

Zdzisław Gliński, Andrzej Żmuda

z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

W zwalczaniu chorób zakaźnych, nowotworów i chorób zwyrodnieniowych coraz większe sukcesy odnosi terapia celowana polegająca na hamowaniu określonych komórkowych szlaków molekularnych. W chorobach zakaźnych zapoczątkowało ją wprowadzenie przez Pawła Ehrlicha (1) salwarsanu do leczenia kiły. Następnie zastosowano sulfonamidoterapię i antybiotykoterapię zaburzającą precyzyjnie czynności życiowe ściśle określonych gatunków mikroorganizmów. Pojawienie się bakterii opornych na dotychczas znane i powszechnie stosowane antybiotyki (superbakterie) coraz częściej stanowiących zagrożenie dla życia człowieka i zwierząt stało się nowym wyzwaniem. Do leczenia zakażeń spowodowanych przez superbakterie odporne na antybiotyki β -laktamowe (NDM-1, New Delhi Metallo- β -laktamase-1), enterokoki odporne na wankomycynę (VRE) (2) oraz szczepy *Staphylococcus aureus* odporne na metycylinę (MRSA; 3) wprowadzono synercid, linezolid, daptomycynę i tejsobaktynę oraz jej analogi (4, 5).

Duży postęp w terapii celowanej przyniosły nanotechnologie. Połączenie nanostruktury z substancją aktywną biologicznie (lek, antygen) umożliwiło kreację nanonosińców. Są one stabilne fizycznie, nietoksyczne, umożliwiają kontrolowane uwalnianie substancji czynnej, są przy tym biokompatybilne i selektywnie ukierunkowane na określone struktury organizmu (6, 7). Obecnie są pomocne w diagnostyce i terapii wielu chorób, a ukierunkowane na wybrane komórki układu immunologicznego umożliwiają ciągłe uwalnianie się antygenów, dlatego nie istnieje konieczność rewakynacji, a jednocześnie stymulują wysoce selektywną odporność (8).

Ostatnio główną rolę w metodzie terapeutycznej polegającej na hamowaniu określonych szlaków molekularnych odgrywają przeciwciała monoklonalne. Stały się one niezwykle cennym narzędziem badawczym w immunologii, naukach biologicznych, medycznych i weterynaryjnych. Dzięki nim stało się m.in. możliwe uchwycenie drobnych zmian we właściwościach

Monoclonal antibodies – a new group of biological agents

Gliński Z., Żmuda A., Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

The concept, that antibodies could serve as "magic bullets" in the diagnosis and therapy of diseases, dates back to their discovery. Monoclonal antibodies are produced by a single clone of B cells and are directed toward a single epitope of an antigen. Their production involves *in vivo* or *in vitro* procedure, or combination of both. Recombinant antibodies revolutionized the world of monoclonal antibody production. They are monoclonal antibodies which are generated *in vitro* using synthetic genes and do not need hybridomas and animals in the production process. In modern medical and veterinary sciences, monoclonal antibody-based therapy is the most successful therapeutic strategy, leading to the inhibition of specific molecular pathways. Therefore, monoclonal and recombinant antibodies are included in the new group of human and veterinary medicinal products used as diagnostic tools, for treatment of infectious and degenerative diseases and also for neoplasms treatment.

Keywords: monoclonal antibody, diagnostic assays, infectious diseases, degenerative diseases, cancer, treatment.

antygenowych drobnoustrojów, co jest niezwykle przydatne w badaniach epidemiologicznych lub w opracowywaniu testów diagnostycznych o wysokiej czułości i swoistości (9, 10). Są one też wykorzystywane do wykrywania i określania stężeń hormonów, enzymów, leków, w diagnostyce nowotworów i prognozowaniu w chorobie nowotworowej. Ze względu na swoje właściwości i uzyskiwane efekty tworzą nową i bardzo obiecującą grupę leków biologicznych. Szacuje się, że obecnie stanowią ok. 30% biofarmaceutyków. W terapii wykorzystuje się przeciwciała monoklonalne i rekombinowane m.in. w celu zniszczenia komórek nowotworowych, zmniejszenia infekcyjności drobnoustrojów, regulacji odpowiedzi immunologicznej, hamowania immunosupresji i leczenia chorób zwyrodnieniowych (11, 12, 13).

Otrzymywanie przeciwciał monoklonalnych

W 1975 r. Köhler i Milstein uzyskali klon komórek produkujących identyczne pod każdym względem cząsteczki przeciwciał nazwanych później przeciwciałami monoklonalnymi (14). Przeciwciała monoklonalne stanowią pulę przeciwciał otrzymanych z jednego klonu limfocytów B. Aktywowane przez antygen limfocyty B tworzą klony komórek w śledzionie oraz węzłach chłonnych, przy czym komórka z danego klonu produkuje jeden ściśle określony typ przeciwciała monoklonalnego. Dzięki temu przeciwciała monoklonalne cechują się jednakową strukturą względem określonego epitopu antygeny i takim samym lub podobnym powinowactwem. Ze względu na swoją wysoką specyficzność względem jednego epitopu antygeny przeciwciała monoklonalne nie rozpoznają zmienionych chemicznie lub zdegradowanych antygenów.

Otrzymanie przeciwciał monoklonalnych jest procesem wieloetapowym i skomplikowanym. W największym skrócie produkcja przeciwciał monoklonalnych na zwierzętach polega na:

- Immunizacji myszy antygenem z epitopem wymaganym do produkcji przeciwciała monoklonalnego.
- Otrzymaniu *in vitro* klonów komórek hybrydowych w następstwie fuzji mieszaniny limfocytów i komórek plazmatycznych pochodzących ze śledziony immunizowanej myszy z komórkami szpiczaka mnogiego najczęściej z uszkodzonym genem fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej. Każda komórka hybrydy jest „nieśmiertelna” i wytwarza stale homogenne przeciwciała, przy czym ich swoistość określa limfocyt B, z którego ona powstała.
- Eliminacji niesfuzjowanych komórek szpiczaka i niesfuzjowanych limfocytów B na podłożu z dodatkiem tymidyny, hipoksantyny, aminopteryny z pozostawieniem hybryd.
- Izolacji z zawiesiny pojedynczych hybryd i wyselekcjonowaniu komórek producentów przeciwciał o określonej swoistości.
- Namnożeniu wyselekcjonowanych klonów. Przeciwciała z hodowli jednego klonu są przeciwciałami monoklonalnymi. Otrzymywane klony komórkowe różnią się zarówno pod względem stabilności, jak i wydajności w produkcji przeciwciał (15).

Przeciwciała monoklonalne otrzymuje się nie tylko z komórek zwierzęcych. Techniki molekularne pozwalają na produkcję przeciwciał monoklonalnych z wykorzystaniem bibliotek fagowych lub myszy transgenicznnych, psów, szczurów z genami immunoglobulin człowieka (12). Można także zastąpić metodę tworzenia hybryd techniką rekombinacji DNA i produkować przeciwciała rekombinowane dzięki modułowej budowie przeciwciał. Można więc ingerować w ich strukturę i projektować cząsteczki o określonych właściwościach farmakokinetycznych, immunogenności, specyficzności i funkcjach efektorowych immunoglobulin.

