

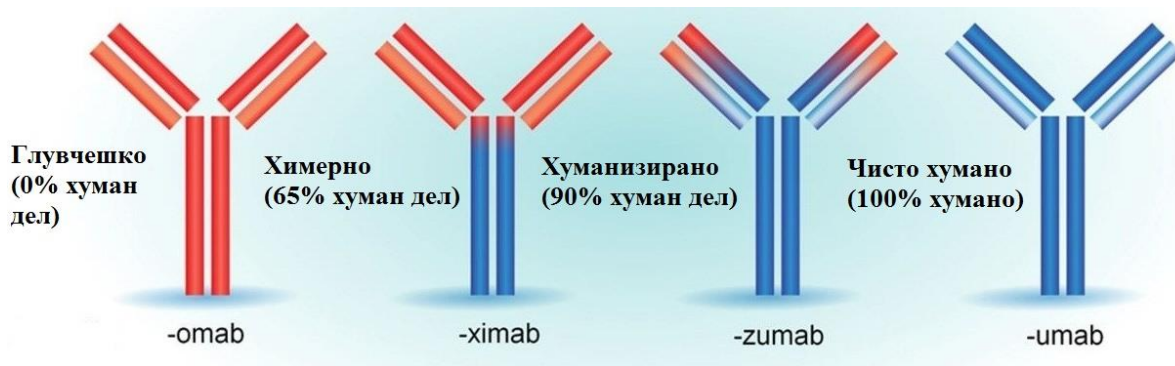
УПОТРЕБА НА HERCEPTIN® (трастузумаб) И НЕГОВИОТ КОНЈУГАТ KADCYLA® (трастузумаб-емтанзин) ВО ТЕРАПИЈА НА РАК НА ДОЈКА



Трастузумабот е првото одобрено хуманизирано моноклонално антитело, кое е активно против HER2/neu позитивен рак на дојка. HER2/neu е трансмембрански тирозин-киназа рецептор, член на фамилијата ErbB (Епидермален фактор за раст) со молекулска маса од 185-kDa. Составен е од екстраклеточен (четири субдомени: I, II, III и IV), трансмембрански и интраклеточен домен. Овој рецептор игра значајна улога во процесот на пролиферација и диференцијација на клетките. Вклучен е во различни биолошки процеси како што се раст, метаболизам и апоптоза како одговор на надворешни и внатрешни стимулации. Катализира трансфер на γ фосфатна група од АТП на тирозинските хидроксилни групи на протеините. Во нормалните клетки активноста на HER2/neu е строго конторлирана, меѓутоа кај мутираните клетки станува моќен онкопротеин. Докажано е дека абнормалната активација на рецепторот и неговата прекумерна експресија е вклучена во развој и напредок на многу малигни заболувања, особено на HER2/neu позитивен рак на дојка. Ова откритие е едно од главните достигнувања во анти-канцер терапијата и целното уништување на туморските клетки. Дизајнирани се и синтетизирани голем број на HER2/neu инхибитори со мала молекулска маса кои успешно се користат во третман на рак на дојка (лапатиниб, гефитиниб). Меѓутоа главна цел било достигнување на целна терапија и постигнување на специфичност и селективност во самиот процес на лекување. Антителата покажале способност да таргетираат одредени тумори и да се локализираат на или околу туморските клетки. Идентификацијата на специфичниот антиген на површината на туморските клетки овозможува креирање на посебни антитела (од животни и луѓе) наречени моноклонални антитела.

Моноклоналните антитела се антитела кои имаат идентична специфичност и својство да препознаат ист епитоп на антигенот. Делуваат преку директно врзување

