



Renesans przeciwciał

Elżbieta Wałajtyś-Rode

Instytut Biologii i Ochrony Środowiska
Wyższa Szkoła Pedagogiczna, Rzeszów

The renaissance of antibodies

Summary

The ability of human and animal immunological system to generate many hundreds of millions of antibodies with different variable-region domains allows to bind other proteins, peptides and low molecular weight haptens despite the enormous variety of chemical and physical structures that these entities can represent. The prediction of Paul Ehrlich in 1900 an age of „magic bullet applications in human therapeutics is now being realized.

Hybrydoma technology introduced in 1975 was crucial event for immunology and biotechnology, providing large amounts of specific monoclonal antibodies (Mab) for basic research, immunodiagnosis, serotherapy and industrial processes. During last 20 years significant progress has been made in production of Mab or Mab fragments by DNA recombination techniques and expression in bacteria, yeast, mammalian cells and transgenic animals and plants. The rapid isolation of high affinity human Mab from phage display libraries and by immunization of transgenic mice will facilitate the development of therapeutic antibodies. It become also clear that antibodies and antibody fragments are playing increasing contribution not only to pharmaceutical but also to food, cosmetic and chemical industries, as well as to environmental protection.

Key words:

antibody, hybrydoma, monoclonal, DNA recombination, display libraries.

1. Wstęp

Organizm ludzi i wyższych zwierząt posiada zdolność generowania wielu setek milionów przeciwciał z odmiennymi regionami zmiennymi, to znaczy powierzchniami zbudowanymi z części białka w taki sposób, że pozwala to na specyficzne wiązanie innych białek, peptydów i haptenu o małej masie cząstecz-

Adres do korespondencji

Elżbieta Wałajtyś-Rode,
Instytut Biologii i Ochrony
Środowiska,
Wyższa Szkoła
Pedagogiczna,
ul. Cegielniana 12,
35-310 Rzeszów;
e-mail:
ewalajty@univ.rzeszow.pl

kowej. Dzięki temu większość obcych antygenów może ulegać rozpoznaniu i związaniu, pomimo niezwykle zróżnicowanej fizycznej i chemicznej budowy małych cząsteczek organicznych, toksyn, wirusów, bakterii i pasożytów z którymi te organizmy się kontaktują.

Interakcja antygen-przeciwciała ma dwie szczególne właściwości. Pierwsza to ogromna specyficzność polegająca na utworzeniu wielu niekowalencyjnych wiązań pomiędzy cząsteczką antygeny i przeciwciała na zasadzie komplementarności kształtu i ładunku. Druga to duża siła tych wiązań powodująca wysokie powinowactwo zaangażowanych cząsteczek (10^{-8} - 10^{-11} M). Ogromne znaczenie możliwości kopiowania tych interakcji i zastosowania ich w pracy laboratoryjnej przewidział już Paul Ehrlich w swoim wykładzie wygłoszonym w 1900 r. w Royal Society w Londynie (1), nazywając przeciwciała magicznym pociskiem *magic bullet*, który w przyszłości będzie miał wiele zastosowań w dziedzinie terapii. Czas pokazał, że oczekiwania Ehrlicha zostały w pełni spełnione, a nawet o wiele przewyższone. W obecnym świecie nauk podstawowych, medycynie, farmakologii i różnych gałęziach przemysłu, a nawet ochronie środowiska, nie można przecenić roli przeciwciał jako narzędzia badań, metod analitycznych i środków terapeutycznych.

Postęp ten związany jest niewątpliwie z rozwojem badań nad wytwarzaniem i właściwościami immunoglobulin oraz na wprowadzeniu metod rekombinacji DNA i inżynierii genetycznej do szybkiego i taniego uzyskiwania zróżnicowanych form przeciwciał odpowiadających ściśle zapotrzebowaniu rynkowemu.

