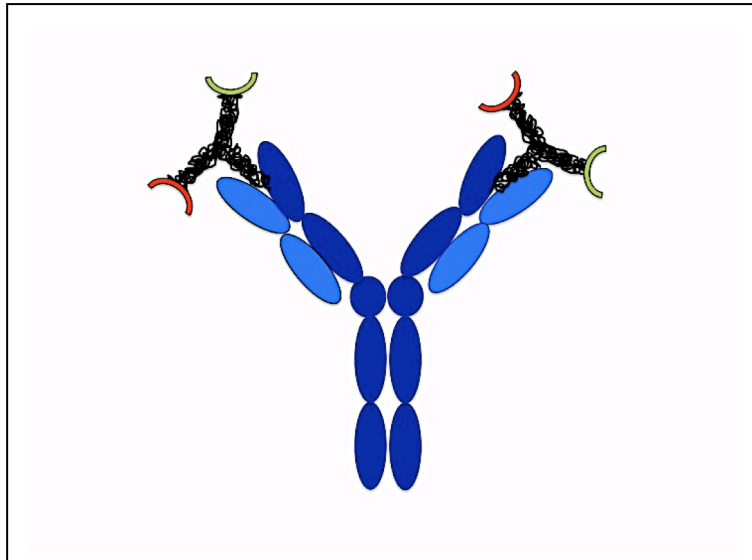




Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

# TERAPEUTISKA ANTIKROPPAR VID TUMÖRANGIOGENES

*Jenny Michal*



---

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2012: 44

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2012

---





Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

## TERAPEUTISKA ANTIKROPPAR VID TUMÖRANGIOGENES

Therapeutic antibodies targeting tumor angiogenesis

*Jenny Michal*

**Handledare:**

Magnus Åbrink, SLU, Institutionen för Immunologi  
Caroline Fossum, SLU, Institutionen för Immunologi

**Examinator:**

Mona Fredriksson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Nivå:** Grund, G2E

**Utgivningsort:** SLU Uppsala

**Utgivningsår:** 2012

**Omslagsbild:** -

**Serienamn, delnr:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2012: 44  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

**On-line publicering:** <http://epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** tumörangiogenes, VEGF, ANG-2, anti-angiogen terapi, monoklonala antikroppar, bispecifika antikroppar, anti-angiogen resistens

**Key words:** tumour angiogenesis, VEGF, ANG-2, anti-angiogenic therapy, monoclonal antibodies, bispecific antibodies, anti-angiogenic resistance



# INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<b>SAMMANFATTNING</b> .....	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>2</b>
<b>INLEDNING</b> .....	<b>3</b>
<b>MATERIAL OCH METODER</b> .....	<b>3</b>
AVGRÄNSNINGAR .....	3
<b>LITTERATURÖVERSIKT</b> .....	<b>3</b>
TUMÖRANGIOGENES .....	3
ANTI-ANGIOGENESTERAPI .....	4
ANTIKROPPAR SOM TERAPEUTISKT ARBETSREDSKAP .....	4
<i>Antikroppens struktur</i> .....	4
<i>Antikropps-stimulerade immunsvär i stora drag</i> .....	5
ATT FRAMSTÄLLA ANTIKROPPAR .....	6
MONOKLONALA ANTIKROPPDERIVAT OCH TUMÖRANGIOGENES .....	6
<i>Bevacizumab</i> .....	7
BISPECIFIKA ANTIKROPPAR, VITSEN MED ANTIKROPPSDESIGN? .....	7
<i>Antikroppsdesignens bakvatten</i> .....	8
<i>Strävan efter det ultimata bispecifika IgG-proteinet</i> .....	8
ANTI-ANGIOGENESRESISTENS? .....	10
<b>DISKUSSION</b> .....	<b>11</b>
<b>REFERENSLISTA</b> .....	<b>13</b>

## **SAMMANFATTNING**

Maligna tumörer är något som drabbar såväl djur som människor över hela världen. Därför har stora ansträngningar lagts på att kartlägga mekanismerna bakom en av nyckelparametrarna för tumörtillväxt, tumörangiogenes. Studier har visat att tumörcellerna själva kan inducera neovaskulatur genom ökat uttryck av pro-angiogena faktorer, så som endotelial tillväxtfaktor och angiopoeitin-2. Anti-angiogenesterapi, i form av olika antikroppsderivat, riktar sig fram för allt mot de signalvägar som involverar pro-angiogena faktorer i ett försök att stävja tumörens tillväxtresurser. Idag används främst monoklonala antikroppar, var för sig, tillsammans eller i kombination med kemo- och/eller strålningsterapi. Tyvärr är anti-angiogenesresistens ett växande problem, troligen relaterat till både adaptiva och inbyggda resistensmekanismer hos de tumörceller som behandlas. Ett effektivt sätt att motverka resistens skulle vara att simultant kunna slå mot flera mål hos tumörvaskulaturen med en antikropp. Studier visar att antikroppar med dubbel specificitet, så kallade bispecifika antikroppar, kan ha större effekt än kombinationen av monoklonala antikroppar med dessa specificiteter. Ännu finns dock inga godkända anti-angiogena bispecifika antikroppar på marknaden då dessa ofta har problem med produkthomogenitet och dålig farmakokinetik men flera befinner sig i Fas I-II. För att till fullo kunna förstå de olika anti-angiogena terapiernas för och nackdelar krävs dock mer forskning kring såväl anti-angiogenesresistens och de olika antikropp-formateringarnas inneboende immunologiska egenskaper.

