

João Pedro de Almeida Frias Coutinho

Anticorpos Bi-específicos em Oncologia

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor João Canotilho Lage e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

João Pedro de Almeida Frias Coutinho

Anticorpos Bi-específicos em Oncologia

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor João Canotilho Lage e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, João Pedro de Almeida Frias Coutinho, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010125127, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de setembro de 2015.

(João Pedro de Almeida Frias Coutinho)

Índice

Lista de Acrónimos	2
Resumo	3
Abstract	3
Introdução.....	4
Anticorpos: estrutura e função	5
Anticorpos monoclonais e aplicação em oncologia.....	6
Progresso para anticorpos bi-específicos.....	8
Anticorpos bi-específicos.....	8
Anticorpos bi-específicos disponíveis atualmente.....	9
Anticorpos híbridos trifuncionais (Triomabs).....	9
Fragmentos variáveis de cadeia única (scFv).....	13
Anticorpos DNL.....	16
DVD-Ig TM	17
Limitações e desafios ainda por ultrapassar	17
Imogenicidade de construções de anticorpos bi-específicos	17
Tamanho da construção: Penetração tumoral e tempo de meia-vida na circulação.....	18
Dificuldades de fabrico e estabilidade	19
Perspectivas Futuras	19
Conclusão.....	21
Bibliografia	22

Lista de Acrónimos

- ADA - anticorpo anti-fármaco
- ADCC - citotoxicidade celular anticorpo-dependente
- ALL - *acute lymphocytic leukemia* - leucemia linfocítica aguda
- BiTE - *bispecific T-cell engager*
- bsAb - *bispecific antibody* - anticorpo bi-específico
- bsDb - *bispecific diabodies*
- C - regiões carboxiterminais constantes
- CD - células dendríticas
- CDC - citotoxicidade complemento-dependente
- CEA - *carcinoembryonic antigen*
- células NK - células *Natural Killer*
- CLL - *chronic lymphocytic leukemia* - leucemia linfocítica crónica
- CR - *complete remission* - remissão completa
- DART - "*Dual-Affinity-Retargeting*"
- DNL - "*Dock and Lock*"
- DVD-Ig™ - *dual variable domain immunoglobulin*
- EpCAM - molécula de adesão epitelial
- Fab - região de ligação ao antigénio
- Fc - fragmento cristalizável
- HAHA - anticorpos humanos anti-humanos
- HAMA - anticorpos humanos anti-murino
- HARA - anticorpos humanos anti-ratazana
- HcAbs - *heavy chain-only antibodies* - anticorpos de cadeia pesada
- IgG - imunoglobulina G
- mAb - *monoclonal antibody* - anticorpo monoclonal
- MRD - *minimal residual disease* - doença residual mínima
- PSMA - *prostate specific membrane antigen*
- scDb - *single chain diabodies*
- scFv - fragmentos variáveis de cadeia única
- TaFv - "*Tandem scFv*"
- V - regiões aminoterminais variáveis

Resumo

Com o avanço da tecnologia e a compreensão crescente acerca das doenças oncológicas surgem soluções cada vez mais complexas para a resolução de um dos grandes flagelos dos tempos modernos.

Esta monografia tem como objetivo a descrição de uma inovação terapêutica, os anticorpos bi-específicos, analisando o seu impacto clínico e a terapêutica já existente. Esta nova abordagem tem demonstrado resultados admiráveis e poderá apresentar alternativas terapêuticas relevantes no futuro.

Abstract

With the advancement of technology and rising comprehension of oncological diseases, increasingly complex solutions are developed to solve one of the greatest health threats of modern times.

This monograph aims to describe this therapeutic innovation, bispecific antibodies, analyzing its clinical impact and existing therapies. This new approach produced admirable results and may present new therapeutic alternatives in the future.

Introdução

Nos últimos anos, a compreensão das alterações genéticas e expressões fenotípicas características de tipos específicos de cancros permitiram aos investigadores identificar potenciais alvos terapêuticos, o que resultou no desenvolvimento de vários agentes antitumorais. Dentre estes, os anticorpos monoclonais (mAbs) representam, na atualidade, o grupo mais variado e bem estudado, além de serem um dos agentes terapêuticos mais utilizados em oncologia. Os mAbs são capazes de reconhecer e ligar-se a antígenos tumorais específicos (alvos), desencadeando respostas imunológicas. Desta forma, poupam as células normais e provocam efeitos menos tóxicos que a quimioterapia tradicional. Estes agentes atuam através de vários mecanismos, podendo, por exemplo, bloquear recetores ou fatores de crescimento essenciais à célula, induzir apoptose, ligar-se a alvos celulares e recrutar funções, como citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC) ou citotoxicidade complemento-dependente (CDC), e ainda distribuir partículas citotóxicas como os radioisótopos e as toxinas (1).

Os anticorpos monoclonais ocupam um nicho em ascensão no arsenal disponível para o tratamento oncológico. Tradicionalmente, os anticorpos eram desenvolvidos para bloquear moléculas sinalizadoras chave implicadas no crescimento tumoral. No entanto, os anticorpos são também capazes de recrutar mecanismos imunes adicionais, que poderão ser explorados para benefício clínico. Os anticorpos bi-específicos, constituídos por elementos derivados de dois anticorpos monoclonais incorporados numa só molécula, representam um desenvolvimento neste tipo de estratégia (2).

Anticorpos: estrutura e função

Os anticorpos são proteínas circulantes produzidas por animais vertebrados em resposta à exposição a estruturas não próprias conhecidas como antígenos. Um antígeno é qualquer substância que pode ser especificamente ligada a uma molécula de anticorpo ou receptor de linfócitos T. O reconhecimento do antígeno irá estimular a proliferação e diferenciação de linfócitos T. Os anticorpos são incrivelmente diversos e específicos na sua capacidade de reconhecimento de estruturas moleculares não próprias e são os mediadores primários da imunidade humoral contra todas as classes de microrganismos. Os anticorpos podem existir em duas formas: ligados a membranas na superfície de linfócitos B, atuando como receptores de antígenos, e anticorpos secretados por plasmócitos (formados através da diferenciação de células B após exposição ao antígeno), que se encontram na circulação, nos tecidos e nas mucosas, onde neutralizam toxinas, impedindo a entrada e disseminação de moléculas patogênicas e eliminando microrganismos. Os linfócitos B são as únicas células que sintetizam as moléculas de anticorpos. Após a exposição a um antígeno, as células B diferenciam-se em plasmócitos, que secretam anticorpos.

Todas as moléculas de anticorpos compartilham as mesmas características estruturais básicas, mas apresentam uma enorme variabilidade na região de ligação aos antígenos. Uma molécula de anticorpo apresenta uma estrutura central simétrica, composta por duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas. As cadeias pesadas e as cadeias leves são compostas por regiões aminoterminais variáveis (V), que participam no reconhecimento de antígenos, e regiões carboxiterminais constantes (C), as regiões C das cadeias pesadas medeiam as funções efetoras das moléculas de anticorpos.