2. Produkcja przeciwciał monoklonalnych

Wprowadzenie przez Kohlera i Milsteina w 1975 r. (2) technologii uzyskiwania hybrydom było niewątpliwie przełomowym momentem dla immunologii i biotechnologii, ponieważ pozwoliło na uzyskiwanie znaczących ilości przeciwciał monoklonalnych wykorzystywanych do badań podstawowych, immunodiagnostyki, seroterapii i procesów przemysłowych (3). Od tego czasu datuje się wzmożony rozwój technik immunologicznych, do których należą oznaczenia immunologiczno-izotopowe (RIA, *radioimmunoassay*), oznaczenia immunologiczno-enzymatyczne (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*), metody immunofluorescencyjne, metody immunoprecypitacji, metody immunoblotingu, czy chromatografii powinowactwa z zastosowaniem przeciwciał lub antygenów. Wynikiem tego był wzrost zapotrzebowania na szybką, wydajną i taną produkcję przeciwciał zwłaszcza monoklonalnych.

Jednocześnie próby stosowania przeciwciał monoklonalnych uzyskiwanych w myszach do terapii chorób u ludzi doprowadzały do szybkiego rozwoju reakcji przeciwko tym przeciwciałom i tworzenia ludzkich przeciwciał przeciwko mysim przeciwciałom (HAMA, *human anti mouse antibody*) powodującym zasadnicze ograniczenia w stosowaniu takiego leczenia. Spowodowało to ogromny rozwój badań nad wytwarzaniem i produkcją przeciwciał monoklonalnych ludzkich lub o zmniejszonej

immunogenności dla ludzi, oraz opartych na tych przeciwciałach technologii, metod diagnostycznych i terapii w ciągu ostatnich 20 lat.

Produkcja przeciwciał monoklonalnych metodą klasyczną (immunizacja *in vivo*) pozwalała na uzyskanie do 30 µg immunoglobulin/ml hodowli hybrydom. Alternatywą było wszczepienie hybrydomy myszom i uzyskiwanie przeciwciał w płynie wydajnościowym w stężeniu ok. 50 mg/ml. Metoda ta jednak jest obecnie zabroniona w wielu państwach zachodnich jako okrutna dla zwierzęcia. W celu zwiększenia wydajności stosowano hodowle na filtrach i w fermentatorach, ale dopiero wprowadzenie metod rekombinacji DNA pozwoliło uzyskać produkcję przeciwciał monoklonalnych na większą skalę przez nadekspresję w różnych systemach (4). Nadekspresję przeciwciał lub ich fragmentów uzyskuje się obecnie w bakteriach, grzybach, komórkach ssaczych, roślinach transgenicznych i zwierzętach transgenicznych (gruczoły mleczne).

Wydajność i przybliżony koszt produkcji przeciwciał monoklonalnych w różnych systemach przedstawiono w tabeli 1 (5). O ile największą wydajność osiąga się przy produkcji przeciwciał w gruczołach mlecznych transgenicznych zwierząt, to niewątpliwie najtańsza jest produkcja przeciwciał w transgenicznych roślinach. Ma ona jeszcze inne dodatkowe zalety (6). Większość technik transformacji roślinnych komórek prowadzi do uzyskania stabilnej integracji wprowadzonego DNA do genomu rośliny, tak, że rekombinacje uzyskanych transgenicznych roślin przez ich krzyżowanie pozwalają na wprowadzenie wielu genów do rośliny. Uzyskane linie mogą być przechowywane łatwo jako nasiona. Istotną cechą roślin jako systemu ekspresji jest ich zdolność do nadekspresji kompletnych immunoglobulin z zachowaniem miejsc glikozylacji w stabilnym regionie łańcuchów oraz miejsca asocjacji łańcuchów i komponenty sekrecyjnej, czego nie posiadają przeciwciała uzyskiwane w bakteriach. Stosując głównie tytoń (*Nicotiana*) otrzymano wiele fragmentów i całych cząsteczek przeciwciał, włącznie z uzyskiwaną wyłącznie w roślinach sekrecyjną formą IgA występującą na powierzchni błony śluzowej układu pokarmowego człowieka (6).

