

MARIA PAPROCKA

Instytut Immunologii i Terapii Eksperymentalnej PAN
Czerska 12, 53-114 Wrocław

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE*

W 1975 roku w angielskim czasopiśmie *Nature* ukazała się praca G. Köhlera i C. Milsteina pt. *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*, która stała się prawdziwym przełomem w immunologii i w 1984 roku przyniosła autorom Nagrodę Nobla. Naukowcy ci przedstawili metodę, dzięki której można było „unieśmiertelnić” limfocyty B, zmuszając je do nieograniczonej produkcji przeciwciał o wymaganej swoistości (KÖHLER i MILSTEIN 1975).

W tamtym czasie była znana od dawna zdolność komórek nowotworowych do nieograniczonej proliferacji w warunkach hodowli *in vitro*. Wiedzano także, że pojedynczy limfocyt B może produkować tylko jeden rodzaj przeciwciała (NOSSAL i LEDERBERG 1958). Köhler i Milstein założyli, że przez połączenie (fuzję) dwu różnych komórek o wymienionych wyżej właściwościach, będzie można otrzymać jedną komórkę hybrydową, która zachowa właściwości komórek, z których powstała.

Aby w pełni zrozumieć na czym polegała wartość opisanej metody, trzeba wyjaśnić, że otrzymanie dobrej surowicy poliklonalnej (przeciwciała poliklonalnego) było, i pozostaje nadal, jedną z bardziej żmudnych i niewdzięcznych prac laboratoryjnych. Najpierw należy przygotować — to znaczy jak najlepiej oczyścić — antygen. (Jeśli nie oczyści się dobrze antygeny, otrzymuje się surowicę o wielu swoistościach, a likwidowanie niepożądanych swoistości prowadzi zwykle do obniżenia aktywności tej surowicy). Następnie trzeba wielokrotnie immunizować małe zwierzęta laboratoryjne — myszy, szczury, króliki, lub, jeśli ma to być na przykład przeciwbakteryjna surowica odpornościowa, duże zwierzęta, takie jak kozy, owce czy konie.

W przypadku większości antygenów używanych do immunizacji otrzymuje się pozytywne rezultaty, ale częste są też sytuacje, gdy zwierzę nie odpowiada produkcją przeciwciał na immunizację, nie wiadomo z jakiego powodu lub odpowiada bardzo słabo. Dodatkowo w trakcie immunizacji zmienia się specyficzność, powinowactwo i miano przeciwciał w surowicy. Surowica konwencjonalna jest bowiem produktem poliklonalnej stymulacji limfocytów B. Otrzymana, nawet po immunizacji dobrze oczyszczonym antygenem, jest mieszaniną prze-

* Artykuł pod takim samym tytułem autorstwa HENRYKI DŁUGOŃSKIEJ i WIESŁAWY RUDNICKIEJ ukazał się w *Kosmosie* 1992, t. 41 nr 4.

ciwiał reagujących z różnymi epitopami (determinantami) jednego antygeny. Poza tym, przeciwciała występujące w surowicy konwencjonalnej różnią się klasą, powinowactwem, mianem i właściwościami efektorowymi, co powoduje, że praktycznie każda surowica od poszczególnego zwierzęcia (a nawet pobrana od jednego zwierzęcia, ale w różnym czasie) jest unikatową mieszaniną różnych przeciwciał. Stężenie żądanych przeciwciał w surowicy rzadko przekracza 10%. Dlatego często trzeba je oczyszczać z innych immunoglobulin normalnie występujących w surowicy (CAMPBELL 1984). Z powodu swojej wewnętrznej heterogenności surowice konwencjonalne często są zbyt mało specyficzne do wykrywania bardziej subtelnych różnic, na przykład do wykrywania antygenów o niskiej ekspresji, czy obecnych tylko na bardzo niewielkiej frakcji komórkowej.

Köhler i Milstein zaproponowali alternatywną metodę otrzymywania przeciwciał. Homogenne przeciwciało, reagujące tylko z jednym determinantem antygenowym, jest produkowane przez klon komórek pochodzący od jednej komórki hybrydowej (stąd nazwa — monoklonalne), która powstała przez fuzję komórki produkującej przeciwciało z nowotworową komórką plazmatyczną. W czasie przygotowywania komórek hybrydowych można prowadzić selekcję klonu komórek tak, aby uzyskać przeciwciało o oczekiwanej swoistości, wybranej klasy lub o innych, wybranych właściwościach biologicznych. Komórki hybrydowe — hybrydoma, można namnażać *in vitro* lub *in vivo*. Daje to możliwość uzyskania praktycznie nieograniczonych ilości monospecyficznego przeciwciała, które może być użyte przykładowo w diagnostyce, w terapii, w badaniach naukowych, a także w detekcji, produkcji i oczyszczaniu różnych białek. Prawie 100% białka w nadsąchu z hodowli komórek hybrydowych to interesujące nas przeciwciało, a w płynie wysiękowym, uzyskiwanym z jamy otrzewnowej zwierzęcia można otrzymać bardzo wysokie — 20 mg/ml — stężenie przeciwciała o niewielkiej zawartości zanieczyszczających immunoglobulin mysich (CAMPBELL 1984).