As associações entre as cadeias das moléculas de anticorpos e as funções das diferentes regiões das imunoglobulinas foram deduzidas pela primeira vez por ensaios realizados por Rodney Porter, em que a IgG de coelhos era clivada por enzimas proteolíticas em fragmentos com propriedades estruturais e funcionais distintas. Quando a IgG de coelhos é tratada com a enzima papaína, formam-se três segmentos. Dois destes segmentos são idênticos um ao outro e compostos pela cadeia leve completa (VL e CL) associada a um fragmento VH-CH da cadeia pesada. Estes fragmentos mantêm a capacidade de se ligar a antígenos. O terceiro segmento, pela sua propensão a cristalização é denominado Fc (fragmento cristalizável). Quando a pepsina é utilizada em vez da papaína gera-se um fragmento denominado F[ab']₂ (Figura 1).

Anticorpos bi-específicos em oncologia

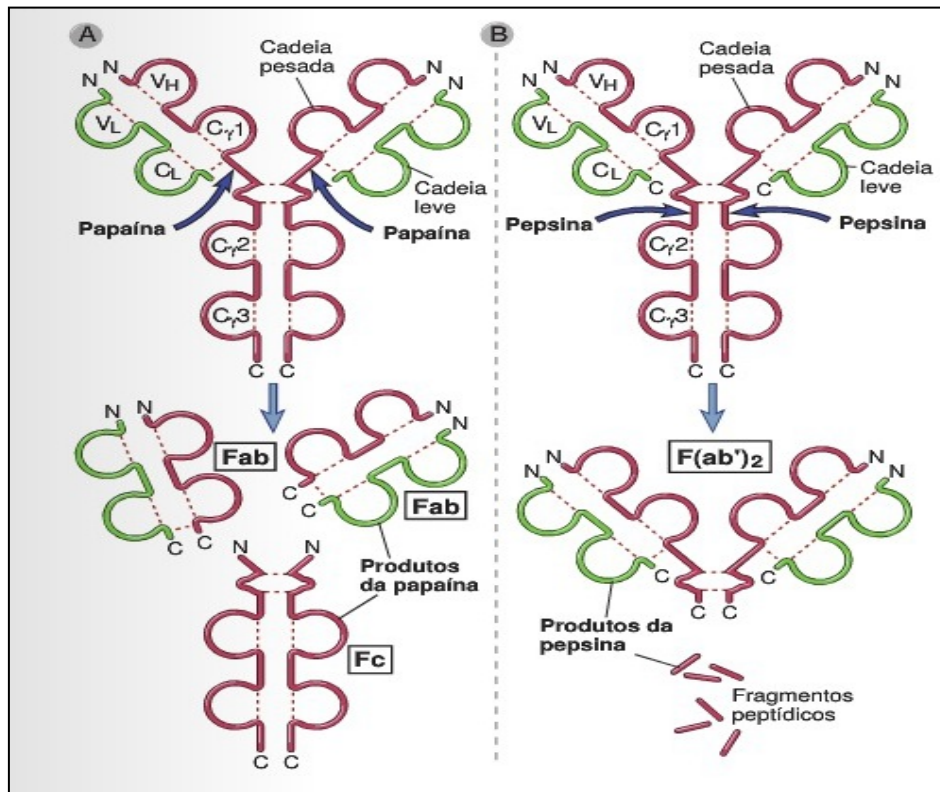


Figura 1: Elucidação da estrutura da imunoglobulina, identificação das suas regiões e descrição dos dois processos de clivagem que permitiram esta identificação das diferentes regiões. A: clivagem com papaína. B: clivagem com pepsina (3).

Anticorpos monoclonais e aplicação em oncologia

Um tumor de plasmócitos é capaz de produzir anticorpos de uma única especificidade pois é monoclonal. Na maioria dos casos, a especificidade do anticorpo derivado não é conhecida. No entanto, a descoberta de anticorpos monoclonais produzidos por estes tumores originou a ideia de que seria possível sintetizar anticorpos monoclonais similares, de qualquer especificidade desejada, por células imortalizadas produtoras de anticorpos de um animal imunizado com um antígeno conhecido. A técnica foi descrita por George Kohler e Cesar Milstein, em 1975, e provou ser um dos mais valiosos avanços na pesquisa científica e medicina clínica. Este método é baseado na fusão de linfócitos B de um animal imunizado (por exemplo murino), com uma linhagem celular de mieloma e no cultivo das células em condições nas quais as células normais, não fundidas e tumorais não conseguem sobreviver. As células fundidas resultantes são denominadas hibridomas, e cada

Anticorpos bi-específicos em oncologia

hibridoma produz apenas uma imunoglobulina. Os anticorpos secretados por estes clones de hibridomas são separados consoante a sua ligação ao antígeno de interesse, e um único clone é selecionado e expandido de acordo com o desejado. Os produtos destes clones são anticorpos monoclonais específicos para um único epítipo de um antígeno, ou mistura de antígenos.

Os anticorpos monoclonais possuem muitas aplicações práticas na pesquisa, diagnóstico e terapia médica. Os anticorpos monoclonais específicos para determinado tipo de tumor podem ser importantes na imunoterapia específica. Os anticorpos podem erradicar os tumores por meio dos mesmos mecanismos efetores utilizados na eliminação de microrganismos incluindo opsonização e fagocitose, ativação do sistema do complemento, e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (3).

O sucesso das terapêuticas com base em utilização de anticorpos monoclonais dependeu, em grande parte, do desenvolvimento de proteínas menos imunogênicas. A utilização de mAbs derivados de murinos provocava a formação de anticorpos humanos anti-murino (HAMA), toxicidades relacionadas e baixa potência. O desenvolvimento de anticorpos "humanizados", recorrendo, por exemplo, a fragmentos Fc humanos, foi um avanço crítico para o sucesso clínico destes produtos (4).

