Generación de nuevas estrategias con anticuerpos monoclonales

L. Álvarez-Vallina
Unidad de Inmunología Molecular, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda (Madrid)

Resumen: *La presión evolutiva ha seleccionado los anticuerpos como moléculas clave del sistema inmunitario en la defensa frente a los patógenos. Sin embargo, el desarrollo de las tecnologías para generar anticuerpos monoclonales ha permitido su uso generalizado como agentes diagnósticos y terapéuticos en numerosas enfermedades, incluyendo el cáncer. Al contrario que las neoplasias hematológicas, los tumores sólidos han demostrado ser relativamente resistentes a la acción de los anticuerpos monoclonales. En un intento de mejorar su eficacia antitumoral se han generado nuevos formatos de anticuerpos monoclonales recombinantes, que en principio imitaron la estructura de las immunoglobulinas nativas y generaron anticuerpos fundamentalmente bivalentes y monoespecíficos. En fechas más recientes se han desarrollado nuevos formatos de anticuerpos multivalentes, con mayor capacidad de penetración tumoral, mediante la optimización de parámetros farmacocinéticos y funcionales. Éstos presentan una mayor eficacia antitumoral gracias a la incorporación de nuevas funciones efectoras. En este capítulo se revisan los recientes avances en el campo de la ingeniería de anticuerpos y las nuevas estrategias terapéuticas basadas en el uso de anticuerpos monoclonales recombinantes de tercera generación.*

Palabras clave: Anticuerpo monoclonal – Ingeniería de anticuerpos – Anticuerpo recombinante – *Trimerbody*.

Anticuerpos monoclonales

La estructura básica de un anticuerpo (Ac) está formada por dos cadenas proteicas pesadas (H), unidas entre sí por puentes disulfuro, y dos cadenas ligeras (L), igualmente idénticas entre sí, que se unen individualmente a cada una de las cadenas H por interacciones covalentes y no covalentes (Fig. 1). Los primeros 100 residuos de cada cadena son virtualmente distintos en cada molécula de Ac (región variable o V), mientras el resto de la cadena es idéntica en cada Ac de una determinada clase (región constante o C). La zona de unión con el antígeno (Ag) está formada por tres segmentos peptídicos no colineales pertenecientes al dominio V_H y tres al dominio V_L, que se yuxtaponen para formar una superficie o cavidad (parátopo) donde se aloja la región del Ag reconocida por el Ac (epítopo). Los segmentos que lo forman reciben el nombre de "regiones hipervariables" o "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR, *Complementary Determining Regions*). Cada molécula de Ac presenta tres regiones unidas por un segmento polipeptídico flexible denominado "región bisagra",[1] que tiene una forma similar a una Y (Fig. 1A).

Hasta que se desarrollaron los anticuerpos monoclonales (AcMo) en el año 1975,[2] el uso

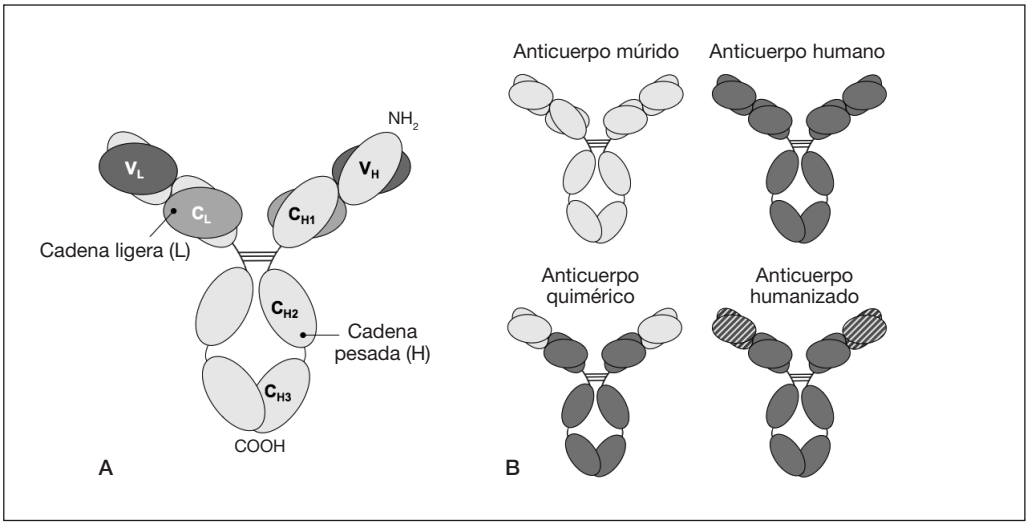

Figura 1. A) Estructura de un anticuerpo (Ac). Un Ac está formado por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), y contiene dos zonas variables (cada una compuesta por una región V_H y una V_L) que le confieren la especificidad de unión. El dominio Fc es la región efectora encargada de activar el complemento y de unirse a diferentes tipos celulares. B) Diagramas esquemáticos de diversos tipos de AcMo: múridos, humanos, quiméricos y humanizados.

clínico de Ac se centraba únicamente en la utilización de sueros policlonales, que contienen una "mezcla" de Ac procedentes de la activación de distintos clones de linfocitos B. El hibridoma es el resultado de la fusión de un linfocito B, procedente del bazo de un animal inmunizado con el Ag de interés, con una célula de mieloma que aporta la capacidad de dividirse indefinidamente. De esta forma pueden obtenerse Ac producidos por un clon celular (monoclonales) que derivan de un único linfocito B. Estos AcMo son, por tanto, homogéneos y específicos de epítopos individuales, y pueden producirse en grandes cantidades, lo que les convierte en reactivos perfectamente estandarizados.

