

ARTÍCULO DE REVISIÓN

ANTICUERPOS MONOCLONALES BIESPECÍFICOS: DESARROLLO, PRODUCCIÓN Y USO COMO TERAPIA ANTICANCERÍGENA.

Bermúdez Carvajal, Kattia¹; Hidalgo Carrillo, Gabriela¹; Mora Mata, Raquel¹; Rodríguez Mora, Karolina¹; Ysmael-Acle Sánchez, Beatriz¹ y Mora Román, Juan José².

¹Estudiante de Licenciatura en Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

²Departamento de Farmacia Industrial, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Resumen: Los anticuerpos monoclonales son glicoproteínas especializadas del sistema inmune. Se producen a partir de células B y presentan la capacidad de reconocer un antígeno específico. A partir de la teoría de generación de hibridomas desarrollada por Köhler y Milstein en 1975, se convirtieron en herramientas esenciales para los ámbitos clínico y biotecnológico, y a través de los años han sido útiles en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades infecciosas, inmunológicas y neoplásicas. Dichos anticuerpos a menudo se unen únicamente a un objetivo específico, lo que limita su potencial terapéutico en enfermedades causadas por múltiples mediadores y mecanismos. En consecuencia, surgieron los anticuerpos monoclonales biespecíficos, los cuales, junto con los avances de los mecanismos fisiopatológicos del cáncer, se han convertido en una eficaz y atractiva alternativa terapéutica. En Costa Rica, existe una considerable inversión en la compra de anticuerpos monoclonales por parte del sistema de Salud Pública. Se espera que, una vez que se aprueben los estudios clínicos y se comercialicen más anticuerpos biespecíficos, estos puedan llegar a ser ofertados a sus pacientes.

Palabras clave: sistema inmune, ADN recombinante, anticuerpos monoclonales, cáncer. Fuente: DeCS, BIREME.

Recibido: 16 Enero 2019. Aceptado: 2 Marzo 2019. Publicado: 25 Abril 2019.

Revista electrónica publicada por el Departamento de Farmacología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica. © All rights reserved. Licensed under a Creative Commons Unported License.



Contáctenos: rev.med.ucr@gmail.com. Tel: (506) 25-11 4492, Fax: 25-11-4489.

BISPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES: DEVELOPMENT, PRODUCTION AND USE AS ANTICANCER THERAPY

Abstract: Monoclonal antibodies are specialized glycoproteins of the immune system. They are produced from B cells and have the ability to recognize a specific antigen. From the theory of hybridoma generation developed by Köhler and Milstein in 1975, they became essential tools in the clinical and the biotechnological fields, and over the years have been useful in the diagnosis and the treatment of infectious, immunological and neoplastic diseases. Such antibodies often bind only to a specific target, which limits their therapeutic potential in diseases caused by multiple mediators and mechanisms. As a result, bispecific monoclonal antibodies emerged, which, together with advances in the physiopathological mechanisms of cancer, have become an effective and attractive therapeutic alternative. In Costa Rica, there is a considerable investment in the purchase of monoclonal antibodies by the Public Health system. It is expected that, once clinical studies are approved and more bispecific antibodies are commercialized, these can be offered to its patients.

Key words: immune system, monoclonal antibodies, recombinant DNA, cancer. Source: DeCS, BIREME.

GLOSARIO

ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.
BCR: complejo receptor de células B.
BiTE: anticuerpo biespecífico acoplado a células T.
bsAb: anticuerpo monoclonal biespecífico.
cADN: ADN complementario.
CD: cúmulo de diferenciación.
CDC: citotoxicidad dependiente de complemento.
CDR: región determinante de complementariedad.
CEA: antígeno carcinoembrionario
CH: dominio constante de la cadena pesada.
CL: dominio constante de la cadena liviana.
DART: anticuerpo de reorientación de doble afinidad.
DMSO: dimetilsulfóxido.
DVD-Ig: enfoque de inmunoglobulina de dominio variable doble.
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico.
EpCam: molécula de adhesión epitelial celular.
Fab: fragmento de unión a antígeno.
Fc: fracción cristalizable.
GST: glutatión-S-transferasa.
HER: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano.
HGF: factor de crecimiento de hepatocitos.
HGFR: receptor del factor de crecimiento de hepatocitos.
HGPRT: hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa.
Ig: inmunoglobulina.
IgH: cadena pesada de la inmunoglobulina.
IgL: cadena liviana de la inmunoglobulina.
MAPK: proteín quinasas activadas por mitógenos.
MBP: proteína de unión a maltosa.

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.
PEG: polietilenglicol.
PKB: proteín quinasa B.
ScFv: fragmento variable de cadena sencilla.
SFB: suero fetal bovino.
TandAb: diacuerpo en tándem biespecífico tetravalente.
Th1: T cooperador 1.
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.
VH: dominio variable de la cadena pasada.
VL: dominio variable de la cadena liviana.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de los anticuerpos monoclonales se debe a la técnica implementada en 1975 por Georges Köhler y César Milstein. La misma se convirtió en la primera empleada para este grupo farmacoterapéutico [1]. Desde entonces, han atraído el interés en las Ciencias de la Salud como opciones terapéuticas en el tratamiento contra el cáncer. Esta enfermedad engloba más de cien procesos patológicos que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Es provocada por un grupo de células que se multiplican sin control y de manera autónoma, invadiendo localmente y a distancia otros tejidos [2].



En los últimos 20 años, se ha producido un gran avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares y de la fisiopatología del cáncer. Debido a ello, se han descrito múltiples estrategias para el desarrollo de nuevos fármacos anticancerígenos, dentro de los cuales se hallan los anticuerpos monoclonales. Estas estrategias pretenden conseguir mayor actividad antitumoral y menor toxicidad que la de los fármacos que se usan actualmente [3].

Sin embargo, desde el punto de vista clínico, los anticuerpos a menudo se unen únicamente a un objetivo específico, lo que limita su potencial terapéutico en enfermedades causadas por múltiples mediadores y mecanismos. En consecuencia, surgieron los anticuerpos monoclonales biespecíficos (bsAbs). Comprenden dos entidades de enlace individual físicamente conectadas, que permiten la unión simultánea a dos epítomos distintos en uno o dos antígenos diferentes [4].

A partir de lo anterior, el presente trabajo tiene como finalidad describir los bsAbs y su uso como tratamiento contra el cáncer. Para ello, se hará un recorrido por la historia y la tecnología de los anticuerpos monoclonales, haciendo énfasis en la obtención y las aplicaciones de los biespecíficos, así como su empleo en Costa Rica. Para llevarlo a cabo, se buscó información en las bases de datos Ebsco Academic Research, Google Académico, Science Direct y el buscador Google. La investigación se limitó a los años 2010 a 2018, utilizando las siguientes palabras claves: anticuerpos monoclonales biespecíficos, sistema inmune, historia de los anticuerpos monoclonales y tratamiento contra el cáncer. Las búsquedas fueron realizadas tanto en idioma español como inglés.

GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNE Y DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los seres vivos, incluyendo el ser humano, habitan en ambientes que se encuentran caracterizados por la presencia continua de bacterias, virus y microorganismos patógenos que perjudican la salud. Esos agentes extraños se denominan

antígenos. Son de procedencia exógena o endógena que resultan ajenos al organismo, por lo que se requiere algún tipo de barrera protectora o bien resistencia para combatirlos [5]. De esta manera, todos los organismos vivos disponen de un mecanismo de defensa frente a microorganismos o sustancias extrañas denominado sistema inmune. Al presentarse alguna agresión, se activa la respuesta inmune con el fin de neutralizar y eliminar las sustancias no propias para el organismo. Esta respuesta incluye numerosos tipos de células con funciones defensivas que se distribuyen por el cuerpo [2].

Una de esas células son los linfocitos B. Estos se diferencian en células plasmáticas y células de memoria. Las primeras son las encargadas de la producción de anticuerpos (identifican y se unen de forma específica a dichos agentes, activando otros mecanismos inmunes) que provocan su eliminación [2] y que son liberados al torrente sanguíneo. En cuanto a las segundas, se mantienen durante varios años, creando una memoria inmunológica que protegerá al organismo frente a futuras exposiciones al mismo agente inmunógeno [6].

Específicamente, los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son un tipo de proteínas denominadas glicoproteínas. Funcionan como la parte específica del complejo receptor de células B (BCR, por sus siglas en inglés). Este reconoce al antígeno a nivel de la membrana del linfocito B, desencadenando una respuesta que incluye la activación de más linfocitos B y de otras células inmunes que atacan al antígeno. Además, funcionan como moléculas circulantes secretadas por las células plasmáticas provenientes de la activación, la proliferación y la diferenciación de dichas células B [2].