Jedną z metod inżynierii molekularnej koncentruje się na segmentach genów odpowiedzialnych za VHCH1 i VLCL immunoglobuliny wiążącej antygen. Mogą one być amplifikowane za pomocą techniki PCR z wielu różnych cząsteczek mRNA ulegających ekspresji w populacji komórek podlegających

odpowiedzi immunologicznej, a następnie amplifikowane segmenty są wstawiane do odpowiedniego wektora, klonowane i parowane losowo. Zidentyfikowane pary VHCH1-VLCL po umieszczeniu w wektorze ekspresyjnym, bakteryjnym, roślinnym lub ssaka wykorzystuje się do wytworzenia dużych ilości przeciwciał monoklonalnych o pożądanej swoistości (16, 17). Można wyprodukować syntetyczne przeciwciała monoklonalne (rekombinowane przeciwciała), wykorzystując geny wyprodukowane w laboratorium lub geny ludzkie i w ten sposób całkowicie wyeliminować zwierzęta z procesu produkcji przeciwciał (18). Dziś już można uzyskać w pełni ludzkie immunoglobuliny otrzymane z syntetycznych lub naturalnych źródeł, kultur tkankowych zwierząt i człowieka, bibliotek fagowych i transgenicznych organizmów. Jednym z ciekawszych rozwiązań w projektowaniu wielospecyficznych fragmentów Ig jest zastosowanie tzw. domen dimeryzacji i dokowania (DDD) oraz domen kotwiczących (AD). Z rekombinowanymi przeciwciałami wiążą się wielkie oczekiwania w związku z leczeniem chorób zakaźnych i genetycznych, a przede wszystkim z terapią przeciwnowotworową. Przeciwciała z fragmentu jednego pojedynczego łańcucha (scFv) są coraz powszechniej wykorzystywane w testach o diagnostycznych oraz w terapii celowanej.

Wykorzystanie przeciwciał monoklonalnych i rekombinowanych w diagnostyce chorób

Przeciwciała monoklonalne poszerzyły wachlarz testów diagnostycznych w chorobach zakaźnych, zwirodnieniowych, a szczególnie w chorobie nowotworowej. Immunoterapia celowana stała się dzięki nim precyzyjniejsza, a tym samym bardziej skuteczna. Zarówno przeciwciała monoklonalne, jak i rekombinowane wykorzystuje się w badaniach nad strukturą antygenową drobnoustrojów (19). Za ich pomocą ustalono np. różnice w budowie antygenowej wirusa wścieklizny i wirusów pokrewnych (20). Powszechnie są wykorzystywane do opracowywania testów diagnostycznych w chorobach zakaźnych i inwazyjnych oraz z bardzo dobrym efektem w diagnostyce różnego typu nowotworów ludzi i zwierząt. Opracowano o dużej czułości i swoistości testy do wykrywania m.in. zakażenia spowodowanego przez *Trichomonas vaginalis*, herpeswirusa bydła typu 1, rotawirusy, wirusa choroby Aujeszkyego (21), *Yersinia pseudotuberculosis* (22), wirusa grypy ptaków, nosówki psów, białaczki kotów, a także do wykrywania antygeny LPS *Brucella*, aflatoksyn w produktach spożywczych i paszach, pozostałości antybiotyków (enrofloksacyny) w produktach pochodzenia zwierzęcego (23).

Dostępne są testy diagnostyczne z użyciem rekombinowanych przeciwciał do diagnostyki zakażenia cirowirusem prosiąt typu II (PCV-2), pomoru klasycznego świń, pryszczycy, zakaźnej encefalopatii bydła (BSE), zakażenia wywołanego przez *Brachyspira hyodysenteriae* i *Mycobacterium bovis* (24). Porcynowane (porcynized) rekombinowane przeciwciała przeciwko białku E2 wirusa klasycznego pomoru świń stanowią nowe narzędzie w diagnostyce tej choroby (25). Uodporniając wielbłądy szczepionką handlową dla PCV-2 dzięki

metodzie inżynierii molekularnej otrzymano jednodomenowe przeciwciała przeciwko fragmentowi białka kapsydu wirusa (Cap) o bardzo wysokiej swoistości, co pozwoliło na precyzyjne rozróżnienie PCV-1 od PCV-2 (26). Fuzja rekombinowanego przeciwciała z fosfatazą zasadową zwiększyła dodatkowo jego czułość i swoistość w wykrywaniu PCV-2 (27). Przeciwciała z fragmentu jednego pojedynczego łańcucha (scFv) wykorzystano w testach do diagnostyki pryszczycy, zakażenia wirusem niedoboru immunologicznego bydła, grypy ptaków, choroby Newcastle (28), kokcydiozy oraz BSE i innych chorób prionowych. ScFv wyprodukowane na kurach lub transgenicznym tytoniu dla regionu 3B antygeny 3ABC wirusa pryszczycy umożliwiły odróżnienie bydła szczepionego od nieszczepionego przeciwciała tej choroby (29). Testy ELISA i Western blot z scFv przeciwko białku kapsydu wirusa niedoboru immunologicznego bydła cechują się wyższą czułością aniżeli dotychczas używany test jako „złoty standard” (30). Kurze scFv dla fragmentów białka prionowego (PrP^{Sc}) wykorzystuje się w testach diagnostycznych BSE i innych chorób prionowych (31). Ponadto przeciwciała monoklonalne stosuje się w testach diagnostycznych dla wąglika, brucelozy, leptospirozy, listeriozy, zakażeń spowodowanym przez *Mycoplasma* spp., *Zygomycetes*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, IBR/IPV, w chorobie niebieskiego języka, wścieklicznie, chorobach Hendra i Nipah, dirofilariozie, włośnicy, trypanosomiazie, leiszmaniozie, anaplazmozie i wielu chorobom przenoszonych przez stawonogi (32).

Powinowactwo i swoistość przeciwciał monoklonalnych nie zawsze są w pełni zadowalające. Mogą bowiem występować reakcje fałszywie dodatnie lub ujemne (assay-specificity) zależnie od zastosowanego testu serologicznego. Mogą też, chociaż rzadko, występować reakcje krzyżowe, ponieważ zupełnie niepokrewne antygeny mogą posiadać identyczne determinanty, względnie przeciwciała monoklonalne mogą reagować z determinantą antygenową o strukturze bardzo podobnej, ale nieidentycznej ze strukturą, przeciwko której zostały wytworzone. Przeciwciała monoklonalne rekombinowane i syntetyczne, w bardzo dużym zakresie wyeliminowały te ograniczenia.

Przeciwciała monoklonalne w leczeniu chorób

Terapia przy użyciu przeciwciał monoklonalnych ma cztery zasadnicze cele. Po pierwsze naprawę zaburzonych szlaków metabolicznych w komórce w celu przywrócenia jej fizjologicznych funkcji, czego efektem jest wyzdrowienie. Po drugie zainicjowanie działań, które prowadzą do dezorganizacji funkcji komórki patologicznie zmienionej, a w efekcie do jej apoptozy. Po trzecie modyfikowanie reakcji immunologicznych, przy czym najczęściej efektem jest działanie immunosupresyjne na organizm. Po czwarte leczenie chorób infekcyjnych. Te cele są realizowane w terapii celowanej przy użyciu przeciwciał monoklonalnych ukierunkowanych na określone receptory, np. receptory patogennych drobnoustrojów, receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) lub antygen CD20 na powierzchni komórki chłoniaka, do neutralizacji TNF- α , neutralizacji IL-31, która odgrywa kluczową rolę w indukowaniu atopowego

zapalenia skóry u psów, blokowanie poszczególnych etapów w procesie neowaskularyzacji w związanym z wiekiem zwyrodnieniu plamki żółtej (AMD), zablokowania działania IgE w chorobach alergicznych, zablokowania szlaków ontogenezy, aktywacji odpowiedzi immunologicznej prowadzącej do niszczenia komórek nowotworowych, modulowanie reakcji ligand-receptor.

Otrzymano różnorodne postacie przeciwciał rekombinowanych i ich ekspresję w różnych systemach ekspresyjnych, jednocześnie eliminując z ich produkcji zwierzęta dzięki osiągnięciom biotechnologii. Jako systemy ekspresyjne wykorzystano bakterie, grzyby, linie komórkowe owadzie i ssaków oraz rośliny transgeniczne (33, 34, 35).

Wyprodukowano przeciwciała zligowane z lekami, radioizotopami, polimerami, cytotoksykami lub cytokinami (36, 37), przeciwciała BiTEs (bispecific T-cell engager molecules), które przez złączenie fragmentów Fv dwu różnych przeciwciał monoklonalnych w jednym łańcuchu polipeptydowym posiadają domenę pobudzającą limfocyty T i domenę uwalniającą substancje cytotoksyczne (38), przeciwciała monoklonalne dwuswoiste otrzymywane w procesie chemicznego sprzęgania dwóch różnych przeciwciał (39). Modyfikacja przeciwciał technikami inżynierii genetycznej pozwala na zmniejszenie ich immunogenności oraz wydłużenie czasu półtrwania w surowicy pacjenta. Otrzymano też przeciwciała humanizowane, muryzowane i porcynowane.

