

DISEGNO E SVILUPPO DI ANTICORPI MONOCLONALI UMANI IN FORMA DI *SINGLE CHAIN FRAGMENT VARIABLE* (SCFV) PER MIGLIORARE EFFICACIA E SICUREZZA NELLA IMMUNOTERAPIA DEI TUMORI

Maurizio Cianfriglia (a), Alessandro Ascione (a), Michela Flego (a), Mara Gellini (a), Maria Luisa Dupuis (a), Stefano Barca (a), Marina Tombesi (a), Alessandra Mallano (a), Katia Scotlandi (b), Piero Picci (b), Silvia Zamboni (b) Mauro Magnani (c), Valentina Fiori (c), Sabrina Dominici (c)

(a) *Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna*

(c) *Diatheva SRL, Fano, Pesaro-Urbino*

Introduzione

La naturale resistenza dei tumori solidi ai trattamenti farmacologici convenzionali rende necessario e urgente l'identificazione di nuovi sistemi di cura che risultino contemporaneamente efficaci e sicuri. In tal riguardo, nell'ultimo decennio sono stati sperimentati e messi in commercio tre distinti anticorpi monoclonali che somministrati singolarmente o in associazione con chemioterapici hanno aperto nuove prospettive terapeutiche nei confronti di neoplasie ad elevata aggressività come i carcinomi mammari e intestinali. Risulta tuttavia sorprendente che mentre i tumori solidi rappresentino all'incirca l'85% delle patologie di origine neoplastica solo una ridotta frazione degli anticorpi monoclonali attualmente in commercio sia stato registrato per il loro trattamento immunologico e/o immuno-chemioterapico. I motivi di questa disproporzione includono aspetti chimico-fisici propri della struttura della immunoglobulina monoclonale e anatomo-fisiologici propri della massa cellulare neoplastica. La combinazione di questi fattori ha come conseguenza che farmaci di origine biologica caratterizzati da discreti pesi molecolari (140-150kDa) raggiungono raramente quella concentrazione critica necessaria per esercitare una funzione curativa nei confronti dei tumori solidi. In particolare solo una frazione assai ridotta dell'anticorpo monoclonale, e generalmente insufficiente per esercitare sulla totalità delle cellule neoplastiche il suo meccanismo di azione, diffonde in modo omogeneo all'interno del tumore solido. Ciò è dovuto come vedremo più avanti in maggior dettaglio, alla ridotta capacità di penetrazione delle immunoglobuline monoclonali soprattutto a causa della loro elevata massa molecolare (140-150 kDa). Queste considerazioni supportano la necessità di verificare se e come nuove tipologie di anticorpi e/o proteine di fusione originate mediante tecniche innovative di ingegneria genetica risultino più efficaci nel combattere le differenti tipologie di carcinomi maligni. A seguito dell'analisi di un gran numero di dati ottenuti dalle varie fasi di sperimentazione clinica è emerso chiaramente che efficacia e sicurezza degli anticorpi monoclonali erano associate ad una serie di fattori. In particolare risultava evidente che:

- la immunogenicità di un anticorpo può non dipendere esclusivamente dalla presenza di proteine xenogeneiche ma anche da altri fattori incluso l'antigene verso cui l'anticorpo è diretto e il meccanismo di azione che l'anticorpo esercita sulla cellula bersaglio;
- l'efficacia è direttamente collegata alle capacità di penetrazione/diffusione di un anticorpo all'interno dei tumori solidi;

- le modalità di somministrazione e la farmacocinetica svolgono un ruolo di primo piano sugli effetti avversi e funzionalità dell'anticorpo;
- l'elevata affinità di un anticorpo può rappresentare un fattore limitante;
- il trattamento con anticorpi può indurre fenomeni di resistenza in modo analogo a ciò che avviene con i chemioterapici.

