

Ny metod upptäcker fler antikroppar

– öppnar för fler läkemedel mot cancer

En ny förbättrad metod för att upptäcka nya antikroppar för behandling av exempelvis cancer har tagits fram vid Lunds tekniska högskola i samarbete med BioInvent International AB. Tekniken skapar stora möjligheter att hitta många fler antikroppar än tidigare. Redan nu har metoden resulterat i en ny antikropp för behandling av leukemi som nu befinner sig i klinisk prövning på människor. Här sammanfattar forskaren **Anne Ljungars** den nya kunskapen på det högtintressanta området.

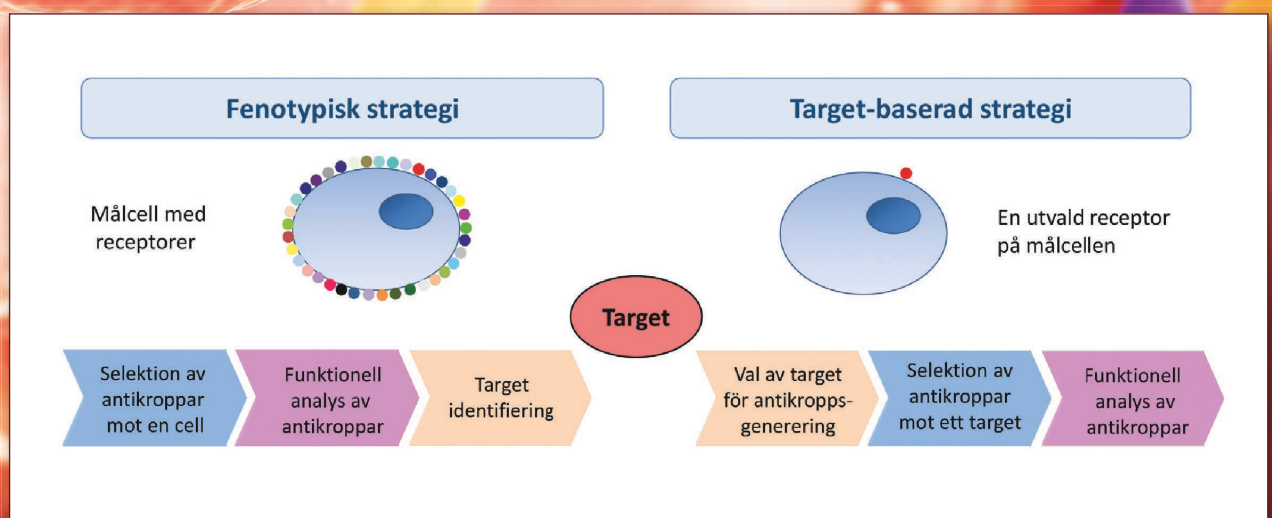
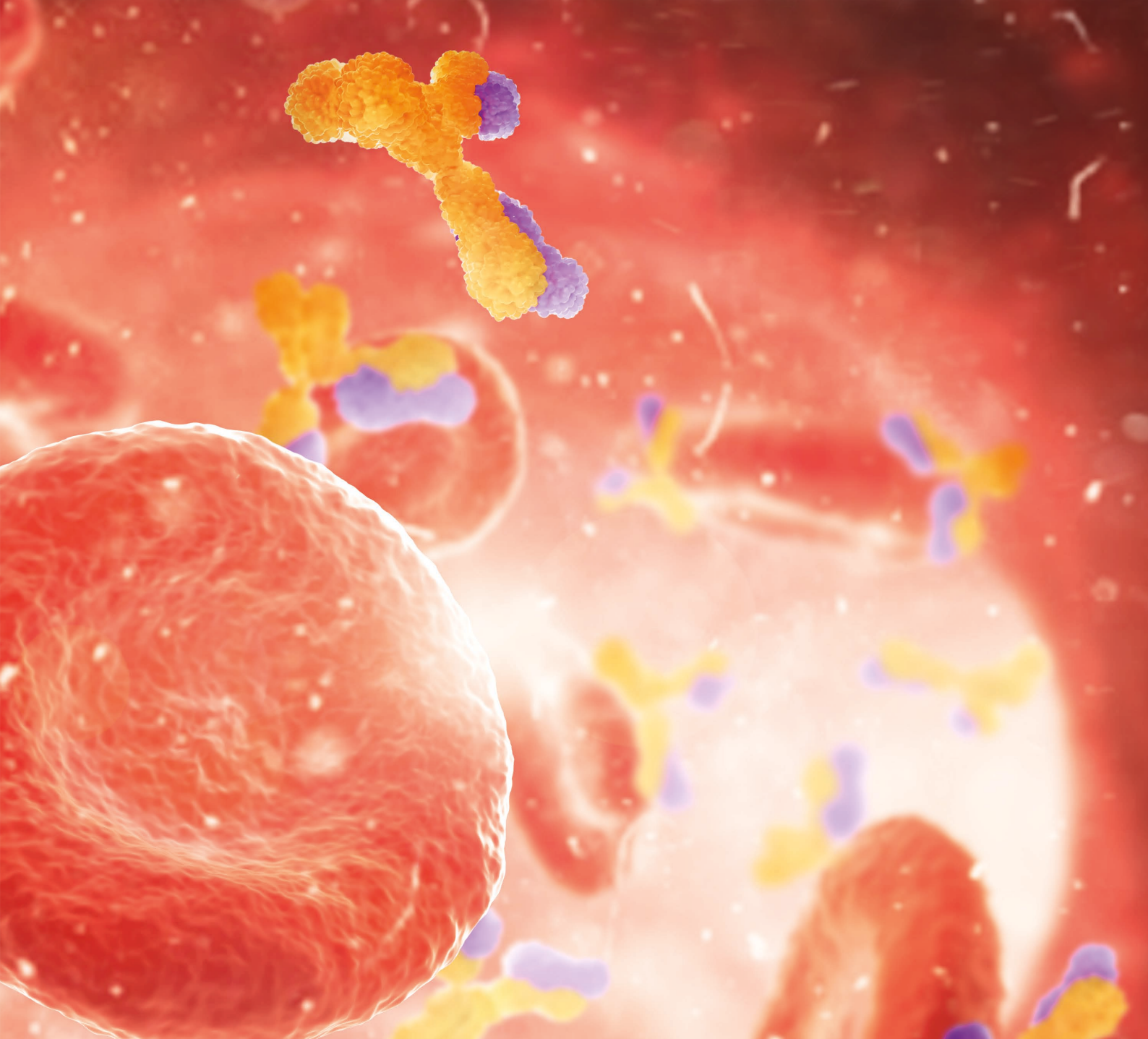
Antikroppar ingår naturligt i vårt immunförsvar där de bland annat skyddar oss genom att identifiera och oskadliggöra infekterade eller sjuka celler, såsom cancerceller. Detta gör antikroppen genom att binda specifikt till olika receptorer på ytan av målcellen och därefter antingen döda cellen direkt genom att inducera apoptos eller genom aktivering av andra immunceller, så kallade effektor-celler som i sin tur dödar målcellen. Dessa egenskaper hos antikroppar utnyttjas i antikropps-läkemedel vilka används framgångsrikt för behandling av många olika sjukdomar inklusive cancer. Att förutspå vilka receptorer som lämpar sig för antikroppsutveckling är dock inte helt lätt vilket har resulterat i att det utvecklas många antikroppar

