

Adalimumab: la molécula y el proceso de obtención

Z. Martínez de Lagrán, S. Pérez-Barrio y J.L. Díaz-Pérez

Servicio de Dermatología. Hospital de Cruces. Cruces (Vizcaya). España.

Resumen. Adalimumab es un anticuerpo monoclonal totalmente humano y dirigido contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). El TNF- α es una citocina proinflamatoria, implicada en la etiopatogenia de múltiples entidades, entre ellas la psoriasis.

El mecanismo de obtención de adalimumab es complejo y se basa en la denominada técnica de selección mediante presentación en fagos.

Palabras clave: psoriasis, adalimumab, fagos.

ADALIMUMAB: THE MOLECULE AND MANUFACTURING PROCEDURE

Abstract. Adalimumab is a fully human monoclonal antibody targeted toward tumor necrosis factor alpha (TNF- α). TNF- α is proinflammatory cytokine involved in the pathogenesis of many inflammatory diseases, as the psoriasis.

The production process of adalimumab is complex and it is based in the called phage display technology.

Key words: psoriasis, adalimumab, phages.

La molécula

Adalimumab es un fármaco de origen biológico que bloquea específicamente la acción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), una de las citocinas más importantes en el mantenimiento de ciertos procesos inflamatorios crónicos.

El TNF fue descrito hace más de 100 años, pero no fue purificado ni caracterizado hasta 1984. Es una citocina que recibe su nombre por su capacidad para eliminar células tumorales mediante apoptosis. Hay dos formas biológicamente activas, el TNF- α y el TNF- β , que aunque estructuralmente son similares, tienen funciones diferentes. El TNF- β , también denominado linfotóxina, se produce por los linfocitos T activados, modula la proliferación celular e induce apoptosis. El TNF- α es producido principalmente por las células del sistema monocito-macrófago, y en menor

cantidad por los linfocitos B, T y los fibroblastos. Es pro-trombótico promueve la adhesión y migración leucocitaria, modula la hematopoyesis, regula la activación de los macrófagos, las respuestas inmunes en los tejidos y la proliferación de linfocitos e induce la producción de otras citocinas como la IL-1 e IL-6. En definitiva, desempeña un papel fundamental en la respuesta inflamatoria y está implicado en la patogénesis de una gran cantidad de enfermedades, entre ellas la psoriasis¹.

Existen dos receptores de la superficie celular que interactúan con el TNF, el TNF-R1 y TNF-R2, llamados también p55 y p75, respectivamente. El TNF- α interactúa fundamentalmente con el TNF-R1 y el beta con el TNF-R2. Si se consigue bloquear esta unión, es posible detener o enlentecer la cascada de fenómenos inflamatorios que genera el TNF. Hay dos formas de antagonizar el TNF:

1. Anticuerpos monoclonales que se fijan al TNF, tanto al circulante como al unido a los receptores celulares, y neutralizan sus funciones.
2. Inhibidores competitivos de los receptores del TNF. Son análogos moleculares del p55 y p75 que "secuestran" al TNF circulante, impiden su llegada y unión a los receptores celulares y forman complejos biológicamente inactivos.

El primer anticuerpo monoclonal anti-TNF α fue desarrollado en ratones. Recibe el nombre de Segard (MAK195)

Correspondencia:
Zuriñe Martínez de Lagrán.
Servicio de Dermatología.
Hospital de Cruces.
48963 Cruces (Vizcaya). España.

ZURINE.MARTINEZDELAGRANALVAREZ DE ARCAÑA@osakidetza.net

es completamente murino y ha sido utilizado experimentalmente en el tratamiento agudo de la sepsis. Posteriormente se han desarrollado anticuerpos monoclonales anti-TNF α quiméricos (infliximab, Remicade®) y humanizados (CDP-571 y CDP-870)¹.