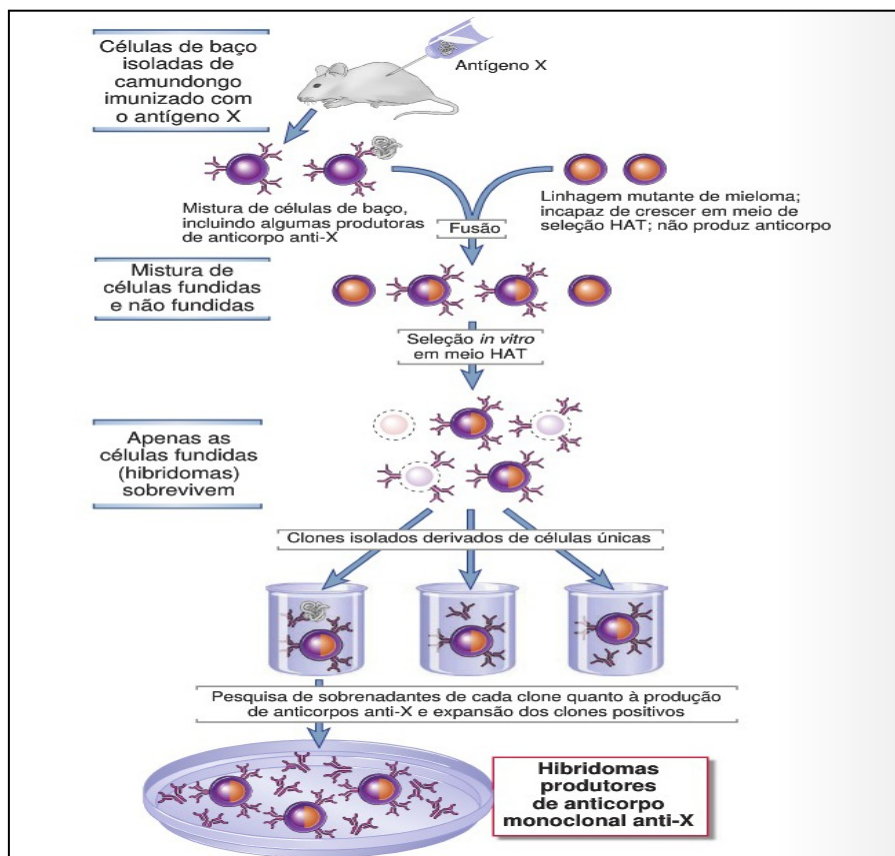


Figura 2: Método de obtenção de anticorpos monoclonais (3).

Progresso para anticorpos bi-específicos

Com o progresso na compreensão de doenças complexas como o cancro, as doenças inflamatórias e as doenças infecciosas, torna-se possível o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes. Uma das qualidades mais desejadas para as novas terapêuticas é a multiespecificidade que tornará possível o recrutamento de células efectoras para melhorar a eliminação dos alvos, prevenir cruzamento entre vias de sinalização paralelas ou redundantes para superar resistências, diferenciar as células normais das células alvo melhorando eficácia e segurança e potencialmente provocar efeitos sinérgicos. Os anticorpos bi-específicos, constituídos por uma molécula capaz de se ligar a dois alvos, destacaram-se recentemente como um grupo terapêutico emergente com capacidade de dar resposta a estas necessidades (5).

Anticorpos bi-específicos

Os anticorpos bi-específicos (bsAbs) podem ser, na generalidade, divididos em duas classes: os que contêm região Fc e os que não a possuem. Aqueles que contêm região Fc são moléculas maiores e frequentemente com um tempo de semi-vida maior (minimizando a *clearance* renal). Existe uma variedade considerável de construções contendo região Fc. São geralmente produzidos pelas técnicas convencionais de produção de anticorpos monoclonais.

Os bsAbs que não possuem regiões Fc são frequentemente de tamanho menor. São frequentemente produzidos por fermentação bacteriana. Possuem tempo de semi-vida reduzido devido ao seu menor tamanho (4).

Anticorpos bi-específicos disponíveis atualmente

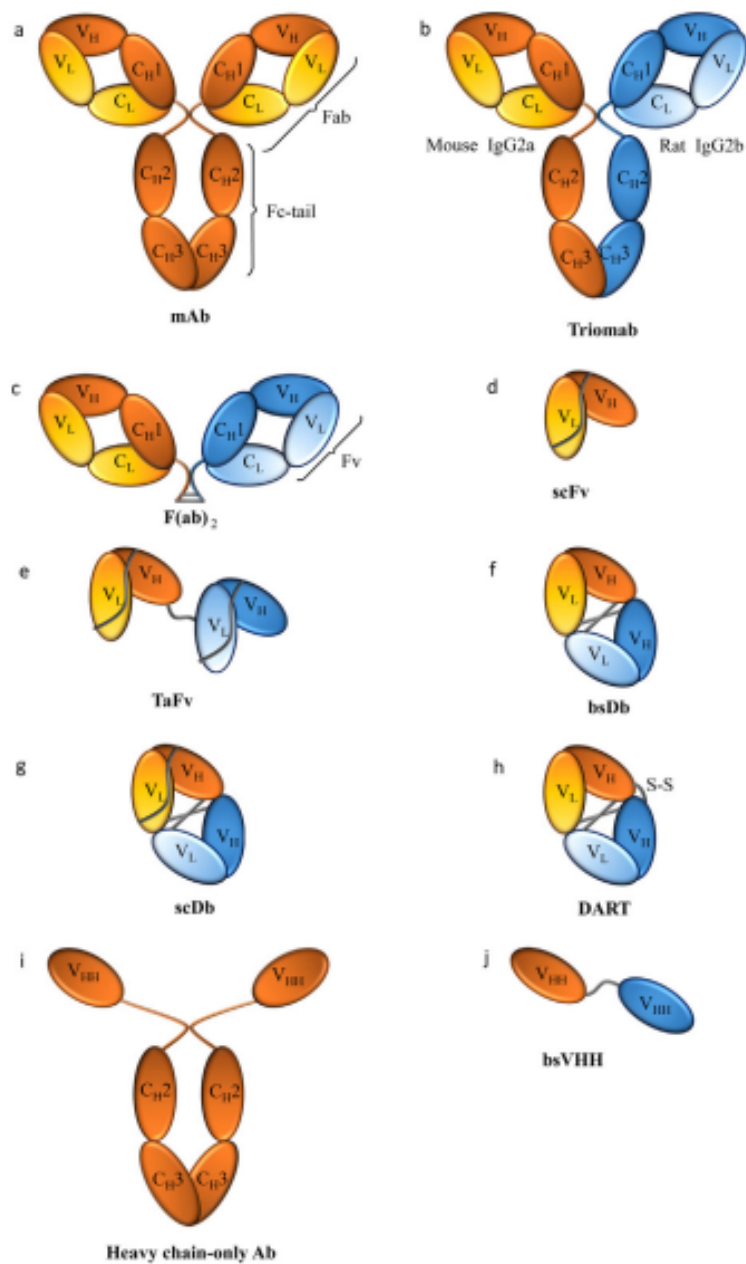


Figura 3: Diferentes construções de anticorpos biespecíficos (6).

Anticorpos híbridos trifuncionais (Triomabs)

Os Triomabs representam provavelmente um dos sucessos mais impressionantes e inesperados no campo dos anticorpos bi-específico (7).

Anticorpos bi-específicos em oncologia

São formados através da combinação de duas metades de anticorpos distintos, um IgG2a de rato com especificidade tumoral e um IgG2a de rato específico para CD3 (6).

O CD3 é um complexo proteico que se associa com o TCR (receptor de células T), formando o complexo TCR e originando um sinal de ativação dos linfócitos T.

Desenvolvidos pela Trion Pharma, são produzidos através de quadromas (hibridoma híbrido). Estes quadromas originam moléculas *IgG-like*, com o emparelhamento correto entre cadeias pesadas e leves porque as cadeias específicas das espécies emparelham naturalmente entre si. Possuem três funcionalidades visto que o seu alvo é um antígeno tumoral, recrutam células efetoras através de ligação a CD3, e podem ativar células *Natural Killer* (NK), macrófagos, monócitos e células dendríticas (CD) através da ligação da região Fc aos receptores Fc γ (8).