mot några få målstrukturer¹. Det behövs således metoder för att identifiera antikroppar mot nya målstrukturer och signalvägar för att kunna ta fram ännu fler antikropps-läkemedel och förbättra dagens cancerbehandling.

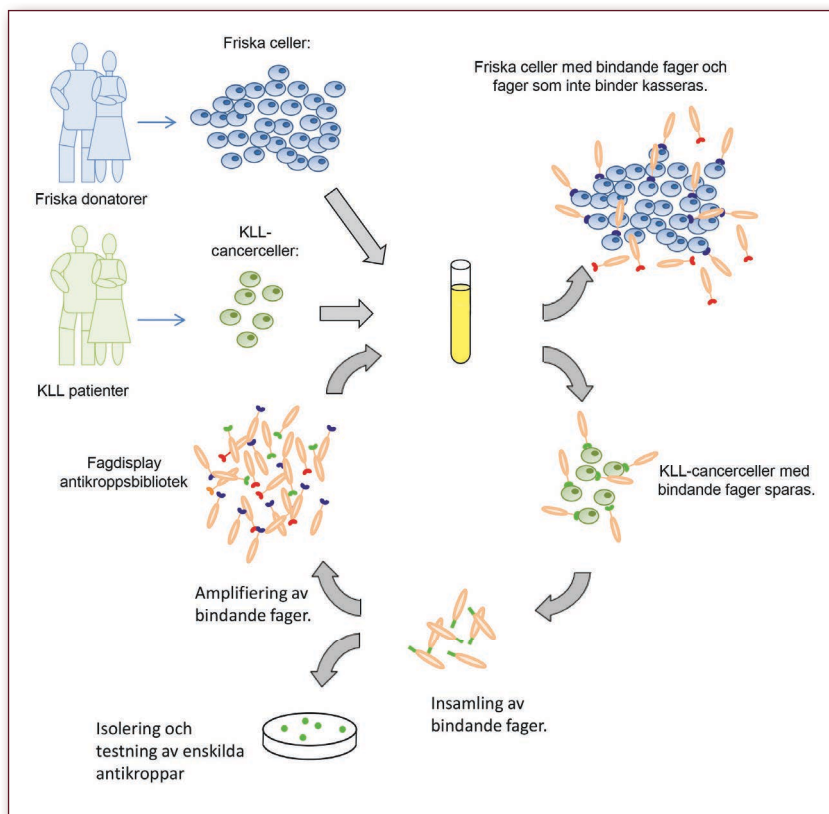
LETAR FÖRUTSÄTTNINGSLÖST

Traditionellt används en target-baserad strategi för att ta fram antikropps-läkemedel där man utgår från en hypotes att antikroppar mot en viss receptor, ett target, kan påverka sjukdomsbilden. Men potentiellt kan alla receptorer som är uppreglerade eller uttrycks specifikt på målcellen jämfört med friska normala celler användas för behandling med antikroppar. Därför använder vi en funktionsbaserad fenotypisk strategi, F.I.R.S.T.TM, där man letar efter

funktionellt aktiva antikroppar förutsättningslöst (Figur 1). Vilka antikroppar binder till målcellen men inte till friska celler och kan till exempel döda en tumörcell? Efter att dessa antikroppar har identifierats genom olika funktionella tester bestämmer man vilka receptorer de binder till. Vi letar alltså samtidigt efter antikroppar och targets. Det finns studier som visar att fler nya targets hittas för småmolekylära läkemedel om man använder ett sådant här fenotypiskt tillvägagångssätt än en target-baserad strategi². Swinney's studie har bidragit till att öka intresset för att använda en fenotypisk strategi även för framtagning av antikroppar (För en summering se Minter et al³). Förhoppningen är att på så sätt hitta flera nya antikroppar och targets.



Figur 1: Schematisk bild över hur antikropps-läkemedel kan tas fram med två olika strategier. I en fenotypisk strategi letar man efter antikroppar mot en hel cell. Isolerade antikroppar analyseras och sedan bestäms vad de funktionellt aktiva antikropparna binder till. I en target-baserad strategi isolerar man antikroppar mot ett target som tros vara viktigt för sjukdomen. Därefter analyseras antikropparna funktionellt. (Bilden är modifierad från Ljungars 2019⁹).



Figur 2: Schematisk bild över hur vi har selekterat fram antikroppar mot KLL-cancerceller. KLL-cancerceller och celler från friska individer blandas med vårt fag-display-bibliotek. Icke bindande fager och fager som binder till celler från friska individer tvättas bort. KLL-cancercellerna med bindande fager sparas och de KLL-bindande fager isoleras och amplifieras. Denna pool av fager används sedan för en andra selektionsrunda. Efter cirka 3 upprepade rundor testas enskilda antikroppar. (Bilderna är modifierade från Ljungars et al 2018⁵).

Det första steget är att blanda antikroppsbiblioteket med målceller och någon celltyp som man inte vill ha någon reaktivitet mot, till exempel cancerceller kontra friska celler.

En teknik som kan användas för att ta fram helt humana antikroppar är selektioner av antikroppar från fag-display-bibliotek⁴, som kan innehålla många miljarder olika antikroppar mot alla typer av targets. I dessa bibliotek används fager för att skapa en länk mellan antikroppens genotyp (DNA-koden som sitter inuti fagen) och fenotyp (det bindande antikroppsprotein på utsidan av fagen). Det första steget är att blanda antikroppsbiblioteket med målceller och någon celltyp som man inte vill ha någon reaktivitet mot, till exempel cancerceller kontra friska celler. I nästa steg fiskas målcellerna med

alla bindande antikroppar ut. På detta sätt kan man i teorin hitta antikroppar mot alla uppreglerade receptorer på målcellens yta. Proceduren upprepas sedan flera gånger innan ett litet antal av de anrikade antikropparna testas. Eftersom man samtidigt får reda på antikropparnas DNA-sekvens kan de intressanta antikropparna sedan tillverkas och testas funktionellt (Figur 2).