Los anticuerpos, independientemente de su especificidad, tienen una estructura común [7], la cual se aprecia en la Figura No. 1.

Como se observa, dicha estructura se compone de cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas

pesadas idénticas de 55 a 70 kDa, unidas covalentemente a un oligosacárido, y un par idéntico de cadenas livianas no glicosiladas de 24 kDa. Un puente disulfuro y otras uniones no covalentes unen las cadenas pesadas con las livianas. Además, las cadenas pesadas están unidas entre sí por al menos un puente disulfuro. Tal unión está localizada en una región conocida como "bisagra", formada por aproximadamente 12 residuos de aminoácidos. Esta proporciona una gran flexibilidad a la molécula. Dichos residuos están expuestos a las rupturas químicas y enzimáticas [7, 9].

En esa misma línea estructural, las inmunoglobulinas se dividen en dos fragmentos idénticos conocidos como Fab (fragmento de unión al antígeno, por sus siglas en inglés) que son los que se unen al antígeno, y en un fragmento que posee la propiedad de ser fácilmente cristalizable denominado Fc (fracción cristalizable). La formación de puentes disulfuro internos en las cadenas da como resultado la obtención de dominios proteicos globulares, característico de todos los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas [7, 8].

Los fragmentos Fab se obtienen cuando las

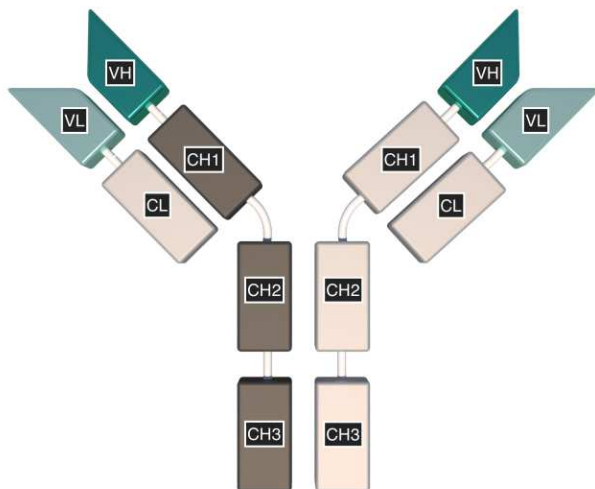


Figura No. 1. Estructura general de los anticuerpos. Se aprecia la fracción cristalizadora o Fc (constituida por CH2 y CH3), así como la fracción de unión a antígeno o Fab (formada por CH1, VH, CL y VL).

regiones variables de las cadenas pesadas (VH, por sus siglas en inglés) y el primer dominio constante de las cadenas pesadas (CH1, por sus siglas en inglés) se asocian con los dominios constante y variable de las cadenas livianas (VL y CL, por sus siglas en inglés). Se forman dos sitios idénticos de unión al antígeno, cada uno de los cuales contiene las regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés). Además, se encuentran constituidas por aproximadamente diez residuos de aminoácidos [10], las cuales interactúan directamente con un antígeno específico. Como complemento, las regiones dos y tres de las cadenas pesadas (CH2 y CH3) forman la Fc. Esta región cumple con funciones efectoras, tales como transporte placentario, potenciación de la fagocitosis (opsonización) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) [7].

A partir de lo descrito, la diversidad de las CDR en los sitios de unión al antígeno es la responsable del amplio repertorio que poseen los anticuerpos para unirse específicamente a una gran cantidad de antígenos. Esta variedad es producida por un mecanismo genético (recombinación de segmentos génicos) exclusivo de los genes de las inmunoglobulinas y de los receptores del linfocito T [11].

Cabe señalar que la mayoría de los organismos (mamíferos) tienen cinco tipos de inmunoglobulinas, también conocidos como isotipos. Estos son: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, cada uno con características y funciones específicas. El isotipo de la inmunoglobulina lo establece la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada [12].

A través de los años y los diversos estudios realizados, la comunidad científica se ha dado a la tarea de investigar sobre la importancia y la utilidad de los anticuerpos en los organismos vivos, entre ellos, los monoclonales y los policlonales [2].

Los anticuerpos monoclonales, glicoproteínas especializadas que forman parte del sistema

inmune, son producidas por las células B y cuentan con la capacidad de reconocer un solo antígeno o epítipo concreto [2, 8]. Se consideran una poderosa herramienta para el diagnóstico de laboratorio, y son cada vez más utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades. Además, su alta especificidad permite el abordaje de dianas muy precisas, que pueden determinar cambios celulares muy variados. Como complemento, dependiendo de la región Fc, pueden diseñarse para facilitar distintos tipos de respuestas efectoras [13].

Los anticuerpos monoclonales, según su origen y su estructura, pueden clasificarse en murinos (provenientes del ratón), quiméricos (una porción de la proteína es humana y la otra de una especie diferente), humanizados (casi toda la molécula es humana y sólo pequeños fragmentos de la secuencia de aminoácidos provienen de otra especie) o enteramente humanos. Este proceso progresivo de humanización responde a la necesidad de reducir su inmunogenicidad y de esta manera, poder usarlos como herramientas en procedimientos diagnósticos *in vivo*, así como tratamientos profilácticos y terapéuticos en seres humanos [3].

HISTORIA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

La producción y el desarrollo de anticuerpos monoclonales emergieron en 1975, cuando Georges Köhler y César Milstein utilizaron la tecnología del hibridoma [14]. La misma consiste en la generación de una línea celular estable, secretora de un isotipo determinado de inmunoglobulina contra un antígeno específico. Es fruto de la fusión de una célula mieloide y un linfocito B de un animal estimulado con el antígeno diana, por medios físicos (centrifugación) y químicos (polietilenglicol o PEG) [8, 15].

El linfocito B aporta la memoria inmune y la capacidad de producir anticuerpos contra el antígeno específico. En cuanto a la célula de mieloma, sus características incluyen: no secretora de anticuerpos, deficiente en la enzima

hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (HGPRT), útil en el proceso de selección posterior de los hibridomas y división ilimitada (inmortalidad) [8].

Más adelante, en 1985 se registró la creación de los primeros anticuerpos monoclonales quiméricos [8], desarrollados por Morrison y Boulliane. Se tratan de moléculas artificiales en las cuales las porciones constantes de las cadenas pesadas y livianas provienen de una Ig humana, mientras que las regiones variables son obtenidas de un anticuerpo monoclonal murino. Su construcción busca reducir la inmunogenicidad para el humano sin afectar la especificidad del anticuerpo. Es conocido que las porciones más inmunogénicas de la Ig están asociadas a la porción constante de la molécula, en particular a la región Fc. Al reemplazar estas regiones por las equivalentes de origen humano, se busca que la molécula resultante sea menos "extraña" para las personas y así, facilitar su uso *in vivo* para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades humanas [16].

La tecnología empleada para la obtención de estos anticuerpos fue la de ADN recombinante. Mediante ella, los genes que codifican la región variable de las inmunoglobulinas de ratón (unión específica del antígeno) se unieron con genes que codifican la región constante humana [8, 17].

Posteriormente, en 1986 se aprobó el primer anticuerpo monoclonal murino llamado muronomab (OKT-3). Su indicación era contra rechazo primario de trasplantes. Actuaba contra el receptor CD3 de células T activadas, eliminando de la circulación dicha población funcional de células y produciendo una inmunosupresión potente, útil para el tratamiento del rechazo agudo [18]. Sin embargo, con la introducción de este primer anticuerpo monoclonal se apreció la generación de intensas respuestas de hiperreactividad en los pacientes, dado su origen murino [19].

Ese mismo año, se incorporó la técnica de humanización de anticuerpos para minimizar el uso de los componentes del anticuerpo de ratón.

Así, con la ayuda de la ingeniería de proteínas se dio paso a la construcción de anticuerpos monoclonales humanizados. Los CDR provenientes de las Ig de ratón se unieron a estructuras de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de una Ig humana. Sin embargo, se detectaron anomalías en este proceso. Ciertos estudios reportaron que esta transferencia podría generar una afinidad variable hacia el antígeno [8, 17, 19].