In alternativa alle metodologie riportate è oggi possibile isolare, data la versatilità che conferisce l'ingegneria genetica nella costruzione di molecole, frammenti anticorpali umani a forma di *single chain fragment variable* (scFv) capaci di riconoscere specificamente l'antigene di interesse (1, 2, 3). Gli anticorpi di tipologia scFv (4, 5), consistono di una singola catena polipeptidica che include un dominio variabile della catena pesante dell'anticorpo (VH) legata attraverso un polipeptide flessibile ad un dominio variabile della catena leggera (VL) e posseggono una massa molecolare di 27-30 kDa. Questi anticorpi debbono essere considerati per funzionalità, struttura e modalità di sviluppo complementari ai mAbs ricombinanti per disegnare nuovi trattamenti per la diagnosi e terapia dei tumori. La costruzione di librerie di anticorpi ricombinanti umani in forma scFv che vengono espressi sulla superficie di fagi filamentosi e la selezione di anticorpi fagici diretti verso antigeni predefiniti, è diventata un'importante strategia biotecnologica per generare anticorpi monoclonali per fini diagnostici e clinici. Anticorpi ottenuti in forma scFv non inducono risposte immuni e possono essere prodotti in larga scala attraverso fermentazione batterica che consente costi ridotti e minori controlli sulla sicurezza del prodotto. Inoltre, l'affinità degli anticorpi isolati può essere migliorata attraverso la costruzione di librerie anticorpali mutanti che possono generare cloni con più alta affinità.

Stato di sviluppo

L'obiettivo del nostro programma di ricerca consiste nella formulazione di anticorpi monoclonali umani in forma scFv che corredati di caratteristiche farmacocinetiche adeguate possono essere utilizzati nella radio-immunodiagnostica e radio-immunoterapia di tumori refrattari al trattamento chemioterapico. Parallelamente, utilizzando la versatilità della ingegneria genetica abbiamo disegnato e costruito proteine di fusione immunocompetenti capaci di direzionare in sede tumorale biofarmaceutici ad alto potenziale citotossico risparmiando i tessuti normali dagli effetti nocivi dei composti utilizzati. Lo studio si articola intorno ad un anticorpo scFv umano diretto specificamente verso l'antigene CEACAM1 espresso selettivamente sul melanoma primario e metastatico e su diversi tipi di carcinoma incluso quello polmonare.

L'anticorpo Diathis-1 generato attraverso queste metodologie e per la sua specificità per l'antigene CEACAM1 espresso su una serie di tumori solidi poco o affatto responsivi al trattamento chemioterapico può essere considerato una piattaforma ideale per lo sviluppo di immuno-reagenti specifici per la diagnosi e terapia del melanoma primario e metastatico e di altri tumori solidi CEACAM1 positivi (adenoma carcinoma polmonare, cancro della prostata, ecc.). Il ridotto peso molecolare degli scFv (27-30 kDa) potrebbe essere limitante per l'uso clinico di questi anticorpi che risultano caratterizzati dalla rapida eliminazione renale e da una emivita in circolo assai ridotta (1-3 ore). In contrasto, l'anticorpo da noi selezionato ed espresso mediante forme multimeriche stabili che raggiungono pesi molecolari intorno agli 80 kDa mostra valori di emivita simile (o superiori) a quelli ottenuti con scFv bivalenti (6, 7). In paragone con altri scFv diretti verso tumori solidi, l'anticorpo Diathis-1 è caratterizzato da lenta eliminazione che contribuisce ad un accumulo dell'anticorpo nel tumore. Possiamo dunque

concludere che Diathis-1 possiede proprietà farmacocinetiche adeguate per un potenziale impiego clinico. I meccanismi molecolari che sono alla base della stabile oligomerizzazione dell'anticorpo devono essere ancora completamente delucidati come la possibilità di estendere questa strategia ad altre molecole di scFv potenzialmente utilizzabili nella sperimentazione clinica.

Studi di radio-imaging convenzionale spesso falliscono nella identificazione di masse tumorali di ridotte dimensioni proprio nella fase in cui possono essere trattate con maggior efficacia, pertanto lo sviluppo di diagnostici tumorali basati su scFv legati a traccianti radionuclidici rappresenta un importante obiettivo nella ricerca di nuovi ed efficaci trattamenti.

L'isolamento di un anticorpo monoclonale umano in forma scFv capace di riconoscere in modo specifico un epitopo della parte extracellulare del CEACAM1 rappresenta una piattaforma per lo sviluppo delle potenzialità applicative degli anticorpi scFv e delle proteine di fusione che utilizzano come partner composti molecolari di vario tipo per la diagnosi e terapia dei tumori.