Sin embargo, el uso clínico de los AcMo de primera generación presentaba importantes limitaciones derivadas de su origen no humano: corta vida media sérica, ineficaz reclutamiento de funciones efectoras y problemas inmunitarios. Una proporción importante de los pacientes tratados con AcMo desarrollan una respuesta inmunitaria (HAMA, *Human Anti-Murine Antibodies*). Para solventar estos obstáculos se desarrollaron nuevas técnicas moleculares que han dado origen a los AcMo de segunda generación: quiméricos y humanizados. Un AcMo quimérico (AcMo-Q) es una molécula artificial en la cual las regiones V provienen de una inmunoglobulina (Ig) múrida y las regiones constantes de una Ig humana (Fig. 1B). Los objetivos fundamentales de la quimerización son reducir la inmunogenicidad y potenciar las funciones efectoras del AcMo múrido, manteniendo la especificidad y la afinidad del AcMo original. La técnica implica el aislamiento de los genes de las regiones V_H y V_L a partir del hibridoma que produce el AcMo, su inserción en vectores de expresión que contienen genes de una región C_H o C_L humana, y la selección de los transfectantes generados a partir de células de mamífero para la producción y posterior purificación del AcMo-Q.[3,4] Numerosos trabajos han demostrado que los AcMo-Q interaccionan de forma específica con

la diana reconocida por el AcMo múrido original, son capaces de mediar funciones efectoras de forma eficiente y son mejor tolerados. Como consecuencia se ha desarrollado una gran variedad de AcMo-Q, algunos de los cuales han sido aprobados para uso terapéutico.

Sin embargo, en algunos casos los AcMo-Q son capaces de inducir respuestas inmunitarias (HACA, *Human Anti-Chimeric Antibodies*). Asimismo, para reducir la inmunogenicidad se desarrollaron los AcMo humanizados (AcMo-Hz). Esta tecnología consiste en el trasplante de las regiones hipervariables (CDR *grafting*) de un AcMo múrido entre las regiones de entramado de un dominio V humano (Fig. 1B).[5,6] De este modo se genera un dominio V híbrido ratón-humano y se transfiere una especificidad de reconocimiento determinada a una molécula que es completamente humana en el resto de su secuencia.

El desarrollo de AcMo terapéuticos ha sido tan vertiginoso que en la carrera para crear moléculas más eficaces y mejor toleradas se han generado procedimientos para obtener AcMo totalmente humanos (AcMo-H): generación de cepas de ratones transgénicos para los *loci* de las Ig humanas[7] y tecnología de genotecas de anticuerpos, mediante la "presentación o exposición" de repertorios de Ac de la superficie de fagos filamentosos *(phage display).*[8]

Actualmente hay más de 30 AcMo aprobados para su utilización como fármacos en humanos, y varias decenas se encuentran en fase de ensayo clínico. El efecto terapéutico de los AcMo "desnudos" (IgG nativas) está determinado por sus propiedades como moléculas efectoras de la respuesta inmunitaria, o por el reconocimiento de dianas específicas. Entre las primeras se incluyen su capacidad para activar células del sistema inmunitario que expresan receptores para la porción Fc (FcR) de la Ig (mecanismos Fc-dependientes), y su capacidad para desencadenar CDC *(Complement Dependent Cytotoxicity).* Los AcMo de las subclases IgG_1 e IgG_3 interaccionan con los receptores FcRγI (CD64), FcRγIIa (CD32), FcRγIIb y FcRγIII (CD16), presentes en diferentes tipos celulares. La activación de los FcR produce diferentes efectos, según el tipo celular: fagocitosis, liberación de mediadores inflamatorios y ADCC *(Antibody-Dependent Cell mediated Cytotoxicity).* Entre los mecanismos Fc-independientes se incluyen la inducción de la muerte programada (apoptosis), el bloqueo de interacciones ligando/receptor, la inhibición de la angiogénesis y la activación de la respuesta inmunitaria (AcMo inmunoestimulantes).

