

Received: 2003.09.12

Accepted: 2003.12.22

Published: 2004.03.05

## Zastosowanie metody phage display w eksperymentalnej terapii onkologicznej

### Phage display technology and its application to experimental oncological therapy

Jan Borysowski<sup>1</sup>, Andrzej Górski<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Immunologii Klinicznej Instytutu Transplantologii Akademii Medycznej w Warszawie

<sup>2</sup>Laboratorium Bakteriofagowe, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirsfelda we Wrocławiu

#### Streszczenie

Jednym z największych wyzwań współczesnej onkologii jest dostarczanie leków selektywnie do komórek nowotworowych lub śródbłónka naczyń guza. Można w tym celu zastosować peptydy wiążące określone molekuly występujące na tych komórkach. Metodą najczęściej stosowaną do ich otrzymywania jest phage display. Uzyskane dzięki niej peptydy mogą wywierać działanie przeciwnowotworowe dzięki hamowaniu angiogenezy, zmniejszaniu aktywności metastatycznej nowotworu czy blokowaniu enzymów, których aktywność jest niezbędna w progresji guza. Znalazły one również zastosowanie jako składniki szczepionek przeciwnowotworowych oraz nośniki „dostarczające” do nowotworu cytokiny, chemioterapeutyki i oligonukleotydy antysensowne. Metoda phage display umożliwia też uzyskanie rekombinowanych przeciwciał o działaniu przeciwnowotworowym. Najczęściej są one stosowane w formie scFv. Do cząsteczek scFv można również wprowadzać określone zmiany w celu zwiększenia ich powinowactwa i zachłanności oraz łączyć je z molekułami indukującymi przeciwnowotworowe funkcje efektorowe.

#### Słowa kluczowe:

phage display • terapia przeciwnowotworowa • peptydy • rekombinowane przeciwciała • scFv

#### Summary

One of the biggest challenges facing modern oncology is that of delivering drugs selectively to cancer cells and tumor endothelial cells. To achieve this goal, one can use peptides binding certain molecules on these cells. The most often used method of creating such peptides is phage display. Peptides obtained from phage display technology can exert anti-cancer effect by inhibiting angiogenesis, decreasing tumor metastatic activity, or inhibiting enzymes important for neoplastic cell spread. They can also be used as components of anti-tumor vaccines or vehicles delivering cytokines, chemotherapeutics, or anti-sense oligonucleotides to tumors. Phage display technology has also enabled the development of anti-cancer recombinant antibodies, most often used as scFv molecules. ScFv-s can be further modified to increase their affinity and avidity. They can also be conjugated with molecules inducing different anti-cancer effector functions.

#### Key words:

phage display • anti-cancer therapy • peptides • recombinant antibodies • scFv

#### Full text PDF:

[http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_58/4834.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/4834.pdf)

#### Word count:

5427

#### Tables:

-

#### Figures:

-

#### References:

59

#### Adres autorów:

Iek. Jan Borysowski, Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Transplantologii AM, ul. Nowogrodzka 59, 02-006 Warszawa, e-mail: wieslawa\_lojek@poczta.onet.pl

Wykaz stosowanych skrótów:

**BF** – bakteriofagi, **CDR3** – region determinujący dopasowanie 3 (complementarity determining region 3), **Fab** – fragment wiążący antygen (fragment antigen binding), **FDA** – Agencja ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration), **VEGF** – czynnik wzrostowy śródbłonka naczyniowego (vascular endothelial growth factor), **VEGFR** – receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (vascular endothelial growth factor receptor), **FGF2** – czynnik wzrostowy fibroblastów 2 (fibroblast growth factor 2), **IL-12** – interleukina 12 (interleukin - 12), **PDP** – peptydy uzyskane metodą phage display (phage display peptides), **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana przez mitogen (mitogen-activated protein kinase), **MMP** – metaloproteinazy macierzy (matrix metalloproteinases), **MT-SP1** – błonowa proteaza serynowa 1 (membrane-type serine protease 1), **PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy (polymerase chain reaction), **PM** – przeciwciało monoklonalne, **scFv** – jednołańcuchowy fragment Fv (single-chain Fv), **SCID** – ciężki złożony niedobór odporności (severe combined immunodeficiency syndrome), **TGF-β** – transformujący czynnik wzrostu beta (transforming growth factor beta), **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworu alfa (tumor necrosis factor alpha), **tTF** – skrócona forma czynnika tkankowego (truncated tissue factor), **VH** – część zmienna łańcucha ciężkiego (heavy-chain variable region), **VL** – część zmienna łańcucha lekkiego (light-chain variable region)

## WSTĘP

Dla zwiększenia skuteczności terapii onkologicznej podstawowe znaczenie ma dostarczanie środków terapeutycznych bezpośrednio do komórek nowotworowych lub naczyń guza [26]. Molekułami umożliwiającymi selektywne oddziaływanie na określone cele w komórkach nowotworowych są przeciwciała monoklonalne (PM). Jak dotąd FDA (Food and Drug Administration) zatwierdziła do stosowania w onkologii pięć PM: Rituximab, Trastuzumab, Gemtuzumab ozogamicin, Alemtuzumab i Ibritumomab tiuxetun; wiele następnych znajduje się w trzeciej fazie badań klinicznych [57].

