

Е.В. ЛУКАЧ

МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА В ОНКОЛОГІЇ

*Від. онкопатології ЛОР-органів (керівник – проф. Е.В. Лукач)
Ін-ту отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка АМН України
(дир. – чл.-кор. АМНУ, проф. Д.І. Заболотний)*

В 1984 р. Жоржу – Жан-Францу Келеру та Цезару Мільштейну було присуджено Нобелівську премію з фізіології, як авторам розробки гібридом, що виробляли моноклональні антитіла (МКА). З цього моменту почався бурхливий розвиток біотехнології в даному напрямку, який привів до широкого застосування МКА в діагностиці, а за останній час – і в лікуванні. Уже в 1979 р. Nadler та співавтори пролікували перших пацієнтів. Відтоді тисячі хворих із злоякісними пухлинами отримали терапію моноклональними антитілами (Multani, Grossbard, 1998). Так, у США на 2005 р. було дозволено використовувати для лікування 18 препаратів МКА. Особливо важливе значення для онкології має група МКА, що реагують з пухлинними клітинами.

Які ж принципи лягли в основу виготовлення МКА?

В 1964 р. Ф. Бернет опублікував свою клонально-селекційну теорію імунітету. Теорія селекції клонів виходить з 4 наступних посилянь.

1. *Обширність популяції лімфоїдних клітин.* За розрахунками Ф. Бернета, у людини знаходиться приблизно 10^{12} лімфоїдних клітин. Їх родоначальником є ретикулярна клітина. Більшість клітин в лімфоїдній тканині представлені перехідними формами. Ці форми об'єднуються загальним терміном “бласти”.

2. *Гетерогенність популяції лімфоїдних клітин.* Вона пояснюється мутаційним процесом, що відбувається в соматичних клітинах даної популяції. Оскільки лімфоїдна тканина складається з великої кількості клітин, які постійно діляться, вся популяція

представляє велику кількість клітинних клонів. Гетерогенність і клонування відносяться і до клітин, що продукують гамма-глобуліни. При цьому кожен клон клітин продукує до кожного антигена свій гамма-глобулін. Ф. Бернет вважає, що в природі існує біля 10 000 можливих антигенів. В такому випадку, вірогідно, що в лімфоїдній популяції повинно бути у крайньому разі 10 000 клонів, які виробляють відповідно до антигена антитіло-глобулін. Відомо, що клон - це популяція організмів, які утворюються від одного родоначальника шляхом розмноження. Для рослин такою формою є розмноження пагінцями, для клітин - ділення без попередньої кон'югації. Всі особи всередині клона генетично ідентичні.

3. *Мала кількість антигена стимулює клітини преадаптованого клону до розмноження та диференціювання в бік клітин - продуцентів антитіл.*

Такі клітини, що реагують на антиген, називаються імунокомпетентними. В залежності від характеру антигена та умов внутрішнього середовища організму стимульований клон може диференціюватися в бік накопичення плазмоцитів (зрілих В-лімфоцитів, які продукують антитіла) або великої кількості лімфоцитів (Т-лімфоцитів, клітин пам'яті та інших), сенсибілізованих до даного антигена. Останні (Т-лімфоцити) визначають імунологічні реакції сповільненого типу (клітинний імунітет).

4. *Велика кількість антигена знищує преадаптовані імунокомпетентні клітини, елімінує відповідний клон. Це посилення є основним для пояснення імунологічної толе-*

рантності і розпізнавання “свого” (Ф. Бернет, 1971; Р. Петров, 1987).

При введенні в організм тварин і людини чужих макромолекулярних речовин – білків або поліцукрів (антигенів) в крові виникають захисні білки – антитіла, для яких характерна незвичайна, унікальна специфічність. Кожне антитіло впізнає тільки свій антиген, точніше, одну його детермінантну групу. Детермінантна група складається з декількох амінокислот (звичайно з 6-8), що утворюють просторову структуру, характерну для даного білка. В одному білкові, що складається з декількох сотень амінокислот, є кілька (5-15) різних детермінант, тому до одного білка формується ціле сімейство різних за своєю специфічністю антитіл. Навіть до одної детермінанти утворюється цілий спектр антитіл, що відрізняються за структурою, ступенем специфічності і міцності зв'язування с нею. Те ж саме стосується і поліцукрів, детермінантні групи яких утворюються залишками 3-6 моноцукрів.