Adalimumab es el primer anticuerpo monoclonal anti-TNF- α totalmente humano. Su nombre de laboratorio es D2E7 y es indistinguible de otras IgG1 humanas. Tiene un peso molecular de 148 kDa¹. El desarrollo de adalimumab ha sido posible gracias a un complejo sistema, denominado mecanismo de selección de fagos, que permite obtener anticuerpos monoclonales (IgG1) completamente humanos y con una alta especificidad frente al antígeno deseado, en este caso el TNF- α . El origen 100% humano del fármaco minimiza el riesgo de reacciones inmunoalérgicas de otros agentes biológicos. Su vida media es como la de las IgG1, aproximadamente 15 días, permitiendo que la frecuencia de administración de adalimumab, vía subcutánea, sea cada dos semanas.

Como excipientes adalimumab contiene manitol, ácido cítrico monohidrato, citrato de sodio, fosfato de sodio dihidrogenado dihidrato, fosfato de disodio dihidrato, cloruro de sodio, polisorbato 80, hidróxido de sodio y agua para preparaciones inyectables.

Está comercializado en forma de jeringas y plumas precargadas de un solo uso, de 0,8 ml, que contienen 40 mg del producto en solución. Hay envases comerciales de 1, 2, 4 y 6 jeringas.

Se debe conservar en nevera, entre 2-8° C y el producto tiene un período de validez de 18 meses.

Etanercept (Enbrel®) es una proteína de fusión, análoga a la forma soluble del receptor p75. Se obtiene al conjugar la porción extracelular del receptor con la porción constante (Fc) de una inmunoglobulina humana IgG1. Etanercept se fija al TNF circulante y bloquea su unión a los receptores de la superficie celular. A diferencia de los anticuerpos monoclonales, que presentan una altísima especificidad frente al TNF- α , etanercept es capaz de unirse tanto al TNF- α como al β^1 .

Proceso de obtención: técnica de selección de fagos

La técnica inicial de desarrollo de los anticuerpos monoclonales se debe a los inmunólogos George J.F. Köhler y César Milstein, por cuyo descubrimiento se les otorgó el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1984. El procedimiento consistía en la inyección de un antígeno en un ratón, induciendo así la proliferación en el animal de linfocitos B que sintetizaban anticuerpos específicos frente al antígeno inyectado. El problema era que al ser estos anticuerpos de origen animal (murino), el sistema inmune los reconocía como extraños, generando una respuesta denominada AHAM (anticuerpos humanos contra anticuerpos

murinos). Esta respuesta, además de destruir los anticuerpos murinos, inactivándolos y haciendo que perdiesen su efecto beneficioso, provocaba graves reacciones inmunoalérgicas.

Con el objetivo de evitar la respuesta AHAM se han desarrollado diferentes técnicas de ingeniería genética, que permiten humanizar la molécula al reemplazar porciones del anticuerpo murino por proteínas humanas. La sustitución de la región constante (Fc) es sencilla, pero resulta más compleja en el caso de las regiones variables (Fab) murinas, puesto que éstas contienen las secuencias responsables de la afinidad antígeno-anticuerpo. Según el porcentaje modificado se obtienen anticuerpos quiméricos (en los que un 66-75% del anticuerpo monoclonal es humano y el resto murino) o anticuerpos humanizados (el 90-95% de la molécula es de origen humano) (fig. 1). A pesar de contener elementos murinos su porcentaje es tan bajo que ambos tipos de anticuerpos se consideran seguros y eficaces.

La situación ideal sigue siendo en cualquier caso la de los anticuerpos monoclonales totalmente humanos. La técnica de los bacteriófagos (fagos) permite obtener anticuerpos monoclonales sin necesidad de pasar por el ratón.

Los fagos son partículas víricas que infectan bacterias, sin producir enfermedades en los seres humanos. En ellos se ha sustentado la base del desarrollo de las principales técnicas modernas de biología molecular².

