

Conjugación de anticuerpos monoclonales a drogas y toxinas para el tratamiento del cáncer*

M. J. EMBLETON

Cancer Research Campaign Laboratories, University of Nottingham, University Park, Nottingham NG7 2RD

Recibido en febrero de 1988

El uso de anticuerpos monoclonales (AcM) como transportadores específicos (*targeting*) de drogas y toxinas para la terapia anticancerosa, se ha venido desarrollando durante un número de años (Davies y Crumpton, 1982; Moller, 1962; Baldwin y Byers, 1985). Se han producido muchos reportes estimulantes sobre efectos citotóxicos selectivos contra células tumorales portadoras de antígenos específicos definidos por AcM, y otros que describen efectos terapéuticos sobre tumores-modelos de roedores, o sobre xenotrasplantes de tumores humanos creciendo en ratones inmunodeprimidos.

No obstante, existen aún problemas por vencer antes que los conjugados AcM-toxinas o AcM-drogas puedan ser aplicables universalmente en la clínica. Este trabajo discute brevemente los requerimientos básicos para el empleo sistémico de AcM como transportadores específicos, resume algunas de las dificultades que se han presentado para el desarrollo de estas investigaciones y finalmente sugiere algunas estrategias para resolver tales problemas.

El primer requerimiento de un AcM para ser usado como transportador específico de drogas o toxinas contra tumores, es que debe reconocer células tumorales y no células normales siendo capaz de esta forma, de localizar específicamente los depósitos tumorales *in vivo*. En la literatura se describe un gran número de AcM antitumorales, y muchos de ellos han sido proclamados como específicos para ciertos tipos de tumores.

Aun así, el ensayo riguroso usualmente revela alguna reactividad cruzada de estos AcM antitumorales con ciertas células normales, frecuentemente a bajos niveles, de forma que es muy posible que virtualmente todos estos AcM detecten antígenos expresados con mayor fuerza en las células tumorales que en las normales, no siendo, por tanto, realmente específicos para las primeras.

* Este trabajo es una "minirrevisión" que forma parte de los artículos "memoria" relativos a los trabajos presentados en el Taller Internacional sobre Tecnología de Producción de Anticuerpos Monoclonales, celebrado en La Habana, Cuba, entre los días 5 y 7 de octubre de 1987. Por tales razones, no requiere una bibliografía con las características editoriales de la Revista.

Si bien este nivel de discriminación es suficiente para que los AcM radiomarcados dirigidos contra antígenos asociados a tumores produzcan imágenes de tumores humanos en una cámara *gamma* (Berche *et al.*, 1982; Farrands *et al.*, 1982; Larson *et al.*, 1982), en términos relativos al porcentaje de dosis inyectada, la localización de tumores de pacientes es más bien ineficiente y típicamente está por debajo del 1% (en comparación, hasta el 10% puede ser alcanzado en varios modelos experimentales).

Una segunda propiedad del anticuerpo es que sea capaz de soportar el acoplamiento químico a la droga a una relación molar droga:anticuerpo, suficiente para producir citotoxicidad, sin afectación de la inmunorreactividad. El funcionamiento de diferentes AcM en este sentido es muy variable y no necesariamente es dependiente del isotipo (Rowland *et al.*, 1983); así, en el presente, la conveniencia de un AcM puede ser sólo determinada empíricamente.

El problema de la inactivación puede ser minimizado mediante el uso de una molécula *carrier* sustituida con la droga o toxina (Garnett y Baldwin, 1986; Rowland *et al.*, 1975), particularmente si esta molécula se acopla sobre bases equimolares a la porción Fc de la inmunoglobulina (ej.: utilizando las cadenas de carbohidrato laterales).

Igualmente importante es la retención de la actividad por la droga o la toxina. Todas las toxinas empleadas hasta el presente han sido proteínas que son fácilmente acoplables mediante agentes heterobifuncionales, sin compromiso de sus sitios activos. Cuando se han conjugado toxinas con propiedades de lectinas (e.g. ricina), la mayoría de los investigadores usan la subunidad cadena A tóxica, que se ha separado previamente de la subunidad cadena B afin por carbohidratos. Algunos han demostrado que es posible usar una toxina total "bloqueada" (Thorpe y Ross, 1982).

