

## Neželjeni efekti bioloških lekova: reakcije preosetljivosti

Zorica Stojić-Vukanić\*, Nevena Arsenović-Ranin,  
Jelena Antić-Stanković, Marina Milenković

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za mikrobiologiju i imunologiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

\* Autor za korespondenciju: e-mail zoricav@pharmacy.bg.ac.rs (Tel: + 381 11 3951224)

---

### Kratak sadržaj

Više od dve decenije biološki lekovi (proteini dobijeni iz bioloških izvora, kao što su bakterije, gljive ili ćelije sisara) koriste se u terapiji različitih autoimunskih/ inflamatornih bolesti i tumora kod ljudi. Primena ovih lekova praćena je pojavom novih neželjenih efekata koji se mogu svrstati u pet različitih grupa koje se obeležavaju slovima grčkog alfabeta (od  $\alpha$  do  $\epsilon$ ). Reakcije preosetljivosti koje se vezuju za imunogenost bioloških lekova su klasifikovane kao reakcije iz grupe tip  $\beta$ . U praksi, svi proteini koji se koriste kao biološki lekovi, pokreću imunski odgovor, a kao rezultat nastaju anti-lek antitela. Brojni faktori koji su vezani za sam lek, pacijenta ili način davanja leka mogu da utiču na imunogenost nekog biološkog leka. Anti-lek antitela mogu da se vežu za lek i smanje njegovu efikasnost ili da izazovu reakcije preosetljivosti (uglavnom tip I, ređe tip III). Infuzijska reakcija, koja se javlja već u toku davanja infuzije leka ili u okviru jednog sata od njenog završetka, jedna je od najčešćih reakcija preosetljivosti na biološke lekove. U ovom radu opisani su faktori koji mogu da utiču na imunogenost bioloških lekova i patogenetski mehanizmi reakcija preosetljivosti na biološke lekove.

**Ključne reči:** imunogenost, biološki lekovi, anti-lek antitela, neželjeni efekti, monoklonska antitela

---

## Uvod

Više od dve decenije biološki lekovi (proteini dobijeni iz bioloških izvora, kao što su bakterije, gljive ili ćelije sisara), pre svega citokini, monoklonska antitela (mAt) i fuzioni proteini, koriste se u terapiji različitih autoimunskih/inflamatornih bolesti i tumora kod ljudi. Primena ovih lekova praćena je pojavom neželjenih efekata koji se razlikuju od onih koji nastaju nakon primene klasičnih/hemijskih lekova. Neželjeni efekti bioloških lekova često zavise od prirode ciljnog molekula na koji oni deluju i povezuju se sa biološkim efektima dejstva tih molekula. Imajući u vidu specifičnost neželjenih efekata bioloških lekova napravljena je posebna klasifikacija njihovih neželjenih efekata. Prema klasifikaciji koju je predložio Pichler (1) neželjeni efekti se svrstavaju u pet različitih grupa koje se obeležavaju slovima grčkog alfabeta (od  $\alpha$  do  $\epsilon$ ) da bi se razlikovali od klasifikacije neželjenih efekata hemijskih lekova.

Neželjeni efekti koji se svrstavaju u **Tip  $\alpha$**  se povezuju sa sistemskom primenom relativno visokih koncentracija citokina ili sa visokom koncentracijom citokina koji se oslobađaju u cirkulaciju nakon primene biološkog leka, a što se označava kao sindrom oslobađanja citokina (engl. cytokines released syndrome, CRS). Druga grupa neželjenih efekata (**Tip  $\beta$** ) povezuje se sa reakcijama preosetljivosti na biološki lek koje mogu biti posredovane antitelima (najčešće IgE i IgG klase) i T-limfocitima. Velika grupa neželjenih efekata, koji se ne mogu objasniti ni povećanom koncentracijom citokina ni indukcijom preosetljivosti, povezuje se sa imunskim/citokinskim disbalansom (engl. immune/cytokine imbalance syndromes) svrstana je u **tip  $\gamma$** . Kao posledica ovog disbalansa može doći do razvoja imunodeficijencija, autoimunosti ili alergijskih reakcija. Neželjeni efekti **tipa  $\delta$**  vezani su za primenu antitela u terapiji tumora i nastaju onda kada antitelo koje je usmereno protiv antigena na tumorskoj ćeliji ukršteno reaguje sa netumorskim ćelijama koje ispoljavaju taj isti antigen (ukrštena reaktivnost). Relativno mali broj bioloških lekova može da prouzrokuje simptome koji ne pogađaju direktno imunski sistem (**Tip  $\epsilon$** ). Ovi efekti na posredan način ukazuju na inicijalno nepoznate funkcije biološkog leka ili ciljnog molekula (1).

### Reakcije preosetljivosti - neželjeni efekti iz grupe tipa $\beta$

U neželjene efekte iz grupe tipa  $\beta$  svrstavaju se reakcije preosetljivosti koje se povezuju sa imunogenošću bioloških lekova. U celini gledano, hronična primena bioloških lekova dovodi do aktivacije imunskog odgovora i nastanka anti-lek antitela. Iako podaci višegodišnjih istraživanja pokazuju da je nastanak anti-lek antitela pre pravilo nego izuzetak, kod velikoj broja pacijenata ona ne utiču na efikasnost ili bezbednost primene biološkog leka. U slučajevima kada su registrovani neželjeni efekti anti-lek antitela oni su bili vezani za smanjenje efikasnosti leka, za neutralizaciju njegovog delovanja (u slučaju nastanka neutrališućih anti-lek antitela) ili za razvoj reakcije preosetljivosti na lek (2).