Przeciwciała monoklonalne mają niestety kilka wad znacznie ograniczających ich skuteczność terapeutyczną:

- 1) większość z nich jest pochodzenia mysiego, co indukuje odpowiedź humoralną (najczęściej skierowaną przeciw regionom stałym przeciwciała, rzadziej antyidiotypową),
- 2) wolny klirens osoczowy implikujący zwiększoną ekspozycję zdrowych narządów i ograniczający liczbę PM dostarczonych do nowotworu [5],
- 3) wielkość cząsteczki limitująca odpowiednią dystrybucję w obrębie guza,
- 4) nieswoiste pobieranie przez układ retikuloendotelialny wątroby, śledziony i szpiku [1].

W tym kontekście ciekawą alternatywę dla PM mogą stanowić peptydy wiążące komórki nowotworowe lub komórki śródbłonka [1] oraz rekombinowane przeciwciała w formacie scFv i Fab [30]. Najczęściej stosowaną metodą ich uzyskiwania jest technologia phage display [1, 21].

## METODA PHAGE DISPLAY

Istotą metody phage display jest wprowadzenie do genomu faga filamentowego określonej sekwencji DNA, co prowadzi do ekspresji kodowanego przez nią peptydu na powierzchni faga. Punktem wyjścia do roz-

woju technologii phage display była praca Smitha [54], który sklonował fragment sekwencji bakteryjnej endonukleazy EcoRI w środku genu kodującego białko kapsydowe pIII faga filamentowego f1 i wykazał, że:

- 1) białko fuzyjne pIII\*EcoRI jest wbudowywane w obręb wirionu,
- 2) fag częściowo zachowuje infekcyjność,
- 3) Eco RI prezentowane przez faga zachowuje pierwotną immunogenność, 4) fag taki może być wyizolowany spośród innych za pomocą przeciwciała wiążącego EcoRI.

W kolejnej pracy zaproponowano dwie ważne modyfikacje umożliwiające stworzenie biblioteki epitopów prezentowanych przez faga:

- 1) miejsce klonowania przesunięto w obręb sekwencji kodującej N-koniec pIII, co umożliwiło przywrócenie pełnej infekcyjności faga,
- 2) zastosowano fagi fd-tet zawierające segment transpozonu Tn10, kodujący oporność na tetracyklinę, co ułatwiło kontrolę propagacji fagów i umożliwiło ich mianowanie w jednostkach transdukujących oporność na tetracyklinę.

Stosując biotynylowane przeciwciała wyizolowano reaktywnego faga spośród  $10^8$  fagów typu dzikiego [42].

Wkrótce potem utworzono pierwsze bakteriofagowe biblioteki randomizowanych peptydów [52, 13, 12].

Dzięki zastosowaniu bibliotek fagowych można zidentyfikować peptyd stanowiący ligand określonej molekuly. Selekcja obejmuje trzy główne etapy:

- 1) inkubacja biblioteki fagowej z daną cząsteczką (tzw. panning),
- 2) usunięcie fagów niezwiązanych,
- 3) amplifikacja fagów wiążących określoną cząsteczkę w komórkach *E.coli*. Sekwencję aminokwasów w peptydzie określa się dzięki sekwencjonowaniu DNA faga [23].

**PEPTYDY UZYSKANE DZIĘKI METODZIE PHAGE DISPLAY**

Dzięki zastosowaniu metody phage display zidentyfikowano peptydy selektywnie wiążące śródbłonek w łożyskach naczyniowych różnych narządów myszy [43, 47], człowieka [3] oraz naczyń nowotworowych [49, 50]. Uzyskano np. cykliczny nonapeptyd selektywnie wiążący naczynia gruczołu sutkowego myszy – w tkance prawidłowej, hiperplastycznej oraz w obrębie raka sutka. Peptyd ten, po połączeniu z lekiem przeciwnowotworowym, może w przyszłości posłużyć do leczenia stanów przednowotworowych w obrębie gruczołu lub wczesnych postaci raka sutka [15].

Uzyskane dzięki metodzie phage display peptydy (PDP) wiążące komórki nowotworowe lub komórki śródbłonka mogą same wywierać działanie przeciwnowotworowe albo “dostarczać” do guza inne środki terapeutyczne.

**PDP o działaniu przeciwnowotworowym**

PDP można zastosować w celu zablokowania angiogenezy nowotworowej. Najważniejszym czynnikiem o działaniu proangiogennym jest VEGF (vascular endothelial growth factor). Zidentyfikowano dwa receptory VEGF: VEGFR1 oraz, zdecydowanie ważniejszy w procesie angiogenezy, VEGFR2. Zatem, zablokowanie interakcji między VEGF i VEGFR2 jest obiecującą metodą hamowania angiogenezy [7]. I tak, peptyd K237 swoiście wiążący domenę zewnątrzkomórkową VEGFR2 *in vitro* blokował wiązanie rozpuszczalnej postaci VEGFR2 do VEGF i zmniejszał VEGF-zależną proliferację komórek śródbłonka żyły pępowinowej o ponad 90%. K237 hamował również angiogenezę *in vivo*, a u myszy scid z ksenogenicznym rakiem sutka zmniejszył masę guza o 70% oraz zredukował liczbę przerzutów w płucach o 53% po podaniu miejscowym [18]. Podobnie heptapeptyd V1, wyizolowany z biblioteki fagowej z użyciem PM wiążących określony sacharyd [25], [16]). Jednym z węglowodanów najważniejszych w powstawaniu przerzutów jest sjalizowany Lewis X. Występuje on na powierzchni komórek różnych nowotworów wywodzących się z tkanki nabłonkowej; jego interakcja z selektynami umożliwia adhezję komórek nowotworowych do śródbłonka. Peptydomimetyk sjalizowanego Lewis X

