala tetravalentna bispecifična protutijela koja bi vezala topive amiloide β u cirkulaciji te bi se zatim amiloidi vezali na eritrocite preko komplement receptora 1 (*engl.* Complement Receptor 1, CR1). Nastali kompleksi bi se iz cirkulacije uklanjali pomoću Fc γ receptora na rezidualnim makrofagima u jetri i slezeni. Za postizanje optimalnih uvjeta za učinkovito i brzo uklanjanje amiloida β vezanih za eritrocite primjenjuje se nekonkurentno anti-amiloid β IgG monoklonsko protutijelo koje se veže na različito mjesto na topivom amiloidu β . Stvaraju se veći imunokompleksi koje prepoznaju Fc γ receptori makrofaga i učinkovito se uklanjaju. Upotreba ovog monoklonskog protutijela dovela bi i do daljnjeg pojačanja vezanja amiloida β na CR1 eritrocita. Ova paradigma proizlazi iz Nelsonove reakcije imunološkog prijanjanja iz koje se vidi da se C3b-opsonizirani IgG imunokompleksi vezani za CR1 eritrocita uklanjaju iz cirkulacije. Primjenu ovog koncepta na klirens amiloida β predložili su Rogers i sur. 2006. godine, oni tvrde da amiloid β može aktivirati komplement i vezati se za CR1 eritrocita, čime se omogućuje njegov periferni klirens (101). Jedinstvena svojstva eritrocitnog CR1 upućuju da se imunski kompleks brzo uklanja iz jetre i slezene i uništava. Bispecifična protutijela koja su opisana ovom teorijom ne bi uklanjala nakupine plakova u mozgu, ali bi sprječavala njihov nastanak uklanjanjem amiloida β iz krvotoka (122).

He i suradnici predlažu bispecifično protutijelo koje bi sprječavalo proteolitičku razgradnju amiloid prekursorškog proteina (APP) i nastanak amiloida β . Amiloid prekursorškog proteina razgrađuje tri skupine proteaza. α -sekretaze razgrađuju APP između 16-Lys i 17-Leu ostataka

amiloida β pri čemu nastaje topivi α fragment APP-a i neamiloidogeni protein vezan na membranu. β -sekretaze razgrađuju APP kako bi nastao amino kraj amiloida β pri tome se oslobađaju kraći topivi β -fragmenti APP-a, dok potencijalno amiloidogeni protein ostaje vezan na membranu; γ -sekretaze razgrađuju membranski vezan fragment na C-kraju amiloida β kako bi se oslobodio amiloidogeni amiloid β protein. Dominantna β -sekretaza je β -sekretaza 1, odnosno protein BACE-1 (*engl.* Beta-site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme 1) primarni je terapijski cilj za liječenje Alzheimerove bolesti. U svom radu He predlaže bispecifično protutijelo koje bi se sastojalo od iBsec1 scFv i Asec1a proteolitičkog scFv. Takvo dijatijelo bi inhibicijom djelovanja BACE-1 smanjilo amiloidogeno procesuiranje APP-a, dok bi istovremenim pojačavanjem aktivnosti α -sekretaze pojačalo neamiloidogeno procesuiranje APP-a. Pokazali su da ovakvo protutijelo smanjuje količinu amiloida β te istovremeno povisuje razinu sAPP α u staničnom modelu Alzheimerove bolesti. Također su pokazali da je ovo protutijelo učinkovito djelovalo i na mišjem modelu Alzheimerove bolesti, za potrebe ispitivanja dodana je domena proteina ApoB koja veže LDLR kako bi se poboljšao prijenos kroz krvno-moždanu barijeru. Ispitali su učinkovitost diatijela i iBsec1 scFv na APP/PS1 mišjim modelima Alzheimerove bolesti pri čemu je korišten humani adeno-povezani virus kao vektor za ekspresiju genskih konstrukata. U oba slučaja je došlo do smanjenja razine plaka, dok je kod primjene diatijela došlo do povećanja razine sAPP α , poboljšano je neurološko zdravlje te je preživljavanje bilo značajno bolje nego u skupini koja je primala iBsec1 (51).

Upala uzrokovana astrocitima i mikroglijama povezana je s neurodegenerativnim procesima Alzheimerove bolesti. Povećanje GFAP-pozitivnih astrocita opaženo je zajedno s grupiranjem hipertrofičnih Iba1-pozitivnih mikroglija oko amiloidnih plakova. Primjenom scFv diatijela i scFv iBsec1 značajno se smanjio broj astrocita u hipokampusu, ali ne i u korteksu. Uzrok tome bi moglo biti ranije javljanje depozita amiloida u korteksu. Gubitak spinalnih dendrita i sinaptička patologija učestali su kod APP/PS1 miševa. Primjenom diatijela obnovljena je gustoća spinalnih dendrita te je smanjena sinaptička patologija što nije slučaj kod primjene iBsec1 scFv. Diatijela su poboljšala neurogenezu u hipokampusu APP/PS1 miševa, ali najznačajnija im je prednost smanjenje stope smrtnosti do čega nije došlo primjenom iBsec1 scFv. Diatijelo, kao i scFv iBsec1 smanjuje djelovanje β -sekretaze i podjednako povećavaju razinu sAPP β , dok samo diatijelo potiče djelovanje α -sekretaze i povećava razinu sAPP α koja štiti neurone hipokampusa od toksičnosti, stimulira proliferaciju odraslih progenitorskih stanica, smanjuje deregulaciju NMDA receptora i antagonizira

degeneraciju dendrita i smrt neurona. Smatra se da je povećanje razine sAPP α odgovorno za povećanje zdravlja neurona i bolje preživljavanje kod miševa s Alzheimerovom bolešću tretiranih dijetelom. Ovim istraživanjem dobiveni su obećavajući rezultati te je pokazan terapijski potencijal scFv iBsec1 i scFv Asev1 dijetijela (51).