En 1985 Smith y Parmley demostraron que mediante la técnica del "ADN recombinante" era posible introducir genes de cualquier organismo, sin importar su complejidad, en el genoma de los fagos. A partir de este momento las investigaciones se orientaron hacia la obtención de fagos modificados genéticamente que expresaran en su superficie péptidos o moléculas que antagonizasen una o varias de las funciones del sistema inmunitario. Estos estudios fueron el inicio de la llamada *phage display technology* o "tecnología de presentación de péptidos y proteínas en la superficie de los fagos filamentosos" (TPFF), desarrollada inicialmente por la compañía alemana MorphoSys AG y la inglesa Cambridge Antibody Technology y con la licencia de Knoll (adquirida por Abbott para el desarrollo de adalimumab) (fig. 2).

De forma resumida el objetivo de esta tecnología es lograr una molécula con afinidad máxima por otra molécula blanco. El primer paso es obtener todas las posibles combinaciones genéticas que produzcan la molécula que se está buscando. Cada una de estas secuencias nucleotídicas se fusionan con el gen que codifica las proteínas de la cápside del fago para lograr que sean expresadas en su superficie. Se obtienen así clones de fagos, cada uno de los cuales sintetiza una variante diferente de la secuencia del polipéptido o proteína a estudio. Finalmente, mediante técnicas de selección por afinidad, o *biopanning*, se separan y eligen aquellos fagos que expresen en su superficie la molécula con las mejores propiedades de unión a la molécula diana²⁻⁴ (fig. 3).

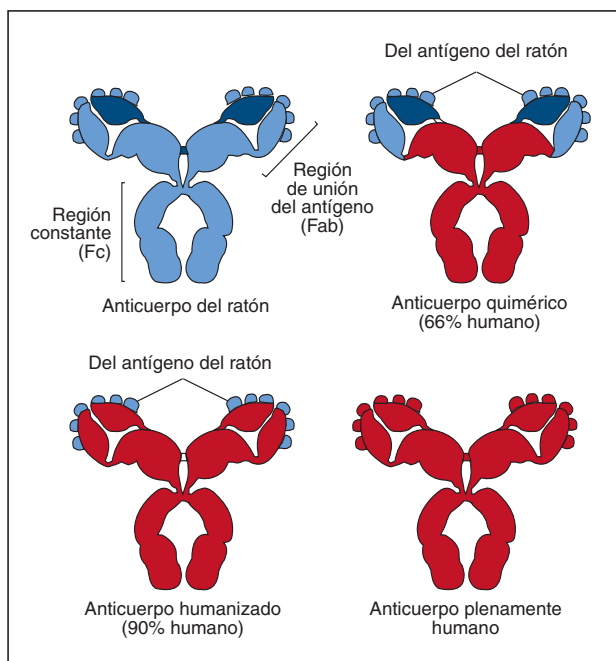


Figura 1. Tipos de anticuerpos obtenidos: de ratón, quiméricos, humanizados y plenamente humanos.

Se han descrito 12 familias de bacteriófagos con diferentes características estructurales y genéticas. Los fagos utilizados en la TPFM son los filamentosos, pertenecientes a

una familia del género *Inovirus*. Están formados por una envoltura proteica tubular en cuyo interior se encuentra una molécula de ADN circular de cadena simple. La partícula viral tiene 900 nm de largo y 6,5 nm de diámetro. Está integrada por 5 proteínas: pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX. El cuerpo de la partícula está formado por 2.700 copias de pVIII. Los extremos contienen 5 copias de las proteínas pVII y pIX en un lado y pVI y pIII en el otro.

En la presentación de péptidos sobre fagos filamentosos se han utilizado dos proteínas de la cápside: pIII y pVIII. Las funciones biológicas de pIII no se afectan de forma significativa con las fusiones. Sin embargo, la inserción de péptidos en la proteína pVIII impide que se ensamble la cápside del fago, lo que provoca que la técnica fracase. Para solucionar esta complicación es necesario recurrir al sistema de dos genes, en la que los fagos contienen dos copias de su material genético. Una de ellas se modifica y la otra se mantiene en estado salvaje. Se obtiene así un fago quimérico, con expresión concomitante de dos versiones de las proteínas de la cápside: una modificada o recombinante, que expresa la molécula foránea en su superficie y otra intacta, que permite el ensamblaje del fago.