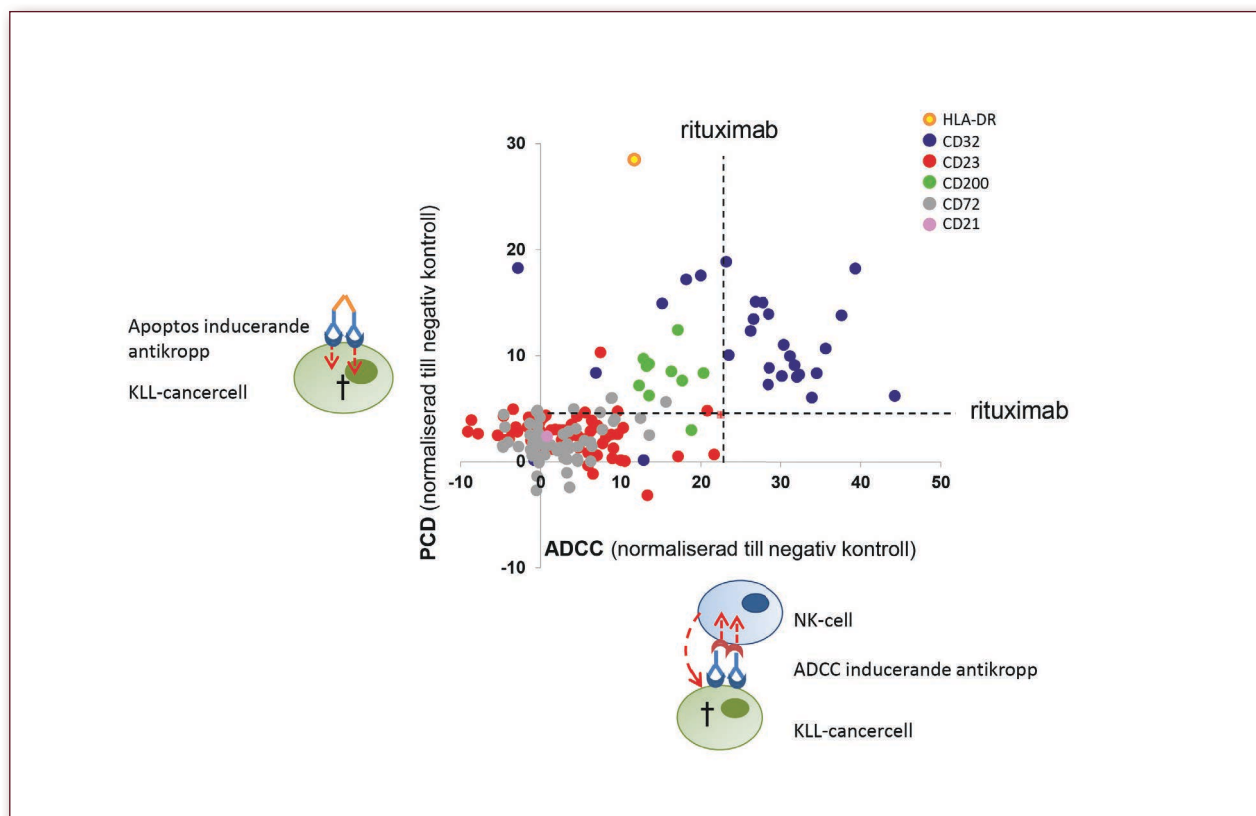
FRAMGÅNGSRIKT MOT KLL

Genom att kombinera fag-display med en fenotypisk strategi har vi selekterat fram antikroppar som binder till cancerceller från patienter med kronisk