Las drogas citotóxicas imponen otras limitaciones a causa de que es necesario que posean un grupo químico, separado del sitio activo de la molécula, para su empleo en la unión al AcM o *carrier*. Obviamente, no todas las drogas cumplen con este requisito. También, debido a que las drogas usualmente operan de forma estequiométrica, son menos citotóxicas sobre bases molares que las toxinas potentes como la ricina. Esto significa que las relaciones molares de sustitución droga:anticuerpo deben ser altas.

Como las moléculas del anticuerpo son progresivamente inactivadas por el incremento en la sustitución, es ventajoso emplear un *carrier* como dextrán o proteínas, a las cuales se puedan unir altos números de moléculas de la droga (Garnett y Baldwin, 1986; Rowland *et al.*, 1975). Las moléculas *carrier* sustituidas pueden ser entonces acopladas al AcM sobre bases equimolares, como ya fue mencionado.

La entrega intracelular de un conjugado AcM-droga o AcM-toxina, depende normalmente de la internalización por endocitosis a nivel de la superficie celular, seguida por la degradación lisosomal que permite la liberación del agente tóxico en el citoplasma. Por esta razón es usualmente necesario que el anticuerpo vector sea fácilmente internalizable por la célula. En algunos casos la internalización de las toxinas es favorecida por la cadena B, siendo ventajoso en estos casos la preparación de inmunotoxinas con la toxina completa bloqueada, o suplementar las inmunotoxinas de cadena A con cadenas B libres o conjugadas (Vitteta *et al.*, 1983).

Algunas drogas o toxinas pueden operar a través de la superficie celular, y en estos casos la internalización no es un requerimiento esencial. También puede ser posible el diseño de enlaces (*linkers*) gracias a los cuales una droga puede ser liberada en el ambiente del tumor, luego de la unión de un conjugado AcM-droga al antígeno diana, y sea internalizada por pinocitosis.

El problema de los enlaces es importante también para la farmacocinética. Se reconoce actualmente que las inmunotoxinas preparadas mediante el N-succinimidil-3(2-piridilditio propionato), que enlaza AcM y toxinas por un puente disulfuro, son rápidamente "aclerados" de la sangre. Se considera deseable que la vida media en sangre sea extensa, y esto se ha logrado mediante el uso de un enlace tioéster, en lugar del enlace disulfuro (Worrell *et al.*, 1986). Relacionados con la farmacocinética están también la biodistribución y la penetración tisular, y estos aspectos están demostrando ser un fuerte obstáculo.

La mayoría de las inmunotoxinas y AcM conjugados con moléculas *carrier* unidas a drogas son relativamente grandes (usualmente bien por encima de los 200 kDa), con una alta carga total negativa o positiva, o como en el caso de las inmunotoxinas, con múltiples residuos de carbohidratos expuestos. Estas propiedades tienen un efecto adverso en su capacidad para dirigirse hacia las células tumorales *in vivo*.

Cuando los conjugados radiomarcados de este tipo se inyectan a ratones portadores de tumores humanos xenotrasplantados, la acumulación máxima se produce usualmente en el hígado, seguido por los riñones y el bazo, y sólo una cantidad muy pequeña llega al tumor, en contraste con la buena localización tumoral conseguida con AcM libres.

Los conjugados en los cuales las moléculas de drogas se unen directamente al AcM, presentan frecuentemente propiedades de localización de xenotrasplantes similares a las de los anticuerpos libres, pero en la mayoría de los casos no son capaces de entregar una cantidad suficiente de droga como para producir un efecto terapéutico, en virtud de las limitaciones en las relaciones de sustitución molar alcanzables.

Un problema ulterior con los conjugados de alto peso molecular es su pobre acceso desde el sistema circulatorio al tejido tumoral, a causa de la extravasación limitada por las paredes de los capilares y la baja penetración a través de los espacios intercelulares.

Ha sido demostrado que los fragmentos Fab y F(ab)'₂ poseen una mucho mayor habilidad para penetrar esferoides multicelulares que la inmunoglobulina completa (Sutherland *et al.*, 1987) y, por analogía, está claro que los conjugados más pequeños tendrán mejores propiedades de penetración que los mayores. No obstante, los fragmentos tienen una vida media en sangre mucho menor que la inmunoglobulina completa, de forma tal que esta analogía sugiere más aún que debe existir un tamaño mínimo deseable que permita una buena retención del conjugado.

