

BISPECIFIČNA PROTITELESA: STRUKTURA, PRINCIP DELOVANJA, NEŽELENI UČINKI

Prof. dr. Barbara Jezeršek Novaković

Sektor internistične onkologije, Onkološki inštitut Ljubljana

Povzetek

Imunoterapevtski pristopi so spremenili pojmovanje sistemskega zdravljenja raka. Med različnimi oblikami imunoterapije se pojavlja uporaba bispecifičnih protiteles kot inovativna oblika zdravljenja. Bispecifična protitelesa vključujejo delovanje imunskega sistema kot strategijo, ki preusmerja aktivacijo prirojene in pridobljene imunosti proti specifičnim antigenom, ki so produkt tumorskih celic.

Uvod

Napredek v biotehnologiji in rekombinantnih tehnikah je omogočil razvoj številnih pristopov priprave protiteles in konstruktov, ki vključujejo protitelesa ali njihove dele. Poleg intaktnih imunoglobulinov G so v postopkih kliničnih preskušanj tudi konjugati protiteles z različnimi učinkovinami in bispecifična protitelesa. Standardna humana protitelesa so monospecifična protitelesa, pri katerih obe vezavni mesti vežeta isto tarčo (isti epitop).

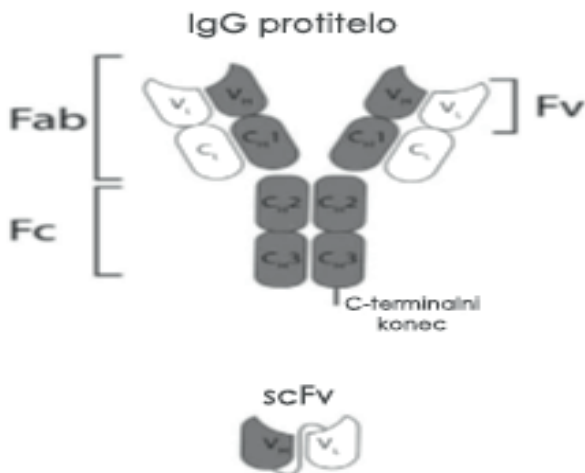
Definicija bispecifičnih protiteles

Bispecifična protitelesa so bolj kompleksne molekule kot standardna protitelesa, pri katerih vezavna mesta vežejo različne tarče (različne epitope). Bispecifična protitelesa se med seboj močno razlikujejo po svoji sestavi in posledično po mehanizmu delovanja. Vezava različnih tarč omogoča bodisi vzpostavljanje kontakta imunske zmožnih celic s tumorskimi celicami in posledično delovanje imunske zmožnih celic na tumorske celice preko imunskih mehanizmov in/ali prenos učinkovin (citotoksičnih, radioaktivnih) v tumorske celice in/ali blokado signaliziranja, ki je pomembno za preživetje tumorskih celic in tumorjev v celoti. Za vsakega od mehanizmov delovanja so potrebne specifične farmakokinetske značilnosti bispecifičnih protiteles, kar lahko dosežemo s spreminjanjem strukture bispecifičnih protiteles.

Normalna zgradba protitelesa IgG

Normalna zgradba protitelesa IgG je prikazana na Sliki 1, hkrati slika prikazuje tudi enoverižni variabilni fragment.

Slika 1. Zgradba protitelesa IgG, zgradba enoverižnega variabilnega fragmenta (scFv).



Protitelo ima dva funkcionalna dela: regijo Fc in vezavno mesto Fab. Regija Fc posreduje efektorske funkcije, ki vodijo do imunsko posredovanega uničenja tarče. Regija Fc tudi prepozna t. i. neonatalni receptor, kar pomembno vpliva na regulacijo serumskih koncentracij IgG in podaljša biološko razpolovno dobo protitelesa. Regija Fab vključuje variabilne fragmente, ki tvorijo vezavno mesto/vezavna mesta. Obe vezavni mesti vežeta isti epitop – protitelo je zato bivalentno, vendar monospecifično. Bispecifična protitelesa, ki imajo afiniteto do dveh različnih epitopov, se posledično vežejo na dve tarči, bodisi monovalentno ali bivalentno, glede na strukturo bispecifičnega konstrukta.