Os receptores Fc γ , são os receptores para a cadeia pesada de anticorpos IgG e são os mais importantes para a fagocitose de partículas opsonizadas. Fazem parte dos receptores Fc expressados pelos leucócitos, que se ligam as regiões constantes dos anticorpos, e desse modo, promovem a fagocitose de partículas e libertam sinais que estimulam a destruição de microrganismos e induzem inflamação (3).

Uma série de bsAbs foi construída a partir desta tecnologia, incluindo bsAbs com afinidade para a molécula de adesão epitelial (EpCAM), HER2, CD20, etc. (8).

Catumaxomab (Removab[®])

Um Triomab anti-EpCAM-antiCD3 foi o primeiro Triomab estudado em doentes (6).

Formado através da combinação de IgG anti-CD3 de rato e IgG2b anti-EPCAM também de rato. Como contém um domínio Fc é trifuncional, refletindo as três ligações que é capaz de fazer. Muitos tumores sólidos exibem expressão de EPCAM sobre-regulada, incluindo todos os tipos que podem dar origem a ascites malignas (2).

Tem como alvo o antígeno tumoral EpCam e foi o primeiro Triomab a ser produzido. O EpCAM (CD326) é expresso em essencialmente todos os adenocarcinomas humanos, certos carcinomas das células escamosas, retinoblastoma e carcinoma hepatocelular. O EpCAM também é expresso em células normais, mas essencialmente localizado em espaços intracelulares onde as células epiteliais formam *tight junctions*. Pensa-se que é mais acessível por anticorpos no tecido tumoral por estar distribuído de forma

Anticorpos bi-específicos em oncologia

homogénea na superfície da célula tumoral. Além disso, muito regularmente encontra-se em células estaminais tumorais, tornando-o um marcador tumoral apetecível.

Num ensaio clínico de fase I/II, doentes com cancro do ovário com ascites malignas foram tratados com administração intraperitoneal do triomab, 22 dos 23 doentes não necessitaram de paracentese entre a última infusão e o final do estudo no dia 37. Verificou-se redução das células EpCAM malignas em ascites. Um estudo piloto de fase 2/3 envolvendo 258 doentes demonstrou uma melhoria estatisticamente significativa do *endpoint* primário, sobrevivência sem necessidade de punção. Os doentes a receber catumoxomab obtiveram melhores resultados em comparação com os que recebiam paracentese. Abaixo da dose máxima tolerada, os efeitos secundários incluindo febre, vômitos e náuseas, eram previsíveis, limitados, controláveis e maioritariamente passageiros. Consequentemente, a Comissão Europeia aprovou este fármaco para o tratamento de ascites malignas em doentes com carcinomas EpCAM-positivos em casos em que a terapia estandardizada não está disponível ou já não é possível. Esta aprovação constituiu uma etapa importante no campo dos anticorpos bi-específicos (7).

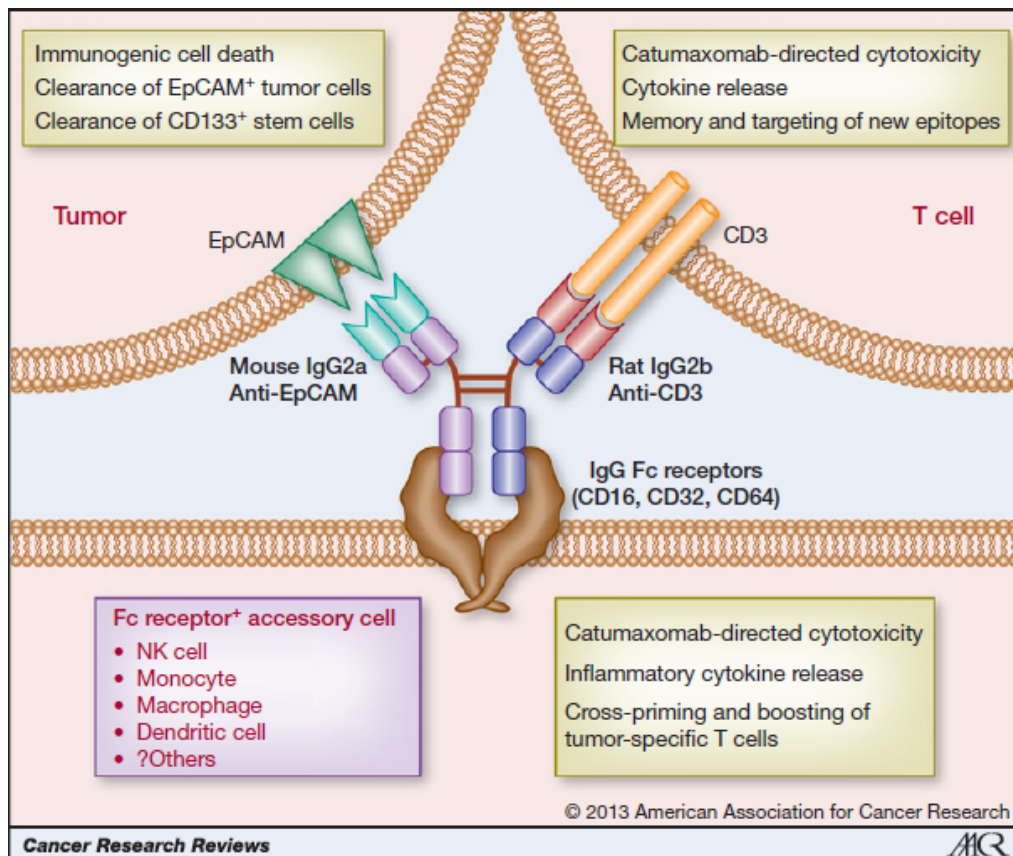


Figura 4: Ligações e ações do catumaxomab (2).

Anticorpos bi-específicos em oncologia

Ertumaxomab (Rexomun®)

Um Triomab anti-HER2-anti-CD3 demonstrou iniciar citotoxicidade imuno mediada eficaz contra linhas tumorais expressando HER2 *in vitro* e capacidade de induzir lise tumoral de células tumorais expressoras de HER2 em pequenas quantidades onde o trastuzumab, um mAb específico para HER2, não foi eficaz (6). O HER2, é um marcador do cancro da mama bem caracterizado. O Ertumaxomab possui a mesma porção Fc híbrida que o catumaxomab e demonstra mesma eficácia *in vitro*. Esta diferença entre a eficácia dos dois pode provavelmente ser explicada pelo mecanismo de ação destes anticorpos. O trastuzumab provoca ADCC mediado por células NK enquanto o ertumaxomab provoca morte mediada pelas células T e interação entre as células T e as células acessórias, como demonstrado pela libertação de citocinas como a IL-6, INF γ e TNF α .