Таким чином, при введенні антигена виникає велике сімейство антитіл, скерованих до різних його детермінант. Навіть всередині групи є різні антитіла, направлені до одної і тої ж детермінанти. В крові тварин, що імунізовані, формується багатий та унікальний за складом спектр антитіл, котрий і забезпечує їх абсолютну специфічність в розпізнаванні даного антигена. Згідно з теорією Ф. Бернета, що пояснює різновидність антитіл, всі антитіла виробляються в результаті мутацій відповідних генів в особливій групі клітин. Для підтвердження цієї теорії майбутній відкривач МАТ – Ж. Келер в своїй дисертації вирішив дослідити популяцію антитілопродукуючих клітин (клон) і з'ясувати, як часто відбуваються мутації. При вивченні мутацій Келер ввів мишам антиген, виділив з їх селезінки клітини, що виробляють антитіла (плазмоцити), та з'єднав ці плазмоцити за допомогою поліетіленгліколя з клітинами мієломи. В результаті утворилась гібридомна мієлома, яка успадкувала від нормальної клітини здатність синтезувати антитіла, а від пухлинної – безсмертність.

Наступний етап – клонування та відбір потрібних клонів. Клітини розсіваються у спеціальні планшети, які мають 96 лунок. У кожному з них вносять приблизно 10 гібри-

домних клітин, які культивуються в присутності “кормлячих” клітин, що не мають відношення до гібридом, але сприяють їх росту. Після декількох днів культивування зміст кожної лунки перевіряють на присутність антитіл потрібної специфічності. Клітини з лунок, які мають потрібні антитіла, знову культивуються, тобто клонуються. Процедура повторяється 1-2 рази. Таким чином відбираються клони, що продукують антитіла тільки потрібної специфічності, тобто моноклональні антитіла. Отримані клони можна заморозити при -70°C та зберігати до часу, коли вони знадобляться. Їх можна накопичувати в культуральному середовищі, а також можливо перещепити мишам (оскільки гібридами – це пухлинні клітини), де вони будуть рости і накопичувати колосальні кількості МКА. Моноклональні антитіла не містять сторонніх антитіл і можуть розглядатися як чисті хімічні реактиви (Г.И. Абелев, 1998).

Застосування МКА, поряд з культивованими *ex vivo* пухлинно-інфільтруючими лімфоцитами (TIL) і лімфокінактивованими кілерами (LAK), а також терапією дендритними клітинами, все це – методи пасивної імунотерапії при злоякісних пухлинах (Rosenberg, 1997). Згідно з існуючими даними, типове антитіло є імуноглобуліном і складається з 4 ланцюгів (2 легких і 2 важких) та має постійний і гіперваріабельний домен. Постійним доменом антитіло фіксується до Fc-рецептора цитотоксичного лімфоцита, а гіперваріабельним доменом – до відповідного антигену. Механізм проти-пухлинної дії МКА, за Jungans та співавторами (1996), достатньо складний і залучає наступні елементи:

- 1) комплемент-залежну цитотоксичність;
- 2) антитіло-залежну клітинну цитотоксичність;
- 3) Ав2 вакцини;
- 4) фагоцитоз (тільки активовані макрофаги);
- 5) блокаду рецепторів (антирецептори);
- 6) апоптоз;
- 7) внутрішньоклітинні ефекти.

Найбільш значущими є перші три механізми. При реалізації комплемент-

залежної цитотоксичності після зв'язування антитілом антигену на поверхні пухлинної клітини активізується багатоетапна система комплементу. На останньому її етапі утворюється білок C₉, здатний формувати отвори в базальній мембрані клітин, що, в кінцевому результаті, приводить до її загибелі. Другим важливим механізмом є антитілозалежна цитотоксичність. При цьому МКА своїм гіперваріабельним доменом зв'язується з відповідним антигеном на поверхні пухлинної клітини, а постійним доменом – з Fc-рецептором цитотоксичного лімфоцита, так званого "кілера". Останній має властивість синтезувати та виділяти білок – перфорін (аналогічний протеїну C₉ системи комплементу) та серинові протеази, що руйнують клітинну мембрану. Третім важливим механізмом протипухлинної дії МКА є так званий механізм Ав2 вакцини. Він реалізується при застосуванні МКА, які містять чужий (частіше всього мишачий) білок. У відповідь на його введення утворюються антидіотипові антитіла, здатні зв'язуватись з поверхневим пухлинним антигеном і викликати один з вказаних механізмів цитотоксичності. Не дивлячись на, здавалось би, простоту концепції використання МКА при злоякісних пухлинах, проблема поки що далека від повного вирішення з наступних причин:

- *біохімічна та біологічна нестабільність моноклональних антитіл, що вимагає їх зберігання і транспортування в особливих температурних умовах;*

- *складності фармакокінетики антитіл (погана екстравазальна дифузія і проникнення антитіл в пухлину, швидка зміна імунних комплексів на поверхні клітини);*

- *імуногенність мишачих моноклональних антитіл;*

- *гетерогенність пухлини і специфічність антитіл.*

Найбільш важливими факторами, що перешкоджають ефективному використанню МКА, є гетерогенність пухлинної маси та імуногенність антитіл. Гетерогенність пухлини означає, що далеко не всі клітини пухлини можуть мати антиген, проти якого скеровано специфічне антитіло. Крім того, внаслідок генетичної нестабільності в клітинах пухлини часто відбуваються мутації,

в тому числі пов'язані з поверхневими антигенами. В результаті частина клітин легко „вислизає” від терапевтичної дії даного МКА. Це “a priori” не дозволяє забезпечувати 100% ефективність використання МКА. Їх головний парадокс: основне досягнення антитіл - їх специфічність, але чим більш специфічне антитіло, тим більше шансів у клітин пухлини запобігти їх впливу (Jungans et al., 1996). Іншим важливим недоліком МКА є їх імуногенність, тобто утворення у відповідь на їх введення нейтралізуючих антитіл. Це відбувається у 75% хворих при введенні чужого (частіше за все мишачого) білка. При повторних введеннях препарату він негайно нейтралізується і, таким чином, знижується його ефективність.

В даний час вчені докладають зусиль для підвищення ефективності терапії МКА. Перш за все – це підвищення їх біологічної активності. Найбільш перспективним в цьому плані вважається отримання біспецифічних антитіл. Біспецифічне антитіло одним плечем гіперваріабельного домена зв'язується з поверхневим антигеном клітини пухлини, а іншим - з антигенним рецептором Т-клітини, що забезпечує їх тісний контакт.

Іншим напрямком підвищення ефективності МКА є зниження їх імуногенності. Для цього за допомогою найскладніших методів генної інженерії було отримано химерні і гіперхимерні (гуманізовані) антитіла з різним співвідношенням мишачого та людського білка. Химерне антитіло містить 30-35% мишачого і 65-70% людського білка, в гіперхимерному (гуманізованому) антитілі вміст людського білка досягає 90%, а мишачого – тільки 10%. В результаті частота утворення нейтралізуючих антитіл у відповідь на введення цих модернізованих антитіл зменшується з 74% при мишачих до 46% – при химерних і до 4% – при гіперхимерних (гуманізованих) антитілах. До препаратів, які синтезуються описаним методом, відносяться Zenarax, Vitaxin, Mylotarg, Herceptin і Xolair, бевацизумаб (авастин).

З існуючих на даний момент препаратів на основі МКА, дозволених в Росії для використання при лікуванні онкологічних хворих, лише один є препаратом нативних МКА – це едреколомаб (панорекс) (Н.И.

Переводчикова, 2005). Панорекс – мишаче МКА проти поверхневого антигена аденокарциноми 17-1А (Ер-САМ). Цей антиген найбільш часто експресується пухлинами товстого кишечника. Клінічному його ефекту не перешкоджає утворення у 80% пацієнтів антитіл до МКА, що, можливо, пов'язано з антиідіотиповою імунізацією. Reuthmuller та співавтори (1994) провели рандомізоване дослідження з метою оцінки ефективності препарату „Панорекс” при ад'ювантному застосуванні після хірургічного втручання у осіб з раком ободової кишки з метастазами в регіонарні лімфовузли (Duke's C), тобто з високим ризиком рецидиву захворювання. В дослідження було включено 189 хворих, причому 99 з них отримали 5 внутрішньовенних введень панорекса, а 90 склали контрольну групу. Як показали 7-річні результати (Reuthmuller et

al., 1998), включення панорекса дозволило знизити на 32% число померлих від рака ($P < 0,01$), на 23% – число рецидивів захворювання ($P < 0,04$) та частоту розвитку віддалених метастазів ($P = 0,004$). При цьому вплив панорекса на частоту виникнення місцевих рецидивів не був визначений ($P = 0,65$), що цілком зрозуміло, бо поява місцевого рецидиву пов'язана з технічними недоліками операції. Ці дані дозволили авторам констатувати, що ад'ювантна терапія з використанням панорекса у пацієнтів з колоректальним раком Duke's C дозволяє на 1/3 збільшити показники загального і безрецидивного виживання.