4. RASPRAVA

Napredak u području biotehnologije doveo je do otkrića protutijela nove generacije koja su dizajnirana da budu snažnija i specifičnija od konvencionalnih monoklonskih protutijela. Od same ideje pa do kliničke primjene bispecifičnog protutijela prošlo je gotovo pedeset godina. Razlog tako dugog vremenskog razmaka od ideje do njene realizacije poteškoće su s povezivanjem različitih lakih i teških lanaca te loš klinički odgovor na protutijela. Razvoj genetičkog inženjerstva omogućio je otkriće brojnih metoda kojima nastaju funkcionalna bispecifična protutijela koja se mogu primijeniti u kliničkoj praksi. S obzirom na strukturu dijele se na bispecifična protutijela koja su slična imunoglobulinu G te na ona koja nisu slična imunoglobulinu G. Bispecifična protutijela koja nisu slična imunoglobulinu G se sastoje od dva jednolančana varijabilna fragmenta povezana peptidnim linkerom najčešće izgrađenim od lizina i serina. Ovom tipu bispecifičnih protutijela nedostaje Fc regija, ne vežu se za Fc neonatalni receptor te stoga imaju kratko vrijeme poluživota u serumu. Zbog svoje male veličine od samo 25 kDa lako prodiru u tkiva i postižu terapijski učinak. Imunogenost im je manja u odnosu na bispecifična protutijela slična imunoglobulinu G. Možemo ih podijeliti u tri skupine: bispecifični usmjerivači T-stanica, bispecifična protutijela dvostrukog afiniteta i tandemska dijetijela. Bispecifični usmjerivači T-stanica istovremeno se vežu za antigen na površini tumorske stanice i na CD3ε receptor na površini T-stanice. T-stanica se aktivira i uzrokuje lizu tumorskih stanica. Mala molekulska masa, dobra fleksibilnost i velik afinitet vezivanja čini ova protutijela iznimno učinkovitima te stoga ne čudi da prvo odobreno bispecifično protutijelo, blinatumomab, ima ovu strukturu. Zbog nedostatka Fc domene, poluvrijeme života im je samo nekoliko sati, ali ga je moguće je produljiti dodatkom Fc regije ili vezanjem na serumski albumin. Bispecifična protutijela dvostrukog afiniteta nastaju heterodimerizacijom dvaju scFv fragmenata te zbog svoje strukture mogu oponašati prirodne interakcije unutar imunoglobulina G. Kao i BiTE[®], male su molekulske mase i posljedično imaju kratko poluvrijeme života. U usporedbi s BiTE[®] imaju jače djelovanje zbog strukturne razlike između ovih protutijela. DART protutijela se većim afinitetom vežu za ciljno mjesto, interakcija antigen/receptor uspostavlja se brže i traje dulje. Mogući uzrok boljeg djelovanja DART-a je i njegova smanjena fleksibilnost jer kompaktna struktura osigurava povoljnu orijentaciju veznih mjesta, dok je fleksibilnim BiTE[®] protutijelima potrebno dulje vrijeme da postignu ispravnu orijentaciju. Tandemska dijetijela su tetravalentna bispecifična protutijela te stoga imaju jači učinak i bolje prodiru u tkiva u odnosu na BiTE[®] i DART. Sastoje se od četiri fragmenta varijabilne regije teških i lakih lanaca povezanih linkerima. Veće su molekulske mase, oko 105 kDa, izbjegavaju metabolizam prvog prolaska kroz jetru te stoga imaju dulje poluvrijeme života od BiTE[®] i DART.

Bispecifična protutijela slična imunoglobulinu G se dijele na simetrična i asimetrična. Simetrična protutijela nastaju fuzijom druge jedinice koja veže antigen na kraj lakog ili teškog lanca. Prednost simetričnih bispecifičnih protutijela je manji broj nusprodukata u odnosu na asimetrična protutijela. Kako bi se smanjio broj nusprodukata asimetričnih protutijela, razvijene su nove tehnike kao što su kvadroma tehnologija, metoda „dugme u rupu“, SEED tehnika, zajednički laki lanac, CrossMAB, metoda ko-kulture. Zahvaljujući ovim metodama danas je za terapijsku primjenu u uporabi sedam odobrenih protutijela blinatumomab, emicizumab, amivantamab, faricimab, tebentafusp, mosunetuzumab i teklistamab.

Blinatumomab je bispecifično protutijelo koje se koristi u terapiji akutne limfocitne leukemije tip B. To je BiTE[®] protutijelo koje se veže za CD19 na površini B limfocita te za CD3 na površini T stanica te tako aktivira T-stanice koje zatim unište tumorske stanice. U odnosu na standardnu kemoterapiju primjena blinatumomaba uzrokuje dulje preživljavanje i postizanje kompletne remisije s potpunim ili djelomičnim hematološkim oporavkom. Rizik od smrtnog ishoda 29% je manji, a vrijeme preživljavanja 3,7 mjeseci dulje. Opće zdravstveno stanje i kvaliteta života poboljšali su se u skupini koja je primala blinatumomab, a pogoršali u skupini koja je primala kemoterapiju, s omjerom rizika za pogoršanje u analizi ovisnosti događaja o vremenu od 0,67. Omjeri opasnosti za druge ishode koji utječu na kvalitetu života bili su od 0,59 do 0,80 u korist blinatumomaba.

Delea i suradnici su u zdravstvenom sustavu SAD-a usporedili isplati li se primjena blinatumomaba više nego primjena kemoterapije kod osoba oboljelih od Philadelphia kromosom negativne akutne limfoblastične leukemije prekursora B limfocita. Korištena analiza troška i koristi jedan je od načina kvantificiranja zdravstvenog postupka. U ovoj analizi inkrementni omjer troška i učinkovitosti (*engl.* Incremental Cost Effectiveness Ratio, ICER) koristi se za procjenu troška zdravstvene intervencije u odnosu na njezinu korist koja se izražava kao godina kvalitetnog života (*engl.* Quality Adjusted Life Year, QALY). Za onkološke bolesnike u SAD-u predloženi ICER iznosi 150.000,00\$-300.000,00\$ po QALY-u. Koristili su BLYNCITO globalni ekonomski model (*engl.* BLINCYTO Global Economic Model, B-GEM) kako bi se procijenili odnos troška i učinkovitosti blinatumomaba u usporedbi s kemoterapijom iz perspektive američkih obveznika zdravstvene skrbi pri čemu su korišteni podatci iz faze III randomiziranog ispitivanja TOWER. Za izračun troškova korištena je cijena blinatumomaba 3,464.34\$ za bočicu s 35 µg lijeka. Dnevni trošak hospitalizacije za primjenu blinatumomaba izračunat je na temelju prosječnog troška i

prosječne duljine boravka za bolničku primjenu kemoterapije. Dnevni trošak kućne infuzijske terapije procijenjen je na 67\$, na temelju javno dostupne dnevne Medicare naknade za kućnu infuzijsku terapiju. Trošak posjeta radi punjenja prijenosne infuzijske pumpe procijenjen je na 139\$, na temelju objavljene cijene za punjenje i održavanje prijenosne infuzijske pumpe Medicare izvan ustanove. Trošak po ciklusu kemoterapije izračunat je kombinacijom procjena postotka pacijenata koji započinju i završavaju svaki ciklus liječenja iz TOWER-a, s procjenama prosječnog troška hospitalizacije za kemoterapiju kod pacijenata s ALL-om te iznosi 58.565\$. Analizom dobivenih podataka utvrđeno je produljenje života primjenom blinatumomaba od gotovo dvije godine u odnosu na kemoterapiju. Inkrementni trošak iznosio je 180.642,00\$, a ICER po dobivenoj godini života je iznosio 94,251\$. Ako se uzme u obzir utjecaj akutne limfocitne leukemije i liječenja na kvalitetu života, dobije se da ICER po QALY-u iznosi 110.108,00\$ što je ispod predložene vrijednosti ICER po QALY-u za onkološke bolesnike u SAD-u (150.000,00\$- 300.000,00\$). Korištenjem najnižeg ICER praga od 150.000,00\$ po QALY-u, vjerojatnost da je blinatumomab isplativ u odnosu na kemoterapiju procijenjena je na 73,7%. Ovi rezultati nam govore da je za zdravstveni sustav SAD-a isplativo ulagati u terapiju blinatumomabom (30).