Además, el gran número de copias de pVIII contrasta con las 5 que existen de pIII. Esto implica que la selección de péptidos unidos a pIII es de mayor afinidad que la de pVIII. Este hecho, junto a la mayor complejidad del sistema de los dos genes, explica que, en general, se prefiera utilizar la proteína pIII en la presentación de péptidos sobre fagos²⁻⁴ (fig. 4).

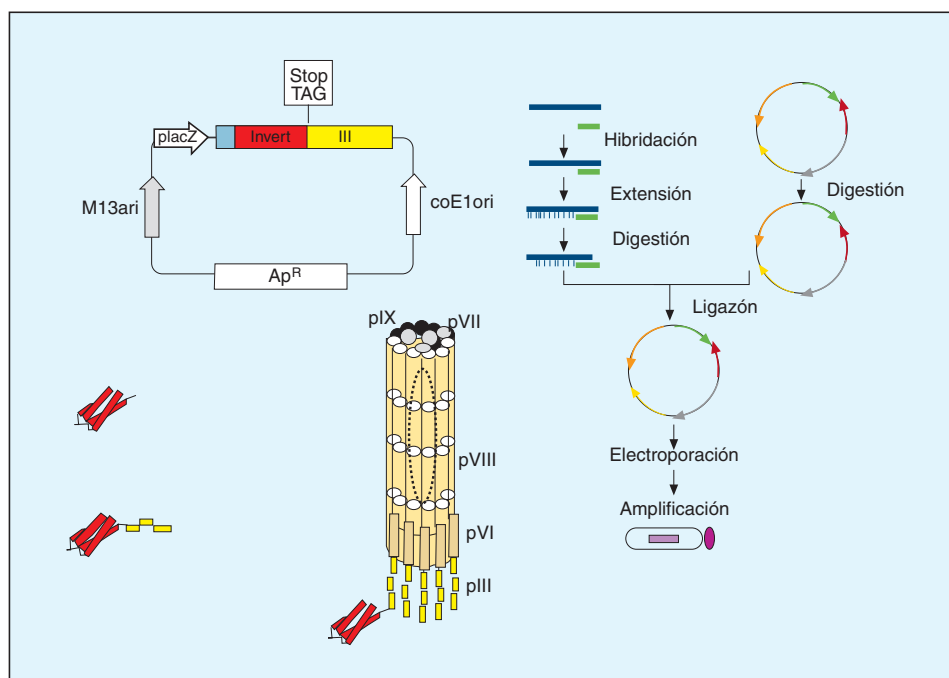


Figura 2. Tecnología de presentación de péptidos y proteínas en la superficie de los fagos filamentosos.