## **SUMMARY**

Animals and humans, worldwide, suffer from malignant tumours. Large efforts have therefore been made to uncover the mechanisms of tumour angiogenesis, one of the key parameters behind tumour growth. Tumour cells can induce neovasculature by up regulating pro-angiogenic factors. In an attempt to inhibit tumour growth, anti-angiogenic agents have been developed to target the different signaling pathways of those factors. Presently anti-angiogenic therapies foremost use monoclonal antibodies (mAb). Either using a single mAb species, a combination of multiple mAb species, or the two above in combination with chemo or radiation therapy. Unfortunately, resistance to the antiangiogenic agents is an emerging problem, most likely related to both evasive adaptation and intrinsic non-responsiveness of tumour cells. One effective method to countervail these hurdles is thought to involve hitting more than one target, within the tumour angiogenesis, with the same antibody. Studies show that the tumour growth inhibiting effects of antibodies with double specificities, bispecific antibodies, can be greater than that of combination therapy of monoclonal antibodies with the same specificities as the bispecific Ab. As of today, due to problems mostly related to poor pharmacokinetics and lack of product homogeneity, there are no approved bispecific anti-angiogenic antibodies on the clinical market although several are in phase I-II clinical trials. To fully understand the pros and cons of different anti-angiogenic therapies, and the intrinsic immunological properties of different antibody formations, much more research is absolutely essential.

## **INLEDNING**

Blodkärl hos en vuxen individ är till stor del färdigutvecklade och angiogenes är något som sällan förekommer annat än vid sårhäkning, ovulering och placentabildning (Carmeliet, 2005). Ibland kan dock vissa celler avvika från sin förutbestämda levnadscykel och istället utveckla maligna tumörer som i strävan efter näring och byggmaterial stimulerar kärlbädden runt omkring att gå i barndom. Tumörangiogenes uppstår (Potente et al., 2011). Syftet med denna uppsats är att kort beskriva tumörangiogenes och hur man kan använda sig av antikroppar för att bekämpa fenomenet. Den ämnar även ge viss inblick i de olika format av antikroppar som används samt fördelar och nackdelar med dessa. Jag har utgått från några grundläggande frågeställningar:

- Hur fungerar anti-angiogena antikroppar?
- Hur ser de ut och hur används de idag?
- Används de på djursidan?
- Vilka är problemen, finns det hinder och kan dessa överkommas?

## **MATERIAL OCH METODER**

Litteratursökningar har utförts i databaser, främst i Web Of Knowledge, PubMed, och ScienceDirect med sökord som; angiogenes, antibodytherapy, immunotherapy, bispecific antibody, VEGF, canine, mammals samt olika kombinationer av dessa. Dessutom har många artiklar hittats genom källhänvisningar i andra, både original- och review-artiklar.

### **Avgränsningar**

På grund av utrymmesbrist tar uppsatsen ej upp antikroppsrelaterade terapier riktade mot annat än tumörangiogenes, undantaget är Catumaxomab som nämns för dess funktion. Vidare beskrivs bara forskning från humansidan då jag inte funnit några antikroppsrelaterade antiangiogena preparat inom veterinärmedicinen.

## **LITTERATURÖVERSIKT**

### **Tumörangiogenes**

I princip är ingenting hos tumörkärl normalt, de uppvisar tydlig abnormitet i samtliga lager av kärlväggarna. Detta gäller såväl funktion som struktur och leder till brist på syre, näring och byggstenar i vävnaden (Goel et al., 2011). I ett försök att kompensera för de existerande kärlets dysfunktionalitet reagerar tumörcellerna med att själva stimulera angiogenes i den omgivande kärlbädden (Potente et al., 2011). Förändringen karaktäriseras av ett oncogendrivet uttryck av flertalet pro-angiogena proteiner från tumörcellerna där vaskulär endotelial tillväxtfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) och angiopietin-2 (ANG-2) är av främst intresse för denna uppsats. VEGF stimulerar endotelproliferation och är i praktiken en hel familj från A till F men i denna uppsats åsyftas alltid VEGF-A som är en förutsättning för de övrigas uttryck (Kerbel and Folkman, 2002). ANG-2 verkar stabiliserande på kärlendotel och binder in till Tie-2 receptorer (tunica internal endothelial cell kinase 2) hos endotelceller (Schaefer et al., 2011). Överflödet av de pro-angiogena proteinerna leder till fortsatt oorganisation av vaskulaturen följt av ökat plasmaläckage, vilket



i sin tur ger fortsatt näringsbrist och en ond spiral skapas. Tumörcellernas försök att kompensera för trasiga kärl leder bara till än fler trasiga kärl. Utöver att bristfälligt förse tumörvävnaden med näring och byggstenar försvårar den röriga kärلبädden distributionen av andra ämnen i vävnaden. Den begränsar därmed högst sannolikt effekten av traditionella cancerbehandlingar (Potente et al., 2011).

### **Anti-angiogenesterapi**

Traditionell cancerterapi består av strålnings- och kemoterapi i form av cytostatika riktad mot de onormala cancercellerna. Tumörceller är av sin natur väldigt föränderliga, mutationer är snarare en regel än ett undantag. Att selektivt rikta in sig på de celler som stöder tumörtillväxt istället för själva tumörcellerna kan vara fördelaktigt eftersom dessa är mer genetiskt stabila och därför löper mindre risk att utveckla mutationer som leder till farmakaresistens (Kerbel and Folkman, 2002). Kerbel (1991) visade att inhibitorer riktade mot vaskulära endotelceller förhindrar dem att proliferera, migrera och undvika apoptos som svar på de proangiogena protein som tumörceller uttrycker. Flera studier har också visat att angiogenesinhibitorer kan inducera tumörcellsapoptos genom att minska nivåer av parakrina signaler från endotelcellerna runt tumören. Genom att stoppa upp den skenande angiogenesen och därmed minska antalet plasmaläckande kärl ökar blodflödet och syretillförseln till vävnaden. Detta i sin tur gagnar distribution av andra farmaka, till exempel cytostatika, eller radiologiska markörer (Kerbel and Folkman, 2002).