Emicizumab je bispecifično protutijelo koje se koristi za profilaksu krvarenja kod osoba oboljelih od hemofilije A sa ili bez prisustva inhibitora faktora VIII. Primjenjuje se subkutano, a poluvrijeme života mu je 30 dana. Ove karakteristike mu daju prednost nad profilaksom faktorom VIII zbog manjeg opterećenja liječenja. Rezultati studije HAVEN 3 su pokazali da se profilaktičkom primjenom emicizumaba postiže manja stopa krvarenja nego profilaktičkom primjenom faktora VIII. Rezultati mrežne meta analize bili su u skladu s rezultatima ispitivanja HAVEN 3, pokazujući da profilaksa emicizumabom dovodi do nižih stopa krvarenja nego prethodna profilaksa faktorom VIII. Ovi rezultati dobiveni su za primjenu emicizumaba 1,5 mg/kg jednom tjedno i 3,0 mg/kg svaka dva tjedna (93).

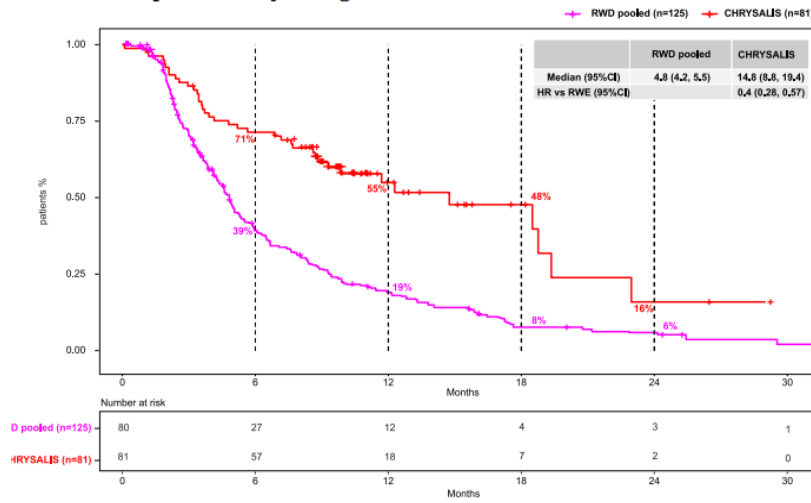
Cortesi i suradnici su usporedili troškove i učinkovitost profilaktičke primjene emicizumaba s profilaktičkom primjenom lijekova koji zaobilaze aktivnost faktora VIII (*engl. bypassing agents, BPA*) kako bi procijenili isplativost primjene emicizumaba, sa stajališta talijanskog zdravstvenog sustava, kod oboljelih od hemofilije A s inhibitorima kod kojih nije uspješna primjena indukcije imunosne tolerancije. Za analizu je korišten Markovljev model. Zbog nedostatka prethodnog modela koji bi uspoređivao različite profilakse s BPA-ima u hemofilicnih pacijenata s inhibitorima, razvijen je novi model. U ovom modelu, pacijenti mogu biti u stanju "Hemofilija A s inhibitorima" ili "Smrt". U stanju "Hemofilija A s

inhibitorima", pacijenti dožive nekoliko krvarenja godišnje koja se liječe ili zahtijevaju artroplastiku. Utjecaj različitih tretmana procijenjen je modelom u smislu broja krvarenja, artroplastika i smrtnosti. Model je procijenio troškove i dobrobiti svakog tretmana i izrazio rezultate kao iznos u eurima (€), godine života (LY), godine kvalitetnog života (QALY) i inkrementi omjer troška i učinkovitosti (ICER) kao € po stečenom QALY-u. Uključeni su samo izravni troškovi povezani s troškovima liječenja emicizumabom i BPA, troškovi hospitalizacije i ortopedske operacije. Troškovi tretmana procijenjeni su kao godišnji troškovi tretmana, po cijeni od 66,65% maloprodajne cijene, bez poreza na dodanu vrijednost, koja predstavlja najveću cijenu koju plaća talijanski zdravstveni sustav. Konačni trošak tretmana je procijenjen uključujući zakonske i skrivene popuste. Doziranje i učestalost primjene za režim profilakse preuzeti su iz kliničkih ispitivanja i primijenjeni na različitu težinu povezanu s dobi pacijenata. Za kontrolu godišnjih krvarenja povezanih sa svakim režimom profilakse, doziranje i broj infuzija preuzeti su iz kliničkih ispitivanja i smjernica. Prema HAVEN1 potrebno je 2,6 dana hospitalizacije po pacijentu liječenom profilaksom emicizumabom, dok je za BPA profilaksu potrebno 3,9 dana. Dnevni trošak hospitalizacije od 137,4 € korišten je u modelu temeljenom na DRG 397. Rezultati studije su pokazali da se profilaktičkom primjenom emicizumaba štedi u usporedbi s profilaksom aPCC i rFVIIa uz značajno smanjenje ukupnih troškova zdravstvenog sustava za liječenje pacijenata oboljelih od hemofilije A s inhibitorima. U analizi osnovnog slučaja, doživotno liječenje profilaksom emicizumabom rezultiralo je smanjenjem od 19,98 odnosno 25,27 milijuna € po pacijentu u usporedbi s aPCC i rFVIIa profilaksom. Ovo smanjenje troškova povezano je s 0,94 QALY dobivenih kod pacijenata liječenih profilaksom emicizumabom, što ovaj novi tretman čini opcijom uštede. Profil uštede profilakse emicizumabom potvrđen je provedenom analizom osjetljivosti. Nadalje, dostupnost i uporaba profilakse emicizumabom u Italiji povezana je sa smanjenjem utjecaja na proračun od 45,4 milijuna eura (-10,9%) u trogodišnjem vremenskom razdoblju. Rezultati ove studije potvrđeni su u SAD-u gdje je profilaktička primjena emicizumaba povećala QALY i smanjila troškove u usporedbi s BPA profilaksom. Dobiven je QALY 0,38 i postignuta ušteda od 78,5 milijuna USD u usporedbi s BPA profilaksom (25).

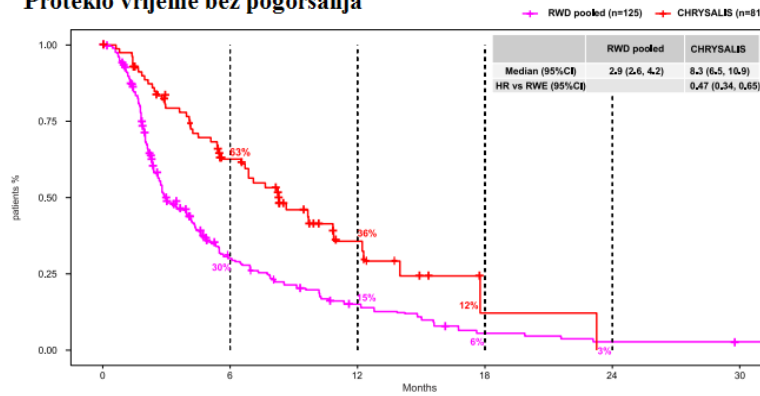
Iz ovih primjera vidljivo je da bispecifična protutijela daju bolje rezultate u kraćem vremenskom razdoblju i uz manje troškove u odnosu na dosadašnju terapiju.