Recientemente, se han incorporado técnicas de Biología Molecular e Ingeniería Genética, las cuales han extendido el contexto de producción y de empleo de los anticuerpos monoclonales. Las diferentes investigaciones han contribuido a la creación y a la propagación de métodos *in vitro* de generación de anticuerpos monoclonales en bacterias, mediante transgénesis con las secuencias de interés [8]. La transgénesis es un procedimiento para transformar un organismo deficiente en algún carácter genético, mediante la introducción en su genoma de un gen adecuado procedente de otro organismo (por tanto es modificado genéticamente). Para ello, se extrae el ADN de un donante, se cortan fragmentos que contengan el gen o los genes de interés y se realiza la inserción en una molécula que se replique autónomamente (por ejemplo, un plásmido bacteriano). Una vez clonado dicho gen en un microorganismo (bacterias o levaduras), se elige un vector adecuado para introducirlo en el genoma receptor. El vector con el gen de interés insertado se utiliza como vehículo para su traslado hacia el genoma donde será integrado para la obtención de organismos transgénicos [20].

En lo que respecta a las aplicaciones, en los últimos años diversos estudios han registrado los anticuerpos monoclonales como opciones para el diagnóstico y/o el tratamiento en numerosos padecimientos, además de métodos de estudio de las interacciones patógeno-hospedador, y de marcación, detección y cuantificación de diversas moléculas [21].

Asimismo, otras de sus aplicaciones son la identificación de las interacciones moleculares con

los productos de genes, la determinación de la localización de la expresión de genes a nivel celular, subcelular y en los tejidos, y la identificación de marcadores fenotípicos únicos de un tipo celular particular. Esto último es la base de la clasificación moderna de linfocitos y fagocitos mononucleares, y la investigación inmunológica [3].

Uno de los últimos avances en este campo sucedió en 1984 en el Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Salud (Maryland, Estados Unidos), donde se desarrolló el primer anticuerpo monoclonal biespecífico. Su producción se realizó a través del método de fusión y se observó su capacidad de unirse a las células efectoras, además del efecto citotóxico desencadenado por ellas. Los primeros anticuerpos biespecíficos que llegaron a fase clínica I se diseñaron para redirigir las células efectoras CD64 o cúmulo de diferenciación 64 (monocitos y macrófagos) hacia las células tumorales que expresaban antígenos como HER2 (receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2, por sus siglas en inglés) o EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico, por sus siglas en inglés). Desafortunadamente, no presentaron los resultados antitumorales esperados, en cuanto a consistencia y a efectividad. En 1990, los Fab de dos sueros policlonales diferentes fueron reasociados en moléculas biespecíficas, gracias a la tecnología de hibridoma establecida en 1975 [22, 23, 24].

El desarrollo de métodos para producir anticuerpos recombinantes permitió la generación de anticuerpos monoclonales biespecíficos con estructura, composición y propiedades bioquímicas, funcionales y farmacológicas definidas. El catumaxomab fue el primer anticuerpo biespecífico en ser aprobado. Este actúa contra la molécula de adhesión de las células epiteliales [22, 23, 24]. Se lanzó en Europa para el tratamiento de la ascitis maligna en abril de 2009 [25].

En la actualidad, se continúan las investigaciones acerca de estos anticuerpos y sus usos, porque

presentan un enorme potencial para las terapias farmacológicas actuales y futuras. Por ello, se debe continuar explorando todas las posibilidades que representan.

Debido al avance desarrollado en este tema, existen una gran cantidad de técnicas para la obtención de anticuerpos monoclonales. Primeramente, se ahondará en las relacionadas con los anticuerpos monoclonales específicos, para posteriormente abordar las referentes a los biespecíficos.

TECNOLOGÍAS DE PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOESPECÍFICOS

Existen diferentes tecnologías empleadas para la obtención de anticuerpos monoclonales mono-específicos. Se sabe que muchos de los anticuerpos monoclonales biespecíficos parten de los mono-específicos. Por tal razón, se explican las distintas tecnologías de producción.

GENERACIÓN DE HIBRIDOMAS

Su fundamento radica en la fusión de un linfocito B de un animal previamente inmunizado con el antígeno de interés (aporta la memoria inmune y la capacidad de producir anticuerpos contra el antígeno específico) y una célula tumoral de mieloma no secretora de anticuerpos (aporta su capacidad de división ilimitada), deficiente en la enzima HGPRT, útil en el proceso de selección posterior de los hibridomas [8, 13, 21, 26].

Las células tumorales de mieloma de ratón procedían de una línea creada por Michael Potter en los años sesenta denominada MOPC21, deficitarias en enzimas claves para la síntesis de oligonucleótidos por la vía de rescate. Por su parte, el agente fusionante inicial era el virus Sendai, pero luego fue sustituido por PEG. Las células B se obtenían de ganglios linfáticos o del bazo de los ratones inmunizados repetida y eficazmente con el antígeno deseado. Estas células se cultivaban con las de mieloma y el agente fusionante en un medio de cultivo de composición especial (HAT, porque contiene hipoxantina, aminopterina y timidina).

Este medio no permite la supervivencia de las de mieloma no hibridadas. Los linfocitos B no fusionados también mueren y quedan únicamente las células fusionadas [13].

La fusión celular se lleva a cabo a partir de la selección de animales con los mayores títulos de anticuerpos antes de la misma. Se emplea la fuente de linfocitos y la línea de mieloma para realizar las fusiones celulares con PEG. Los hibridomas positivos son clonados y reclonados por la técnica de dilución limitante, y congelados en nitrógeno líquido en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO) y suero fetal bovino (SFB) [27].

Este hibridoma hereda de la célula plasmática la información genética para sintetizar el anticuerpo deseado. De la célula de mieloma recibe la actividad de síntesis proteica y la capacidad de multiplicación, tanto *in vivo* como *in vitro*, de forma indefinida [28].

La técnica descrita presenta dos ventajas: es uno de los métodos básicos de producción de anticuerpos monoclonales contra un determinante antigénico conocido, y se puede utilizar para identificar antígenos desconocidos presentes en una mezcla, pues cada hibridoma es específico para un solo determinante antigénico [8].

ANIMALES TRANSGÉNICOS

Esta técnica se empleó para disminuir los efectos adversos e incrementar la efectividad terapéutica de los anticuerpos monoclonales. Los ratones empleados se denominan Xenomouse (en inglés). Son híbridos descendientes de un progenitor (cepa de ratones), en el que se han inactivado los genes necesarios para la producción de inmunoglobulinas, y de un segundo progenitor en cuyas células productoras de anticuerpos se han introducido el locus (lugar específico ocupado por un alelo en un cromosoma) de la IgH (cadena pesada de la inmunoglobulina, por sus siglas en inglés) y los loci (plural de locus) κ y λ de la IgL (cadena liviana de la inmunoglobulina, por sus siglas en inglés) humanos [21, 29].

Una vez cruzados ambos ratones, se consigue mediante selección previa, una cepa que expresa únicamente inmunoglobulinas humanas. De esta forma, si dichos animales se inmunizan frente a un antígeno concreto, se obtendrán anticuerpos útiles como terapia en personas. Debido a que las inmunoglobulinas humanas se dividen en cinco isotipos, se han generado ratones transgénicos para la producción de cada uno de ellos [21].

TECNOLOGÍA DE ADN RECOMBINANTE

Se divide en dos técnicas: la terapia de fagos (phage-display, en inglés) y la terapia ribosomal (ribosomal-display, en inglés). Con respecto a la primera, los fagos o bacteriófagos son virus que infectan bacterias, introduciendo su material genético en el genoma bacteriano. Emplean las funciones vitales de la bacteria para la producción de más unidades virales [21]. Consisten fundamentalmente de material genético y proteínas. Su genoma puede componerse de ADN o ARN, el cual puede ser de cadena doble o sencilla [30].

El fago M13 es un tipo de bacteriófago ampliamente empleado para la producción de anticuerpos monoclonales. Este infecta las bacterias de *E. coli*, insertando su genoma y empleando las funciones de la bacteria para reproducirse y producir más copias del virus. Mediante técnicas de Ingeniería Genética, es posible manipular su material genético e insertar una secuencia externa de ADN. Estos fagos recombinantes consiguen expresar en su superficie o en su cubierta la proteína codificada por el ADN insertado. Cuando uno de estos portadores de ADN codificante para un anticuerpo infecta una bacteria, se producen nuevos fagos que expresan en su superficie los anticuerpos de interés unidos a sus proteínas. Por tanto, son capaces de unirse al antígeno, para posteriormente ser seleccionados y empleados nuevamente para infectar bacterias, produciendo nuevos virus portadores de anticuerpos [2, 31].