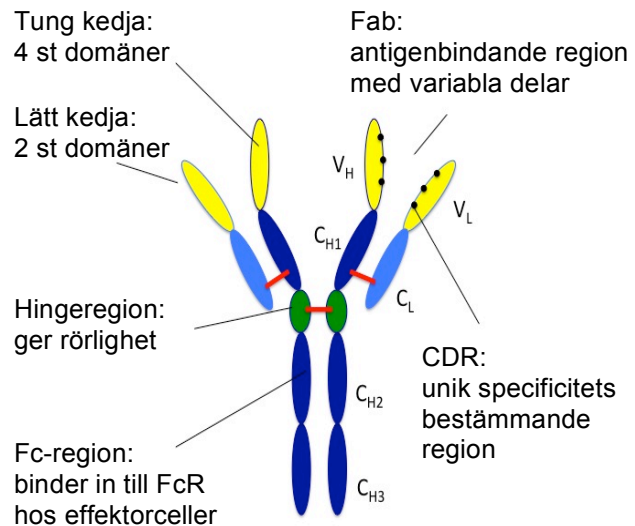
### **Antikroppar som terapeutiskt arbetsredskap**

Idag finns fyra helt godkända angiogenesinhibitorer på humansidan och flertalet ännu ej godkända preparat befinner sig i fas I-III försök (Teicher, 2011). Många av dem innehåller någon form av antikroppsderivat, antingen för att binda direkt till mål proteinet eller som bärare av ligand till detta eller radiologiska markörer. Man vill på denna väg inhibera proangiogena signaler eller märka ut tumörvaskulatur för annan cancerbehandling till exempel kemo- och/eller strålningsterapi (Potente et al., 2011). Genom att använda antikroppsderivat kan man även i vissa fall nyttja antikroppens inbyggda förmåga att stimulera ett immunsvaret i tumörens omgivning (Ferrara and Kerbel, 2005). Utformningen av angiogenesinhibitorernas antikropps-komponenter är därför essentiell för deras funktion och terapeutiska effekt.

### **Antikroppens struktur**

Antikroppar (Ak) utsöndras av aktiverade B-celler, så kallade plasmaceller, som svar på immun-aktiverande antigen i kroppen. De är idag uppdelade i fem olika klasser; IgG, IgM, IgE, IgD och IgA, vilka definieras utifrån skillnader i deras molekylära uppbyggnad. Alla immunglobuliner innehåller dock i grunden en tung kedja ( $\gamma$  hos IgG) och en lätt kedja som kan vara av typ  $\kappa$  eller  $\lambda$ . Den tunga kedjan avgör klasstillhörighet och subklass. De senare uppstår via genetisk drift i de domäner som kodar för den tunga kedjan och benämns med nummervärde, exempel IgG1. Subklasserna uppvisar olika typer av biologisk aktivitet och antalet skiljer sig mellan djurslag, till exempel så har häst sju olika IgG emedan nöt bara har tre och människa har fyra. Notera dock att alla individer inom en art uttrycker alla subklasser.

I denna uppsats används IgG och dess klassiska uppbyggnad som typmodell i ett försök att beskriva antikroppens olika delar, *Figur 1*. Den lätta kedjan sitter ihop med den tunga via disulfidbindningar och tillsammans med ett identiskt tvillingpar av kedjor bildar de ett Y med en axel och två armar. I armarnas ändrar sitter de variabla delar (variable heavy, VH/variable light, VL) som utgör den epitopbindande delen, kallad Fab. Dessa delar innehåller korta unika aminosyrasekvenser som avgör antikroppens specificitet, så kallade komplementärt bestämmande regioner



*Figur 1. IgG*

(complementarity determining regions, CDRs). Ak-specificitet genereras genom rearrangering av gener samt via somatisk mutation eller genkonversion, där större komplex av en genssekvens byts ut, i de variabla delarna. En antikropp är normalt monospecifik och bivalent. Det vill säga, den känner bara igen en typ av epitop och kan binda in två av dessa samtidigt. Resten av antikroppens struktur består av konstanta delar (constant heavy, CH/constant light, CL). Två andra viktiga strukturella komponenter är hingregionen som ger rörlighet samt Fc-regionen. Fc-regionen binder in till receptorer på endotelceller, lymfocyter, monocyter och fagocyter samt komplementfaktorer i serum. Detta genererar i sin tur olika immunsvår beroende på receptorvärd samt vilken typ av Fc-receptor (FcR) denna bär se *Tabell 1*. Fc-receptorerna får namn efter tunga kedjan i den antikropp de binder och oftast krävs att Ak har bundit till en epitop för att inbindningen skall kunna ske. Undantag är bland annat FcγRn som binder in till alla IgG oavsett om de bundit epitop eller inte.