PDP mogą również znaleźć zastosowanie w leczeniu przerzutów nowotworowych. Wykorzystać tu można peptydomimetyki węglowodanów biorących udział w powstawaniu przerzutów (peptydy takie można wyizolować z bibliotek fagowych za pomocą PM wiążących określony sacharyd [25], [16]). Jednym z węglowodanów najważniejszych w powstawaniu przerzutów jest sjalizowany Lewis X. Występuje on na powierzchni komórek różnych nowotworów wywodzących się z tkanki nabłonkowej; jego interakcja z selektynami umożliwia adhezję komórek nowotworowych do śródbłonka. Peptydomimetyk sjalizowanego Lewis X

blokował jego wiązanie do selektyny E, P i L oraz adhezję komórek nowotworowych do selektyny E *in vitro*. *In vivo*, peptyd znamiennie zmniejszał liczbę przerzutów syngenicznego czerniaka w płucach myszy C57BL/6 oraz przerzutów ksenogenicznego gruczolakoraka płuca u myszy nagich po podaniu dożylnym [16]. Również zastosowanie peptydomimetyków gangliozydu GD1, którego część węglowodanowa umożliwia powstawanie przerzutów chłoniaka RAW117-H10 u myszy, pozwoliło na zmniejszenie masy przerzutów w płucach o 100%, w wątrobie o 91%, a w śledzionie o 48,8% [25].

Peptydomimetyki określonych antygenów węglowodanowych (tzw. mimotopy) mogą być również użyte do tworzenia szczepionek przeciwnowotworowych [37]. Zastosowanie węglowodanów w takich szczepionkach napotyka na wiele trudności, ponieważ węglowodany są trudne do uzyskania w dużej ilości i przeważnie są antygenami T-niezależnymi, indukują jedynie krótkotrwałą odpowiedź humoralną [27]. Jednym ze sposobów na ominięcie tych trudności jest zastosowanie mimotopów. I tak, oktapeptyd odpowiadający jednemu z epitopów antygeny węglowodanowego Lewis Y indukował swoistą dla tego epitopu odpowiedź humoralną u królika i myszy. Mysie przeciwciała uzyskane dzięki immunizacji mimotopem wiązały zarówno rekombinowaną, jak i natywną postać Lewis Y w komórkach nowotworowych [34]. Surowica królika immunizowanego innym mimotopem znamiennie hamowała rozwój ksenogenicznego włókniakomięsaka oraz zmniejszała wielkość przerzutów w płucach u myszy nagich [44].

Kieber-Emmons i wsp. [26] zastosowali w charakterze mimotopów polipeptydy, których sekwencja obejmuje tandemowe powtórzenia tripeptydów “imitujących” epitopy różnych węglowodanów (powtórzenia tandemowe danego mimotopu mają indukować silniejszą odpowiedź humoralną oraz lepiej odpowiadać natywnym konfiguracjom nowotworowych antygenów węglowodanowych). Immunizacja myszy Balb/c polipeptydami, poprzedzająca podskórne podanie komórek syngenicznego mięsaka, znamiennie przedłużyła okres przeżycia myszy.

Bardzo ciekawym pomysłem terapeutycznym jest zastosowanie tzw. peptociał. Peptociało jest to białko fuzyjne, w którym określony peptyd determinujący swoistość wiązania jest połączony z pentameryczną domeną białka macierzy tkanki chrzęstnej (struktura homopentameryczna zwiększa zachłanność białka) [56]. Do syntezy peptociał zastosowano heksapeptydy selektywnie wiążące ErbB2. Wszystkie trzy peptociała wiązały rekombinowaną postać domeny zewnątrzkomórkowej ErbB2 oraz komórki raka sutka SK-BR-3

(linia o dużej ekspresji ErbB2), natomiast nie wiązały komórek nowotworowych ErbB2 – ujemnych. Peptociała znacznie hamowały proliferację komórek SK-BR-3 *in vitro* w stężeniu 0,28  $\mu\text{M}$  prawdopodobnie wskutek blokowania dimeryzacji ErbB2 lub działania częściowo agonistycznego wywieranego na ten receptor (w przypadku samych heksapeptydów w celu osiągnięcia porównywalnego działania niezbędne było znacznie większe ich stężenie – 70  $\mu\text{M}$ ). Peptociała powinny bardziej selektywnie od PM wiązać komórki nowotworowe z nadekspresją ErbB2 w porównaniu ze zdrowymi komórkami, gdyż wymagają większej gęstości receptorów na powierzchni komórki [20].

PDP mogą również znaleźć zastosowanie jako inhibitory określonych enzymów, których aktywność umożliwiłaby progresję nowotworu. I tak, Koivunen i wsp. [28] uzyskali dwa cykliczne dekapeptydy selektywnie blokujące aktywność niektórych metaloproteinaz macierzy – MMP (jest to rodzina enzymów biorących udział w naciekaniu tkanek przez komórki nowotworowe, w angiogenezie i powstawaniu przerzutów). Peptydy te silnie blokowały aktywność MMP-9 i MMP-2 nie wywierając żadnego wpływu na aktywność katalityczną trypsyny 2, elastazy neutrofilowej, katepsyny G, oraz innych enzymów z rodziny MMP (ma to istotne znaczenie, ponieważ nieswoiste inhibitory MMP wywołują poważne objawy niepożądane w czasie terapii przeciwnowotworowej). *In vitro*, dekapeptydy blokowały migrację komórek czterech różnych linii nowotworowych oraz komórek śródbłonka. U myszy bezgranicznych znacznie hamowały wzrost mięsaka Kaposiego i całkowicie blokowały rozwój raka sutka i raka jajnika [28].

