# SIMPOSIO WARMA WALLER TO THE SIMPOSIO WARMA WALLER TO THE SIMPOSIO WARMAN WALLER TO THE SIMPOSIO WALLER TO THE SIMPOSIO WARMAN WALLER TO THE SIMPOSIO WALLE TO THE SIMPOSIO

Innovación en el diseño de terapias biológicas para el tratamiento de la Artritis Reumatoide



The next generation biopharma leader

# La tecnología de la PEGilación aplicada en la mejora de moléculas biológicas

Dra. Mercedes Arenere Mendoza.

Servicio de Farmacia.

Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa" de Zaragoza.

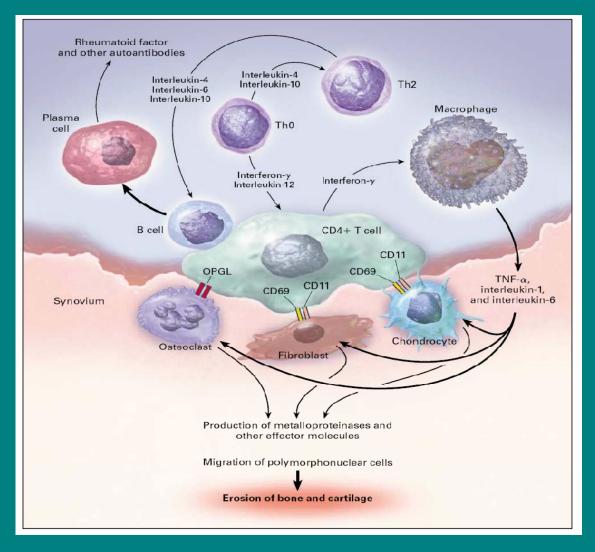
- 1. La artritis reumatoide (AR)
- 2. Tratamiento farmacológico de la AR
- 3. Anticuerpos monoclonales (mAb)
- 4. Anti-TNF alfa
- 5. Certolizumab pegol
- 6. Pegilación
- 7. Diferencias entre los anti-TNF alfa
- 8. Conclusiones

# La artritis reumatoide (AR)

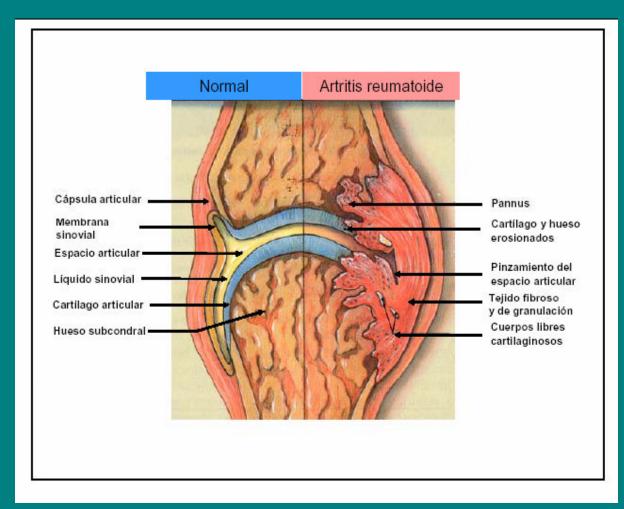
- AR enfermedad inflamatoria, crónica, autoinmune y de origen desconocido, caracterizada por la afectación simétrica de las articulaciones diartrodiales.
- Prevalencia 0,5%, en España.
- Se trata de una patología que se presenta con mayor frecuencia entre los 40 y 60 años y en mujeres.
- Enfermedad altamente incapacitante.

# La artritis reumatoide (AR)

#### **PATOGÉNESIS**



# La artritis reumatoide (AR) PATOLOGIA



Hiperplasia de la membrana sinovial

Neovascularización

Infiltrado de células inflamatorias

Formación de pannus

Invasión del cartílago

Destrucción del cartílago

Postigo AA et al. The role of adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Autoinmunity 1993;16: 69-76.