Nie znaczy to jednak, że przeciwciała poliklonalne są w chwili obecnej zupełnie zbędne. Tańsze przeciwciała poliklonalne są często dogodniejsze w użyciu, ponieważ w odróżnieniu od przeciwciał monoklonalnych, łatwo wywołują reakcje immunoprecypitacji i hemaglutynacji. Wyniki takich testów nadają się do odczytania gołym okiem, jako prążki w żelach lub jako zagregowane komórki.

Przeciwciała monoklonalne natomiast mogą być użyte do wykrywania śladowych ilości badanych białek (10 ng/ml), ale testy takie wymagają wysokoocyszczonych, często znakowanych radioaktywnie odczynników oraz specjalistycznego sprzętu do odczytania reakcji. Ostatnio, gdy do immunizacji są używane oczyszczone antygeny i gdy metody oczyszczania immunoglobulin zostały znacznie ulepszone, specyficzność przeciwciał konwencjonalnych została znacznie podwyższona (CATTY 1988). Tak więc w zależności od potrzeb można stosować przeciwciała monoklonalne lub konwencjonalne. Do bardzo szczególnych celów, są stosowane mieszaniny, tak zwane koktaile przeciwciał monoklonalnych, które umożliwiając panowanie nad proporcjami przeciwciał w mieszaninie, łączą zalety przeciwciał monoklonalnych i konwencjonalnych (BRUN DEL RE 1985).

Tabela 1 zawiera zestawienie i porównanie właściwości przeciwciał monoklonalnych i konwencjonalnych.

Tabela 1

Porównanie właściwości przeciwciał konwencjonalnych i monoklonalnych

Właściwości	Przeciwciała	
	konwencjonalne	monoklonalne
Swoistość	poli-, oligo- lub monoswoiste, reagujące z różnymi determinantami antygenowymi (epitopami) jednego antygeny zmienna (zwierzę, czas)	monoswoiste, reagujące z pojedynczymi determinantami antygenowymi stała, standardowa
Powinowactwo	zmiennie (zwierzę, czas)	stałe, może być wybrane w czasie selekcji
Klasa	mieszanina przeciwciał różnych klas	jedna klasa, może być wybrana w czasie selekcji
Zawartość przeciwciała	do 1 mg/ml	do 100 µg/ml w hodowli <i>in vitro</i> do 20 mg/ml w płynie wysiękowym
Zanieczyszczające immunoglobuliny	ponad 90%	0% w hodowli do 10% w płynie wysiękowym
Czystość antygeny	im bardziej oczyszczony antygen tym bardziej swoiste przeciwciała	oczyszczenie antygeny wskazane ale niekonieczne
Zdolność do precypitacji i aglutynacji	zwykle reaktywne w testach precypitacyjnych i aglutynacyjnych	zwykle nieaktywne w testach precypitacyjnych i aglutynacyjnych
Zdolność do aktywizacji komplementu	zwykle cytotoksyczne w reakcji z komplementem	często nie wywołują reakcji cytotoksycznej, zależnej od komplementu

OTRZYMYWANIE PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH

IMMUNIZACJA

Pierwszym etapem pracy prowadzącej do uzyskania przeciwciała monoklonalnego o żądanej swoistości jest immunizacja zwierzęcia, którego komórki, zwykle komórki śledziony, zostaną następnie użyte do fuzji. Etap ten jest podobny do immunizacji zwierząt przeprowadzanej w celu uzyskania surowicy odpornościowej, lecz w tym drugim przypadku uzyskanie surowicy z krwi immunizowanego zwierzęcia kończy proces. Przy produkcji przeciwciał monoklonalnych jest to dopiero początek pracy. Zwierzęta doświadczalne, które będą dawcami „uczulonych” limfocytów B, są wielokrotnie szczepione dootrzewnowo, czasem dożylnie, wybranym antygenem rozpuszczalnym lub komórkowym. W różnych laboratoriach są stosowane z powodzeniem różne schematy immunizacji. Czasem immunizacja trwa bardzo krótko, a czasem jest wydłużona nawet do jednego roku. Zwykle w przypadku immunizacji myszy, ostatnie szczepienie wybranym antygenem jest przeprowadzane 3–4 dni przed pobraniem komórek do fuzji. Przed fuzją należy sprawdzić, czy w surowicy immunizowanego zwierzęcia można wykryć interesujące nas przeciwciała poliklonalne. Wynik pozytywny potwierdza skuteczność immunizacji, ale nie przesądza o pozytywnym wyniku fuzji. Wynik negatywny kwalifikuje zwierzę do dalszej immunizacji. Test

jest przeprowadzany także w celu wypróbowania metody przesiewowej, która będzie następnie użyta do selekcji klonów komórkowych, produkujących przeciwciała o pożądanym swoistościach i innych właściwościach biologicznych.