Nie zawsze leczenie wyłącznie za pomocą przeciwciał przynosi zamierzone efekty. Dlatego też do terapii przeciwciałami często dołącza się leczenie wspomagające przy użyciu chemioterapeutyków, radioterapię i leczenie chirurgiczne. Takie postępowanie zarówno w medycynie, jak i weterynarii często przynosi wyzdrowienie, łagodzi przebieg choroby albo przedłuża średni czas przeżycia pacjenta.

Transplantologia, alergia, choroby zwyrodnieniowe

W transplantologii istotną rolę odgrywa profilaktyka i leczenie przypadków ostrego odrzucania przeszczepów. Przeciwciała monoklonalne, a u człowieka przeciwciała monoklonalne humanizowane, łącząc się z antygenem Tac (monoklonalny receptor czynnika wzrostu komórek T) dla receptora IL-2 na aktywowanych limfocytach T, hamują ich proliferację. Nie zaburzają przy tym odporności, ponieważ nie wywierają niepożądanego wpływu na spoczynkowe limfocyty T (40). Dostępne są monoklonalne przeciwciała mysie anti-CD3, chimeryczne oraz humanizowane anti-CD25 oraz humanizowane anti-CD52 (41). Najnowsze generacje przeciwciał monoklonalnych niszczą komórki układu odpornościowego odpowiedzialne za odrzut przeszczepu, hamują aktywację cytokinową i kostymulację zależną od limfocytów T i B, blokują aktywację dopełniacza (42). Duży postęp w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów przyniosły chimeryczne przeciwciała monoklonalne przeciwko TNF- α i IL-6. Leki oparte na nich wiążą rozpuszczalny i związany z błoną komórkową TNF- α , który jest głównie odpowiedzialny za proces zapalny. Obecnie w USA

FDA dopuściła ponad 10 leków opartych na przeciwciałach monoklonalnych przeciw TNF- α , IL-6, IL-17, CD20, np. Ixekizumab, Mavrilimumab, Ocrelizumab, Ofatumumab (43). Duże nadzieje wiąże się z chimerycznymi pełnej długości przeciwciałami anty-IL-17 (44). Ogromny postęp w leczeniu zwyrodnienia płamki żółtej związanego z wiekiem, zwłaszcza postaci wysiękowej tej choroby, przyniosły przeciwciała blokujące neowaskularyzację przez blokowanie izomerów czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF). Obecnie jest zalecanych 19 leków opartych na przeciwciałach monoklonalnych, m.in. przeciw amyloidowi β , blokujące angiogenezę (sfingozyno-1-fosforan, o5 β 1 integryna), przeciw komponentom C5, B i properdynie układu dopełniacza oraz przeciw interleukinie prozapalnej IL-27. Są to zarówno przeciwciała ludzkie IgG1 κ , humanizowane IgG2/4 κ , IgG i gG1 oraz mysie, chimeryczne (ludzko-mysie) IgG1 κ (45).

Zablokowanie przez przeciwciała anty-IgE tej immunoglobuliny przez zahamowanie procesu degranulacji komórek tucznych i bazofilów przynosi dobre efekty w leczeniu astmy, alergicznego nieżytu nosa, atopowego zapalenia skóry, przewlekłej pokrzywki i alergii pokarmowych (46). Rekombinowane humanizowane przeciwciało monoklonalne anty-IgE (IgG1 κ) specyficznie łączy się z domeną CH3 surowiczej IgE, blokując jej interakcję z receptorem Fc ϵ RI (receptor o wysokim powinowactwie do IgE) na komórkach tucznych, bazofilach, komórkach prezentujących antygen i komórkach zapalnych. Następnym jest zmniejszenie ilości wolnej IgE, zmniejszenie ilości Fc ϵ RI na komórkach aktywnych w zapaleniu i przerwanie kaskady alergicznej, spadek liczby eozynofili, czynnika stymulacji kolonii granulocyty-makrofagi (GM-CSF), IL-2, IL-4 i IL-13, spadek liczby limfocytów T prezentujących alergen i produkcji cytokin przez limfocyty Th2 (47). W leczeniu atopowego zapalenia skóry u psów wykorzystuje się przeciwciała monoklonalne neutralizujące IL-31, która odgrywa kluczową rolę w indukowaniu zapalenia i wywołaniu świądu. IL-31 produkują limfocyty Th2 i limfocyty T skóry w odpowiedzi na bodziec antygenowy. Po leczeniu przy użyciu Cytopoint w jednorazowej iniekcji po 4–8 tygodniach ustępuje świąd i zostają wyleczone uszkodzenia spowodowane drapaniem przez psa zmian zapalnych na skórze (48).

Choroby zakaźne zwierząt i ludzi

Zarówno przeciwciała monoklonalne, jak i rekombinowane przeciwciała monoklonalne są coraz częściej z dobrymi efektami wykorzystywane w profilaktyce, a zwłaszcza w leczeniu chorób zakaźnych ludzi i zwierząt. Ich stosowanie nie niesie takich samych ograniczeń jak antybiotykoterapia, natomiast dzięki metodom inżynierii molekularnej można wydłużyć okres ich obecności w leczonym organizmie i precyzyjnie dostosować ich działanie do struktur docelowego działania na drobnoustroje.

Próby leczenia przy użyciu przeciwciał monoklonalnych niektórych chorób zwierząt takich jak choroba niebieskiego języka, zakażenie wirusem *rhinotracheitis* i kolibakterioza cieląt podjęto w latach 80. XX w. (49). Otrzymano przeciwciała monoklonalne i oceniono ich

przydatność w terapii zespołu rozrodczo-oddechowego świń (PRRS), afrykańskiego pomoru świń, przyszczyca, epidemicznej biegunki prosiąt. Rekombinowane przeciwciało anty-glikoproteinie 4 (GP4) wirusa lub anty-niestrukturalnemu białku 9 (nsp9), a także chimeryczne przeciwciała mysz x świnia dla epitopu G5 skutecznie blokują infekcję PRRSV (50, 51). Chimeryczne porcynowane przeciwciało z fragmentu jednego pojedynczego łańcucha (scFv-Fc mysz x świnia) swoiste dla receptora Langerin, w połączeniu z białkiem „spike” wirusa epidemicznej biegunki prosiąt, użyte do szczepień macior indukuje produkcję przeciwciała w IgG i odpowiedź limfocytów TCD4. Siara immunizowanych macior eliminuje u prosiąt wysiew wirusa, ale nie wpływa na ich zachorowanie (52). Natomiast chimeryczne przeciwciała monoklonalne przeciwko *Haemophilus parasuis* hamują namnażanie się zarazka *in vitro*, ale tylko częściowo chronią prosięta przed zakażeniem (53). Przeciwciała rekombinowane scFv przeciw fimbriom K99 enterotoksynogennych szczepów *Escherichia coli* znacznie obniżają zachorowalność cieląt noworodków (54). Przeciwciała scFv anty-*Eimeria tenella* z ekspresją na groszku i anty-*E. acervulina* z ekspresją na *Nicotiana benhemiana* redukują u kurcząt karmionych zmodyfikowanymi roślinami liczbę oocytów pasożyta w kale (55). Rozważa się wykorzystanie scFv skierowane przeciw czynnikowi A wiążącemu fibronektynę i czynnikowi zlepiania A *Staphylococcus aureus* w profilaktyce i leczeniu zapalenia gruczołu mlekowego u krów (56).

U ludzi terapia przy użyciu przeciwciał monoklonalnych jest szerzej stosowana aniżeli u zwierząt. Odnosi się to zwłaszcza do chorób wirusowych. W przypadku groźnych chorób wywołanych wirusami Zika, ebola, HIV, wirusem syncytialnym terapia z ich użyciem jest ważnym komponentem wspierającym leczenie farmakologiczne. W ostatnich 20 latach wyprodukowano i wprowadzono do leczenia chorób ludzi ponad 60 rekombinowanych przeciwciał monoklonalnych (57).