PDP mogą być też ligandami określonych receptorów komórek nowotworowych, których pobudzenie indukuje apoptozę lub w inny sposób hamuje proliferację komórek. I tak, peptydy selektywnie wiążące błonowy receptor immunoglobulinowy IgM  $\lambda$  w komórkach chłoniaka Burkitta w postaci tetramerycznej indukowały swoiste dla tych komórek działanie cytotoksyczne dzięki krzyżowemu wiązaniu receptorów. Również tandemowa postać jednego z peptydów (utworzona przez dwa monomery zespolone 6 resztami glicynowymi) oraz postać dimeryczna stabilizowana wiązaniem dwusiarczkowym działały swoiście cytotoksycznie na komórki chłoniaka [48].

Koolpe i wsp. [29] zastosowali natomiast 12-aminokwasowy peptyd YSA, będący selektywnym agonistą receptora EphA2 (zwiększoną ekspresję tego receptora stwierdza się w różnych nowotworach oraz w naczyniach nowotworowych). Peptyd ten może hamować proliferację komórek nowotworowych, ponieważ aktywacja receptora EphA2 zmniejsza aktywność kinazy MAP.

## Koniugaty PDP

### Białka chimeryczne

Wykazano, że połączenie TNF- $\alpha$  z peptydem “kierującym” do śródbłonka naczyń nowotworowych 12-15 razy zwiększa działanie przeciwnowotworowe tej cytokiny u myszy po podaniu dootrzewnowym. Dzięki połączeniu z peptydem możliwe jest zatem obniżenie dawki TNF- $\alpha$  w celu uzyskania takiego samego efektu terapeutycznego. Jest to bardzo ważne, ponieważ kliniczne zastosowanie TNF- $\alpha$  jest obecnie ograniczone do podawania miejscowego, ze względu na znaczną toksyczność tej cytokiny [11].

Koniugat złożony z proapoptotycznego peptydu oraz PDP wiążącego śródbłonek naczyń nowotworowych *in vitro* działał o wiele bardziej cytotoksycznie na komórki mięsaka Kaposiego od ekwimolarnej mieszaniny niezwiązanych peptydów. U myszy nagich z ksenogenicznym rakiem sutka koniugat w sposób znamieny zwalniał rozwój guza, wydłużał czas przeżycia i zmniejszał liczbę przerzutów po podaniu dożylnym. Co więcej, nie działał on toksycznie nawet po stosowaniu przez 3 miesiące [14].

### Chemioterapia

Jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwnowotworowych jest doksorubicyna. Wykazano, że koniugaty doksorubicyny z peptydem “kierującym” do naczyń nowotworowych w większym stopniu hamowały rozwój guza, zmniejszały liczbę przerzutów i wydłużały czas przeżycia myszy nagich niż sama doksorubicyna. Ponadto koniugaty takie były mniej toksyczne dla wątroby i serca [2].

### Oligonukleotydy antysensowne

Heptapeptyd selektywnie wiążący komórki raka sutka po połączeniu przez mostek dwusiarczkowy z oligonukleotydami antysensownymi przeciw ErbB2 w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$ , w sposób znamieny zmniejszał ekspresję genu ErbB2 w komórkach nowotworowych *in vitro* (ilość produktu białkowego genu została zredukowana o 60%). Natomiast ani sam peptyd, ani oligonukleotydy antysensowne nie wpływały w sposób znamieny na ekspresję genu ErbB2 [53].

### Liposomy

Wykazano, że liposomy zawierające adriamycynę z wbudowanym pentapeptydem wiążącym śródbłonek naczyń nowotworowych, silniej hamowały wzrost dwóch różnych nowotworów u myszy Balb/c niż liposomy z adriamycyną pozbawione pentapeptydu i sama

adriamycyna [41]. Dzięki modyfikacji liposomów peptydem ogólna ilość dostarczonego do guza chemioterapeutyku jest tylko nieznacznie większa, więc prawdopodobnie efektywniejsze działanie przeciwnowotworowe zależy od dostarczenia większej ilości leku bezpośrednio do komórek śródbłonka naczyń nowotworowych [4].

#### Terapia genowa

Jednym z najważniejszych problemów ograniczających skuteczność terapii genowej jest mała selektywność wektorów. Można ją zwiększyć dzięki zastosowaniu ligandów wiążących komórki nowotworowe. Jednym z nich jest FGF2 wiążący komórki nowotworowe oraz komórki śródbłonka w naczyniach guzów. Ma on jednak poważne wady ograniczające możliwość zastosowania w terapii genowej (działanie mitogenne, mała stabilność w osoczu, wiązanie heparyn i białek osocza). Zaproponowano zatem zastosowanie heptapeptydu selektywnie wiążącego receptor FGF2, lecz niedziałającego mitogennie. Wykazano, że dodanie takiego peptydu do kompleksu poli-L-lizyna-DNA plazmidowe umożliwiło uzyskanie prawie 40-krotnie większej ekspresji badanego transgenu w komórkach czerniaka i 20-krotnie większej w embrjonalnych retinoblastach *in vitro* [35].

Bardzo istotne jest, że PDP mogą dostawać się do jąder komórek nowotworowych, komórek śródbłonka naczyń krwionośnych [45] i limfatycznych [31] w obrębie nowotworu. Takie peptydy mogą stanowić bardzo dobry wektor dla leków przeciwnowotworowych działających w jądrze komórkowym [31].