### **Antikropps-stimulerade immunsvår i stora drag**

- neutralisering av antigen genom bildande av immunkomplex
- aktivering av lymf- och fagocyter vilket leder till eliminering av antigen
- aktivering av den klassiska komplementvägen i serum
- antikroppsberoende-cellmedierad-cytotoxicitet (ADCC)

Vid aktivering av den klassiska komplementvägen krävs att flera Ak binder till samma målcell. Vid antigenbindning konfigureras antikropparnas Fc-regioner varvid komplement C1 kan fästa in till dom och därmed aktiveras. Vid aktivering klyver C1 komplementfaktor C4 varvid en kaskadreaktion startar som utmynnar i ett komplex av proteiner vilket attackerar målcellens membran (membrane attack complex, MAC). MAC bildar porer i cellmembranet och avdödar målcellen via osmotisk lys. Vad det gäller mekanismerna bakom ADCC är dessa ännu inte helt kartlagda. Flera av de accessoriska immuncellerna kan utöva cytotoxiska effekter men naturliga avdödar celler (natural killer cells, NK) är de som främst förknippas med ADCC inom anti-angiogenesterapi (Palumbo et al., 2011). NK celler uttrycker FcγRIII

och binder in till cellytsbundna antikroppar. Antikroppen fungerar som länk mellan NK cell och målcell varvid den senare tvingas i apoptos via den yttre, medierad av CD95L/CD95, eller den inre vägen med hjälp av perforiner, granulysin och NK-lysin.

Tabell 1. Biologiska aktiviteter medierade via IgG-bindande FcR

FcR	Affinitet	Effektorcell	Biologisk aktivitet hos effektorcell
FcγRn	hög	endotelceller i muskler, vaskulatur och leversinusoider	kontrollerar indirekt IgG nivå i serum via inhibitorisk feed back signal
FcγRI	hög	monocyter, neutrofiler, makrofager och dendritter	fagocytos, ADCC
FcγRIIa	moderat	neutrofiler makrofager dendritter	fagocytos, ADCC stim. cytokinuttryck, ADCC antigenpresentation
FcγRIIb	moderat	B-celler dendritter	inhiberar Ak-produktion via feed back mognad, antigenpresentation
FcγRIIc	moderat	dendritter	mognad, antigenpresentation
FcγRIII	låg	granulocyter makrofager natural killer celler	degranulering, ADCC fagocytos, ADCC ADCC

### Att framställa antikroppar

Antikroppar för medicin- och forskningssyfte utvinns traditionellt ur manipulerade plasmacellslinjer, så kallade hybridom. Hybridom skapas i labbet via fusion av myeloma plasmaceller med "evigt liv" och plasmaceller som med hjälp av immunisering skolats att uttrycka en viss specificitet. Resultatet blir en långlivad klon av celler som alla uttrycker exakt likadana antikroppar, så kallade monoklonala antikroppar (mAk). Tekniska framgångar inom molekylär bioteknik har lett till att det idag räcker med att känna till aminosyrasekvensen hos en önskad antikropp för att kunna framställa den. Sekvensordningen talar om hur genen som kodar för antikroppen ser ut. Genom att syntetisera DNA och överföra detta till vektorer kan man sedan utnyttja bakterier (med hjälp av plasmider) eller celler (med hjälp av retrovirus) att producera den efterfrågade antikroppen. Både hybridom och sekvensering följt av DNA:syntes gör att man kan massproducera Ak med samma specificitet.

### Monoklonala antikroppderivat och tumörangiogenes

Monoklonala antikroppar eller delar av dessa används frekvent inom olika typer av farmakologiska behandlingar, även inom anti-angiogenesterapi (Teicher, 2011). De allra flesta är riktade mot VEGF eller fungerar som antagonister till dess receptorer, VEGFR, som

består av två stycken tyrosin kinas receptorer, så kallade RTKs (Ferrara and Kerbel, 2005; Teicher, 2011). I huvudsak utgår man från IgG1 eftersom det är den antikropp som är mest förekommande i serum samt att IgG tack vare sin låga molekylvikt, ca 180 kDa, kan distribueras relativt fritt i kroppens vävnader (Presta et al., 1997; Schaefer et al., 2011). Det finns olika protokoll för hur de monoklonala antikropparna används, var för sig eller tillsammans med andra typer av cancerterapi. Det är också möjligt att kombinera olika mAk för att slå mot tumörangiogenes från flera håll. Wu et al. (2007) påpekar dock att dessa möjligheter begränsas starkt av det lilla antalet terapeutiska mAk som finns på marknaden samt av det faktum att dessa troligen inte är testade prekliniskt i kombination med varandra. Nedan beskrivs den mAk som funnits längst på marknaden.

### **Bevacizumab**

**Bevacizumab** (rhuMAB VEGF, Avastin®) framtagen av Presta et al. (1997) är en humaniserad anti-VEGF-A mAk. Presta med kollegor förde över komplementärt bestämmande regioner (CDRs) från en murin mAk riktad mot human-VEGF till en human antikroppstomme. Gensekvenser som kodar för stommens kedjor och murina CDR sattes in i plasmider som tillsammans uttrycktes i *E. coli*. Slutprodukten, med samma struktur som IgG1, uttrycktes sedan i manipulerade äggstocksceller från kinesisk hamster (chinese hamster ovarie cells, CHO) efter vektortransfektion. Studier visade att antikroppen hade farmakokinetiska egenskaper likt konventionellt IgG1 samt god effekt med avseende på tumörregression. Bevacizumab godkändes för behandling av adenocarcinom i kolon 2004 och används i dag även vid behandling av flertalet andra cancertyper. Framför allt i kombination med kemoterapi för att underlätta för cytostatika att komma åt tumörceller samt att göra dessa känsligare för denna och/eller strålningsterapi (Ferrara et al., 2004; Teicher, 2011). Det skall dock nämnas att Bevacizumab inte är en generellt fungerande angiogenesinhibitor, till exempel uppvisar den ingen eller mycket liten effekt vid behandling av bröst- och pancreascancer (Teicher, 2011). Vissa negativa bieffekter i form av hypertension och epistaxis har också kunnat påvisas men då i sådan grad att de kunnat behandlas relativt okomplicerat (Ferrara et al., 2004).