Por otro lado, la terapia ribosomal es una tecnología de producción/síntesis de fragmentos

de anticuerpos monoclonales *in vitro* [21]. Mediante este procedimiento, se generan bibliotecas de genes de anticuerpos basadas en la síntesis de fragmentos de anticuerpos monoclonales, al igual que ocurre con la terapia de fagos. La diferencia es el uso de ribosomas, sin emplear células como fábricas de producción de estas glicoproteínas [2]. Una ventaja que ofrece es que el medio ambiente utilizando un sistema de selección *in vitro* puede ser manipulado y optimizado para la expresión, el plegado y la estabilidad de los miembros de la biblioteca de genes [32].

PLANTAS TRANSGÉNICAS

Son plantas modificadas mediante Ingeniería Genética. Su uso se basa en la expresión de los anticuerpos monoclonales, ya sean en plantas o en cultivos de células vegetales. Ofrece ventajas como el aumento de productividad y la reducción de costos [2, 21, 33].

A través de esta tecnología, primeramente se clona el ADN complementario (cADN) de las cadenas pesadas y ligeras de la IgG a partir de un hibridoma. Una vez obtenido el gen de interés, se pueden utilizar dos procesos diferentes, pues la introducción del gen transgénico mediante vectores en el genoma de la planta puede conseguir la expresión permanente o temporal del anticuerpo monoclonal. En este último caso, el cADN aislado es introducido en la célula vegetal para que sea transcrito y traducido por la maquinaria de síntesis de proteínas, estando presente en la célula durante un tiempo limitado [21].

PROTEÍNAS DE FUSIÓN

Son polipéptidos originados al traducirse dos o más genes previamente unidos en un marco de lectura para dar lugar a una única proteína. Estos presentan propiedades distintas a las obtenidas en las proteínas originales. Se crean artificialmente por tecnología de ADN recombinante, y son muy utilizadas en investigación y en terapia biológica [34].

El uso de anticuerpos monoclonales para su elaboración presenta como ventajas: mayor diversidad y especificidad antigénica, mínimo riesgo de reacciones cruzadas, y propiedades específicas requeridas en ciertas aplicaciones como vida media, tamaño y funciones efectoras [21].

Existe un importante número de proteínas de fusión en las que se combinan porciones de moléculas de anticuerpos diferentes o se fusionan con toxinas, interleucinas, moléculas de adhesión, componentes de la matriz extracelular, hormonas, factores de crecimiento, superantígenos, moléculas CD, receptores celulares e incluso lípidos [21].

Las proteínas más utilizadas son la A de estafilococo, la G de estreptococo, la de unión a maltosa (MBP, por sus siglas en inglés) y la glutatión-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum* [34].

Todas estas técnicas son utilizadas para la obtención de anticuerpos biespecíficos, cuyas generalidades se exponen a continuación.

ANTICUERPOS MONOCLONALES BIESPECÍFICOS

Los anticuerpos monoclonales biespecíficos son inmunoglobulinas construidas artificialmente mediante técnicas de Ingeniería Genética, en las cuales los dos sitios de unión a antígeno poseen especificidades diferentes. De esta manera, son capaces de unirse simultáneamente a dos epítomos en el mismo o en distintos antígenos. A través del reconocimiento simultáneo de ambos objetivos, pueden servir como mediadores para dirigir la función de células efectoras inmunes, como las células NK (del inglés Natural Killer) y los linfocitos T a las células tumorales, con el fin de mejorar su destrucción. Además, pueden inducir modificaciones de la señalización celular, incluyendo la inactivación de la proliferación celular o de las vías inflamatorias. En la Figura No. 2 se observa la capacidad de este tipo de anticuerpos de unirse a dos objetivos diferentes [2, 35]. Su estructura puede variar, lo cual se abordará posteriormente.

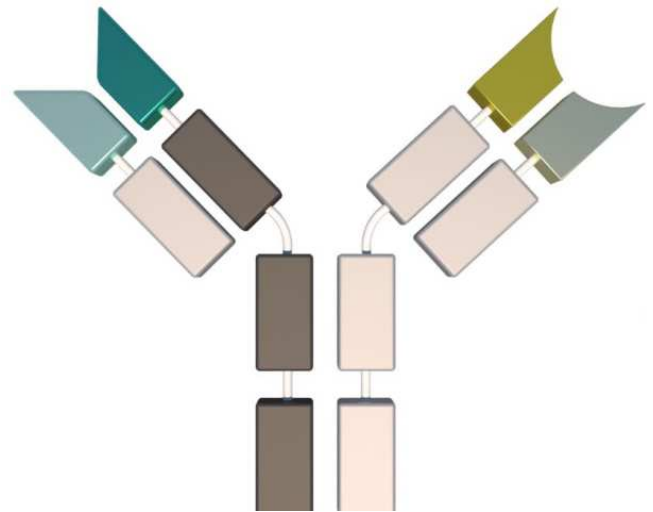


Figura No. 2. Estructura general de un anticuerpo biespecífico. Se observan los dos sitios de unión para dos antígenos diferentes.

CLASIFICACIÓN E IMPLICACIONES FARMACOCINÉTICAS Y FARMACODINÁMICAS

Hay dos categorías principales de estructuras biespecíficas. El primer grupo se aproxima a una estructura completa de anticuerpo tipo IgG con una región Fc. El mantenimiento de esta región incorpora las funciones de ADCC y la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Tienen vidas medias extendidas en el suero y un ejemplo es el triomab [35, 36].

La segunda consiste de estructuras mucho más pequeñas. Contienen dominios de unión a antígeno minimizados en una estructura similar a un anticuerpo, con la porción Fc eliminada. Al eliminarse dicha porción, las estructuras tienen vidas medias mucho más cortas y pueden incrementar la toxicidad como resultado de su pequeño tamaño. Tres ejemplos de este grupo son: anticuerpos biespecíficos acoplados a células T (BiTEs, por sus siglas en inglés), anticuerpos de reorientación de doble afinidad (DARTs, por sus siglas en inglés) y diacuerpos en tándem biespecíficos tetraivalentes (TandAbs, por sus siglas en inglés) [22, 35, 36].

La mayoría de estos anticuerpos en desarrollo no contienen regiones Fc. Su reducido tamaño y la

falta de estas regiones conducen a una eliminación renal bastante rápida *in vivo*. Aunque este tamaño podría ser ventajoso con respecto al tejido de penetración (por ejemplo, en la terapia tumoral), las vidas medias cortas del plasma afectan la dosificación, requiriendo inyecciones o infusiones frecuentes. Por ello, la conjugación con PEG podría ser útil para incrementar dicha vida media. Dentro de los anticuerpos biespecíficos pequeños, los TandAbs son los más grandes. Tienen un peso molecular de 100 a 110 kDa (mientras que los BiTEs son de 55 kDa), que está muy por encima del umbral renal para el primer aclaramiento. Su vida media estimada de aproximadamente 23 horas en primates no humanos es significativamente mejor que en los otros formatos y no requiere una administración intravenosa continua tan prolongada [22, 37, 38].

Por otro lado, la presencia de la región Fc facilita la purificación del anticuerpo, utilizando protocolos establecidos para moléculas de IgG, y contribuyendo a una mejor solubilidad y una mayor estabilidad. Además, tiene consecuencias para las funciones efectoras mencionadas anteriormente, las cuales están mediadas por Fc (ADCC, CDC), así como una mayor vida media, producto de su mayor tamaño [22].

DESCRIPCIÓN Y PRODUCCIÓN DE LOS ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS

ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS CON REGIÓN FC

La familia triomab está constituida por anticuerpos biespecíficos trifuncionales que contienen la región Fc. Estas quimeras consisten en la mitad de dos anticuerpos, cada uno con una cadena ligera y una pesada. Se originan a partir de los isotipos IgG2a de ratón parental e IgG2b de rata. Esta combinación permite una fabricación biofarmacéutica rentable a escala industrial, porque al ser de un isotipo específico de ratón/rata favorece la coincidencia de las correspondientes mitades de anticuerpos. Cada miembro de esta familia está compuesto de un medio anticuerpo IgG2b de rata anti-CD3 (reconocimiento de los linfocitos T) y el sitio de unión al antígeno es

presentado por el isotipo IgG2a de ratón, que es intercambiable [25, 39].

En cuanto a la producción de este tipo de anticuerpos se consideran las siguientes cuatro técnicas:

Cuadroma: es la hibridación de dos hibridomas para generar un híbrido o cuadroma. En otras palabras, es la fusión somática de dos células de hibridoma que expresan cada uno anticuerpos monoclonales con especificidades distintas. Se observó, que células cuadroma de una sola especie (ratón/ratón) mostraban un emparejamiento aleatorio entre la cadena pesada y la ligera con varias posibles variantes, las cuales se reducían al hacerlo con dos especies diferentes (rata/ratón). Como resultado, se obtenía una producción muy baja de la proteína deseada y un proceso de purificación muy complejo, lo cual se solucionó con el método de *knobs-into-holes* [23, 40].