Nuevos formatos de anticuerpos

Algunas características de los AcMo nativos, como su tamaño y su prolongada vida media, pueden representar una limitación para ser utilizados in vivo como herramienta terapéutica, en algunos contextos. La vida media tan larga se debe a que su tamaño está por encima del umbral de filtración glomerular y a su capacidad para unirse al denominado FcR neonatal (FcRn), que protege a la IgG de su degradación en el endosoma. Por ello se han generado diferentes tipos de fragmentos recombinantes derivados de Ac. Los fragmentos Fv (25 kDa), formados por las regiones V_H y V_L, son ideales para algunas aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, pero la débil unión de las regiones V los hace inestables. Para mejorar su estabilidad se han desarrollado diferentes estrategias, entre las que destaca la inserción de secuencias peptídicas flexibles *(linkers)* entre las regiones V. El *linker* permite el apareamiento intramolecular de ambos dominios, para formar un sitio funcional de unión al Ag. Este formato, denominado scFv *(single chain Fragment variable)* es uno de los más utilizados para generar nuevos formatos y construir repertorios de Ac (Fig. 2).[8,9] Sin embargo, los fragmentos recombinantes con un tamaño inferior a 60 kDa presentan limitaciones debido a su corta vida media, al ser eliminados rápidamente por la orina.

Para aumentar la vida media se han propuesto diferentes estrategias, cuyo objetivo es la obtención de Ac multivalentes, denomina-

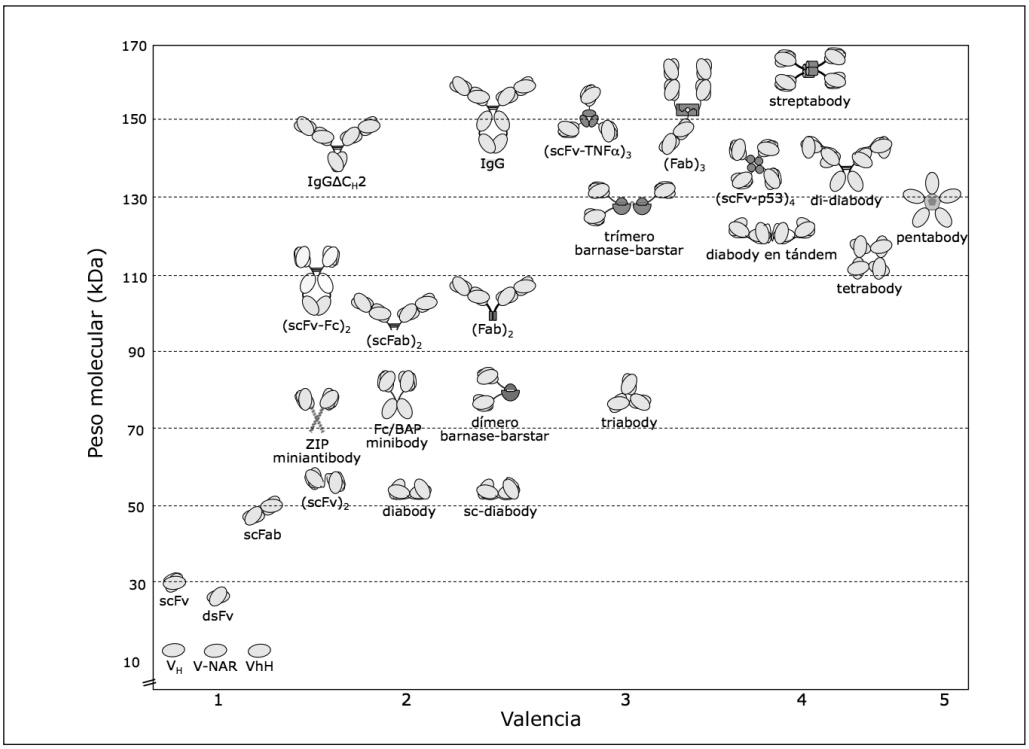

Figura 2. Clasificación, según peso molecular (kDa) y valencia, de los principales fragmentos recombinantes derivados de anticuerpos (Ac). Sólo aparecen aquellos Ac que se han utilizado en ensayos de imagen molecular o de los que se han descrito características funcionales o estructurales que demuestran su multivalencia.

dos AcMo de tercera generación, mediante la asociación de dos o más fragmentos mediante *linkers* de longitud variable, o con el uso de proteínas de fusión que incorporan dominios de oligomerización (Fig. 2).

Estrategias de multimerización basadas en la modificación de la longitud del linker

En la mayoría de los scFv, los dominios V_H y V_L están unidos por *linkers* de 15 a 20 residuos, formados por una repetición de residuos glicina y serina $(G_4S)_3$ que proporcionan flexibilidad y solubilidad. Utilizando *linkers* más cortos se impide el apareamiento intramolecular entre los dos dominios de la misma cadena, por lo que se produce un apareamiento de los dominios V_H y V_L de dos cadenas distintas, creando dos sitios de unión al Ag. Estos fragmentos bivalentes (Fig. 2), denominados *diabodies* (30 kDa), presentan una mayor afinidad funcional (avidez).[10] Si el *linker* es eliminado por completo, el resultado es la formación de trímeros de 80 kDa o tetrámeros de 110 kDa, denominados *triabodies* o *tetrabodies.*[11,12] También es posible combinar dos scFv introduciendo un *linker* adicional entre el extremo C-terminal de un scFv y el extremo N-terminal de otro scFv, obteniendo fragmentos $(scFv)_2$ monoespecíficos o biespecíficos[13] (Fig. 2). Estos fragmentos biespecíficos (anti-CD19 × anti-CD3), denominados *BITE (BIspecific T-cell Engager),* han demostrado un enorme potencial terapéutico e inducción de regresión tumoral en pacientes con linfomas no Hodgkin.[14,15]