Tabela 1

Przybliżony koszt produkcji fragmentów przeciwciał

Źródło	Wydajność	Koszt (funty ang)
komórki ssacze	0,5-1,0 g/l	300,00
mleko transgeniczne	10,0 g/l	60,00
bakterie	3,0 g/l	1,00
rośliny transgeniczne	2,0 g/kg	0,30
wektory wirusowe (roślinne)	10,0 g/kg	0,06

3. Fragmenty przeciwciał i najmniejsza rozpoznająca jednostka (MRU)

Miejsca wiążące przeciwciała i antygen wiążą się w stosunku molarnym 1:1, a zatem, jak się wydaje, nie jest ekonomiczne użycie przeciwciała o masie cząsteczkowej 150 kDa do związania antygeny o masie cząsteczkowej, np. 200 Da. W związku z tym rozpoczęto intensywne badania w celu uzyskania najmniejszej rozpoznającej jednostki (MRU, *minimal recognition units*), która może rozpoznawać i wiązać antygen z wysokim powinowactwem. W ciągu ostatnich lat opracowano różne konfiguracje fragmentów immunoglobulin zachowujące zdolność wiązania antygeny (7,8). Najmniejszą jednostką MRU jest region zmienny łańcucha ciężkiego V_H immunoglobuliny, jakkolwiek nie zawsze zachowuje on zdolność wiązania antygeny. Właściwości te można poprawić stosując „kamelizację” (od camel), czyli wprowadzanie fragmentów wielbłądzych V_H do ludzkich fragmentów V_H (wielbłądy i lamy mają przeciwciała składające się tylko z łańcuchów ciężkich) (9,10). Do najpowszechniej stosowanych należy moduł pojedynczego łańcucha Fv (scFv), w którym zmienne domeny łańcucha ciężkiego i lekkiego są połączone łącznikiem polipeptydowym. Monowalencyjne scFv mogą być łączone w dwuwalencyjne moduły przez łącznik tworząc dimery (*diabody*) (11). Dimeryzację fragmentów Fv można również uzyskać przez połączenie przez łącznik (linker) do fragmentu łańcucha ciężkiego C_{H3} – jednołańcuchowe przeciwciała (scAb), lub przez wprowadzenie reszt cysteinowych do fragmentów V_L i V_H i utworzenie mostka dwusiarczkowego przez transferazę glutationową co daje stabilizowane mostkiem dwusiarczkowym jednołańcuchowe przeciwciała (STAB) (12,13). Połączone mostkiem dwusiarczkowym dwa moduły scAb tworzą miniprzeciwciała (*minibody*) (14).

4. Przeciwciała humanizowane i ludzkie

W celu uzyskania przeciwciał monoklonalnych o zmniejszonej immunogenności dla ludzi zastosowano metody inżynierii genetycznej (reakcję odwrotnej transkrypcji, PCR, i nadekspresję w komórkach ssaczych) i wprowadzono techniki humanizacji przeciwciał, tworząc chimeryczne przeciwciała zawierające mysie zmienne regiony łańcucha ciężkiego i lekkiego i resztę cząsteczki immunoglobuliny ludzkiej. Inne konstrukty chimerycznych przeciwciał mają „przeszczepione” mysie segmenty wiążące antygen, znane jako regiony determinujące komplementarność (CDR, *complementarity determining regions*), do cząsteczki ludzkiej immunoglobuliny (15,16). Takie przeciwciała znalazły już zastosowanie w terapii różnego rodzaju nowotworów.

Poznanie genów kodujących ciężkie i lekkie łańcuchy ludzkich immunoglobulin pozwoliło na bezpośrednie uzyskiwanie ludzkich przeciwciał ze zbiorów prezentowanych na fagach lub z transgenicznymi zwierzętami.