Knobs-into-holes: esta técnica permitió generar una estrategia para facilitar la asociación de la cadena pesada. Se basa en una transfección de genes humanos modificados que codifican los anticuerpos en células de mamíferos. Su ventaja es que los anticuerpos biespecíficos resultantes son de naturaleza humana en lugar de murina y, en consecuencia, son menos inmunogénicos [35, 41]. La producción se fundamenta en una única sustitución de aminoácidos en los dominios CH3 opuestos, que promueve la heterodimerización de la cadena pesada. Esta técnica permite la producción eficiente, con más del 90 % de asociación de cadena correcta. Problemas derivados del hecho de que las cadenas ligeras no tienen preferencia por una de las dos cadenas pesadas se pueden resolver aplicando anticuerpos con una secuencia de cadena ligera común [35, 41].

Anticuerpos cruzados: es una opción para asegurar la asociación correcta de la cadena ligera en anticuerpos biespecíficos similares a IgG, cuando se combina con el enfoque de *knobs-into-holes*. En esta, uno de los brazos del anticuerpo permanece intacto, mientras que en la mano opuesta se

modifican la cadena pesada y la ligera. Se proponen tres modificaciones diferentes: 1) Toda la región Fab. 2) La región VL-VH. 3) La región CL-CH1. Debido a ello, la cadena ligera modificada ya no puede unirse con la cadena pesada no modificada y se obtiene la asociación de cadena correcta. De los tres modelos sugeridos, el tercero mostró el mejor perfil y la mejor pureza. Cabe señalar que no se lleva a cabo la modificación de la especificidad de unión a antígeno, pues la única diferencia frente a un anticuerpo convencional es la conexión con la parte Fc [35, 42].

Inmunoglobulina de dominio variable doble (DVD-Ig, por sus siglas en inglés): los anticuerpos se generan combinando los dominios variables de dos anticuerpos monoclonales preexistentes con diferentes especificidades. Estos dominios se fusionan en tándem, permitiendo crear una molécula doble similar a la IgG, conservando las afinidades de ambos anticuerpos monoclonales. Cada sitio de unión a antígeno puede funcionar independientemente, sin presentar un impedimento estérico significativo. Además, estos anticuerpos pueden dirigirse a moléculas solubles, tales como interferones, interleucinas y quimiocinas. También, es posible combinar anticuerpos monoclonales de diferente naturaleza (humana, quimérica y murina). Un anticuerpo biespecífico optimizado de este tipo tiene muchas propiedades deseables, tales como fácil purificación, buenas propiedades farmacocinéticas y capacidad de fabricación a gran escala [35, 43].

ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS SIN REGIÓN FC

Los anticuerpos biespecíficos pequeños (BiTES, DARTs y TandAbs) son generados a través de la tecnología de ADN recombinante, donde se fusionan los dominios VH y VL de dos diferentes anticuerpos y seguidamente se sobreexpresan generalmente en bacterias de *E. coli*. En este diseño, cada dominio VL es cruzado y vinculado a través de enlaces peptídicos cortos con el dominio VH del otro anticuerpo. Se utiliza un enlazador de tamaño pequeño (cinco aminoácidos) situado entre los dominios VH y VL. De esta manera, los dominios son obligados a asociarse con los

dominios complementarios del segundo anticuerpo, obteniéndose productos con dos sitios de unión a antígeno [42].

En el caso específico de los BiTEs, los cuatro dominios quedan alineados en una sola cadena polipeptídica, porque el primer fragmento variable de cadena sencilla (scFv, por sus siglas en inglés) es generado mediante la fusión del dominio variable de la cadena pesada con el variable de la cadena ligera a través del conector y fusionado en tandem con otro scFv (dirigido contra otro antígeno blanco) a través de un conector adicional. Esto resulta en un anticuerpo de cadena sencilla [24, 36].

Por otro lado, los DARTs están expresados con dos cadenas polipeptídicas. La cadena pesada VH de la primera región variable se vincula a la cadena liviana VL de la segunda región variable, y el VH de la segunda región variable a la VL de la primera región variable, dimerizándose de manera cruzada. Si los dos anticuerpos se denominaran A y B, los DARTs tendrían el arreglo VHA-VLB y VHB-VLA. Además, presentan enlaces disulfuro covalentes que estabilizan las dos cadenas de proteínas [22, 36].

En cuanto a los TandAb, contienen dos dominios de unión para cada antígeno. Se expresan como un solo polipéptido constituido por cuatro dominios variables conectados a través de enlazadores. Para ello, se combinan dos polipéptidos, cada uno con un dominio compuesto por una cadena liviana y una pesada de cada anticuerpo (en total se tienen 2VHA, 2VHB, 2VLA y 2VLB). Después de la traducción en el retículo endoplásmico, el polipéptido monomérico se empareja de cabeza a cola con otro monómero, formando la molécula TandAb [36, 37].

MECANISMOS DE ACCIÓN

A continuación, se describen los mecanismos de acción generales de los dos tipos de anticuerpos monoclonales biespecíficos descritos en la sección anterior.

ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS CON REGIÓN FC

El éxito de muchos fármacos contra el cáncer depende fundamentalmente de la cantidad de células efectoras reclutadas del organismo de un paciente. Esto se conoce como inmunoterapia [44, 45]. Por lo tanto, los anticuerpos triomab fueron diseñados para inducir simultáneamente varios mecanismos de defensa antitumoral, dirigiendo las células NK, los linfocitos T citotóxicos, los macrófagos/monocitos y las células dendríticas al sitio donde se encuentra el tumor. Su estructura permite la unión a dos estructuras antigénicas distintas, como los antígenos asociados al tumor y la molécula CD3 en las células T, o receptores Fc γ a través de la región Fc en células accesorias como macrófagos. Estos anticuerpos median la formación de complejos tricelulares, y de esta manera, la terapia con anticuerpos clásica o inmunización pasiva puede transformarse en inmunización activa *in situ* [25, 46, 47].

La actividad citotóxica dirigida de las células T, la participación de las células accesorias y su señalización coestimuladora, y las respuestas proinflamatorias inducidas por citoquinas tipo Th1 (del inglés T helper 1) representan las principales características de un tratamiento de cáncer basado en anticuerpos de tipo triomab como el catumaxomab. Por lo tanto, su uso permite inmunizar a los pacientes contra sus propios tumores primarios, protegiéndolos de futuras recaídas. En conjunto, las respuestas antitumorales combinadas y altamente concertadas mediadas por estos anticuerpos conducen a la eliminación de las células tumorales por necrosis, fagocitosis y la inmunidad humoral duradera, así como mediada por células, en situaciones de recaída [25].

ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS SIN REGIÓN FC

En el caso de los BiTEs, se unen con el dominio ϵ de CD3 (subunidad del complejo receptor de linfocitos T) y a la superficie celular de las células tumorales, mediante el otro dominio de enlace. De esta forma, reclutan respuestas policlonales de los linfocitos T para la lisis de las células tumorales, a la vez que se evita la toxicidad por activación no específica de dichas células. Al interactuar

independientemente del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad, por sus siglas en inglés) y la presentación del antígeno, evitan los mecanismos de escape inmunitario común [36].

Un ejemplo es el blinatumomab (Blinicyto®). Este se une a la proteína CD19 presente en las células B y al CD3 de los linfocitos T [22].

Por otra parte, al igual que los BiTEs, los DARTs reconocen una molécula activadora expresada por los linfocitos T y otra molécula por las de las células tumorales de interés. El flotetuzumab es una molécula humanizada en fase 1 que se une a la proteína superficial CD123 de las células tumorales, así como a CD3 [36, 48].

En lo que corresponde a los TandAbs, contienen cuatro sitios de unión, dos para unirse a los antígenos de superficie de la célula tumoral y los otros dos a las células inmunes. El reclutamiento de células inmunes por el anticuerpo biespecífico TandAb denominado AFM13 está dirigido a la unión de células NK. La primera entidad de unión se une a la proteína de la célula tumoral CD30 y la otra a CD16A en las células NK y los macrófagos [22].

APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES BIESPECÍFICOS

Las aplicaciones cubren un amplio espectro que incluye diagnóstico, imágenes, profilaxis y terapia. Al inicio, estas se centraron en la reorientación de las células efectoras para la terapia del cáncer, incluidas los linfocitos T, que no pueden reclutarse hacia las células tumorales por parte de los anticuerpos monoclonales mono-específicos. No obstante, también se han evaluado como posibles tratamientos para otras indicaciones, entre ellas: enfermedades inflamatorias crónicas, autoinmunidad, neurodegeneración, trastornos hemorrágicos e infecciones. Asimismo, se están investigando para su aplicación en trastornos del sistema nervioso central, psoriasis y lupus eritematoso sistémico [49].

