

## ÍNDICE

RESUMO .....	2
ABSTRACT .....	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
1. INTRODUÇÃO .....	9
2. Considerações gerais e contextualização histórica dos anticorpos monoclonais.....	11
2.1 Anticorpos – Estrutura .....	11
2.2 Anticorpos policlonais – Isótipos.....	13
2.3 Anticorpos – Recetores Fc.....	15
2.4 Anticorpos monoclonais – Contextualização Histórica .....	16
3. Desenvolvimento e produção de anticorpos monoclonais.....	18
3.1 Produção de hibridomas .....	18
3.2 Desenvolvimento de anticorpos monoclonais.....	21
3.3 Técnicas de humanização dos mAbs .....	23
4. Nomenclatura dos anticorpos monoclonais terapêuticos .....	26
5. Mecanismos de ação dos anticorpos monoclonais terapêuticos .....	29
5.1 Citotoxicidade celular dependente de anticorpos .....	31
5.3 Imunoconjugados.....	34
6. Terapêuticas dirigidas em hemato-oncologia.....	39
6.1 Anticorpos monoclonais aprovados em Hematologia - Passado e Presente.....	40
6.1.1 Rituximab.....	40
6.1.2 Ofatumumab .....	47
6.1.3 Ibritumomab tiuxetano .....	49
6.1.4 Obinutuzumab.....	51
6.1.5 Gemtuzumab ozogomicina.....	53
6.1.6 Alemtuzumab .....	55
6.1.7 Brentuximab vedotina.....	56
6.1.8 Eculizumab .....	59
7. Perspetivas futuras dos anticorpos monoclonais em hemato-oncologia.....	64
8. Conclusão .....	71
Referências Bibliográficas .....	73

## RESUMO

A quimioterapia convencional tem sido o suporte do tratamento em oncologia, contudo apresenta algumas limitações, nomeadamente existência de toxicidade significativa associada e o desenvolvimento de resistências. De forma a colmatar estes efeitos indesejáveis, a investigação científica procurou, durante décadas, agentes farmacológicos que apresentassem, idealmente, um mecanismo de ação mais específico contra as células tumorais.

O tratamento em hemato-oncologia tem sido considerado um exemplo na abordagem terapêutica de diferentes doenças neoplásicas, exemplo que se mantém no âmbito da terapêutica dirigida e particularmente nos tratamentos com anticorpos monoclonais.

Os anticorpos monoclonais terapêuticos (mAbs), pertencentes ao grupo de terapêuticas dirigidas, são imunoglobulinas que se ligam seletivamente a antígenos tumorais e desencadeiam respostas terapêuticas específicas e eficazes, poupando paralelamente os tecidos celulares normais.

Em 1997, o rituximab, tornou-se o primeiro mAb aprovado para o tratamento de Linfomas Não-Hodgkin (LNH) de células B. Este foi um grande marco na história da terapêutica em hematologia e um fator impulsionador para a investigação de outros mAbs que têm sido essenciais nos esquemas de tratamento atuais, da maioria das neoplasias hematológicas.

Os mecanismos de ação destes agentes farmacológicos são variados e, dependendo do anticorpo monoclonal, podem contemplar a estimulação das vias de sinalização da apoptose, o bloqueio da função das moléculas ou recetores das vias de sinalização alvo envolvidas na proliferação e/ou diferenciação, o transporte de citotóxicos à célula tumoral alvo, a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e a citotoxicidade dependente de complemento (CDC).

O objetivo deste trabalho é reunir os conhecimentos disponíveis na literatura acerca de anticorpos monoclonais, contemplando a sua evolução, mecanismos de ação, identificação dos principais mAbs utilizados em hematologia, as suas aplicações terapêuticas, efeitos secundários e perspectivas futuras desta classe farmacológica.

**Palavras-Chave:** Anticorpos monoclonais, Imunoglobulinas, Antígenos, Hematologia, Terapêuticas dirigidas, Rituximab.

## **ABSTRACT**

Conventional chemotherapy has been the backbone of treatments in oncology. It does have some limitations though, particularly when it comes to its significant toxicity and the development of drug resistances. In order to overcome its undesirable effects, scientific research has searched for pharmacological agents, which ideally could present a more specific targeting against tumor cells.

The treatment of hematologic malignancies has been a forerunner to the medical management of neoplastic disorders in general. Hence, it is not surprising that even in the area of targeted therapy, the treatment of these malignancies remains at the forefront of ongoing research about monoclonal antibodies.

The therapeutic monoclonal antibodies (mAbs), a main type of targeted therapy, are immunoglobulins, which selectively target tumor cells by binding tumor - specific surface antigens, allowing specific and effective anticancer therapy while relatively sparing normal tissues.

In 1997, rituximab became the first mAb approved for the treatment of B-cell non-Hodgkin lymphomas (NHL). This approval was a major breakthrough in the history of the treatments in hematology and was essential to further investigations about other therapeutic mAbs which are used in the current treatment regimens of most hematologic malignancies.

Monoclonal antibodies exert their anticancer effects through a variety of mechanisms: by stimulating the signaling pathways of apoptosis, by blocking the function of target molecules or receptors and their signaling pathways involved in proliferation and/or differentiation, by transporting cytotoxic substances to the target tumor cells, and last but not least by using antibody dependent cell cellular cytotoxicity (ADCC) and complement mediated cytotoxicity (CDC).

The objective of this document is to gather knowledge currently available in the literature about monoclonal antibodies, their evolution, and mechanisms of action. Identify the main monoclonal antibodies used in hematology, the respective therapeutic use, side effects and general future prospects of these therapeutic agents.

**Key-words:** Monoclonal antibodies, Immunoglobulins, Antigens, Hematologic malignancies, Targeted therapy, Rituximab.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ALFA** - Associação francesa de leucemia aguda

**ATCPH** - Transplante autólogo de células progenitoras hematopoiéticas

**ADCC** - Citotoxicidade celular dependente de anticorpos

**B-R** - Bendamustina e rituximab

**BsmAbs** - Anticorpos monoclonais bispecíficos

**CD** - Cluster de diferenciação

**cDNA** – DNA complementar

**CDC** – Citotoxicidade dependente de complemento

**CDR** - Regiões determinantes de complementaridade

**CH** – Região constante da cadeia pesada da imunogloblina

**CL** - Região constante da cadeia leve da imunogloblina

**CHOP** - ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisolona

**Clb** – Clorambucil

**CLGB** – Cancer leucemia group B

**CR** – Resposta completa

**C-terminal** - carboxi-terminal

**CTC** – Critérios Comuns de toxicidade

**DCI** - Denominação Comum Internacional

**DHFR** - diidrofolato redutase

**DTPA** - dietileno triamina do ácido penta-acético

**EMA** - Agência Europeia do Medicamento

**EMSR** - Esclerose múltipla Surto-Remissão

**ERK** - *Extracelular signal-regulated kinase*

**Fab** – Fragmento de ligação ao antigénio

**Fc** - Fragmento cristalino

**FcR** – Recetor do fragmento cristalino

**FDA** – *Food and Drug Administration*

**GCLLSG** - German CLL Study Group

**GO** - Gemtuzumab ozogomicina

**GPI** - Glicosilfosfatidilinositol

**gpP** - Glicoproteína p

**HGPRT** - Hipoxantina – guanina fosforiltransferase

**HAT**- Hipoxantina, aminopterina timidina

**HAMA** - *Human antimouse antibodies*

**HPN** - hemoglobinúria paroxística noturna

**Ig** – Imunoglobulina

**IgSF** – Super família das imunoglobulinas

**IL** - Interleucina

**LDGCB** – Linfoma Difuso de Grandes Células B

**LH** – Linfoma de Hodgkin

**LLA** – Leucemia linfoblática aguda

**LLC** – Leucemia linfocítica crónica

**LMA** – Leucemia mielóide aguda

**LNH** – Linfoma Não Hodgkin

**mAbs** – Anticorpos monoclonais

**MAP** – Proteínas cinases ativadas por mitógenos

**MMAE** - Antimicrotúbulo monometil auristatina E

**NF-kB** – Fator nuclear kB

**N – terminal** - Amino-terminal

**O-C1b** – Ofatumumab/clorambucil

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**ORR** – Taxa de resposta global

**PEG** - Polietilenoglicol

**PMN** – Célula polimorfonuclear

**PTEN** - *Phosphatase and tensin homolog*

**R-CHOP** – Rituximab, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, prednisolona

**R- CVP** – Rituximab, ciclofosfamida, vincristina, prednisolona

**R-FC**- rituximab, fludarabina e ciclofosfamida

**RME** - endocitose mediada por recetores

**R-QT**- Rituximab e Quimioterapia

**scFv** - fragmentos variáveis de cadeia simples

**SMD** – Síndrome mielodisplásica

**SHUa** - Síndrome hemolítica urémica atípica

**TNF** – Fator de necrose tumoral

**VH** - Região variável da cadeia pesada

**VL** - Região variável da cadeia leve

# 1. INTRODUÇÃO

A leucemogénese é um processo de transformação maligna através da aquisição de alterações genéticas e epigenéticas responsáveis por modificar o desenvolvimento celular normal, que resultam na formação de clones celulares neoplásicos com alterações das suas propriedades de crescimento (1). As alterações nas vias de sinalização responsáveis pela proliferação, apoptose e diferenciação celular, são mecanismos conhecidos no desenvolvimento e crescimento de neoplasias (2).

A quimioterapia convencional tem sido o suporte principal, do tratamento oncológico. Os agentes quimioterápicos atuam em diferentes fases do ciclo celular das células neoplásicas altamente mitóticas (2). Subsequentemente, em adição aos efeitos nas células neoplásicas, afetam também as células normais com elevada taxa replicativa, originando os efeitos secundários conhecidos e associados à quimioterapia convencional (2). Estes fármacos, que ainda permanecem como base dos tratamentos oncológicos atuais, apresentam como limitações um índice terapêutico estreito, uma toxicidade significativa e o desenvolvimento de resistências (3).

De forma a colmatar estes efeitos indesejáveis a investigação científica procurou, durante décadas, agentes farmacológicos que apresentassem, idealmente, um mecanismo de ação mais específico contra as células neoplásicas, associado a menor incidência de efeitos adversos (4).

A utilização das terapêuticas dirigidas em oncologia, resultou dos avanços da investigação e da pesquisa, de mecanismos responsáveis pela carcinogénese, desenvolvida ao longo das últimas décadas (5).

As terapêuticas dirigidas incluem os inibidores das vias de sinalização e a classe dos anticorpos monoclonais que, com mecanismos e toxicidades diferentes da quimioterapia citotóxica convencional, alteraram significativamente o tratamento oncológico na última década e são utilizados, atualmente, no tratamento de várias neoplasias (6).

Os anticorpos monoclonais terapêuticos são imunoglobulinas que se ligam seletivamente a antígenos expressos por células tumorais (alvos), e desencadeiam respostas terapêuticas cuja característica principal é a especificidade contra as células malignas, conseguindo poupar desta forma os tecidos normais (7).

As neoplasias hematológicas constituem um grupo de doenças, onde a utilização desta classe farmacológica é bastante frequente, muitas vezes fundamental (4). Em 1997, o rituximab, um anticorpo monoclonal terapêutico anti-CD20, tornou-se o primeiro mAb aprovado para o tratamento de Linfomas Não Hodgkin (LNH) de células B. Este processo teve um impacto de tal ordem, que na literatura é comum encontrar o termo «*Era Rituximab*» como designação do período após a sua aprovação (4).

Desde a sua aprovação, o rituximab, tornou-se um fármaco indispensável no tratamento dos LNH de células B, e leucemia linfocítica crónica (LLC) (8), tanto em monoterapia como em combinação com fármacos citotóxicos, o que melhorou significativamente as respostas terapêuticas em hemato-oncologia (9).

A ampla utilização dos anticorpos monoclonais na clínica, as repercussões na terapêutica, o aumento da sobrevivência e da qualidade de vida destes doentes oncológicos, assim como a evolução exponencial desta classe farmacológica foram os impulsionadores do presente trabalho. Deste modo procurou-se identificar os principais anticorpos monoclonais utilizados em hematologia, a sua evolução, mecanismos de ação, aplicações terapêuticas, efeitos secundários e perspectivas futuras gerais referentes a esta classe farmacológica.

## **2. Considerações gerais e contextualização histórica dos anticorpos monoclonais**

### **2.1 Anticorpos – Estrutura**

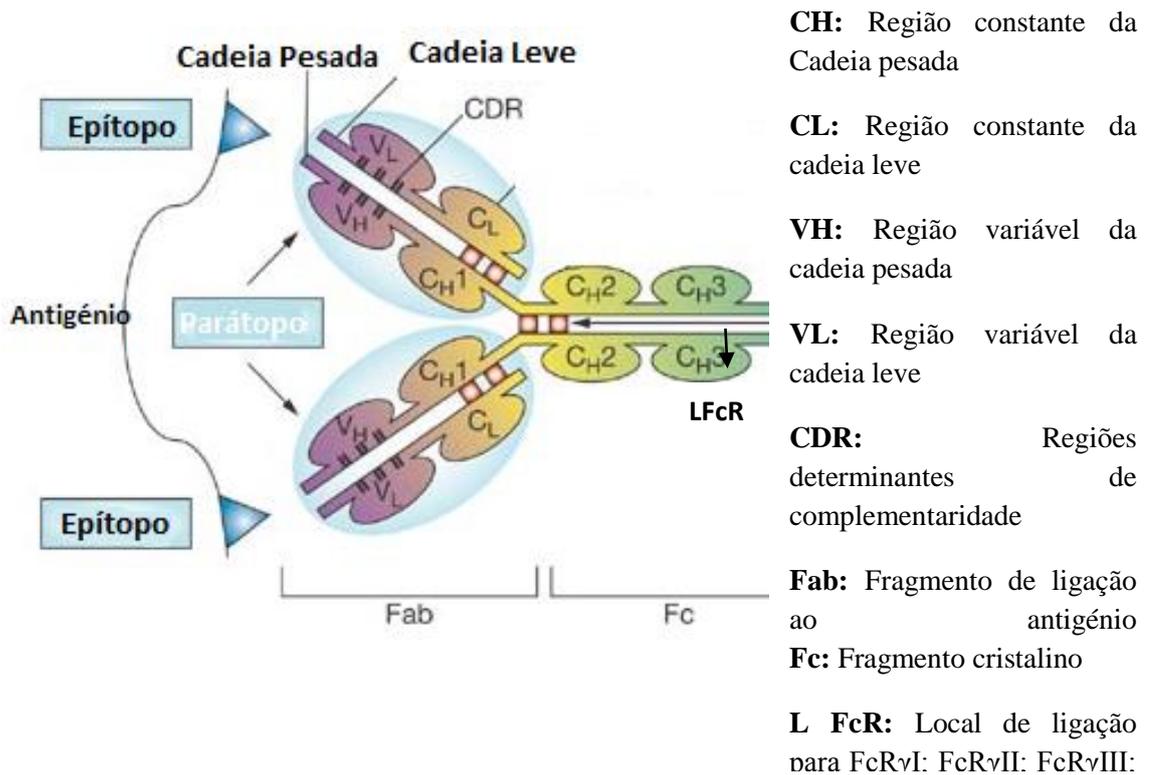
A Era Moderna da Imunologia teve início em 1890 com a descoberta de anticorpos, como componentes principais da resposta imunitária (10).