Num ensaio clínico inicial os doentes com ascites malignas devido a carcinomatose peritoneal, a administração de doses baixas de ertumaxomab provocou eliminação completa das células tumorais em ascites, e desaparecimento da acumulação das ascites em todos os doentes (7).

Bi20 (FBTA05 ou Lymphomun™)

Um Triomab anti-CD20-anti-CD3. (7) Utiliza a mesma porção Fc híbrida do que o cartumaxomab e ertumaxomab e o seu alvo é o CD20. O CD20 é expresso em todas as fases do desenvolvimento das células B desde as pré-células B até às células-memória, mas não nas células pro-B nem nas células do plasma, sendo assim um alvo apetecível para o tratamento de patologias malignas das células B. *In vitro*, demonstrou ser capaz de mediar lise de linhas de células B malignas e de células B com baixa expressão de CD20 derivadas de doentes com CLL (*chronic lymphocytic leukemia*) de forma eficiente e específica. Em comparação, o rituximab, anticorpo monoclonal cujo alvo é o CD20, demonstrou uma erradicação de células B significativamente mais baixa. Num estudo piloto, o Bi20 foi administrado a seis doentes com CLL ou linfoma altamente maligno recorrente depois de transplante de células estaminais (9). Todos os doentes refratários com tratamento com alemtuzumab e rituximab demonstraram resposta clínica e hematológica, demonstrando que há potencial terapêutico elevado com este Triomab (7).

Anticorpos bi-específicos em oncologia

Fragmentos variáveis de cadeia única (scFv)

O fragmento Fv é a unidade mais pequena da molécula de imunoglobulina com função de ligação a antígenos. Um anticorpo no formato ScFv (*single chain fragment variable*) consiste em regiões variáveis das cadeias leves e pesadas que são unidas por um ligador peptídico flexível que pode ser facilmente expresso em forma funcional na *E.Coli*, permitindo a engenharia de proteínas melhorar as propriedades do scFv tais como o aumento da afinidade ou a alteração da especificidade.

Os anticorpos monoclonais no formato scFv são preferíveis aos anticorpos no seu formato intacto devido ao seu menor tamanho e reduzida possibilidade de desenvolver resposta imune anti-rato. Além disso, é possível desenhá-los como anticorpos bi-específicos trabalhando como imunotoxinas (10). Dois formatos baseados em scFvs foram extensivamente estudados, TaFv (*Tandem scFv*) e bsDb (*bispecific diabodies*) (6).

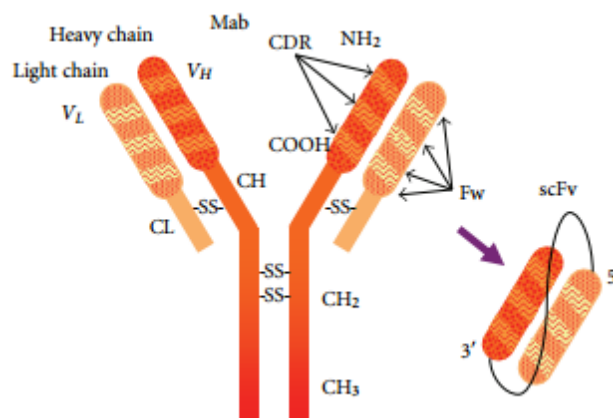


Figura 5: Estrutura do scFv em comparação com um mAb inteiro (10).

MM-III

A família HER dos recetores tirosina cinase (RTK) possui quatro membros, HER1/EGFR, HER2, HER3, HER4. A ligação e atividade consequente pode resultar em crescimento tumoral. O HER2 é sobreexpresso em 30% dos carcinomas mamários. O HER3 está também envolvido no desenvolvimento e progressão do cancro da mama. Anticorpos monoclonais que se ligam e interferem com a sinalização destas moléculas como o cetuximab e o trastuzumab são utilizados com sucesso na terapêutica. O desenvolvimento

Anticorpos bi-específicos em oncologia

de bsAbs capazes de se ligar a mais do que um membro desta família tem como objetivo a melhoria da eficácia terapêutica (8).

Um estudo de fase I, com um anticorpo bi-específico composto por dois scFVs que se ligam tanto ao HER2 como ao HER3 e ligados entre si e a uma molécula de albumina humana para modular a sua farmacocinética na ausência de região Fc, demonstrou que o MM-111 se liga e forma complexos com HER2 e HER3 inibindo a proliferação do tumor *in vitro* e *in vivo* (11).

Tandem scFv (TaFv)

Por ligação covalente de dois scFVs com um ligador peptídico flexível com orientação em tandem, pode ser formado um TaFv bi-específico. É espectável que a orientação flexível entre os dois domínios de ligação melhore a ligação simultânea aos alvos, enquanto que o seu reduzido tamanho (55-60 kDa) permite uma penetração rápida no tumor.

Os anticorpos BiTE (bispecific T- cell engagers) são uma nova classe de anticorpos bi-específicos de cadeia única (TaFv) que promovem a realocação dos linfócitos T para antígenos tumorais de superfícies pré-selecionadas ou células tumorais (12). Os BiTE provocam uma resposta citotóxica elevada, em concentrações de pico a femtomolar, na ausência de co-estimulação. Demonstraram ser capazes de provocar lise tumoral em rácio efetor-alvo mais baixos do que os triomabs (6).

Blinatumomab (MT103)

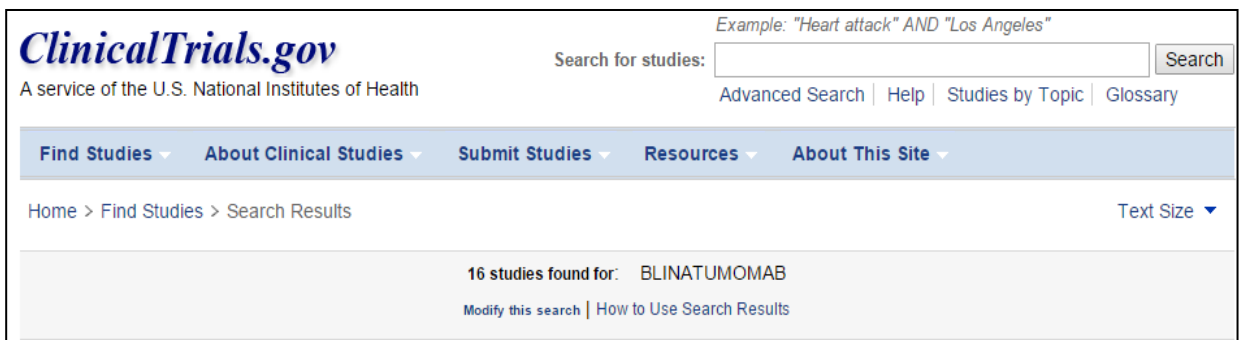
O Blinatumomab é um anticorpo bi-específico anti-CD19/anti-CD3 para o tratamento de doenças hematológicas malignas das células da linhagem B. É desenhado para se ligar transitoriamente a linfócitos T memória citotóxicos efetores e eliminar as células B malignas, que expressam uniformemente CD19.