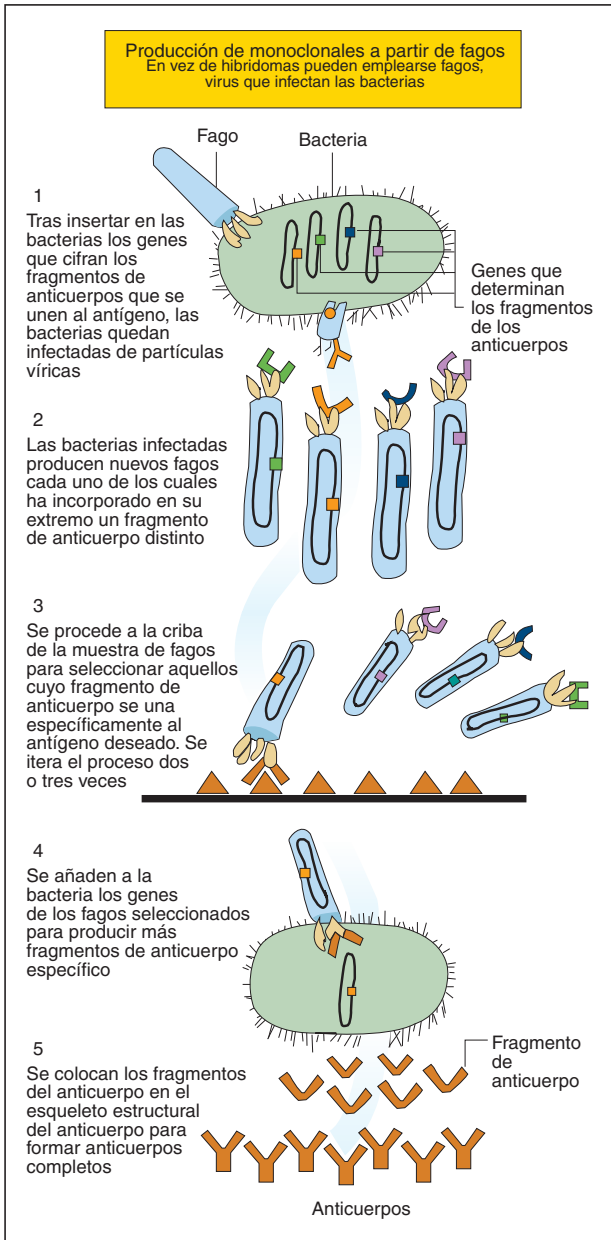


Figura 3. Producción de anticuerpos monoclonales mediante el sistema de presentación en fagos.

Técnica de presentación de fagos en la obtención de adalimumab

El proceso de síntesis de adalimumab comienza aislando linfocitos B de una gran cantidad de donantes humanos adultos sanos. La porción variable (Fab) de los anticuerpos se compone de dos cadenas pesadas (VH) y dos cadenas ligeras (VL), que deben ensamblarse para formar un anticuerpo funcional. Los genes que codifican estas cadenas