Najczęściej są produkowane obecnie komórki hybrydoma, w których „uczulona” komórka B pochodzi od myszy lub szczura. Produkcja ludzkich komórek hybrydowych jest hamowana zarówno przez brak dobrych, ludzkich linii plazmocytozy, jak i trudności z uzyskaniem limfocytów B. Limfocyty B pochodzą zwykle z limfocytów krwi obwodowej albo z węzłów lub śledzion pobranych w czasie operacji. Liczba limfocytów B jest jednak stosunkowo niska, ponieważ ze względów etycznych, nie przeprowadza się specjalnej immunizacji dawców komórek B, toteż wydajność fuzji jest bardzo niska. Czasami próbuje się też uczulać *in vitro* ludzkie limfocyty B na różne antygeny. Immunizacja taka trwa 3–5 dni. Wymagane jest do niej bardzo złożone medium, w którego skład wchodzi przynajmniej trzy interleukiny: IL-2, IL-4, IL-6 oraz różne niespecyficzne immunostymulatory, jak na przykład dipeptyd muramylowy. Immunizację taką przeprowadza się używając bardzo niskich stężeń antygeny. Wyniki immunizacji *in vitro* są jednak niepowtarzalne i nieprzewidywalne. Jeśli udaje się „immunizować” komórki B *in vitro* i przeprowadzić fuzję, to znakomita część przeciwciał produkowanych przez komórki hybrydoma jest klasy IgM. Przeciwciała tej klasy sprawiają znaczne kłopoty przy oczyszczaniu i są niedogodne do stosowania w wielu testach immunologicznych (BORREBAECK 1988).

FUZJA

Po uzyskaniu limfocytów B, zdolnych do produkcji przeciwciał reagujących z antygenem użytym do immunizacji, przystępuje się do zasadniczego etapu produkcji przeciwciał monoklonalnych, to jest do połączenia (fuzji) uczulonych limfocytów z komórkami plazmocytozy. W chwili obecnej istnieje wiele mysich i szczurzych linii plazmocytozy, które mogą być używane jako partnerzy do fuzji. Są to linie z defektem genetycznym, zwykle dotyczącym enzymu HGPRT (fosforybozyl transferaza hypoksantynowo-guaninowa). Dodatkową cechą wielu linii plazmocytozy, która kwalifikuje linię jako dobrego partnera do fuzji, jest utrata zdolności produkcji własnych immunoglobulin. (Komórki produkujące własne immunoglobuliny po hybrydyzacji produkują mieszaniny przeciwciał, co wymaga dodatkowego oczyszczenia interesującego nas przeciwciała).

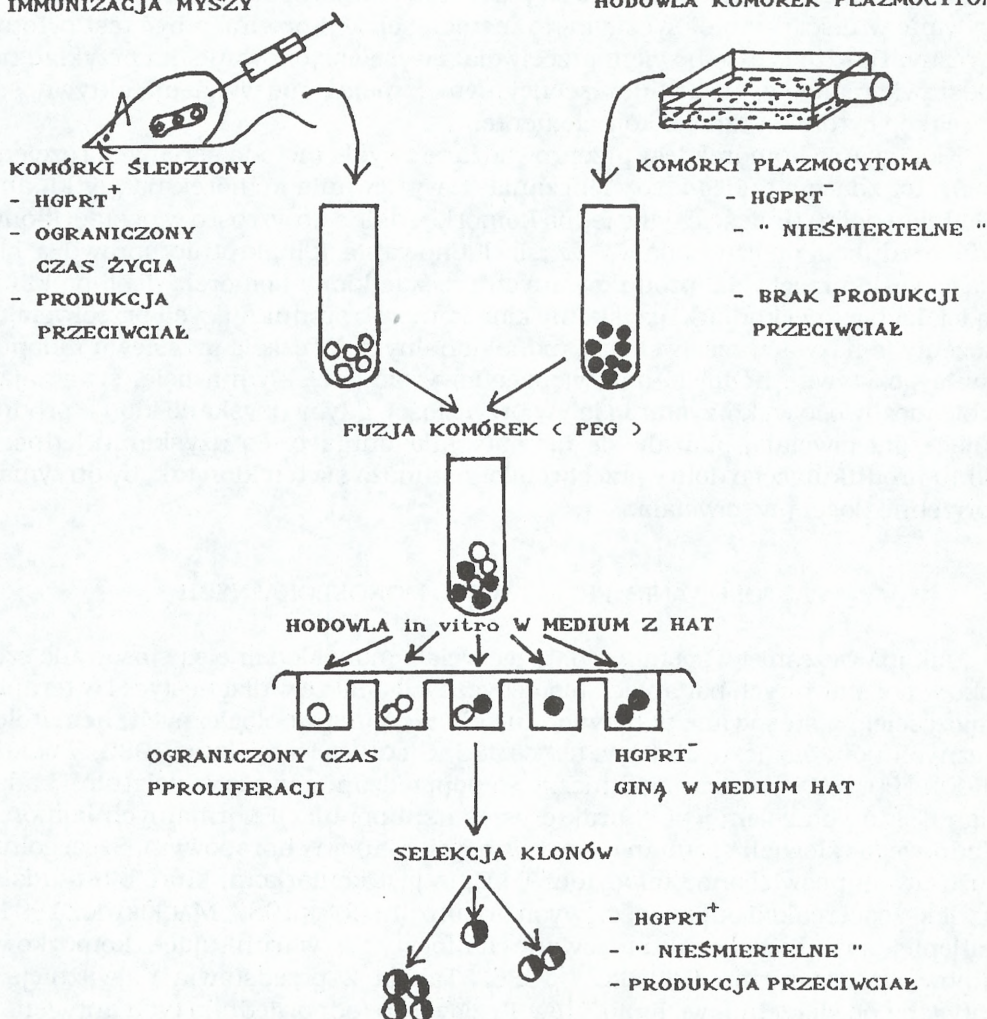
Najczęściej stosowanym czynnikiem wywołującym łączenie się błon komórkowych jest glikol polietylenowy (PEG). Powoduje on sklejanie się błon komórkowych, ale mechanizm jego działania nie jest w pełni poznany. Glikol polietylenowy jest polimerem o masie cząsteczkowej od 200 do 20 000. Do fuzji używa się PEG 600–6000, ale zwykle, także w naszym laboratorium, używany jest PEG 1500. Zwykle reakcję łączenia komórek przeprowadza się używając 50% roztworu PEG w temperaturze 37°C w czasie 1–3 minut. Czasem obniża się stężenie PEG, a wydłuża czas fuzji. Po dokładnym odplukaniu PEG, który jest toksyczny dla komórek przy dłuższym kontakcie, komórki są wysiewane do odpowiednio przygotowanych, plastikowych płytek hodowlanych 24- lub 96-dółkowych. Komórki są hodowane po fuzji w medium hodowlanym wzbogaconym o HAT. Medium HAT (skrót od hypoksantyna, aminopteryna, tymidyna) to medium