Celem przeciwciał monoklonalnych przeznaczonych do terapii może być, jak to ma miejsce w przypadku ludzkiego cytomegalowirusa (HCMV), pentameryczny kompleks glikoproteinowy gH. Przeciwciało CSJ148 jest przeciwciałem chimerycznym o podwójnej swoistości, które łączy zalety obydwu typów przeciwciał monoklonalnych: LJP538 skierowanego na białko gB wirusa i LJP539 skierowanego na gH wirusa. Przeszło ono już pozytywnie badania przedkliniczne na wolontariuszach (58). Do walki z wirusem grypy podjęto próby wyprodukowania przeciwciał monoklonalnych neutralizujących wszystkie znane szczepy wirusa grypy A. Na drodze inżynierii molekularnej wyprodukowano przeciwciała humanizowane VIS410 w klasie IgG1 skierowane na region macierzysty (stem) wirusa grypy (59). Ich przydatność kliniczna jest w trakcie badań.

Dużo badań poświęcono wirusowi HIV i dengi. Do najciekawszych należą badania Zhou i wsp. (60) dotyczące przeciwciała VRC01 neutralizującego wirusa HIV-1 wyizolowanego z limfocytów B pacjenta zakażonego przez HIV. Jest ono skierowane przeciw strukturze CD4 na limfocytach T. Humanizowane przeciwciało 3BNC117 otrzymane od chorego na HIV pacjenta jest

skierowane na gp120 wirusa. Natomiast przeciwciała 3BNC117 blokuje zakażenie i zmniejsza wiramię u makaków zakażonych małpio-ludzkim wirusem SHIV-AD8. Humanizowane przeciwciała IgG4 mAb Pro 140 w badaniach klinicznych wykazało silne i długo utrzymujące się w organizmie leczone działanie przeciwwirusowe i było dobrze tolerowane przez pacjentów.

W przypadku wścieklizny otrzymano nie tylko przeciwciała monoklonalne wykrywające wirusa i przeciwciała anty-wirus w organizmie, ale też do celów terapeutycznych. Przeciwciała monoklonalne CL184 jest mieszaniną dwóch monoklonalnych przeciwciała CR57 i CR4,098, które wiążą się z epitopem glikoproteiny wirusa wścieklizny. CR57 wyizolowano z komórek B pamięci immunologicznej pacjenta szerepiętego inaktywowaną szczepionką przeciw wściekliznie transformowanych wirusem Epsteina-Barr (61). Wyprodukowano też przeciwciała z fragmentu jednego pojedynczego łańcucha o potrójnej swoistości (scFv50AD1-Fd) skierowane przeciw glikoproteinie wirusa wścieklizny, połączone z domeną trimeryzacji fibryliny bakteriofaga T4 (Fd). Ta strategia otrzymywania przeciwciał przeciw wściekliznie może zostać wykorzystana do projektowania nowej generacji leków przeciwko wściekliznie opartych na immunoterapii (62). Przeciwciała monoklonalne stanowią alternatywę dla końskiej lub ludzkiej immunoglobuliny przeciw wirusowi wścieklizny stosowanej u ludzi po pokąsaniu przez chore zwierzę. Dwa neutralizujące ludzkie przeciwciała monoklonalne RVC20 i RVC58 (wiążące się odpowiednio z miejscem antygenowym I i III) o dużej swoistości epitopowej i szerokim spektrum reaktywności stanowią ważną i niedrogą alternatywę dla dotychczas stosowanych immunoglobulin. Do ich otrzymania wykorzystano limfocyty B pamięci immunologicznej od czterech wybranych szczepionych dawców. *In vitro* RVC20 i RVC58 były zdolne do neutralizowania wszystkich 35 wirusów wścieklizny (RABV) i 25 *Lyssavirusów* innych aniżeli RABV. Koktajl RVC20-RVC58 chronił chomiki syryjskie przed zakażeniem śmiertelną dawką RABV i nie wpływał na odpowiedź na szczepienie przeciw wściekliznie (63).

Celem terapii dengi przy użyciu przeciwciał monoklonalnych jest uniemożliwienie interakcji przeciwciał z FcγRs na makrofagach (64). Mutacja uzyskana na drodze inżynierii w regionie Fc D23-1G7C2 IgG1 spowodowała silną redukcję powinowactwa regionu FcIgG1 do FcγRs (65).

Nowotwory

Wiek XXI cechuje ogromny postęp w diagnostyce i leczeniu nowotworów. Nie jest przesadne stwierdzenie, że immunoterapia zaczyna ogrywać coraz większą rolę i przynosi bardzo dobre efekty w wielu typach nowotworów. Przystaje powoli być wykorzystywana jako metoda wspomagająca leczenie chirurgiczne, radioterapię i farmakoterapię. Celem immunoterapii z użyciem przeciwciał monoklonalnych jest zablokowanie szlaków onkogenezy, nasilenie apoptozy, modulowanie reakcji ligand-receptor, blokowanie określonego receptora dla czynnika wzrostu, zaburzenie angiogenezy w obrębie nowotworu (66). W weterynarii, podobnie

jak w medycynie, immunoterapia nowotworów, głównie zwierząt towarzyszących człowiekowi, z użyciem przeciwciał monoklonalnych zaczyna odgrywać coraz większą rolę (67).

Wyraźnie zarysowały się przy tym tendencje do wykorzystania w terapii określonych form przeciwciał monoklonalnych, od immunotoksyn i koniugatów przeciwciał monoklonalnych z radioizotopami przez przeciwciała chimeryczne i o podwójnej swoistości do rekombinowanych przeciwciał o zmniejszonej masie cząsteczkowej (Fv przeciwciała z jednego łańcucha), przeciwciał chimerycznych szczurzo-mysich, ludzko-mysich i humanizowanych (68, 69).

Immunotoksyny, powstałe przez połączenie przeciwciał monoklonalnych z toksyną roślin (rycyna, sarpyna, gelonina), toksynami bakteryjnymi (egzotoksyna A *Pseudomonas nodosus*, *Pseudomonas aeruginosa*) lub toksynami grzybowymi (α -sarcyna), są bardzo skuteczne. Do zabicia jednej komórki jest zdolna nawet jedna cząsteczka rycyny. Pierwszą immunotoksynę otrzymano w 1981 r. (70). Immunotoksyny są stosowane w leczeniu raka pęcherza moczowego, białaczki, chłoniaka, raka płuc, czerniaka. Coraz częściej zamiast immunotoksyn z roślin i grzybów, które cechują się dużą immunogennością dla pacjentów, stosuje się immunotoksyny powstałe z połączenia przeciwciał monoklonalnych z toksyną *Corynebacterium diphtheriae*, *Pseudomonas* spp., endogennymi białkami ludzkiego pochodzenia, np. z RNA-zami i granzynami (71). Dalsze ulepszenie immunotoksyn dotyczy zmniejszenia ich immunogenności, zwiększenia selektywności w odniesieniu do komórek nowotworowych, zmniejszenia działania na zdrowe komórki organizmu. W immunotoksynie SSIP domenę I toksyny A *Pseudomonas aeruginosa* zastępuje Fv skierowane przeciw mezotelinie (białko 40 kDa o ekspresji na komórkach nabłonka), natomiast immunotoksyna RG7787 zawiera humanizowany fragment Fab i jest pozbawiona domeny II toksyny *P. aeruginosa*. Toksyna dyfterytowa ma trzy domeny: katalityczną, transmembranową i wiążącą, zaś w immunotoksynie *Denileukin difitox* w miejsce domeny wiążącej toksyny dyfterytowej wstawiono IL-2, co umożliwi wiązanie immunotoksyny do komórek z receptorem dla IL-2. W immunotoksynie hSGZ rekombinowana gelonina łączy się z Fv, który wiąże się z receptorem czynnika wzrostu fibroblastów 14-kD (Fn14), a domena bZIP (Basic Leucine Zipper Domain) zwiększa aktywność immunotoksyny przez umożliwienie dimeryzacji (72). W koniugatach przeciwciał monoklonalnych z izotopami wykorzystuje się m.in. Jod¹³¹, Itr⁹⁰. Dają one dobre efekty w leczeniu nowotworów wywodzących się z układu krwiotwórczego. Ażeby dodatkowo zwiększyć ich efektywność łączenia z komórkami nowotworu, dodaje się cytokiny (IL-2) celem zwiększenia przepuszczalności naczyń lub INF- γ , który stymuluje ekspresję antygenów nowotworowych (73). W leczeniu białaczki mieloidalnej są one skierowane przeciw strukturze CD33 chłoniaka Raji B, przeciw CD74, w leczeniu przerzutów nowotworów wątroby przeciw antygenowi CEA (antygen rakowo-płodowy) i glikoproteinie A33 (74). U psów w profilaktyce odrzucania przeszczepu szpiku zastosowano z powodzeniem przeciwciała monoklonalne