### **Bispecifika antikroppar, vitsen med antikropsdesign?**

Avancerade biokemiska tekniker har öppnat upp för oanade möjligheter vad det gäller så kallad antikropsdesign. Genom att känna till gensekvenser för olika antikroppars strukturella arkitektur och funktion kan man kombinera dessa för att bygga helt nya former av immunglobuliner. Den medicinska världen har länge lockats av tanken på antikroppar som kan binda till flera olika ligander, så kallade bispecifika antikroppar (BiAk), eftersom flera olika mediatorer ofta är involverade i patogenesen för en och samma sjukdom. Möjligheten att kunna blockera flera faktorer simultant och därmed flera signalvägar samtidigt tros leda till en bättre klinisk effekt och ökade möjligheter att nå ut till en bredare patientpopulation (Wu et al., 2007). Genom att tydligare kunna rikta in sig mot patologiska tillstånd tror man att BiAk leder till minskad systemisk cytotoxisk effekt, jämfört med mAk, samt att synergistiska effekter kan uppstå inuti cellen och verka till terapeutisk fördel om BiAk riktas mot cellytsbundna receptorer (Schaefer et al., 2011).

Andra fördelar med BiAk inkluderar rekrytering av effektorceller, som i fallet med den godkända trifunktionella BiAk **Catumaxomab** (Seimetz et al., 2010). Catumaxomab kan simultant binda in till CD3 hos T-celler, epiteliella celladhesions-molekyler hos tumörceller samt till Fc $\gamma$ R av typ II, IIa och III. På så sätt kan antikroppen ledsaga cytotoxiska T-celler till tumören via celladhesions-molekyler samtidigt som dess Fc-region bland annat kan binda in till NK, dendritiska celler och makrofager. Seimetz et al. (2010) beskriver hur detta gör att antikroppen kan utöva olika former av antitumorala effekter på en och samma gång, det vill säga T-cellsmedierad lys, ADCC och fagocytos av tumörceller. Tillsammans leder de tre attackvägarna till tumörregression. Det bör noteras att Catumaxomab inte är en angiogenesinhibitor utan endast tas upp i denna uppsats för att gestalta ett exempel på vad man kan åstadkomma kliniskt med hjälp av BiAk.

Jag vill också påpeka att det i strikt mening inte bara är bispecifikt ligandbindande proteiner med klassisk IgG-struktur som benämns bispecifika antikroppar. Begreppet rymmer även andra format av protein eller peptider med immunoglobulinliknande egenskaper med avseende på bispecifik ligandbindning, farmakokinetik och ackumulation i kroppen (Wu et al., 2007; Doppalapudi et al., 2010).

### ***Antikroppdesignens bakvatten***

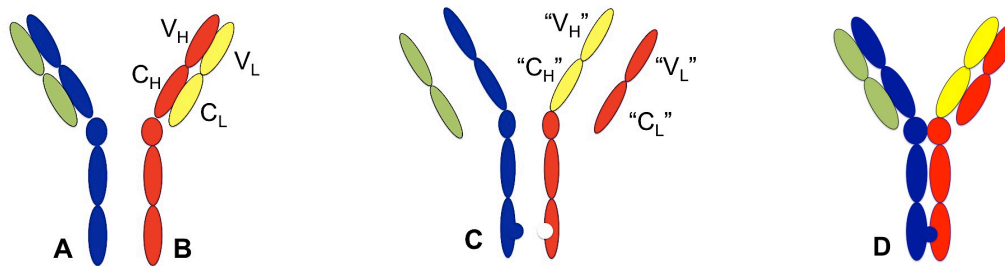
Tyvär är inte allt guld som glimmar. Trots att man kommit upp med flera olika designformat vad gäller BiAk de senaste tjugo åren är det få som nått ut på marknaden, oftast stoppas de upp redan på *in vitro* stadiet i sin utveckling. Många av formaten har problem med immunogenicitet, dåliga farmakokinetiska egenskaper samt förlust av effektfunktioner på grund av att vissa av dem saknar Fc-region (Schaefer et al., 2011). De varianter av BiAk som innehåller länkfragment har en tendens att forma aggregat med varandra och det finns även studier som visat på BiAk med instabilitetsproblem vilket ger korta halveringstider (Wu et al., 2007). Detta gör att det krävs frekventa dosgivor med korta intervall vid terapeutisk användning, eller att den farmakologiskt aktiva molekylen måste konjugeras till ett annat bärarprotein vilket i sin tur kan påverka dess farmakokinetiska egenskaper (Doppalapudi et al., 2010). De flesta av problemen tros bero på att formaten signifikant avviker från arkitekturen hos det naturliga IgG-proteinet (Schaefer et al., 2011).

### ***Strävan efter det ultimata bispecifika IgG-proteinet***

Schaefer et al. (2011) berättar att man redan tidigt stötte på hinder i framställandet av BiAk med exakt IgG-struktur. Hindren består inte i att syntetisera fram antikropps-DNA som kodar för olika specificitet i vardera arm, hindren dyker upp när de fyra olika tunga och lätta kedjorna skall sättas ihop i den cell som translaterat dem. Eftersom fästpunkterna mellan kedjorna ser exakt likadana ut för alla antikroppar kan tio slumpmässigt ihopsatta kombinationer uppstå, vilka nödvändigtvis inte alls behöver överensstämma med den önskade BiAk:en. Nedan följer beskrivningar av två olika format med samma bispecificitet där man tror sig ha överkommit dessa hinder.