selekcjonujące, nie pozwalające na wzrost komórek mających defekt dotyczący enzymu HGPRT. Aminopteryna zawarta w medium HAT jest silnym inhibitorem reduktazy dihydrofoliowej — enzymu używanego przez komórki do produkcji puryn i pirymidyn *de novo*. Normalne komórki wystawione na działanie aminopteryny uruchamiają zastępcze szlaki metaboliczne produkcji pirymidyn, z udziałem kinazy tymidynowej (która używa zawartą w medium HAT tymidynę). Puryny natomiast mogą być produkowane z egzogennej hypoksantyny przy udziale enzymu HGPRT.

Na rysunku 1 zaznaczono, że do fuzji są używane zwykle komórki plazmocytoma HGPRT⁻. Komórki te w medium HAT nie mają szansy podjąć proliferacji, jeśli nie ulegną fuzji z HGPRT⁺ limfocytami B. Z kolei czas życia limfocytów B *in*

IMMUNIZACJA MYSZY

HODOWLA KOMÓREK PLAZMOCYTOMA



Rys. 1. Schemat otrzymywania przeciwciał monoklonalnych.

vitro jest ograniczony, tak więc w hodowli z medium HAT mają szansę przeżyć tylko komórki będące hybrydami — limfocyty B i komórki plazmatycznej.

PRZESIEW I KLONOWANIE KOMÓREK HYBRYDOWYCH

Jest wiele metod immunologicznych, które mogą być zastosowane do wykrywania komórek produkujących przeciwciała o wymaganych swoistościach i właściwościach. Metody przesiewowe, używane do wyboru klonów pozytywnych, muszą być proste i szybkie (CATTY 1988, LANGONE i VANAHIS 1986, GODING 1983). Z drugiej jednak strony muszą dawać odpowiedź jednoznaczną, gdyż w ciągu kilku godzin trzeba zdecydować, które klony produkujące przeciwciała należy poddać dalszemu subklonowaniu. Z dużej liczby klonów pozytywnie reagujących z antygenem należy wybrać takie, które przynajmniej potencjalnie, będą najlepsze do celu, do którego są przygotowywane. Jeśli przeciwciała ma być używane w teście cytotoksycznym, to metodą selekcji powinien być test cytotoksyczny. Bardzo często bowiem przeciwciała wyselekcjonowane, na przykład na podstawie reakcji w teście fluorescencyjnym, zupełnie nie wykazują aktywności w reakcji cytotoksycznej z komplementem.

Klonowanie komórek jest przeprowadzane zwykle metodą seryjnych rozcieńczeń, to znaczy takiego rozcieńczania i wysiewania komórek na płytki, aby w jednym dołku umieścić tylko jedną komórkę zdolną do wzrostu w postaci klonu i do produkcji przeciwciała. W czasie klonowania kilkakrotnie sprawdza się właściwości przeciwciał produkowanych przez te klony komórek. Jeśli po kilku podziałach jednej komórki uzyskamy klon komórek produkujących przeciwciała, możemy je nazwać przeciwciałem monoklonalnym. W czasie przesiewu i klonowania pozytywne hodowle należy przechowywać w ciekłym azocie, stwarzając sobie możliwość wykorzystania ich w przyszłości, gdyby uzyskane klony, produkujące przeciwciała, okazały się nie satysfakcjonujące. Po uzyskaniu jednego klonu produkującego dobre przeciwciała, namnaża się ten klon tak, by otrzymać potrzebne ilości przeciwciała.

ZASTOSOWANIE PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH

Jak już wcześniej wspomniano, przeciwciała monoklonalne są stosowane szeroko w podstawowych badaniach biomedycznych a także w diagnostyce i w terapii. Najczęściej są stosowane w przypadku schorzeń immunologicznych, hematologicznych i onkologicznych (BEVERLEY 1986, GRIGNANI i współaut. 1985, VAICKUS i FOON 1991). Zastosowania kliniczne są poprzedzone zawsze wieloletnimi badaniami, których celem jest charakterystyka subpopulacji normalnych komórek u zdrowego człowieka i zmian towarzyszących stanom chorobowym. Szczególnie dużo uwagi poświęcono limfocytom T i B, to jest komórkom, które biorą udział w większości reakcji odpornościowych organizmu (PTAK 1987, MACKIEWICZ 1991). Najlepiej zostały scharakteryzowane limfocyty T, warunkujące komórkową odpowiedź organizmu (BEVERLEY 1986). Tabela 2 przedstawia najważniejsze antygeny powierzchniowe limfocytów T człowieka (odpowiedniki tych antygenów znajdują się na komórkach T wszystkich ssaków).