Os anticorpos ou imunoglobulinas (Igs) são glicoproteínas produzidas pelos linfócitos B (11). Estas moléculas de adesão celular pertencentes à superfamília das imunoglobulinas (IgSF) apresentam uma estrutura base em “Y”, cuja unidade é constituída por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) (11,12). As cadeias apresentam um N-terminal, que constitui a sua região variável (V), e um ou mais C-terminais, que constituem as suas regiões constantes (C). Cada cadeia leve encontra-se ligada a uma cadeia pesada, e as cadeias pesadas encontram-se ligadas entre si, por ligações dissulfeto (Figura 1) (12).

A estrutura das imunoglobulinas apresenta a nível funcional duas regiões principais: o fragmento cristalino (Fc) e o fragmento de ligação ao antigénio (Fab) (7,12). O Fab, responsável pelo reconhecimento do antigénio é constituído pela cadeia leve (L) e pelas regiões: variável e uma constante da cadeia pesada (CH1). O Fc, responsável pelas propriedades efetoras da Ig, é constituído pelas restantes regiões constantes da cadeia pesada, duas ou três conforme a classe de Ig (12).

Nas regiões variáveis localizam-se seis regiões hipervariáveis designadas regiões determinantes de complementaridade (CDR), três pertencentes à região variável da cadeia leve e três pertencentes à região homóloga da cadeia pesada, que formam entre si o local de ligação ao antigénio (7).

O antígeno apresenta uma pequena região, o determinante antigénico ou epítopo representado por uma sequência de aminoácidos que é reconhecida pela Ig. O epítopo liga-se ao local da imunoglobulina denominada parátopo, por ligações não covalentes (pontes de hidrogénio, ligações electrostáticas, forças de Van der Waals, ou forças hidrofóbicas) (13).



**Figura 1** Estrutura molecular de IgG (adaptado de Jagadeesh Bayry et al., 2007) (14).

## 2.2 Anticorpos policlonais – Isótipos

As cadeias leves são de dois tipos principais  $\kappa$  e  $\lambda$ , as cadeias pesadas podem ser de cinco tipos diferentes e são responsáveis pela categorização das Igs em classes ou isótipos (11). As Igs são diferenciadas de acordo com a cadeia pesada que apresentam ( $\alpha, \gamma, \delta, \epsilon, \mu$ ), respetivamente nos seguintes isótipos: IgA, IgG, IgD, IgE e IgM (12).

➤ A IgA que se encontra presente nas secreções é responsável, principalmente, pela imunidade das superfícies mucosas (7). A IgA divide-se em duas subclasses IgA1 e IgA2 e pode apresentar-se em duas formas de acordo com a sua localização no soro (IgA), ou nas secreções (sIgA). A subclasse IgA2 predomina nas secreções mucosas, contrariamente à IgA1 que é a subclasse predominante no soro (90%). A função da IgA é mediada pela sua ligação ao recetor pIgR nas mucosas, ou ao Fc $\alpha$ RI (CD89) no sangue, que é expresso por células PMN. Estas são posteriormente ativadas para mediar ADCC (citotoxicidade celular dependente de anticorpos) (12).

➤ A IgG constitui o isótipo predominante do organismo humano. Com base nas diferenças estruturais, e funcionais das regiões constantes da cadeia pesada, CH1 e CH3 em particular, foram identificadas quatro subclasses de IgG designadas por ordem decrescente de concentração (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) (15), e que apesar de serem estruturalmente semelhantes, apresentam diferentes atividades funcionais (7). A CDC (citotoxicidade dependente de complemento) é uma das propriedades efetoras desta classe de Igs, destacando-se apenas a IgG4 como a única subclasse que não consegue fixar o complemento, por seu lado a afinidade por C1q, o primeiro componente da via do complemento que se liga ao domínio CH2 de IgG, difere entre os membros das outras três subclasses IgG3 > IgG1 > IgG2 (12).

Outro mecanismo de acção da classe IgG é a ADCC através da qual são ativadas as células efetoras nomeadamente as células NK e monócitos, através da ligação da Ig a recetores Fc $\gamma$ R expressos por estas células (15).

➤ A IgD circulante é encontrada em baixa concentração no soro pois apresenta uma semi-vida curta, que pode ser atribuída à sensibilidade da molécula à proteólise. A sua função e atividade ainda não estão completamente esclarecidas (12).

➤ A IgE liga-se com afinidade aos recetores Fc $\epsilon$ RI que é expresso em mastócitos, basófilos, células Langerhans e eosinófilos o que conduz à libertação de vários mediadores químicos responsáveis por respostas inflamatórias alérgicas (7). Existem dois tipos de recetores para a IgE, recetores de baixa afinidade (Fc $\epsilon$ RII; CD23), expressos na superfície de células B, entre outras células imunes, e recetores de alta afinidade (Fc $\epsilon$ RI), expressos pelos mastócitos e basófilos (16). A IgE circulante regula positivamente a expressão de Fc $\epsilon$ R nestas células. A combinação de forte regulação positiva de ligação e da expressão Fc $\epsilon$ R contribui para a potência notável desta imunoglobulina (16).

➤ A IgM é responsável pela ativação do complemento. Estas Igs estão associadas a uma resposta imunitária primária e são frequentemente usadas para diagnosticar a exposição aguda a um antígeno ou agente patogénico (12).

Uma vez que a IgM é expressa precocemente no desenvolvimento de células B, as cadeias pesadas  $\mu$  apresentam regiões variáveis que não foram ainda submetidas a mutações somáticas, como resultado os anticorpos IgM tendem a ser mais reativos do que os restantes isótipos, o que permite que as células B produtoras de IgM tenham a capacidade de responder rapidamente a uma maior variedade de antígenos (12).

### 2.3 Anticorpos – Recetores Fc

Como referido anteriormente, os recetores Fc encontram-se expressos na superfície de células responsáveis pela resposta imunitária, incluindo as células NK, neutrófilos, macrófagos, mastócitos e basófilos (15). Estes recetores são os responsáveis pela ligação destas células às imunoglobulinas, e o seu nome deriva da ligação que estes recetores estabelecem com a sua região Fc (7).

Os recetores Fc mais estudados são os recetores da IgG denominados Fc $\gamma$ R (15). Em humanos, estão identificadas três classes de Fc $\gamma$ R: I, II e III. Os recetores Fc $\gamma$ RII e Fc $\gamma$ RIII apresentam ambos, duas isoformas, A e B (15). Estes recetores são expressos em graus variáveis, por diferentes células efectoras, mas não exclusivamente, podendo ser ainda expressos por células endoteliais (12). Existem diferenças conhecidas na afinidade pelas três classes de recetores Fc $\gamma$ R (I, II e III) (12,15). A IgG1 e a IgG3 ligam-se às três classes de recetores, sendo que a IgG3 estabelece ligações mais eficazes com os recetores Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIIa, and Fc $\gamma$ RIIIb (15). A IgG4 liga-se apenas aos recetores Fc $\gamma$ RII e III, embora estabeleça uma ligação significativamente mais fraca comparativamente com a IgG1, por sua vez a subclasse IgG2 liga-se apenas ao recetor Fc $\gamma$ RII (12).

O recetor Fc $\gamma$ RIIa é o mais expresso pelas células mielóides, e é descrito como o único que estabelece uma ligação significativa com a IgG2. A afinidade deste recetor, para com as diferentes subclasses de IgG varia da seguinte forma: IgG3 > IgG1 > IgG4 = IgG2 (15).

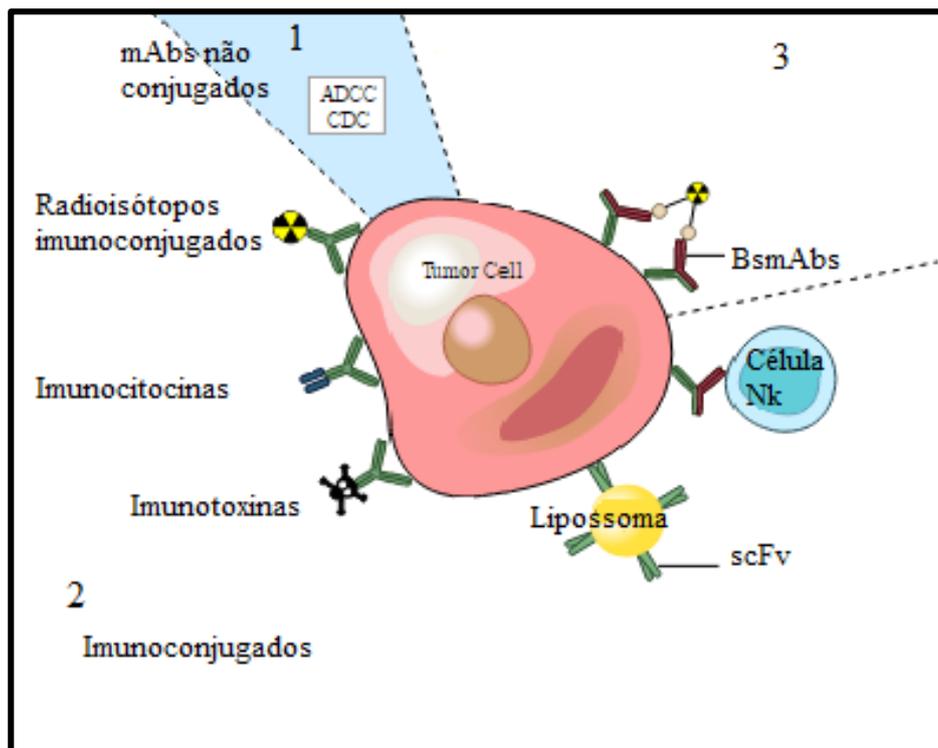
## 2.4 Anticorpos monoclonais – Contextualização Histórica

Os mAbs são imunoglobulinas (geralmente da classe IgG) que desencadeiam respostas imunológicas ao ligarem-se seletivamente a antígenos tumorais específicos (alvos) (7). Os anticorpos monoclonais são produzidos por uma única célula B, apresentam-se iguais entre si em estrutura, propriedades e especificidade, que reagem contra o mesmo epítipo do antígeno (21), contrariamente aos anticorpos policlonais. No âmbito da terapêutica oncológica dirigida, apresentam especificidade contra moléculas mutadas ou sobre-expressas, nas células neoplásicas, os antígenos tumorais (6).

O conceito de terapêutica dirigida remonta a Paul Ehrlich, que no início do século XX, quando os mecanismos de ligação antígeno – anticorpo já eram conhecidos, propôs um modelo para a ligação de um fármaco a um transportador específico, de forma a poder exercer a sua ação no tecido alvo. Este modelo que viria a ser conhecido como «*magic bullet*», tinha por base o princípio da especificidade na ligação anticorpo – antígeno, e teria como objetivo o aumento da eficácia da resposta terapêutica nos tecidos alvo e a diminuição dos efeitos não desejados do fármaco noutros tecidos (10).

Em 1975, após a descoberta da estrutura dos anticorpos, foi descrita pela primeira vez por George J. F. Kohler e Cesar Milstein, a técnica de produção dos anticorpos monoclonais, conhecida como hibridização celular somática, hibridoma, ou fusão celular (4), que irá ser descrita no capítulo seguinte do presente trabalho. A descoberta desta técnica tornou-se o primeiro grande passo em direção ao desenvolvimento de anticorpos monoclonais terapêuticos (7).

Estes agentes terapêuticos são eficazes através de vários mecanismos de ação: bloqueio de recetores ou fatores de crescimento essenciais à célula, indução da apoptose, ligação aos alvos celulares e posterior recrutamento de funções como a ADCC ou CDC e através da distribuição de partículas citotóxicas, nomeadamente radioisótopos e toxinas (Figura 2) (17), todos os mecanismos irão ser apresentados em detalhe no decorrer do trabalho.



**Figura 2** – Mecanismos de ação dos anticorpos monoclonais (Adaptado de D. Focosi et al., 2011). Nesta figura estão representados alguns mecanismos de acção de mAbs não conjugados (1), nomeadamente a ADCC e a CDC; mAbs imunoconjugados (2), e BsmAbs (bisespecíficos) que podem ser utilizados em RIT. ADCC- citotoxicidade celular dependente de anticorpos; CDC- citotoxicidade dependente de complemento; scFc- fragmentos variáveis de cadeia simples.

### **3. Desenvolvimento e produção de anticorpos monoclonais**

#### **3.1 Produção de hibridomas**

A técnica da hibridização celular (Figura 3) conduz à obtenção de uma linhagem de células B estável secretora de um isótipo específico de Ig, originada através da fusão de linfócitos B e células de mieloma (19).

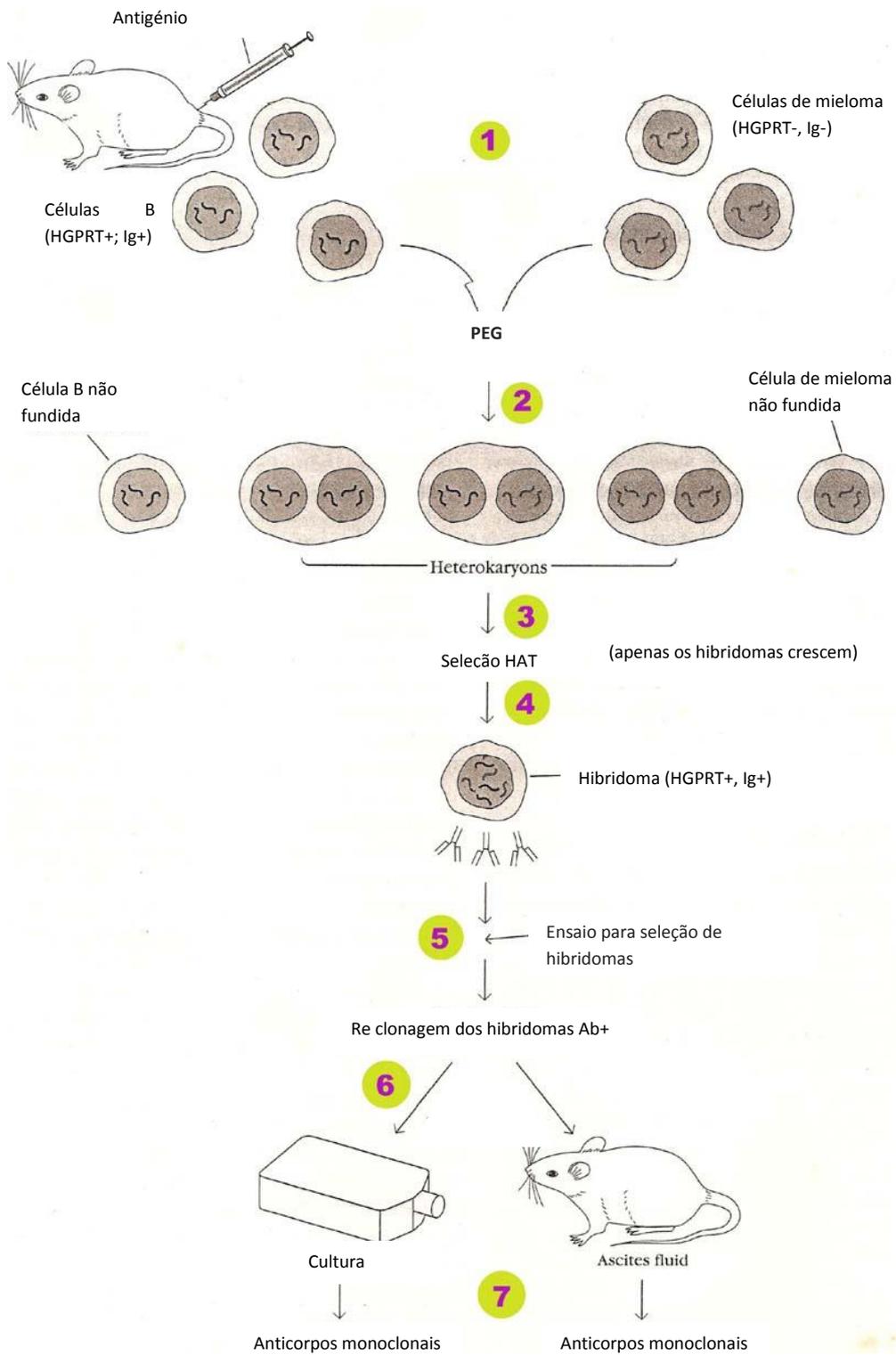
A técnica contempla a imunização de um murgão por um antígeno específico e posterior obtenção de linfócitos B provenientes do baço. Os hibridomas são produzidos pela subsequente fusão entre os linfócitos B e células de mieloma, as últimas previamente selecionadas pela ausência de síntese de imunoglobulinas e da enzima hipoxantina – guanina fosforiltransferase (HGPRT), em suma, não possuem a capacidade de sintetizar purinas pela via exógena (20).