Amivantamab je novitet u terapiji karcinoma nemalih stanica pluća. Ovo bispecifično protutijelo sprječava rast tumora vezanjem na EGFR i MET stoga može nadvladati inherentnu otpornost NSCLC s insercijom u egzonu 20 gena za EGFR na ciljanu terapiju. Jednom kada se veže za svoju metu, amivantamab inducira trogocitozu, izaziva staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima, dolazi do endocitoze kompleksa receptor-protutijelo i uklanjanja pomoću lizosoma. U kliničkom ispitivanju faze I koje je provedeno na 81 pacijentu kod kojih je došlo do progresije bolesti nakon kemoterapije bazirane na platini, amivantamab je pokazao trajne odgovore i zadovoljavajuću sigurnost. Potvrđena ukupna stopa odgovora (*engl.* overall response rate, ORR) po kriterijima za procjenu odgovora u solidnim tumorima (*engl.* Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST) v1.1 bila je 40% s medijanom trajanja odgovora (*engl.* duration of response, DOR) od 11,1 mjeseci; medijan preživljenja bez progresije bolesti (*engl.* progression-free survival, PFS) bio je 8,3 mjeseca, a medijan ukupnog preživljenja (*engl.* overall survival, OS) bio je 22,8 mjeseci. Provedena je usporedba liječenja amivantamabom i terapijom koja se koristi za liječenje pacijenata s uznapredovalim NSCLC-om s insercijom u egzonu 20 gena za EGFR, a kod kojih kemoterapija na bazi platine nije dala zadovoljavajuće rezultate. Korišteni su podatci podskupine pacijenata iz CHRYSALIS-a i eksternih kontrola iz tri stvarna izvora podataka iz SAD-a. Klinički ishodi bili su bolji kod osoba liječenih amivantamabom nego kod osoba koje su koristile ostale odobrene terapije nakon kemoterapije bazirane na platini (Slika 17). Bolesnici liječeni amivantamabom imali su 10 mjeseci dulji medijan OS (medijan: 22,8 naspram 12,8 mjeseci, kao i poboljšani PFS (medijan 8,3 naspram 2,9 mjeseci), interval od početka primjene amivantamaba do početka primjene sljedeće linije terapije (medijan 14,8 naspram 4,8 mjeseci) i ORR (medijan 40% prema 16%). Loši rezultati vanjskih kontrola potvrđuju neučinkovitost trenutno dostupnih tretmana u stvarnom svijetu i naglašavaju potencijalnu prednost liječenja amivantamabom u ovoj populaciji pacijenata (81). Iz ovog istraživanja vidljivo je da bispecifična protutijela pružaju bolji terapijski odaziv i prosječno preživljenje.

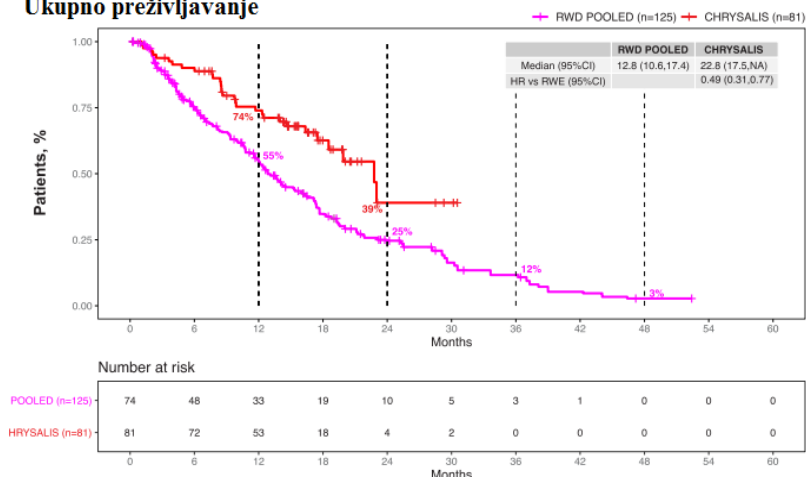
Vremenski period do sljedećeg tretmana



Protjeklo vrijeme bez pogoršanja



Ukupno preživljavanje



Slika 17. Kaplan-Meierove krivulje za pacijente liječene amivantamabom (CHRYSALIS) i vanjske kontrole (preuzeto i prilagođeno iz 81)

Osim odobrenih protutijela u pretkliničkim ispitivanjima nalazi se više od 180 bispecifičnih protutijela, dok je u različitim fazama kliničkih ispitivanja više od 50 bispecifičnih protutijela. Vrijednost tržišta bispecifičnih protutijela 2020. iznosila je 489.7 milijuna dolara.

Faricimab predstavlja važan napredak u oftalmologiji. Njegovim odobrenjem pacijentima je postao dostupan lijek koji uz manji broj primjena daje izvrsne rezultate. Procjenjuje se da će ovaj lijek do 2028. ostvariti prihode od milijardu američkih dolara. Ni ostala protutijela ne zaostaju za faricimabom, na primjer blinatumomabu je prodaja porasla s 190 milijuna dolara 2020. na 300 milijuna dolara 2021. Prema HALMED-ovu izvješću o potrošnji, 2021. je u Hrvatskoj korišten samo emicizumab te je na njega utrošeno 288.490,00 kn. Porast broja karcinoma i drugih teških bolesti povezan je s procvatom tržišta bispecifičnih protutijela. Prema nekim procjenama očekuje se da će tržište bispecifičnih protutijela premašiti 25 milijardi dolara do 2028 (99).

5. ZAKLJUČAK

Bispecifična protutijela istovremeno djeluju na dvije mete što im omogućuje postizanja boljih rezultata od dosad dostupne terapije. Razvojem biotehnologije i genetičkog inženjerstva riješeni su problemi ispravnog povezivanja lakih i teških lanaca što je doprinijelo razvoju novih bispecifičnih protutijela.

Odobrena su protutijela za terapiju akutne limfocitne leukemije tip B, hemofilije A, neovaskularne starosne makularne degeneracije i dijabetičkog makularnog edema, karcinom nemalih stanica pluća, multiplog mijeloma, folikularnog limfoma te uvealnog melanoma. U različitim fazama kliničkih ispitivanja nalazi se velik broj bispecifičnih protutijela za terapiju brojnih drugih bolesti.

Bispecifična protutijela pokazala su znatan napredak u učinkovitosti u odnosu na do sad dostupnu terapiju. Napredak je vidljiv u ishodima liječenja, vremenu potrebnom za postizanje terapijskog odgovora te u vremenu do pogoršanja bolesti. Osim boljih rezultata liječenja, bispecifična protutijela su se pokazala i kao isplativija nego dosadašnja terapija.