Tabela 2

Markery powierzchniowe limfocytów T

Antygen	Reaktywność
CD ¹ 1	tymocyty, niedojrzałe limfocyty
CD 2	receptor dla SRBC ² , pan T
CD 3	komponenta receptora dla antygenu pan T
CD 4	komórka helperowa/induktorowa
CD 5	pan T + B CLL ³
CD 6	pan T + B CLL
CD 7	pan T
CD 8	komórka supresorowa/cytotoksyczna
CD 25	receptor dla IL-2 ⁴ , aktywowane limfocyty T

¹ CD — cluster of differentiation — antygen różnicowania

² SRBC — sheep red blood cells — krwinki czerwone owcy

³ BCLL — B chronic lymphocytic leukemia — chroniczna białaczka limfocytarna wywodząca się z limfocytów B

⁴ IL-2 — interleukina 2

Antygeny CD2, CD3 i inne antygeny typu pan T są używane do oznaczenia całkowitej liczby limfocytów T u pacjentów. Wzajemnie wykluczające się, na limfocytach obwodowych, antygeny CD4 i CD8 dzielą te limfocyty na dwie główne subpopulacje, to znaczy CD4⁺ — helperowe (pomocnicze) i CD8⁺ — cytotoksyczne (supresorowe). U zdrowych osobników proporcja limfocytów CD4 do CD8 wynosi około 2. W niektórych stanach patologicznych ogólna liczba limfocytów ulega zmianie (zwiększeniu lub zmniejszeniu) a proporcja limfocytów CD4⁺ do CD8⁺ ulega odwróceniu. Liczbę i proporcje limfocytów T określa się często w zaburzeniach immunologicznych, w chorobach autoimmunologicznych, po przeszczepach szpiku lub narządów wewnętrznych. Ostatnio stwierdzono bardzo interesującą korelację między liczbą limfocytów CD4⁺ a konwersją pacjentów seropozytywnych w pełnoobjawową postać AIDS. W dużej grupie osób badanych (ponad 600 osób, z czego 300 osób z grupy wysokiego ryzyka) stwierdzono w tym okresie gwałtowny spadek liczby limfocytów CD4⁺. Spadek ten następował po charakterystycznym dla wielu chorób wirusowych podwyższeniu liczby limfocytów CD8⁺ zaraz po zakażeniu (SCOTT i KAUFMAN 1991). W pewnych stanach chorobowych ma miejsce proliferacja limfocytów T, które rozpoznają i niszczą własne komórki lub komórki przeszczepianych narządów, na przykład serca czy nerki (tzw. reakcja GvH — graft versus host — reakcja przeszczep przeciwko gospodarzowi). Dotychczas pacjentom takim podawano cytotoksyczne preparaty powodujące ogólną immunosupresję. Po poznaniu różnych subpopulacji limfocytów T, biorących udział w tych reakcjach i po określeniu ich markerów powierzchniowych, są podejmowane, z coraz większym powodzeniem, próby obniżenia liczby i funkcji tych komórek. Zastosowanie kliniczne znalazło już przeciwciała anty CD3, które jest szczególnie skuteczne w stanach ostrego odrzucania przeszczepionej nerki (Ortho Multicenter Transplant Study Groups. 1985). Stwierdzono, że bardzo korzystne efekty powoduje stosowanie jednocześnie kilku przeciwciał monoklonalnych (QIN i współaut. 1989). Podjęto także próby stosowania przeciwciała anty CD25, które powinno eliminować komórki akty-

wowane czyli te, które w danym momencie biorą udział w reakcji immunologicznej, oszczędzając jednocześnie inne komórki immunologicznie kompetentne.

Określono także całą grupę antygenów charakterystycznych dla limfocytów B, których aktywność stanowi o sprawności odpowiedzi humoralnej organizmu (ZOLA 1987). Najważniejsze z nich są przedstawione w tabeli 3.

Tabela 3

Markery powierzchniowe limfocytów B

Antygen	Reaktywność
CD ¹ 9	komórki pre B
CD 10	komórki pre B, CALLA ²
CD 19	pan B
CD 20	pan B
CD 21	dojrzałe limfocyty B
CD 22	subpopulacja limfocytów B
CD 23	aktywowane limfocyty B
CD 24	pan B
CD 72	pan B
CD 75	dojrzałe limfocyty B
CD 78	pan B

¹CD — cluster of differentiation — antygen różnicowania

²CALLA — common acute lymphoblastic leukemia antigen

Precyzyjne określenie markerów fenotypowych normalnych limfocytów T i B doprowadziło do stwierdzenia, że niektóre z nich mogą być markerami nowotworowymi, na przykład antygen CD10, charakterystyczny dla wczesnych stadiów rozwojowych normalnych limfocytów B ma wysoką ekspresję na komórkach CALLA⁺ ostrej białaczki limfatycznej (BEVERLEY 1986). Antygeny CD5 i CD6, występujące normalnie na limfocytach T, występują także na limfocytach B w przewlekłej białaczce limfatycznej.