Após a seleção ocorre a fusão dos linfócitos B com as células de mieloma utilizando-se Polietileno Glicol (PEG) (21). Após a fusão permanecem em meio de cultura HAT (Hipoxantina, aminopterina timidina), as três linhagens celulares: hibridomas, células de mieloma e linfócitos B (10). Neste meio as células de mieloma quando expostas a aminopterina não conseguem utilizar a via endógena das purinas e pirimidinas, ficando dependentes da enzima HGPTTR para a sobrevivência. Uma vez que estas células foram previamente selecionadas pela ausência desta enzima, este meio causa a morte das células de mieloma excedentes (que não sofreram fusão com os linfócitos), uma vez que a aminopterina ao inibir a diidrofolato redutase (DHFR), bloqueia a síntese endógena de purinas e pirimidinas (21). Os linfócitos B acabam por sofrer apoptose entre uma a duas semanas após o processo de fusão, em conformidade com a sua semi vida (10).

Desta forma só se verifica o crescimento e multiplicação dos hibridomas que herdam características de ambas as linhagens celulares que lhes deram origem: capacidade de crescimento e síntese de anticorpos, característica proporcionada pelos linfócitos e imortalidade característica das células de mieloma (21).

A etapa seguinte identifica e seleciona os hibridomas que produzem os anticorpos monoclonais com a especificidade procurada, recorrendo-se a técnicas ELISA ou RIA, seguindo-se a clonagem e preservação dos hibridomas selecionados (21).

A utilidade dos anticorpos monoclonais baseia-se principalmente em três características: a especificidade de ligação, a homogeneidade e a capacidade de produção em quantidades ilimitadas. A produção de mAbs permite o isolamento de agentes com a especificidade escolhida, descendentes de uma única célula hibridoma, homogéneos e reagentes contra o mesmo epítopo (22).



**Figura 3** Esquema ilustrativo da hibridização celular (adaptado de <http://biosiva.50webs.org/mab.htm> (23)).

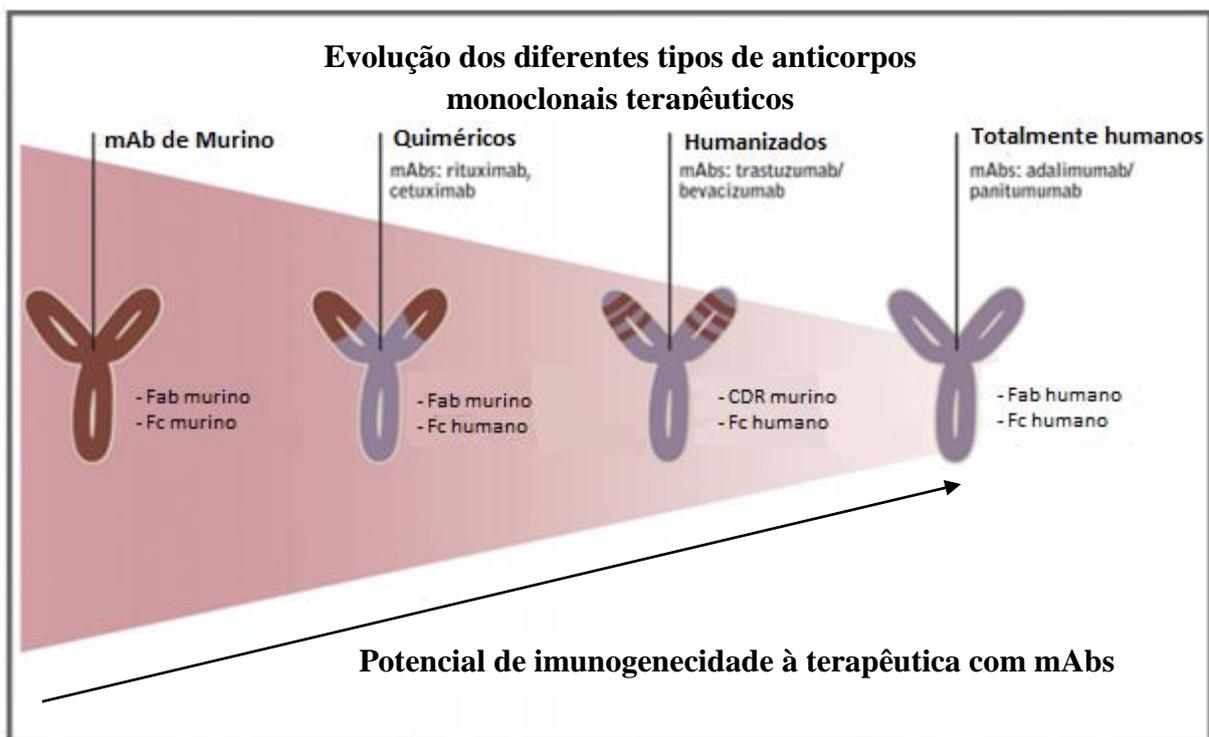
### 3.2 Desenvolvimento de anticorpos monoclonais

O primeiro anticorpo monoclonal aprovado para administração em humanos, em 1986, foi o muromonab. Este anticorpo tinha como alvo o receptor CD3 existente na superfície da membrana dos linfócitos T, e tinha por objetivo a supressão da rejeição de órgão nos doentes alotransplantados (6).

A produção de anticorpos monoclonais alterou-se nos últimos vinte anos paralelamente à evolução da biotecnologia. Como foi descrito anteriormente esta classe farmacológica era obtida, inicialmente, pela imunização de murganhos/ murinos com o antigénio alvo, apresentando, por isso, um elevado carácter imunogénico. As diferenças entre os sistemas imunológicos dos humanos e murinos, culminavam no desenvolvimento de HAMAs (anticorpos humanos anti-murinos/ *human antimouse antibodies*) por parte dos doentes submetidos a este tratamento. O que resultava numa *clearance* rápida, hipersensibilidade, baixa capacidade de penetração nos tecidos-alvo e redução da eficácia por redução da estimulação citotóxica (24).

Com o intuito de limitar estes efeitos indesejáveis a engenharia genética desenvolveu anticorpos monoclonais constituídos com uma maior proporção de componentes humanos relativamente aos exclusivamente murinos: quiméricos, humanizados, e totalmente humanos estes identificam-se pelas diferentes terminologias, exemplos: Momab – murinos; Ximab – quiméricos; Zumab – humanizados; Mumab – humanos. (Figura 3) (24).

O progresso da engenharia genética permitiu a produção de mAbs quiméricos constituídos entre 60 a 90% de sequências de aminoácidos humanas. São constituídos por Fc humanos e Fab provenientes de murinos. Os humanizados que contêm mais de 90% de sequências humanas que são produzidos pela emersão de CDRs murinas na estrutura de imunoglobulina humana. Por fim, os mAbs completamente humanos apresentam a totalidade das sequências de aminoácidos humanas (4).



**Figura 3** – Evolução dos anticorpos monoclonais e relação com o respectivo potencial de imunogenicidade do hospedeiro (adaptado de Catapano e Papadopoulos, 2013) (24).

### 3.3 Técnicas de humanização dos mAbs

#### ➤ Quimerização

A quimerização foi o primeiro processo desenvolvido na tentativa de humanizar os anticorpos monoclonais terapêuticos provenientes de murino (25). A quimerização implica a substituição das regiões constantes das cadeias leves e pesadas da imunoglobulina, por regiões homólogas dos anticorpos humanos (4). Com esta substituição almejava-se uma redução significativa nas reações imunes contra o mAb, mantendo-se a especificidade e afinidade original do anticorpo (25).

Ao longo do tempo foram desenvolvidas abordagens no processo de formação de anticorpos quiméricos; nomeadamente a hiperquimerização e «*Ig resurfacing*». A hiperquimerização é um processo no qual uma sequência de cDNA, correspondente a um Fab da Ig humana, é identificada numa biblioteca genómica, e posteriormente usada como sequência CDR – aceitadora (25). A técnica denominada «*resurfacing*» envolve a substituição de resíduos de aminoácidos específicos de murinos expostos à superfície para homólogos de aminoácidos humanos (25).

Apesar das técnicas de quimerização não eliminarem o risco total de reações imunes, os mAbs quiméricos estão reportados como sendo seguros. Um exemplo é o rituximab (mAb quimérico anti-CD20), que apesar de poder induzir HAMAs estas são de baixa intensidade ou afetam apenas cerca de 5% dos doentes, não apresentando perda de eficácia terapêutica (24).

## ➤ **Humanização**

Os anticorpos humanizados são anticorpos para os quais as CDR provenientes da Ig do murino são colocadas numa estrutura de Imunoglobulina humana. O processo para a produção de mAbs humanizados engloba algumas das técnicas de biologia molecular requeridas para a quimerização, já descritas (25).

Os anticorpos monoclonais humanizados, como o obinutuzumab (anticorpo anti-CD20, aprovado para o tratamento da leucemia linfocítica crónica, LLC) apresentam na sua constituição CDRs provenientes de murino na estrutura de uma Imunoglobulina humana. Assim em comparação com os anticorpos murinos ou quiméricos, as moléculas humanizadas, apresentam uma proporção maior de sequência aminoácidos humana, o que reduz teoricamente a probabilidade de desenvolvimento de HAMAs (11).

*A priori* poder-se-ia pensar que a produção deste tipo de mAbs diminuiria drasticamente o risco de imunogenicidade, evitando as reações mediadas por HAMAs. Contudo, verificou-se que os mAbs quiméricos (já descritos anteriormente), e humanizados podiam despoletar a síntese de anticorpos anti-CDR (anti-idiotipo), e induzir respostas imunogénicas (25,26), o que se verificou em alguns doentes que realizaram esquemas terapêuticos com o alemtuzumab (mAb humanizado anti-CD52) (25). Adicionalmente aos componentes dos mAbs, está reportada a existência de outros fatores envolvidos na sua imunogenicidade, nomeadamente as suas propriedades físico-químicas (e.g. solubilidade e estabilidade), a dose e vias de administração e a combinação com outras substâncias farmacológicas (25).

➤ **MAbs totalmente humanos**

Recentemente, os mAbs totalmente humanos têm sido produzidos com níveis de imunogenicidade reduzidos, quando comparados com os mAbs quiméricos e humanizados (7). Este tipo de mAbs pode ser produzido *in vitro*, como bibliotecas de exposição a fagos ou produzido em plataformas *in vivo* recorrendo a murinos transgênicos (25). Um exemplo deste tipo de mAbs é o ofatumumab, aprovado pela FDA para o tratamento da LLC (4).

A primeira técnica envolve a expressão recombinante de Fabs humanos no bacteriófago e seleção posterior de mAbs baseada nas características de ligação ao antígeno pretendido. A segunda técnica recorre aos murinos transgênicos e envolve a introdução de genes de imunoglobulina humana no seu genoma com intuito de estimular a produção de mAbs humanos, que podem posteriormente ser isolados e clonados a partir das células B dos murinos (24). Estes anticorpos monoclonais estão associados a um risco de imunogenicidade extremamente baixo, e apresentam propriedades muito semelhantes às imunoglobulinas humanas endógenas (7).

#### 4. Nomenclatura dos anticorpos monoclonais terapêuticos

A nomenclatura dos anticorpos monoclonais é regida por um esquema de nomes utilizado pela Denominação Comum Internacional (DCI) da Organização Mundial de Saúde (OMS) (27). Contrariamente à grande maioria dos fármacos, neste caso a nomenclatura serve-se de morfemas para identificar a estrutura e função do mAb (28).

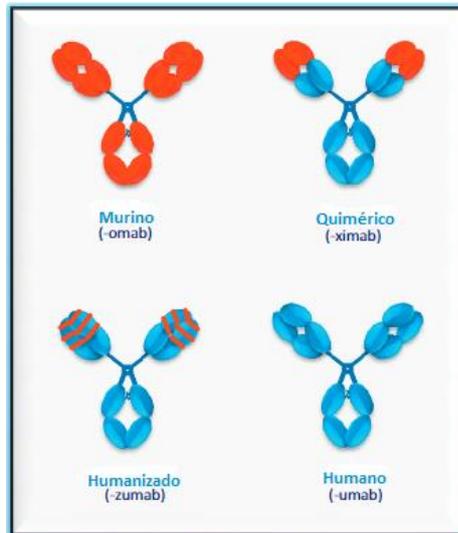
De acordo com a DCI todos os nomes de anticorpos monoclonais apresentam um sufixo, um prefixo e dois morfemas. O sufixo *-mab* é o responsável por identificar a classe destes agentes farmacológicos e é utilizado em todos os produtos constituídos por um domínio variável com capacidade de ligação a um alvo específico (27).

##### **Morfema correspondente à origem do mAb**

O morfema imediatamente antes do sufixo *-mab*, indica a proveniência do anticorpo (Figura 4). Os primeiros anticorpos monoclonais eram obtidos recorrendo-se a linfócitos de ratos nomeadamente o murganho (morfema *-o*, com a adição do sufixo *-omab*), o morfema *-i* é indicativo de proveniência de primatas ou outra não-humana (28).

No caso do mAb ser quimérico o morfema utilizado é *-xi*, como é o caso do rituximab, se o anticorpo for humanizado, o morfema que o identifica é *-zu*. Os mAbs totalmente humanos caracterizam-se pelo morfema *-u*. (28).