## **Imunski mehanizmi nastanka anti-lek antitela**

Danas je opšte prihvaćeno da je humoralna imunost, koja je posredovana antitelima, najzastupljeniji oblik imunosti tokom primene većine bioloških lekova (3). S obzirom da su biološki lekovi proteini, za sintezu antitela je neophodno učešće T-ćelija, pa se ovi antigeni, kao i humorani imunski odgovor koji pokreću, označavaju kao T-zavisni (4). Praktično, to znači da kada se primeni biološki lek, njega preuzimaju i obrađuju antigen-prezentujuće ćelije (APĆ), a zatim ga prezentuju pomoćničkim CD4+ (engl. helper, Th) T-limfocitima, koji se aktiviraju kada ga prepoznaju. Ove ćelije (Th limfociti) zatim imaju važnu ulogu u aktivaciji i diferencijaciji B-ćelija u ćelije koje će sekretovati antitela različitih klasa (IgG, IgE ili IgA) i visokog afiniteta (4, 5). Podaci iz literature pokazuju da su anti-lek antitela IgG klase najzastupljenija tokom imunskog odgovora na različite biološke lekove i da su ozbiljni neželjeni efekti koji mogu da se ispolje tokom primene bioloških lekova uglavnom posledica visokog nivoa anti-lek antitela IgG klase (2).

Ređe, biološki lekovi mogu da se ponašaju kao neproteinski ili T-nezavisni antigeni i da direktno aktiviraju B limfocite bez pomoći T-ćelija. To se najčešće dešava kada biološki lekovi formiraju agregate koji na svojoj površini imaju neke strukture koje se ponavljaju (podsećaju na strukture mikroorganizama) (5). Agregati mogu nastati usled različitih interakcija između proteina, kao što su hidrofobne reakcije, ili strukturnih promena koje su posledica hemijskih modifikacija - oksidacije ili deamidacija. Faktori koji utiču na stepen agregacije su i pH, temperatura, koncentracija, dodirna površina vazduh-tečnost i drugi faktori (2, 6). Kao rezultat T-nezavisnog imunskog odgovora nastaju antitela IgM klase niskog afiniteta (4).

## **Faktori koji utiču na imunogenost**

Faktori vezani za sam biološki lek (stepen „humanizacije” biološkog leka)

Kada biološki lek, a to se najčešće odnosi na mAt, sadrži neke sekvence koje organizam pacijenta prepoznaje kao strane (engl. non-self epitops) dolazi do imunskog odgovora i produkcije specifičnih anti-lek antitela (7). Kao što je i očekivano, mišja i himerna mAt su izrazito imunogena jer sadrže sve (mišja) ili bar neke strane determinante (kod himernih mAt 25-30% molekule tj. varijabilni regioni su mišjeg, a konstantni regioni su humanog porekla) (8). U prilog prethodnoj tvrdnji ide podatak da do stvaranja anti-lek antitela dolazi kod velikog broja pacijenata (i do 60%) koji primaju himerno mAt infliksimab (9). Savremene molekulske tehnike omogućile su dobijanje humanizovanih (samo hipervarijabilni regioni su mišjeg porekla što čini oko 10% cele molekule) ili potpuno humanih mAt (opisano u radu 8), čime je značajno smanjena imunogenost. Ipak, i nakon primene humanih mAt kod pacijenata su detektovana anti-

lek antitela (8), što je verovatno posledica različite glikozilacije ili razlika u antigen-vezujućem mestu mAt. Fuzioni proteini, kao što su etanercept ili abatacept, manje su imunogeni od celih molekula antitela i njihova imunogenost se uglavnom povezuje sa novoformiranim determinantama koje nastaju u regionu spajanja solubilnog molekula i Fc fragmenta At (10). Konačno, odsustvo Fc fragmenta kod nekih bioloških lekova (npr. certolizumaba koji je pegilovani Fab fragment), ne samo da smanjuje neželjene efektorske funkcije, već i njihovu imunogenost. Ovo se objašnjava time da je preuzimanje/prerada kompleksa ciljni molekul-lek posredstvom Fc receptora na APC smanjeno, a samim tim i aktivacija imunskog odgovora (11).

Stepenu imunogenosti jednog biološkog leka može da doprinese i veličina kompleksa koju on stvara sa ciljnom molekulom. Na primer, etanercept formira male imunске komplekse (veličine do 300kDa), dok kompletna anti-TNF- $\alpha$  mAt formiraju veće komplekse (4000kDa adalimumab i 14000kDa infliksimab). Veći kompleksi povećavaju preuzimanje leka od strane APC, a time i imunogenost, ali mogu i direktno da stimulišu B ćelije i dovedu do produkcije anti-lek antitela (12).

Modifikacija bioloških lekova glikozilacijom ili kovalentnim vezivanjem polimera polietilen glikola (PEG) za proteine (PEGilacija) u značajnoj meri može da izmeni njihovu imunogenost. Pokazano je da umetanje određenih glikana u molekule mAt tokom same sinteze molekula antitela od strane mišjih mijelomskih SP2/0 ćelija, može dovesti do IgE-posredovane imunogenosti tokom njegove primene (13). Paradoksalno, iako se pegilacijom smanjuje imunogenost terapeutskih proteina (povećava se rastvorljivost, maskiraju neki epitopi koji pokreću imunski odgovor, smanjuje frekvencija doziranja i dr.) u nekim slučajevima ova modifikacija biološkog leka povećava imunogenost (14). Iako još uvek nema pouzdanih kliničkih dokaza, oksidacija ili deamidacija proteina, koja može nastati usled interakcije komponenti pakovanja sa biološkim lekom, takođe se može povezati sa njihovom povećanom imunogenošću. Smatra se da slobodni radikali koji nastaju tokom procesa oksidacije mogu biti tzv. „opasni signali” koji će dovesti do aktivacije APC, a samim tim i T ćelija, ili da modifikacije proteina, bilo oksidacijom bilo deamidacijom, mogu da dovedu do promene konformacione strukture proteina, što može dovesti do izloženosti nekih novih epitopa antigena imunskom sistemu i pokrenuti imunski odgovor na njih (2, 6).

#### Faktori vezani za način primene leka

Opšte je prihvaćeno da visoke doze leka indukuju toleranciju i smanjuju imunogenost. Visoke doze infliksimaba kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA) i Kronovom bolešću su u negativnoj korelaciji sa pojavom anti-lek antitela (15, 16). Zatim, učestalost i dužina terapije, kao i način davanja leka mogu da utiču na pokretanje imunskog odgovora na biološki lek.