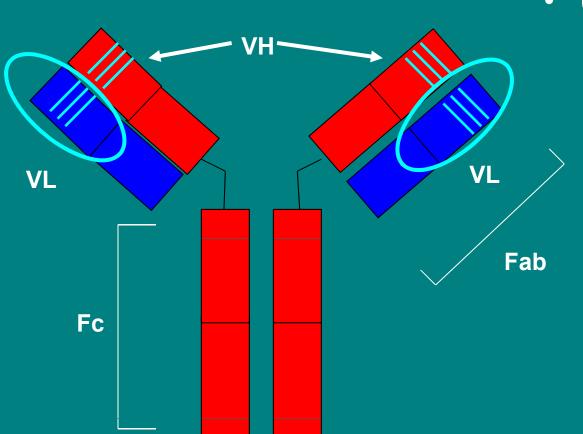
# Tratamiento farmacológico de la AR

- **Grupo A**: Modifican signos y síntomas de la AR. Analgésicos, AINEs y corticoides.
- **Grupo B:** Fármacos modificadores de la enfermedad (FAMEs). **Metotrexato, leflunomida, sulfasalazina,** sales de oro, antipalúdicos, ciclosporina, azatioprina, ciclofosfamida y clorambucil.
- Grupo C: Terapias biológicas. Permiten controlar la AR. Inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), inhibidores de la interleuquina I y los fármacos dirigidos contra las moléculas de superficie.

<sup>•</sup>Aletaha D et al. Practical progress in realisation of early diagnosis and treatment of patients with suspected rheumatoid arthritis: results from two matched questionnaires within three years. Ann Rheum Dis 2002;61: 630-4.

# Anticuerpos monoclonales

#### Estructura de un anticuerpo



Un anticuerpo

- Fc fragmento que fija complemento
- Fab fragmento que se une al anticuerpo
- VH Región variable de la cadena pesada
- VL Región variable de la cadena ligera
- CDR Regiones determinantes de complementariedad

•Weir N et al. A new generation of high-affinity humanized PEGylated Fab'fragment anti-tumor necrosis factor-α monoclonal antibodies. Therapy 2006; 535.45.

### Anticuepos monoclonales

#### TIPOS

- Murinos (omab). Muronomab.
- Quiméricos (imab). Infliximab, rituximab.
- Humanos (umab). Adalimumab, gemtuzumab.

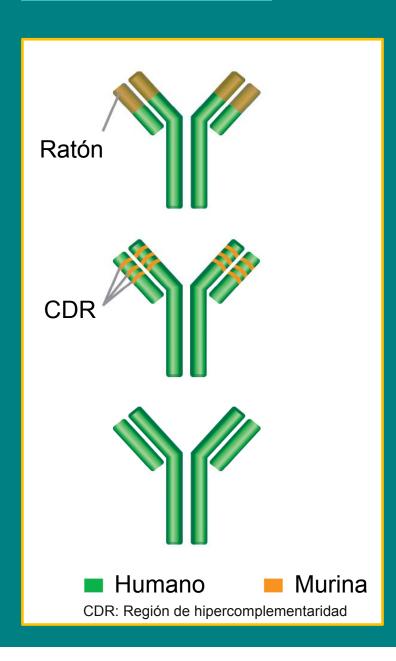
#### PROBLEMAS

- Anticuerpos humanos contra los mAb.
- HAMA, HACA, HAHA.

## Anticuerpos monoclonales

- Estrategias para disminuir la posible producción de auto anticuerpos:
  - Producción HAMA → anticuerpos murinos
  - Producción HACA → anticuerpos humanizados y humanos.
  - Producción HAHA????