#### REKOMBINOWANE PRZECIWCIAŁA UZYSKANE DZIĘKI METODZIE PHAGE DISPLAY

Najmniejszą częścią przeciwciała zachowującą wyściową swoistość wiązania jest fragment Fv stanowiący połączenie domen zmiennych łańcucha lekkiego ( $V_L$ ) i ciężkiego ( $V_H$ ). Oddziaływania hydrofobowe między takimi domenami nie są dostatecznie silne, dlatego niezbędne jest kowalencyjne połączenie  $V_H$  i  $V_L$ . Najczęściej stosuje się w tym celu peptydowy łącznik długości 15-20 aminokwasów, a otrzymana cząsteczka to scFv (single-chain Fv, w polskim piśmiennictwie - jednołańcuchowe fragmenty Fv lub przeciwciała z jednego łańcucha).  $V_H$  i  $V_L$  mogą też być złączone wiązaniem dwusiarczkowym. Fragmenty Fab natomiast składają się z całego łańcucha lekkiego L i łańcucha Fd (są one stosowane rzadziej niż scFv) [8].

Obecnie najczęściej stosowaną metodą umożliwiającą selekcję rekombinowanych fragmentów przeciwciał *in vitro* jest phage display [21], [30]. W celu tworzenia

bibliotek rekombinowanych przeciwciał klonuje się wiele różnorodnych genów kodujących scFv bądź Fab w wektorze fagowym lub fagmidowym, tak że odpowiednie białko prezentowane jest na powierzchni faga; pożądane przeciwciało izoluje się na podstawie powinowactwa do określonego antygeny [30]. Wyróżnia się dwa główne rodzaje bibliotek: dziewicze i immunizowane. W bibliotekach dziewiczych geny części zmiennych przeciwciał uzyskuje się z obwodowych limfocytów B (szczególnym ich rodzajem są biblioteki syntetyczne, powstałe przy zastosowaniu metody PCR i zdegenerowanych primerów w celu zróżnicowania sekwencji ściśle określonych fragmentów przeciwciał – najczęściej CDR3). W bibliotekach immunizowanych geny te pochodzą od myszy immunizowanych odpowiednim antygenem [8].

Rekombinowane przeciwciała w postaci scFv i Fab mogą, podobnie jak PDP, same działać przeciwnowotworowo. Zaproponowano również dalsze modyfikacje ich cząsteczek oraz tworzenie przeciwciał bifunkcyjnych.

#### Rekombinowane przeciwciała o działaniu przeciwnowotworowym

W ostatnich latach uzyskano bardzo wiele scFv i Fab wiążących różne antygeny komórek nowotworowych i śródbłonka bądź białka ważne dla progresji nowotworu. Przykładem może być praca [58], opisująca scFv swoiście wiążące VEGF - V65. V65 neutralizowało VEGF-zależną angiogenezę *in vivo*. Podawane dotrzewnowo myszom nagim znacznie hamowało wzrost guzów rozwijających się z fibroblastów szczura transfekowanych onkogenem H-ras (nadekspresja tego onkogeny znacznie zwiększa syntezę VEGF).

Wykazano również skuteczność terapii genowej z użyciem genu innego scFv blokującego angiogenezę. Doguzowe podanie odpowiedniego plazmidu w znacznym stopniu zahamowało progresję ksenogenicznego włóknakiomęsaka u myszy nagich.

Dzięki zastosowaniu metody phage display można również uzyskać scFv będące selektywnymi inhibitorami określonych enzymów. I tak, Sun i wsp. [55] opisali 5 różnych scFv, wiążących centrum aktywne błonowej proteazy serynowej 1 (MT-SP1), której aktywność proteolityczna ma podstawowe znaczenie w procesie naciekania przez nowotwór zdrowych tkanek i powstawania przerzutów. Wszystkie scFv silnie i wysoce selektywnie blokowały aktywność MT-SP1.

Bardzo obiecującą metodą terapeutyczną jest zastosowanie tzw. intraciał, czyli rekombinowanych przeciw-

ciał ulegających ekspresji we wnętrzu komórek.

Intracjalia mogą inaktywować wiązane białka przez blokowanie ich naturalnych interakcji lub niedopuszczanie do przyjęcia właściwej lokalizacji w obrębie komórki. Bardzo trudno jest jednak uzyskać właściwą konformację intracjaliał w cytoplazmie [8, 23].

ScFv nie jest jednak idealnym formatem rekombinowanego przeciwciała. Główne jego wady są następujące:

1. Niedostateczna zachłanność wskutek budowy monomerycznej,
2. Zbyt mała cząsteczka (~ 30 kDa) i wynikający stąd zbyt szybki klirens osoczowy,
3. Zmniejszone w porównaniu z PM powinowactwo do danego antygeny.

W cząsteczkach scFv wprowadza się zatem określone modyfikacje [21, 8].

#### **Modyfikacje cząsteczek scFv**

##### *Zwiększanie powinowactwa scFv*

Dzięki zastosowaniu różnych metod genetyki molekularnej i odpowiedniej selekcji możliwe jest wielokrotne zwiększenie powinowactwa scFv do określonego antygeny [19]. Wykazano np., że zwiększenie powinowactwa scFv wiążącego domenę ED-B fibronektyny (swoisty marker naczyń nowotworowych) zwiększa jego akumulację w obrębie guza [59]. Jednak przeciwciało o zbyt dużym powinowactwie może słabiej indukować pewne funkcje efektorowe, np. cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciała [22].