Kada je u pitanju način davanja leka, smatra se da je intravenski način davanja manje imunogen u poređenju sa intramuskularnim, subkutanim ili intranazalnim načinom davanja (17). Potencijalno objašnjenje za ovo bi moglo da leži u činjenici da su i koža i mukozne membrane prva linija odbrane od stranih antigena/patogena i da su bogate APC, naročito dendritskim ćelijama, koje su glavne ćelije za preuzimanje i prezentaciju proteina T-ćelijama (2). Zatim, tokom subkutane primene leka neminovno dolazi do oštećenja tkiva i nekroze ćelija što može stvoriti „opasne signale” i dodatno stimulisati imunski odgovor na biološki lek. Ipak, nijedan način davanja leka sam po sebi ne izaziva imunogenost, tako da ona ipak najviše zavisi od karakteristika samog biološkog leka. U skladu sa tim su i podaci iz literature da promena načina davanja biološkog leka ne utiče značajno na njegovu imunogenost (18).

Dalje, konkomitentno davanje biološkog leka sa drugim imunosupresivnim lekovima, može da smanji njegovu imunogenost. Na primer, upotreba metotreksata zajedno sa infliksimabom smanjuje neželjeni imunski odgovor na infliksimab i poboljšava klinički odgovor kod pacijenata sa RA (19). Takođe, i adalimumab je imunogen kod manjeg procenta obolelih od RA kada se daje zajedno sa metotreksatom, a ne kao monoterapija (12% vs 38%). Pokazan je jasan dozno-zavisan odnos između primenjenog metotreksata i redukcije produkcije anti-lek antitela (20, 21).

#### Faktori vezani za pacijenta

Obično je teško razlikovati uticaj specifičnih karakteristika samog biološkog leka na razvoj neželjenih efekata u odnosu na brojne faktore povezane sa individualnim karakteristikama pacijenta ili terapijskog režima. Genetska predispozicija, godine, pol, stadijum bolesti i komorbiditet, medikacija i premedikacija su samo neki od faktora koji su vezani za pacijenta, a mogu da utiču na imunski odgovor koji će organizam da razvije na biološki lek. Jedan od najvažnijih faktora vezanih za pacijenta je prisustvo visoko polimorfnih gena koji kodiraju humane leukocitne antigene (engl. human leukocyte antigen, HLA). U zavisnosti od HLA genotipa pacijenta, različiti peptidi koji nastaju razgradnjom proteinskog leka će kod jednog pacijenta moći da se vežu za HLA molekule i da aktiviraju T ćelije, dok će kod drugog pacijenta aktivacija T ćelija izostati, odnosno proteinski lek će biti imunogen za prvog pacijenta, ali ne i za drugog (18).

Uopšteno gledano, pokazano je da su pacijenti koji imaju neku imunski-posredovanu bolest skloniji razvoju anti-lek antitela nego oni koji nemaju (22, 23). S druge strane, pacijenti koji primaju imunosupresivnu terapiju tokom lečenja karcinoma, retko će razviti antitela, jer je njihov imunski sistem suprimiran. Na primer, upotreba rituksimaba (anti-CD20 himerno mAt) kod pacijenata sa B-ćelijskom limfocitnom leukemijom, nije izazvala stvaranje anti-lek antitela, što je verovatno posledica uklanjanja B-ćelija (24). Suprotno navedenom primeru, kada se rituksimab daje

pacijentima sa autoimunskim bolestima, kao što su sistemski eritemski lupus ili primarni Sjogrenov sindrom, anti-lek antitela se detektuju kod 65% odnosno 27% pacijenata, čak i onda kada dobijaju drugu imunosupresivnu terapiju (24).

## **Posledice prisustva anti-lek antitela**

### Smanjenje efikasnosti ili gubitak efekta biološkog leka

Klinički značaj razvoja anti-lek antitela još uvek nije u potpunosti razjašnjen, čemu u značajnoj meri doprinosi nedostatak odgovarajućih standardizovanih metoda za njihovu detekciju i kvantifikaciju. Dodatno, u nekim bolestima, kao što je RA, prisustvo samog leka i faktora vezanih za samu bolest (reumatoidni faktor), može da interferira sa određivanjem anti-lek antitela (25). Pokazano je da anti-lek antitela mogu da formiraju imunske komplekse sa biološkim lekom, što može da dovede do ubrzanog uklanjanja leka ili, u slučaju nastanka neutrališućih antitela, njegove inaktivacije (neutralizacije), što se klinički manifestuje, u prvom slučaju potrebom za povećavanjem doze, a u drugom gubitkom efekta. Potpuno odsustvo dejstva leka, u prisustvu neutrališućih anti-lek antitela, posledica je njihovog vezivanja za ona mesta na biološkom leku kojima se on vezuje za ciljni molekul. Na primer, kod terapije mAt neutrališuća anti-lek antitela se vezuju za antigen-vezujuće mesto (19).

Najviše podataka u literaturi, koji se odnose na imunogenost bioloških lekova i uticaj anti-lek antitela na klinički odgovor, ima za TNF inhibitore. Ovi lekovi se već dugi niz godina primenjuju u terapiji, prvenstveno RA, ali i drugih autoimunskih bolesti. Danas je na tržištu dostupno pet anti-TNF lekova, infliksimab, adalimumab, golimumab, etanercept i certolizumab (8, 19). Kao što je i bilo očekivano, najimunogeniji od svih TNF inhibitora je infliksimab (himerno mAt). Procenat pacijenata kod kojih su detektovana anti-infliksimab antitela je dosta varirao i kretao se od 10% pa i do preko 60% (26), što je verovatno posledica različitih kriterijuma na osnovu kojih su pacijenti birani, kao i od testa za detekciju ovih antitela. Nivoi anti-adalimumab antitela su se takođe razlikovali u krvi pacijenata uključenih u različite studije. Međutim, u studiji koja je tri godine pratila nivoe ovih anti-lek antitela kod pacijenata obolelih od RA pokazano je da je njih oko 28% bilo pozitivno (27). Manje je podataka o imunogenosti golimumaba i certolizumaba jer se kraće primenjuju u terapiji, a najmanje imunogen od ovih pet pomenutih je etanercept tokom čije primene su se kod 1-18% pacijenata javila anti-etanercept antitela. Pored toga, pokazano je da su antitela na adalimumab uvek neutrališuća, dok je različit procenat neutrališućih antitela nađen kod primene drugih TNF blokatora. Tokom primene etanercepta nikad se ne razvija ovaj tip anti-lek antitela (28-30). Kao što je ranije već navedeno, anti-lek antitela koja se stvaraju tokom primene etanercepta su usmerena protiv „fuzionog regiona” - regiona