6. LITERATURA

1. Ahmad ZA Yeap SK, Ali AM i sur. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. *Clinical and Developmental Immunology* 2012; 2012:1-15.
2. Akiba H, Satoh R, Nagata S, Tsumoto K. Effect of allotypic variation of human IgG1 on the thermal stability of disulfide-linked knobs-into-holes mutants of the Fc for stable bispecific antibody design. *Antibody Therapeutics* 2019; 2 (3):65–69.
3. Allanore Y, Wung P, Soubrane C i sur. A randomised, double-blind, placebo-controlled, 24-week, phase II, proof-of-concept study of romilkimab (SAR156597) in early diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2020; 79(12): 1600-1607.
4. Allen C, Zeidan AM, Bewersdorf JP. BiTEs, DARTS, BiKEs and TriKEs-Are Antibody Based Therapies Changing the Future Treatment of AML?. *Life* 2021; 11:465.
5. Andreano E, Seubert A, Rappuoli R. Human monoclonal antibodies for discovery, therapy, and vaccine acceleration. *Current Opinion in Immunology* 2019; 59:130-134.
6. Andreis I, Batinić D, Čulo F i sur. *Imunologija sedmo, obnovljeno i dopunjeno izdanje. Medicinska naklada; 2010 str. 58-98.*
7. Barca EG. Role of Bispecific Antibodies in Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma in the CART Era. *Frontiers in Immunology* 2022;13.
8. Bayer V. An Overview of Monoclonal Antibodies. *Seminars in Oncology Nursing* 2019; 35 (5).
9. Benschop RJ, Chow CK, Tian Y i sur. Development of tibulizumab, a tetravalent bispecific antibody targeting BAFF and IL-17A for the treatment of autoimmune disease. *mAbs* 2019; 11(6): 1175-1190.
10. Bernstam FM, Beeram M, Hamilton E, Oh DY, Hanna DL, Kang YK. Zanidatamab, a novel bispecific antibody, for the treatment of locally advanced or metastatic HER2-expressing or *HER2*-amplified cancers: a phase 1, dose-escalation and expansion study. *The Lancet Oncology* 2022.
11. Biopharma PEG: Bispecific antibodies: Current Status and Prospects. Available at: <https://www.biochempeg.com/article/252.html>
12. Blair HA. Emicizumab: A Review in Haemophilia A. *Drugs* 2019; 79 (15):1697-1707.
13. Boyd SD, Joshi SA. High-throughput DNA sequencing analysis of antibody repertoires. *Microbiol Spectrum* 2014; 2(5).

14. Brinkmann U, Kontermann RE. The making of bispecific antibodies. *mAbs* 2017; 9(2): 182-212.
15. Broske AE, Korfi K, Belousov A i sur. Pharmacodynamics and molecular correlates of response to glofitamab in relapsed/refractory non-Hodgkin lymphoma. *Blood advances* 2022; 6(3): 1025-1037.
16. Brozy J, Schlaepfer E, Mueller CKS i sur. Antiviral Activity of HIV gp120 Targeting Bispecific T Cell Engager (BiTE®) Antibody Constructs. *Journal of Virology* 2018; 92 (14).
17. Budde LE, Assouline S, Sehn LH i sur. Single-Agent Mosunetuzumab Shows Durable Complete Responses in Patients With Relapsed or Refractory B-Cell Lymphomas: Phase I Dose-Escalation Study. *Journal of Clinical Oncology* 2021; 40(5):481-491.
18. Burges A, Wimberger P, Kumper C i sur. Effective relief of malignant ascites in patients with advanced ovarian cancer by a trifunctional anti-EpCAM x anti-CD3 antibody: A phase I/II study. *Clinical Cancer Research* 2007; 13(13): 3899–3905.
19. Cao M, Wang C, Chung WK i sur. Characterization and analysis of scFv-IgG bispecific antibody size variants. *mAbs* 2018; 10(8): 1236-1247.
20. Cao Z, Li Y, Wang W i sur. Is Lutikizumab, an Anti–Interleukin-1 α/β Dual Variable Domain Immunoglobulin, efficacious for Osteoarthritis? Results from a bayesian network meta-analysis. *BioMed Research International* 2020; 10.
21. Castelli MS, McGonigle P, Hornby PJ. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacology Research & Perspectives* 2019; 7(6).
22. Chen S, Li L, Zhang F, Wang Y, Hu Y, Zhao L. Immunoglobulin Gamma-Like Therapeutic Bispecific Antibody Formats for Tumor Therapy. *Journal of Immunology Research* 2019; 2019:1-13.
23. Cheng M, Santich BH, Xu H, Ahmed M, Huse M, Cheung NV. Successful engineering of a highly potent singlechain variable-fragment (scFv) bispecific antibody to target disialoganglioside (GD2) positive tumors. *OncoImmunology* 2016; 5:6.
24. Cho H, Gonzales-Wartz KK, Huang D i sur. Bispecific antibodies targeting distinct regions of the spike protein potently neutralize SARS-CoV-2 variants of concern. *Science Translational Medicine* 2021;13(616).

25. Cortesi PA, Castaman G, Trifirò G i sur. Cost-Effectiveness and Budget Impact of Emicizumab Prophylaxis in Haemophilia A Patients with Inhibitors. *Thrombosis and Haemostasis* 2019; 120 (02): 216-228.
26. Davis JH, Aperlo C, Li Y i sur. SEEDbodies: fusion proteins based on strand-exchange engineered domain (SEED) CH3 heterodimers in an Fc analogue platform for asymmetric binders or immunofusions and bispecific antibodies. *Protein Engineering, Design & Selection* 2010; 23(4): 195-202.
27. Davis Orcutt K, Ackerman ME, Cieslewicz M i sur. A modular IgG-scFv bispecific antibody topology. *Protein Engineering, Design & Selection* 2010; 23(4): 221-228.
28. Davis-Gardner ME, Alfant B, Weber JA, Gardner MA, Farzan M. A Bispecific Antibody That Simultaneously Recognizes the V2- and V3-Glycan Epitopes of the HIV-1 Envelope Glycoprotein Is Broader and More Potent than Its Parental Antibodies. *mBio* 2020; 11(1).
29. De Nardis C, Hendriks LJA, Poirier E i sur. A new approach for generating bispecific antibodies based on a common light chain format and the stable architecture of human immunoglobulin G. *Journal of Biological Chemistry* 2017; 292(35): 14706-14717.
30. Delea TE, Amdahl J, Boyko D i sur. Cost-effectiveness of blinatumomab versus salvage chemotherapy in relapsed or refractory Philadelphia-chromosomenegative B-precursor acute lymphoblastic leukemia from a US payer perspective. *Journal of Medical Economics* 2017; 20(9):911-922.
31. Deshaies RJ. Multispecific drugs herald a new era of biopharmaceutical innovation. *Nature* 2020; 580(7803): 329-338.
32. Dietrich S, Gross AW, Becker S i sur. Constant domain-exchanged Fab enables specific light chain pairing in heterodimeric bispecific SEED-antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2020; 1868 (1).
33. Ebbert PT, Xavier F, Seaman CD, Ragni MV. Emicizumab prophylaxis in patients with haemophilia A with and without inhibitors. *Haemophilia* 2019; 26 (1): 41-46.
34. Einsele H, Borghaei H, Orlowski RZ i sur. The BiTE (Bispecific T-Cell Engager) Platform: Development and Future Potential of a Targeted Immuno-Oncology Therapy Across Tumor Types. *Cancer* 2020; 126(14): 3192-3201.
35. European Medicines Agency (EMA): Blincyto Product information. *Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/blincyto-h-c-3731-ii-0030-epar-assessment-report-variation_en.pdf*.