W technice prezentacji na fagach domeny V_H i V_L ludzkich przeciwciał są klonowane metodą PCR, wprowadzane do nitkowatego faga i ekspresjonowane na jego

powierzchni jako scFv lub Fab. Specyficzne dla danego antygeny fagi są selekcjonowane przez technikę paningu (adsorpcji na specyficznym antygenie w fazie stałej) *in vitro*. Metoda ta pozwala na uzyskanie zbioru ludzkich przeciwciał zawierającego ok. 10^{10} klonów i izolowanie przeciwciał o wysokim powinowactwie (10^{-9} - 10^{-10} M) dla specyficznego antygeny w przeciągu kilku tygodni (17,18).

Ludzkie przeciwciała o wysokim powinowactwie otrzymywane są również z transgenicznych *knock-out* myszy, którym zniszczono ich geny immunoglobulinowe i wprowadzono geny ludzkich immunoglobulin (19). Immunizacja prowadzi do produkcji ludzkich immunoglobulin, które mogą być odzyskiwane jako monoklonalne przeciwciała z zastosowaniem standardowej techniki hybrydyzacji (20).

5. Zwiększanie naturalnego powinowactwa przeciwciał

Wraz ze wzrostem zastosowania przeciwciał do oznaczania małych cząsteczek z wysoką czułością, powstaje problem otrzymania przeciwciał o wyższym powinowactwie niż uzyskiwane przez immunizację myszy lub prezentację na fagach. Opracowano wiele metod zwiększania powinowactwa przeciwciał *in vitro*. Należą do nich zbiory prezentowane na rybosomach (21), metody sterowanej ewolucji (22), oraz mutageniza punktowa i przypadkowa (23). Ciekawym spostrzeżeniem jest fakt, że przeciwciała uzyskiwane metodą immunizacji *in vivo* w owcach mają z reguły o dwa rzędy wyższe powinowactwo w porównaniu do przeciwciał uzyskiwanych przeciwko tym samym antygenom w myszach (5).

6. Zastosowanie przeciwciał w terapii

Docelowa terapia genowa i immunoterapia polega na wykorzystaniu strategii wnikania wirusów i toksyn bakteryjnych do wnętrza komórki, po przyłączeniu się do receptorów komórek docelowych. Zależna od receptorów endocytoza jest najpowszechniejszą metodą internalizacji wektorów i toksyn (24). Projektowanie wektorów dla terapii genowej i immunoterapii wymaga uzyskiwania przeciwciał monoklonalnych specyficznych dla antygenów powierzchniowych komórek docelowych. Przeciwciała te powinny podlegać internalizacji dla zapewnienia dostarczenia genów lub toksyn do subkomórkowego miejsca działania. Takie przeciwciała naśladują efekt naturalnych ligandów. Przeciwciała monoklonalne przeciwko receptorowi p185^{HER-2}, białku ulegającemu nadekspresji w ludzkim raku sutka, jajników, żołądka i ślinianek, powodują jego dimeryzację, fosforylację i internalizację, co może mieć zastosowanie do ukierunkowania (targetingu) i działania terapeutyczne (25). Stosowane i badane obecnie immunotoksyny obejmują egzotoksynę *Pseudomonas* wiążącą się do węglowodanowego antygeny Lewis^Y znajdującego się na wielu ludzkich nowotworach, ludzką rybonukleazę – angiogenną oraz toksyny niebiałkowe

takie jak kalichemicynę (z mikroorganizmu *Micromonospora echinospora calichensis*) i maytanisoid (z actinomycetes *Nocardia*), które są 100-1000 razy bardziej toksyczne, niż konwencjonalne leki chemioterapeutyczne (26).

Innymi częściami pozwalającymi na ukierunkowanie (targeting) do specyficznych tkanek są sterycznie stabilizowane immunoliposomy, czyli liposomy z dołączonymi humanizowanymi fragmentami Fab poprzez ich wolne grupy tiolowe (27,28). Mają one istotne znaczenie w forsowaniu bariery krew/mózg.