gde se spajaju molekul solubilnog TNF receptora i Fc fragment mAt i nastaju novi epitopi (30).

Kod pacijenata sa multiplom sklerozom (MS) primena natalizumaba (mAt usmerenog protiv  $\alpha 4$  integrina) dovela je do nastanka anti-lek antitela u oko 9% pacijenata, što je rezultovalo smanjenom efikasnošću ovog leka (31). Takođe, pojava visokog titra anti-IFN- $\beta$  antitela tokom terapije pacijenata sa MS, odnosno anti-IFN- $\alpha$  antitela tokom terapije pacijenata obolelih od leukemije i hroničnog hepatitisa, bila je u korelaciji sa gubitkom kliničke efikasnosti ovih bioloških lekova (32-35). Štaviše, neutrališuća anti-IFN- $\beta 1b$  antitela, koja nastaju tokom terapije pacijenata sa MS, ispoljavaju visok stepen ukrštene reaktivnosti i sa IFN- $\beta 1a$ , što onemogućava zamenu jednog leka drugim i dovodi do pogoršanja bolesti (33).

Retko, neutrališuća antitela mogu da neutrališu, ne samo rekombinantni protein koji se koristi kao lek, već i njegov endogeni analog, što može da ugrozi i život pacijenta. Takav slučaj opisan je krajem 90-ih godina kod pacijenata koji su primali rekombinantni eritropoetin i kod kojih je zbog formiranja neutrališućih anti-eritropoetin antitela došlo do teške anemije, koja je zahtevala prekid terapije i stalne transfuzije (36). Kasnije je pokazano da imunogenost ovog preparata nije bila posledica prirode samog leka već prisustva organskog jedinjenja koje se oslobodilo, pod dejstvom polisorbata 80, iz neobloženog gumenog dela klipa šprica koji je korišćen za primenu leka (37). Organsko jedinjenje sa adjuvantnim osobinama (pojačava imunski odgovor) nije bilo prisutno kada je za davanje leka korišćen špic sa obloženim gumenim klipom, a kao nosač za formulaciju proizvoda humani serumski albumin umesto polisorbata 80 (36, 37). Nakon primene pegilovanog rekombinantnog humanog faktora razvoja i rasta megakariocita (engl. pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor, PEG-rHuMGDF) formirana anti-PEG-rHuMGDF antitela su ukršteno reagovala sa endogenim trombopoetinom i neutralisala njegovu biološku aktivnost, što je dovelo do pojave trombocitopenije (14).

### Reakcije preosetljivosti posredovane anti-lek antitelima

Kao što je ranije navedeno, u humoralnom imunskom odgovoru na biološke lekove najviše se stvaraju anti-lek antitela IgG klase, ali su detektovana i anti-lek antitela IgE i IgM klase. Nedavno objavljeni podaci pokazuju da je oko 76,6% pacijenata koji su primali infliksimab stvorilo specifična anti-lek antitela svih klasa, a da je 26% od njih imalo anti-infliksimab IgE antitela (9).

Reakcije preosetljivosti mogu biti posredovane svim navedenim klasama anti-lek antitela. Kada su posredovane IgE antitelima označavaju se kao rana preosetljivost, I tip preosetljivosti ili alergije. Antitela koja nisu IgE klase mogu da izazovu reakcije

preosetljivosti formiranjem imunskih kompleksa koji se talože u krvnim sudovima (III tip preosetljivosti) (4).

U klasičnim alergijskim reakcijama, tokom prvog izlaganja antigenu (npr. biološkom leku) dolazi do aktivacije Th2 ćelija i stvaranja IgE antitela. Ova IgE antitela se vezuju za Fc receptore visokog afiniteta, specifične za Fc fragment IgE antitela, koji su ispoljeni na tkivnim mastocitima i cirkulišućim bazofilima (faza senzibilizacije). Prvo izlaganje antigenu ne dovodi do simptoma, dok pri sledećem izlaganju antigenu dolazi do aktivacije mastocita i bazofila, usled unakrsnog vezivanja antigena za dva ili više molekula IgE antitela na tim ćelijama, i oslobađanja preformiranih (vazoaktivni amini i proteaze) ili novoformiranih medijatora (prostaglandini, leukotrieni i citokini). Kliničke i patološke karakteristike reakcija rane preosetljivosti zavise od količine oslobođenih medijatora i tkiva u kojima dolazi do reakcije. Najteži oblik rane preosetljivosti je anafilaksija, sistemska reakcija koju karakterišu pad krvnog pritiska i generalizovani edemi, uključujući i edem larinksa (4).

Primena bioloških lekova (infliksimab, rituksimab, omalizumab ili natalizumab) u vidu infuzije dovodi se u vezu sa akutnom sistemskom reakcijom koja se označava kao akutna infuzijska reakcija. Ova reakcija može da se javi već tokom prve infuzije, ali i svake naredne, traje 30-60 minuta, i može biti praćena groznicom, urtikarijom i anafilaksijom. Simptomi se mogu ublažiti smanjenjem brzine davanja infuzije i primenom antihistaminika i paracetamola, dok teži oblici ovih reakcija zahtevaju primenu kortikosteroida. Iako je ova premedikacija već u rutinskoj primeni, pre davanja biološkog leka u vidu infuzije, ne postoje čvrsti dokazi da ovaj profilaktički tretman može da speči infuzijske reakcije (38, 39).