Tem havido resultados promissores em ensaios clínicos de fase II com o blinatumomab indicando que é uma molécula com alta eficácia (13). Numa recente análise a longo prazo de um ensaio clínico de fase II (mediana de *follow up* de 33 meses) o Blinatumomab induziu 80% da taxa de resposta MRD (*minimal residual disease*) em adultos (16 a 20 doentes com linfócitos B ALL e MRD persistente ou recidivante) (14). Induziu remissão completa (CR) em três casos de doentes pediátricos com ALL das células B recidivante ou

Anticorpos bi-específicos em oncologia

refratária depois de um HSCT (*hemathopoietic stem cell transplant*) alogénico (15). Um ensaio clínico pediátrico de fase I/II em crianças com ALL das células B recorrente ou refratária resultou numa taxa de resposta global de 41% com 32% de taxa CR (16). O evento adverso mais significativo foi toxicidade reversível do sistema nervoso central, incluindo encefalopatia, tremores e afasia.

O Blinatumomab tem uma semi-vida curta (2 a 3 horas) devido a rápida *clearance* renal, deste modo, a via de administração ideal consiste na infusão contínua durante 4 a 8 semanas através de uma mini bomba portátil, criando um desafio para o tratamento pediátrico. A dependência das células imunes circulantes também limita a capacidade de combinar este tratamento com o tratamento citotóxico padrão e terapias mielossupressivas. Contudo, promete ser uma molécula promissora na gestão da doença MRD positiva (13).



The image shows a screenshot of the ClinicalTrials.gov website. At the top left is the logo 'ClinicalTrials.gov' with the tagline 'A service of the U.S. National Institutes of Health'. To the right is a search bar with the text 'Search for studies:' and a 'Search' button. Above the search bar is an example search query: 'Example: "Heart attack" AND "Los Angeles"'. Below the search bar are links for 'Advanced Search', 'Help', 'Studies by Topic', and 'Glossary'. A navigation menu contains 'Find Studies', 'About Clinical Studies', 'Submit Studies', 'Resources', and 'About This Site'. Below the menu is a breadcrumb trail: 'Home > Find Studies > Search Results' and a 'Text Size' dropdown. The main content area displays '16 studies found for: BLINATUMOMAB' and links for 'Modify this search' and 'How to Use Search Results'.

Figura 6: Resultados disponíveis para estudos com Blinatumomab.

Outros TaFv

TaFvs cujo alvo são EpCAM e PSMA (*prostate specific membrane antigen*) entraram em ensaios clínicos de fase I em cancro epitelial e da próstata, respetivamente. Outros TaVs estão a ser avaliados pre-clinicamente, incluindo construções cujo alvo é EGFR, CEA (*carcinogenoembryonic antigen*) e CD33 (6).

bsDb (*bispecific diabodies*)

Em contraste com os TaFvs, os bsDbs são formados por ligações não-covalentes entre dois scFvs, consistindo em cadeias leves e pesadas de diferentes Abs-pais, conectados por um ligante peptídico muito curto permitindo interações intra-cadeias.

Anticorpos bi-específicos em oncologia

Estes *diabodies* possuem os seus domínios variáveis orientados de forma oposta e são bastante pequenos e rígidos (~60kDa). Devido ao facto de as cadeias individuais não estarem covalentemente associadas, as ligações dos domínios Vh e Vl são um fator limitante na estabilidade da molécula, possivelmente culminando em desintegração, dimerização e formação de agregados.

A adição de um ligador peptídico pode combater esta limitação formando scDB (*single chain diabodies*). Alternativamente, introduzindo uma ligação dissulfito entre o C-terminal de cada scFv, resulta na formação das moléculas DART (*Dual-Affinity-Retargeting*).

Estudos pré-clínicos de um bsDb anti-PSMA-anti-CD3 demonstraram eficácia na lise de células cancerígenas da próstata expressoras de PSMA pelas células CD3+ *in vitro* e na inibição do crescimento do cancro da próstata em ratos. Resultados similares foram apresentados para anti-CD-19-anti-CD3 e anti-EFGR-anti-CD3.

A potência dos DARTs foi demonstrada num estudo de comparação com o blinatumomab, possuindo domínios Fv CD3 e CD19 idênticos. A molécula DART teve melhor *performance* tanto na indução da lise de células B como na ativação e proliferação das células T (6).

Anticorpos DNL

O método "Dock and Lock" (DNL) representa uma forma conveniente e eficiente de criar anticorpos bi-específicos. Consiste na associação de um peptídeo derivado da subunidade regulatória da proteína cinase humana dependente de cAMP (PKA) com um peptídeo derivado dos domínios de ligação das proteínas A cinase (AKAs). Durante a associação formam-se duas ligações dissulfídicas e consequentemente um complexo covalente que é estável por mais de uma semana a 37°C em plasma humano. Esta técnica pode ser usada para criar qualquer tipo de bsAb mas tem sido usada para criar moléculas bi-específicas para radioimunoterapia.

O primeiro bsAb construído usando esta técnica foi uma molécula de 157 kDa sem fragmento Fc e com dois fragmentos Fab derivados de anticorpos monoclonais humanizados. A estratégia consiste em criar uma especificidade para um agente de radioterapia e para um antígeno tumoral. Após ligação do bsAb (aproximadamente 1 hora) é injetado o agente de

Anticorpos bi-específicos em oncologia

quimioterapia que se irá ligar no seu local correspondente. A estratégia aparenta ter elevado potencial (7).

DVD-Ig™

A molécula bi-específica e tetravalente conhecida como *dual variable domain immunoglobulin* (DVD-Ig) é composta por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, *IgG-like*. No entanto, tanto a cadeia pesada como a cadeia leve possuem um domínio variável extra conectado através de um ligante flexível nas regiões N-terminais de um anticorpo monoclonal existente. A molécula resultante possui quatro regiões de ligação a antígenos. Podem ser produzidas e purificadas até a homogeneidade em grandes quantidades, possuem propriedades farmacológicas idênticas às *IgG* convencionais e demonstram eficácia *in vivo* em vários modelos com ratos (17).

Um estudo com o objetivo de criar uma DVD-Ig anti-ErbB2, molécula da família dos recetores das tirosina cinases (RTKs), verificou que esta construção é tão eficaz ou superior aos anticorpos monoclonais utilizados com este efeito, podendo trazer ainda mais benefícios. A sinalização pela molécula de ErbB2 tem um papel chave no desenvolvimento de certas doenças como o cancro. Por exemplo, uma porção significativa dos cancros do ovário, mamário e gástrico possuem sobreexpressão de ErbB2 ou amplificação do gene (18).