La situación en el presente requiere el rediseño de los procedimientos de conjugación, casi seguro empleando fragmentos Fab o F(ab)'₂ más que inmunoglobulinas completas, así como moléculas *carrier* menores, para poder desarrollar inmunoconjugados pequeños y sin carga. El tamaño molecular óptimo y la estabilidad requerida para los enlaces químicos son difíciles de predecir con certeza, de forma que este trabajo requerirá estudios intensos de farmacocinética y biodistribución.

La farmacocinética de los conjugados también está influida por la respuesta inmune del hospedero contra los inmunoconjugados inyectados. Existe una abundante evidencia de que los pacientes fabrican anticuerpos contra AcM murinos, incluyendo esto respuestas anti-alotipo, anti-isotipo y anti-idiotipo (Levy y Miller, 1983; Koprowski *et al.*, 1984).

La experiencia de la mayoría de los clínicos es que, a pesar de ello, la incidencia de reacciones de hipersensibilidad es baja (Levy y Miller, 1983; Koprowski *et al.*, 1984), pero estas respuestas podrían presumiblemente llevar a un "aclaramiento" incrementado o la inactivación de los inmunoconjugados, y a una eficacia disminuida.

Como es previsible la necesidad del tratamiento múltiple de los pacientes, se precisa el diseño de estrategias para vencer la inmunogenicidad. El diseño cuidadoso de los combinados puede ayudar, y se sugiere con frecuencia que los AcM humanos o AcM quiméricos (construidos de regiones constantes humanas y regiones variables murinas), pueden ser mucho menos inmunogénicos que los AcM murinos. No obstante, la respuesta anti-idiotipo parece ser dominante y no hay duda de que las toxinas (Harkonen *et al.*, 1987) y las drogas (como haptenos), también provocarán respuestas inmunes, de forma que el uso de estos anticuerpos quizás no podrá resolver totalmente el problema.

Se están investigando un conjunto de procedimientos para suprimir las respuestas anti-inmunoglobulinas, incluyendo la inducción de tolerancia, el tratamiento con ciclosporina A, la depleción selectiva de clones de células B reactivos contra las inmunoglobulinas, y la inmunosupresión por drogas. Aun cuando la tolerancia o depleción específicas de largo término son probablemente las más deseables, supresiones menos específicas pueden ser aceptables para los períodos de tratamiento con los inmunocombinados.

Un factor limitante para cualquier inmunocombinado consistente de una toxina o droga acoplada a un AcM único, deberá ser la heterogeneidad existente en la población de células tumorales hacia las cuales este querrá ser dirigido. Es conocido que las poblaciones celulares tumorales humanas expresan un amplio rango de antígenos definidos por AcM, pero que una célula cualquiera puede expresar sólo parte de este espectro antigénico (Durrant *et al.*, 1986; Natali *et al.*, 1983), y que la sensibilidad a drogas también varía ampliamente en el marco de la población celular total. Por lo tanto, es de esperar que una proporción significativa de las células tumorales no serán susceptibles al tratamiento con un único inmunocombinado, ya sea por falta del antígeno diana, o por resistencia al agente tóxico.

En teoría, debe ser posible vencer estas limitaciones empleando un panel de inmunocombinados construidos con diferentes AcM unidos a distintos agentes tóxicos, de una forma similar a la quimioterapia combinada que se emplea en el presente para el tratamiento de los tumores.

Existen evidencias sugestivas de que parejas de inmunocombinados pueden llevar a citotoxicidades incrementadas, cuando se emplean incluso con poblaciones celulares de cultivo relativamente homogéneas (Embleton, 1987), por lo que es de esperar que esta estrategia sea aún más exitosa cuando la población celular diana no es homogénea.

Es concebible que las interacciones clonales que existen en los tumores puedan modificar el resultado final, pero en la actualidad se conoce todavía muy poco de las bases de tales efectos.

Un área activa relacionada con el empleo de AcM como transportadores selectivos es aquella en la que se emplean radioisótopos en dosis terapéuticas (Pectasides *et al.*, 1986). Aun cuando este tipo de desarrollo terapéutico impone problemas radiológicos complejos, tiene la ventaja potencial de que las células tumorales no antigénicas pudieran recibir una cierta dosis terapéutica de radiación del isótopo unido a una subpoblación celular antigénica.