Mehanizmi koji leže u osnovi infuzijskih reakcija nisu do kraja poznati i razjašnjeni, tako da su brojni imunski-posredovani mehanizmi predloženi. Smatra se da one mogu biti prave alergijske reakcije posredovane anti-lek IgE antitelima, zatim pseudoalergijske reakcije posredovane drugim klasama anti-lek antitela (tzv. IgE nezavisne reakcije koje su posledica direktne aktivacije imunskih ćelija i komplementa), ali da mogu nastati i kao posledica CRS. Simptomi sva tri tipa imunski-posredovanih infuzijskih reakcija se u velikoj meri preklapaju, pa je teško, samo na osnovu kliničkih simptoma, identifikovati uzrok njihovog nastanka bez dodatnih laboratorijskih analiza, odnosno klasifikovati neželjene efekte kao preosetljivost (tip  $\beta$ ) ili CRS (tip  $\alpha$ ) (1).

Opisan redosled događaja u ranoj preosetljivosti isključuje mogućnost pojave anafilaksije tokom primene prve infuzije biološkog leka, tako da je infuzijska reakcija u tim slučajevima verovatno posledica pseudoalergijskih reakcija i/ili CRS. Međutim, u retkim opisanim slučajevima kada pacijenti imaju preformirana IgE antitela koja ukršteno reaguju sa biološkim lekom, do anafilaktičke reakcije je došlo i pri primeni prve infuzije leka. U Sjedinjenim Američkim Državama su 2007. godine opisani teški oblici preosetljivosti kod 22% pacijenata nakon prve infuzije cetuksimaba (13).



Pokazano je da su oni imali IgE antitela specifična za galaktozu- $\alpha$ -1,3-galaktozu, oligosaharid koji se nalazi na Fab fragmentu teškog lanca cetuksimaba. Ovaj oligosaharid je normalno ispoljen kod svih sisara, osim primata, i većina ljudi ima IgE antitela koja su specifična za taj molekul, ali razlog za senzibilizaciju i nastanak IgE nije, za sada, poznat (13).

Direktna korelacija između akutne infuzijske reakcije i prisustva anti-lek antitela IgE klase je pokazana kod primene mAt, kao što su infliksimab, muromonab, cetuksimab, tocilizumab i natalizumab (40-43). Kod nekih od pacijenta koji su primali infliksimab, rituksimab i trastuzumab, pozitivne kožne probe su bile u skladu sa pretpostavkom da je reakcija preosetljivosti koja se javlja tokom davanja infuzije bila posredovana antitelima IgE klase. Određivanjem koncentracije anti-infliksimab antitela IgE klase kod pacijenata na terapiji ovim lekom pokazano je da se antitela javljaju na početku terapije, obično u toku davanja prve tri doze (9).

Podaci da je kod nekih pacijenata koji su bili na terapiji infliksimabom došlo do teške anafilaktičke reakcije tokom davanja infuzije i da su oni bili pozitivni na anti-lek antitela, ali nisu imali anti-lek antitela IgE i IgM klase, ukazala su da bi mehanizmi, koji uključuju anti-lek antitela drugih klasa (prevažodno IgG klase) mogli biti odgovorni za nastalu preosetljivost (44). Naime, već je ranije pokazano na eksperimentalnom modelu kod miša da anafilaksija može biti izazvana na dva potpuno nezavisna načina. Prvi, ranije opisan, uključuje učešće IgE antitela, Fc $\epsilon$ RI i mastocita uz oslobađanje histamina, dok u drugom učestvuju IgG antitela, Fc $\gamma$ RIII, makrofage i bazofili, a najznačajniji medijator je faktor koji aktivira trombocite (engl. platelet activating factor, PAF) (45). U skladu sa ovom tvrdnjom, nedavno su objavljeni podaci da je kod ljudi koncentracija PAF u direktnoj korelaciji sa težinom anafilaktičke reakcije (46). Shodno tome, danas se smatra da se IgG-posredovana anafilaksija javlja u uslovima kada se unose velike količine antigena (kao što je to slučaj kod primene bioloških lekova) i kada postoji visoka koncentracija specifičnih anti-lek antitela IgG klase (47). Dodatni efektorski mehanizam posredovan IgG antitelima bi mogao da bude aktivacija komplementa i direktna aktivacija mastocita anafilatoksinima (aktivisanim komponentama komplementa C3a, C4a i C5a) bez učešća IgE antitela (48).

Odložene reakcije preosetljivosti (engl. delayed reaction) su sve one koje se javljaju posle više od šest sati, nekad i posle 3 pa čak i 12 dana, od primene biološkog leka. Najčešće se manifestuju kao bol u mišićima i zglobovima, groznica, osip, svrab, dolazi do edema lica i usta, otežanog gutanja i koprivnjače (49). One su najčešće posledica formiranja imunskih kompleksa između anti-lek antitela i leka i svrstavaju se u reakcije preosetljivosti III tipa. Anti-lek antitela IgG i IgM klase iz imunskih kompleksa klasičnim putem aktiviraju sistem komplementa, što izaziva nastanak razgradnih produkata komplementa koji privlače leukocite i izazivaju zapaljenje. Antitela IgG klase se vezuju za Fc $\gamma$ R neutrofila i makrofaga i izazivaju zapaljenje

aktivirajući ove ćelije (4). Nastali imunski kompleksi se talože u krvnim sudovima, naročito glomerula bubrega i sinovije zglobova, i dovode do pojave serumske bolesti koja se klinički manifestuje kao sistemski vaskulitis, nefritis i artritis (4). Takođe, pokazano je da formirani imunski kompleksi, koji nastaju tokom terapije leukemije IFN- $\alpha$ , mogu da izazovu, kao neželjeni efekat, tešku trombocitopeniju. Nastali imunski kompleksi vezuju se za Fc $\gamma$ R na trombocitima, što dovodi do njihovog uklanjanja iz cirkulacije preuzimanjem od strane fagocita u jetri i slezini (50).