Estrategias de multimerización basadas en dominios de oligomerización

Los dominios de dimerización ricos en leucina *(zipper),* presentes en las proteínas nucleares JUN y FOS y en los reguladores de la trascripción GCN4 (en levaduras) y C/EBP (en células de mamífero), presentaban excelentes propiedades para promover la formación de complejos oligoméricos.[16,17] Estos conocimientos fueron aprovechados para generar el *miniantibody* (64 kDa), una proteína de fusión homodimérica compuesta por el *zipper* de CGN4, la región bisagra de la IgG_3 múrida y un scFv.[18] La ventaja de este formato es su capacidad de recuperar la bivalencia de las Ig, reduciendo su peso molecular. Posteriormente se desarrollaron otros diseños similares (bivalentes y homodiméricos), como el *minibody* (80 kDa), en el cual un scFv se une al dominio CH_3 de una IgG mediante un *linker* (Fig. 2). También se han desarrollado otros formatos de Ac multiméricos que intentan mantener la "fisonomía" del Ac nativo, por ejemplo mediante la incorporación de dominios de homodimerización de origen procariótico, como la fosfatasa alcalina.[19] Cabe destacar la tecnología denominada "botón en ojal" *(knob-into-hole),* que permite generar heterodímeros biespecíficos en formato de *minibody.*[20] Otra estrategia de multimerización consiste en la utilización del complejo que forma la ribonucleasa bacteriana barnasa (12 kDa) con su inhibidor natural barstar (10 kDa).[21] Mediante esta estrategia pueden obtenerse Ac diméricos y triméricos de 85 y 130 kDa, respectivamente.

La fusión de un scFv al factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) permitió generar homotrímeros activos[22] con un peso molecular aproximado de 140 kDa (Fig. 2). Ambos dominios de la proteína de fusión, el scFv y el TNF-α, son funcionalmente activos y su efecto terapéutico es superior al del TNF-α aislado. Mediante la fusión de un scFv con el complejo estreptavidina-biotina se ha obtenido un anticuerpo tetramérico de 170 kDa,

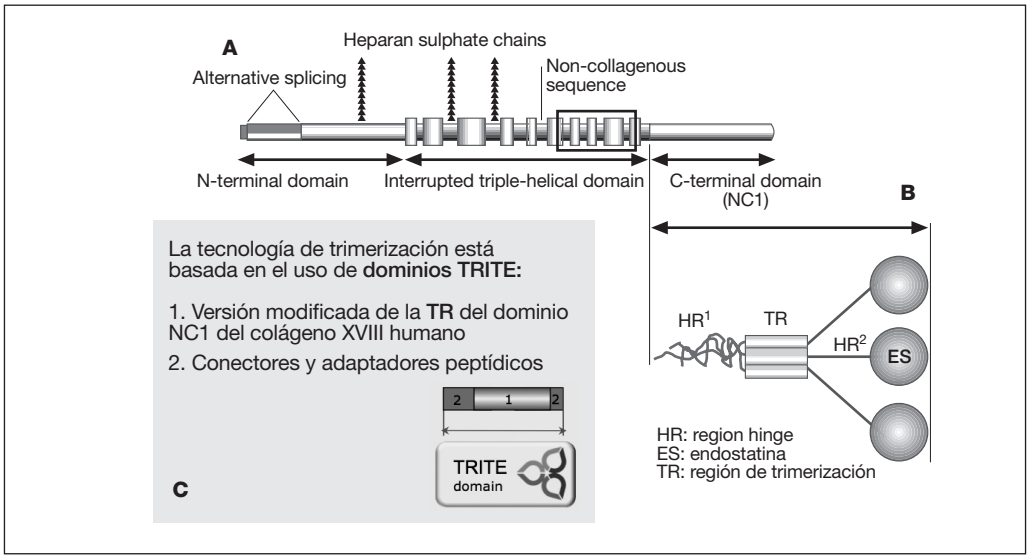

Figura 3. A) La cadena alfa (α) del colágeno presenta un dominio central de triple hélice discontinua, un largo dominio de trombospondina N-terminal y un dominio no colagenoso (NC1) C-terminal. B) El dominio NC1 se compone de tres segmentos: una región de trimerización (TR) N-terminal, implicada en el ensamblaje, un linker *sensible a la acción de las proteasas, y un dominio globular compacto (endostatina) situado en el extremo C-terminal. C) Diagrama esquemático de un dominio TRITE.*

denominado *streptabody.* Este formato es muy estable y permite la incorporación de scFv con la misma o diferentes especificidades.[23] Un formato similar, tetramérico monoespecífico,[24] de aproximadamente 130 kDa, surge mediante la fusión del dominio de tetramerización de p53 con un scFv (Fig. 3).