La importancia de estos productos terapéuticos en lo referente al cáncer se debe a que este es capaz de desarrollar mecanismos de evasión de la respuesta inmune. De esta manera, inhibe su reconocimiento y su eliminación por parte de las células de este sistema [50]. El objetivo principal de tales investigaciones es actuar simultáneamente sobre distintas dianas implicadas en procesos fisiopatológicos, y con ello, obtener un aumento en la eficacia terapéutica. Por tanto, se trata de una inmunoterapia que busca redirigir el sistema inmune hacia el ataque de células malignas u otros procesos de la enfermedad [9, 22, 36].

Actualmente, existen pocos anticuerpos monoclonales biespecíficos en el mercado. En esta sección se mencionan algunos de los que ya han sido utilizados clínicamente.

Catumaxomab (Removab®)

Es un triomab, establecido como fármaco huérfano por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) para tumores gástricos y de ovario EpCam (molécula de adhesión epitelial celular, en español) positivos. Además, fue aprobado en el 2010 para las mismas indicaciones por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, por sus siglas en inglés). Específicamente, un brazo de catumaxomab se une al antígeno de superficie EpCAM en las células tumorales, mientras que el otro lo hace al CD3 expuesto en la superficie de linfocitos T [9, 51]. Su objetivo es activar la lisis mediada por células T, la fagocitosis, la ADCC y la CDC, funciones para destruir células tumorales [9, 25].

En los estudios de fase II y III realizados al aplicar catumaxomab en forma intraperitoneal con un programa de dosificación de 10, 20, 50 y 150 µg, evaluado previamente en fase I, se mejoró el tiempo medio hasta la siguiente paracentesis, procedimiento quirúrgico en el cual se realiza una punción para drenar líquido de una cavidad. Además, disminuyeron los signos y los síntomas de la ascitis, y se observó una tendencia hacia una mayor supervivencia. Los efectos adversos

asociados a su uso fueron pirexia o estado febril, náuseas, vómitos y dolor abdominal [9, 52, 53].

En otro estudio realizado, se demostró que el anticuerpo permitió la lisis de células de carcinoma de próstata que expresaban EpCAM. Se observó que alrededor de las células tumorales se encontraron linfocitos y células mononucleares de sangre periférica, así como la formación de poros en las células tumorales mediada por perforinas secretadas por las células inmunes. Los estudios preclínicos realizados por estos investigadores exhibieron una relación entre la supervivencia en ratones y la inducción de la respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos [9, 54].

Sin embargo, ya no está siendo producido por Fresenius Biotech GmbH, debido a consideraciones logísticas. En junio de 2017, la EMA retiró la autorización de mercado en la Unión Europea a petición del titular de la autorización de comercialización, Neovii Biotech GmbH [4, 9].

Blinatumomab (Blinicyto®)

Es un BiTE producido por Amgen, Inc. Se encuentra compuesto por dos segmentos variables. Un brazo se une a la proteína CD19 presente en linfocitos B y el otro a CD3 de las células T. Se elabora en células de ovario de hámster chino con el vector de expresión de ADN blinatumomab, productor de la proteína BiTE, y se secreta al medio de cultivo.

Blinatumomab fue aprobado por la FDA en el 2014 para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda precursora de células B (cromosoma Filadelfia negativo) recidivante (reaparece la enfermedad después de un período de convalecencia o curación) o refractaria (no responde a tratamientos previos) en adultos. En el 2016, se aprobó para su uso en niños bajo la misma indicación. Posteriormente, en julio de 2017 la FDA amplió la indicación a la patología con cromosoma Filadelfia positivo [4, 9, 22, 51, 55, 56].

En estudios preclínicos, el blinatumomab demostró actividad citotóxica contra células B positivas para C19, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Como

complemento, en los ensayos clínicos se observó una mejora en la supervivencia en pacientes con leucemia linfoblástica aguda con células B recidivante o refractaria. Este anticuerpo se administró como infusión intravenosa continua de 9 µg al día durante los primeros siete días, seguido de 28 µg al día durante cuatro semanas cada seis semanas hasta cinco ciclos en la población adulta. Entre los efectos adversos más comunes se observó pirexia, dolor de cabeza, neutropenia febril y edema periférico [9, 57, 58].

ANTICUERPOS MONOCLONALES BIESPECÍFICOS EN INVESTIGACIÓN

Actualmente, más de 50 anticuerpos biespecíficos se encuentran en ensayos clínicos (fases I y II) para comprobar su efectividad como tratamiento contra varios tumores malignos [9]. Algunos ejemplos se mencionan a continuación.

Flotetuzumab (MGD006)

Anticuerpo humanizado de tipo DART que se une a la proteína de superficie celular CD123, sobreexpresada en células cancerígenas, así como a CD3. Su posible uso recae en enfermedades hematológicas malignas, incluida la leucemia mieloide aguda [36, 48].

AFM13

Anticuerpo quimérico biespecífico tetravalente que se une a CD30 en dos de sus sitios, el cual es expresado en células tumorales, y a CD16A (presente en células NK) con los otros dos sitios de unión. Esto da como resultado la activación de células NK y la lisis de células tumorales [9, 22, 59, 60].

OMP-305B83/navicixizumab

Anticuerpo biespecífico humanizado (IgG2), que inhibe la angiogénesis tumoral a través del bloqueo tanto de DLL4 (proteína transmembrana involucrada en el desarrollo de la mayoría de tejidos), así como del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés). El brazo anti-DLL4 se une a DLL4 y previene la señalización tumoral mediada por Notch (proteína transmembrana que sirve como receptor de

señales extracelulares). El brazo anti-VEGF se une a VEGF, impidiendo su asociación con el receptor de VEGF en las células vasculares endoteliales y bloqueando la proliferación endotelial [9, 61, 62].

TC-BsAb

Un estudio llevado a cabo en el 2012 evaluó el efecto de este anticuerpo biespecífico anti-EGFR/ErbB2 (receptor de tirosín proteín quinasa 2), comparándolo contra los tratamientos existentes para cáncer de mama, específicamente trastuzumab y cetuximab. El cetuximab es un anticuerpo monoclonal quimérico que también actúa sobre EGFR, bloqueando la vía de señalización que estimula la proliferación y el crecimiento de células cancerígenas [63]. Los resultados de los ensayos preclínicos revelaron que el TC-BsAb es significativamente más potente en la inhibición de la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama en comparación con los otros dos, ya sean solos o en combinación [64].

ME22S

Anticuerpo biespecífico diseñado para el tratamiento de carcinoma de laringe. Actúa sobre receptores EGFR y HGFR (también llamado receptor Met). Este último es un receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés), producto del protooncogen de la tirosin quinasa heterodimérica. La unión de su ligando (HGF) conduce a la activación de rutas enzimáticas tales como ERK/MAPK (proteín quinasa activadas por mitógenos) y proteín quinasa B (PKB), encargadas de la proliferación, la angiogénesis y la supervivencia de células tumorales. Según los hallazgos del estudio realizado en el 2016, se encontró una doble inhibición de EGFR y Met al administrar ME22S, con lo cual se suprimió la invasión y el crecimiento del carcinoma de laringe [65, 66].

REALIDAD EN COSTA RICA

Debido a que se ha demostrado que la doble acción sobre células tumorales y células inmunes ayuda al tratamiento contra el cáncer, se indagó sobre la situación actual en Costa Rica respecto al uso de estos fármacos. En la Lista Oficial de Medicamentos

(LOM) que maneja la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS), entidad de mayor cobertura e importancia en materia de Salud Pública en Costa Rica, se encuentran los anticuerpos monoclonales basiliximab, rituximab, trastuzumab, adalimumab y tocilizumab. De ellos, los tres primeros corresponden a terapias anticancerígenas. No obstante, al desarrollar esta investigación no se contaba con anticuerpos biespecíficos disponibles para uso por parte de sus asegurados [67].

Durante el año 2015, la CCSS invirtió más de 15 millones de dólares en la compra de anticuerpos monoclonales para su uso en pacientes con cáncer. En general, los fármacos antineoplásicos e inmunomoduladores, dentro de los cuales se ubican los anticuerpos monoclonales antes mencionados, representaron el 48,74 % de las compras de productos biológicos realizadas por parte de la institución, porcentaje equivalente a casi 24 millones de dólares [68]. En la Tabla No. 1 se muestra la cantidad de viales que se adquirió de los anticuerpos antineoplásicos más utilizados durante el 2015, así como el precio total de compra ese año. Dicha información fue brindada por la CCSS como parte de su política de transparencia. También, se debe señalar que a la fecha no existen productos de este tipo registrados para su comercialización en Costa Rica [69].

