تکنیک مهندســـــی آنتی‌بادی در ایمنی‌شناسی

سحر خراسانی، دانشجوی کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه مقاله:

پیشرفت‌های اخیر در تکنولوژی بیولوژی مولکولی منجر به رشد بیشتر این علم و راهگشایی آن به تجارت و صنعت شده است. استفاده از آنتی‌بادی‌ها با حداکثر کیفیت، مستلزم ایجاد تغییراتی در ساختار آن‌هاست. در این راستا مهندسی آنتی‌بادی موفقیت‌های زیادی را در سال‌های گذشته بدست آورده است؛ به کمک مهندسی آنتی‌بادی این امر محقق شده که بتوان در ویژگی‌های فارماکوکینتیک آنتی‌بادی، سایز، نیمه‌عمر، ایمونوژنیسیته و ویژگی‌های دیگری از آن‌ها تغییراتی ایجاد کرد. تاکنون محصولات زیادی از این علم در دسترس قرار گرفته‌اند که از این میان می‌توان آنتی‌بادی‌های موشی، کایمریک، انسانی‌شده، کاملاً انسانی و غیره را نام برد. هدف از این مقاله توضیح اجمالی درباره چگونگی تغییر در برخی از ویژگی‌های آنتی‌بادی‌ها برای اهداف مختلف و نیز معرفی چند محصول آنتی‌بادی حاصل مهندسی آنتی‌بادی خواهد بود.

لغات کلیدی: آنتی‌بادی، ایمونوژنیسیته، گیرنده Fc نوزادی، قطعات آنتی‌بادی

مقدمه:

حدود یک قرن پیش، از آنتی‌بادی‌ها تحت عنوان "گلوله‌های جادویی" نام می‌بردند (1). موفقیت‌های اخیر در استفاده از آن‌ها در بالین، برازنده بودن این نام‌گذاری قدیمی را ثابت می‌کند.

آنتی‌بادی‌ها با اهداف و کاربردهای مختلف در بالین استفاده می‌شوند، برای مثال آن‌ها می‌توانند به‌صورت محصولات بدون بازو باعث مهار سلول هدف و یا مرگ سایتوتوکسیک آن شده و یا به‌صورت کریر برای اهداف سیتوسیدال یا تصویربرداری استفاده شوند(1,2). کاربردهای مختلف آنتی‌بادی‌ها در بالین و افزایش کیفیت و کارآیی آن‌ها نیازمند ایجاد یک سری تغییرات در آن‌هاست که اساس پایه‌گذاری علم مهندسی آنتی‌بادی است.

آنتی‌بادی‌ها از نظر ایجاد تغییر در سایز، فارماکوکینتیک، ایمونوژنیسیته، اختصاصیت، ظرفیت و اعمال اجرایی مهندسی می‌شوند (1,3). از میان بیش از 20 داروی برپایه آنتی‌بادی که توسط سازمان غذا و دارو (FDA) تأیید شده است، حدود 85٪ آن‌ها محصول مهندسی آنتی‌بادی است. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در بین 10 محصول از پرفروش‌ترین داروها و در 4 رده اول قرار دارد (4,5).

محصولات مهندسی آنتی‌بادی‌ها شامل آنتی‌بادی‌های کایمریک (Chimeric)، آنتی‌بادی انسانی‌شده (Humanized)، آنتی‌بادی کاملاً انسانی (Fully Human)، قطعات آنتی‌بـادی‌ها (Antibody Fragments)، آنتی‌بادی‌های کونژوگه با توکسین و غیره

هستند. ازجمله انواع دیگری از محصولات که تحت این علم در حال پیشـرفتند می‌توان Single chain antibodies، Single domain antibodies، مینی بادی‌ها، Bispecific antibody و غیره را نام برد (2,3,6).

در این مقاله هدف ما توضیح کلی درباره چگونگی تغییر در برخی از ویژگی‌های آنتی‌بادی‌ها برای اهداف مختلف و نیز معرفی چند محصول آنتی‌بادی حاصل مهندسی آنتی‌بادی خواهد بود.

ویژگی‌های فارماکوکینتیک، سایز، نیمه‌عمر و Antibody Fragments:

ویژگی‌های فارماکوکینتیک آنتی‌بادی بسته به نوع کاربرد آن‌ها دستخوش تغییر قرار می‌گیرد و مسئله بسیار مهمی در این علم محسوب می‌شود (7). از میان این ویژگی‌ها میزان حضور آنتی‌بادی و چگونگی پاکسازی آن در بدن بسیار مهم است.