Inconvenientes de las estrategias de multimerización actuales

La mayoría de los Ac multivalentes generados mediante estrategias de multimerización basadas en la modificación de la longitud del *linker* tienen importantes impedimentos estructurales, así como problemas de estabilidad y de solubilidad. En general, los Ac multivalentes generados con estrategias de multimerización basadas en dominios de oligomerización utilizan dominios de origen no humano altamente inmunógenos, o bien dominios derivados de proteínas biológicamente activas, que añaden funciones no requeridas o indeseables, en muchos contextos.

Un nuevo concepto de anticuerpo multivalente

El empleo de dominios de oligomerización de origen humano es fundamental para generar moléculas terapéuticas plenamente efectivas. Una de las familias de proteínas con capacidad de multimerización mejor estudiada es la del colágeno (Fig. 3). Datos previos indicaban que una región de 60 residuos, situada en el dominio NC1, era la causante de la trimerización no covalente de las cadenas alfa del colágeno.[25] Nuestro grupo ha demostrado que la fusión de esta región de trimerización (TR) al extremo C-terminal de un scFv confiere un estado trimérico al anticuerpo generado,[26] que ha sido denominado *trimerbody*. Los Ac en formato *trimerbody* se aíslan en forma funcional a partir de medio condicionado de las células transfectadas, y son fácilmente purificados mediante cromatografía;[27] son triméricos en solución y poseen una excelente estabilidad y capacidad de unión al Ag. Los estudios mediante resonancia del plasmón superficial (Biacore) han demostrado que un *trimerbody* tiene una afinidad funcional unas 100 veces mayor, en comparación con un scFv monovalente.[26]

El efecto avidez hace del *trimerbody* un formato muy competitivo respecto a los multivalentes convencionales diméricos (por ejemplo, *minibody*). El análisis del modelo tridimensional del *trimerbody* sugiere una estructura con forma de trípode con los dominios scFv orientados hacia fuera. La flexibilidad entre los dominios de unión al Ag, requeridos para el entrecruzamiento *(cross-linking),* es otro aspecto importante en el diseño de Ac multivalentes de receptores de superficie. Según nuestros cálculos, en un *trimerbody* los scFv tienen un área de influencia unas 11 veces mayor que otros formatos bivalentes, como el *minibody,* aumentando así la probabilidad de una segunda interacción efectiva.[28] La unión multivalente reducirá la constante de disociación *(off rates),* y aumentará el tiempo de retención del Ac unido al Ag.

El potencial del formato *trimerbody* para la localización de depósitos tumorales in vivo se ha estudiado en varios modelos experimentales de cáncer humano en ratones desnudos.[29] Un *trimerbody* que reconoce un antígeno asociado a un tumor localiza, de manera rápida y específica, tumores in vivo. La máxima señal se observó a las 5 horas de la inyección del *trimerbody* marcado. Es importante destacar que un *trimerbody* con especificidad frente a un Ag irrelevante no localizó tumores in vivo.[29]

Ventajas del formato trimerbody

La simplicidad, la valencia, la estabilidad y la enorme plasticidad del formato *trimerbody* le confieren una gran ventaja frente a los AcMo convencionales y frente a los formatos de Ac multivalentes actualmente existentes (Fig. 2). El formato *trimerbody* es la base ideal para el desarrollo de la nueva generación de moléculas terapéuticas, cuyas características más representativas son (Fig. 4):

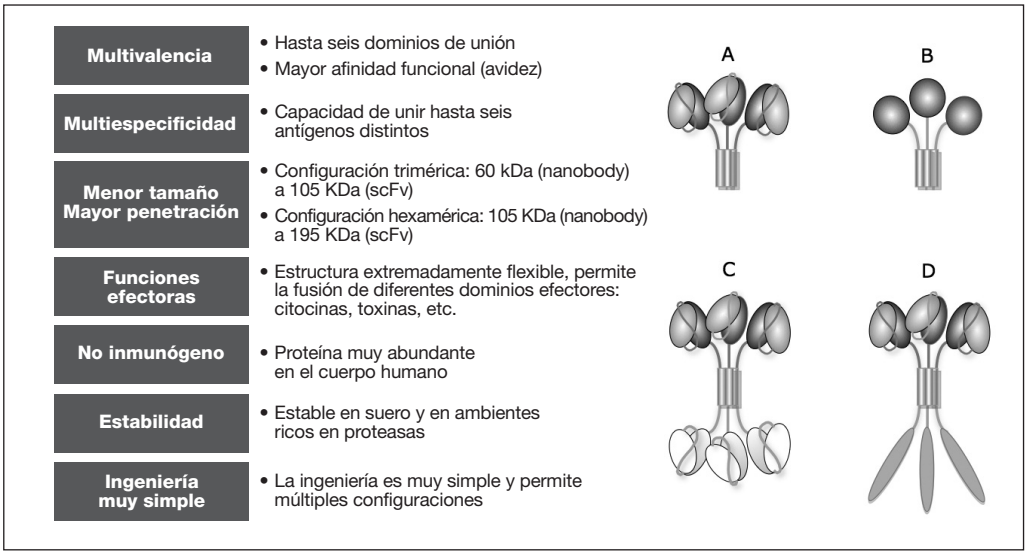

Figura 4. Principales características del formato trimerbody *y ejemplos de configuraciones. Configuraciones trivalentes monoespecíficas (A y B):* N-trimerbody *basado en dominios de unión en formato scFv (A) y* N-trimerbody *basado en dominios de unión VHH* (nanobody) *(B). Configuraciones hexavalentes (C y D): single-chain* N-/C-trimerbody *biespecífico basado en dominios de unión en formato scFv (C) y* single-chain N-trimerbody *con dominio efector C-terminal (D).*