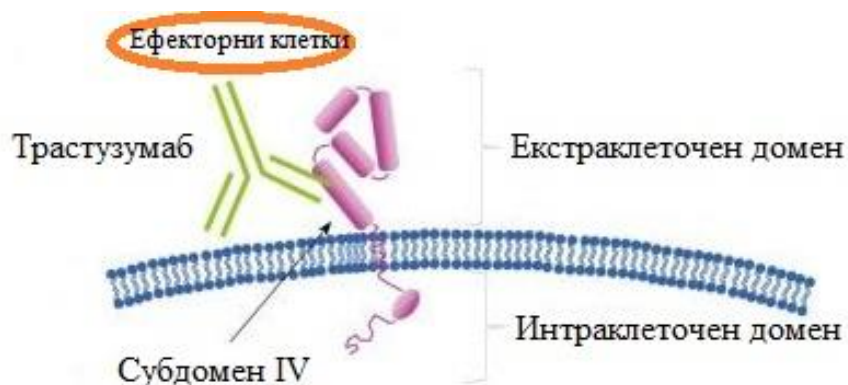
и неутрализирање на токсинот и *индиректно* преку CDC (комплемент зависна цитотоксичност) и ADCC (антитело зависна клеточна цитотоксичност). Со напредокот на генетскиот инженеринг во текот на годините дизајнирани се и произведени четири главни категории на моноклонални антитела (гљувчешки, химерни, хуманизирани и чисто хумани). Чисто гљувчешките антитела кои првобитно се користеле покажале неколку главни недостатоци. Поради тоа што претставуваат протеини кои потекнуваат од глодари, лесно се препознаени од имунолошкиот систем на човекот и предизвикуваат развој на хумани анти-гљувчешки антитела (НАМА). НАМА не само што го инактивираат и елиминираат гљувчешкото антитело, туку создаваат антитело-НАМА комплекс кој дава алергиски реакции и анафилактичен шок. Поради разликата помеѓу гљувчешкиот и хуманиот имунолошки систем, гљувчешките Fc фрагменти имаат смалена можност да предизвикуваат CDC и ADCC. За да се надминат овие проблеми, оригиналното гљувчешко антитело е модифицирано со што настанува минимизирање на имуногеноста и добивање на антитела кои се слични на хуманите и кои даваат добар фармаколошки одговор. Со клонирање на рекомбинантната ДНК која содржи секвенци од гљувчешки гени и гени од константните региони на хуманите антитела се добиваат химерни и хуманизирани моноклонални антитела. Со тоа се намалува НАМА одговорот и се подобрува активноста преку CDC и ADCC (Слика 1).



Слика 1. Моноклонални антитела

Трастузумабот е хуманизирано моноклонално антитело одобрено во 1998 од стана на FDA (Агенција за храна и лекови) за третман на рак на дојка. Составено е од 1328 аминокиселини со молекулска маса од 148-kDa. Потекнува од гљувчешкото антитело 4D5 кое инхибира пролиферација на клеточните линии кои имаат прекумерна експресија на HER2/neu рецепторите, а немаат ефект кај клетките кај кои немаат експресија на овој рецептор. Ова гљувчешко антитело претставува potentен инхибитор на растот на туморските хумани клетки од дојка и затоа е избрано за понатамошен клинички развој. Со цел за намалување на НАМА одговорот 4D5

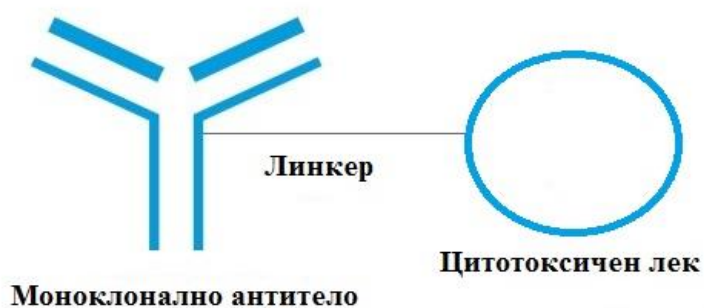
антителото е хуманизирано. *Картер и соработниците, (1992)* успеале да го субклонираат хиперваријабилниот регион од 4D5 во плазмиди кои кодираат создавање на константни ланци од хумано IgG1 антитело и генерирање на вектор кој кодира создавање на химерно антитело кое е понатаму хуманизирано. Добиеното хуманизирано антитело има поголем афинитет спрема HER2/neu отколку 4D5 и одобрено е за терапија на рак на дојка. Делува преку антитело зависна клеточна цитотоксичност (ADCC), врзувајќи се за четвртиот субдомен на екстраклеточниот домен на HER2/neu рецепторот. Fc регионот содржи јаглехидратни остатоци кои реагираат со останатите делови од имунолошкиот систем – ефекторни клетки. Откако антителото се врзува за четвртиот субдомен од рецепторот, Fc фрагментот се врзува за ефекторните клетки (макрофаги, природни клетки убијци, моноцити), врши нивна регрутација и убивање на туморските клетки преку фагоцитоза, апоптоза итн (Слика 2). Регистриран е како лек кој се користи само во болнички услови, Herceptin® (F.Hoffmann-la Roche Ltd) од 150 mg и 440 mg прашок за раствор за инфузија и раствор за инјектирање од 600 mg/5 ml. Во Република Македонија се регистрирани две форми од овој лек, прашок за раствор за инфузија од 150 mg и раствор за инјектирање од 600 mg/5 ml.