Kada se primenjuju lokalno, najčešće subkutano, biološki lekovi mogu izazvati crvenilo i otok na mestu primene. U nastanku ovih promena učestvuju anti-lek antitela IgE klase. Ove reakcije se javljaju brzo (u okviru prvih 20 minuta) nakon ubrizgavanja leka. Takođe, nakon lokalne primene tri različita TNF inhibitora opisan je vaskulitis, koji je verovatno posledica taloženja imunskih kompleksa nastalih vezivanjem tih lekova i za njih specifičnih antitela IgG ili IgM klase (51). Iako ove neželjene lokalne reakcije mogu, kao što je prethodno opisano, biti posredovane anti-lek antitela svih klasa, one su češće posledica nespecifične iritacije koja nema imunsku osnovu i koja se javlja na komponente leka kao što su rastvarač, ekscipijens i dr. (38).

### Reakcije preosetljivosti posredovane T-ćelijama

Iako CD4<sup>+</sup> T-ćelije imaju važnu ulogu u humoralnom imunskom odgovoru i nastanku anti-lek antitela, biološki lekovi retko dovode do preosetljivosti koja je posredovana T-ćelijama (IV tip preosetljivosti). Ovaj tip preosetljivosti opisan je nakon subkutane primene etanercepta i adalimumaba i označava se kao reakcija na mestu uboda (engl. injection-site reaction, ISR). Imunohistohemijska analiza mesta davanja leka ukazuje na tipičnu reakciju kasne preosetljivosti (engl. delayed-type hypersensitivity reaction) (52). Reakcija se označava kao kasna ili odložena jer se javlja 24 do 48 sati pošto osoba, koja je prethodno bila izložena proteinskom antigenu (npr. biološkom leku), ponovo dođe u kontakt sa tim antigenom. Oštećenje tkiva uglavnom je izazvano CD4<sup>+</sup> T-ćelijama koje luče citokine koji indukuju lokalno zapaljenje i aktiviraju makrofage (Th1) ili privlače leukocite, posebno neutrofile (Th17) (4).

Različite metode se koriste za određivanje prisustva anti-lek antitela u serumu kao mere humoralnog imunskog odgovora na biološki lek, između ostalih brojne modifikacije metode enzimske imunoadsorpcije (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), imunotestovi sa radioaktivnim obeleživačima (engl. radio-immunoassay, RIA), masena spektrometrija i dr. (53-56). Međutim, s obzirom da većina ovih testova nije standardizovana i validirana, poređenje rezultata dobijenih iz različitih studija nije moguće, tako da brojni radovi na tu temu još uvek ne mogu da daju odgovor na pitanje kako, kada i zašto neki pacijenti stvaraju antitela na različite proteine (47).

Ako se sumnja na preosetljivost, mogu se pored *in vitro* testova, uraditi i kožni testovi (prick ili intradermalni) sa biološkim lekom. Pozitivni kožni test, tj. neposredna pojava crvenila i otoka, ukazuje na prisustvo specifičnih anti-lek antitela IgE klase, a crvenilo i otvrdnuće, posle 24-72 sata na mestu uboda, na reakciju preosetljivosti posredovanu T-ćelijama (1). Međutim, još uvek nema smernica za upotrebu kožnih testova u svakodnevnoj kliničkoj praksi, čak ni kod pacijenata kod kojih postoji intolerancija na neke biološke lekove, kao što su na primer mAt (9).

## Zaključak

Proteklih dvadeset godina biološki lekovi su u velikoj meri omogućili ili poboljšali terapiju mnogih bolesti. Njihova primena se povećava, bilo kroz nalaženje novih indikacija za već postojeće ili uvođenjem novih lekova na tržište. Iako vrlo efikasni, oni izazivaju širok spektar neželjenih reakcija od kojih neke mogu ugroziti život pacijenta. Većina bioloških lekova su proteini sa imunogenim potencijalom čija primena dovodi do nastanka anti-lek antitela svih klasa, koja mogu biti odgovorna za različite reakcije preosetljivosti. Očekuje se da će bolje razumevanje reakcija preosetljivosti koje pokreću biološki lekovi, korišćenje novih testova za detekciju anti-lek antitela, kao i savremenih metoda za identifikaciju imunogenih antigenskih determinanti koje prepoznaju T-ćelije, smanjiti učestalost neželjenih efekata ovih lekova, i sledstveno značajno poboljšati njihov bezbednosni profil.

## Literatura

1. Pichler WJ. Adverse side-effects to biological agents. *Allergy* 2006; 61: 912-20.
2. Singh SK. Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics. *J Pharm Sci* 2011; 100: 354-87.
3. Porter S. 2001. Human immune response to recombinant human proteins. *J Pharm Sci* 90: 1-11.
4. Abbas Ak, Lichtman AH, Pillai S. Osnovna imunologija. 4. Izdanje. Izdavač Data Status, 2013.
5. De Groot AS, Scott DW. Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends Immunol* 2007; 28: 482-90.
6. Vazquez E, Corchero JL, Villaverde A. Post-production protein stability: trouble beyond the cell factory. *Microb Cell Fact* 2011; 10:60. doi: 10.1186/1475-2859-10-60.
7. Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJ. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 325-38.