# Anti-TNF alfa



Anticuerpo monoclonal quimérico **75% humano** 

INFLIXIMAB 840,000 pacientes tratados

Anticuerpo monoclonal humanizado ~95% humano

**CDP571** 

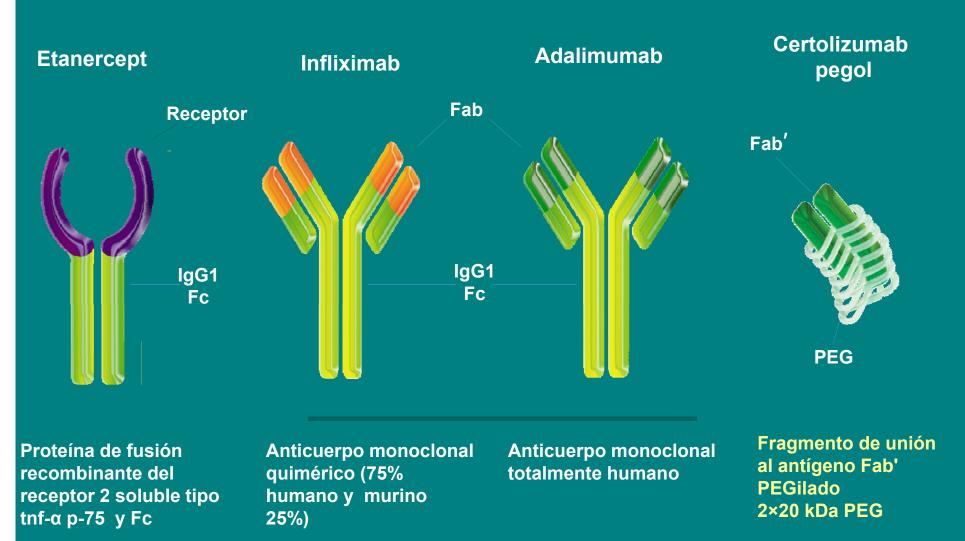
Anticuerpo monoclonal humano **100% humano** 

ADALIMUMAB 110,000 pacientes tratados

Abbas AK et al. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. 2003. Reichert J et al. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3:383-384. Waldmann TA. *Nat Med*. 2003;9:269-277.

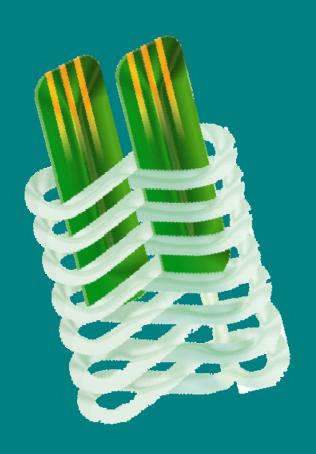
Congreso Nacional de la SEFH. Zaragoza, 23 de Septiembre de 2009.

# Anti-TNF alfa



Weir N, Athwal D, et al. Therapy. 2006;3:535-45

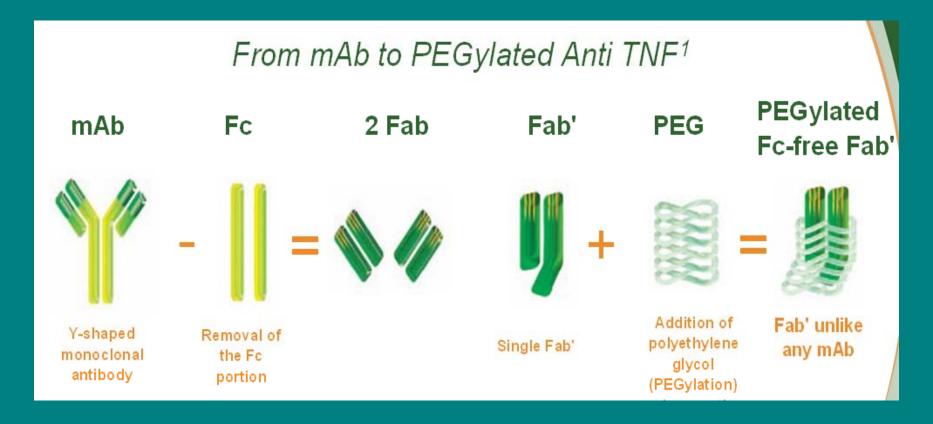
Congreso Nacional de la SEFH. Zaragoza, 23 de Septiembre de 2009.