O morfema *-xizu* é utilizado em anticorpos que apresentam tanto cadeias quiméricas como humanizadas na sua constituição (27).



**Figura 4** – Nomenclatura dos diferentes tipos de anticorpos monoclonais (adaptado de Buss et al., 2012 (7)). De acordo com a origem dos anticorpos o nome do sufixo atribuído aos anticorpos é diferente, como representado na figura. Assim, “Momab”, é o sufixo atribuído aos anticorpos exclusivamente com origem em murinos; “Ximab, aos anticorpos quiméricos”; “Zumab” – aos anticorpos humanizados e Mumab, aos anticorpos totalmente humanos.

### **Morfema correspondente ao alvo do mAb**

O morfema que antecede a origem do mAb é indicador do seu alvo (tumores, sistemas de órgãos ou agentes infecciosos). Alguns exemplos: *-ci-* para o sistema circulatório; *-li(m)-* para o sistema imunológico, e *-ne(r)-* ou *-neu(r)* para o sistema nervoso. Em 2009 estes morfemas foram alterados, sendo que a maioria consiste, atualmente, numa consoante e numa vogal, que pode ser omitida, como exemplo existem os mAbs que têm como alvo o sistema imunológico que têm a terminação do seu nome *-lumab*, em substituição de *-limumab*, como exemplo desta terminologia existe o golimumab, um anticorpo monoclonal IgG1 humano contra o fator de necrose tumoral (TNF) (28).

O prefixo apresenta apenas a exigência de ser único para cada mAb (27).

Na designação do mAb conjugado utiliza-se uma segunda palavra que identifique a substância. No caso de radioisótopos, o seu nome é escrito antes do anticorpo, e.g. tecnécio ( $^{99m}\text{Tc}$ ) nofetumomab merpentano, no caso de toxinas pode ser utilizado um sufixo *-tox* (27).

## 5. Mecanismos de ação dos anticorpos monoclonais terapêuticos

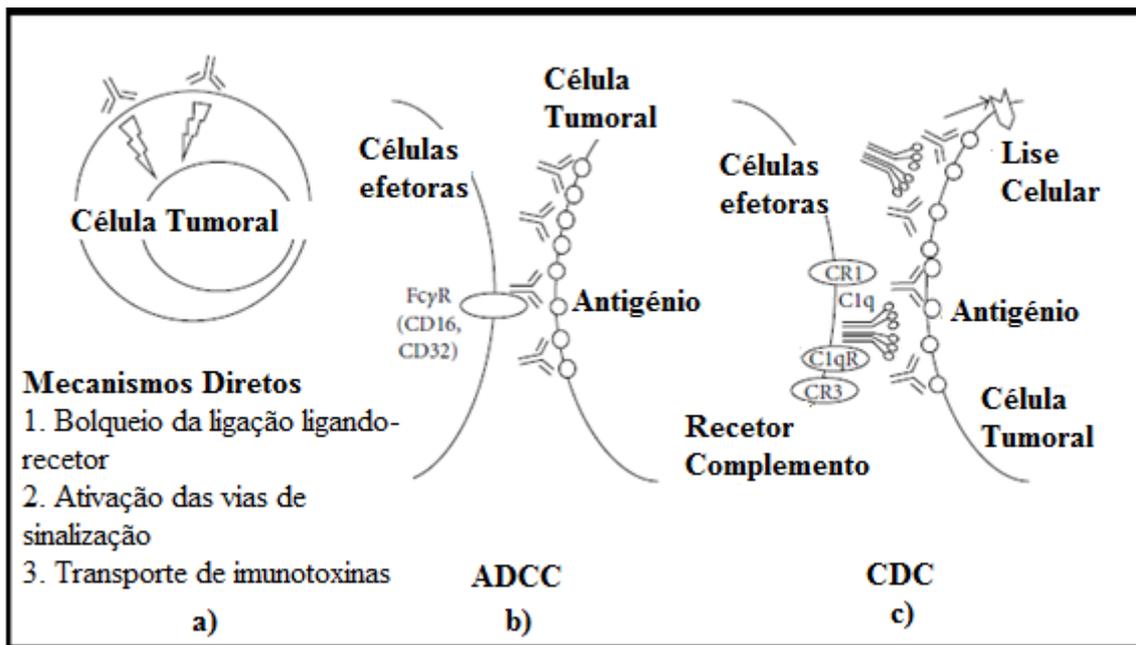
Os anticorpos monoclonais têm a capacidade de destruir as células neoplásicas recorrendo a vários mecanismos de ação (Figuras 2 e 5) (17). Em algumas situações de forma a aumentar a sua eficácia, os mAbs podem ainda ser conjugados com radioisótopos, toxinas, citostáticos ou citocinas (17).

Relativamente aos mecanismos de ação dos mAbs, estes podem ser categorizados em mecanismos diretos ou indiretos. Os mecanismos de ação diretos (Figura 5a) contemplam a estimulação das vias de sinalização da apoptose, bloqueio da função das moléculas ou recetores das vias de sinalização alvo e transporte de citotóxicos à célula tumoral alvo (29).

A indução direta da apoptose pode ser mediada por mAbs, nomeadamente o rituximab. A ligação deste mAb aos antígenos CD20 das células B pode induzir a ativação dos membros da família das SRC cinases, elevação do cálcio intracelular e ativação das fosfolipases  $C\gamma$  (26). O rituximab pode induzir apoptose através da inibição de vias de sinalização anti-apoptóticas nomeadamente a via das MAP cinases ERK1/2 e a via do NF- $\kappa$ B, resultando na quimiossensibilização das células B à quimioterapia (26), adicionalmente consegue induzir apoptose pela inibição das proteínas da família BCL-2/BCL-xL (29).

O bloqueio da sinalização celular pode ocorrer de várias formas: pelo bloqueio da ligação ligando-receptor responsável pela ativação dessa via, com vista à inibição da progressão do ciclo celular, ou bloqueio da reparação do DNA ou da angiogénese. Por outro lado pode diminuir a expressão dos recetores através do aumento da sua internalização celular ou diminuição da sua clivagem proteolítica (29).

Os mecanismos de ação indiretos dos mAbs, contemplam ADCC e a CDC (Figura 5 b) (17).



**Figura 5** – Mecanismos de ação associados aos mAbs terapêuticos (adaptado de Yu-Tzu Tai e Kenneth C. Anderson, 2011 (29). Em **a**) os mAbs podem induzir diretamente apoptose ou bloquear o crescimento celular por ligação ao receptor da superfície celular tumoral. Em **b**), após a ligação do mAb a um alvo específico na célula tumoral, ADCC é despoletada por interações entre o Fc e a célula tumoral e recetores Fc particularmente FcγRII e FcγRIII das células efetoras do sistema imune. As células tumorais são posteriormente fagocitadas por macrófagos, ou sofrem lise celular pelas células NK. Em **c**), no caso do mecanismo CDC, o recrutamento de C1q pelas Ig, conduz à ativação da via clássica do complemento e posterior lise celular.

## 5.1 Citotoxicidade celular dependente de anticorpos

O mecanismo de ADCC (Figura 5) é dependente das células efetoras que expressam, em particular, os recetores Fc $\gamma$ R, (e.g. células NK, monócitos, macrófagos e granulócitos), capazes de reconhecer o Fc dos mAbs ligados às células alvo. Após o reconhecimento a célula efetora liberta perforina, granulinas, e granzimas que induzem a apoptose e lise das células tumorais. As células imunitárias de maior importância no mecanismo de ação dos mAbs são as células NK que expressam Fc $\gamma$ RIIc (CD32c) e Fc $\gamma$ RIIIa (CD16a) (26). Estes recetores reconhecem os Fc das subclasses IgG1 e IgG3 desencadeando assim os seus efeitos citotóxicos *in vivo* (26).

Relativamente às subclasses de imunoglobulinas, sabe-se que a IgG1 tem a capacidade de estabelecer ligação com os três tipos de Fc $\gamma$ R. Esta característica torna-a mais eficaz na indução de ADCC. Adicionalmente, apresenta uma estabilidade molecular intrínseca e conseqüentemente é o isótipo de escolha para a produção da maioria dos anticorpos monoclonais utilizados atualmente em ensaios clínicos (7).

Um anticorpo monoclonal que ilustra este mecanismo de ação é o rituximab, mAb anti-CD20, IgG1, que através da ligação ao recetor FcR $\gamma$ III expresso pelos monócitos e células NK, induz a apoptose dos linfócitos B tumorais CD20 positivos (29).

Existem várias evidências da mediação de ADCC pelo rituximab e relatam a importância deste mecanismo na resposta terapêutica ao mAb. Alguns estudos demonstraram uma associação entre os polimorfismos do CD16a (FcR $\gamma$ IIIa) e a resposta clínica à monoterapia com rituximab (26,31).

Um desses exemplos é a homozigotia do CD16 para a valina na posição 158 (VV) que tem uma maior afinidade para a IgG1 comparativamente com o genótipo com fenilalanina na mesma posição (VF) ou (FF). Os doentes com linfoma folicular tratados com rituximab, que apresentaram homozigotia para a valina obtiveram melhor resposta clínica que os restantes (31). Outro exemplo é a homozigotia para a histidina na posição 131 (HH) do FcR $\gamma$ IIa que também confere uma melhor resposta ao tratamento (31).

## 5.2 Citotoxicidade dependente de complemento

A CDC (Figura 5c) é também um importante mecanismo de ação dos mAbs, na destruição das células tumorais (6). O início da via clássica do complemento é despoletado por complexos antígeno-anticorpo. A molécula crucial na ativação desta via é a C1q, que se liga ao Fc da Ig interveniente. Posteriormente ocorre uma cascata de acontecimentos que culminam na formação do complexo de ataque à membrana (26).

A C1q constitui juntamente com as serina proteases C1r e C1s, o complexo C1. A ligação cruzada do C1q com IgM ou duas IgGs ativa o C1r que por sua vez ativa a pró-enzima C1s responsável pela clivagem do C4. O C4 dá seguimento às etapas da via clássica com vista à lise da célula tumoral alvo (25).

O rituximab consegue induzir este mecanismo de ação. Vários estudos *in vitro* provaram a sua elevada eficácia como mediador CDC. A expressão das moléculas inibitórias do complemento (CD55 e CD59) pelas células B malignas está associada à extensão da lise celular (31). Relativamente aos estudos *in vitro*, sendo que estes utilizam soro como fonte de complemento, um estudo avaliou na importância da atividade anti-tumoral deste mecanismo de ação nos gânglios linfáticos e outras localizações extravasculares. Este estudo utilizou um líquido de um transudato pleural ou líquido ascítico como fonte de complemento extra vascular, e mostrou que, apesar do transudato apresentar concentrações mais baixas de componentes do complemento, estas eram suficientes para mediar a CDC. Estes resultados sugeriram que o rituximab apresenta atividade anti-tumoral através de CDC tanto a nível intra como extravascular (31).

Clinicamente foi demonstrado que o rituximab não induz CDC em todos os doentes, e que este mecanismo de ação está relacionado com a toxicidade de infusão (31).

### 5.3 Imunoconjugados

Como referido anteriormente, no caso de transporte de citotóxicos, os mAbs podem estar acoplados a imunotoxinas, como agentes antitubulina, antraciclina (doxorubicina), radioisótopos ou outros fármacos quimioterápicos que penetram seletivamente nas células tumorais alvo (29).

#### ➤ **Radioisótopos Imunoconjugados**

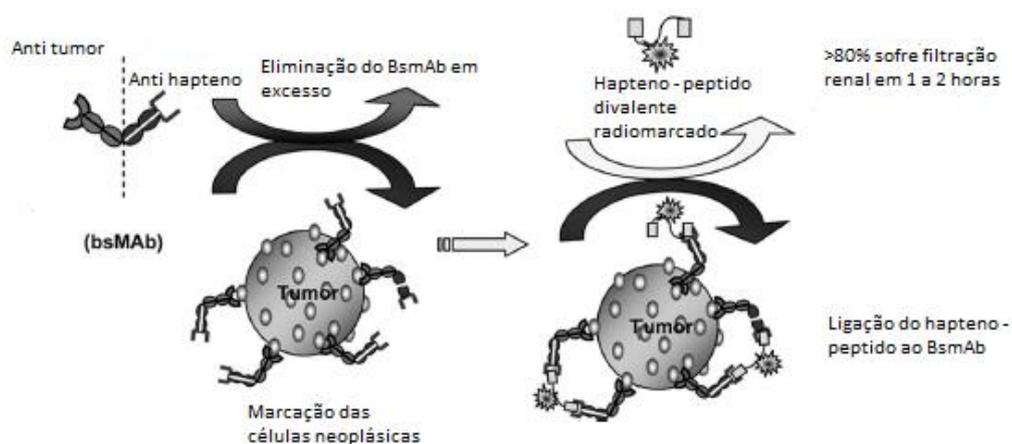
Uma das abordagens, para o aumento da resposta terapêutica dos mAbs, é a utilização de substâncias citotóxicas acopladas, nomeadamente a radioisótopos (partículas emissoras de radiação  $\alpha$ - or  $\beta$ -). Esta estratégia é empregue com o intuito de conduzir os radioisótopos ao tecido alvo através de um transportador. Após a ligação dos mAbs aos antígenos expressos pelos tecidos neoplásicos, as células dentro das regiões anatómicas ao alcance das respectivas radiações serão destruídas (32).

A radioimunoterapia (RIT) é administrada por via intravenosa, permitindo uma distribuição da radioatividade pelo organismo, atingindo neoplasias com localizações diferentes. A captação tumoral de um mAb tipo IgG, radiomarcado ocorre de forma gradual, apresentando o pico de absorção cerca de um a dois dias após a sua administração. O pico de absorção corresponde geralmente a menos de 0.01% da dose total administrada, por grama de tecido neoplásico, contudo esta radioatividade é notória mesmo depois de várias semanas após a sua administração (17).

As células irradiadas absorvem altas doses de energia na forma de fótons ou partículas carregadas, que promovem lesão molecular e a formação de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio. Todo este processo culmina na lesão do DNA e apoptose celular (32).

Existem dois métodos de administração de mAbs radiomarcados, o método direto, no qual o mAb já está acoplado à molécula e o método de conjugação *in vivo* dos mAbs que são administrados previamente à molécula (32). Neste último método de RIT são utilizados anticorpos monoclonais bispecíficos BsmAbs, constituídos por fragmentos de dois anticorpos monoclonais diferentes que conseqüentemente conseguem estabelecer ligação com dois tipos diferentes de antígenos. Nesta terapêutica os BsmAbs possuem um braço que se liga à célula neoplásica e o outro ao hapteno que é tipicamente incorporado num peptídeo que por sua vez pode ser rádio marcado (17).

O BsmAb é administrado primeiramente, de forma a reconhecer e estabelecer ligação com os antígenos das células tumorais. Apenas após excreção do sobrenadante é feita a administração do péptido marcado. Este migra da circulação e estabelece ligação com o braço livre do BsmAb (Figura 6) (17).