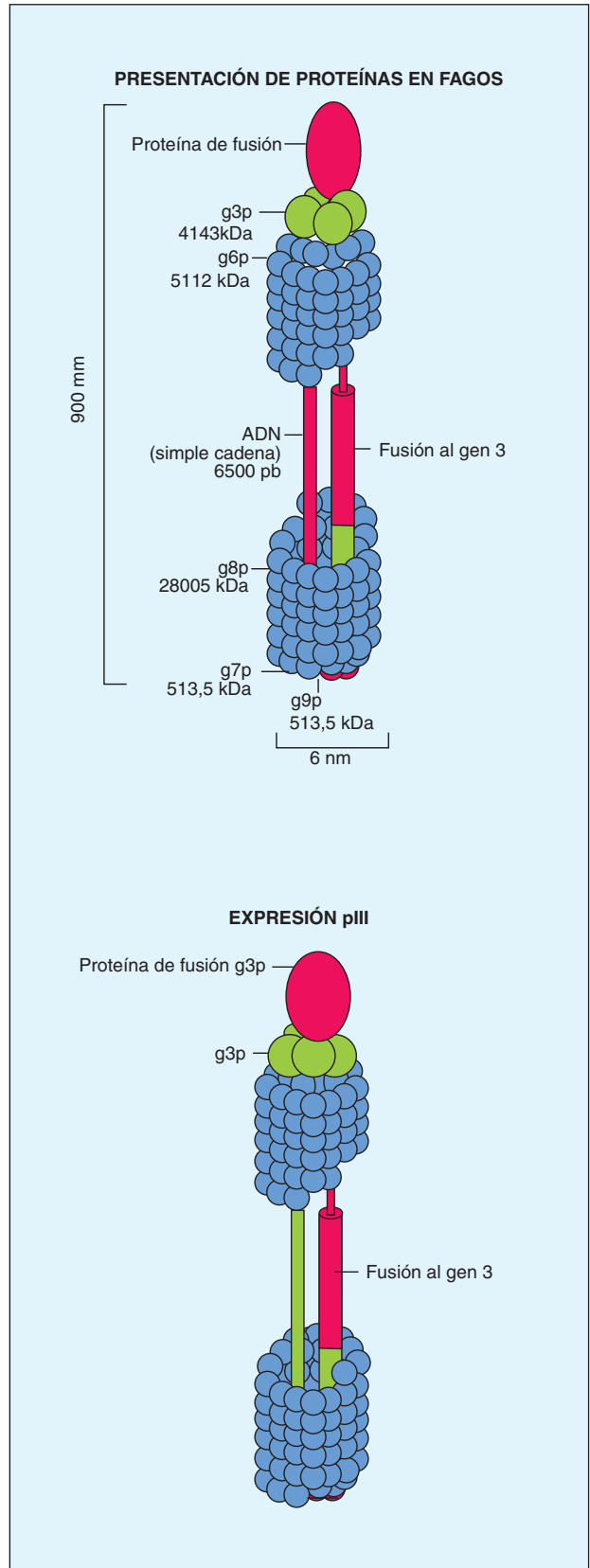


Figura 4. Presentación de proteínas en fagos mediante la expresión de pIII.

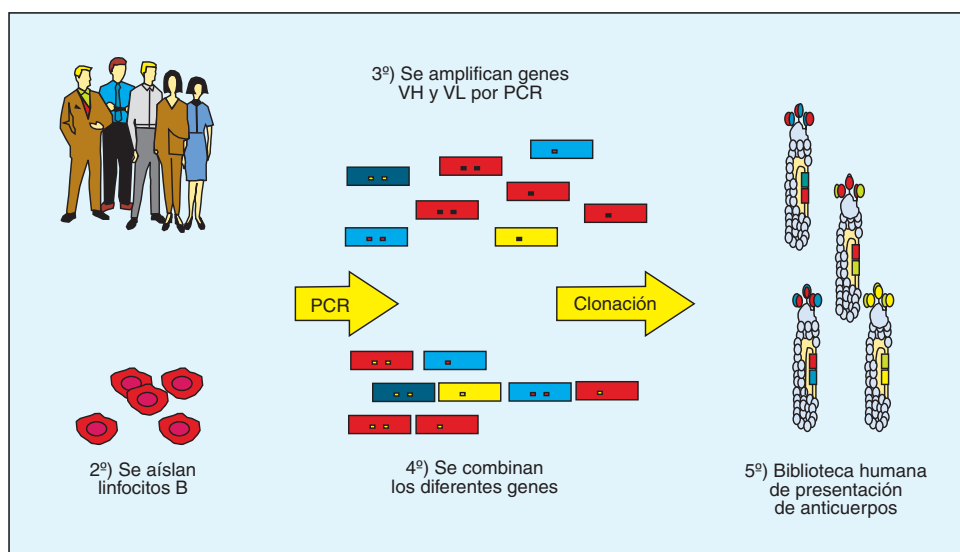


Figura 5. Obtención de la biblioteca humana de presentación de anticuerpos en fagos.

ligeras y pesadas se extraen de los linfocitos B aislados y se amplifican mediante un proceso denominado reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite aumentar su cantidad de una forma exponencial.

Una vez de que las secuencias genéticas de las VH y VL han sido aisladas y copiadas se someten a un proceso de recombinación y randomización, obteniendo todas las combinaciones posibles de VH y VL, que suponen una gran cantidad de anticuerpos diferentes.

El siguiente paso es clonar las diferentes combinaciones genéticas obtenidas. Para ello se insertan en el ADN del fago junto a los genes que codifican las proteínas estructurales de la cápside. Los fagos se replican en el interior de *E. coli* y los anticuerpos funcionales son expresados en su cápside, de manera similar a como un linfocito B expresa los anticuerpos en su superficie. El conjunto de los múltiples fagos, cada uno con su correspondiente anticuerpo en superficie, es la denominada biblioteca de anticuerpos¹ (fig. 5).