36. European Medicines Agency (EMA): Helimbra Product information. *Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/hemlibra-epar-product-information_hr.pdf*.
37. European Medicines Agency (EMA): Kimmtrak Product information. *Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kimmtrak>*
38. European Medicines Agency (EMA): Lunsumio Product information. *Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/lunsumio>*.
39. European Medicines Agency (EMA): Tecvayli Product informaion. *Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tecvayli>*.
40. Evans AR, Capaldi MT, Goparaju G i sur. Using bispecific antibodies in forced degradation studies to analyze the structure–function relationships of symmetrically and asymmetrically modified antibodies. *mAbs* 2019; 11 (6): 1101-1112.
41. Fabozzi G, Pegu A, Koup RA, Petrovas C. Bispecific antibodies: Potential immunotherapies for HIV treatment. *Methods* 2019; 154: 118-124.
42. Fleischmann RM, Bliddal H, Blanco FJ i sur. A Phase II Trial of Lutikizumab, an Anti–Interleukin-1 α / β Dual Variable Domain Immunoglobulin, in Knee Osteoarthritis Patients With Synovitis. *Arthritis & Rheumatology* 2019; 71 (7): 1056-1069.
43. Food and drug administration (FDA): Vabysmo product information. *Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/761235s000lbl.pdf*
44. Fu M, He Q, Guo Z i sur. Therapeutic Bispecific T-Cell Engager Antibody Targeting the Transferrin Receptor. *Frontiers in Immunology* 2019; 10.
45. Gallegos-Arreola MP, Borjas-Gutiérrez C, Zúñiga-González GM, Figuera LE, Puebla-Pérez AM, García-González JR. Pathophysiology of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Epidemiology of Acute Lymphoblastic Leukemia - From the Molecules to the Clinic* 2013.
46. Goebeler ME, Bargou RC. T cell-engaging therapies - BiTEs and beyond. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2020; 17 (7): 418-434.
47. Gökbuget N, Dombret H, Bonifacio M i sur. Blinatumomab for minimal residual disease in adults with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2018; 131 (14): 1522-1531.
48. Gómez Román VR, Murray JC, Weiner LM. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC). *Antibody Fc* 2014.

49. Guo G, Han J, Wang Y, Li Y. A potential downstream platform approach for WuXiBody-based IgG-like bispecific antibodies. *Protein Expression and Purification* 2020; 173.
50. Guy DG, Uy GL. Bispecific Antibodies for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Current Hematologic Malignancy Reports* 2018; 13(6): 417-425.
51. He P, Xin W, Schulz P, Sierks MR. Bispecific Antibody Fragment Targeting APP and Inducing α -Site Cleavage Restores Neuronal Health in an Alzheimer's Mouse Model. *Molecular Neurobiology* 2019; 56(11): 7420-7432.
52. Hornig N, Färber-Schwarz A. Production of Bispecific Antibodies: Diabodies and Tandem scFv. *Antibody Engineering* 2012; 907: 713-727.
53. Hosseini SS, Khalili S, Baradaran B i sur. Bispecific monoclonal antibodies for targeted immunotherapy of solid tumors: Recent advances and clinical trials. *International Journal of Biological Macromolecules* 2021; 167: 1030-1047.
54. Huehls AH, Coupet TA, Sentman CL. Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy. *Immunology and Cell Biology* 2015; 93: 290-296.
55. Hultqvist G, Syvänen S, Fang XT, Lannfelt L, Sehli D. Bivalent Brain Shuttle Increases Antibody Uptake by Monovalent Binding to the Transferrin Receptor. *Theranostics* 2017; 7(2):308-318.
56. Hummel HD, Kufer P, Grulich C i sur. Pasotuxizumab, a BiTER immune therapy for castration-resistant prostate cancer: Phase I, dose-escalation study findings. *Immunotherapy* 2021; 13(2): 125-141.
57. Jiabing M, Yicheng M, Tang M i sur. Bispecific Antibodies: From Research to Clinical Application. *Frontiers in Immunology* 2021; 12.
58. Kamen L, Myneni S, Langsdorf C i sur. A novel method for determining antibody-dependent cellular phagocytosis. *Journal of Immunological Methods* 2019; 468:55-60.
59. Kang C. Teclistamab: First Approval. *Drugs* 2022.
60. Kantarjian H, Stein A, Gökbuget N i sur. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2017; 376(9): 836–847.
61. Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2021. *mAbs* 2021; 13(1).
62. Kesik-Brodacka M. Progress in biopharmaceutical development. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2017; 65(3):306-322.
63. Kipriyanov SM. Generation of Bispecific and Tandem Diabodies. *Methods in Molecular Biology* 2009; 562(14): 177-193.

64. Klamroth R, Wojciechowski P, Aballéa S i sur. Efficacy of rFVIII_h versus Emicizumab for the Treatment of Patients with Hemophilia A without Inhibitors: Matching-Adjusted Indirect Comparison of A-LONG and HAVEN Trials. *Journal of Blood Medicine* 2021;12: 115–122.
65. Klein C, Schaefer W, Regula JT i sur. Engineering therapeutic bispecific antibodies using CrossMAb technology. *Methods* 2019; 154: 21-31.
66. Knoebl P, Thaler J, Jilma P, Quehenberger P, Gleixner K, Sperr W. Emicizumab for the treatment of acquired hemophilia A. *Blood* 2021; 137 (3): 410-419.
67. Kontermann RE, Brinkmann U. Bispecific antibodies. *Drug Discovery Today* 2015; 20 (7): 838-847.
68. Krah S, Kolmar H, Becker S, Zielonka S. Engineering IgG-Like Bispecific Antibodies-An Overview. *Antibodies* 2018; 7:28.
69. Krah S, Schröter C, Eller C i sur. Generation of human bispecific common light chain antibodies by combining animal immunization and yeast display. *Protein Engineering Design and Selection* 2017; 1-11.
70. Krishnamurthy A, Jimeno A. Bispecific antibodies for cancer therapy: A review. *Pharmacology and Therapeutics* 2018; 185:122-134.
71. Labrijn AF, Janmaat ML, Reichert JM, Parren PWHI. Bispecific antibodies: A mechanistic review of the pipeline. *Nature reviews Drug Discovery* 2019.
72. Li H, Saw PE, Song E. Challenges and strategies for next-generation bispecific antibody-based antitumor therapeutics. *Cellular & Molecular Immunology* 2020; 17: 451-461.
73. Lum LG, Tushir-Singh J. Arming “old guards” with “new dual-targeting weapons”. *Cancer Cell* 2021; 39 (5): 604-606.
74. Ljungars A, Schiödt T, Mattson U i sur. A bispecific IgG format containing four independent antigen binding sites. *Scientific Reports* 2020; 10(1).
75. Magistrelli G, Poitevin Y, Schlosser F i sur. Optimizing assembly and production of native bispecific antibodies by codon de-optimization. *mAbs* 2017; 9(2):231-239.
76. Malouf C, Ottersbach K. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2018; 75 (417): 417-446.
77. Marinescu C, Vladareanu AM, Mihai F. Acute Lymphocytic Leukemia in Adults. Pathologic Features and Prognosis. *Romanian Journal Of Internal Medicine* 2015; 53(1): 33-38.