##### *Zwiększanie zachłanności scFv*

W celu zwiększenia zachłanności monomerycznej scFv łączy się za pomocą białkowych domen adhezyjnych lub łączników peptydowych tworząc dimery, trimery i tetramery (dodatkową zaletą zwiększania walentności jest zwiększenie wielkości cząsteczki, a co za tym idzie - zwolnienie klirensu osoczowego) [21, 8].

Najprostszą postacią bivalentnego dimerycznego scFv jest tzw. diacjalia, w którym 5-aminokwasowy łącznik między domenami  $V_H$  i  $V_L$  obu scFv uniemożliwia liniowe połączenie się domen V w pojedynczy moduł Fv i prowadzi do asocjacji dwóch cząsteczek scFv. Diacjalia takie mają dwa miejsca wiążące antygen [21]. Szczególną postacią diacjaliał jest diacjalia biswoiste (wiążące dwa różne epitopy antygenowe). Nettelbeck

i wsp. [38] wykazali, że biswoiste diacjalia wiążące endoglinę (składnik kompleksu receptora TGF- $\beta$  o zwiększonej ekspresji na komórkach śródbłonna naczyń nowotworowych) i jedno z białek kapsydu adenowirusa, sześciokrotnie zwiększało efektywność endoglinozależnej adenowirusowej transdukcji komórek śródbłonna. Co więcej, transdukcja komórek śródbłonna była niezależna od "naturalnego" receptora adenowirusowego, którego obecność w wielu rodzajach komórek determinuje objawy niepożądane związane z adenowirusową terapią genową, a mała ekspresja w komórkach nowotworowych oraz komórkach śródbłonna zmniejsza efektywność terapii.

Istnieją też inne sposoby na połączenie dwóch scFv w jedną cząsteczkę biswoistą. Jedną z możliwości przedstawiona jest w pracy Mc Call i wsp. [35], którzy zespolili C6.5 (scFv przeciw HER2/neu) z scFv swoiście wiążącym Fc $\gamma$ RIII (NM3E2) 20-aminokwasowym łącznikiem. U myszy scid stwierdzono bardziej selektywną retencję białka w obrębie guza w porównaniu do zdrowych tkanek niż w przypadku samego C6.5. Białko biswoiste *in vitro* znacznie efektywniej stymulowało leukocyty krwi obwodowej do lizy komórek HER2/neu-dodatnych od mieszaniny niezłączonych NM3E2 i C6.5. Warto dodać, że C6.5\*NM3E2 jest pierwszym biswoistym scFv o całkowicie ludzkim pochodzeniu.

#### **Rekombinowane przeciwciała bifunkcjonalne**

W rekombinowanych przeciwciałach bifunkcyjnych scFv bądź Fab, determinujące swoistość wiązania, połączone jest z określoną domeną odpowiedzialną za działanie przeciwnowotworowe [21].

Nilsson i wsp. [40] połączyli L 19 (scFv swoiście wiążące domenę ED-B fibronektyny) ze skróconą formą czynnika tkankowego (tTF). U myszy nagich po podaniu dożylnym scFv(L19)-tTF znamienne zahamowało wzrost trzech różnych nowotworów; w przypadku mięsaka FE8 po podaniu dożylnym jedynie 3 dawek stwierdzono całkowitą regresję guza u 30% myszy (wyniki te są tym bardziej zachęcające, że mięsak ten jest nowotworem opornym na tradycyjną chemioterapię). Mechanizm działania scFv(L19)-tTF polega na indukowaniu zakrzepicy selektywnie w naczyniach guza; u badanych myszy nie stwierdzono żadnych zmian histopatologicznych w zdrowych narządach.

Zaproponowano również połączenie L19 z domenami p40 i p35 IL-12 (cytokina ta ma silne właściwości immunostymulujące i przeciwingiogenne, jednak jej kliniczne zastosowanie znacznie ograniczają objawy toksyczne). U myszy immunokompetentnych 129Sv

takie białko fuzyjne znacznie silniej hamowało wzrost dwóch różnych rodzajów nowotworów od samej IL-12, nawet gdy dawka cytokiny była dwudziestokrotnie większa. Natomiast u myszy BALB/c IL-12-L19 czterokrotnie zmniejszyło masę przerzutów raka jelita grubego w płucach w porównaniu do samej cytokiny [17].

Chowdhury i wsp. [9] zastosowali rekombinowaną immunotoksynę stanowiącą połączenie skróconej postaci bakteryjnej egzotoksyny A oraz scFv przeciw mezotelinie. Stwierdzono wysoce selektywne działanie cytotoksyczne immunotoksyny *in vitro* na komórki mezotelinododatnie. U myszy nagich trzy dożylne dawki immunotoksyny spowodowały regresję guza. Lorimer i wsp. [33] wykazali, że immunotoksyny zawierające sFv mogą działać bardziej cytotoksycznie od dawniej stosowanych postaci, w których toksynę bakteryjną łączono z całą cząsteczką PM.

Bardzo cennym środkiem terapeutycznym umożliwiającym dostarczanie do wnętrza komórek leków, toksyn, czy DNA są przeciwciała wiążące określone receptory i ulegające receptorozależnej endocytozie [46].

W celu uzyskania takich przeciwciał z bibliotek fagowych zaproponowano połączenie selekcji na żywych komórkach mających określony receptor z "odzyskiwaniem" internalizowanych BF z lizatów komórkowych [6].