Najszerze zastosowanie znalazły przeciwciała monoklonalne w diagnostyce chorób układu krwiotwórczego. W wielu nowotworach hematologicznych, komórki zmieniają swoją morfologię i właściwości tak, że prawidłowe określenie komórki, której ta zmiana dotyczy, jest trudne lub niemożliwe. Typowanie rodzaju komórek, które uległy procesowi nowotworzenia, na przykład w białaczkach u dzieci, jest szczególnie ważne, ponieważ w zależności od rodzaju białaczki są stosowane różne rodzaje leków i schematy leczenia. Przy dobrze zdiagnozowanej białaczce i odpowiednio dobranej chemioterapii całkowite wyleczenia można uzyskać nawet u 90% pacjentów.

Największe nadzieje wiązano z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych w diagnostyce i terapii nowotworów. Oczekiwano przede wszystkim wykazania istnienia specyficznych antygenów nowotworowych TSA (tumor specific antigens). Zastosowanie bardzo czułych odczynników, jakimi są przeciwciała monoklonalne, pozwoliło na stwierdzenie, że tylko w bardzo nielicznych przypadkach istnieją antygeny swoiste dla nowotworu. Do takich antygenów zaliczyć można immunoglobuliny produkowane przez nowotworowe limfocyty B, czy białka

będące produktem zmutowanych onkogenów komórkowych. Inne wykrywane antygeny, to raczej antygeny towarzyszące nowotworom — TAA (tumor associated antigens). Antygeny te mają wysoką ekspresję na komórkach nowotworowych, ale wykryć je można także na komórkach prawidłowych, na przykład pochodzących z tego samego listka zarodkowego, lub na komórkach tej samej tkanki w różnych okresach rozwoju osobniczego (np. w okresie płodowym; RADZIKOWSKI i WIĘDŁOCHA 1988). Antygenami najlepiej poznanymi, które znalazły zastosowanie w diagnostyce oraz monitorowaniu postępów leczenia (KAWIAK 1991) przykładowo są:

AFP — alfa fetoproteina, występująca w rakach wątroby, jąder, jajnika,

CEA — antygen karcinoembrionalny (carcinoembrional antigen) występujący w rakach przewodu pokarmowego,

β -HCG — beta gonadotropina kosmówkowa występująca w rakach jąder, macicy i jajnika.

Trwają także próby znalezienia markerów dla innych typów nowotworów, na przykład dla niewrażliwych na chemioterapię czerniaków czy raków trzustki. Z ostatnich lat pochodzą próby praktycznego wykorzystania receptora dla epitelialnego czynnika wzrostowego (EGFR) jako markera nowotworów wywodzących się z komórek nabłonkowych. EGFR występuje na komórkach normalnych tkanek z bardzo niską ekspresją. Znacznie podwyższoną ekspresję EGFR stwierdzono w wielu typach nowotworów człowieka, takich jak przykładowo nowotwory mózgu, płuc, nerek czy pęcherza. Komórki niektórych nowotworów mają ekspresję EGFR podwyższoną nawet 1000 razy, co umożliwiło radioimmunolokalizację tych nowotworów przy zastosowaniu przeciwciała anty — EGFR wyznakowanego promieniotwórczym izotopem indu (In^{111}) (GOLDENBERG i współaut. 1989).

Przeciwciała, które wykazują wybiórczą reaktywność z antygenem swoistym lub towarzyszącym nowotworom, mogą być używane do diagnostyki i terapii w postaci natywnej lub po zmodyfikowaniu. Podawanie przeciwciał w formie natywnej ma zwykle na celu wywołanie reakcji cytotoksycznej, zależnej od komplementu CDC (complement dependent cytotoxicity) lub reakcji typu ADCC (antibody dependent cell cytotoxicity), w której komórki gospodarza, głównie monocyty i makrofagi, mogą niszczyć opłaszczoną przeciwciałem komórkę nowotworu. Często jednak stosuje się myślenie przeciwciała w formie zmodyfikowanej, na przykład przez usunięcie z przeciwciała fragmentu, który nie jest konieczny do związania się przeciwciała z antygenem, a na który powstaje najsilniejsza odpowiedź immunologiczna (HALE i współaut. 1988). Inny często stosowany sposób modyfikacji przeciwciał to wspomniane już wcześniej przyłączanie do przeciwciała izotopów promieniotwórczych, pozwalające na lokalizację guza nowotworowego i przerzutów (GOLDENBERG i współaut. 1989, DIVCI i współaut. 1991), a czasem także na lokalne napromieniowanie tkanki nowotworowej, co może dać widoczny efekt leczniczy. Do przeciwciał przyłączano także leki przeciwnowotworowe lub inne wysoko toksyczne preparaty. Pozwala to znacznie ograniczyć uboczne działanie toksyczne tych leków na komórki normalne. Lekami, które były z powodzeniem zastosowane po skoniugowaniu z przeciwciałami monoklonalnymi, są między innymi daunorubicyna, chlorambucil czy metotreksat (SEDLACEK 1988). Poza lekami przeciwnowotworowymi do łączenia