**Figura 6** – Esquema de biodistribuição de um BsmAb (adaptado de Sharkey et al., 2006 (17)).

Relativamente à escolha dos radioisótopos, esta assenta sobre as características tumorais sendo o tamanho o principal condicionante. As partículas emissoras de radiação  $\beta$  como o  $^{131}\text{I}$  atravessam 1.0 mm de tecido, por sua vez o  $^{90}\text{Y}$  pode penetrar até 11 mm, destruindo assim centenas de células, efeito conhecido como *bystander* ou *crossfire*. Este é um atributo importante nos radioconjugados comparativamente com outros imunoconjugados uma vez que conseguem apresentar eficácia terapêutica mesmo em casos de expressão heterogénea de antígenos de superfície, contudo este efeito é sinónimo de irradiação e destruição de células normais (32).

As partículas emissoras de radiação  $\alpha$  como o  $^{213}\text{Bi}$  e  $^{211}\text{At}$ , apesar de serem energeticamente mais eficientes na destruição celular que as emissoras de radiação  $\beta$ , não conseguem atingir o mesmo número de células (17).

A RIT já provou eficácia no tratamento de neoplasias hemato-oncológicas. A experiência clínica de maior duração está relacionada com a terapêutica de mAbs conjugados a radioisótopos emissores de radiação  $\beta$  ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ), que apresentam vantagens como a disponibilidade e ligação estável ao anticorpo. A capacidade de penetração nos tecidos traz vantagens nomeadamente o efeito *crossfire* nas células tumorais próximas que não expressem o marcador de superfície, contudo esta característica pode potenciar toxicidade nos tecidos normais circundantes (33).

Em hemato-oncologia, existem como exemplo de mAb radioconjugados: o  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab tiuxetano e o  $^{131}\text{I}$ -Tositumumab. Ambos são mAbs murinos anti-CD20 aprovados para o tratamento de doentes com LNH folicular de células B CD20 em recidiva ou refratário ao rituximab (48).

Contudo não é indicado para doentes com um envolvimento da medula óssea superior a 25%, uma vez que está associado a uma toxicidade hematológica severa nestes doentes (32).

Os radioisótopos emissores de radiação  $\alpha$ , podem constituir uma melhor opção para o tratamento de doentes com neoplasias hematológicas. Em investigações anteriores a utilização de  $^{213}\text{Bi}$  anti-CD33 IgG em RIT foi colocada em prática no tratamento de doentes com leucemia mielóide aguda (LMA), contudo a semi vida curta deste composto apresenta um problema à sua conjugação. Para contornar esta situação dever-se-á pensar na utilização de radioisótopos com semi vida mais longa ( $^{211}\text{At}$  ou  $^{225}\text{Ac}$ ) (32).

#### ➤ **Fármacos imunoconjugados**

Os mAbs conjugados com fármacos citotóxicos apresentam a especificidade do anticorpo e a eficácia do fármaco. Estes mAbs conjugados são internalizados, após a ligação ao antigénio tumoral, via endocitose mediada por recetores (RME) e a substância é posteriormente libertada no interior da célula neoplásica (34).

À semelhança dos radioconjugados, o sucesso clínico dos mAbs conjugados a fármacos foi alcançado primeiramente na área da hemato-oncologia, com a aprovação do gemtuzumab ozogamicina, um anticorpo monoclonal anti-CD33 para o tratamento de doentes com leucemia mielóide aguda (LMA), em primeira recaída e que não eram candidatos a uma quimioterapia agressiva (35).

Neste tipo de terapêutica as substâncias citotóxicas necessitam de ser internalizadas de forma a serem eficazes, assim conclui-se que um alvo internalizado ativamente teria mais interesse comparativamente a um alvo relativamente abundante, que não fosse internalizado tão ativamente (17).

Um exemplo seria o antígeno CD74 altamente expresso em neoplasias de células B e expresso em baixa concentração em tecido normal. Apresenta uma rápida internalização e auto reciclagem tendo sido descrito como um transportador altamente eficiente para fármacos, toxinas e rádio isótopos (17).

### ➤ **Toxinas Imunoconjugadas**

As imunotoxinas consistem numa ligação covalente entre um mAb, ou outra substância específica como IL2 (proteínas de fusão), e uma toxina. Imunotoxinas foram produzidas inicialmente recorrendo a toxinas que inativam os ribossomas, interferindo assim com a leitura do mRNA, e interrompendo a síntese proteica (36).

Com a exceção da aprovação do *Ontak*, um agente antineoplásico, que combina a toxina diftérica com IL2, para o tratamento de linfoma cutâneo de células T, mais nenhuma imunotoxina foi aprovada em hematologia (17).

## **6. Terapêuticas dirigidas em hemato-oncologia**

O tratamento das neoplasias hematológicas tem sido ao longo do tempo um exemplo pioneiro para a terapêutica das patologias neoplásicas na generalidade, o que se verifica também no âmbito das terapêuticas dirigidas (37).

Em 1997, o rituximab, um mAb anti-CD20, tornou-se o primeiro mAb aprovado para o tratamento de Linfomas Não-Hodgkin de células B. Com o decorrer do tempo os mAbs, mostraram ser essenciais nos regimes de tratamento atuais da maioria das neoplasias hematológicas (33).

## **6.1 Anticorpos monoclonais aprovados em Hematologia - Passado e Presente**

### **6.1.1 Rituximab**

#### **Considerações Gerais**

A aprovação do rituximab, inicialmente pela Food and Drug Administration (FDA) em 1997, e no ano seguinte pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) (8), iniciou uma nova era designada «*Era Rituximab*» e desde essa altura vários anticorpos contra o mesmo alvo (antigénio CD20) foram introduzidos na prática clínica (4).

O antigénio CD20 é um marcador de superfície das células B maduras sendo também expresso em cerca de 95% das células B dos linfomas. É ainda expresso em níveis inferiores pelas células B da leucemia linfocítica crónica (LLC) e pelos plasmócitos. Em conjunto com a sua especificidade, as razões pelas quais este é um marcador apelativo para imunoterapia são múltiplas, nomeadamente o facto de não ser expresso pelas células B progenitoras permitindo assim a sua regeneração normal, de não ser uma molécula circulante no plasma, não ser secretado/ internalizado pelas células B após a marcação pelo anticorpo e de conseguir mediar vários mecanismos de destruição celular nomeadamente CDC, ADCC, apoptose e alteração do influxo celular de cálcio (38).

O Rituximab é um anticorpo monoclonal quimérico IgG1, o primeiro mAb anti-CD20 aprovado, caracterizado por induzir a morte celular através de vários mecanismos. Após duas décadas de utilização o rituximab tem uma posição firme no tratamento de Linfoma Folicular, tanto como primeira linha como em recidivas. A sua administração conjunta com os agentes quimioterápicos melhorou as respostas terapêuticas destes doentes (30).

Como já foi descrito anteriormente, o rituximab caracteriza-se por apresentar

mecanismos de ação diretos e indiretos. Os mecanismos indiretos que contemplam a ADCC, com o recrutamento de células efetoras e a CDC que termina com a formação de complexos de ataque à membrana induzindo a lise celular (26).

Alguns polimorfismos na proteína FcγRIIIa alteram a ativação das células efetoras causando uma menor eficácia da ACDD e assim taxas inferiores de resposta de monoterapia com o rituximab (26,31).

### **Aplicações terapêuticas em Hemato-oncologia**

De acordo com a EMA, o rituximab apresenta as seguintes indicações terapêuticas em hemato-oncologia: tratamento de Linfoma não-Hodgkin folicular estágio III-IV, não tratado previamente, em associação com o regime de quimioterapia; tratamento de manutenção em doentes com linfoma folicular que responderam à terapêutica de indução; tratamento de linfoma folicular no estágio III-IV, resistente à quimioterapia, ou em segunda ou subsequente recidiva após quimioterapia. Encontra-se também indicado para o tratamento de doentes com linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B, positivo para CD20, em associação com o protocolo de quimioterapia CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, prednisolona); também em associação com quimioterapia, é indicado no tratamento de doentes com leucemia linfocítica crónica (LLC) não tratada previamente e recidivante/ refractária (8).

## **Linfoma Difuso de Grandes células B (LDGCB)**

O Linfoma Difuso de Grandes Células B é a neoplasia de linfócitos mais frequente, representando entre 30-40% de todos os diagnósticos de LNH (39). O protocolo terapêutico combinado de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisolona (CHOP), foi o regime *standard*, desde a década de 70 com uma sobrevivência global aos cinco anos estimada em 30-35%. Este tratamento está associado frequentemente a neutropenia febril uma causa importante da falência deste regime em doentes com LDGCB (41).

Os estudos iniciais sobre a adição do rituximab ao regime CHOP (R-CHOP), mostraram melhorias significativas no prognóstico de doentes com LDGCB. Em doentes com LDGCB resistente/ recidivante a sobrevivência global aos 5 anos foi estimada em 58%, comparativamente o regime CHOP associava-se a uma sobrevivência de 45% (40).

O protocolo R-CHOP (a cada 14 ou 21 dias) tornou-se o tratamento *standard* em casos de LDGCB, contudo cerca de 30% dos doentes não obterão resposta terapêutica ou poderão apresentar formas resistentes da doença (40) .

As respostas dos doentes com LDGCB ao regime de protocolo R-CHOP podem-se considerar heterogêneas. Considerando os doentes que não apresentam nenhuma resposta significativa ao tratamento, aproximadamente 30%, a investigação pode incidir sobre os mecanismos através dos quais as células neoplásicas ganham resistência ao rituximab (39).

Com o objetivo de conhecer e identificar a importância dos biomarcadores da via de sinalização celular PTEN/PI3K/ AKT na resistência dos doentes com LDGCB ao tratamento com rituximab foi realizado um estudo com 48 doentes. Os resultados mostraram o que já tinha sido referido noutros estudos: que a perda do PTEN, mutação no PI3K, e ativação da p-AKT estão relacionadas com a progressão do LDGCB e que poderão ter um papel no desenvolvimento de resistências ao rituximab. A alteração que se manifestou de forma mais significativa no grupo de doentes com resistência ao tratamento foi a deleção do PTEN (50% dos doentes neste grupo apresentavam a alteração, comparativamente com o grupo sensível 17.9%) (39).

Relativamente à eficácia e segurança do esquema R-CHOP nestes doentes, vários estudos mostraram este esquema está associado a uma melhor segurança e efetividade com uma menor taxa de recaídas e mortalidade no período de seguimento. Aos dez anos a sobrevida livre de doença e a sobrevida global de doentes tratados com R-CHOP era 36.5% e 43.5% respetivamente, comparativamente com 20% e 27.6% de doentes tratados com CHOP (40).

## **Linfoma Folicular**

O linfoma folicular é o segundo tipo de linfoma mais frequente, cuja incidência tem vindo a aumentar principalmente nos países ocidentais. Ao diagnóstico, aproximadamente 80% dos doentes apresentam-se com um estágio avançado da doença (30).

De acordo com a EMA, o rituximab está indicado no tratamento do linfoma folicular em associação em terapêutica de manutenção, no caso de LF não tratado previamente, ou recidivante/refratário e em monoterapia, como terapêutica de indução em doentes adultos com linfoma folicular de grau III-IV que sejam quimioresistentes ou que estejam na sua segunda ou subsequente recidiva após quimioterapia, e como re-tratamento em doentes que responderam a tratamento prévio com rituximab em monoterapia para linfoma folicular recidivante/refratário (8).

Relativamente aos doentes sintomáticos com elevada carga tumoral que requerem tratamento, protocolos de quimioterapia com clorambucil ou ciclofosfamida, CVP (ciclofosfamida, vincristina, prednisolona) ou CHOP são os selecionados mais frequentemente. A combinação de rituximab com estes regimes aumenta significativamente a sobrevivência dos doentes e diminui a progressão histológica do tumor. Remissões completas podem-se obter em 85% dos doentes tratados com R-CHOP e a média das durações das remissões podem exceder os 6 ou 7 anos (41).

A efetividade do rituximab em doentes com baixa carga tumoral em estádios avançados da doença foi avaliada num estudo, em que 187 doentes foram acompanhados com atitude expectante (*watchful waiting/ WW*) e 182 foram tratados com rituximab em esquema de indução com uma administração semanal durante 4 semanas seguido de esquema de manutenção a cada dois meses durante dois anos. Os resultados mostraram que 56% dos doentes do primeiro grupo (WW) necessitaram de tratamento (quimioterapia) contrariamente a 17% dos doentes do grupo que realizou tratamento de manutenção com rituximab (42).

Relativamente à sobrevivência aos 3 anos não se verificaram diferenças significativas 94% para o grupo WW e 97% para o grupo tratado com rituximab, também não se verificaram diferenças significativas nas taxas de transformação histológica entre os dois grupos (42).

Estudos com o objetivo de compararem a efetividade dos protocolos de quimioterapia e protocolos com rituximab em combinação com quimioterapia (R-QT) em tratamentos de indução são realizados com alguma frequência sendo os mais comumente avaliados os seguintes protocolos: R-CHOP, R-CVP e B-R (bendamustina e rituximab). Um ensaio clínico de fase III mostrou que os protocolos com rituximab apresentaram resultados superiores em vários parâmetros nomeadamente na resposta completa, sobrevivência livre de doença, e principalmente na sobrevivência global: 95% de sobrevivência aos 3 anos para R-CHOP comparativamente 86% para CHOP e 83% de sobrevivência aos 4 anos para R-CVP comparativamente a 77% CVP (30).

### **Leucemia Linfocítica crónica**

De acordo com a EMA, o rituximab está indicado em associação com quimioterapia, no tratamento de doentes com leucemia linfocítica crónica não tratada previamente e recidivante/refractária. (8).

A leucemia linfocítica crónica, o tipo mais comum de leucemia nos países ocidentais, é uma neoplasia linfoproliferativa, caracterizada pela acumulação de pequenos linfócitos B neoplásicos (43), muitas vezes diagnosticada acidentalmente após avaliação de exames complementares de rotina (41). A idade média de diagnóstico é 72 anos sendo que mais de 40% dos doentes se apresentam com mais de 75 anos ao diagnóstico (44).

O tratamento *standard* destes doentes é QT em combinação com rituximab. O grupo de estudos GCLLSG (German CLL Study Group) concluiu que os doentes que realizaram um regime terapêutico de rituximab com fludarabina e ciclofosfamida (R-FC) apresentaram uma resposta global (ORR) e uma resposta completa (CR), uma sobrevivência livre de doença e uma sobrevivência global significativamente superiores comparativamente aos tratados com FC (44).

Num estudo de fase II foi avaliada a segurança e efetividade da combinação rituximab e clorambucil, em 100 doentes com LLC, uma mediana de idades de 70 anos e com uma média de 7 comorbilidades, requerendo assim um tratamento diferente do convencional. Relativamente à segurança, as toxicidades hematológicas, neutropenia e linfopenia de grau 3/4, representaram a maioria dos eventos adversos de grau 3/4 relatados, com neutropenias e linfopenias ambas ocorrendo em 41% dos doentes seguidos de leucopenia em 23%, anemia em 19% e trombocitopenia em 18%. Os efeitos secundários mais frequentes foram as náuseas em cerca de 52% dos doentes (44).