Dwuspecyficzne humanizowane diabody znalazły szczególne zastosowanie w ukierunkowywaniu cytotoksycznych komórek T do komórek raka sutka i białaczkowych komórek B na modelu *in vitro* (29). Natomiast miniprzeciwciała okazały się szczególnie przydatne jako czynnik pozwalający na lokalizację raka metodami radiologicznymi (*radioimmunoimaging*) (14).

Bardzo istotne jest zastosowanie przeciwciał w immunoterapii jako szczepionek stanowiących alternatywę dla immunizacji nagim DNA, zwłaszcza dla wywoływania odpowiedzi typu komórkowego przeciwko wirusom. Nadzmiennie regiony immunoglobulin mogą służyć do ekspresji peptydowych sekwencji antygenów – powstają wtedy antygenizowane przeciwciała, które służą jako immunogeny pozwalające ukierunkować odpowiedź immunologiczną na specyficzne epitopy komórek B lub T (30,31).

7. Zastosowanie przeciwciał w dziedzinach nie związanych z medycyną

Przeciwciała znajdują coraz większe zastosowanie w produkcji żywności, kosmetyków i środków czystości, przemyśle chemicznym i w ochronie środowiska. Zastosowanie przeciwciał w tych dziedzinach przedstawiono w tabeli 2 (5). Zwłaszcza istotne jest zastosowanie metod immunologicznych do pomiarów zanieczyszczeń środowiska. Normy Unii Europejskiej wymagają pomiarów zanieczyszczeń wody organicznymi czynnikami poniżej 0,1 µg/l (32). Dotychczasowe metody obejmują HPLC, chromatografię gazową i spektrometrię masową, wszystkie wymagające drogiej aparatury i odczynników. Zastosowanie immunologicznych metod kompetycyjnych lub niekompetycyjnych z użyciem enzymów, wyznaczników fluorescencyjnych czy chemiluminescencyjnych, a zwłaszcza immunosensorów pozwolą na osiągnięcie wysokiej czułości (0,1 ppb) mniejszym kosztem (33).

W tym krótkim przeglądzie podajemy tylko przybliżony pogląd na różne aspekty zastosowania przeciwciał w nowoczesnych metodach badawczych, medycynie i przemyśle. Zamieszczone w tym numerze „Biotechnologii” artykuły dostarczą Czytelnikom bardziej szczegółowych informacji o wybranych dziedzinach i mamy nadzieję, że zachęcą do pogłębiania wiadomości z tych dziedzin.

Tabela 2

Zastosowanie fragmentów przeciwciał w różnych sektorach

Przeciwciała jako specyficzne czynniki wiążące przemysł żywnościowy	hamowanie enzymów niszczących żywność ochrona wrażliwych modułów podczas produkcji stymulacja lub maskowanie zapachów zabezpieczanie przeciwko drobnoustrojom uzdatnianie wody
kosmetyki i środki czystości	działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze (w paście do zębów i płynach do płukania ust) hamowanie enzymów powodujących odory
detergenty	ochrona wrażliwych modułów podczas produkcji usuwanie plam
przemysł lekki	oddzielanie produktów od intermedatów uzdatnianie wody poprodukcyjnej
ochrona środowiska	usuwanie mikroorganizmów i wirusów z wody usuwanie organicznych zanieczyszczeń z wody biologiczna regeneracja gleby
Przeciwciała jako cząsteczki przenoszące sygnały i sensory	monitorowanie chemicznych zanieczyszczeń środowiska monitorowanie mikrobiologicznych zanieczyszczeń monitorowanie rozkładu żywności (testy świeżości) monitorowanie przechowywania i dojrzewania owoców monitorowanie świeżości warzyw