A pesar de no contar con anticuerpos monoclonales biespecíficos en el arsenal médico del país, Costa Rica tiene un lugar en la historia de estos medicamentos. El costarricense Pablo Umaña es director de Inmunoterapia Oncológica del Centro de Investigación de la compañía farmacéutica Roche, con sede en Zúrich, Suiza. Umaña colaboró al descubrimiento de un anticuerpo biespecífico que equilibra la destrucción de células tumorales sin dañar a las normales, evitando la toxicidad. Se trata del CEA-TCB, un anticuerpo biespecífico para el tratamiento de tumores sólidos que expresan el antígeno carcinoembrionario (CEA, por sus siglas en inglés). Este se encontraba en ensayos clínicos de fase I durante el 2016. CEA-TCB se une de forma divalente a CEA y CD3 por los dominios Fab. Muestra una potente actividad antitumoral, eficaz en tumores poco infiltrados donde aumenta la infiltración de linfocitos T y genera un microambiente tumoral altamente inflamado capaz de atacar a las células cancerígenas con mayor facilidad [70].

Tabla No. 1. Unidades compradas y precio de anticuerpos monoclonales adquiridos por la Caja Costarricense de Seguro Social durante el año 2015.

Medicamento	Unidades compradas	Precio total de compras realizadas (\$)
Basiliximab 20 mg	108	205178
Rituximab 400 mg	2195	3508488
Rituximab 100 mg	3350	1072000
Trastuzumab 440 mg	5810	10458000



CONCLUSIONES

Los anticuerpos monoclonales son inmunoglobulinas de inmenso valor e interés. Su método de producción permite la fabricación de cantidades ilimitadas de un solo anticuerpo frente a un antígeno que puede ser especialmente seleccionado. Su desarrollo contra diferentes blancos tumorales, junto a otros inhibidores farmacológicos, puede lograr un manejo diferente contra el cáncer.

En el caso de los anticuerpos monoclonales biespecíficos, su importancia reside en una acción simultánea sobre varios factores o vías, la cual puede brindar mejores resultados en la terapia antitumoral. Por ello, proporciona un enfoque diferente para redirigir el sistema inmune hacia el ataque de células malignas u otros procesos de la enfermedad. Como complemento, su capacidad para la estimulación del sistema inmune le da una ventaja sobre los monoespecíficos, resaltando la importancia de su producción y dejando entrever su potencial en la aplicación farmacoterapéutica.

En Costa Rica, existe una considerable inversión en la compra de anticuerpos monoclonales por parte del sistema de Salud Pública. Se espera que, una vez que se aprueben los estudios clínicos y se comercialicen más anticuerpos biespecíficos, estos puedan llegar a ser comercializados a los pacientes que acuden a la CCSS.

Por todo lo anterior, es fundamental para los profesionales de la salud comprender la información esencial sobre estos nuevos productos, los cuales se están convirtiendo en una pieza fundamental de los futuros tratamientos farmacológicos contra el cáncer.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica.

REFERENCIAS

1. Creus N, Massó J, Codina C, Ribas J. Anticuerpos monoclonales en Oncología. *Revista Farmacia Hospitalaria* (Madrid). 2002; 26(1):28-43.

2. Ruiz G, Moreno M, López M, Vega M. Anticuerpos monoclonales terapéuticos: Informe de Vigilancia Tecnológica. Madrid: Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica/Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid, 2007.
3. Armas Ramírez T. Anticuerpos Monoclonales en el Tratamiento del Cáncer. In *Crescendo. Ciencias de la Salud*. 2016; 3(2):182-188.
4. Krah S, Sellmann C, Rhiel L, Schröter C, Dickgiesser S, Beck J, et al. Engineering bispecific antibodies with defined chain pairing. *New Biotechnol*. 2017; 39:167-173.
5. Salinas Carmona MC. Principios de inmunología aplicados a la hematología. En: José Carlos Jaime Pérez JC, Gómez Almaguer D, editores. *Hematología: La sangre y sus enfermedades*. Nueva York: McGraw-Hill, 2015.
6. Parker D. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol*. 1993; 11:331-360.
7. Sanabria Ayala V, Landa Piedra A. Anticuerpos: sus propiedades, aplicaciones y perspectivas. *Revista Médicas UIS*. 2007; 20:15-30.
8. Machado NP, Téllez GA, Castaño JC. Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infectio*. 2006; 10(3):186-197.
9. Krishnamurthy A, Jimeno A. Bispecific antibodies for cancer therapy: A review. *Pharmacol Ther*. 2018; 185:122-134.
10. Narváez J. Inmunoglobulinas porcinas. *La Granja. Revista de Ciencias de la Vida*. 2006; 4:64-66.
11. Vega Robledo GB. Anticuerpos. *Rev Fac Med UNAM*. 2009; 52(3):136-138.
12. Montoya Villafañe HH. *Microbiología básica para el área de salud y afines*. 2a ed. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia: Universidad de Antioquia, 2008.
13. García Merino A. Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*. 2011; 26(5):301-306.
14. Waldmann TA. Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med*. 2003; 9(3):269-277.
15. Hammers CM, Stanley JR. Antibody Phage Display: Technique and Applications. *J Invest Dermatol*. 2014; 134(2):1-5.



16. Montaña R, Pujol FH. Anticuerpos monoclonales de primera y segunda generación: aplicaciones biomédicas. Vitae: Academia Biomédica Digital. 2001; 7.
17. Brüggemann M, Caskey HM, Teale C, Waldmann H, Williams GT, Surani MA et al. A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1989; 86(17):6709-6713.
18. Gil Navarro MV, Quintero García JP. Investigación de la inmunosupresión en trasplantes. Anticuerpos policlonales y monoclonales. Actualizaciones en Trasplantes. 2007; 134-141.
19. Bakr MA. Induction therapy. Exp Clin Transplant. 2005; 3(1):320-328.
20. Jouve N. Transgénesis y terapia génica. Universidad de Alcalá. 2009. http://www3.uah.es/benito_fraile/ponencias/transgenesis.pdf. 2009. Accedido el 1 de junio de 2018.
21. Gutiérrez Rodríguez N. La inmunoterapia con anticuerpos monoclonales y sus derivados. [Tesis]. Santander: Universidad de Cantabria. Facultad de Medicina. 2016.
22. Kontermann RE, Brinkmann U. Bispecific Antibodies. Drug Discov Today. 2015; 20(7):838-847.
23. Lindhofer H, Hess J, Ruf P. Trifunctional Triomab® Antibodies for Cancer Therapy. En Kontermann RE, editor. Bispecific Antibodies. Berlín: Springer, 2011; p. 289-312.
24. Fajardo Ramírez OR. Generación de un anticuerpo Bi-específico anti CD19 y CD16 mediador de citotoxicidad tumoral CD16 dependiente. [Tesis doctoral]. Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina. 2014.
25. Chelius D, Ruf P, Gruber P, Plösch M, Liedtke R, Gansberger E et al. Structural and functional characterization of the trifunctional antibody catumaxomab. MAbs. 2010; 2(3):309-319.
26. García Calvo ER. Anticuerpos monoclonales en el tratamiento del cáncer [Tesis]. Madrid: Universidad Complutense. Facultad de Farmacia. 2016.
27. Falero G, Rodríguez BL, Rodríguez I, Suzarte E, Otero O, Núñez N et al. Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra la proteína de membrana externa U (OmpU) de *Vibrio cholerae*. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2007; 38(3):224-227.
28. Cabrera Muñoz J. Anticuerpos Monoclonales (ACMO). Málaga: Fesitess Andalucía, 2011.
29. Green L. Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. J Immunol Methods. 1999; 231(1-2):11-23.
30. Segundo N, Hernández E, López O, Torres O. Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2010; 41(3):17-26.
31. Smith J, Kontermann RE, Embleton J, Kumar S. Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis. FASEB J. 2005; 19(3):331-341.
32. Dreier B, Plückthun A. Ribosome Display: A Technology for Selecting and Evolving Proteins from Large Libraries. Methods Mol Biol. 2011; 687:283-306.
33. Argaluz Ballester U. Plantas transgénicas [Tesis]. La Rioja: Universidad de la Rioja. Escuela Universitaria de Enfermería. 2016.
34. Calvo López T. Caracterización y purificación de una proteína de fusión. [Tesis]. Galicia: Universidad de La Coruña. Facultad de Ciencias. 2014.
35. Spasevska I. An outlook on bispecific antibodies: Methods of production and therapeutic benefits. BioSciences Master Reviews. 2014; 1-7.
36. Kistler M L, Schiller G J. Bispecific Antibody Therapy for Hematologic Conditions: A Review of Current Therapies and Emerging Treatments. 2015; 19:171-176.
37. Reusch U, Knackmus S. Beyond mAbs with TandAbs. Innovations Pharm Technol. 2011; 56-60.
38. Reusch U, Harrington KH, Gudgeon CJ, Fucek I, Ellwanger K, Weichel M. Characterization of CD33/CD3 Tetravalent Bispecific Tandem Diabodies (TandAbs) for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. Clin Cancer Res. 2016; 22(23):5829-5838.