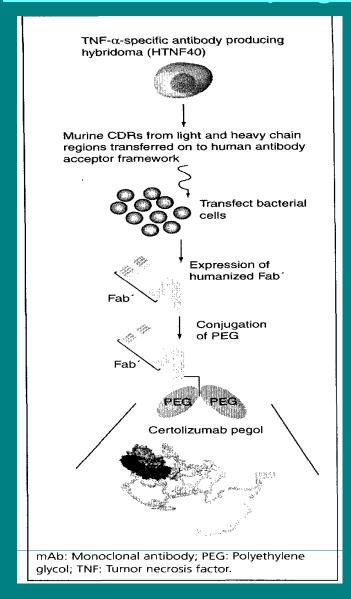
#### Certolizumab pegol

Fragmento Fab´de un anticuerpo monoclonal frente a TNF humanizado y PEGilado

#### OBTENCIÓN DEL CERTOLIZUMAB PEGOL

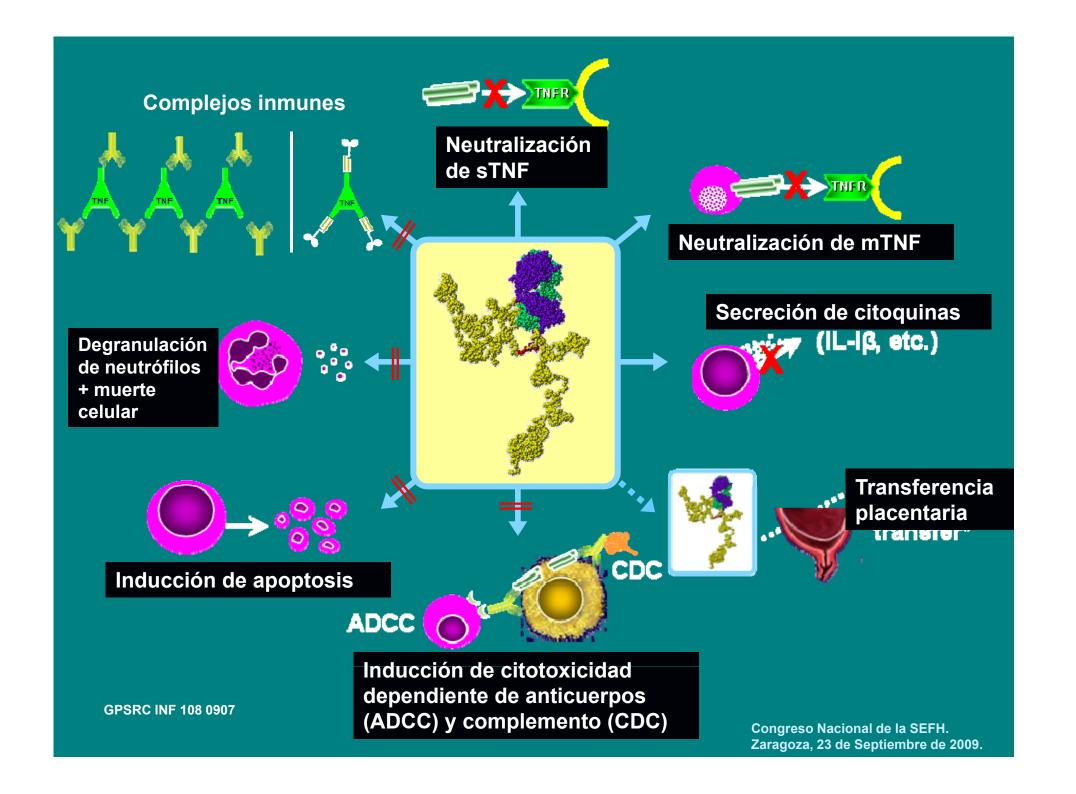


Weir N, Athwal D, Brown D, et al. A new generation of high-affinity humanized PEGylated Fab'fragment anti-tumor necrosis factor-α monoclonal antibodies. Therapy. 2006;3:1-11.2. Stephens S, Nesbitt A. Foulkes R. Placental transfer of the anti-TNF antibody TN3 in rats: comparison of immunoglobulin G1 and PEGylated Fab versions. Presented at: the 14th United European Gastroenterology Week Annual Meeting: October 21-25, 2006; Berlin, Germany