78. Mei L, Zappala F, Tsourkas A. Rapid Production of Bispecific Antibodies from Off-the-Shelf IgGs with High Yield and Purity. *Bioconjugate Chemistry* 2020; 33: 134-141.
79. Melchiorre D, Manetti M, Matucci-Cerinic M. Pathophysiology of Hemophilic Arthropathy. *Journal of Clinical Medicine* 2017; 6(7): 63.
80. Miller BR, Demarest SJ, Lugovskoy A i sur. Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies. *Protein Engineering, Design & Selection* 2010; 23(7): 549-557.
81. Minchom A, Viteri S, Bazhenova L i sur. Amivantamab compared with real-world therapies in patients with advanced non-small cell lung cancer harboring EGFR exon 20 insertion mutations who progressed after platinum-based chemotherapy. *Lung Cancer* 2022; 168: 74-82.
82. Moore GL, Bennett MJ, Rashid R i sur. A robust heterodimeric Fc platform engineered for efficient development of bispecific antibodies of multiple formats. *Methods* 2019; 154: 38-50.
83. Moore PA, Shah K, Yang Y i sur. Development of MGD007, a gpA33 x CD3-Bispecific DART Protein for T-Cell Immunotherapy of Metastatic Colorectal Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 2018; 17(8): 1761-1772.
84. Moore PA, Zhang W,Jonah Rainey G i sur. Application of dual affinity retargeting molecules to achieve optimal redirected T-cell killing of B-cell lymphoma. *BLOOD* 2011; 117 (17): 4542-4551.
85. Moorkens E, Meuwissen N, Huys I, Declerck P, Vulto AG, Simoens S. The Market of Biopharmaceutical Medicines: A Snapshot of a Diverse Industrial Landscape. *Frontiers in Pharmacology* 2017; 8.
86. Müller J,Pekrul I, Pöttsch B, Berning B, Oldenburg J, Spannagl M. Laboratory Monitoring in Emicizumab-Treated Persons with Hemophilia A. *Thrombosis and Haemostasis* 2019; 119(09):1384-1393.
87. Neijssen J, Cardoso RMF, Chevalier KM i sur. Discovery of amivantamab (JNJ-61186372), a bispecific antibody targeting EGFR and MET. *Journal of Biological Chemistry* 2021; 296: 100641.
88. Nesspor TC,Kinealy K, Mazzanti N i sur. High-throughput Generation of Bipod (fab × scFv) Bispecific Antibodies Exploits Differential Chain Expression and Affinity capture. *Scientific Reports* 2020; 10(1).

89. Nicolò M, Desideri LF, Vagge A, Traverso CE. Faricimab: an investigational agent targeting the Tie-2/angiopoietin pathway and VEGF-A for the treatment of retinal diseases. *Expert opinion on investigational drugs* 2021; 30(3): 193-200.
90. Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B i sur. Emicizumab Prophylaxis in Hemophilia A with Inhibitors. *The new england journal of medicine* 2017; 377 (9): 809-818.
91. Olivier T, Prasad V. Tebentafusp in frst-line melanoma trials: An outperforming outlier. *Translation Oncology* 2022; 20:101408
92. Padte NN, Yu J, Huang Y, Ho DD. Engineering multi-specific antibodies against HIV-1. *Retrovirology* 2018; 15(60).
93. Parray HA, Shukla S, Samal S i sur. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *International Immunopharmacology* 2020; 85.
94. Pellerin L, Chen P, Gregori S, Hernandez-Hoyos G, Bacchetta R, Grazia Roncarolo M. APVO210: a Bispecific anti-cD86- il-10 Fusion Protein (aDaPTir™) to induce antigen-specific T regulatory Type 1 cells. *Frontiers in Immunology* 2018; 9(81).
95. Peña JR, Fitzpatrick D, Saidman SL. Complement-Dependent Cytotoxicity Crossmatch. *Methods in Molecular Biology* 2013; 257-283.
96. Pfizer: Pfizer's Elranatamab Granted FDA Breakthrough Therapy Designation for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma.
Available at: <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizers-elranatamab-granted-fda-breakthrough-therapy>
97. Posner J, Barrington P, Brier T, Datta-Mannan A. Monoclonal Antibodies: Past, Present and Future. *Concepts and Principles of Pharmacology* 2019; 81-141.
98. Ramasubramanian A, Tennyson R, Magnay M i sur. Bringing the Heavy Chain to Light: Creating Symmetric, Bivalent IgG-Like Bispecific. *Antibodies* 2020; 9: 62.3
99. Research K. Global Bispecific Antibodies Market Size USD 25 Billion Opportunity By 2028. *Globe Newswire NewsRoom*. 2022. Available from: <https://www.globenewswire.com/en/news-release/2022/02/10/2382503/0/en/Global-Bispecific-Antibodies-Market-Size-USD-25-Billion-Opportunity-By-2028.html>
100. Reyes A, Révil C, Niggli M i sur. Efficacy of emicizumab prophylaxis versus factor VIII prophylaxis for treatment of hemophilia A without inhibitors: network meta-analysis and sub-group analyses of the intra-patient comparison of the HAVEN 3 trial. *Current Medical Research and Opinion* 2019; 35(12): 2079-2087.

101. Rogers J, Li R, Mastroeni D i sur. Peripheral clearance of amyloid β peptide by complement C3-dependent adherence to erythrocytes. *Neurobiol Aging*. 2006;27:1733-1739.
102. Ross SL, Sherman M, McElroy PL, Lofgren JA, Moody G i sur. Bispecific T cell engager (BiTE®) antibody constructs can mediate bystander tumor cell killing. *PLOS ONE* 2017; 12(8).
103. Rouet R. i Christ, D. Bispecific antibodies with native chain structure, *Nature biotechnology* 2014; 32(2): 136-137.
104. Ruf P, Kluge M, Jäger M i sur. Pharmacokinetics, immunogenicity and bioactivity of the therapeutic antibody catumaxomab intraperitoneally administered to cancer patients. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2010; 69(6): 617-625.
105. Sahni J, Patel SS, Dugel PU i sur. Simultaneous Inhibition of Angiopoietin-2 and Vascular Endothelial Growth Factor-A with Faricimab in Diabetic Macular Edema. *Ophthalmology* 2019; 126(8):1155-1170.
106. Sawant MS, Streu CN, Wu L, Tessier PM. Toward Drug-Like Multispecific Antibodies by Design. *International Journal of Molecular Science* 2020; 21:7496.
107. Schaffitzel C, Hanes J, Jermutus L, Pluckthun A. Ribosome display: an in vitro method for selection and evolution of antibodies from libraries. *Journal of Immunological Methods* 1999; 231: 119-135.
108. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010; 125(2).
109. Sedykh SE, Prinz VV, Buneva VN, Nevinsky GA. Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives. *Drug Design, Development and Therapy* 2018; 12: 195-208.
110. Seidel UJE, Schlegel P, Lang P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Frontiers in Immunology* 2013; 4:76.
111. Sharma A, Kumar N, Parachuri N, Bandello F, Kuppermann BD, Loewenstein A. Faricimab: Two in the Bush Is Proving Better than One in the Hand?. *Ocular Immunology and Inflammation* 2021; 1-3.
112. Shatz W, Ng D, Dutina G i suradnici. An efficient route to bispecific antibody production using single-reactor mammalian co-culture. *Mabs* 2016 ; 8(8):1487-1497.
113. Shim H. Bispecific Antibodies and Antibody–Drug Conjugates for Cancer Therapy: Technological Considerations. *Biomolecules* 2020; 10 (3).