## CrossMab

**CrossMab**, framtagen av Schaefer et al. (2011) är en BiAk med samma arkitektur och molekylvikt som klassisk IgG1. Föräldraparet består av tidigare nämnda Bevacizumab samt mAk LC60, vilket är en human anti-ANG-2 av isotyp IgG1 $\kappa$ . Genom att i DNA:t skriva in nya fästpunkter för de tunga kedjorna samt kasta om sekvensordningen för Fab-domänerna i den ena monoklonala antikroppens arm, V<sub>H</sub>, C<sub>H</sub>, V<sub>L</sub> och C<sub>L</sub>, har man sett till att kedjorna teoretiskt bara kan anta en kombinationsform, *Figur 2*. Produkterna uttrycks sedan med hjälp av plasmider i embryonala njurceller från människa, HEK293F.

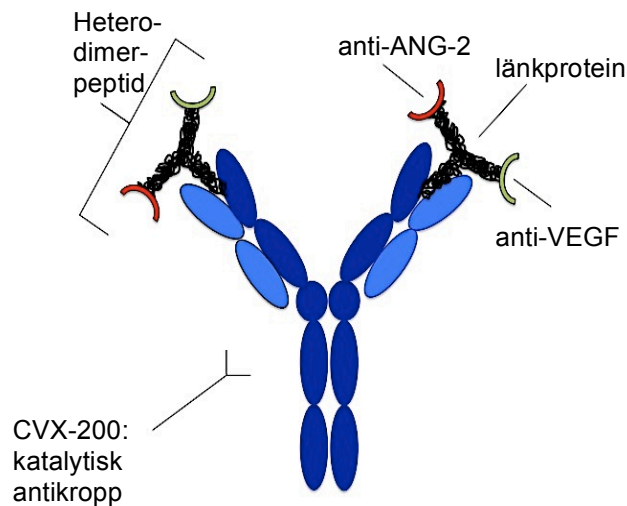


*Figur 2. A) Halv mAk LC60, original. B) Halv Bevacizumab, original. C) De fyra kedjorna för CrossMab med nya fästpunkter i de tunga kedjorna och "utbytta" variabla domäner i högra armens Fab-region. D) CrossMab*

DNA för tre olika domänkombinationer testades varav alla uppvisade en monovalent bispecifik ANG-2-VEGF antikropp som liknar konventionell IgG1 i både storlek och vikt. Detta gör att den förväntas uppvisa samma kinetiska egenskaper med avseende på diffusion, ackumulation och halveringstid som IgG1. Schaefer et al. (2011) valde att gå vidare med den domänkombination där C<sub>H</sub> och C<sub>L</sub> bytt plats med varandra då den visade störst produkthomogenitet. In vivo försök visade att ANG-2-VEGF CrossMab<sup>CH/CL</sup> minskade tumörtillväxt med 92 %. Vilket kan jämföras med 78 %, den effekt som kombinationsterapi av det ursprungliga monoklonala föräldraparet uppvisade. Samtliga antikroppar gavs i en dos av 20mg/kg/vecka. Tester visade också att den orörda Fc-regionen kunde binda in till Fc $\gamma$ RIIIa vilket därmed ger formatet möjlighet till komplementaktivering, neonatala Fc-receptor interaktioner och ADCC. Notera dock att detta format är monovalent och alltså ej kan medverka till mekanismer som kräver antigenbindning till antikroppens båda Fab-regioner (Schaefer et al., 2011).

## CovX

**CovX-242**, *Figur 3*, framtagen av Doppalapudi et al. (2010) bygger på en metod där de länkar heterodimerpeptider till monoklonala aldolas-katalytiska antikroppar (Wagner et al., 1995). Katalytiska antikroppar induceras på konstgjord väg och påminner lite om enzym då de katalyserar en kemisk reaktion mellan sig och den ligandmolekyl de binder. Specificiteten är snarare riktad mot molekyler som befinner sig i ett visst övergångsstadie från substrat till produkt än mot inerta epitoper likt traditionella Ak (Barbas et al., 1997). Detta gör att samma katalytiska antikropp kan binda in till olika ligander förutsatt att denna befinner sig i ett visst transitionstadium.



Figur 3. CovX-242

och cynomolgus apa visade på en reduktion av tumörtillväxt med ca 50% vid doser på 10-30mg/kg/vecka. Samma modeller användes för att jämföra effekten av CovX-242 och monospecifika CovX-format (VEGF respektive ANG-2). Dessa studier visade att CovX-242 hade signifikant större effekt än båda de monospecifika formaten samt att effekten var likartad den effekt som uppnås med en kombination av dessa. Samtliga antikroppar gavs i en dos av 15mg/kg/vecka. CovX-242, som är en tetravalent bispecifik antikropp, prövas för närvarande kliniskt i Fas1.

### Anti-angiogenesresistens

Precis som i fallet med många andra cancerterapi har det visat sig att tumörer ofta blir okänsliga mot anti-angiogena preparat vid upprepade behandlingar (Teicher, 2011). Som jag tidigare nämnt är den kliniska anti-angiogenesterapi idag framför allt inriktad på att inhibera de signalvägar som involverar VEGF/VEGFR. Resultaten är förvisso upplyftande men inte den stora succé som man hoppats på. Majoriteten av högselektiva antikroppsterapier har till exempel visat sig ha begränsade fördelar för patienter med sjukdomar med multipla mekanismer (Doppalapudi et al., 2010). Bergers and Hanahan (2008) tar upp att både statistik och konfirmerande studier visar att tumörerna förvisso går i regression men att de alltid kommer tillbaka, och det inom bara några månader.