z przeciwciałami wybrano także toksyny roślinne i bakteryjne, które są najsilniejszymi ze znanych trucizn komórkowych. Do zabicia jednej komórki jest potrzebna teoretycznie jedna cząsteczka (praktycznie mniej niż 10 cząsteczek) rycyny — toksyny uzyskiwanej z nasion rącznika (*Ricinus communis*). Preparaty uzyskane przez połączenie przeciwciała z toksyną są nazywane immunotoksynami. Mają one bardzo wysoką aktywność cytotoksyczną *in vitro* ograniczoną tylko do tych komórek, które na powierzchni mają antygen, z którym reaguje przeciwciało użyte do wytworzenia immunotoksyny (WIEDŁOCHA i współaut. 1989, PAPROCKA i współaut. 1990). Immunotoksyny są obecnie stosowane, z dużym powodzeniem, do eliminacji *in vitro* różnych typów komórek (białaczkowych, nowotworowych i limfocytów T) przed transplantacjami szpiku. Do zastosowania w terapii są przygotowywane, między innymi, dwie immunotoksyny — Xoma Zyme 791 i Xoma Zyme H-65. (BYERS i współaut. 1989, BYERS i współaut. 1990). Pierwsza z nich rozpoznaje antygen obecny na komórkach nowotworów pochodzących z jajnika i okrężnicy, a druga reaguje z limfocytami CD5⁺ chronicznej białaczki szpikowej typu B oraz chłoniaka typu T. Jako czynnik toksyczny w obydwu immunotoksynach został zastosowany łańcuch A rycyny. Efektywność działania immunotoksyn u pacjentów jest, niestety, znacznie niższa niż w systemach eksperymentalnych *in vitro*, ale zachowują one swoistość działania.

Ocena rzeczywistej przydatności terapeutycznej immunotoksyn wymaga jednak czasu. Przedkliniczne i kliniczne przetestowanie jednego preparatu trwa bowiem od jednego do trzech lat. Następnie aktywność preparatu jest oceniana i są podejmowane próby tworzenia następnej generacji leku o poprawionych właściwościach farmakologicznych o zmienionej toksyczności, lub immunogenności (VITETTA i współaut. 1993).

Tak jak w przypadku natywnych przeciwciał, istnieje wiele problemów związanych z terapeutycznym zastosowaniem immunotoksyn. Najważniejsze wynikają z braku dostępności do całego guza nowotworowego, co jest spowodowane jego masą i słabym unaczynieniem. Znaczną przeszkodę stanowi też wolny antygen, złuszczone z komórek nowotworowych, krążący w surowicy pacjenta, który, jako łatwiej dostępny, w pierwszej kolejności reaguje z przeciwciałem lub immunotoksyną, neutralizując je. Komórki nowotworowe są zwykle zróżnicowane pod względem ekspresji antygeny. Komórki o niskiej ekspresji lub negatywne nie są zabijane. Dużym problemem terapeutycznym jest także, powstająca w trakcie stosowania przeciwciał i immunotoksyn, odpowiedź immunologiczna pacjenta na podawane, głównie mysie, przeciwciała. Odpowiedź tego typu (HAMA — human anti mouse) może całkowicie zniwelować terapeutyczną efektywność preparatu (SEDLACEK 1988). Podjęto więc próby, by na drodze manipulacji genetycznych, z mysich przeciwciał zachować jedynie rejony V — odpowiedzialne za swoistość przeciwciała, natomiast rejony stałe C zastąpić fragmentami przeciwciał ludzkich. Uzyskane w ten sposób przeciwciała, (nazywane często humanized, chimeric lub CDR grafted antibodies) mają rzeczywiście znacznie lub nawet całkowicie zmniejszoną immunogenność (WINTER i HARRIS 1993).

Z wieloma problemami, wynikłymi przy stosowaniu przeciwciał w klinice, badacze już się uporali, co pozwala mieć nadzieję na postęp w stosowaniu przeciwciał monoklonalnych w klinice w najbliższym czasie. Wydaje się, że przynajmniej niektóre nowotwory człowieka będą mogły być leczone bardziej

efektywnie niż obecnie, przy stosunkowo ograniczonej toksyczności ogólnej postępowania leczniczego (HALE i współaut. 1988, BYERS i współaut. 1989)

MONOCLONAL ANTIBODIES

S u m m a r y

The technique of cell fusion has been applied to solve different problems in biomedical sciences, like, e.g., that of recessive or dominant nature of malignancy, but the most frequently it is applied for production of monoclonal antibodies.

In the paper, general properties and applications of monoclonal antibodies are presented. The results of therapeutic attempts at using monoclonal antibodies are still less impressive than expected. It seems however possible that understanding of the fate of an antibody injected into the patient's organism will lead to considerably improved therapeutic result.