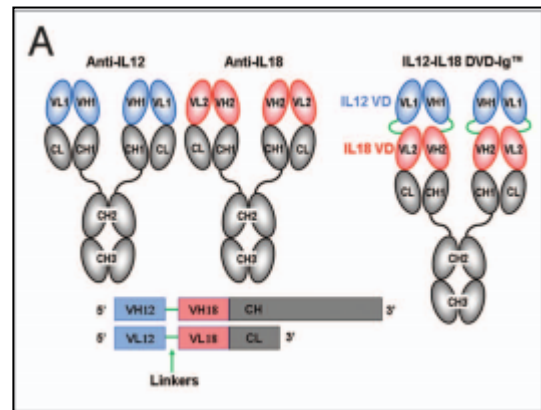


Figura 7: Esquema elucidativo da formação de uma molécula DVD-Ig (17).

Limitações e desafios ainda por ultrapassar

Imunogenicidade de construções de anticorpos bi-específicos

Historicamente, os mAbs derivados de murinos e ratas têm sido associados a reduzido tempo de semi-vida quando administrados repetidamente, devido à formação do complexo neutralizante HAMA/HARA e suscetibilidade do Síndrome de libertação de

Anticorpos bi-específicos em oncologia

citocinas (CRS) nos doentes. De facto, como discutido anteriormente, a dose I.V de triomabs foi limitada pelos efeitos adversos imunológicos, e a formação do HAMA/HARA pode restringir a repetição dos ciclos de tratamento. Apesar de a humanização geralmente limitar a formação do anticorpo anti-fármaco (ADA) não o pode fazer completamente como demonstrado pelo anticorpo monoclonal andalimumab anti-TNF α , onde mais de 89% dos doentes desenvolveram anticorpos neutralizantes humanos anti-humanos (HAHA). Como a ligação direta a células efectoras através de, por exemplo, Fc γ R pode também provocar CRS, os efeitos adversos imunológicos provocados pelos mAbs nem sempre podem ser prevenidos.

Como foi verificado em estudos *in vitro* com o catumaxumab, direcionamento simultâneo para células Fc γ R⁺ e linfócitos T pode também resultar em ligação cruzada e ativação dessas células na ausência de antígeno-alvo e assim limitando a eficácia pretendida na atividade anti-tumoral destas células.

Em relação aos BiTEs acredita-se que o seu tamanho reduzido os torna menos imunogénicos, mas houve algumas preocupações em relação a ativação contínua das células T durante o tratamento com estas moléculas, com vários doentes a desenvolver resposta imune descontrolada. Além, disto a ativação persistente de células T pode induzir anergia, apesar de durante o tratamento se tenha observado supressão contínua das células B indicando que a função das células T se encontrava preservada (6).

Tamanho da construção: Penetração tumoral e tempo de meia-vida na circulação

O domínio Fc dos Abs melhora o tempo de semi-vida, em dez ou mais dias. Sendo assim, a remoção do domínio Fc pode provocar remoção rápida da circulação. Além disto, os bsAbs de tamanho pequeno sofrem facilmente filtração renal e degradação devido ao limiar da barreira de filtração glomerular (40/50 Da). Para manter níveis plasmáticos estáveis era necessária infusão contínua dos BiTEs, criando a necessidade de desenvolver métodos para aumentar o tempo de semi-vida como a pegilização e N-glicosilação. No entanto, as construções de pequeno tamanho apresentam maior capacidade de penetração tumoral, o que os pode tornar indicados para o tratamento de grandes tumores. Sendo assim, a concentração plasmática pode não refletir a sua eficácia (6).

Anticorpos bi-específicos em oncologia

Dificuldades de fabrico e estabilidade

A produção de triomabs, tal como todos os anticorpos, requer células hospedeiras de mamíferos, o que aumenta os custos e tempo de produção.

Os scFVs podem ser expressos em bactérias, mas os TaFVs tendem a formar agregados insolúveis nas bactérias devido a dobra incorreta e requerem produção em células de mamíferos com elevado rendimento.

Nos bsDBs a expressão de duas cadeias polipeptídicas numa única célula pode produzir homodímeros inativos ao longo dos heterodímeros ativos. Através da introdução de uma ligação peptídica adicional (como ScDBs) ou ligações dissulfídicas (como nos DARTs) pode ser prevenida a homodimerização. Enquanto os ScDBs podem ser expressos em bactérias, as ligações dissulfídicas reduzem o rendimento das bactérias.

Apesar da estabilidade a longo prazo dos TaFvs ainda poder requerer engenharia adicional, os scDBs são 2 a 3 vezes mais estáveis em plasma humano a 37°C. As propriedades biológicas dos scDBs podem ser fortemente afetadas por variações mínimas na sua composição (ex: diferenças no comprimento do ligante ou outros domínios variáveis) (6).

Perspetivas Futuras

Avanços na engenharia de bsAb marcaram uma nova era de tratamento com base em anticorpos o que resultou numa variedade construções que demonstraram ser eficazes em induzir morte de células-alvo por envolvimento de células efectoras. De facto, ensaios clínicos e pré-clínicos demonstraram resultados que não são uma mera melhoria do que foi obtido pelos anticorpos convencionais, mas um repertório terapêutico completamente novo. No entanto, existe ainda necessidade de melhoria das construções em termos de tempo de semi-vida, estabilidade e penetração tumoral assim como na especificidade em relação aos seus alvos (6).

No desenvolvimento de bsAbs, a estratégia mais utilizada para recrutar e ativar os linfócitos T e provocar lise celular é através da ligação ao CD3. Esta estratégia é atrativa devido ao seu potencial destrutivo mas possui risco associado como libertação exacerbada de citocinas em voluntários saudáveis. Novas estratégias, para evitar efeitos adversos, podem passar por escolher como alvo outras moléculas específicas com efeitos antitumorais conhecidos como as células NK que representam um subconjunto de células citotóxicas

Anticorpos bi-específicos em oncologia

linfóides reguladas por sinalização positiva ou inibitória por recetores celulares de superfície (6).

Como demonstrado, as construções de bsAbs podem induzir a realocização de células efetoras do sistema imune e provocar respostas terapêuticas, no entanto as melhorias a ultrapassar e as dificuldades encontradas parecem praticáveis. Com base nas limitações discutidas, as propriedades ideais das construções de bsAbs devem ser: facilidade de fabrico a custos relativamente baixos, estabilidade elevada, pequeno tamanho de modo a permitir penetração tumoral homogénea mas ainda assim possuírem um tempo de semi-vida suficiente para provocar efeito terapêutico, a afinidade elevada com as células alvo, uma ativação estritamente dependente do seu alvo e ausência de imunogenicidade.

Uma inovação que pode possuir muitas das características acima mencionadas são os domínios variáveis de anticorpos de cadeia pesada (6).