Literatura

- Ehrlich P., (1900), Proc. R. Soc., 112, 178-195.
- Kohler G., Milstein C., (1975), Nature, 256, 495-497.
- Galfre G., Milstein C., (1981), Meth. Enzymol., 73, 1-46.
- Shields J. G., Turner M. W., (1986), J. Immunol. Meth., 87, 29-33.
- Harris B., (1999), Trends Biotechnol., 17, 290-296.
- Ma J. K. C., Hein M. B., (1995), Trends Biotechnol., 13, 522-527.
- Pluckthun A., (1994), *Handbook of Pharmacology*, Eds. Rosenberg M., Moore G. P., Springer Verlag, 133, 269-315.
- Pluckthun A., Pack P., (1977), Immunotechnology, 34, 83-105.
- Davies J., Riechmann L., (1995), Bio-Technology, 13, 475-479.
- Davies J., Riechmann L., (1996), Protein Eng., 9, 531-537.
- Holliger P., Winter G., (1993), Curr. Opin. Biotechnol., 4, 446-449.
- Tudyka T., Skerra A., (1997), Protein Sci., 6, 2180-2187.
- Reiter Y., Brinkmann U., Lee B., Pastan I., (1996), Nat. Biotech., 14, 1239-1245.
- Hu S., Shively L., Raubitschek A., Sherman M., Williams L. E., Wong J. Y., Shively J. E., Wu A. M., (1996), Cancer Res., 56, 3055-306.
- Kelley R. F., (1996), *Protein Engineering and practice*, Eds. Cleland J. L., Craik C. S., Wiley-Liss, New York, 399-434.
- Adair J. R., Bright S. M., (1995), Exp. Opin. Invest. Drugs, 4, 863-870.
- Griffiths A. D., Williams S. C., Hartley O., Tomlison I. M., Waterhouse P., Crosby W. L., Kontermann R., Jones P. T., Low N. M., Allison T. J., et al., (1994), EMBO J., 13, 3245-3260.

18. Vaughan T. J., Williams A. J., Pritchard K., Osbourn J. K., Pope A. R., Earnshaw J. C., McCafferty J., Hodits R. A., Wilton J., Johnson K. S., (1996), *Nat. Biotechnol.*, 14, 309-314.
19. Winter G., Griffiths A. D., Hawkins R. E., Hoogenboom H. R., (1994), *Ann. Rev. Immunol.*, 12, 433-452.
20. Mendez M. J., Green L. L., Corvalan J. R. F., Jia X. C., Maynard-Currie C. E., Yang X. D., Gallo M. L., Lee D. V., Erickson K. L., et al., (1997), *Nat. Genet.*, 15, 146-156.
21. Hanes J., Pluckthun A., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4937-4942.
22. Proba K., Worn A., Honegger A., Pluckthun A., (1998), *J. Mol. Biol.*, 275, 245-253.
23. Rader C., Barabas C. F., (1997), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 503-508.
24. Michael S. I., Curiel D. T., (1994), *Gene Ther.*, 1, 223-232.
25. Park J. M., Yang X., Park J. J., Press O. W., Press M. F., (1999), *Hybridoma*, 18, 487-495.
26. Carter P., Merchant M., (1997), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 449-454.
27. Lasic D. D., Papadopoulos D., (1995), *Science*, 267, 1275-1276.
28. Park J. W., Hong K., Carter P., Asgari H., Guo L. Y., Keller G. A., Writh C., Shalaby R., Kotts C., Wood W. I., et al., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1327-1331.
29. Zhu Z., Zapata G., Shalaby M. R., Snedecor B., Chen H., Carter P., (1996), *Bio-Technology*, 14, 192-196.
30. Zanetti M., Rossi F., Lanza P., Filaci G., Lee R. H., Billetta R., (1992), *Immunol. Rev.*, 130, 125-150.
31. Xiong S., Gerloni M., Zanetti M., (1997), *Nat. Biotechnol.*, 15, 882-886.
32. Agg Ba A. R., Zabel T. F., (1990), *J. Ins. Water Environ. Manag.*, 4, 44-50.
33. Gizeli E, Lowe C. R., (1996), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7, 66-71.