Conclusioni e prospettive future

L'innovatività della nostra attività si basa non solamente sulla la tipologia genetica di anticorpi umani in forma di scFv derivati da librerie fagiche ma anche per gli antigeni bersaglio riconosciuti dai nostri anticorpi che aprono nuove prospettive di cura per pazienti affetti da tumori con un basso CEACAM1 positivi che includono melanomi metastatici, carcinomi polmonari con recidive da chemioterapia o da precedenti trattamenti con anticorpi monoclonali diretti verso antigeni diversi. In modo analogo gli anticorpi monoclonali di tipo scFv specifici per epitopi del CD99 non condivisi con altre tipologie di cellule dell'organismo verranno utilizzati in prima istanza per la radio-immunodiagnostica e radio-immunoterapia. Successivamente, data la capacità di alcuni anticorpi anti CD99 di indurre apoptosi in cellule di EW's e di aumentare in modo selettivo la citotossicità di queste cellule cancerose se trattate in combinazione con agenti citotossici (doxo, vincristina, vinblastina), intendiamo ricostituire anticorpi monoclonali umani completi di Fc mediante ricombinazione genica degli scFv con i geni delle IgG1 umane. In conclusione questo nuovo tipo di anticorpi monoclonali umani di forma scFv e sviluppati completamente *in vitro* e prodotti in sistemi procariotici posseggono, se comparati con quelli a struttura classica (IgG), una migliore farmacocinetica e biodistribuzione come dimostra la velocità con cui gli scFv si distribuiscono in modo omogeneo in ogni comparto tumorale e vengono velocemente escreti dall'organismo. Queste caratteristiche metaboliche rendono particolarmente attrattivi gli scFv per alcuni tipi di interventi terapeutici come il radio-imaging e il trasporto in sede peri-tumorale di immuno-modulatori. Inoltre, per rendere ottimale la ritenzione degli scFv all'interno della massa tumorale, abbiamo introdotto alcune modificazioni nella struttura dei linker e dei metodi di purificazione che consentono la formazione oligomeri con specificità scFv ma di più alto peso molecolare per aumentarne la massa molecolare e modulare il livello di diffusione.

La rapida ascesa dei frammenti anticorpali e in particolare degli scFv nella terapia dei tumori è dovuta essenzialmente alle modifiche genetiche che possono essere facilmente introdotte nella struttura della molecola per renderla compatibile con i requisiti farmacocinetici/farmacodinamici richiesti per la sperimentazione clinica. Data la particolare flessibilità genetica molecolare è possibile derivare, dalla struttura base di 28 kDa, anticorpi disegnati per il *targeting* di radionuclidi che necessitano per esempio oltre che di penetrazione nel tessuto tumorale anche di adeguati livelli di ritenzione. La rapida ascesa del numero dei frammenti anticorpali nella sperimentazione clinica di prodotti biologici per la terapia dei tumori ha suscitato negli Stati Uniti un notevole interesse anche a

livello delle istituzioni regolatorie. Un recente studio apparso sul numero di aprile di *Nature Biotechnology* (8) ha messo in evidenza come il trend di approvazione dei frammenti anticorpali da parte della *Food and Drug Administration* sia più positivo se comparato ad altre forme di Mabs rilevando la necessità di un adeguamento biotecnologico da parte di tutte le istituzioni che intendono competere a livello internazionale per lo sviluppo di immuno-biologici ad attività antitumorale.

Bibliografia

1. Hudson PJ. Recombinant antibody fragments. *Curr Opin Biotechnol* 1998;9(4):395-402.
2. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990;348:552.
3. Orlandi R, Gussow DH, Jones PT, Winter G. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3833-37.
4. Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M. Single-chain antigen-binding protein. *Science* 1988;242(4877):423-6.
5. Barbas CF, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7978-82.
6. Kortt AA, Dolezal O, Power BE, Hudson PJ. Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer *targeting*. *Biomolecular Engineering* 2001;18:95-108.
7. Srtork R, Zettlitz KA, Muller D, Rether M, Hanisch FG, Kontermann RE. N-Glycosylation as Novel Strategy to improve pharmacokinetic Properties of Bispecific Single-Chain Diabodies. *Journal of Biological Chemistry* 2008;283:7804-12.
8. Hughes B. Large drugs outdo small. *Nature Biotechnology* 2011;29:296.