Слика 2. Механизам на дејство на трастузумаб

Конјугирањето на моноклоналните антитела со цитотоксични лекови, токсини или радиоизотопи дава најголема надеж во развој на рак-специфични цитотоксични реагенси. Лек конјугатите имаат поголема потенцијална предност поради зголемената селективност на цитотоксичните лекови кои се премногу токсични за да се користат самостојно. Со помош на конјугатите се овозможува внесување на лекот во внатрешноста на туморската клетка и нејзино побрзо уништување. Тие се дизајнирани така да предизвикуваат помало уништување на нормалните клетки, даваат помалку несакани ефекти и помала резистенција на самиот лек. Составени се

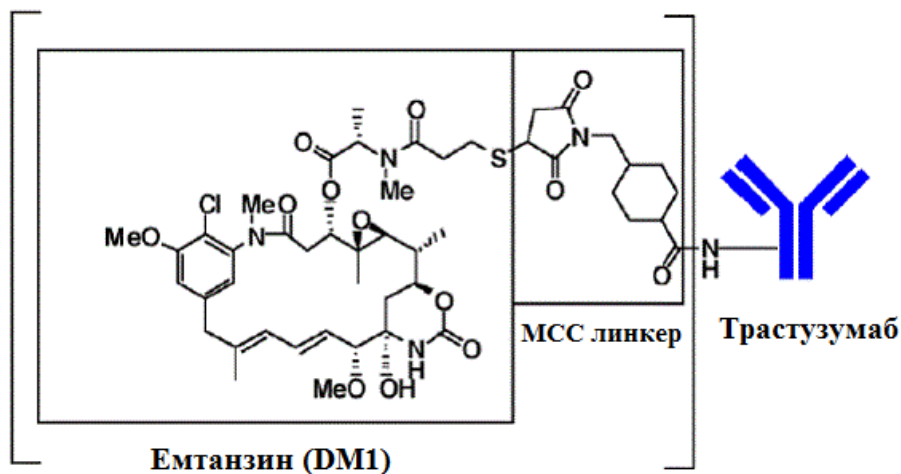
од три дела: моноклонално антитело, цитотоксичен лек и линкер кој служи за поврзување на лекот и антителото. За ефикасност на конјугатот потребно е внимателно одбирање на сите компоненти. Изборот на антителото зависи од типот на прекумерно експресираниот антиген (кај рак на дојка - HER2/neu рецепторот). Во овој случај висока селективност и брза интернализација ќе се постигне со анти-HER2/neu антителата. Од друга страна цитотоксичниот лек мора да покажува стабилни физичко-хемиски карактеристики и најчесто припаѓа во групата на ауристатини, маитанзини и калихемицини. Линкерот треба да овозможува ковалентно поврзување помеѓу лекот и антителото и стабилност на конјугатот во процесот на растворање, лиофилизација и стерилизација (Слика 3). Конјугатот станува активен во туморското ткиво после интернализацијата и после ослободувањето на цитотоксичниот лек во доволна количина за нејзино убивање. Во некои случаи дејство на лекот е придружено и потпомогнато со антитуморското дејство на антителото преку ADCC и CDC.