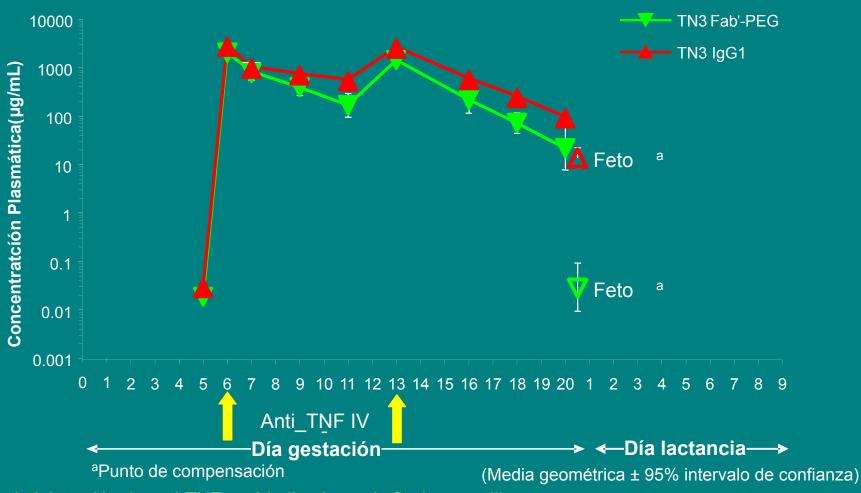


- Certolizumab pegol se ha elaborado mediante injerto de las CDR hipervariables cortas procedentes de mAb murino (HTNF40) en un fragmento Fab'de Ig humano.
- El fragmento Fab´ de certolizumab pegol tiene un 98% de residuos de línea germinal humana.

- ¿Por qué emplear solo la fracción Fab´ humanizada?
  - Ausencia de fracción Fc
     —No fija el complemento.
  - No se produce CDC y la ADCC.
  - No se produce formación de inmunocomplejos
  - Menor producción de HACA y HAHA.
  - Transferencia placentaria-lactaria



# Concentraciones TN3 IgG1 y TN3 Fab'-PEG en el plasma de las crías después de 2 inyecciones IV



La administración de anti-TNF está indicada por la flecha amarilla

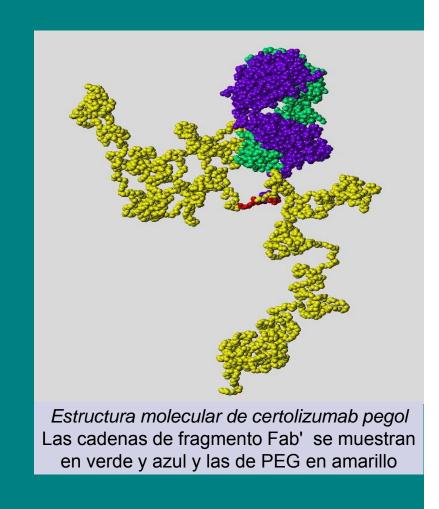
Símbolos abiertos muestran la concentración en el plasma de los fetos el día 20 de la gestacion.

# La pegilación

- La pegilación es la modificación de moléculas biológicas mediante la conjugación covalente con polietilenglicol (PEG).
- El PEG que es un polímero hidrosoluble no inmunógeno y no tóxico.
- La pegilación permite un cambio en las propiedades físicas y químicas de la molécula:
  - Mejora la solubilidad
  - Disminuye la inmunogenia
  - Permite una disminución en la frecuencia de administración

# La pegilación de certolizumab pegol

- Unión específica del PEG en la región bisagra del fragmento Fab´ con un resto tiol de la cisteína libre y solitario.
- Conjugación con un PEG ramificado (PEG2) en un sitio alejado de la unión al antígeno.
- Se consigue una disminución de la inmunogenia y un aumento la semivida circulante, sin perder afinidad por el TNF-α. Pegilación específica en un sitio alejado de la región de unión al antígeno.