- Multivalencia: hasta seis posibles valencias.
- Multiespecificidad: por su capacidad de unir varias dianas diferentes.
- Tamaño y configuración adaptables: su tamaño está por encima del límite de filtración renal, lo que aumenta su vida media, y por debajo del tamaño de los AcMo convencionales, lo que le permite aumentar la penetración tumoral.
- No inmunógeno: secuencia completamente humana.
- Estabilidad: tanto en suero como en ambientes ricos en proteasas.
- Sencillez: ingeniería molecular sencilla.
- Adición de funciones efectoras: citocinas, toxinas, etc.

El efecto avidez, aportado por la adición de un tercer scFv asociado con la "geometría única", derivada de la estrategia de trimerización utilizada, y su tamaño ajustable, hacen que el formato *trimerbody* sea superior al patrón de referencia de los Ac multivalentes actuales *(minibody)* en determinadas aplicaciones clínicas, como la localización tumoral *(tumor targeting),* el *trapping* molecular y el entrecruzamiento de receptores de superficie como agonista *(cross-linking).*

Bibliografía

1. Sanz L, Blanco B, Álvarez-Vallina L. Antibodies and gene therapy: teaching old 'magic bullets' new tricks. Trends Immunol. 2004;25:85-91.
2. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975;256:495-7.
3. Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. Nature. 1984;312:643-6.
4. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. Proc Natl Acad Sci USA. 1984;81:6851-5.

5. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. Nature. 1986;321:522-5.
6. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. Nature. 1988;332:323-7.
7. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. Annu Rev Immunol. 1994;12:433-55.
8. Hudson PJ, Souriau C. Engineered antibodies. Nat Med. 2003;9:129-34.
9. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA. 1988;85:5879-83.
10. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol. 2005;23:1126-36.
11. Hudson PJ, Kortt AA. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. J Immunol Methods. 1999;231:177-89.
12. Kipriyanov SM, Moldenhauer G, Schuhmacher J, Cochlovius B, Von der Lieth CW, Matys ER, et al. Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics. J Mol Biol. 1999;293:41-56.
13. Adams GP, McCartney JE, Tai MS, Oppermann H, Huston JS, Stafford WF III, et al. Highly specific in vivo tumor targeting by monovalent and divalent forms of 741F8 anti-c-erbB-2 single-chain Fv. Cancer Res. 1993;53:4026-34.
14. Bargou R, Leo E, Zugmaier G, Klinger M, Goebeler M, Knop S, et al. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. Science. 2008;321:974-7.
15. Beckman RA, Weiner LM, Davis M. Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. Cancer. 2007;109:170-9.
16. O'Shea EK, Rutkowski R, Kim PS. Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. Science. 1989;243:538-42.
17. O'Shea EK, Rutkowski R, Stafford WF III, Kim PS. Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun. Science. 1989;245:646-8.
18. Pack P, Pluckthun A. Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric FV fragments with high avidity in Escherichia coli. Biochemistry. 1992;31:1579-84.
19. Griep RA, van Twisk C, Kerschbaumer RJ, Harper K, Torrance L, Himmler G, et al. pSKAP/S: an expression vector for the production of single-chain Fv alkaline phosphatase fusion proteins. Protein Expr Purif. 1999;16:63-9.
20. Ridgway JB, Presta LG, Carter P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng. 1996;9:617-21.
21. Deyev SM, Waibel R, Lebedenko EN, Schubiger AP, Pluckthun A. Design of multivalent complexes using the barnase*barstar module. Nat Biotechnol. 2003;21:1486-92.
22. Borsi L, Balza E, Carnemolla B, Sassi F, Castellani P, Berndt A, et al. Selective targeted delivery of TNF-alpha to tumor blood vessels. Blood. 2003;102:4384-92.
23. Kipriyanov SM, Little M, Kropshofer H, Breitling F, Gotter S, Dubel S. Affinity enhancement of a recombinant antibody: formation of complexes with multiple valency by a single-chain Fv fragment-core streptavidin fusion. Protein Eng. 1996;9:203-11.
24. Rheinnecker M, Hardt C, Ilag LL, Kufer P, Gruber R, Hoess A, et al. Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen. J Immunol. 1996;157:2989-97.
25. Sasaki T, Fukai N, Mann K, Gohring W, Olsen BR, Timpl R. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. EMBO J. 1998;17:4249-56.
26. Cuesta AM, Sánchez-Martín D, Sanz L, Bonet J, Compte M, Kremer L, et al. In vivo tumor targeting and imaging with engineered trivalent antibody fragments containing collagen-derived sequences. PLoS One. 2009;4:e5381.
27. Sánchez-Arévalo LV, Cuesta AM, Sanz L, Compte M, García P, Prieto J, et al. Enhanced antiangiogenic therapy with antibody-collagen XVIII NC1 domain fusion proteins engineered to exploit matrix remodeling events. Int J Cancer. 2006;119:455-62.
28. Cuesta AM, Sainz-Pastor N, Bonet J, Oliva B, Álvarez-Vallina L. Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. Trends Biotechnol. 2010;28:355-62.
29. Sánchez-Martín D, Cuesta AM, Fogal V, Ruoslahti E, Álvarez-Vallina L. The multi-compartmental p32/gClqR as a new target for antibody-based tumor targeting strategies. J Biol Chem. 2011; 286:5197-203.