Llegado este momento el objetivo es seleccionar entre todos los fagos que componen la librería aquellos que contienen la secuencia genética que codifica el anticuerpo con la mayor afinidad y especificidad por el TNF- α . El procedimiento se denomina *biopanning* y consiste en pasar varias veces la librería por la denominada “superficie de afinidad”, una columna cilíndrica que contiene en su superficie el antígeno contra el que se desea desarrollar los anticuerpos, es decir, el TNF- α . Los fagos que expresan en su cápside anticuerpos que se unen al TNF- α se adhieren a la columna y son extraídos, purificados y caracterizados. El resto de partículas, sin afinidad por el TNF- α , pasarán de largo y serán lavadas. El proceso se repite hasta encontrar los anticuerpos con máxima afinidad¹ (fig. 6).

El último paso es la denominada “selección guiada”, en la que las cadenas pesadas y ligeras seleccionadas de la librería, mediante los sucesivos pases por la superficie de afinidad, se combinan al azar con las cadenas pesadas y ligeras del MAK 195. El MAK 195 es el anticuerpo monoclonal anti-TNF- α obtenido a partir de ratón inmunizado, con lo que el objetivo de este paso es aumentar aún más la especificidad de la molécula. La cadena pesada murina se une con las diferentes cadenas ligeras humanas hasta conseguir la combinación que tenga las mismas características de afinidad que el MAK 195. Lo mismo se hace al revés, es decir, se combina la cadena ligera murina con las cadenas pesadas humanas. Y finalmente, se fusionan las cadenas humanas pesadas y ligeras seleccionadas, obteniendo un anticuerpo totalmente humano, pero con las mismas características de unión y afinidad que el MAK 195¹ (fig. 7).

Una vez seleccionada la combinación VH/VL (es decir, la región Fab) con las características ideales de unión y la mayor adherencia y especificidad posibles, ésta se ensambla con el esqueleto estructural del anticuerpo (Fc). La secuencia genética resultante se introduce en células de ovario de hámster chino y se selecciona el clon que secreta altos niveles de anticuerpo completo al medio de cultivo. Después de un proceso de expansión del clon celular en diferentes matraces de cultivo de tamaño creciente se procede a la inoculación de la siembra en biorreactores controlados por ordenador de 3.000-6.000 litros, y se cultiva allí durante unos 15 días; después de este tiempo se aíslan mediante una serie de pasos los anticuerpos altamente purificados y se desecha la parte celular.

El resultado es adalimumab, un anticuerpo monoclonal, totalmente humano, con una altísima afinidad y especifici-