dwuswoiste anty-CD45 i anty-TCR $\alpha\beta$ limfocytów T regulatorowych skoniugowane z radioaktywnym bizmutem-213 (75) oraz przeciwciała monoswoiste anty-CD45 skoniugowane z astatyną-211 (76). Przeciwciała przeciwnowotworowe wstrzyknięte do nowotworu mogą indukować niszczenie komórek nowotworu za pomocą takich endogennych mechanizmów komórkowych jak cytotoksyczność zależna od układu dopełniacza (CDC), cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał (ADCC), immunofagocytoza. W przypadku ADCC niszczenie nowotworu jest wywoływane przez region Fc przeciwciała związanego z komórką nowotworową i receptorami Fc γ na komórkach efektorowych układu immunologicznego (neutrofile, makrofagi, NK). Modyfikacja polegająca na przykład na glikozylacji w regionie przeciwciała wiążącym się z receptorem może odgrywać kluczową rolę w uruchomieniu mechanizmów cytotoksyczności ADCC i CDC (77).

Przeciwciała chimeryczne IgG1 nieskoniugowane otrzymano w 1997 r., chimeryczną mysio-szczurzą hybrydę w 2009 r., a chimeryczne IgG1 skoniugowane z lekiem auristatin E (Brentuximab vedotin) w 2011 r. Przeciwciała chimeryczne nie wywołują przeciw sobie efektywnej odpowiedzi immunologicznej i są powoli eliminowane z krążenia pacjenta (78). Szerokie zastosowanie w leczeniu chłoniaków niezłazniczych znajduje chimeryczne ludzko-mysie przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko antygenowi CD20 (79). Przeciwciało, wiążąc się z antygenem CD20 na powierzchni komórki, uruchamia mechanizmy lizy komórkowej za pośrednictwem reakcji cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ADCC) oraz aktywacji dopełniacza (CDC). W leczeniu białaczki u psów z powodzeniem stosuje się chimeryczne przeciwciała anty-CD20 (80). Tworzy się też przeciwciała chimeryczne o podwójnej swoistości, które łączą zalety obydwu typów przeciwciał monoklonalnych. Przeciwciała o podwójnej swoistości, skierowane przeciw strukturze CD3 na limfocytach T połączone z przeciwciałem przeciwnowotworowym zbliża limfocyt T do komórki nowotworowej i równocześnie aktywuje jego zdolność cytotoksyczną. Otrzymano też przeciwciała o podwójnej swoistości w których jeden fragment przeciwciała monoklonalnego jest skierowany przeciw cząsteczkom CD2 lub CD16, drugi zaś przeciwko komórce nowotworowej. Są one stosowane w leczeniu raka jajnika, raka sutka, glejaka, ostrej białaczki szpikowej. Równoczesne podanie choremu z tymi przeciwciałami cytokin i komórek efektorowych zwiększa efektywność podawanych komórek. Przeciwciała monoklonalne mają wiązać i aktywować komórki efektorowe w miejscu rozwoju nowotworu (81). Spośród omówionych wielu celów terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych w nowotworach ważny jest receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR – epidermal growth factor receptor). Jego zablokowanie poprzez związanie go ze swoistym przeciwciałem przynosi dobre efekty w terapii celowanej w wielu nowotworach, zwłaszcza w przerzutowym drobnokomórkowym raku płuc, raku odbytnicy, raku trzustki, raku płaskonabłonkowym głowy i szyi (82). Psie przeciwciała monoklonalne anty-EGFR hamują u psów w 40–60% proliferację komórek raka sutka, *in vitro* zwiększają niszczenie komórek nowotworowych w procesie fagocytozy (83).

W leczeniu raka jelita grubego stosuje się przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw czynnikowi wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) odgrywającego kluczową rolę w angiogenezie wokół i w obrębie guza, dzięki czemu następuje rozwój nowotworu i przerzuty. Rekombinowane humanizowane przeciwciało monoklonalne IgG1 przez wybiórcze związanie się z VEGF blokuje proliferację komórek indukowaną przez VEGF (84).

Wprowadzenie leków przeciw czynnikowi martwicy guza (TNF- α) do praktyki klinicznej otworzyło nową erę w terapii przewlekłych schorzeń zapalnych. Interakcja TNF- α z receptorami TNFR1/p55 i TNFR2/p75 aktywuje wiele szlaków sygnałowych o kluczowym znaczeniu dla przeżycia, apoptozy komórki, zapalenia i odporności. TNF- α wpływa na wzrost guza, przeżycie, różnicowanie, inwazyjność, przerzuty oraz na sekrecję cytokin pro-angiogennych (85). Chimeryczne przeciwciało monoklonalne (Infliximab) zbudowane z mysiego zmiennego regionu Fab anty-TNF- α oraz ze stałego fragmentu Fc ludzkiej IgG1 neutralizuje biologiczną aktywność TNF- α przez związanie rozpuszczalnego i związanego z błoną komórkową TNF- α . Inicjuje ono też lizę komórek z ekspresją TNF- α w reakcji cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC) lub od przeciwciał (ADCC). Zwiększając przepuszczalność naczyń krwionośnych zaopatrujących guz, przeciwciała monoklonalne anty-TNF- α ułatwiają przenikanie cytostatyków do guza i jego niszczenie (86).

Skuteczne w terapii nowotworów są rekombinowane przeciwciała dwuswoiste (BiMabs). Mają masę od kilku do 1000 kDa. Celem ich działania jest: zablokowanie dwu receptorów powierzchniowych komórki, zablokowanie dwu ligandów, sieciowanie dwu receptorów i/lub rekrutacja limfocytów T. Trójswoiste przeciwciała (TrioMabs) są zbudowane z dwu zmiennych fragmentów Fv dwu różnych przeciwciał monoklonalnych wiążących antygen w jednym łańcuchu peptydowym i komponenty Fc w celu włączania komórek odpornościowych. Po związaniu z komórką nowotworową pobudzają limfocyty T do podziałów, wytwarzania adhezyn, granzymów i perforyn niszczących nowotwór (87). Catumaxomab (TrioMabs) jest hybrydą szczurzo-mysią IgG2 o masie 150 kDa (88). Jeden fragment Fv przeciwciała monoklonalnego wiąże się z EpCAM (transmembranowa glikoproteina obecna na wielu komórkach nowotworowych), drugi z cząsteczką CD3 na limfocytach T, a domena Fc łączy się z receptorami Fc na komórkach odpornościowych: makrofagi, komórki NK. Następstwem jest zniszczenie komórek nowotworu powodujące ich lizę, fagocytozę, niszczenie w reakcji cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ADCC), cytotoksyczności przy współdziałaniu cytokin. Lek jest stosowany w terapii raka żołądka i raka jajników. Natomiast w przypadku Blnatumomab (BiTE) jeden zmienny fragment łączy się z CD19 komórek nowotworowych, drugi z CD3 cytotoksycznych komórek T, fragmenty domeny zmiennej (Fv) są połączone nieimmunogennymi sekwencjami łącznika glicyna-seryna (89). Efektem jest liza komórek nowotworu. Preparat jest stosowany w leczeniu ostrej i chronicznej białaczki limfatycznej i chłoniaków. Obecnie w badaniach przedklinicznych i klinicznych jest ponad 50 tego typu przeciwciał dla różnych typów raka (90).