Detta har lett till många teorier kring mekanismerna bakom förmodad anti-angiogenesresistens. En av de vanligaste rör det faktum att de flesta av inhibitorerna är monospecifika och att man genom att bara stänga av en signalväg stimulerar tumörcellerna att uppreglera nya kommunikationsvägar. En annan teori är att tumörcellerna utvecklar faktisk resistens mot själva inhibitorerna genom att börja producera proangiogena faktorer av annan specificitet. Man har även gjort studier som indikerar att vissa tumörceller kan utveckla hypoxitolerans och därför inte är lika beroende av angiogenesen för överlevnad (Kerbel and Folkman, 2002; Bergers and Hanahan, 2008; Teicher, 2011). Bergers and Hanahan (2008) menar att sanningen om anti-angiogenesresistens är en kombination av allt ovan och föreslår följande huvudlinjer med tillhörande orsaker

- **Adaptiv resistens** med hjälp av
  - uppreglering av alternativa pro-angiogena signalvägar
  - rekrytering av vaskulära pro-genitor celler och pro-angiogena monocytter från benmärg
  - ökning av tätt bundna pericyter på utsidan av tumörkärnen
  - ökad kapacitet till invasivitet utan angiogenes
- **Inbyggd resistens** på grund av
  - andra redundanta multipla pro-angiogena signaler
  - vaskulaturskyddande inflammationsrelaterade celler runt tumören
  - hypovaskularitet
  - invasivitet (metastas) i normalvaskulatur

## DISKUSSION

Det ter sig uppenbart att anti-angiogenesterapi brottas med en hel del svårigheter eftersom det nämns i samtliga artiklar som ingår i denna uppsats. Problemen ser lite olika ut beroende på artiklarnas fokus, de monospecifika antikropparna kämpar mot resistens och de bispecifika med funktionella- och kinetiska problem kopplade till deras struktur. För att slänga in en brasklapp skall såklart sägas att det inte är täta skott emellan de två formaten, även mAk kan drabbas av funktionella problem såväl som att BiAk kan drabbas av resistens. Dock väcker litteraturen en del andra frågor kring anti-angiogenesterapi och de olika format som redan används eller är på väg ut på marknaden.

Jag undrar till exempel hur det är med de mekanismer hos immunförsvaret som BiAk antas framkalla, hur testas dessa? Frågan är om man bara tar för givet att så länge formatet har en Fc-region så medierar det samma biologiska aktiviteter som konventionellt IgG eller om detta faktiskt testas men inte redovisas? Undantaget, bland de artiklar jag läst, är CrossMabs där de faktiskt har undersökt möjligheterna för ADCC trots att det egentligen inte är aktuellt i frågan om just ANG-2-VEGF, eftersom dessa är lösliga ligander (Schaefer et al., 2011). Det skulle till exempel vara intressant att se studier som visar huruvida antikropparna har samma opsoniserande effekt som konventionellt IgG1, detta gäller samtliga format. Det torde vara ganska lätt att mäta nivåer av accessoriska immunceller i närheten av immunkomplexen.

Vad det gäller CovX-242 undrar jag huruvida de katalytiska antikropparna har någon som helst biologisk aktivitet med avseende på immunförsvaret? Ingen av de två artiklar som direkt behandlar aldolas-katalytiska antikroppar nämner immunologiska mekanismer (Wagner et al., 1995; Barbas et al., 1997) och inte heller Doppalapudi et al som konstruerat CovX-242. Hur påverkar inbindningen av länkproteinet antikroppens konfiguration, förändras den eller är den densamma? Studier saknas. Vi får anta att man valt att använda CVX-200 för att antikroppstrukturen i sig inte är immunogen och att man är ute efter dess farmakokinetiska egenskaper, det vill säga lång halveringstid och stor diffusionsbredd. Produktionen av CovX är onekligen lättsam i och med att själva Ak kan pre-fabriceras och farmakologiskt aktiva substanser fästas på i laboratoriet. De nya kombinationerna måste dock fortfarande gå igenom



samma långa prekliniska studier som andra format så det är inte direkt så att preparaten kan kablats ut på en förmiddag i alla fall. Personligen tycker jag nog dessutom att många terapeutiska fördelar går förlorade om formatets inneboende förmåga att stimulera immunologiska försvarsmekanismer ignoreras.

Frågan huruvida de anti-angiogena bispecifika antikropparna är effektivare än de monospecifika mAk med avseende på cancerterapi har så många nivåer att den är svår att svara på. Till att börja med tycks väldigt få BiAk användas kliniskt idag och de som finns är fortfarande så nya att ingen riktig statistik finns att tillgå. Detta är då till skillnad mot mAk som i alla fall har använts de senaste tio åren och under denna period gått ifrån att användas var för sig till att alltmer användas i kombinationsterapier. Kanske kan det vara en klar indikation på att monospecificiteten inte räcker till? Jag kan såklart inte tala för alla men det är intressant att statistik visar hur de mAk som riktar sig mot VEGF/VEGFR kanske inte är så effektiva som man först trott. Det tycks finnas en hel del frågetecken kring vad detta beror på men jag är böjd att hålla med Bergers och Hanahan (2008) i deras uppdelning av problematiken.