Лікування МКА звичайно добре переноситься хворими і частота бічних ефектів не піддається співставленню з аналогічними показниками для хіміотерапії (табл. 2).

Таблиця 2

Частота побічних реакцій при лікуванні мишачим моноклональним антитілом „Панорекс” (Reuthmuller et al., 1994)

| Побічні реакції | Число хворих (%), яких лікували препаратом „Панорекс” (n=183) |
|-----------------------|---|
| Понос | 15% |
| Нудота | 9% |
| Лихоманка | 8% |
| Біль черевний | 7% |
| Блювання | 7% |
| Анафілактичні реакції | 1,8% |

Найбільшою проблемою є анафілактичні реакції. Хоча частота виникнення останніх не перевищує 1,8%, ризик їх появи вимагає скрупульозного спостереження за хворими при кожному введенні препарату (В.М. Моисеєнко, 1999).

Наведемо перелік сучасних, найбільш часто вживаних при злоякісних захворюваннях ЛОР-органів препаратів МКА (Н.И. Переводчикова, 2005).

Мабтера (ретуксімаб) – химерне МКА до антигену CD-20, який знаходиться на поверхні В-лімфоцитів, починаючи зі стадії пре- В-клітин і до стадії диференційованих плазматичних клітин. Цей антиген виявляється на 95% пухлинних клітин В-

клітинної злоякісної лімфоми і відсутній на Т- лімфоцитах та клітинах нелімфоїдного ряду. Антитіла здатні специфічно зв'язуватись з трансмембранним антигеном CD-20 нормальних і злоякісних В-лімфоцитів, індукуючи антитілозалежну цитотоксичність та запуск механізмів апоптозу (природної смерті). Клінічні дослідження виявили ефективність ретуксімаба при комплексному лікуванні пацієнтів з рецидивуючою та резистентною до хіміотерапії злоякісною (CD20⁺) лимфоною і з фолікулярною В-клітинною лимфоною з поганим прогнозом.

На основі МКА до CD20⁺ створено ще 2 препарати, у яких антитіла зв'язані з ізо-

топами: **Зевалін (Zevalin, Ibritumomab tiuxetan)**, де МКА CD20 зв'язані з ^{90}Y . Показання до його застосування аналогічні таким для ретуксімабу, але існують дані, що зевалін ефективний у 74% хворих, резистентних до ретуксімабу.

Бекар (Bexxar, 131-I – tositumomab) – МКА, помічені ^{131}I . Препарат проходить 3-ю фазу клінічних досліджень. Попередні дані вказують на перспективність застосування бекара, особливо у осіб з рецидивуючою В-клітинною лімфомою в поєднанні з аутологічною трансплантацією кісткового мозку.

Цетуксімаб (ербітукс, C225) – МКА до HER-1 EGFR-1/.

Внутрішньовенне введення в дозах 250 нг/м^2 в комбінації з променевою терапією або препаратами платини виявилось ефективним при плоскоклітинному раку в області голови та шиї, а в поєднанні з іринотеканом та 5-фторурацилом – при колоректальному раку. Вивчення цетуксімаба продовжується.

Бевацизумаб (Авастін) – химерне людське рекомбінантне МКА до VEGF – вивчається в комбінації з хіміотерапією при раку молочної залози, легень, нирок, колоректальному раку. При метастатичному колоректальному раку бевацизумаб в поєднанні з комбінацією IFL (іринотекан+фторурацил+фолінат кальцію) сприяв кращим результатам в порівнянні з самостійною хіміотерапією в режимі IFL, у зв'язку з чим він дозволений в Україні. Бе-

вацизумаб вводиться у вигляді в/в інфузій в дозі 5 мг/кг маси тіла 1 раз на 2 тижні. Побічна дія – артеріальна гіпертензія, артеріальна тромбоемболія, нефропатія, порушення загоєння ран, геморагії, гастроінтестинальні перфорації.