در مواردی که هدف از استفاده از آنتی‌بادی، مهار (مثل مهار مسیر سیگنالینگ خاص) یا القای یک عملکرد (مثل مرگ سلولی به‌واسطه آنتی‌بادی (ADCC) یا مرگ سلولی به‌واسطه کمپلمان (CDC) است، افزایش نیمه‌عمر باعث افزایش دسترسی بیولوژیکی و کاهش تعداد دفعات تزریق و نیز کاهش هزینه مصرفی می‌شود، به‌علاوه اگر آنتی‌بادی مثلاً با یک ماده سمی مثل مواد رادیواکتیو، توکسین، داروها و غیره کونژوگه شده باشد، پاکسازی (کلریانس) سریع آن از بدن و درنتیجه کاهش اثرات جانبی آن مستلزم کوتاه بودن نیمه‌عمر آن است (6).

نیمه‌عمر:

در بین فاکتورهای مختلفی که بر میزان نیمه‌عمر/کلریانس آنتی‌بادی مونوکلونال اثر دارند، اینتراکشن Fc با گیرنده Fc نوزادی (FcRn) نقش پررنگی دارد (8). گیرنده‌های FcRn در سطح سلول‌های فاگوسیتیک سیستم رتیکولواندوتلیال با اتصال به آنتی‌بادی IgG باعث مهار حذف آن می‌شوند (9). اتصال آنتی‌بادی به FcRn سطح اندوزوم‌ها از هضم لیزوزومال آن جلوگیری کرده و منجر به بازگشت آنتی‌بادی‌ها به جریان خون می‌شود. یک علت نیمه‌عمر کوتاه‌تر آنتی‌بادی‌های دیگر به‌دلیل کاهش و یا فقدان این اینتراکشن است. با توجه به این مطالب مهندسی آنتی‌بادی در جهت تغییر میزان افینیتی اتصال ناحیه Fc اثر قابل‌توجهی بر چگونگی و میزان کلریانس و درنتیجه نیمه‌عمر آن محصول در بدن دارد.

موتاسیون‌هایی که منجر به افزایش افینیته اتصال آنتی‌بادی به این گیرنده می‌شوند نیمه‌عمر را افزایش می‌دهند؛ درحالی‌که موتاسیون‌هایی که باعث کاهش این افینیتی می‌شوند نیمه‌عمر محصول را کاهش می‌دهند (1). علاوه بر موتاسیون‌های هدفمند جهت کاهش نیمه‌عمر، از قطعات بدون ناحیه Fc با نیمه‌عمر کمتر از 30 ساعت و نیز بلاکرهای FcRn که میل بالاتری در مقایسه با IgG به آن گیرنده دارند نیز در جهت کاهش نیمه‌عمر محصول استفاده می‌شود. همانطور که می‌دانید اتصال آنتی‌بادی به این گیرنده وابسته به PH است. این نکته جالب‌توجه است که تغییراتی که منجر به افزایش افینیتی آنتی‌بادی در هر دو PH اسیدی لیزوزوم و PH فیزیولوژیک می‌شوند نیمه‌عمر کمتری در سرم خواهند داشت (8).

قطعات آنتی‌بادی (Antibody Fragments):

سایز بزرگ آنتی‌بادی‌های دست‌نخورده باعث افزایش دفعات گردش آن‌ها در جریان خون و در نتیجه ایجاد سمیت‌های وابسته به دوز و مشکلاتی در عکس‌برداری می‌شود (6). اولین تلاش در جهت کاهش سایز آنتی‌بادی‌ها، هضم پروتئولیتیک آن‌ها به‌واسطه آنزیم‌های پاپائین و پپسین بود که قطعات $F(ab)_2'$ و Fab' را ایجاد می‌کرد. این قطعات اختصاصیت مشابه، کلریانس سریع‌تر و قدت نفوذ بیشتری در مقایسه با نوع دست‌نخورده داشتند (6). پیشرفت‌های ایجادشده در تکنولوژی DNA نوترکیب تولید گونه‌های دیگری از این قطعات را تسهیل کرد.