Otra forma para intentar resolver el problema de la heterogeneidad tumoral puede ser el empleo de *linkers* entre anticuerpo y droga que permitan la liberación de esta última, una vez producida la reacción con la célula antigénica, y que por tanto pueda ser tomada por las células adyacentes.

Se puede observar en esta breve revisión, que hay muchos factores a tomar en consideración en el estadio de diseño básico, y varias áreas de desarrollo ulterior asociadas con la eventual aplicación de AcM combinados. Por tanto, no es razonable esperar buenos resultados por el solo hecho de combinar un anticuerpo y un agente tóxico. No obstante, los problemas que se

prevén o que ya han sido encontrados en la práctica, tienen un número de posibles soluciones y parece ser que la entrega de drogas por anticuerpos empleados como transportadores específicos puede ser refinada e incrementada en al menos un orden de magnitud.

Los estudios terapéuticos con modelos de roedores y xenotrasplantes ya han demostrado respuestas positivas con muy baja toxicidad colateral (Baldwin y Byers, 1985; Rowland *et al.*, 1985), y un número de ensayos clínicos fase I con inmunotoxinas están en curso con reportes (no publicados) de mejoras clínicas en algunos pacientes.

Con el desarrollo continuado en las direcciones mencionadas, las perspectivas futuras para la terapia de los tumores con AcM conjugados a drogas y toxinas son esperanzadores.

REFERENCIAS

- BALDWIN, R. W. y V. S. BYERS (Eds) (1985). *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, Academic Press, Orlando and London.
- BERCHE, C.; J. P. MACH y J. D. LUMBROSO (1982). *Br. Med. J.*, **285**: 1447.
- DAVIES, A. J. S. y M. J. CRUMPTON (Eds) (1982). *Cancer Surveys*, **1**: 347.
- DURRANT, L. G.; R. A. ROBINS y N. C. ARMITAGE (1986). *Cancer Res.*, **46**: 3543.
- EMBLETON, M. J. (1987). *Med. Sci. Res.*, **15**: 1107.
- FARRANDS, P. A.; A. C. PERKINS y M. V. PIMM (1982). *Lancet*, (ii), **397**.
- GARNETT, M. C. y R. W. BALDWIN (1986). *Cancer Res.*, **46**: 2407.
- HARKONEN, S.; J. STOUDEMIRE y R. MISCHAK (1987). *Cancer Res.*, **47**: 1377.
- KOPROWSKI, H.; D. HERLYN y M. LUBECK (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **81**: 216.
- LARSON, S. M.; J. P. BROWN y P. W. WRIGHT (1982). *J. Nucl. Med.*, **24**: 123.
- LEVY, R. y R. A. MILLER (1983). *Fed. Proc.*, **42**: 2650.
- MOLLER, G. (Ed) (1962). *Immunol. Revs.*, **62**.
- NATALI, P. G.; R. CAVALIERE y A. BIGOTTI. *J. Immunol.*, **130**: 1462.
- PECTASIDES, D.; S. STEWART y N. COURTENAY-LUCK (1986). *Br. J. Cancer*, **53**: 727.
- ROWLAND, G. F.; C. A. AXTON y R. W. BALDWIN (1985). *Cancer Immunol. Immunother.*, **19**: 1.
- ROWLAND, G. F.; G. J. O'NEILL y D. A. L. DAVIS (1975). *Nature*, **255**: 487.
- ROWLAND, G. F.; M. R. G. SIMMONDS y J. R. F. CORVALAN (1983). *Protides Biol. Fluids*, **30**: 375.
- SUTHERLAND, R.; M. BUCHEGGER y M. SCHREYER (1987). *Cancer Res.*, **47**: 1627.
- THORPE, P. E. y W. C. J. ROSS (1982). *Immunol. Revs.*, **62**: 119.
- VITETTA, E. S.; W. CUSHLEY y J. M. UHR (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **80**: 6332.
- WORRELL, N. R.; A. J. CUMBER y G. D. PARNELL (1986). *Anti-Cancer Drug Design*, **1**: 179.