39. Lindhofer H. Trifunctional antibody format: Concept and first drug candidate. *Pharma Focus Asia*. 2008; 9:51-54.
40. Schaefer W, Völger HR, Lorenz S, Imhof-Jung S, Regula JT, Klein C et al. Heavy and light chain pairing of bivalent quadroma and knobs-into-holes antibodies analyzed by UHR-ESI-QTOF mass spectrometry. *mAbs*. 2016; 8(1):49-55.
41. Ridgway JBB, Presta LG, Carter P: 'Knobs-into-holes' engineering of antibody C_H3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng*. 1996; 9(7):617-621.
42. Schaefer W, Regula JT, Böhner M, Schanzer J, Croasdale R, Dürr H et al. Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(27):11187-11192.
43. Wu C, Ying H, Bose S, Miller R, Medina L, Santora L et al. Molecular construction and optimization of anti-human IL-1 α / β dual variable domain immunoglobulin (DVD-IgTM) molecules. *mAbs*. 2009; 1(4):339-347.
44. Liu B, Song Y, Liu D. Recent development in clinical applications of PD-1 and PD-L1 antibodies for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol*. 2017; 20(1):174.
45. Jia L, Zhang Q, Zhang R. PD-1/PD-L1 pathway blockade works as an effective and practical therapy for cancer immunotherapy. *Cancer Biol Med*. 2018; 15(2):11-123.
46. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000; 6(4):443-446.
47. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, et al. High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the Fc γ R. *J Biol Chem*. 2001; 276(9):6591-6604.
48. MacroGenics. Flotetuzumab (CD123 x CD13). MacroGenics. 2018. <https://www.macrogenics.com/mgd006-cd123-x-cd3/>. Accedido el 15 de junio de 2018.
49. Brinkmann U, Kontermann RE. The making of bispecific antibodies. *mAbs*. 2017; 9(2):182-212.
50. Malvicini M, Puchulo G, Matar P, Mazzolini G. Inmunoterapia del cáncer: Importancia de controlar la inmunosupresión. *Medicina (B. Aires)*. 2010; 70(6):565-570.
51. Animal Cell Technology Industrial Platform. Monoclonal Antibodies Approved by the EMA and FDA for Therapeutic Use (status 2017). Animal Cell Technology Industrial Platform. 2017. Disponible en: <http://www.actip.org/products/monoclonal-antibodies-approved-by-the-ema-and-fda-for-therapeutic-use/>. Accedido el 15 de junio de 2018.
52. Heiss MM, Ströhlein MA, Jäger M, Kimmig R, Burges A, Schoberth A et al. Immunotherapy of malignant ascites with trifunctional antibodies. *Int J Cancer*. 2005; 117(3):435-443.
53. Burges A, Wimberger P, Kümper C, Gorbounova V, Sommer H, Schmalfeldt B et al. Effective Relief of Malignant Ascites in Patients with Advanced Ovarian Cancer by a Trifunctional Anti-EpCAM x Anti-CD3 Antibody: A Phase I/II Study. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(13):3899-3905.
54. Riesenberger R, Buchner A, Pohla H, Lindhofer H. Lysis of Prostate Carcinoma Cells by Trifunctional Bispecific Antibodies (α EpCAM \times α CD3). *J Histochem Cytochem*. 2001; 49(7):911-917.
55. Food and Drug Administration. FDA grants regular approval to blinatumomab and expands indication to include Philadelphia chromosome-positive B cell. Food and Drug Administration. 2017. Disponible en <https://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm566708.htm>. Accedido el 14 de junio de 2018.
56. Zhou Y, Gou LT, Mu B, Liao WC, He J, Ma C et al. A fully human CD19/CD3 bi-specific antibody triggers potent and specific cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes against non-Hodgkin's lymphoma. *Biotechnol Lett*. 2012; 34(7):1183-1191.
57. Martinelli G, Boissel N, Chevallier P, Ottmann O, Gökbuget N, Topp MS et al. Complete Hematologic and Molecular Response in Adult Patients With Relapsed/Refractory Philadelphia Chromosome-Positive B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Following Treatment With Blinatumomab: Results From a Phase II, Single-Arm, Multicenter Study. *J Clin Oncol*. 2017; 35(16):1795-1802.
58. Von Stackelberg A, Locatelli F, Zugmaier G, Handgretinger R, Trippett TM, Rizzari C, Gore, L. Phase I/phase II Study of Blinatumomab in Pediatric



- Patients with Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol.* 2016; 34(36):4381-4389.
59. Wu J, Fu J, Zhang M, Liu D. AFM13: a first-in-class tetravalent bispecific anti-CD30/CD16A antibody for NK cell-mediated immunotherapy. *J Hematol Oncol.* 2015; 8(96).
60. Reusch U, Burkhardt C, Fucek I, Le Gall F, Le Gall M, Hoffmann K et al. A novel tetravalent bispecific TandAb (CD30/CD16A) efficiently recruits NK cells for the lysis of CD30⁺ tumor cells. *mAbs.* 2014; 6(3):727-738.
61. Yen WC, Fischer MM, Axelrod F, Bond C, Cain J, Cancilla B et al. Targeting Notch Signaling with a Notch2/Notch3 Antagonist (Tarextumab) Inhibits Tumor Growth and Decreases Tumor-Initiating Cell Frequency. *Clin Cancer Res.* 2015; 21(9):2084-2095.
62. Srivastava M, Murriel C, Yun R, Mayes E, Jie HB, Axelrod F et al. Co-targeting of delta-like ligand 4 (DLL4) and vascular endothelial growth factor a (VEGF) with programmed death 1 (PD1) blockade inhibits tumor growth and facilitates anti-tumor immune responses. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.* 2015; 3(Suppl 2):P373.
63. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J of Med.* 2004; 351(4):337-345.
64. Wang S, Chen C, Meng Y, Hu S, Zheng L, Song J, et al. Effective suppression of breast tumor growth by an anti-EGFR/ErbB2 bispecific antibody. *Cancer Lett.* 2012; 325(2):214-219.
65. Lee BS, Kim HJ, Hwang JW, Cheong KH, Kim KA, Cha HY et al. The Dual Inhibition of Met and EGFR by ME22S, a Novel Met/EGFR Bispecific Monoclonal Antibody, Suppresses the Proliferation and Invasion of Laryngeal Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2016; 23(6):2046-2053.
66. Xu H, Stabile LP, Gubish CT, Gooding WE, Grandis JR, Siegfried JM. Dual Blockade of EGFR and c-Met Abrogates Redundant Signaling and Proliferation in Head and Neck Carcinoma Cells. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(13):4425-4438.
67. Caja Costarricense de Seguro Social. Lista oficial medicamentos. Caja Costarricense de Seguro Social. 2018. Disponible en: <http://www.ccss.sa.cr/lom>. Accedido el 19 de mayo de 2018.
68. Castro Cambronero A, Mata Coto R, Pacheco Molina JA, Mora Román JJ. Oferta de medicamentos biosimilares a la Caja Costarricense de Seguro Social: posible impacto económico para la seguridad social. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica.* 2017; 11(1):22-36.
69. Ministerio de Salud. Regístrelo. Ministerio de Salud. 2018. Disponible en: <https://registrelo.go.cr/cfm/plantillas/ms/index.cfm?uri=/cfm/home/index.cfm&errormsg=>. Accedido el 28 de setiembre de 2018.
70. Bacac M, Klein C, Umana P. CEA TCB: A novel head-to-tail 2:1 T cell bispecific antibody for treatment of CEA-positive solid tumors. *OncoImmunology.* 2016; 5(8). e1197459. doi: 10.1080/2162402X.2016.1197459.

CORRESPONDENCIA

Mora Román, Juan José

Correo: juanjose.moraroman@ucr.ac.cr