DISCUSIÓN

A. Ribas: La investigación con ratones inmunodeficientes con xenoinjertos que nos has mostrado constituye el primer paso de los estudios in vivo. ¿Habéis probado un *trimerbody* múrido en un ratón inmunocompetente o un *trimerbody* humano en un primate para ver su farmacocinética y comprobar su eficacia?

L. Álvarez-Vallina: En la actualidad estamos realizando estudios de biodistribución y localización con *trimerbodies* N-terminal y hexavalentes en modelos múridos inmunodeficientes, para tener una idea general de su comportamiento. En relación a tu pregunta, sí hemos hecho algún estudio con *trimerbodies* completamente múridos, con la secuencia del colágeno 18 y un dominio de unión múrido en ratones normales, para comprobar la posible inmunogenicidad de dichas moléculas. Hemos observado que, tras una administración repetida y sistémica de estos *trimerbodies*, no hay una respuesta inmunitaria relevante, ni sérica ni celular. Por otro lado, con nuestro control positivo, en el cual forzamos la inmunización mediante el uso de adyuvantes, sí detectamos una respuesta inmunitaria tanto frente al dominio de unión como al de trimerización. Aún no tenemos datos concluyentes, pero creemos que los *trimerbodies* no serán especialmente inmunógenos. Además, un trabajo publicado por un grupo de Seattle demuestra que en pacientes normales pueden detectarse trazas de colágeno 18 en suero, que indican que la proteína es tolerable.

A. Ribas: ¿Se dispone de datos farmacocinéticos de estos compuestos en ratón y sobre si son similares a una inmunoglobulina de ratón?

L. Álvarez-Vallina: Sólo tenemos datos muy preliminares, pero un *trimerbody* N-terminal sencillo, de la primera generación, sin dominios Fc, tiene una vida media de 3 a 4 horas, por lo que las propiedades de los *trimerbodies* son muy favorables para aplicaciones diagnósticas, es decir, utilizar la molécula como guía para llevar algo hasta el tumor. El *trimerbody* circula por el torrente sanguíneo varias veces y se elimina rápidamente, con lo cual su proporción sangre/tumor es muy favorable, mucho más que la de una inmunoglobulina.

J. Yagüe: Desde el punto de vista terapéutico, ¿sabéis qué capacidad de difusión tienen estas moléculas en las distintas cavidades (articular, barrera hematoencefálica, etc.)? ¿Es similar a la de una inmunoglobulina?

L. Álvarez-Vallina: No tenemos datos tan exhaustivos porque se salen del ámbito académico y de un laboratorio normal. Para obtenerlos es necesario disponer de la colaboración de empresas y de gente que nos pueda ayudar. No disponemos de datos directos sobre si pueden atravesar la barrera hematoencefálica o si llegan a las articulaciones mejor o peor que las inmunoglobulinas. En mi opinión, creo que su capacidad de difusión será mayor, tanto por su tamaño como por su diseño, y probablemente alcanzarán concentraciones más altas en las cavidades.

C. Muñoz: A partir de la charla ha quedado muy clara la aplicación diagnóstica de los *trimerbodies*, ¿pero habéis pensado en aplicaciones terapéuticas? Es decir, ¿qué modificaciones harías para que los *trimerbodies* pudieran mediar mecanismos efectores?

L. Álvarez-Vallina: Una de las aplicaciones terapéuticas obvias es la generación de biespecíficos, gracias a la polivalencia. Aunque hay que tener cuidado con los anti-CD3, ya que no podemos generar un *trimerbody* biespecífico con tres anti-CD3, porque provocaría una activación sistémica generalizada. Actualmente estamos trabajando en un *trimerbody* que sólo tenga una copia de

anti-CD3 y tres copias de antitumor, con lo que se garantizaría la ausencia de entrecruzamiento *(cross-linking)* tumoral, no habría una activación sistémica de los linfocitos T y probablemente podrían activarse los depósitos tumorales de una forma mucho más eficiente que los anticuerpos tipo BITE, que son los anticuerpos biespecíficos que ahora están teniendo tanto éxito. En resumen, uno de los principales focos en el tratamiento del cáncer es conseguir anticuerpos biespecíficos que produzcan un entrecruzamiento de CD3 y que nos permitan redirigir el sistema inmunitario hacia el tumor.