8. Stojić-Vukanić Z, Arsenović-Ranin N, Milenković M, Bufan B. Razvoj monoklonskih antitela za terapijsku primenu: od mišjih do humanih. *Arh Farm* 2012; 62: 562-75.
9. Matucci A, Pratesi S, Petroni G, Nencini F, Virgili G, Milla M, et al. Allergological in vitro and in vivo evaluation of patients with hypersensitivity reactions to infliximab. *Clin Exp Allergy* 2013; 43: 659-64.
10. Jamnitski A, Krieckaert CL, Nurmohamed MT, Hart MH, Dijkmans BA, Aarden L, et al. Patients non-responding to etanercept obtain lower etanercept concentrations compared with responding patients. *Ann Rheum Dis* 2012; 71: 88-91.
11. Vos AC, Wildenberg ME, Duijvestein M, Verhaar AP, van den Brink GR, Hommes DW. Anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  antibodies induce regulatory macrophages in an Fc region-dependent manner. *Gastroenterology* 2011; 140: 221-30.
12. Kim MS, Lee SH, Song MY, Yoo TH, Lee BK, Kim YS. Comparative analyses of complex formation and binding sites between human tumor necrosis factor-alpha and its three antagonists elucidate their different neutralizing mechanisms. *J Mol Biol* 2007; 374: 1374-88.
13. Chung CH, Mirakhur B, Chan E, Le Q-T, Berlin J, Morse M, et al. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N Engl J Med* 2008; 358: 1109-17.
14. Li J, Yang C, Xia Y, Bertino A, Glaspy J, Roberts M, et al. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood* 2001; 98: 3241-8.
15. Wasserman MJ, Weber DA, Guthrie JA, Bykerk VP, Lee P, Keystone EC. Infusion-related reactions to infliximab in patients with rheumatoid arthritis in a clinical practice setting: relationship to dose, antihistamine pretreatment, and infusion number. *J Rheumatol* 2004; 31: 1912-17.
16. Sandborn WJ, Hanauer SB. Infliximab in the treatment of Crohn's disease: a user's guide for clinicians. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2962-72.
17. Genovese MC, Covarrubias A, Leon G, Mysler E, Keiserman M, Valente R, et al. Subcutaneous abatacept versus intravenous abatacept: a phase IIIb noninferiority study in patients with an inadequate response to methotrexate. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 2854-64.
18. Brennan FR, Dill Morton L, Spindeldreher S, Kiessling A, Allenspach R, Hey A, et al. Safety and immunotoxicity assessment of immunomodulatory monoclonal antibodies. *mAbs* 2010; 2: 233-55.
19. Thalayasingam N, Isaacs JD. Anti-TNF therapy. *Best Pract Res Clin Rheum* 2011; 25: 549-67.
20. Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Moreland LW, Weisman MH, Birbara CA, et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 35-45.
21. Jani M, Barton A, Warren RB, Griffiths CEM, Chinoy H. The role of DMARDs in reducing the immunogenicity of TNF inhibitors in chronic inflammatory diseases. *Rheumatology* 2014; 53: 213-222.

22. Anderson PJ. Tumor necrosis factor inhibitors: clinical implications of their different immunogenicity profiles. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 34: 19-22.
23. Chirmule N, Jawa V, Meibohm B. Immunogenicity to therapeutic proteins: impact on PK/PD and efficacy. *AAPS J* 2012; 14: 296-302.
24. Van Walle I, Gansemans Y, Parren PW, Stas P, Lasters I. Immunogenicity screening in protein drug development. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7: 405-18.
25. Bendtzen K, Geborek P, Svenson M, Larsson L, Kapetanovic MC, Saxne T. Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 3782-9.
26. Baert F, Noman M, Vermeire S, Van Assche G, D Haens G, Carbonez A, et al. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003; 348: 601-8.
27. Bartelds GM, Krieckaert CL, Nurmohamed MT, van Schouwenburg PA, Lems WF, Twisk JW, et al. Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA* 2011; 305: 1460-8.
28. Ben-Horin S, Yavzori M, Katz L, Kopylov U, Picard O, Fudim E, et al. The immunogenic part of infliximab is the F(ab')<sub>2</sub>, but measuring antibodies to the intact infliximab molecule is more clinically useful. *Gut* 2011; 60: 41-8.
29. van Schouwenburg PA, van de Stadt LA, de Jong RN, van Buren EE, Kruithof S, de Groot E, et al. Adalimumab elicits a restricted anti-idiotypic antibody response in autoimmune patients resulting in functional neutralisation. *Ann Rheum Dis* 2012; 72: 104-9.
30. Dore RK, Mathews S, Schechtman J, Surbeck W, Mandel D, Patel A, et al. The immunogenicity, safety, and efficacy of etanercept liquid administered once weekly in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25: 40-6.
31. Sandborn WJ, Colombel JF, Enns R, Feagan BG, Hanauer SB, Lawrance IC, et al. International efficacy of natalizumab as active Crohn's therapy (ENACT-1) trial group; Evaluation of natalizumab as continuous therapy (ENACT-2) trial group. Natalizumab induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2005; 353: 1912-
32. Scagnolari C, Bellomi F, Turriziani O, Bagnato F, Tomassini V, Lavalpe V, et al. Neutralizing and binding antibodies to IFN- $\beta$ : Relative frequency in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with different IFN- $\beta$ ; Preparations. *J Interf Cytok Res* 2002; 22: 207-13.
33. Kivisakk P, Alm GV, Fredrikson S, Link H. Neutralizing and binding anti-interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) antibodies. A comparison between IFN- $\beta$ -1a and IFN- $\beta$ -1b treatment in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2000; 7: 27-34.
34. Ronnblom LE, Janson ET, Perers A, Oberg KE, Alm GV. Characterization of anti-interferon-alpha antibodies appearing during recombinant interferon-alpha 2a treatment. *Clin Exp Immunol* 1992; 89: 330-5.