Priprava bispecifičnih protiteles

Bispecifična protitelesa lahko tvorimo s kvadromom, ki nastane s fuzijo dveh hibridomov, lahko tudi s konjugacijo dveh obstoječih protiteles ali njihovih fragmentov. Precej prednosti pri pripravi bispecifičnih protiteles pa ima genetski inženiring in uporaba genetsko spremenjenih rekombinantnih proteinov, saj omogoča boljši nadzor nad združevanjem težkih in lahkih verig in preprečuje naključno združevanje le-teh.

Struktura bispecifičnih protiteles

Strukturo (sestavo) bispecifičnih protiteles lahko modificiramo na različne načine in s tem vplivamo na njihovo delovanje (funkcionalnost) in povečujemo njihovo učinkovitost – npr. s spreminjanjem imunogenosti, efektorskih funkcij in razpolovne dobe protitelesa.

Imunogenost protiteles zmanjšujemo tako, da imunogene dele protiteles, ki izvirajo iz miši, nadomestimo s humanimi (himerični ali humanizirani konstrukti).

Osrednjo vlogo za efektorsko funkcijo protitelesa ima regija Fc, ki omogoča imunsko posredovane mehanizme celičnega ubijanja, kot sta s komplementom posredovana citotoksičnost in s protitelesi posredovana celična citotoksičnost. Na to lahko vplivamo z modifikacijo (glikiranje, sprememba sekvence aminokislin) ali celo popolno odstranitvijo regije Fc. Glede na to delimo protitelesa na tista, ki vključujejo regijo Fc, in tista, ki so brez nje, ki so posledično veliko manjša in s povsem spremenjenimi farmakokinetičnimi lastnostmi.

Velikost konstrukta vpliva na njegovo razpolovno dobo, čim manjši je konstrukt, tem krajša je njegova razpolovna doba. Velikost konstrukta lahko zmanjšamo tudi z odstranitvijo nevezavnih delov regije Fab (predela C_L in C_{H1}), v tem primeru ostanejo le variabilni fragmenti. Variabilni fragmenti, povezani z enojno peptidno verigo, se imenujejo enoverižni variabilni fragment (scFv), ki ima izrazito kratko razpolovno dobo. Podaljšanje razpolovne dobe je možno s povečanjem velikosti bispecifičnega konstrukta ali vezavo konstrukta na albumin, polietilenglikolni fragment ali z vezavo regije Fc na konstrukt.

Bispecifična protitelesa se v nasprotju s standardnimi protitelesi ne vežejo vedno bivalentno na eno tarčo. Bivalentna vezava sicer poveča avidnost in lahko vpliva na farmakodinamiko konstrukta.

Mehanizmi delovanja bispecifičnih protiteles

Mehanizmi delovanja, ki so se izkazali kot učinkoviti na področju onkologije, vključujejo predvsem:

- stabilno vzpostavljanje kontakta imunsko zmožnih celic s tumorskimi celicami in posledično njihovo delovanje na tumorske celice,
- prenos učinkovin (citotoksičnih, radioaktivnih) v/do tumorske celice in
- blokado signaliziranja, ki je pomembno za delovanje tumorskih celic in tumorjev v celoti.

Stabilno vzpostavljanje kontakta imunsko zmožnih celic s tumorskimi celicami.

Večina bispecifičnih protiteles, ki so v kliničnih raziskavah in tudi že registriranih, sodi v to skupino.