O tratamento com rituximab e clorambucil (R-Clb) permite atingir uma ORR de 84% e uma resposta completa de 10%. Foram observadas respostas ao tratamento em todos os grupos citogenéticos estudados. Estes resultados, após comparação com estudos anteriores onde foi avaliada a eficácia do clorambucil em monoterapia, concluíram que a adição do rituximab pode melhorar a eficácia do tratamento sem outros efeitos secundários adicionais (44).

### **6.1.2 Ofatumumab**

O ofatumumab é um anticorpo monoclonal totalmente humano do tipo IgG1 k, cujo alvo é o antígeno CD20. Este anticorpo liga-se a um epítipo diferente do rituximab e apresenta a capacidade de induzir a lise celular em células com uma elevada ou fraca expressão de CD20 assim como em células resistentes ao rituximab (4).

O ofatumumab induz a destruição dos linfócitos B neoplásicos através dos mecanismos CDC e ADCC. Comparativamente com o rituximab, a eficácia da indução de ADCC é semelhante, mas relativamente à CDC, o ofatumumab parece mais eficaz. Aparentemente possui uma citotoxicidade superior ao rituximab (45).

De acordo com a EMA o ofatumumab está indicado para tratamento de leucemia linfocítica crónica (LLC) em associação com clorambucil ou bendamustina em doentes que não tenham recebido terapêutica prévia e que não sejam elegíveis para terapêutica com base em fludarabina (46). Este mAb tem ainda indicação para o tratamento de doentes com LLC refractária à fluradabina e alemtuzumab (45).

Para avaliar a efetividade do ofatumomab como terapêutica de primeira linha em doentes com LLC sem indicação para fludarabina, foram realizados vários estudos que avaliaram a administração de ofatumumab em monoterapia. Num estudo que envolveu 77 doentes o ofatumumab foi administrado em esquema de indução, semanalmente, ao longo de 8 semanas (45).

Foi ainda realizada uma terapêutica de manutenção com ofatumumab a cada dois meses durante dois anos a todos os doentes que obtiveram resposta à terapêutica de indução e não mostraram sinais de progressão da doença. A ORR foi de 55% e 36% e as taxas de resposta completas (CR) foram de 5% e 4% respetivamente para os coortes 1 e 2 (45).

A baixa taxa de respostas completas em monoterapia impulsionou estudos de combinação do ofatumumab com outros agentes citotóxicos. Sendo que muitos doentes com LLC não apresentam indicação para fazer terapêutica com fludarabina, devido à sua idade e/ou comorbilidades, a associação de ofatumumab com clorambucil (O-Clb) foi comparada com clorambucil em monoterapia num estudo de fase III que envolveu 447 doentes, não tratados previamente. Os doentes foram aleatoriamente selecionados para cada um dos regimes. A ORR e a taxa de respostas completas foram respetivamente de 82% e 12% para o grupo tratado com O-Clb e de 69% e 1% para o grupo tratado com Clb. A média de sobrevivência livre de doença foi de 22.4 e 13.1 meses, respetivamente (47).

### 6.1.3 Ibritumomab tiuxetano

O ibritumomab tiuxetano é um anticorpo monoclonal murino IgG-1 k anti CD20, marcado radioativamente com ítrio-90, átomo emissor de radiação  $\beta$  na presença do quelante tiuxetano (Mx-DTPA). Este mAb liga-se ao antígeno CD20 expresso na membrana dos linfócitos B malignos e normais e a radiação emitida pelo radioisotopo destrói as células neoplásicas (4).

O ibritumomab é um anticorpo monoclonal ligado de forma covalente ao tiuxetano que funciona como estabilizador do complexo anticorpo-radionuclídeo. Como o Y-90 forma um complexo estável com ibritumomab tiuxetano, a biodistribuição da marcação radioativa acompanha a biodistribuição do anticorpo. A radiação por parte das partículas beta emitidas ocorre num raio de 5 mm em torno do isótopo (48).

Com conhecimento sobre a rádio sensibilidade das células linfóides a RIT tornou-se uma abordagem apelativa, emergindo assim como opção após uma resposta terapêutica prévia a um mAb, combinando uma seletividade da imunoterapia anti-CD20 e do radioisótopo conjugado (49).

De acordo com a EMA, o ibritumomab tiuxetano está indicado na terapêutica de consolidação após indução da remissão em doentes com linfoma folicular não tratados previamente e no tratamento de doentes adultos com LNH folicular de células B CD20 em recidiva ou refratário ao rituximab (48).

A RIT com ibritumomab foi testada primeiramente em casos de recidiva do linfoma folicular. Ao provar a sua segurança procedeu-se à avaliação em tratamentos de primeira linha desta neoplasia (50).

Num estudo multicêntrico de fase II, avaliou-se o ibritumomab tiuxetano como tratamento de primeira linha em monoterapia, em doentes com linfoma folicular. No estudo foram incluídos 59 doentes, em diferentes estádios da doença. Os resultados referentes à segurança e toxicidade mostraram que a terapêutica foi bem tolerada. A resposta global aos seis meses foi de 87%, com 41% dos doentes a atingirem CR, e 31% uma resposta parcial. A média de sobrevivência livre de doença foi de 25.9 meses. Comparativamente aos resultados obtidos por outros estudos referentes aos esquemas de tratamento R-CVP a taxa de respostas completas foi superior, contudo isso não se verificou na sobrevivência livre de doença, o ibritumumab apresentou um resultado inferior aos 32 meses reportados com este regime terapêutico (51).

Neste estudo o tratamento foi bem tolerado. Citopénias de grau 3 ou 4, de acordo com Critérios comuns de toxicidade (CTC), manifestaram-se em alguns doentes, sendo a mais comum a trombocitopenia que ocorreu em 48% dos casos. As toxicidades não hematológicas observadas não ultrapassaram o grau 2 de CTC (51).

A associação entre o Ibritumumab e risco aumentado de neoplasias secundárias, nomeadamente a LMA e síndrome mielodisplásica (SMD) é bem conhecido, um estudo que avaliou a eficácia e segurança da consolidação com este mAb, em 204 doentes com linfoma folicular com estágio avançado que haviam respondido à terapêutica de primeira linha. Os resultados mostraram que 12,7% dos doentes no braço do Ibritumumab radiomarcado com ítrio-90, desenvolveram uma neoplasia secundária em comparação aos 6.8% dos doentes no braço de controlo (48).

#### **6.1.4 Obinutuzumab**

O Obinutuzumab, também conhecido por GAG 101, é um anticorpo monoclonal humanizado anti-CD20 cujo mecanismo de ação principal é direto através da indução da via extrínseca da apoptose (estimulação das proteínas da família Bcl-2), ou através da estimulação da via íntinseca (4). Consegue induzir os mecanismos de ADCC e CDC, em estudos pré-clínicos verificou-se que o obinutuzumab possuía uma eficácia superior ao rituximab como estimulador da ADCC, o que não se verificou relativamente à CDC (45).

É um derivado de IgG1 de murino Bly-1, que foi submetido a glicosilação da região Fc com o objetivo de aumentar a afinidade ao receptor Fc $\gamma$ RIIIa na ativação das células efectoras, e assim aumentar a sua atividade ADCC (52).

O obinutuzumab tem a capacidade de ativar os neutrófilos e mediar a fagocitose através do CD16b dos neutrófilos de forma mais potente que o rituximab, em comparação com o mAb idêntico que não sofreu glicosilação, este apresenta uma indução de fagocitose mais eficaz (52).

Este anticorpo monoclonal em associação com clorambucil está indicado no tratamento de doentes adultos com leucemia linfocítica crónica (LLC), não tratados previamente e com comorbilidades que tornem inadequado o tratamento baseado em fludarabina (53).

O GCLLSG realizou um estudo multicêntrico de fase III para avaliar e comparar a eficácia e segurança da combinação terapêutica obinutuzumab/ Clb com a combinação rituximab/Clb e Cbl em monoterapia em 781 doentes com LLC não tratados previamente, com uma mediana de idades de 73 anos e comorbilidades (43).

Este estudo incluiu duas etapas. Na primeira foram comparadas as associações rituximab/ obinutuzumab com C1b e C1b em monoterapia de forma a determinar se a administração dos mAbs anti-CD20 era eficaz nesta população idosa e com comorbilidades. A segunda etapa comparou ambas as terapêuticas combinadas. Os resultados do estudo mostraram vantagens na adição do mAb anti-CD20 ao C1b (rituximab ou obinutuzumab), com maior número de remissões completas e aumento da sobrevivência sem doença (26.7 meses vs 11.1 meses) (43).

Na segunda etapa do estudo concluiu-se que a combinação obinutuzumab e C1b obteve uma resposta e uma sobrevivência livre de doença superior à combinação rituximab e C1b (20.7% vs 7%) (43).

Os efeitos secundários observados mais frequentemente ( $\geq 1/10$ ) com a associação obinutuzumab/ C1b são os efeitos hematológicos, nomeadamente neutropenia, trombocitopenia, anemia e febre (53).

## 6.1.5 Gemtuzumab ozogomicina

O antígeno CD33 é expresso em mieloblastos das leucemias mielóides agudas, numa proporção entre 85% a 95%, podendo ainda ser expresso em leucemias linfoblásticas agudas (LLA). Aparentemente a expressão do antígeno CD33 encontra-se restrita a células hematopoiéticas estando ausentes nas células progenitoras hematopoiéticas, mas presente nas células estaminais dos precursores mielóides, fazendo dele um alvo ideal para a terapêutica dirigida (54).

O gemtuzumab ozogamicina (GO) é um anticorpo monoclonal humanizado IgG4, dirigido contra o antígeno CD33, presente nas células leucémicas de cerca de 80% dos doentes com LMA. Este mAb é ligado através de uma ligação covalente a um derivado de caliqueamicina, substância citotóxica, que após internalização é libertado pelos lisossomas das células mielóides e induz a quebra das cadeias duplas de DNA (4).

O regime terapêutico mais comum na LMA consiste em quimioterapia com citarabina e uma antraciclina (e.g. daunorubicina, idarubicina, mitoxantrona). O gemtuzumab ozogamicina foi aprovado inicialmente para episódios de recidiva de LMA em doentes com idades mais avançadas, contudo foi retirado do mercado voluntariamente, em 2010, por não ter obtido as respostas terapêuticas almejadas pelo laboratório (55). Alguns efeitos adversos graves estavam associados ao GO nomeadamente: toxicidade de infusão, mielossupressão e doença veno-oclusiva (41).

Após a sua retirada do mercado, têm sido realizados vários estudos com GO. Os resultados mais promissores revelaram-se num estudo realizado pela Associação francesa de leucemia aguda (ALFA). Este estudo avaliou a combinação daunorubicina/ citarabina com ou sem GO como esquema de indução em 280 doentes com idades compreendidas entre os 50-70 anos (35).

O GO foi administrado em doses baixas, com o objetivos de reduzir a sua toxicidade. Os resultados mostraram que o GO apesar de não mostrar diferenças significativas na taxa de respostas completas, melhorou significativamente a sobrevivência global (mediana de 34 meses vs 19.2 meses) (55) e a sobrevivência livre de doença, o que foi observado particularmente no subgrupo de doentes com citogenética favorável/ intermédia (35,55).

A eficácia do GO é conhecida em doentes com o subtipo de leucemia promielocítica aguda (LPA), o que pode estar associado a duas características das células da LPA, nomeadamente a sua expressão homogénea e abundante do antígeno CD33, e a ausência ou presença de níveis reduzidos de glicoproteína p (gpP), que funciona como bomba de efluxo diminuindo a biodisponibilidade da substância ativa (55).

Adicionalmente a estes conhecimentos, sabe-se que GO administrado em monoterapia resulta em remissões moleculares em doentes com recaída/ recidiva de LPA (35).

A informação relativa à eficácia do GO em doentes com LPA e diagnosticados *de novo* com citogenética favorável, não era do conhecimento dos clínicos na altura da sua retirada do mercado (36) é importante reconhecer a eficácia específica deste mAb em subgrupos de doentes com LMA, assim é esperado que o gemtuzumab seja novamente aprovado no tratamento destes doentes (55).

### **6.1.6 Alemtuzumab**

O antígeno CD52 é significativamente expresso por linfócitos B e T normais e neoplásicos, sendo também expresso em menor grau pelos monócitos, macrófagos, eosinófilos, células NK, neutrófilos e células tronco hematopoiéticas, apesar das suas funções exatas permanecerem desconhecidas (56).

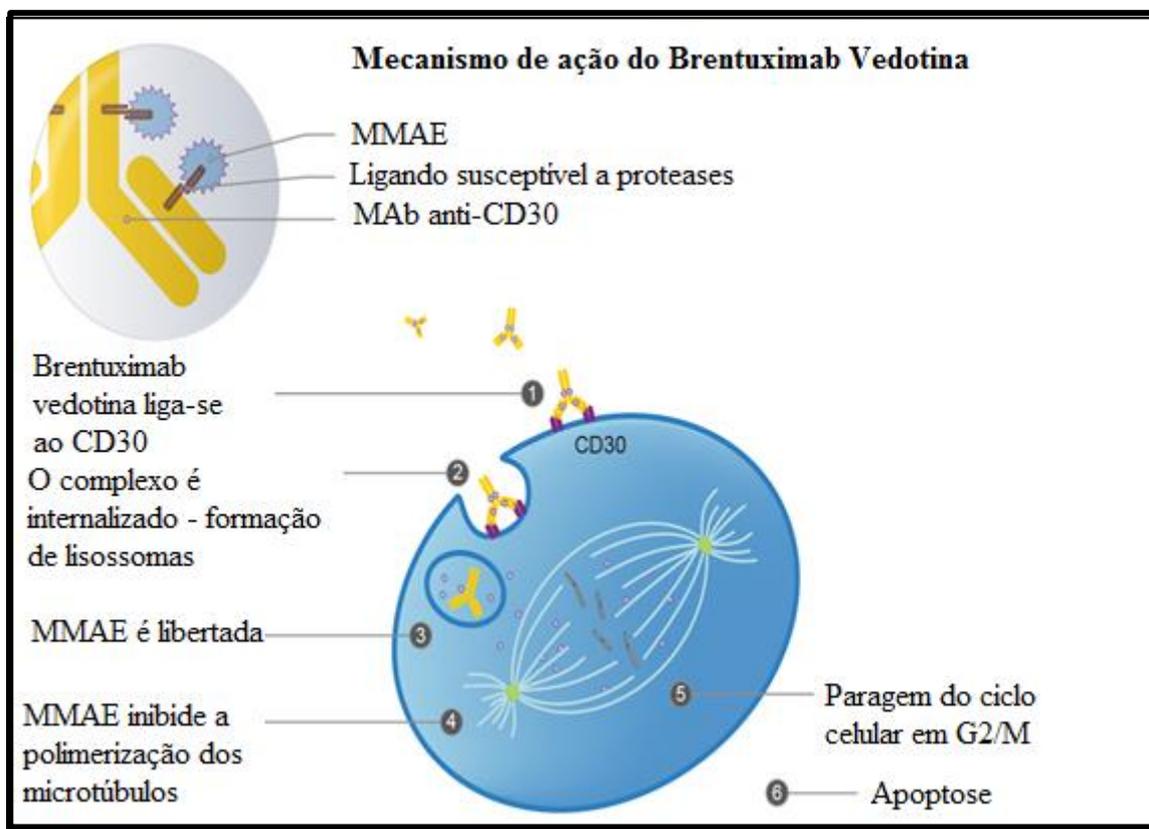
O alemtuzumab é um anticorpo monoclonal anti-CD52 do tipo IgG1 k, humanizado, eficaz na eliminação das células da linhagem B e T. Este mAb foi autorizado inicialmente para o tratamento de doentes com LLC para os quais a quimioterapia com fludarabina não estava recomendada. Em 2012 foi retirado do mercado, por decisão do laboratório, e atualmente, de acordo com a EMA, tem apenas indicação para doentes adultos com esclerose múltipla Surto-Remissão (EMSR) (57).