Dzięki zastosowaniu tej metody wyizolowano F5 – scFv swoiście wiążące ErbB2 i ulegające ErbB2-zależnej endocytozie [46]. F5 zespolone z liposomami zawierającymi dokсорubicynę zachowało zdolność

swoistej, receptorozależnej endocytozy w komórkach ErbB2-dodatnich. U myszy nagich immunoliposomy podawane dożylnie indukowały znamienne większą regresję nowotworu od liposomów pozbawionych F5 (rak sutka BT474 z nadekspresją ErbB2) [39].

Li i wsp. [32] zaproponowali z kolei dwa różne sposoby wprowadzania za pomocą scFv egzogenego DNA do komórek nowotworowych *in vitro*. W pierwszej metodzie komórki SKBR3 transfekowano plazmidowym DNA obejmującym gen reporterowy lucyferazy z użyciem białka fuzyjnego, będącego połączeniem ML39 (scFv swoiście wiążące ErbB2) i skróconej postaci protaminy (aminokwasy 8-29); w drugiej natomiast zastosowano kompleksy zawierające plazmidowe DNA, protaminę, ML39 oraz kationowy lipid Dotap. Zaletą pierwszej metody jest znaczna selektywność transfekcji, której ogólna efektywność jest jednak niewielka. W drugiej natomiast – zwiększonej ogólnej efektywności transfekcji towarzyszy zmniejszona selektywność (prawdopodobnie skutek niedostatecznej ekspresji ML39 na powierzchni kompleksu).

## PODSUMOWANIE

Metoda phage display umożliwiła uzyskanie wielu peptydów oraz rekombinowanych przeciwciał selektywnie wiążących różne antygeny komórek nowotworowych i śródbłonka naczyń guzów. W licznych badaniach przeprowadzonych na modelach zwierzęcych wykazały one bardzo znaczną aktywność przeciwnowotworową. Stwarza to nadzieję na wprowadzenie w przyszłości do onkologii klinicznej nowych środków terapeutycznych wybiórczo niszczących komórki nowotworowe.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Aina O.H., Sroka T.C.: Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers* 2002, 66, 184-189.
- [2] Arap W., Pasqualini R.: Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 1998, 279, 377-380.
- [3] Arap W., Kolonin M.G.: Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nat. Med.* 2002, 8, 121-127.
- [4] Asai T., Shimizu K.: Anti-neovascular therapy by liposomal DPP-CNDAC targeted to angiogenic vessels. *FEBS Lett.* 2002, 520, 167-170.
- [5] Batra S.K., Jain M.: Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002, 13, 603-608.
- [6] Becerril B., Poul M-A.: Toward selection of internalizing antibodies from phage libraries. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 255, 386-393.
- [7] Binetruy-Tournaire R., Demangel C.: Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *EMBO J.* 2000, 19, 1525-1533.
- [8] Chames A., Baty D.: Antibody engineering and its applications in tumor targeting and intracellular immunization. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000, 189, 1-8.
- [9] Chowdhury P.S., Viner J.L.: Isolation of a high affinity stable single-chain Fv specific for mesothelin from DNA-immunized mice by phage display and construction of a recombinant immunotoxin with anti-tumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998, 95, 669-674.
- [10] Cooke S.P., Boxer G.M.: A strategy for antitumor vascular therapy by targeting the vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 2001, 61, 3653-3659.
- [11] Curnis F., Sacchi A.: Enhancement of tumor necrosis factor  $\alpha$  antitumor immunotherapeutic properties by targeted delivery to aminopeptidase N (CD13). *Nat. Biotechnol.* 2000, 18, 1185-1190.
- [12] Cwirla S.E.: Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990, 87, 6378-6382.
- [13] Devlin J.J.: Random peptide libraries: A source of specific protein binding molecules. *Science* 1990, 249, 404-406.
- [14] Ellerby H.M., Arap W.: Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat. Med.* 1999, 5, 1032-1038.
- [15] Essler M., Ruoslahti E.: Molecular specialization of breast vasculature: a breast homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001, 99, 2252-2257.
- [16] Fukuda M.N., Ohya C.: A peptide mimic of E-selectin ligand inhibits sialyl Lewis X-dependent lung colonization of tumor cells. *Cancer Res.* 2000, 60, 450-456.