Jednym z nowych kierunków immunoterapii raka jest blokada receptora programowanej śmierci-1 (PD-1) na limfocytach T, limfocytach B i monocytach/makrofażach. Jego związanie z programowanym ligandem PD-L1 (białko transmembranowe 40 kDa) hamuje aktywację układu odpornościowego. Okazało się, że swoiste monoklonalne przeciwciała anty-PD-1 i anty-PD-L1, blokując interakcję PD-L1/PD-1, aktywują limfocyty T do zwiększenia produkcji IFN- γ (91). Blokada PD-L1/PD-1 przez psie przeciwciała monoklonalne może zostać wykorzystana w leczeniu nowotworów psów z ligandem PD-L1 (92). Oprócz monoklonalnych przeciwciał IgG w terapii nowotworów z ekspresją Fc ϵ R, takich jak rekombinowane przeciwciała IgE dla tego receptora immunoglobuliny dają lepsze efekty aniżeli inne izotypy przeciwciał (93, 94).

Leczenie przeciwciałami monoklonalnymi przynosi niekwestionowane korzyści. Koncerny farmaceutyczne oferują prawie co miesiąc nowe leki do terapii celowanej w chorobę nowotworową i chorobach zwyrodnieniowych związane z wiekiem zwyrodnienie płamki żółtej oraz autoimmunologicznych. Pomimo wysokiej ceny ze względu na skuteczność znajdują rzesze nabywców. Wiele przeciwciał monoklonalnych w terapii jest dobrze tolerowanych. Jednak należy mieć na uwadze możliwość wystąpienia niepożądanych reakcji u pacjentów. Już wcześniej zauważono, że mogą wystąpić: anafilaksja, choroba posurowicza, zespół lizy guza, trombocytopenia immunologiczna, burza cytokin (CRS) lub ogólnoustrojowy zespół odpowiedzi zapalnej (SIRS) (95). Przeciwciała anty-TNF- α mogą indukować autoimmunologiczne choroby tarczycy, a przeciwciała przeciwko limfocytom cytotoksycznym T związane z antygenem CTLA4 (antygen błonowy limfocytów T aktywowany pod wpływem antygeny) autoimmunologiczne zapalenie okrężnicy. W leczeniu humanizowanym przeciwciałem anty-EGFR może wystąpić wysypka, a przeciwciała monoklonalne anty-ERBB2 (receptorowa kinaza tyrozynowa) może działać kardiotoksycznie. Burzę cytokinową notuje się po leczeniu przeciwciałami anty-CD28 (Theralizumb, TGN1412; 96). U psów mysie przeciwciała monoklonalne 231 indukują gorączkę i obrzęk. Chimeryzacja przeciwciał monoklonalnych i stosowanie jednogatunkowych przeciwciał monoklonalnych (humanizowane, porcynowane, psie) zmniejsza wystąpienie reakcji niepożądanych, ale nie eliminuje ich całkowicie (91). Monitoring (test ELISA i cELISA) pojawienia się i narastania miana przeciwciał anty-przeciwciała monoklonalne pozwala na wczesne podjęcie działań profilaktycznych celem eliminacji działań niepożądanych.

Piśmiennictwo

- Gensini G.F., Conti A.A., Lippi D., Ehrlich P.: The contributions of Paul Ehrlich to infectious disease. *J. Infect.* 2007, **54**, 221–224.
- Courvalin P.: Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clin. Infect. Dis.* 2006, **42**, suppl. 1, 25–34.
- Banaszkiewicz T., Krukowski H.: Chorobotwórczość MRSA dla ludzi i zwierząt. *Med. Weter.* 2014, **70**, 151–156.
- Clemett D., Markham.: Linezolid. *Drugs* 2000, **59**, 815–827.
- Fiers W.D., Craighead M., Singh I.: Teixobactin and its analogues: A new hope in antibiotic discovery. *ACS Infect. Dis.* 2017, **3**, 688–690.
- Almeida A.J., Souto E.: Solid lipid nanoparticles as drug delivery system for peptides and proteins. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2007, **59**, 478–490.
- Lasoń E., Ogonowski J.: Stałe nanocząsteczki lipidowe – charakterystyka, zastosowanie i otrzymywanie. *Chemik* 2011, **65**, 960–967.
- Kim M.G., Park J.Y., Shon Y., Kim G., Shim G., Oh Y.K.: Nanotechnology and vaccine development. *Asian J. Pharm. Sci.* 2014, **9**, 227–235.
- Gupta A., Dixit A.K., Dixit P., Mahajan C.: Application of monoclonal antibodies in veterinary parasitology. *Vet. World.*, 2011, **4**, 183–188.
- Siddiqui M.Z.: Monoclonal antibodies as diagnostics: an appraisal. *Indian J. Pharm. Sci.* 2010, **72**, 12–17.
- Kieć-Kononowicz K.: Terapeutyczne przeciwciała monoklonalne i białka fuzyjne zawierające ich elementy. *Farmacja Polska* 2007, **63**, 183–198.
- Chan A.C., Carter P.J.: Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2010, **10**, 301–316.
- Sparrow E., Friede M., Sheikh M., Torvaldsen S.: Therapeutic antibodies for infectious diseases. *Bull. W.H.O.* 2017, **95**, 235–237.
- Köhler G., Milstein C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975, **256**, 495–497.
- Falkenberg F.W.: Monoclonal antibody production: problems and solutions. *Res Immunol.* 1998, **149**, 542–547.
- Swann P.G., Tolnay M., Muthukumar S., Shapiro M.A., Rellahan B.L., Clouse K.A.: Considerations for the development of therapeutic monoclonal antibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 2008, **20**, 493–499.
- Büyükköroğlu G., Şenel B.: Engineering monoclonal antibodies: Production and applications. Chap. 16. Barh D., Azevedo V. (Ed.): Omics technologies and bio-engineering. Towards improving quality of life. *Acad. Press*, 2018, 353–389.
- Merrick B.A.: The plasma proteome, adductome and idiosyncratic toxicity in toxicoproteomics research. *Brief Funct. Genomic Proteomic.* 2008, **7**, 35–49.
- Yewdell J.W., Gerhard W.: Antigenic characterization of viruses by monoclonal antibodies. *Annu. Rev. Microbiol.* 1981, **35**, 185–206.
- Falmand A., Wiktor T.J., Koprowski H.: Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies related virus proteins. I. The nucleocapsid protein. *J. Gen. Virol.* 1980, **48**, 97–107.
- Marchioli C., Yancey R.J.J., Timmins J.G., Post L.E., Young B.R., Povedo D.A.: Protection of mice and swine from pseudorabies virus induced mortality by administration of pseudorabies virus specific mouse monoclonal antibodies. *Am. J. Vet. Res.* 1988, **49**, 860–864.
- Fedorova V.A., Samelia Z.G., Devdariani Z.L., Utkin D.V., Eremina O.F., Liapina E.P.: Development of competitive immuno-assay based on monoclonal antibodies for the detection of specific antibodies to pseudotuberculosis pathogen. *Clin. Lab. Diagn.* 2003, **11**, 45–47.
- Daohong Z., Peiwu L., Qi Z., Wen Z., Yanling H., Xiaoxia D., Jun J.: Production of ultrasensitive generic monoclonal antibodies against major aflatoxins using a modified two step screening procedure. *Anal. Chim. Acta.* 2009, **636**, 63–69.
- Foord A.J., Muller J.D., Yu M., Wang L.F., Heine H.G.: Production and application of recombinant antibodies to foot-and-mouth disease virus non-structural protein 3ABC. *J. Immunol. Met.* 2007, **321**, 142–151.
- Chen S., Li S., Sun H., Li Y., Ji S., Song K., Zhang L., Luo Y., Sun Y., Ma J., Liu P., Qiu H.J.: Expression and characterization of a recombinant porcine antibody against the E2 protein of classical swine fever virus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018, **102**, 961–970.
- Yang S., Shang Y., Yin S., Tian H., Chen Y., Sun S., Jin Y., Liu X.: Selection and identification of single-domain antibody fragment against capsid protein of porcine circovirus type 2 (PCV2) from *C. bactrianus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2014, **160**, 12–19.
- Yang S., Shang Y., Yin S., Wang D., Cai J., Gong Z., Serge M., Liu X.: A phage-displayed single domain antibody fused to alkaline phosphatase for detection of porcine circovirus type 2. *J. Virol. Met.* 2015, **213**, 84–92.
- Li B., Ye J., Lin Y., Wang M., Jia R., Zhu J.: Selection and characterization of single-chain recombinant antibodies against phosphoprotein of Newcastle disease virus. *Biologicals* 2014, **42**, 285–289.
- Joensu J., Brown K., Conley A., Clavijo A., Menassa R., Brandle J.: Expression and purification of an anti-foot-and-mouth disease virus single chain variable antibody fragment in tobacco plants. *Transgenic Res.* 2009, **18**, 685–696.
- Bhatia S., Gangil R., Gupta D.S., Sood R., Pradhan H., Dubey S.: Single-chain fragment variable antibody against the capsid protein of bovine immunodeficiency virus and its use in ELISA. *J. Virol. Met.* 2010, **167**, 68–73.
- Miyamoto K., Shimamoto T., Aosasa M., Kimura S., Nakamura N., Okubo Y., Yokoyama T., Horiuchi H., Furusawa S., Matsuda H.: Development of recombinant chicken IgY from single chain fragment of variable region for diagnosis of BSE. *Biologicals* 2007, **35**, 31–34.
- Deb R., Chakraborty S., Veeragowda B., Verma A.K., Tiwari R., Dharma K.: Monoclonal antibody and its use in the diagnosis of livestock diseases. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2013, **4**, 50–62.
- Kunert R., Reinhart D.: Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 2016, **100**, 3451–3461.
- Frenzel A., Hust M., Schirrmann T.: Expression of recombinant antibodies. *Front Immunol.* 2013, **4**, 217.10.3389/fimmu.2013.00217,