lymfatisk leukemi, KLL, men inte till celler från friska individer. Dessa antikroppar utvärderades sedan med avseende på hur bra de var på att döda KLL-cancerceller genom att inducera programmerad celldöd eller NK-cells-medierad celldöd. Därefter identifierades att antikroppar mot sex olika targets: CD21, CD72, CD23, HLA-DR, CD200 eller CD32 hade hittats. De mest intressanta antikropparna band till tre av dessa targets: HLA-DR, CD200 eller CD32 och dessa antikroppar var mer potenta än den idag ofta använda CD20-specifika antikroppen rituximab när det gäller att döda KLL-celler (Figur 3). Antikropparnas effekt konfirmerades med experimentella djurmodeller⁵. Vidare karakterisering visade att antikroppar mot en av dessa målstrukturer, CD32, hade en förmåga att motverka och överkomma cancer-cellers resistens mot rituximab⁶. En av dessa antikroppar, BI-1206, utvecklas av BioInvent för behandling av rituximab-resistent B-cellslymfom och testas för närvarande i kliniska studier (NCT02933320 and NCT03571568). Även om det tidigare var känt att CD32b uttrycks på bland annat B-celler hade inga antikroppar mot detta target utvecklats eller testats för behandling av patienter med KLL eller B-cellslymfom. Detta visar hur en funktionsbaserad fenotypisk strategi kan hjälpa till att identifiera nya målstrukturer och verkningsmekanismer som tidigare inte har förknippats med progression i en viss sjukdom.

TEKNISKT UTMANANDE

Den fenotypiska strategin att samtidigt leta efter antikroppar och targets med hjälp av selektioner från fagdisplay-bibliotek på hela celler är dock tekniskt utmanande. Under selektionsprocessen är det många olika faktorer som påverkar hur en fag-bunden antikropp anrikas. Detta resulterar i en antikropps-pool där några få antikroppar kommer att dominera och finnas i många kopior medan de flesta antikropparna kommer att vara ovanliga och finnas i få kopior. Normalt testas bara de vanligaste antikropparna men eftersom anrikningen inte är relaterad till antikropparnas funktion är det viktigt att hitta många olika typer av antikroppar, även de mer



Figur 3: KLL-specifika antikroppars förmåga att döda KLL-cancerceller med hjälp av NK-celler (ADCC antibody dependent cellular cytotoxicity) eller förmåga att inducera programmerad celldöd (PCD). I båda försöken binder antikropparna till KLL-cancerceller. Därefter inducerar de celldöd direkt, PCD, eller aktiverar NK-celler som i sin tur dödar KLL-cancercellerna, ADCC. Antikropparna är färgkodade baserat på vilket target de binder till och data är normaliserat till en negativ kontrollantikropp. Värdet för den CD20-specifika antikroppen rituximab, som ofta används för behandling av KLL är med som jämförelse. (Bild från Ljungars et al 2018⁸.)

ovanliga, och utvärdera dessa funktionellt. För att kunna gräva djupare i befintliga antikroppspooler kan metoder för att förhindra att redan kända antikroppar eller targets återfinns användas. Ett annat sätt att hitta ovanliga antikroppar i en pool innefattar att man använder så kallad next-generation-sequencing, NGS⁷. Med hjälp av dessa metoder för att hitta ovanliga antikroppar har antikroppar mot nya targets, som inte hittades på traditionellt sätt, identifierats⁸. Tillsammans med den fenotypiska strategin kommer detta att vara viktigt för utvecklingen av framtida antikroppsläkemedel eftersom det möjliggör att nya antikroppar och targets hittas.

REFERENSER:

1. Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2019. *MAbs*. 2019;11(2):219-238.
2. Swinney DC, Anthony J. How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(7):507-519.
3. Minter RR, Sandercock AM, Rust SJ. Phenotypic screening-the fast track to novel antibody discovery. *Drug Discov Today Technol*. 2017;23:83-90.
4. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. 1990;348(6301):552-554.
5. Ljungars A, Martensson L, Mattsson J, et al. A platform for phenotypic discovery of therapeutic antibodies and targets applied on Chronic Lymphocytic Leukemia. *NPJ Precis Oncol*. 2018;2:18.
6. Roghanian A, Teige I, Martensson L, et al. Antagonistic human FcγRIIb (CD32B) antibodies have anti-tumor activity and overcome resistance to antibody therapy in vivo. *Cancer Cell*. 2015;27(4):473-488.
7. Ravn U, Gueneau F, Baerlocher L, et al. Bypassing in vitro screening--next generation sequencing technologies applied to antibody display and in silico candidate selection. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(21):e193.
8. Ljungars A, Svensson C, Carlsson A, et al. Deep Mining of Complex Antibody Phage Pools Generated by Cell Panning Enables Discovery of Rare Antibodies Binding New Targets and Epitopes. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10(847).
9. Ljungars A. Phenotypic antibody discovery and mining of complex antibody libraries. *Thesis, Lund University*, ISBN 978-91-7895-348-6. 2019.

ANNE LJUNGARS, PH D, SENIOR FORSKARE VID BIOINVENT INTERNATIONAL AB