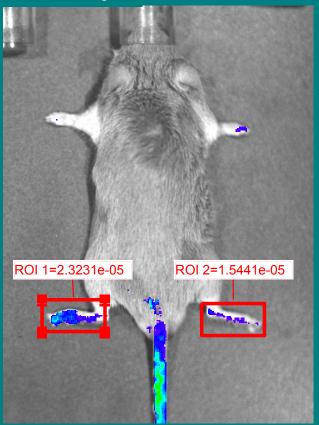


# La pegilación

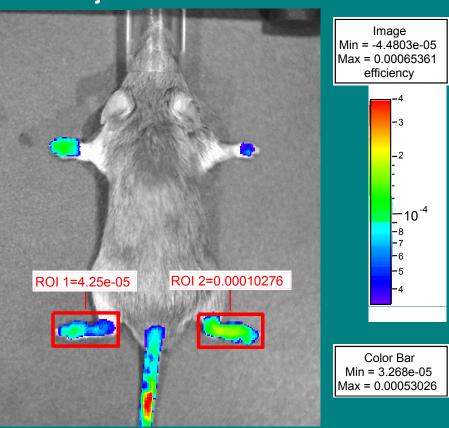
- ¿Por qué pegilar el framento Fab'?
  - Aumenta el tamaño y el peso de una proteína terapéutica
  - Aumenta la vida media (14 días) siendo comparable a la del anticuerpo completo.
  - Es compatible con la administración subcutánea
  - Modifica las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas.
  - Mejora la estabilidad térmica y mecánica
  - Mejora la distribución del certolizumab en el tejido inflamado (resultados en animales).

# Distribución tisular: Imagen *in vivo* de acumulación de certolizumab pegol en tejido de ratón enfermo y ratón normal

Tejido normal

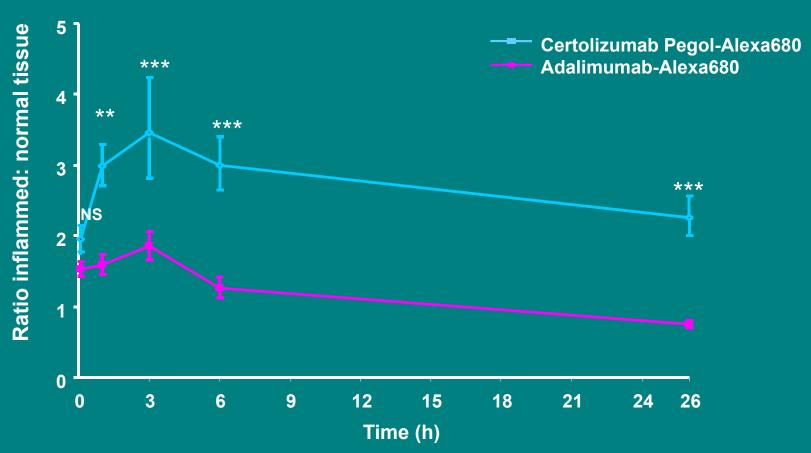


Tejido inflamado



Ratón con artritis reumatoide activa y ratón normal con administración de 2 mg/kg CZP IV marcado con Alexa-680 lmagen y muestras de sangre periférica obtenidas en las siguientes 26h ROI= Región de interés

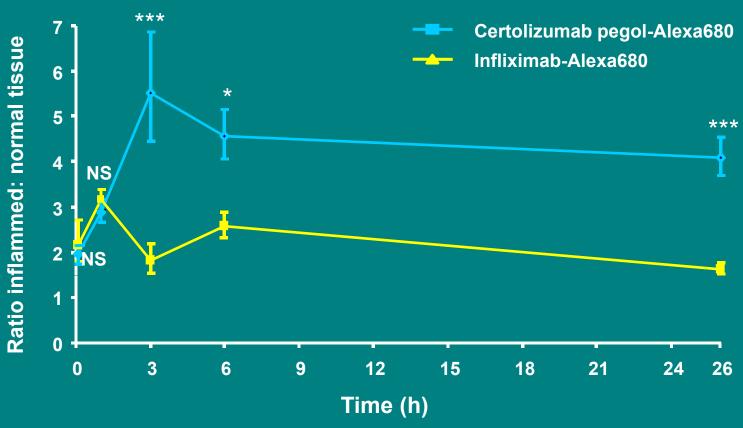
# Niveles de Anti-TNF en tejido normal y en tejido inflamado en modelo animal