Bispecifična protitelesa, ki vežejo celice T CD3+

Vezava celic T in tumorskih celic (ki nosijo s tumorjem povezani antigen) z bispecifičnim protitelesom sproži nastanek citolitične sinapse. Celice T sprostijo perforin in citotoksični granzim B, kar privede do smrti tumorske celice. Dodatek kostimulatornega signala (kot npr. IL-2 *in vitro*) lahko poveča učinkovitost uničevanja tumorskih celic. Ugotovljeno je bilo tudi, da igrajo imunske nadzorne točke (npr. izražanje PD-L1) pomembno vlogo pri zmanjševanju odgovora na bispecifične konstrukte, ki aktivirajo delovanje celic T pri hematoloških malignomih, zato je dodatek protiteles proti PD1 ali proti PD-L1 k tem konstruktom povečal njihovo učinkovitost. V nekaterih primerih, ko so pomešane tumorske celice, ki izražajo s tumorjem povezan antigen, s tistimi brez tega antigena, lahko bispecifični konstrukt uničuje tudi celice brez tega antigena (primer bispecifični T-celični povezovalc antiCD3 x antiEGFR; bispecific T cell engager-BiTE). S tumorjem povezani antigen bi moral biti čimbolj specifičen za tumorske celice, ni pa potrebno, da je pomemben za nastanek tumorja, temveč služi za vezavo na membrani tumorske celice. S tumorjem povezani antigeni hematoloških malignomov, ki služijo za pripravo bispecifičnih konstruktov, so najpogosteje CD19, CD20, CD33, FcR1L5, CLEC12A, manj pogosto CD30, BCMA. S tumorjem povezani antigeni solidnih tumorjev, ki služijo za pripravo bispecifičnih konstruktov, so najpogosteje HER2, EGFR, PSMA, EPCAM, gp100. Za tumor specifična antigena (intracelularna), ki služita za pripravo bispecifičnih konstruktov, sta mutiran RAS peptid-HLA kompleks in mutiran p53 peptid-HLA kompleks. V tem primeru je namesto regije Fab protitelesa vezavno mesto T-celični receptor.

Poleg aktivacije limfocitov T CD3+ pa je možna aktivacija tudi γδ celic T, da se izognemo aktivaciji imunosupresivnih celic Treg in zmanjšamo možnost neželenih učinkov. Bispecifična protitelesa proti CD16A pa aktivirajo celice ubijalke (angl. natural killer cells, NK), povečajo sproščanje proinflammatoryh citokinov in kemokinov in ojačajo protitumorsko delovanje NK celic.

Prenos učinkovin (citotoksičnih, radioaktivnih) v/do tumorske celice Bispecifična protitelesa imajo večjo selektivnost in učinkovitost v primerjavi z monoklinalnimi protitelesi, zato so primerna tudi za prenos učinkovin v/do tumorske celice. Večja specifičnost bispecifičnih konstruktov zmanjšuje neželene učinke, zmožnost endocitoze pa omogoča bolj učinkovit transmembranski prenos učinkovin.

Blokada signaliziranja, ki je pomembno za delovanje tumorskih celic in tumorjev v celoti.

Bispecifična protitelesa, ki vežejo receptorje

Ker so s tumorji povezani antigeni izraženi tudi na normalnih celicah, kar povzroča neželene učinke bispecifičnih protiteles, obstaja možnost, da kot tarča služita dva s tumorjem povezana antigena ali dva epitopa istega antigena, kar poveča specifičnost bispecifičnega konstrukta in zmanjša toksičnost. Poleg tega je pri malignih tumorjih prisotna disregulacija več proteinov, tako da lahko hkratno ciljanje kompenzatornih poti poveča učinkovitost in zmanjša možnost pojava rezistence. Možen mehanizem delovanja je tako zavora dveh s tumorjem povezanih antigenov, kar poveča terapevtski učinek s ciljanjem na različne signalne poti ali z vezavo na dva različna epitopa istega receptorja.

Na površini imunsko zmožnih celic so številni regulatorni proteini, vključno s proteini nadzornih imunskih točk, ki regulirajo aktivacijo, proliferacijo in protitumorsko delovanje imunskih celic. S stimulacijo ali zaviranjem relevantnih signalnih poti lahko zato dosežemo bolj učinkovito imunsko posredovano uničevanje tumorskih celic. Npr. bispecifični konstrukti, ki hkrati zavirajo CTLA-4 in PD-1/PD-L1, omogočajo aktivacijo imunskih celic v tumorskem mikrookolju, kar vodi v apoptozo tumorskih celic. Obetajoč pristop predstavlja tudi uporaba bispecifičnega konstrukta z agonističnim delovanjem na 4-1BB in OX40 (kostimulatorna receptorja).