در اولین قدم مهندسی آنتی‌بادی، قطعات آنتی‌بادی کدشده با تک ژن ایجاد شدند. محصول این ژن زنجیره‌های ناحیه متغیر سنگین و سبک و یک پپتید کوتاه برای اتصال دو زنجیره به یکدیگر بود. این محصول مونووالان که scFV (single chain FV) نام دارد دارای قدرت اتصال مشابه نوع دست‌نخورده ولی تک‌ظرفیتی است (6). این قطعات نیمه‌عمر کوتاهی (کمتر از ده دقیقه) داشته و درنتیجه در تشخیص و عکس‌برداری کاربرد بیشتری دارند.

نانوبادی‌ها که حاصل دامین‌های V_HH زنجیره سنگین آنتی‌بادی‌ها هستند عاری از زنجیره سبک بوده و در مقایسه با آنتی‌بادی معمولی، CDR طولانی‌تری دارند. به‌علاوه این آنتی‌بادی‌ها مقاومت دمایی، حلالیت و افینیتی بیشتری نیز دارند. اخیراً نانوبادی‌ها برضد آنتی‌ژن‌های توموری مختلفی ساخته شده و روی مدل‌های آزمایشگاهی حیوانی تحت بررسی‌اند (6).

مولتی‌مریزاسیون Antibody Fragmentها که منجر به افزایش نیمه‌عمر، افینیتی/اویدیتی آن‌ها می‌شود به طرق مختلف صورت می‌گیرد (6). استراتژی‌های اولیه براساس استفاده از لینکرها یا اتصال خودبخودی مونومرها به یکدیگر بود. scFVهای دوظرفیتی، حاصل اتصال غیرکوالان خودبخودی یا اتصال کووالان دی‌سولفیدی دو scFV تک‌ظرفیتی به یکدیگر است. scFV دوظرفیتی یا چندظرفیتی با اتصال دو یا چند مولکول scFV با استفاده از یک پپتید لینکر نیز ساخته شده‌اند (6).

راه‌کارهای دیگر در جهت مولتی‌مریزاسیون شامل استفاده از استرپتاویدین، پروتئین P_{53} و زیپر لوسین است (6). علاوه بر scFV، V_HHها نیز با پپتید لینکر، دوظرفیتی می‌شوند. همچنین از ساب‌یونیت B سم وروتوکسین E.coli جهت پنتامریزاسیون V_HHها استفاده می‌شود (6).

ایمونوژنیـــــــسیتـــــه:

اســـتفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال موشی برای انسان باعث تولید آنتی‌بادی‌های ضدمـوشی انسانی (Human Anti Mouse Antibody=HAMA) در بدن می‌شود. جهت کاهش ایمونوژنیسیته، آنتی‌بادی‌ها به طرق مختلف مهندسی شده‌اند. اولین قدم، ساخت آنتی‌بادی کایمریک موشی-انسانی بود که حاصل اتصال زنجیره متغیر سبک و سنگین موشی و ناحیه ثابت انسانی است. از حدود 20 آنتی‌بادی تأییدشده برای استفاده انسانی، نزدیک به نصف آن‌ها کایمریک‌اند (1).

اما اســـــــــــــــــتفاده از آنتی‌بادی کایمریک در انسان نیز باعث ساخت آنتی‌بادی آنتی کایمریک (Human Amti Chimeric Antibody= HACA) می‌شود. برای کاهش بیشتر ایمونوژنیسیته، ناحیه CDR در IgG موشی به Framework انسانی متصل شد و محصول Humanized Antibody نام گرفت، بااین‌حال پاسخ ضد ناحیه متغیر نیز ایجاد می‌شد.

بررسی‌ها نشان می‌دهدکه تمام رزیدیوهای اسیدآمینه‌ای CDR در اتصال به آنتی‌ژن دخیل نیستند؛ تنها حدود 20 تا 33٪ آن‌ها که به آن‌ها SDR (Specificity Determining Residues) می‌گویند با بالاترین افینیتی در اتصال به آنتی‌ژن نقش دارند. جایگزینی CDRها با SDR در Humanized Antibody باعث کاهش ایمونوژنیسیته آن می‌شود (1).

قدم دیگر جهت کاهش ایمونوژنیسیته آنتی‌بادی‌های موشی براساس این تفکر است که تنها رزیدیوهای سطحی در ایمونوژنیسیته ناحیه متغیر نقش دارند، بنابراین تنها رزیدیوهای سطحی از آنتی‌بادی موشی با نوع انسانی آن جایگزین شدند. آنتی‌بادی ساخته شده با این فرایند تحت بررسی است (1).