114. Shiraiwa H, Narita A, Kamata-Sakurai M i sur. Engineering a bispecific antibody with a common light chain: Identification and optimization of an anti-CD3 epsilon and anti-GPC3 bispecific antibody, ERY974. *Methods* 2019; 154: 10-20.
115. Sigmund AM, Sahasrabudhe KD, Bhatnagar B. Evaluating Blinatumomab for the Treatment of Relapsed/Refractory ALL: Design, Development, and Place in Therapy. *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy* 2020; 10:7-20.
116. Spasevska I. An outlook on bispecific antibodies:Methods of production and therapeutic benefits. *BioSciences Master Reviews* 2014.
117. Spiess C, Merchant M, Huang A i sur. Bispecific antibodies with natural architecture produced by co-culture of bacteria expressing two distinct half-antibodies. *Nature Biotechnology* 2013; 31 (8): 753-758.
118. Staton TL, Peng K, Owen R i sur. A phase I, randomized, observer-blinded, single and multiple ascending-dose study to investigate the safety, pharmacokinetics, and immunogenicity of BITS7201A, a bispecific antibody targeting IL-13 and IL-17, in healthy volunteers. *BMC Pulmonary Medicine* 2019; 19(1).
119. Stieglmaier J, Benjamin J, Nagorsen D. Utilizing the BiTE (bispecific T-cell engager) platform for immunotherapy of cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2015; 15(8):1093-1099.
120. Suzuki M, Kato C, Kato A. Therapeutic antibodies: their mechanisms of action and the pathological findings they induce in toxicity studies. *J Toxicol Pathol* 2015; 28: 133–139.
121. Syed YY. Amivantamab: First Approval. *Drugs* 2021;81:1349-1353.
122. Taylor RP, Lindorfer MA, Atkinson JP. Clearance of amyloid-beta with bispecific antibody constructs bound to erythrocytes. *Alzheimer's Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 2020; 6.
123. Teitell MA, Pandolfi PP. Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2019; 4: 175-198.
124. Thakur A, Huang M, Lum LG. Bispecific antibody based therapeutics: Strengths and challenges. *Blood Reviews* 2018; 32(4): 339-347.
125. Torres T, Romanelli M, Chiricozzi A. A revolutionary therapeutic approach for psoriasis: bispecific biological agents. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2016; 25(7): 751-754.

126. Tustian AD, Endicott C, Adams B, Mattila J, Bak H. Development of purification processes for fully human bispecific antibodies based upon modification of protein A binding avidity. *MABS* 2016;8 (4), 828–838.
127. Van Blarcom T, Lindquist K, Melton Z i sur. Productive common light chain libraries yield diverse panels of high affinity bispecific antibodies. *mAbs* 2017; 10 (2): 256-268.
128. Vyse S, Huang PH. Amivantamab for the treatment of *EGFR* exon 20 insertion mutant non-small cell lung cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2022; 22(1):3-16.
129. Waaijer SJH, Warnders FJ, Stienen S i sur. Molecular Imaging of Radiolabeled Bispecific T-cell Engager ⁸⁹Zr-AMG211 Targeting CEA-positive Tumors. *Clinical Cancer Research* 2018; 24(20): 4988-4996.
130. Waldmann H. Human Monoclonal Antibodies: The Benefits of Humanization. *Methods in Molecular Biology* 2018; 1-10.
131. Walseng E, Nelson CG, Qi J i sur. Chemically Programmed Bispecific Antibodies in Diabody Format. *Journal of Biological Chemistry* 2016; 291(37): 19661-19673.
132. Wang B, Yang C, Jin X i sur. Regulation of antibody-mediated complement-dependent cytotoxicity by modulating the intrinsic affinity and binding valency of IgG for target antigen. *mAbs* 2019; 12 (1).
133. Wang Q, Chen Y, Park J, Liu X, Hu Y, Wang T, McFarland K, Betenbaugh MJ. Design and Production of Bispecific Antibodies. *Antibodies* 2019; 8(3): 43.
134. Watanabe Y, Tanabe A, Hamakubo T, Nagatoishi S, Tsumoto K. Development of biparatopic bispecific antibody possessing tetravalent scFv-Fc capable of binding to ROBO1 expressed in hepatocellular carcinoma cells. *The Journal of Biochemistry* 2021; 170(2): 307-315.
135. Weber F, Bohrmann B, Niewoehner J i sur. Brain Shuttle Antibody for Alzheimer's Disease with Attenuated Peripheral Effector Function due to an Inverted Binding Mode. *Cell Reports* 2018; 22: 149-162.
136. Wu Y, Yi M, Zhu S, Wang H, Wu K. Recent advances and challenges of bispecific antibodies in solid tumors. *Experimental Hematology & Oncology* 2021; 10(56).
137. Yun J, Lee SH, Kim SY i sur. Antitumor Activity of Amivantamab (JNJ-61186372), an EGFR-cMet Bispecific Antibody, in Diverse Models of *EGFR* Exon 20 Insertion-Driven NSCLC. *Cancer Discovery* 2020; 10(8): 1194-1209.

138. Zhang J, Yi J, Zhou P. Development of bispecific antibodies in China: overview and prospects. *Antibody Therapeutics* 2020; 3(2): 126-145.
139. Zhang X, Yang Y, Fan D, Xiong D. The development of bispecific antibodies and their applications in tumor immune escape. *Experimental Hematology & Oncology* 2017; 6(12):1-6.
140. Zhang Z, Luo F, Cao J i sur. Anticancer bispecific antibody R&D advances: a study focusing on research trend worldwide and in China. *Journal of Hematology & Oncology* 2021; 14(1).
141. Zhao Q. Bispecific Antibodies for Autoimmune and Inflammatory Diseases: Clinical Progress to Date. *BioDrugs* 2020; 34(2): 111-119.
142. Zhu M, Wu B, Brandl C i sur. Blinatumomab, a Bispecific T-cell Engager (BiTE) for CD-19 Targeted Cancer Immunotherapy: Clinical Pharmacology and Its Implications. *Clinical Pharmacokinetics* 2016; 55(10): 1271-1288.