As doenças secundárias mais frequentemente associadas à administração de alemtuzumab eram doenças auto-imunes da tiróide. Doenças auto-imunes dermatológicas, renais e hematológicas nomeadamente a PTI, estavam também associadas em alguns casos e poder-se-iam manifestar tardiamente, no segundo ano após tratamento (57).

### 6.1.7 Brentuximab vedotina

O brentuximab é um anticorpo monoclonal quimérico IgG1 que tem como alvo o antígeno CD30, expresso pelas células do Linfoma de Hodgkin (LH) e pelo linfoma anaplásico de células grandes sistémico (sALCL) (4).

O brentuximab está conjugado de forma covalente ao agente antimicrotúbulo monometil auristatina E (MMAE), um potente inibidor da polimerização dos microtúbulos (Figura 6) (4).



**Figura 6 – Estrutura do Brentuximab vedotina e mecanismo de acção** (Adaptado de <http://www.ascopost.com/issues/september-15-2011/fda-approves-brentuximab-vedotin-in-two-lymphoma-indications.aspx>).

O esquema de quimioterapia mais utilizado no tratamento de doentes com LH é a combinação de doxorubicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina (ABVD). A sobrevivência livre de doença a longo prazo, destes doentes pode ultrapassar os 75%, em casos sem sintomatologia e superar os 70% em doentes com sintomas sistêmicos. Em doentes nos quais os esquemas de quimioterapia convencional, não obtiveram respostas de remissão prolongadas, o transplante autólogo de células progenitoras hematopoiéticas (ATCPH) pode estar associado a uma resposta completa em 50% dos casos (41). Contudo os doentes que apresentam recidivas após ATCPH ou os que não são candidatos a transplante, permanecem um desafio clínico devido à limitação de terapêuticas efetivas, sendo que estes doentes apresentam em média uma sobrevivência global de 2 a 3 anos (58).

De acordo com a EMA o brentuximab está indicado para o tratamento de doentes adultos com LH CD30 positivo, recidivante/refractário nas seguintes situações: no seguimento de ATCPH, ou no seguimento de pelo menos duas terapêuticas anteriores quando o transplante ou a quimioterapia combinada não constituem uma opção de tratamento adequada. Encontra-se também aprovado para o tratamento de doentes adultos com sALCL recidivante / refratário (59).

Um estudo multicêntrico procurou avaliar a efetividade e segurança de brentuximab vedotina (BV) em 65 doentes com LH refratário/ recidivante após ATCPH ou após tratamento com duas ou mais linhas de quimioterapia. Os melhores resultados foram observados após o 3º ciclo (9 semanas) de tratamento revelaram 21.5% de respostas completas, 49.2% de respostas parciais, e uma ORR de 70.7%. O estudo concluiu que o BV é um agente eficaz e bem tolerado pela generalidade dos doentes, no respeitante à toxicidade, sendo a neuropatia periférica o efeito adverso mais frequente (58).

Relativamente à outra indicação do BV o linfoma anaplásico de grandes células é um subtipo de linfoma de células T caracterizado pela expressão de antígeno CD30. As recidivas deste linfoma são geralmente resistentes ao protocolo de quimioterapia convencional. Com o objetivo de avaliar a resposta terapêutica destes doentes ao BV foi realizado um estudo multicêntrico de fase II que envolveu 57 doentes. Os resultados indicaram uma ORR de 86%; uma taxa de respostas completas de 57% e de respostas parciais de 29%. O tempo mediano para uma resposta global foi de 5.9 semanas e de 11.9 semanas para respostas completas. O tempo de sobrevivência livre de doença foi estimado em 13.3 meses. Os investigadores concluíram que a terapêutica dirigida com BV é um tratamento eficaz nos casos de sALCL refractário/ recidivante e deixaram a sugestão de se realização estudos futuros com o intuito de avaliar o BV como agente de primeira linha (60).

Os efeitos adversos associados ao BV estão reportados como dose-dependentes, sendo que os mais comuns são febre, cefaleias, astenia, diarreia, náuseas, vômitos, neutropenia, neuropatia periférica, anemia e alopecia (4).

### 6.1.8 Eculizumab

O eculizumab é um anticorpo monoclonal IgG  $\kappa$  recombinante humanizado, um híbrido de IgG2 e IgG4 (Fc humano Ig2 e CDRs Ig4 provenientes de murino inseridas na estrutura Fab humana) que tem como alvo o componente C5 do sistema complemento humano com atividade na fase tardia da cascata (61).

De acordo com a EMA o eculizumab está indicado no tratamento em adultos e crianças com hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) e no tratamento da síndrome hemolítica urémica atípica (SHUa) (59). Ao inibir a clivagem do C5 em C5a e C5b pela C5 convertase, inibe as fracções C5a e C5b-9 responsáveis pelos eventos mediados por complemento característicos da HPN e SHUa (61).

A SHUa é uma patologia crónica, rara (62), em que estudos observacionais mostraram uma mortalidade associada a SHUa de 8% na primeira manifestação da doença e 11% ao longo de 3 anos de seguimento (63). A fisiopatologia do SHUa tem como base uma ativação crónica e descontrolada do sistema complemento, o que conduz à ativação plaquetar, leucocitária, endotelial e a microangiopatia trombótica sistémica. A ativação da via do complemento ocorre devido à presença de clivagem persistente da proteína C5 em C5a (pró-inflamatória) e C5b (indutora de lise celular), e formação do complexo de ataque à membrana (C5b-9) (63).

A plasmaferese foi a primeira linha de tratamento da SHUa durante muito tempo, associada a uma redução da mortalidade de 25% a 50% em alguns casos, sendo que as respostas obtidas dependiam do genótipo dos doentes (62).

Um estudo avaliou a eficácia e segurança do eculizumab em dois ensaios prospectivos de fase II que decorreram durante um ano. Um ensaio incidiu sobre 17 doentes com SHUa e evidência clínica de microangiopatia trombótica progressiva. O outro estudo abrangeu 20 doentes com SHUa de longa duração e insuficiência renal crónica que tinham sido submetidos a plasmafere ou transfusão de plasma previamente (mediana de duração do tratamento 10.1 meses), ambos os grupos realizaram tratamento com uma duração mediana semelhante (64 e 62 semanas respectivamente). O eculizumab esteve associado a uma melhoria significativa dos parâmetros hematológicos e da função renal destes doentes. O tratamento precoce foi associado a melhorias significativas na taxa de filtração glomerular (TFG). Em geral o eculizumab esteve associado à interrupção de plasmaferes e diálise e a uma melhoria da qualidade de vida destes doentes (64).

A HPN é uma doença adquirida das células hematopoiéticas, na qual há deficiência da síntese de GPI (glicosilfosfatidilinositol), que liga várias proteínas da superfície da membrana celular, nomeadamente os antigénios CD55 e CD59 que detêm o papel de controlar a ativação da cascata do complemento (41). Assim, a hemólise da HPN resulta do aumento da susceptibilidade de eritrócitos clonais ao complemento, por défice de ação de CD55 e CD59 (41). A mortalidade e morbilidade da doença resultam da hemólise intravascular e a idade mediana de diagnóstico é 30 anos. Num estudo foi avaliada a eficácia a longo prazo do tratamento com eculizumab em 79 doentes durante 8 anos. Os resultados mostraram redução na hemólise, estabilização dos níveis de hemoglobina, redução do número de transfusões e melhoria na qualidade de vida destes doentes. Adicionalmente, o eculizumab evita as complicações associadas a esta patologia como a deterioração da função renal, hipertensão pulmonar, e eventos tromboembólicos. Foi ainda estabelecida concordância entre a taxa de mortalidade destes doentes tratados com eculizumab e a população normal (65).

Em todos os estudos clínicos em HPN e SHUa, a reação adversa mais grave foi a septicemia meningocócica (48). No sentido de reduzir o risco de infecção, todos os doentes devem ser vacinados no mínimo 2 semanas antes do tratamento na ausência de risco significativo em atrasar a terapêutica (59).

**Tabela 2 - Anticorpos monoclonais utilizados em hemato-oncologia**

<b>mAb</b>	<b>Nome Comercial</b>	<b>Antigénio Alvo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Indicação terapêutica</b>	<b>Efeitos secundários muito frequentes (≥1/10)</b>
<b>Rituximab</b>	MabThera®	CD20	Quimérico	LNH células B LLC	Susceptibilidade a infeções virais ou bacterianas, cefaleias, náuseas, febre, arrepios leucopénia, trombocitopénia.
<b>Ibritumomab</b>	Zevalin®	CD20	Murino/ Conjugado	LNH células B	Febre, citopenias, astenia, náuseas, arrepios, astenia, susceptibilidade a infeções, aparecimento de petéquias.
<b>Ofatumumab</b>	Arzerra®	CD20	Humano	CLL	Infeções do trato respiratório, neutropénia, anemia, febre, infeções urinárias, infeções víricas (Vírus Herpes zóster ou por HSV-1/2).
<b>Gemtuzumab</b>	Mylotag®	CD33	Humanizado/ Conjugado	LMA recidivada	Retirado do mercado.

**Tabela 2- Anticorpos monoclonais utilizados em hemato-oncologia (continuação)**

<b>mAb</b>	<b>Nome Comercial</b>	<b>Antigénio Alvo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Indicação terapêutica</b>	<b>Efeitos secundários muito frequentes (≥1/10)</b>
<b>Brentuximab</b>	Adcetris®	CD30	Quimérico conjugado	LH; sALCL	Neutropenia, trombocitopénia, susceptibilidade a infeções, náuseas, prurido, alopecia, alteração das transaminases, mialgias, artralgias,
<b>Obinutuzumab</b>	Gazyvaro®	CD20	Humanizado	LLC	Febre, hipotensão, citopenias, diarreia, infeção do aparelho urinário e respiratório, mialgias, artralgias alopecia.
<b>Eculizumab</b>	Soliris®	C5	Humanizado	HPN, SHUa	Cefaleias, febre, sintomas tipo gripal, hipotensão, infeções do trato respiratório, anemia, leucopenia, trombocitopénia, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia, alopecia, prurido, mialgias, artralgias. Reações anafiláticas.

(adaptado de Podhorecka M et al., 2014) (4).

## **7. Perspetivas futuras dos anticorpos monoclonais em hemato-oncologia**

O futuro da aplicação dos anticorpos monoclonais em hemato-oncologia adivinha-se promissor. O sucesso do rituximab estimulou esforços no desenvolvimento de outros mAbs, existindo vários em ensaios clínicos e muitos outros em estudos pré-clínicos. Como foi descrito anteriormente, a evolução da engenharia genética e biologia molecular trouxeram consigo novas gerações de anticorpos monoclonais que diferem do rituximab a nível de imunogenicidade, e funções efetoras (66). Seguidamente serão descritos alguns anticorpos monoclonais terapêuticos que se encontram atualmente em ensaios clínicos para a avaliação da efetividade em hemato-oncologia.

### **Veltuzumab**

Veltuzumab é um anticorpo anti-CD20, humanizado, tipo I IgG1 que se encontra atualmente em ensaios clínicos para tratamento de linfomas de células B e outras doenças autoimunes. Este mAb apresenta CDRs idênticas às do rituximab, diferindo estruturalmente deste em apenas um aminoácido na região variável da cadeia pesada (67). O veltuzumab encontra-se sob investigação em ensaios clínicos de fase I/II para o tratamento de LNH de células B. Num estudo foi administrado doentes com LNH de células B refratários, revelou-se ser bem tolerado, sem efeitos adversos graves; particularmente no tratamento de linfomas foliculares com exposição prévia ao rituximab esteve associado a uma ORR de 44% e taxa de resposta completa de 27%. Alguns estudos afirmam a eficácia do veltuzumab em administração subcutânea de baixas doses (80-320mg) igualando-a à administração intravenosa, deixando como sugestão a realização de outros estudos neste sentido (4).

## Ocrelizumab

Ocrelizumab é um mAb anti-CD20 humanizado, que medeia a destruição celular, à semelhança do rituximab recorrendo aos mecanismos de ADCC, CMC, e indução directa da apoptose (68).

Apresenta como característica uma melhor ligação às variantes de baixa afinidade de ligação do FcγR IIIa (CD16 FF/FV na posição 158) o que poderá ter interesse clínico nos doentes que apresentem este fenótipo. Um ensaio clínico de fase I/II avaliou a sua eficácia em 47 doentes com linfoma folicular recidivante/ refractário depois de submetidos a terapêutica com rituximab, o resultado foi uma taxa de resposta global de 38%, dos quais 17% apresentaram resposta completa, com uma incidência de efeitos adversos quase nula. A taxa de resposta global verificou-se superior nos doentes que haviam obtido resposta prévia ao rituximab (41%) em comparação com os doentes que apresentavam doença refratária ao rituximab (17%) (68).

## **Lintuzumab**

O lintuzumab é um anticorpo monoclonal humanizado cujo alvo é o antígeno CD33. Encontra-se em investigação como uma opção de tratamento para as neoplasias mielóides em doentes nos quais a quimioterapia e o transplante da medula óssea não estão indicados (4).

A eficácia do lintuzumab tem sido avaliada em combinação com quimioterapia de indução na AML. Num estudo de fase II avaliou-se a eficácia de um tratamento com lintuzumab e baixa dose de citarabina na sobrevivência de 211 doentes com LMA, com idade igual ou superior a 60 anos que ainda não tinham sido submetidos a nenhum tratamento. Embora a combinação fosse segura não se verificou melhoria significativa da sobrevivência (69).

## Bevacizumab

O anticorpo monoclonal bevacizumab, é uma imunoglobulina IgG1 com a capacidade de neutralizar o VEGF e desta forma inibir a angiogénese e limitar assim o crescimento tumoral (4).

O bevacizumab já é amplamente utilizado em oncologia, de acordo com a EMA está indicado no tratamento de Carcinoma metastizado do cólon ou do reto, carcinoma da mama metastizado, cancro do pulmão de não pequenas células, e carcinoma do ovário.

Recentemente foi introduzido em hemato-oncologia, uma vez que o VEGF apresenta uma expressão aumentada em vários tumores, incluindo o LNH sendo que um nível elevado de VEGF está associado a pior prognóstico em doentes com linfoma e leucemia (4).