När det kommer till de rent farmakotoxiska skillnader som flera av de artiklar som behandlar BiAk tar upp kan jag tyvärr bara dra slutsatser utifrån studier i dessa artiklar. Schaefer et al. (2011) säger bland annat att BiAk har en mindre systemisk cytotoxisk effekt än mAk. Jag får anta att de med systemisk toxisk effekt syftar på att antikroppar inte gör skillnad på var i kroppen de stöter på sina ligander. Till exempel finns VEGF/VEGFR hos alla endoteliala celler i kroppen vilket torde vara orsaken till de biverkningar som setts i samband med bevacizumab (Ferrara et al., 2004; Teicher, 2011). Den toxiska effekten är precis som med all farmaka dosrelaterad. Båda de artiklar som redovisar jämförande studier mellan BiAk och mAk uppvisar ett resultat som tyder på att mindre dosgivor av en BiAk uppnår samma effekt med avseende på tumörregression som kombinationen av mAk av en högre dos (Doppalapudi et al., 2010; Schaefer et al., 2011). Detta tycker i alla fall jag borde innebära i praktiken att färre anti-angiogena antikroppar snurrar runt i blodet totalt och därmed har en mindre systemisk cytotoxisk effekt jämfört med dubbla dosen av monospecifika mAk.

Så, mAk versus BiAk, vilket är egentligen att föredra ur resistens- och effektivitetssynpunkt? Jag tycker att det verkar vara bevisat att tumörvävnaden utvecklar någon form av resistens mot de monoselektiva terapierna. Gällande BiAk har jag lite svårt att uttala mig om eventuell resistens då jag inte funnit någon statistik över detta. Rent generellt känns det dock som att det alltid är bättre att attackera ett problem, i detta fall tumörvaskulatur, från två eller flera håll. Särskilt om det ena målet helt plötsligt förvinner eller av annan anledning inte längre genererar den eftersökta effekten. Exemplet med Catumaxomab visar också tydligt på vilka fantastiska möjligheter bispecifika antikroppar har i kliniskt arbete. Jag anser dock att större fokus och mer forskning behöver läggas på anti-angiogena bispecifika antikroppars immunologiska aktivitet. Vidare behöver anti-angiogenesresistensen kartläggas tydligare, annars tycks det mig som att utvecklingen av nya antikropsformat bara är som att fortsätta pytsa vatten genom ett läckande såll i tron om att det är en hink.

## REFERENSLISTA

- Barbas, C.F., 3rd, Heine, A., Zhong, G., Hoffmann, T., Gramatikova, S., Björnstedt, R., List, B., Anderson, J., Stura, E.A., Wilson, I.A., Lerner, R.A. (1997). Immune versus natural selection: antibody aldolases with enzymic rates but broader scope. *Science*, 278, 2085–2092.
- Bergers, G., Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature Reviews Cancer*, 8, 592–603.
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438, 932–936.
- Doppalapudi, V.R., Huang, J., Liu, D., Jin, P., Liu, B., Li, L., Desharnais, J., Hagen, C., Levin, N.J., Shields, M.J., Parish, M., Murphy, R.E., Del Rosario, J., Oates, B.D., Lai, J.-Y., Matin, M.J., Ainekulu, Z., Bhat, A., Bradshaw, C.W., Woodnutt, G., Lerner, R.A., Lappe, R.W. (2010). Chemical generation of bispecific antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 22611–22616.
- Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.-P., Novotny, W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature Review Drug Discovery*, 3, 391–400.
- Ferrara, N., Kerbel, R.S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 438, 967–974.
- Goel, S., Duda, D.G., Xu, L., Munn, L.L., Boucher, Y., Fukumura, D., Jain, R.K. (2011). Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiological Reviews*, 91, 1071–1121.
- Kerbel, R., Folkman, J. (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature Review Cancer*, 2, 727–739.
- Kerbel, R.S. (1991). Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *Bioessays*, 13, 31–36.
- Palumbo, A., Hauler, F., Dziunycz, P., Schwager, K., Soltermann, A., Pretto, F., Alonso, C., Hofbauer, G.F., Boyle, R.W., Neri, D. (2011). A chemically modified antibody mediates complete eradication of tumours by selective disruption of tumour blood vessels. *British Journal of Cancer*, 104, 1106–1115.
- Potente, M., Gerhardt, H., Carmeliet, P. (2011). Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell*, 146, 873–887.
- Presta, L.G., Chen, H., O'Connor, S.J., Chisholm, V., Meng, Y.G., Krummen, L., Winkler, M., Ferrara, N. (1997). Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Research*, 57, 4593–4599.
- Schaefer, W., Regula, J.T., Böhner, M., Schanzer, J., Croasdale, R., Dürr, H., Gassner, C., Georges, G., Kettenberger, H., Imhof-Jung, S., Schwaiger, M., Stubenrauch, K.G., Sustmann, C., Thomas, M., Scheuer, W., Klein, C. (2011). Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 11187–11192.
- Seimetz, D., Lindhofer, H., Bokemeyer, C. (2010). Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy. *Cancer Treatment Reviews*, 36, 458–467.
- Teicher, B.A. (2011). Antiangiogenic agents and targets: A perspective. *Biochemical Pharmacology*, 81, 6–12.
- Wagner, J., Lerner, R.A., Barbas, C.F. 3rd. (1995). Efficient aldolase catalytic antibodies that use the enamine mechanism of natural enzymes. *Science*, 270, 1797–1800.
- Wu, C., Ying, H., Grinnell, C., Bryant, S., Miller, R., Clabbers, A., Bose, S., McCarthy, D., Zhu, R.-R., Santora, L., Davis-Taber, R., Kunes, Y., Fung, E., Schwartz, A., Sakorafas, P., Gu, J.,

Tarcsa, E., Murtaza, A., Ghayur, T. (2007). Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. *Nature Biotechnology*, 25, 1290–1297.