LITERATURA

- BEVERLEY P. C., 1986. *Monoclonal Antibodies. Methods in Hematology*. t. 3, Churchill Livingstone, Oxford.
- BORREBAECK C. A. K., 1988. *In Vitro Immunization in Hybridoma Technology Progress in Biotechnology*. t. 5, Elsevier, The Netherlands, Amsterdam.
- BRUN DEL RE G. Ü., STERN A., C., BAUMGARTNER C., KNAPP W., HIIRT A., MORELL A., BUCHER U., WAGNER H. P., 1985. *Purging of bone marrow with the anti Calla antibodies VIL-AL, VIB-E3 and VIB-C5 as a prerequisite for autologous bone marrow transplantation*. Exp. Hematol. 13, Suppl. 17, 54-62.
- BYERS V. S., HENSLEE P. J., KERNAN N. A., 1990. *Use of an anti-pan T-lymphocyte ricin A chain immunotoxin in steroid resistant acute Graft versus Host Disease*. Blood. t. 75, 7, 1426-1432.
- BYERS V. S., RODVIEN R., GRANT K., DURRANT L., G., HUDSON H. K., BALDWIN R. W., SCANNON P. J., 1989. *Phase I study of monoclonal antibody ricin A chain immunotoxin, Xoma Zyme 791 in patients with metastatic colon cancer*. Cancer Res. 49, 6153-6160.
- CAMPBELL A., 1984. *Monoclonal antibody technology. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. t. 13, Elsevier, Amsterdam.
- CATTY D., 1988. *Antibodies*. t. 1. A practical approach. IRL Press, Oxford.
- DIVIGI C. R., WELT S., KRIS M., REAL F. X., YEH S., GRALLA R., 1991. *Phase I and imaging trial of indium 111-labeled Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma*. J. Natl. Cancer Inst. t. 83, 2, 97-105.
- GODING J. W., 1983. *Monoclonal Antibodies: Principles and practice*. Academic Press, Orlando.
- GOLDENBERG A., MASUI H., DIVIGI C., KAMRATH H., PENTLOW K., MENDELSON J., 1989. *Imaging of human tumor xenograft with Indium-111-labeled Anti Epidermal Growth Factor Receptor monoclonal antibody*. J. Natl. Canc. Inst. t. 81, 21, 1616-1625.
- GRIGNANI F., MARTELLI M. F., MASON C. Y., 1985. *Monoclonal Antibodies in Haematology*. Raven Press, New York.
- HALE G., CLARK M. R., MARCUS R., WINTER G., DYER M. J. S., PHILLIPS J. M., WALDMAN H., 1988. *Remission Induction in non Hodgkin Lymphoma with Reshaped Human Monoclonal Antibody Campath 1H*. Lancet. 2, 1394-1395.
- KAWIAK J., 1991. *Ultrastruktura i funkcja komórki*. t. 5, PWN, Warszawa.
- KÖHLER G., MILSTEIN, 1975. *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature. 365, 495-497.
- LANGONE J. J., VAN VUNAKIS H., 1986. *Immunochemical Techniques, Methods in Enzymology*. t. 121. Academic Press, Orlando, USA.
- MACKIEWICZ S., 1991. *Immunologia*. PZWL, Warszawa.
- NOSSAL G. J. V., LEDERBERG J., 1958. *Antibody production by single cells*. Nature. 188, 1419-1420.
- Ortho Multicenter Transplant Study Groups, 1985. *A randomized clinical trial of OKT 4 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplantants*. New England J. Med. 313, 337-3425.

- PAPROCKA M., WIEDŁOCHA A., RADZIKOWSKI C., 1990. Mouse L1210V leukemia as a model to analyse efficiency of leukemic cell elimination by immunotoxin, antibody and complement and cytostatic agents. *In Vivo*. 4, 209-214.
- PTAK W., 1987. *Podstawy immunologii. Podręcznik dla studentów medycyny*. PZWL, Warszawa.
- QIN S., COBBOLD S., BENJAMIN R., WALDMAN M., 1989. Induction of classical transplantation tolerance in the adult. *J. Exp. Med.* t. 169, 779-794.
- RADZIKOWSKI C., WIEDŁOCHA A., 1988. *Przeciwciała monoklonalne i ich zastosowanie w onkologii*. Problemy Biotechnologii. Wszechnica PAN, Ossolineum.
- SCOTT P., KAUFMAN S., 1991. The role of T subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunology Today*. t. 12, 10, 346-348.
- SEDLACEK H. H., 1988. *Monoclonal Antibodies in Tumor Therapy*. Karger, München.
- SZKUDLAREK J., STEUDEN J., SALWA J., RADZIKOWSKI C., 1984. Cell surface antigens of L1210 leukemia recognized by monoclonal antibodies. *Arch. Immunol. Ther. Exper.* 32, 671-675.
- VAICKUS L., FOON K. A., 1991. Overview of monoclonal antibodies in the diagnosis and therapy of cancer. *Cancer Invest.* 2, 195-209.
- VITETTA E.S., THORPE P.E., UHR J., 1993. Immunotoxins: magic bullets or misguided missiles? *Immunology Today*. t. 14, 6, 252-259.
- WIEDŁOCHA A., SALWA J., PAPROCKA M., STEUDEN J., RADZIKOWSKI C., 1989. Specific killing of mouse leukemic cells with α -chain immunotoxin. *Arch. Immunol. Ther. Exper.* 37, 101-113.
- WINTER G., HARRIS W. J., 1993. Humanized antibodies. *Immunology Today*. t. 14, 6, 243-246.
- ZOLA H., 1987. The surface antigens of human B lymphocytes. *Immunology Today*. t. 8, 10, 308-315.