Слика 3. Антитело-лек конјугат

После регистрирањето на трастузумабот во терапија на рак на дојка и добрите клинички резултати, правени се долгогодишни напори за дизајнирање на негов конјугат со цел за подобрување на активноста и процесот на лекување. Најдобра стабилност и ефикасност покажал конјугатот трастузумаб-емтанзин, кој е регистриран во 2013 од страна на Агенцијата за храна и лекови како лек кој се користи во болнички услови (Kadcyla[®] - Genentech, la Roche Ltd, прашок за раствор за инјектирање од 100 mg и 160 mg). Клиничките студии покажале дека добро се поднесува и дава добри резултати кога се применува кај пациенти со метастазиран рак на дојка во напредната фаза. Содржи анти-HER2/neu антитело – трастузумаб и цитотоксичен агенс емтанзин DM1 (дериват на маитанзин) кои меѓусебно се поврзани со стабилен линкер малеимидометил-циклохексан-1-карбоксилат (тиоетер MCC). Антителото и линкерот се поврзани со амидна врска помеѓу карбоксилната група на линкерот и аминокислотната група на лизинот од антителото. За едно антитело се

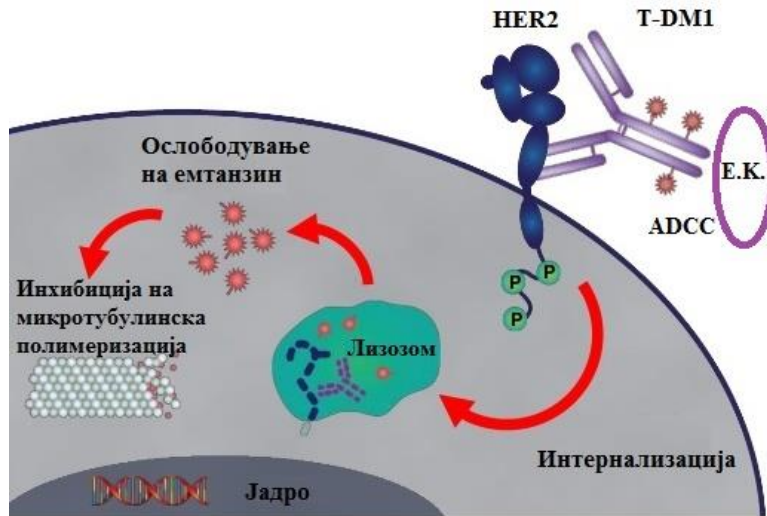
поврзани 3.5 молекули на DM1 на Fc фрагментот. Конјугирањето на лекот е најчесто на Fc фрагментот за да не пречи на активноста на Fab фрагментите во процесот на врзување за антигенот. Емтанзинот е дериват на маитанзинот и претставува бензоансамacroлиден природен производ изолиран од кората на афричката билка *Maytenus ovatus* (Слика 4).



Слика 4. Трастузумаб-емтанзин

Маитанзинот е силен анти-микротубулински агенс и инхибитор на тубулинската полимеризација. После врзувањето за HER2/neu рецепторот со помош на антителото, доаѓа до интернализација на конјугатот преку рецептор-посредувана ендоцитоза и активниот дериват емтанзин се ослободува со протеолитичка деградација во лизозомите. Емтанзинот понатаму делува на тој начин што се врзува за тубулинот и брзи инхибирање на микротубулинската полимеризација и разрушување на туморската клетка. Од друга страна пред интернализација на конјугатот Fc фрагментот од трасузумабот ги активира ефекторните клетки преку ADCC кои исто ги убиваат клетките (Слика 5).

Предност на овој конјугат е тоа што е овозможено користење на јакиот анти-тубулински дериват емтанзин, кој во слободна форма поради слабата селективност е многу токсичен и ги оштетува здравите клетки. Голем број на испитувања и студии покажуваат значително намалување на несаканите ефекти и резистентоста спрема лекот. Од друга страна овој конјугат е поефикасен од чистото антитело со повисока антитуморска активност која потекнува од синергистички ефект на двете компоненти кои се покажале значително ефикасни кај метастазиаран и агресивен рак на дојка.