Оригінальним підходом для застосування МКА є кон'югування МКА з токсинами або хіміопрепаратами. В даний час випробовуються наступні препарати.

Denileukin diftitox (Онтак) – мишачі анти-25 МКА мають в якості вектора направленої доставки до рецептора МКА до ІЛ-2 (інтерлейкіна-2), а в якості токсину – дифтерійний токсин з видаленим фрагментом зв'язування. Препарат дозволено в США для лікування пацієнтів з Т-клітинною лімфомою.

Трастузумаб (Trastuzumab, Herceptin) зв'язується с HER2 – рецептором до фактора росту епідермісу, що присутній на клітинах деяких типів рака молочної залози і лімфомах.

В лікуванні хворих із злоякісними пухлинами за допомогою МКА є ще багато невирішених питань у зв'язку з особливостями їх застосування та побічними реакціями. Проте позитивні наслідки такого лікування вже оцінені і в нашій клініці. Протоколи клінічних досліджень по використанню МКА ведуться і на теренах України. Вони дають можливість виконувати багатоцільові рандомізовані дослідження, що сприяє прогресу в лікуванні пацієнтів із злоякісними пухлинами ЛОР-локалізації.

1. Бернет Ф. Клеточная иммунология. – Москва: Мир, 1971. – 497 с.
2. Петров Р.В. Иммунология. - М.: Медицина. – 1987. - 416 с.
3. Моисеенко В.М. Применение моноклональных антител для лечения злокачественных солидных опухолей, webmaster@rosoncoweb.ru. – 1999.
4. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / Под редакцией Н.И. Переводчиковой. - М.: Практическая медицина, 2005. - С. 699.
5. Абелев Г.И. Моноклональные антитела // Соросовский образовательный журн. – 1998. - №1: stjul@stjul.msk.ru.
6. Рябцева Евгения. Интернет-журнал "Коммерческая биотехнология" <http://www.cbio.ru/> по материалам BIO.org.
7. Rosenberg S.A. Principles of cancer management : biologic therapy // Cancer: Principles & Practice of Oncology, Fifth Edition / Edited by Vincent. - Т. 7. DeVita, Jr. M.D., Samuel Hellman, M.D., Steven A. Rosenberg, M.D. Ph.D. - Chapter 1. – P. 349-373. - Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997.

8. Pressman D., Korngold L. The in vivo localization of anti-Wagner osteogenic sarcoma antibody // *Cancer*. – 1953. - 6: 619-623.
9. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *Nature*. – 1975. - 256: 495-497.
10. Nadler L., Stashenko P., Hardy R. et al. Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen // *Cancer Res* 40: 3147-3154, 1980.
11. Jungans R.P., Sgouros G., Scheinberg D. Antibody-based immunotherapies for cancer // *Cancer chemotherapy and biotherapy*, 2nd edit./ Ed. by Bruce Chabner and Dan Longo. – Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996. – P. 655-689.
12. Ruethmuller G., Schneider-Gadicke E., Schlimok G. et al. Randomized trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Duke's C colorectal carcinoma // *Lancet* 1994; 343:1177-83.
13. Ruethmuller G., Holz E., Schlimok G. et al. Monoclonal antibody therapy for resected Duke's C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial // *JCO*. - 1998. - Vol.16, 5. - P. 1788-1794.
14. Multani P., Grossbard M. Monoclonal antibody-based therapies for hematologic malignancies // *JCO*. - 1998. - Vol.16, 11. - P. 3691-3710.
15. Cobleigh M.A., Vogel C.L., Tripathy D. et al. Efficacy and safety of Herceptin (humanized anti-Her2 antibody) as a single agent in 222 women with Her2 overexpression who relapsed following chemotherapy for metastatic breast cancer // *Proc. ASCO*. - May 16-19 1998. - Vol.17. - P. 97a (abst. 376).
16. Slamon D., Leyland-Jones B., Shak S. et al. Addition of Herceptin (humanized anti-Her2 antibody) to first line chemotherapy for Her2 overexpressing metastatic breast cancer markedly increases anticancer activity: a randomized, multinational controlled phase III trial // *Proc. ASCO*. - May 16-19, 1998. - Vol.17. - P. 98a (abst. 377).

Надійшла до редакції 11.12.06.