35. Bustamante-Córdova L., Melgoza-González E.A., Hernández J.: Recombinant antibodies in veterinary medicine: An update. *Front. Vet. Sci.* 2018, **5**, 175, doi: 10.3389/fvets.2018.00175.
36. Sosińska-Mielcarek K., Jassem J.: Przeciwciała monoklonalne w leczeniu nowotworów litych. *Onkologia w Praktyce Klinicznej* 2005, **1**, 225–232.
37. Green M.C., Murray J.L., Hortobagyi G.N.: Monoclonal antibody therapy for solid tumors. *Cancer Treat. Rev.* 2000, **26**, 269–286.
38. Jain M., Kamal N., Batra S.K.: Engineering antibodies for clinical applications. *Trends Biotechnol.* 2007, **25**, 307–316.
39. Kufer P., Lutterbüse R., Baeuerle P.A.: A revival of bispecific antibodies. *Trends Biotechnol.* 2004, **22**, 238–244.
40. Mueller X.M.: Drug immunosuppression therapy for adult heart transplantation. Part 1: immune response to allograft and mechanism of action of immunosuppressants. *Ann. Thorac. Surg.* 2004, **77**, 354–362.
41. Mahmud N., Klipa D., Ahsan N.: Antibody immunosuppressive therapy in solid-organ transplant. Part I. *MAbs* 2010, **2**, 148–156.
42. Yeung M.Y., Gabardi S., Sayegh M.H.: Use of polyclonal/monoclonal antibody therapies in transplantation. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2017, **17**, 339–352.
43. Serio L., Tovoli F.: Rheumatoid arthritis: new monoclonal antibodies. *Drugs Today* 2018, **54**, 219–230.
44. Bai F., Tian H., Niu Z., Liu M., Ren G., Yu Y., Sun T., Li S., Li D.: Chimeric anti-IL-17 full-length monoclonal antibody is a novel potential candidate for the treatment of rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 2014, **33**, 711–721.
45. Volz C., Pauly D.: Antibody therapies and their challenges in the treatment of age-related macular degeneration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015, **95**, 158–172.
46. Ozdemir C.: Monoclonal antibodies in allergy; updated applications and promising trials. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 2015, **9**, 54–65.
47. Landolina L., Levi-Schaffer F.: Monoclonal antibodies: the new magic bullets for allergy: IUPHAR Review 17. *Br. J. Pharmacol.* 2016, **173**, 793–803.
48. Gonzales A.J., Humphrey W.R., Messamore J.E., Fleck T.J., Fici G.J., Shelly J.A., Teel J.F., Bammert G.F., Dunham S.A., Fuller T.E., McCall R.B.: Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 2013, **24**, 48–53.
49. Gliński Z., Wernicki A.: Przeciwciała monoklonalne – właściwości i zasady otrzymywania. *Medycyna Weter.* 1981, **41**, 587–589.
50. Jar A.M., Osorio F.A., López O.J.: Mouse x pig chimeric antibodies expressed in Baculovirus retain the same properties of their parent antibodies. *Biotechnol. Prog.* 2009, **25**, 516–523.
51. Ooms K., Van Gorp H., Botti S., Van Gaever T., Delputte P.L., Nauwincq H.J.: Evaluation of viral peptide targeting to porcine sialoadhesin using a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccination-challenge model. *Virus Res.* 2013, **177**, 147–155.
52. Subramaniam S., Cao D., Tian D., Cao Q.M., Overend C., Yugo D.M., Matzinger S.R., Rogers A.J., Heffron C.L., Catanzaro N., Kenney S.P., Opriessnig T., Huang Y.W., Labarque G., Wu S.Q., Meng X.J.: Efficient priming of CD4⁺ T cells by Langerin-expressing dendritic cells targeted with porcine epidemic diarrhea virus spike protein domains in pigs. *Virus Res.* 2017, **227**, 212–219.
53. Chai Z., Fu F., Jiang F., Tian H., Wang Z., Zheng N., Zhang X., Wang X., Li X.: Development of a neutralizing mouse-pig chimeric antibody with therapeutic potential against *Haemophilus parasuis* in Pichia pastoris. *FEMS Microbiol. Lett.* 2014, **354**, 85–91.
54. Sahagun-Ruiz A., Velazquez L.V., Bhaskaran S., Jay C.M., Morales-Salinas E., Rathore K., Wagner G.G., Waghela S.D.: Reduction of enterotoxin induced fluid accumulation in ileal loops of neonatal calves with anti-F5 fimbriae recombinant antibody. *Vet. Res. Commun.* 2015, **39**, 229–236.
55. Wieland W.H., Lammers A., Schots A., Orzáez D.V.: Plant expression of chicken secretory antibodies derived from combinatorial libraries. *J. Biotechnol.* 2006, **122**, 382–391.
56. Wang M., Zhang Y., Li B., Zhu J.: Construction of scFv that bind both fibronectin-binding protein A and clumping factor A of *Staphylococcus aureus*. *Res. Vet. Sci.* 2015, **100**, 109–114.
57. Salazar G., Zhang N., Fu T.M., An Z.: Antibody therapies for the prevention and treatment of viral infections. *Vaccines* 2017, **2**, doi: 10.1038/s41541-017-0019-3.
58. Ohlin M., Soderberg-Naucler C.: Human antibody technology and the development of antibodies against cytomegalovirus. *Mol. Immunol.* 2015, doi:10.1016/j.molimm.2015.02.026.
59. Meng W., Pan W., Zhang A.J.X., Li Z., Wei G., Feng L.: Rapid generation of human-like neutralizing monoclonal antibodies in urgent preparedness for influenza pandemics and virulent infectious diseases. *PLoS ONE* 2013, **8**, e66276.
60. Zhou T., Georgiev I., Wu X., Yang Z.Y., Dai K., Finzi A.: Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* 2010, **329**, 811–817.
61. Wilfred E., Marissen R., Kramer A., Rice A., Weldon W.C., Niezgodna M., Faber M., Sloopstra J.W., Meloen R.H., van der Horst M.C., Visser T.J., Jongeneelen M., Thijssse S., Throsby M., de Kruijff J., Rupprecht C.E., Dietzschold B., Goudsmit J., Bakker A.B.H.: Novel rabies virus-neutralizing epitope recognized by human monoclonal antibody: fine mapping and escape mutant analysis. *J. Virol.* 2005, **79**, 4672–4678.
62. Turki I., Hammami A., Kharmachi H., Mousli M.: Engineering of a recombinant trivalent single-chain variable fragment antibody directed against rabies virus glycoprotein improved neutralizing potency. *Mol. Immunol.* 2014, **57**, 66–73.
63. Salomoni A., Foglierini M., Agatic G., Vanzetta F., Vallentir R., Lepelletier A., Bentley E., Weiss R., Cattoli G., Capua I., Sallusto F., Wright E., Lanzavecchia A., Bourhy H., Corti D.: Development of broad-spectrum human monoclonal antibodies for rabies post-exposure prophylaxis. *EMBO J.* 2016, <https://doi.org/10.15252/emmm.201505986>.
64. Williams K.L., Sukupolvi-Petty S., Johnson M.B.S., Sallusto F., Lanzavecchia A., Diamond M.S., Harris E.: Therapeutic efficacy of antibodies lacking Fc-gamma receptor binding against lethal dengue virus infection is due to neutralizing potency and blocking of enhancing antibodies. *PLoS Pathog.* 2013, **9**, e1003157.
65. Ramadhany R.I., Sasaki T., Ono K., Ramasoota P., Ikuta K., Kurosu T.: Antibody with an engineered Fc region as a therapeutic agent against dengue virus infection. *Antiviral Res.* 2015, **124**, 61–68.
66. Elert E.: Calling cells to arms. *Nature* 2013, **504**, 2–3.
67. Anderson K.L., Modiano J.F.: Progress in adaptive immunotherapy for cancer in companion animals: success on the path to a cure. *Vet. Sci.* 2015, **2**, 363–387.
68. Green M.C., Murray J.L., Hortobagyi G.N.: Monoclonal antibody therapy for solid tumors. *Cancer Treat. Rev.* 2000, **26**, 269–286.
69. Powroźnik B., Kubowicz P., Pękala E.: Przeciwciała monoklonalne w terapii celowanej. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2012, **66**, 663–673.
70. Atignani A., Fitzgerald D.: Immunotoxins: The role of the toxin. *Toxins (Basel)* 2013, **5**, 1486–1502.
71. Akbari B., Farajnia S., Khosroshahi S., Safari F., Yousefi M., Darjushajad H., Rahbarnia L.: Immunotoxins in cancer therapy: review and update. *Int. Rev. Immunol.* 2017, **36**, 207–219.
72. Allahyari H., Heidari S., Ghangosha M., Saffarian P., Amani J.: Immunotoxin: A new tool for cancer therapy. *Tumor Biol.* 2017, **39**, doi: 10.1177/1010428317692226.
73. Bush S.: Monoclonal antibodies conjugated with radioisotopes for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Semin. Oncol. Nurs.* 2002, **18**, suppl. 1, 16–21.
74. Kawashima H.: Radioimmunotherapy: A specific treatment protocol for cancer by cytotoxic radioisotopes conjugated to antibodies. *Sci. World J.* 2014, doi: 10.1155/2014/492061.
75. Bethge W., Wilbur D.S., Storb R., Hamlin D.K., Santos E.B., Brechbiel M.W., Sandmaier B.M.: Radioimmunotherapy with bismuth-213 as conditioning for nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in dogs: A dose de-escalation study. *Transplantation* 2004, **78**, 352–359.
76. Burtner C., Chandrasekaran D., Santos E., Beard B., Adair J., Hamlin D., Wilbur D.S., Sandmaier B., Kiem H.P.: 211 astatine-conjugated monoclonal CD45 antibody-based nonmyeloablative conditioning for stem cell gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 2015, **26**, 399–406.
77. Janice M.R., Vija E.V.R.: Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007, **6**, 349–356.
78. Hansel T.T., Kropshofer H., Singer T., Mitchell J.A., George A.J.: The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, **9**, 325–338.
79. Seimetz D.: Novel monoclonal antibodies for cancer treatment: the trifunctional antibody Catumaxomab (Removab). *J. Cancer* 2011, **2**, 309–309.
80. Ito D., Brewer S., Modiano J.F., Beall M.J.: Development of a novel anti-canine CD20 monoclonal antibody with diagnostic and therapeutic potential. *Leuk. Lymphoma* 2015, **56**, 219–225.
81. Coulson A., Levy A., Gossell-Williams M.: Monoclonal antibodies in cancer therapy: mechanisms, successes and limitations. *West Indian Med. J.* 2014, **63**, 650–654.
82. Chanprapaph K., Vachiramon V., Rattanakaemakorn P.: Epidermal growth factor receptor inhibitors: A review of cutaneous adverse events and management. *Dermatol. Res. Pract.* 2014, doi: 10.1155/2014/734249.
83. Singer J., Fazekas J., Wang W., Weichselbaumer M., Matz M., Mader A., Steinfellner W., Meitz S., Mechtcheriakova D., Sobanov Y., Willman M., Stocker T., Spillner E., Kunert R., Jensen-Jarolim E.: Generation of a canine anti-EGFR (ErbB-1) antibody for passive immunotherapy in dog cancer patients. *Mol. Cancer Ther.* 2014, **13**, 1777–1790.
84. Meadows K.L., Hurwitz H.I.: Anti-VEGF therapies in the clinic. *Cold Spring Harb. Prospect. Med.* 2012, **2**, doi: 10.1101/cshperspect.a006577
85. Horssen van R., Hagen ten T.L.M., Eggermont A.M.M.: TNF- α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *The Oncologist* 2006, **11**, 397–408.
86. Burton E.R., Libutti S.K.: Targeting TNF- α for cancer therapy. *J. Biol.* 2009, **8**, 95. doi:10.1186/jbiol189.
87. Lipman N.S., Jackson L.R., Trudel J.J., Weis-Garcia F.: Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications and information resources. *ILAR J.* 2005, **46**, 258–268.