35. Steis RG, Smith JW, Urba WJ, Venzon DJ, Longo DL, Barney R, et al. Loss of interferon antibodies during prolonged continuous interferon-alpha 2a therapy in hairy cell leukemia. *Blood* 1991; 77: 792-8.
36. Casadevall N, Nataf J, Viron B, Kolta A, Kiladjian JJ, Martin-Dupont P, et al. Pure red-cell aplasia and anti-erythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med* 2002; 346: 469-75.
37. Boven K, Knight J, Bader F, Rossert J, Eckardt KU, Casadevall N. Epoetin-associated pure red cell aplasia in patients with chronic kidney disease: solving the mystery. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: iii33-iii40.
38. Barbaud A, Granel F, Waton J, Poreaux C. How to manage hypersensitivity reactions to biological agents? *Eur J Dermatol* 2011; 21: 667-74.
39. Lecluse LL, Piskin G, Mekkes JR, Bos JD, de Rie MA. Review and expert opinion on prevention and treatment of infliximab-related infusion reactions. *Br J Dermatol* 2008; 159: 527-36.
40. Georgitis JW, Browning MC, Steiner D, Lorentz WB. Anaphylaxis and desensitization to the murine monoclonal antibody used for renal graft rejection. *Ann Allergy* 1991; 66: 343-47.
41. Stubenrauch K, Wessels U, Birnboeck H, Ramirez F, Jahreis A, Schleypen J. Subset analysis of patients experiencing clinical events of a potentially immunogenic nature in the pivotal clinical trials of tocilizumab for rheumatoid arthritis: Evaluation of an anti-drug antibody ELISA using clinical adverse event-driven immunogenicity testing. *Clin Ther* 2010; 32: 1597-609.
42. Timm V, Gruber P, Wasiliu M, Lindhofer H, Chelius D. Identification and characterization of oxidation and deamidation sites in monoclonal rat/mouse hybrid antibodies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010; 878: 777-84.
43. Munoz-Cano R, Carnes J, Sanchez-Lopez J, Saiz A, Bartra J, Lopez-Matas MA, et al. Biological agents: new drugs, old problems. *J All Clin Immunol* 2010; 126: 394-5.
44. Vultaggio A, Matucci A, Nencini F, Pratesi S, Parronchi P, Rossi O, et al. Anti-infliximab IgE and non-IgE antibodies and induction of infusion-related severe anaphylactic reactions. *Allergy* 2010; 65: 657-61.
45. Finkelman FD. Anaphylaxis: lessons from mouse model. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 506-15.
46. Vadas P, Gold M, Perelman B, Liss GM, Lack G, Blyth T, et al. Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *N Engl J Med* 2008; 358: 28-35.
47. Matucci A, Petroni G, Pratesi S, Nencini F, Maggi E, Vultaggio A. Immunogenicity of biological agents: basic knowledge and clinical implications. *Int Trends Immunity* 2014; 2: 11-21.
48. Maggi E, Vultaggio A, Matucci A. Acute infusion reactions induced by monoclonal antibody therapy. *Expert Rev Clin Immunol* 2011; 7: 55-63.
49. Han PD, Cohen RD. Managing immunogenic responses to infliximab: treatment implications for patients with Crohn's disease. *Drugs* 2004; 64: 1767-77.

50. Arimura K, Arima N, Ohtsubo H, Matsushita K, Kukita T, Ayukawa T, et al. Severe autoimmune thrombocytopenic purpura during interferon-alpha therapy for chronic myelogenous leukemia. *Acta Haematol* 2004; 112: 217-8.
51. Mohan N, Edwards ET, Cupps TR, Slifman N, Lee J-H, Siegel JN, et al. Leukocytoclastic vasculitis associated with tumor necrosis factor-alpha blocking agents. *J Rheumatol* 2004; 31: 1955-58.
52. Zeltser R, Valle L, Tanck C, Holyst MM, Ritchlin C, Gaspari AA. Clinical, histological, and immunophenotypic characteristics of injection site reactions associated with etanercept: a recombinant tumor necrosis factor  $\alpha$  receptor: Fc fusion protein. *Arch Dermatol* 2001; 137: 895-9.
53. Bourdage JS, Lee TN, Taylor JM, Willey MB, Brandt JT, Konrad RJ. Effect of double antigen bridging immunoassay format on antigen coating concentration dependence and implications for designing immunogenicity assays for monoclonal antibodies. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 39: 685-90.
54. Robert F, Ezekiel MP, Spencer SA, Meredith RF, Bonner JA, Khazaeli MB, et al. Phase I study of anti-epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2001;19: 3234-43.
55. Milowsky MI, Nanus DM, Kostakoglu L, Vallabhajosula S, Goldsmith SJ, Bander NH. Phase I trial of yttrium-90-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2522-31.
56. Ritter G, Cohen LS, Williams C Jr, Richards EC, Old LJ, Welt S. Serological analysis of human anti-human antibody responses in colon cancer patients treated with repeated doses of humanized monoclonal antibody A33. *Cancer Res* 2001; 61: 6851-9.

# **Adverse side-effects of biological agents: hypersensitivity reactions**

**Zorica Stojić-Vukanić\*, Nevena Arsenović-Ranin,  
Jelena Antić-Stanković, Marina Milenković**

University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Microbiology and  
Immunology, 450 Vojvode Stepe, 11221 Belgrade, Serbia

\*Corresponding author: e-mail zoricav@pharmacy.bg.ac.rs (Tel: + 381 11 3951224)

---

## **Summary**

Clinical use of various biological agents (protein-based products derived from biological sources, such as bacteria, fungi or mammalian cells) have greatly improved the treatment of a wide variety of diseases in humans. Nevertheless, a variety of their adverse reactions have been observed. These adverse effects have been classified in five types ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$ ). Type  $\beta$  adverse effect involves hypersensitivity reactions linked to the immunogenicity of biological agents. It is worth emphasizing that biological agents irrespective whether they contain xenoantigens may lead to development of anti-drug antibodies. Several drug-, patients-, disease- and treatment-related factors contribute to immunogenicity of biological agents. Anti-drug antibodies can influence either the efficacy of biological agent or induce hypersensitivity reactions. One of them is immediate infusion reaction, which occurs during or within one hour after biological agent infusion. This reaction may cause mild to severe clinical manifestations. Involvement of IgE- and non-IgE isotypes in hypersensitivity reactions are confirmed by novel methods for detecting anti-drug antibodies. This manuscript summarizes the current knowledge on factors influencing immunogenicity to biological agents, and points to the mechanisms underlying the drug-induced hypersensitivity reactions.

**Keywords:** immunogenicity, biological agents, anti-drug antibodies,  
adverse side-effects, monoclonal antibodies

---