- [17] Halin C., Rondini S.: Enhancement of the antitumor activity of interleukin-12 by targeted delivery to neovasculature. *Nat. Biotechnol.* 2002, 20, 264-269.
- [18] Hetian L., Ping A.: A novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 43137-43142.
- [19] Hoogenboom H., Chames P.: Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol. Today* 2000, 21, 371-378.
- [20] Houimel M., Schneider P.: Selection of peptides and synthesis of pentameric peptabody molecules reacting specifically with ErbB-2 receptor. *Int. J. Cancer* 2001, 92, 748-755.
- [21] Hudson P.J.: Recombinant antibody constructs in cancer therapy. *Curr. Opin. Immunol.* 1999, 11, 548-557.
- [22] Huls G., Gestel D.: Tumor cell killing by *in vitro* affinity-matured recombinant human monoclonal antibodies. *Cancer Immunol. Immunother.* 2001, 50, 163-171.
- [23] Hyland S., Beerli R.: Generation and functional characterization of intracellular antibodies interacting with the kinase domain of human EGF receptor. *Oncogene* 2003, 22, 1557-1567.
- [24] Irving M.B., Pan O.: Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2001, 5, 314-324.
- [25] Ishikawa D., Kikkawa H.: GD1 $\alpha$ -replica peptides functionally mimic GD1 $\alpha$ , an adhesion molecule of metastatic tumor cells, and suppress the tumor metastasis. *FEBS Lett.* 1998, 441, 20-24.
- [26] Jain R.K.: The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nat. Med.* 1998, 4, 655-657.
- [27] Kieber-Emmons T., Luo P.: Vaccination with carbohydrate peptide mimotopes promotes anti-tumor responses. *Nat. Biotechnol.* 1999, 17, 660-665.
- [28] Koivunen E., Arap W.: Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat. Biotechnol.* 1999, 17, 768-774.
- [29] Koolpe M., Dail M.: An ephrin mimetic peptide that selectively targets the EphA2 receptor. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 46974-46979.
- [30] Kretschmar T., von Rűden T.: Antibody discovery: phage display. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002, 13, 598-602.
- [31] Laakkonen P., Porkka K.: A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels. *Nat. Med.* 2002, 8, 751-755.
- [32] Li X., Stuckert P.: Single-chain antibody mediated gene delivery into ErbB2-positive human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther.* 2001, 8, 555-565.
- [33] Lorimer J.A., Keppler-Hafkemeyer A.: Recombinant immunotoxins specific for a mutant epidermal growth factor receptor: targeting with a single chain antibody variable domain isolated by phage display. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996, 93, 14815-14820.
- [34] Lou Q., Pastan I.: A Lewis Y epitope mimicking peptide induces anti-Lewis Y immune response in rabbit and mice. *J. Pept. Res.* 1999, 53, 252-260.
- [35] Maruta F., Parker A.L.: Identification of FGF receptor binding peptides for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 2002, 9, 543-552.
- [36] McCall A.M., Adams G.P.: Isolation and characterization of an anti-CD16 single-chain Fv fragment and construction of an anti-HER2/neu/anti-CD16 bispecific scFv that triggers CD16-dependent tumor cytotoxicity. *Mol. Immunol.* 1999, 36, 433-446.
- [37] Monzavi-Karbassi B., Cunto-Amesty G.: Peptide mimotopes as surrogate antigens of carbohydrates in vaccine discovery. *Trends Biotechnol.* 2002, 20, 207-214.
- [38] Nettelbeck D.M., Miller D.W.: Targeting of adenovirus to endothelial cells by a bispecific single-chain diabody directed against the adenovirus fiber knob domain and human endoglin (CD 105). *Mol. Ther.* 2001, 3, 882-891.
- [39] Nielsen U.B., Kirpotiu D.B.: Therapeutic efficacy of anti-ErbB2 immunoliposomes targeted by a phage antibody selecteg for cellular endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1591, 109-118.
- [40] Nilsson F., Kosmehl H.: Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin mediates the infarction of solid tumors in mice. *Cancer Res.* 2001, 61, 711-716.
- [41] Oku N., Asai T.: Anti-neovascular therapy using novel peptides homing to angiogenic vessels. *Oncogene* 2002, 21, 2662-2669.
- [42] Parmley S.F., Smith G.P.: Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 1988, 73, 305-318.
- [43] Pasqualini R., Ruoslahti E.: Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature* 1996, 380, 364-366.
- [44] Popkov M., Sidrac-Ghali S.: Epitope-specific antibody response to HT-1080 fibrosarcoma cells by mimotope immunization. *Clin. Cancer Res.* 2000, 6, 3629-3635.
- [45] Porkka K., Laakkonen P.: A fragment of the HMG2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002, 99, 7444-7449.
- [46] Poul M.A., Becerril B.: Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries. *J. Mol. Biol.* 2000, 301, 1149-1161.
- [47] Rajotte D., Arap W.: Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by *in vivo* phage display. *J. Clin. Invest.* 1999, 102, 430-437.
- [48] Renschler M.F., Bhatt R.R.: Synthetic peptide ligands of the antigen binding receptor induce programmed cell death in a human B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994, 91, 3623-3627.
- [49] Ruoslahti E.: Targeting tumor vasculature with homing peptides from phage display. *Semin. Cancer Biol.* 2000, 10, 435-442.
- [50] Ruoslahti E.: Drug targeting to specific vascular sites. *Drug Discov. Today* 2002, 7, 1138-1143.
- [51] Sanz L., Kristensen P.: Single-chain antibody-based gene therapy: inhibition of tumor growth by *in situ* production of phage-derived human antibody fragments blocking functionally active sites of cell-associated matrices. *Gene Ther.* 2002, 9, 1049-1053.
- [52] Scott J.K., Smith G.P.: Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 1990, 249, 386-390.
- [53] Shadidi M., Sioud M.: Identification of novel carrier peptides for the specific delivery of therapeutics into cancer cells. *FASEB J.* 2002, 17, 256-258.
- [54] Smith G.P.: Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985, 228, 1315-1316.
- [55] Sun J., Pons J.: Potent and selective inhibition of membrane-type serine protease 1 by human single-chain antibodies. *Biochemistry* 2003, 42, 892-900.
- [56] Tersikh A.V., LeDoussal J.-M.: "Peptabody": a new type of high avidity binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997, 94, 1663-1668.
- [57] Trikha M., Yan L.: Monoclonal antibodies as therapeutics in oncology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002, 13, 609-614.
- [58] Vitaliti A., Wittmer M.: Inhibition of tumor angiogenesis by a single-chain antibody directed against vascular growth factor. *Cancer Res.* 2002, 60, 4311-4314.
- [59] Viti F., Tarli L.: Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis. *Cancer Res.* 1999, 59, 347-352.