\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (certolizumab pegol-Alexa680 vs adalimumab-Alexa680) One-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test between equivalent time points

Palframan et al. Use of biofluorescence imaging to compare the distribution of certolizumab pegol, adalimumab and infliximab in the inflamed paws of mice with collagen induced arthritis. Journal of inmunological methods 2009; 348: 36-41.

# Niveles de Anti-TNF en tejido normal y en tejido inflamado en modelo animal



\*p<0.05, \*\*\*p<0.001 (certolizumab pegol-Alexa680 vs infliximab-Alexa680) ANOVA seguido de post-test de Bonferroni entre intervalos de tiempo equivalentes

### Distribución tisular

• En modelos animales, certolizumab pegol ha presentado ínidices de penetración en el tejido inflamado frente a sano de ratones con artritis, mayores que adalimumab e infliximab.

### Diferencias entre los anti-TNF

Ac. Monoclonales

	INFLIXIMAB	ADALIMUMAB	Anti-receptor  ETANERCEPT	CERTOLIZUMAB PEGOL
Tipo	Ac. Monoclonal Quimérico	Ac. Monoclonal Humano	Prot. Fusión	Ac. Monoclonal humanizado, pegilado
Peso mol. KD, aprox	149	148	150	417
Vía de administración	IV perfusión	sc	SC	SC
Biodisponibilidad %	100%	64%	58-76%	80%
Cinética	No lineal	No lineal	No lineal	Lineal
Pauta	Carga 0, 2, 6 y cada 8 semanas	2 semanas	Semanal	Carga 0, 2, 4 sem/Mensual
Perfil de concentración	Picos	Estado estable	Estado estable	Lineal
Semivida días	9,5	9-21	3 - 5	≈14
Cmax µg/ml	118	4,7	1,2-3	?
Antigenicidad	++++	++	+	+
% HACA	7-21	6-12	2	6
Valencia	Bivalente	Bivalente		Monovalente preso Nacional de la SEFH. goza, 23 de Septiembre de 2009.

### Diferencias entre los anti-TNF

Ac. Monoclonales









Tipo	Ac. Monoclonal, Quimera	Ac. Monoclonal Humano	Prot. Fusión	Ac. Monoclonal humanizado, pegilado
Citotoxicidad mediada por complemento	Si	Si	Si	No
Citotoxicidad mediada por anticuerpos	Si	Si	Si	No
Apoptosis	Si	Si	٤?	No
Degranulación/muerte de neutrófilos	Si	Si	٤?	No
Potencia (Inhibición del TNF)	IC90: 5 ng/ml	IC90: 6 ng/ml	NA	IC90: 0,4 ng/ml
Transferencia placentaria	Si	Si	Si	¿menor?
Otras			Inhibe TNFß	
Eficaz en Enfermedad de Crohn	SI	SI	NO	SI

Congreso Nacional de la SEFH. Zaragoza, 23 de Septiembre de 2009.

### CONCLUSIONES

- Certolizumab pegol es un fragmento Fab´
   humanizado pegilado de un mAb anti-tnf alfa.
- Su estructura confiere ciertas peculiaridades:
  - Reducir la inmunogenicidad
  - Reducir efectos tóxicos mediados por la región Fc del anticuerpo.
  - Buena biodisponibilidad tras la administración subcutánea (80%).
  - Preferencia por tejido inflamado.

# GRACIAS POR SU ATENCIÓN

54° CONGRESO NACIONAL DE LA SEFH

# 

Innovación en el diseño de terapias biológicas para el tratamiento de la Artritis Reumatoide



The next generation biopharma leader

Nota: Certolizumab pegol es un producto no comercializado en España