Слика 5. Механизам на дејство на трастузумаб-емтанзин

Подготвил:

м-р фарм. Марија Штерјова
 м-р фарм. Паулина Апосотлова
 Проф. д-р Емилија Јаневиќ-Ивановска

Литература:

- Bennisroune A., Gardin A., Aunis D., Cremel G. and Hubert P.; Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Oncology Hematology* 50:23-38 (2004).
- Cadena D.L. and Gill N.G.; Receptor tyrosine kinases. *The FASEB Journal* 6:2332-2337 (1992).
- Carter P., Presta L., Gorman C.M., Ridgway J.B.B., Henner D., Wong W.L.T., Rowland A.M., Kotts C., Carver M.E. and Shepard M.; Humanization of an anti-p185^{HER2} antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 89:4285-4289 (1992).
- Cassady J.M., Chan K.K., Floss H.G. and Leistner E.; Recent development in the maytansinoid antitumor agent. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 52(1):1-26 (2004).
- Dosio F., Brusa P. and Cattel L.; Immunotoxins and anticancer drug conjugate assemblies: the role of the linkage between components. *Toxins*. 3:848-883; 2011.
- Ducry L. And Stump B.; Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies. *Bioconjugate Chemistry* 21(1):5-13 (2010).

- Erickson H.K., Park P.U., Widdison W.C., Kovtun Y.V., Carrett L.M., Hoffman K., Lutz R.J., Goldmacher V.S. and Blattler W.A.; Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing. *Cancer Research* 66(8):4426-4433 (2006).
- Gennari R., Menard S., Fagnoni F., Ponchio L., Scelsi M., Tagliabue E., Castiglioni F., Villani L., Magalotti C., Gibelli N., Oliviero B., Ballardini B., Da Prada G., Zambelli A. and Costa A.; Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clinical Cancer Research* 10:3650-3655 (2004).
- Kolibaba K.S. and Druker B.J.; Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1333:217-248 (1997).
- Lee J., Dull T.J., Iax L., Schlessinger J. and Ullrich A.; HER2 cytoplasmic domain generates normal mitogenic and transforming signals in a chimeric receptor. *The EMBO Journal* 8(1):167-173 (1989).
- Legouffe E., Liautard J., Gaillard J.P., Rossi J.F., Wijdendes J., Bataille R., Klein B. and Brochier J.; Human anti-mouse antibody response to the injection of murine monoclonal antibodies against IL-6. *Clinical and Experimental Immunology* 98:323-329 (1994).
- Lopus M., Oroudjev E., Wilson L., Wilhelm S., Widdison W., Chari R. and Jordan M.A.; Maytansine and cellular metabolites of antibody-maytansinoid conjugates strongly suppress microtubule dynamics by binding to microtubules. *Molecular Cancer Therapeutic* 9(10):2689-2699 (2010).
- Oldham R.K.; Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology* 1(9):582-590 (1983).
- Scott A.M., Wolchok J.D. and Old L.J.; Antibody therapy of cancer. *Cancer* 12:278-288 (2012).
- Scott G.K., Robles R., Rark J.W., Montgomery P.A, Daniel J., Holmes W.W., Lee J., Keller G.A., Li W.L, Fendly B.M., Wood W.I., Shepard M. and Benz C.C.; A truncated intracellular HER2/neu receptor produced by alternative RNA processing affects growth of human carcinoma cells. *Molecular and Cellular Biology* 13(4):2247-2257 (1993).
- Sharkey R.M. and Goldenberg D.M.; Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 56(4):226-243 (2006).
- Stern M. and Herrmann R.; Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Oncology/Hematology* 54:11-29 (2005).
- Valabrega G., Montemurro F. and Aglietta M.; Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Annals of Oncology* 10:1-8 (2007).

- Verma S., Miles D., Gianni L., Krop I.E., Welslau M., Baselga J., Pegram M., Oh D.Y., Dieras V., Guardino E., Fang L., Lu M.W., Olsen S. and Blackwell K.; Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 367(19):1783-1791 (2012).
- Weiner L.M., Surana R. and Wang S.; Monoclonal antibody: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Immunology* 10:317-327 (2010).