Em contraste com a estrutura da IgG em mamíferos, os membros da família *Camelidae* possuem ainda isótopos das IgG compostos por cadeias pesadas apenas. Estas estruturas completamente funcionais mantêm capacidades elevadas de ligação, semelhantes às obtidas com os mAbs normais, mesmo sem a cadeia leve. Devido à facilidade de imunização, estes anticorpos de cadeia pesada (HcAbs) são maioritariamente obtidos da família *Camelidae*, apesar de também serem encontrados em peixes cartilagosos. O domínio variável da cadeia pesada dos HcAbs (o VHH ou *nanobody*) que

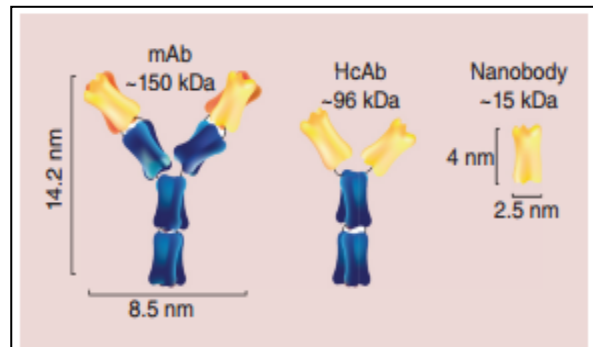


Figura 8: Comparação entre o tamanho de um *nanobody* e um mAb (19).

é o domínio responsável pela ligação ao antígeno, é plenamente funcional e é nos tempos correntes, o fragmento de ligação a antígeno natural de menor tamanho (19).

Até agora, nenhum VHH bi-específico foi avaliado para redirecionamento de células efetoras, mas devido às características que demonstram podem provar ser consideravelmente eficientes. Estudos futuros irão determinar se as suas propriedades se traduzem na clínica (6).

Conclusão

Os resultados clínicos obtidos por estas novas estratégias não são uma mera melhoria comparados com aqueles que foram obtidos pelos anticorpos aprovados para a terapêutica, mas representam um verdadeiro salto em termos de eficácia terapêutica. Pela primeira vez, a possibilidade de realmente conseguir curar doentes usando anticorpos parece estar ao nosso alcance (7).

A sua capacidade de reconhecer dois alvos permite que novas hipóteses sejam testadas em comparação com os mAbs tradicionais (5).

Investigações futuras irão revelar até que ponto os bsAbs irão ter impacto no tratamento de doenças oncológicas. Indubitavelmente, o interesse crescente neste campo irá resultar em múltiplos compostos a entrar em ensaios clínicos, num futuro próximo, que possibilitarão aumentar o conhecimento acerca destes compostos (6).

Bibliografia

1. DEL DEBBIO CB, TONON LM, SECOLI SR - Terapia com anticorpos monoclonais: uma revisão de literatura. *Revista Gaúcha de Enfermagem* 28.1(2007),133-42.
2. MAHER, JOHN e A. ADAMI, ANTONELLA - Antitumor Immunity: Easy as 1, 2, 3 with Monoclonal Bispecific Trifunctional Antibodies? *Cancer Res.* 73,18 (2013), 5613-7.
3. ABBAS, A. - *Imunologia Celular e Molecular*. 7º ed.
4. ADDLER, M., DIMITROV, D.- Therapeutic antibodies against cancer. *Hematol Oncol Clin North AM.* 26.3 (2012) 447-481.
5. XU, I. LEE, J. TRAN, C. HEIBECK, T.H. WANG, W. YANG,J. STAFFORD, R. STEINER,A. SATO, A. HALLAM,T. YIN,G. - Production of bispecific antibodies in "knobs-into-holes" using a cell-free expression system. *mAbs* 7.1 (2015) 231-242.
6. LAMERIS, R. DE BRUIN, R.C.G. SCHNEIDERS, L. F. HENEGOUWEN, P. VERHEUL, H. GRUIJL,T. VLIET, J. - Bispecific platforms for cancer immunotherapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 92 (2014) 153-165.
7. CHAMES, P. e BATY, DANIEL- Bispecific antibodies for cancer therapy The light at the end of the tunnel? *mAbs* 1:6 (2009), 539-547.
8. WEIDLE, U. KONTERMANN, R. BRINKMANN, U. - Tumor-Antigen-Binding Bispecific Antibodies for Cancer Treatment. *Semin Oncol* 41 (2014) 653-660.
9. BUHMANN,R. SIMOES,B. STANGLMAIER,M. YANG,T. FALTIN,M. ET AL. - Immunotherapy of recurrent B-cell malignancies after allo-SCT with Bi20(FBTA05), a trifunctional anti-CD3-anti-CD20 antibody and donor lymphocyte infusion. *Bone Marrow Trans.*43(2009)383-97.
10. AHMAD, Z. YEAP, S. ALI, A. HO, W. ALITHEEN, N. HAMID, M. - scFv Antibody: Principles and Clinical Application. *Clinical and Developmental Immunology* (2012).
11. MCDONAGH, CF. HODGE,KM. HORAK,E. ET AL. - Antitumor Activity of a Novel Bispecific Antibody That Targets the ErbB2/ErbB3 Oncogenic Unit and Inhibits Heregulin-Induced Activation of ErbB3. *Mol Cancer Ther.* 11 (2012) 582-93.
12. ADVANI, A. - New immune strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: antibodies and chimeric antigen receptors. *Hematology, American Society of Hematology* (2013).
13. VIEDI, A. ZIEGLER, D. . Antibody therapy for pediatric leukemia. *Frontiers in Oncology.* 4, 82 (2014).

14. TOPP, MS. GOKBUTN, ZUGMAIER G. DEGENHARD, E. GOEBELER, ME. KLINGER, M. ET AL. - Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase II study of blinatumomab in patients with MRD in B.lineage ALL. *Blood*.120(2012) 5185-7.
15. HANDERGRETINGER,R. ZUGMAIER,G. HENZE,G. KREYENBERG,H. LANG,P. VON STACKELBERG,A. - Complete remission after blinatumomab-induced donor T-cell activation in three. *Leukemia*. 25 (2011) 181–184.
16. ZUGMAIER,G. HANDGRETINGER, R. LOCATELLI,F. RIZZARI,C. TRIPPET,TM. BORKHARDT,A. ET AL. - A Phase I/2 Study Of Blinatumomab In Pediatric Patients With Relapsed/Refractory B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 122.70 (2013).
17. JAKOB, C.G. EDALJI,R. JUDGE, A. DIGIAMMARINO, E. LI, Y. GHAYUR,T. - Structure reveals function of the dual variable domain immunoglobulin (DVD-Ig) molecule. *mAbs*. 5.3 (2013) 358-363.
18. GU, J. WANG, J. CHANG,Q. LU, X. WANG,J. CHEN,M. GHAYUR,T. GU,J. - Identification of Anti-ErbB2 Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig) Proteins with Unique Activities. *PLOS One*. 9.5 (2014).
19. KIJANKA, M. DORRESTEIJN, B. OLIVEIRA,S. HENEGOUWEN,P. - Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. *Nanomedicine (Lond.)* 10.1 (2015) 161-174.
20. RIETHMÜLLER, G.- Symmetry breaking: bispecific antibodies, the beginnins, and 50 years on. *Cancer Immunity* 12,12 (2012).