فرآیند De-immunization راهکار دیگری در جهت کاهش ایمونوژنیسیته آنتی‌بادی‌های کایمریک یا موشی است. در این فرآیند ابتدا اپی‌توپ‌های خطی که قرار است توسط سلول T شناخته شوند با فرآیند بیوانفورماتیک تشخیص داده شده و با موتاژنزهای هدفمند به سکانس‌های انسانی یا غیرایمونوژن تغییر داده می‌شوند (1).

هرچند که Humanized Antibody ایمونوژنیسیته پایینی دارد، اما می‌تواند منجر به تولید آنتی‌بادی ضد انسانی (Human Anti Human Antibody=HAHA) شود. از بین آنتی‌بادی‌های انسانی شده مورداستفاده، پاسخ HAHA بین 0/1٪ (در داروی هرسپتین) تا 34٪ (در داروی Zenapax) دیده می‌شود. به‌علاوه کایمریزاسیون یا هیومنیزاسیون آنتی‌بادی‌ها فرآیندی سخت، نیازمند آنالیز، متدلوژی‌های مهندسی پیشرفته، تغییرات افینیتی و ایمونوژنیسیته است. تکنولوژی‌های جدید، تولید آنتی‌بادی‌هـــــــــــــای کاملاً انسانی (Fully human) را تسهیل کرده است. یک راهکار، استفاده از موش‌های ترانسژن است که در آن لوکوس ایمونوگلوبولین موشی غیرفعال شده و با ژن‌های انسانی جایگزین شده است. علاوه بر آن تکنولوژی جدید phage display راهکار دیگری جهت ساخت آنتی‌بادی‌های کاملاً انسانی است (1).

نتیجه‌گیری:

امروزه آنتی‌بادی‌ها با اهداف و کاربردهای مختلف در بالین استفاده می‌شوند. ویژگی‌های فارماکوکینتیک، آنتی‌بادی‌ها را برحسب هدف کاربری آن تغییر می‌دهند؛ مثلاً می‌توان نیمه‌عمر آن‌ها را با ایجاد تغییراتی در ناحیه Fc آن‌ها طولانی یا کوتاه یا سایز آن‌ها را کوچک‌تر نمود.

ایمونوژنیسیته حاصل از کاربری این آنتی‌بادی‌ها در بدن انسان با انسانی کردن آنتی‌بادی‌ها، استفاده از SDRها، فرآیند De-immunization، آنتی‌بادی‌های کاملاً انسانی با استفاده از موش‌های ترانسژن و تکنولوژی‌های جدیدتر کاهش چشمگیری داشته است.

این چشم‌انداز وجود دارد که با پیشرفت‌های بزرگ بوجود آمده در مهندسی آنتی‌بادی که در این مقاله مجال گفتن آن نبود، عصر استفاده از آنتی‌بادی جای خود را به Antibody fragment، Single domain antibody، Bispecific antibody و غیره بدهد.

منابع:

.1 Jain M, Kamal N, Batra SK. Engineering antibodies for clinical applications. Trends in biotechnology. 2007;25(7):307-16. Epub 2007/05/22.

.2 Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. Nature biotechnology. 2005;23(9):1147-57. Epub 2005.10/09/

.3 Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nature biotechnology. 2005;23(9):1126-36. Epub 2005/09/10.

.4 Lo KM, Leger O, Hock B. Antibody Engineering. Microbiology spectrum. 2014;2(1):AID-0007-2012. Epub 2014/02/01.

.5 Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB, Dewitz MC. Monoclonal antibody successes in the clinic. Nature biotechnology. 2005;23(9):1073-8. Epub 2005/09/10.

.6 Loo L, Robinson MK, Adams GP. Antibody engineering principles and applications. Cancer J. 2008;14(3):149-53. Epub 2008/06/10.

.7 Tabrizi MA, Tseng CM, Roskos LK. Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies. Drug discovery today. 2006;11(1-2):81-8. Epub 2006/02/16.

.8 Presta LG. Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. Current opinion in immunology. 2008;20(4):460-70. Epub 2008/07/29.

.9 Filpula D. Antibody engineering and modification technologies. Biomolecular engineering. 2007;24(2):201-15. Epub 2007/05/01.

.10 Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, Baty D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. British journal of pharmacology. 2009;157(2):220-33. Epub 2009/05/23.