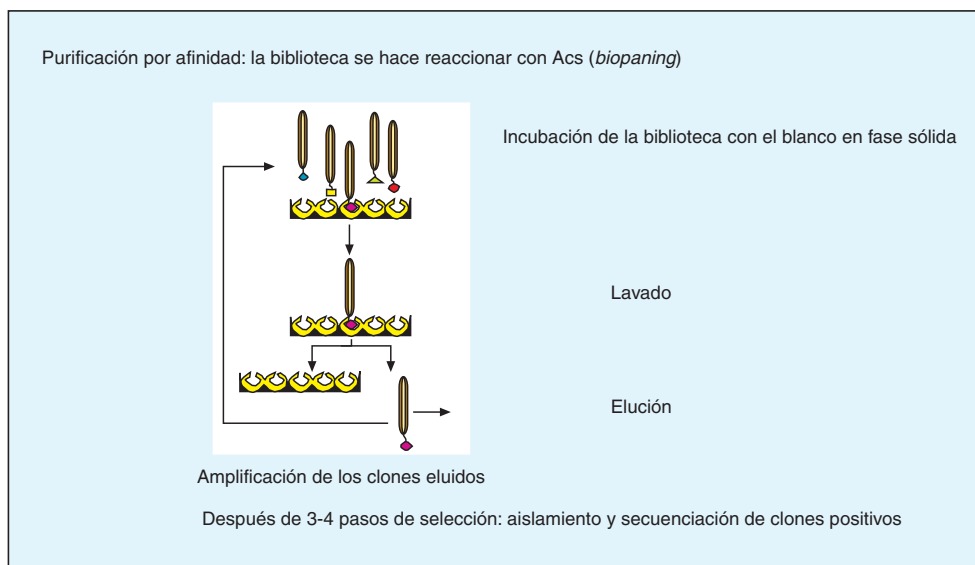


Figura 6. Selección por afinidad o *biopanning*.

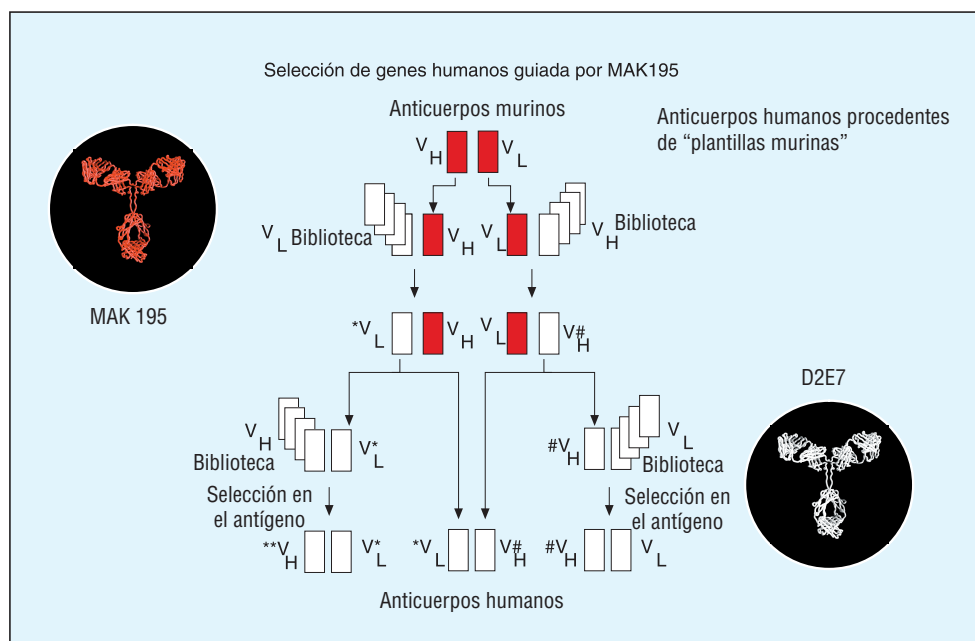


Figura 7. Técnica de la selección guiada.

dad por el TNF- α , y sin ningún resto de plasma o residuo hemático humano.

Conclusiones

Adalimumab es el primer anticuerpo monoclonal de origen completamente humano que se dirige específicamente contra el TNF- α . Su mecanismo de obtención se basa en

la tecnología de presentación de péptidos y proteínas en fagos filamentosos. Su vía de administración es subcutánea, cada dos semanas.

Conflicto de intereses

La Dra. Z. Martínez de Lagrán y la Dra. S. Pérez Barrio declaran no tener ningún conflicto de intereses.

El Dr. J. L. Díaz Pérez declara haber formado parte del grupo de asesores médicos de Merck Serono en 2006 y 2007.

Bibliografía

1. Overview of the role of tumor necrosis factor and tumor necrosis factor antagonist therapy in rheumatoid arthritis. Development of HUMIRA (Adalimumab). Material proporcionado por Laboratorios Abbott.
2. Vispo NS, Puchades Y. Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria. *BA*. 2001;18:135-47.
3. Hoogenboom HR, de Bruine AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends J, Roovers RC. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*. 1998;4:1-20.
4. Azzazy HME, Highsmith WE Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem*. 2002;35:425-445.