M. del Val: ¿Los *trimerbodies* son capaces de detectar las metástasis?

L. Álvarez-Vallina: Por ahora sólo hemos trabajado con *trimerbodies* marcados con fluorocromos que emiten en el infrarrojo cercano, por lo que los datos son limitados, ya que la tecnología va por detrás del diseño molecular. Nosotros creemos que los *trimerbodies* con biomarcadores adecuados y el uso de tecnología de imagen por emisión de fotón único (PET) más avanzada (o algo equivalente) sí permitirán localizar micrometástasis.

C. Juárez: Volviendo a la relación de los *trimerbodies* con el sistema inmunitario, creo que estas moléculas presentan un potencial inmenso, pero la desconexión con el sistema inflamatorio es evidente por los sistemas de activación de complemento, por ejemplo. ¿Os habéis planteado conectar estas moléculas con los sistemas clásicos de inflamación, como ya hacen algunos anticuerpos monoclonales en terapéutica?

L. Álvarez-Vallina: Este tipo de moléculas permite añadir, en cualquiera de los extremos, tanto dominios de anticuerpos como toxinas, citocinas, inhibidores endógenos de la angiogénesis, etc. Actualmente, en el laboratorio tenemos datos preliminares de *trimerbodies* con endostatina, un inhibidor endógeno, y también con una citocina, y hemos observado que se expresa muy bien. Como dices, es una forma de poder añadir dominios y funciones efectoras adicionales, y creo que es una línea importante a desarrollar.

F. Ruiz-Cabello: Enfocado al diseño de estructuras biespecíficas, ¿en qué medida el diseño de oligomerización con el dominio de colágeno introduce más rigidez al *trimerbody* en comparación con la rigidez que tiene una inmunoglobulina convencional?

L. Álvarez-Vallina: Estos *trimerbodies* tienen mayor plasticidad que los anticuerpos normales debido a que su dominio de oligomerización está compuesto por sólo 50 residuos, y poseen conectores flexibles de longitudes variables en los dos dominios terminales, el amino y el carboxi-terminal. Nuestro dominio de unión es muy pequeño, sobre todo en comparación con el de otras compañías que poseen centenares de residuos, por lo que nuestros dominios de oligomerización permiten mucha flexibilidad, además de ser muy prácticos y fáciles de manipular.

N. Prats: ¿Habéis realizado estudios comparativos de la regresión de los tumores frente a otro anticuerpo?

L. Álvarez-Vallina: Estamos desarrollando un modelo con el que podamos comparar un anticuerpo BITE con un *trimerbody* biespecífico que reconoce CD3 y antígeno carcinoembrionario (CEA). La dificultad de trabajar con este modelo es que usamos dominios que reconocen antígenos humanos, por lo que en primer lugar debe inocularse el tumor al modelo experimental y luego realizar una inoculación repetida de células humanas (PBL). Con este modelo veremos si nuestra hipótesis inicial es cierta o no, es decir, si conseguimos inducir la regresión del tumor.

L. Graça: Si el funcionamiento de los *trimerbodies* depende de su proximidad a los linfocitos T, ¿cómo funciona la penetración en las masas tumorales?

L. Álvarez-Vallina: Las masas tumorales tienen una vasculatura muy irregular, con zonas que presentan una barrera endotelial irregular, por lo que las moléculas entran mejor. Creemos que la mayor parte de *trimerbodies* pueden entrar fácilmente por esas zonas. Pero, por otro lado, también cabe la posibilidad de que los *trimerbodies* penetren en el tumor mientras están asociados a los linfocitos T que infiltran el tumor.

D. Jaraquemada: ¿Qué posibilidades hay de que se genere una respuesta anticolágeno?

L. Álvarez-Vallina: Es difícil que se produzca dicha respuesta porque el colágeno es una molécula muy ubicua, es una de las proteínas más importantes en el cuerpo humano. Además, hay datos que sugieren que pueden detectarse, en los pacientes, fragmentos circulantes que contienen el dominio NC1. Adicionalmente, también hemos hecho algún experimento animal utilizando el dominio del colágeno múrido en ratones inmunocompetentes y no hemos detectado una respuesta inmunitaria apreciable, lo que indica que la aplicación de los *trimerbodies* por vía sistémica o intravenosa sería tolerable.

A. Ribas: ¿Habéis considerado marcar radiactivamente los *trimerbodies* para poder hacer un seguimiento durante su uso en pacientes?

L. Álvarez-Vallina: Es uno de los proyectos en los que actualmente estamos trabajando en colaboración con un centro en San Sebastián (CIC bioMAGUNE) que tiene una unidad de radiofarmacia importante, donde ahora realizamos estudios de biodistribución y pretendemos conjugar los *trimerbodies* con radionúclidos. Por otro lado, tampoco descartamos el uso de hexavalentes, que tienen una vida media de 6 a 8 horas, con los que podríamos obtener alguna aplicación diagnóstica.