88. Chelius D., Ruf P., Gruber P., Ploscher M. Riedtke R., Gansberger E., Hess J., Wasilu M., Lindhofer H.: Structural and functional characterization of the trifunctional antibody Catumaxomab. *MABs* 2010, **2**, 309–319.
89. Nagorsen D., Baeuerle P.A.: Immunomodulatory therapy of cancer with T cell-engaging BiTE antibody Binatumomab. *Exp. Cell Res.* 2011, **317**, 1255–1260.
90. Krishnamurthy A., Jimeno A.: Bispecific antibodies for cancer therapy: A review. *Pharmacol. Ther.* 2018, **185**, 122–134.
91. Sharma P., Allison J.P.: The future of immune checkpoint therapy. *Science* 2015, **348**, 56–61.
92. Nemoto Y., Shosu K., Okuda M., Noguchi S., Mizuno T.: Development and characterization of monoclonal antibodies against canine PD-1 and PD-L1. *Vet. Immunol.* 2018, **198**, 19–25.
93. Singer J., Jensen-Jarolim E.: IgE-based immunotherapy of cancer – a comparative oncology approach. *J. Carcinog. Mutagen.* 2014, **5**, doi: 10.4172/2157–2518.1000176.
94. Leoh L.S., Daniels-Wells T.R., Peniche M.L.: IgE immunotherapy against cancer. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.* 2015, **388**, 109–149.
95. Liu L., Li Y.: The unexpected side effects and safety of therapeutic monoclonal antibodies. *Drugs Today* 2014, **50**, 33–50.
96. Hansel T.T., Kropshofer H., Singer T., Mitchell J.A., George A.J.T.: The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature Rev. Drug Discov.* 2010, **9**, 325–338.

Prof. zw. dr hab. mgr Zdzisław Gliński, e-mail: zgliński@o2.pl