Bispecifična protitelesa so lahko usmerjena proti receptorjem na imunskih celicah (limfociti T, ki infiltrirajo tumor) in na tumorskih celicah, kar aktivira protitumorsko aktivnost imunskih celic in direktno sproža apoptozo tumorskih celic.

Bispecifična protitelesa, ki vežejo citokine in receptorje

Priprava bispecifičnih protiteles, ki vežejo citokine, je omejena zaradi kratkega razpolovnega časa in visoke imunogenosti. Bodočnost je v kombinirani uporabi z drugimi učinkovinami (npr. zaviralci imunskih nadzornih točk).

Priprava bispecifičnih konstruktov proti dvema citokinoma je še v začetni fazi.

Tri- in tetraspecifična protitelesa

Kombinirana terapija, ki cilja na sinergistične poti, je pristop, ki omogoča povečanje učinkovitosti protitumorske terapije. Celice T za aktivacijo potrebujejo številne signale. Posledično so tri- in tetraspecifična protitelesa pričakovano učinkovitejša na tem področju. Trispecifična protitelesa vključujejo tri različna vezavna mesta za antigene in tetraspecifična protitelesa vključujejo štiri različna vezavna mesta za

antigene, kar omogoča učinkovitejšo povezavo celic in bolj učinkovito stimulacijo imunskih celic.

Neželeni učinki

Neželeni učinki pri uporabi bispecifičnih konstruktov so lahko resni in življenje ogrožajoči. V visokem odstotku se pojavljajo imunski neželeni učinki, kot so sindrom sproščanja citokinov in nevrotoksičnost, povezana z imunskimi celicami. Podroben opis obeh zapletov in ustrezno ukrepanje je podano v drugih prispevkih v tem zborniku. Poleg tega se pri aplikacijah nekaterih bispecifičnih konstruktov lahko pojavlja hepatotoksičnost, ki je odvisna od odmerka (angl. off target, aktivnost in toksičnost zunaj želenega cilja), okužbe in hematološki neželeni učinki. Pojavljanje imunskih neželenih učinkov je odvisno od farmakokinetičnih lastnosti bispecifičnih konstruktov, na katere lahko vplivamo s sestavo bispecifičnih konstruktov. Strategije, ki omogočajo pogojno aktivacijo celic T znotraj tumorjev in spremembe vezavne afinitete do tarč (nizka afiniteta za CD3 omogoča počasnejše naraščanje koncentracije perifernih citokinov), lahko zmanjšajo ali v celoti izničijo t. i. »on-target, off-tumor« neželene učinke.

Zaključek

Razvoj številnih učinkovitih bispecifičnih protiteles omogoča pridobivanje izkušenj glede vzorcev protiteles in prilagajanja njihove učinkovitosti. Pravilna struktura in izbira tarč sta pomembni za učinkovitost in čim manjšo toksičnost. Spreminjanje strukture bispecifičnih protiteles vpliva na njihove farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti in posledično ponuja neomejene možnosti za njihovo uporabo. Kombinacije z drugimi imunomodulatornimi učinkovinami (predvsem modulatorji imunskih nadzornih točk) dodatno vplivajo na njihovo učinkovitost.

Literatura

1. Suurs FV, Lub-de Hooge MN, de Vries EGE, de Groot DJA. A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges. *Pharmacology & Therapeutics* 2019; 201: 103–119.
2. Sun Y, Yu X, Wang X, et al. Bispecific antibodies in cancer therapy: Target selection and regulatory requirements. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2023; 13(9):3583e3597.
3. Wei J, Yang Y, Wang G, Liu M. Current landscape and future directions of bispecific antibodies in cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2022; 13:1035276. doi:10.3389/fimmu.2022.1035276.
4. Ordóñez-Reyes C, García-Robledo JE, Chamorro DF, et al. Bispecific Antibodies in Cancer Immunotherapy: A Novel Response to an Old Question. *Pharmaceutics* 2022; 14, 1243. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061243>.
5. Wu Y, Yi M, Zhu S, et al. Recent advances and challenges of bispecific antibodies in solid tumors. *Experimental Hematology & Oncology* 2021; 10:56. <https://doi.org/10.1186/s40164-021-00250-1>.