O Bevacizumab em monoterapia foi reportado por apresentar atividade clínica modesta em doentes com recaídas de LNH indolente (4). Neste âmbito foram realizados estudos para avaliar o bevacizumab em combinação com as terapêuticas *standard* para o LDGCB, não tratado previamente. Os resultados mostraram que a associação do bevacizumab ao protocolo R-CHOP aumentou as manifestações de cardiotoxicidade, sem aumentar a eficácia do tratamento (68).

## **Galiximab**

Um número significativo de doentes apresenta linfomas refractários/ recidivantes após terapêutica com rituximab devido ao desenvolvimento de resistência, de forma a prevenir estas situações, outros mAbs com alvos celulares diferentes encontram-se sob investigação. O antígeno CD80 é uma glicoproteína envolvida na regulação/ ativação das células T, expressa por células B malignas, que se apresenta assim como possível alvo para a terapêutica dirigida (70).

O galiximab é um anticorpo quimérico anti-CD80 capaz de induzir ADCC em adição à proliferação das células neoplásicas através da influência sobre as vias de sinalização celular como a via NF-kB (4).

Os estudos pré clínicos revelaram uma atividade antitumoral significativa em monoterapia ou em combinação com o rituximab no tratamento de vários linfomas de células B incluindo o linfoma folicular. Apesar de ser bem tolerado o galiximab apresentou uma atividade mínima em doentes com LH submetidos a terapêutica prévia (4).

Num estudo de fase II foi avaliada a atividade e a segurança da combinação de galiximab e rituximab no tratamento de indução de linfoma folicular não tratado previamente. Os resultados mostraram que se trata de uma combinação bem tolerada, obtendo-se uma resposta global de 72.1% (a estimativa pré tratamento era >80%), com 47.6% de respostas completas e 24.6% de respostas parciais. Apesar de não terem sido atingidos os resultados estimados, descobriu-se que os doentes de risco baixo e intermédio que participaram no estudo obtiveram uma resposta global de 86.5% e taxa de CR de 60%. Estes resultados excelentes sugerem que esta combinação é altamente eficaz nestes grupos de doentes e detém um bom perfil de toxicidade (70).

## **Inotuzumab ozogamicina**

O antígeno CD22 é uma glicoproteína expressa em células B maduras e em mais de 90% das células B malignas, a sua função não está completamente conhecida contudo estudos recentes sugerem que actua na regulação das células B, tem impacto da sua sobrevivência actuando ainda como molécula de adesão, tornando-se assim um alvo atrativo para a terapêutica com anticorpos monoclonais (4).

Atualmente os mAbs anti-CD22 que se encontram sob investigação para o tratamento de neoplasias de células B são o inotuzumab e o epratuzumab (4).

O inotuzumab ozogamicina é um mAb IgG4 humanizado anti CD22, conjugado com caliqueamicina, um potente citotóxico. A calequeamicina é internalizada pela célula alvo e lesa o DNA conduzindo à apoptose (71).

Estudos pré clínicos relataram eficácia do tratamento com inotuzumab em LNH células B não responsivos ao rituximab, com regressão significativa da neoplasia (72). Um estudo clínico de fase I revelou atividade do inotuzumab ozogamicina no tratamento de LNH de células B CD22 positivos, recidivantes a 2 ou mais protocolos terapêuticos. A trombocitopenia foi a toxicidade mais frequentemente associada, 90% dos casos (72).

Recentemente alguns estudos de fase II avaliaram a resposta terapêutica ao inotuzumab ozogamicina em doentes com leucemia linfoblástica aguda (LLA) recidivante/ refractária. A taxa de respostas completas destes doentes à quimioterapia convencional é de um terço. Em estudo de fase I/II os resultados mostraram que conduz à remissão em dois terços dos doentes com leucemia linfoblástica aguda refractária permitindo assim que cerca de 20-45% dos doentes pudessem ser submetidos a alotransplante de células tronco (71).

## **Epratuzumab**

O epratuzumab é outro anticorpo monoclonal anti CD22, que de forma semelhante ao inotuzumab mostrou eficácia demonstrou atividade em LNH de células B refratários ou que apresentaram recaídas após terapêutica convencional, incluindo o rituximab (4)

O epratuzumab tem sido avaliado em monoterapia ou em combinação com a quimioterapia convencional ou rituximab. O CLGB (Cancer and Leukemia Group B) realizou um estudo de fase II para avaliação da combinação Rituximab-epratuzumab em 59 doentes com linfoma folicular não tratado previamente. Os resultados mostraram uma ORR de 88.2%, resposta completa de 42.4%, e uma sobrevivência livre de doença, aos 3 anos de 60% (73).

Um estudo clínico de fase III tem por objetivo avaliar a associação do epratuzumab com a quimioterapia convencional no tratamento de crianças com LLA recidivante. Outro estudo de fase II que também se encontra a decorrer, com vista à avaliação das respostas terapêuticas em doentes adultos com LLA recidivante (74).

Adicionalmente aos já descritos, existem diversos mAbs que se encontram sob avaliação em ensaios clínicos, seguidamente enumeram-se alguns: o apolizumab (Hu1D10), um mAb humanizado anti-HLA-DR $\beta$ ; o milatuzumab um anticorpo humanizado cujo alvo são os tumores com expressão do antigénio CD74; o lumiliximab, um mAb quimérico anti CD23; o blinatumumab, um anticopro biespecífico que combina a ação da terapêutica dirigida com a ativação das células T; o daratumumab anti-CD38; o siltuximab (anti-IL6); o elotuzumab (anti CS1), e o dacetumumab, anti CD40 (4).

## 8. Conclusão

Nos últimos anos, e com o intuito de ultrapassar as limitações das terapêuticas citotóxicos tem se vindo a apostar em novos alvos terapêuticos. O processo que culminou na utilização de anticorpos monoclonais terapêuticos de forma corrente na prática clínica foi longo e moroso, passando pelos conhecimentos básicos de imunologia até ao conhecimento pormenorizado dos mecanismos envolvidos na carcinogénese, a atualização das técnicas de engenharia genética na criação destes agentes farmacológicos e os respetivos estudos sobre a sua eficácia, segurança, e potencialidades adicionais.

Apesar de ser uma classe farmacológica que pode ser administrada numa variedade de patologias, em hemato-oncologia a introdução dos anticorpos monoclonais melhorou significativamente as respostas terapêuticas destas neoplasias que têm vindo a apresentar um aumento progressivo na sua incidência, e que tantas vezes indolentes, se caracterizam por uma elevada taxa de mortalidade e morbilidade.

Em 1997, a aprovação do rituximab foi um grande marco na história da terapêutica em hematologia e um impulsionador para a investigação de outros mAbs que têm sido essenciais nos regimes de tratamento atuais da maioria das neoplasias hematológicas.

Os resultados positivos obtidos com o avanço nas terapêuticas dirigidas em hematologia, não deverão ser considerados apenas como metas atingidas mas devem ser encarados como impulsionadores de uma investigação cada vez mais conhecedora dos mecanismos de ação da carcinogénese, de atuação destes agentes farmacológicos, e evicção dos meios de resistência à terapêutica, de forma a serem atingidos cada vez melhores resultados.

Todos os percursos têm os seus percalços e o desenvolvimento dos mAbs não foi exceção, alguns foram aprovados para posteriormente serem retirados do mercado, contudo na sua generalidade esta classe terapêutica foi revolucionária no seu todo, instaurando uma nova esperança no tratamento de doenças oncológicas na generalidade e em hematologia em particular.

Atualmente existem vários mAbs em estudos clínicos e pré-clínicos, na sua generalidade apesar de não ser uma classe farmacológica perfeita, adivinha-se um futuro promissor.

## Referências Bibliográficas

1. Craig FE, Foon KA, De W, Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms Review article Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. 2011;111(8):3941–67.
2. Pavani Chalasani AA and AP. Targeted therapies in hematological malignancies. Ozdemir PO, editor. Curr Cancer Treat - Nov Beyond Conv Approaches. In Tech; 2011;(9 December, 2011):255–80.
3. Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. Nat Rev Cancer. Nature Publishing Group; 2012;12(4):237–51.
4. Podhorecka M, Markowicz J, Szymczyk A, Pawlowski J. Target Therapy in Hematological Malignancies: New Monoclonal Antibodies. Int Sch Res Not. 2014;2014(3):1–16.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. Elsevier Inc.; 2011;144(5):646–74.
6. David E. G. Targeted therapies: A new generation of cancer treatments. Am Fam Physician. 2008;77(3):311–9.
7. Buss NAPS, Henderson SJ, McFarlane M, Shenton JM, De Haan L. Monoclonal antibody therapeutics: History and future. Curr Opin Pharmacol. 2012;12(5):615–22.
8. Ema. Anexo I - Resumo das Características do Medicamento Rituximab. 2010;1–29.
9. Suresh T, Lee LX, Joshi J, Barta SK. New antibody approaches to lymphoma therapy. J Hematol Oncol. 2014;7:58.

10. Rosaly V, Plínio M, Lima G De, Harth FM, Melo FY De, Akamatsu HT, et al. Aplicações terapêuticas dos anticorpos monoclonais Monoclonal antibodies therapeutic applications. *Rev bras alerg imunopatol.* 2006;Vol. 29(Nº 2):77–85.
11. Newsome BW, Ernstoff MS. The clinical pharmacology of therapeutic monoclonal antibodies in the treatment of malignancy; Have the magic bullets arrived? *Br J Clin Pharmacol.* 2008;66(1):6–19.
12. Schroeder HWJ, Cavacini L. Structure and Function of Immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(Feb 2010):S41–52.
13. Arosa, Fernando A., Elsa M. Cardoso FCP. Imunoglobulinas. In: *Fundamentos de Imunologia. 2ª Edição.* Lisboa: Lidel - Edições Técnicas; 2012. p. 195–214.
14. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri S V. Monoclonal antibody and intravenous immunoglobulin therapy for rheumatic diseases: rationale and mechanisms of action. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007 May;3(5):262–72.
15. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014;5(OCT):1–17.
16. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. 2011;125:1–16.
17. Sharkey RM, Goldenberg DM. Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA Cancer J Clin.* 2006;56(4):226–43.
18. D. Focosi , F. Maggi , M. Pistello, U. Boggi, F. Scatena. Immunosuppressive monoclonal antibodies: current and next generation. *Clinical Microbiology and Infection.* 2011; 17, 1759–1768.

19. B. Casanova Estruch. Safety profile and practical considerations of monoclonal antibody treatment. *Neurologia*. 2013;28(3):169–78.
20. Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, Ward E, Giannopoulos K, Murray PG. Monoclonal antibodies. *Mol Pathol*. 2000;53(3):111–7.
21. Pandey S. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2010;1(2):88–94.
22. Greenfield EA. Generating Monoclonal Antibodies. In: *A Laboratory Manual*. Boston, Massachusetts; 2014. p. 201–21.
23. Monoclonal antibody production [Internet]. Available from: <http://biosiva.50webs.org/mab.htm>
24. Catapano AL, Papadopoulos N. The safety of therapeutic monoclonal antibodies: Implications for cardiovascular disease and targeting the PCSK9 pathway. *Atherosclerosis*. Elsevier Ltd; 2013;228(1):18–28.
25. Tanner JE. Designing antibodies for oncology. *Cancer Metastasis Rev*. 2005;24(4):585–98.
26. Liu XY, Pop LM, Vitetta ES. Engineering therapeutic monoclonal antibodies. *Immunol Rev*. 2008;222(1):9–27.
27. Who. General policies for monoclonal antibodies. *World Health*. 2009;1–3.
28. Lefranc M-P. Antibody nomenclature. *MAbs*. 2011;3(1):1–2.
29. Tai Y-T, Anderson KC. Antibody-Based Therapies in Multiple Myeloma. *Bone Marrow Res*. 2011;2011(Figure 1):1–14.

30. Aguiar-Bujanda D, Blanco-Sánchez MJ, Hernández-Sosa M, Galván-Ruíz S, Hernández-Sarmiento S. Critical appraisal of rituximab in the maintenance treatment of advanced follicular lymphoma. *Cancer Manag Res.* 2015;7:319–30.
31. Weiner GJ. Rituximab : mechanism of action. *Semin Hematol.* 2011;47(2):115–23.
32. Kawashima H. Radioimmunotherapy: A specific treatment protocol for cancer by cytotoxic radioisotopes conjugated to antibodies. *Sci World J.* 2014;2014.
33. Palanca-Wessels MC, Press OW. Advances in the treatment of hematologic malignancies using immunoconjugates. *Blood.* 2014;123(15):2293–301.
34. DAS M, Zuniga E, Ojima I. Novel Taxoid-Based Tumor-Targeting Drug Conjugates. *Chim Oggi.* 2009;27(6):54–6.
35. Rowe JM LB. Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: a remarkable saga about an active drug. *Blood Forum.* 2013;121(24):4838–41.
36. Kaminetzky D, Hymes KB. Denileukin diftitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Biologics.* 2008;2(4):717–24.
37. Kuriakose P. Targeted therapy for hematologic malignancies. *Cancer Control.* 2005;12(2):82–90.
38. Boye J. An overview of the current clinical use of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Ann Oncol.* 2002;14(4):520–35.
39. Ma Y, Zhang P, Gao Y, Fan H, Zhang M, Wu J. Evaluation of AKT phosphorylation and PTEN loss and their correlation with the resistance of rituximab in DLBCL. 2015;8(11):14875–84.
40. Meng F, Zhong D, Zhang L, Shao Y, Ma Q. Efficacy and safety of rituximab

combined with chemotherapy in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(10):17515–22.

41. Dennis Kasper, Anthony Fauci, Stephen Hauser, Dan Longo, J. Larry Jameson JL. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 19e ed. United States: McGraw-Hill Education; 2015. 660-661; 682-683; 695-702 p.

42. Friedberg JW. End of rituximab maintenance for low-tumor burden follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2014;32(28):3093–5.

43. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*. 2014;370(12):1101–10.

44. Hillmen P, Gribben JG, Follows GA, Milligan D, Sayala HA, Moreton P, et al. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY* Rituximab Plus Chlorambucil As First-Line Treatment for Chronic Lymphocytic Leukemia : Final Analysis of an Open- Label Phase II Study. 2014;32(12).

45. Shah A. New developments in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: role of obinutuzumab. *Ther Clin Risk Manag*. 2015;11:1113–22.

46. Ema. Anexo I - Resumo das Características do Medicamento Ofatumumab. 2010;1–29.

47. Hillmen P, Robak T, Janssens A, Babu KG, Kloczko J, Grosicki S, et al. Addition of ofatumumab to chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia : a randomised , open label phase 3 trial. 2015;(Complement 1):1–19.

48. Ema. Resumo das Características do Medicamento Ibritumomab. 2010;1–29.

49. Andrade Campos MM, Montes Limón AE, Grasa JM, Lievano P, Baringo T, Giraldo P. RIT with  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab tiuxetan in follicular non-hodgkin lymphoma: Evaluation of recent outcomes in a single institution. *J Oncol*. 2012;2012:3–8.
50. Witzig TE, Clinch M. Moving Radioimmunotherapy Forward for Follicular Lymphoma. 2013;31(3):294–6.
51. Scholz CW, Pinto A, Linkesch W, Lindtner O, Viardot A, Keller U, et al.  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab-tiuxetan as first-line treatment for follicular lymphoma: 30 months of follow-up data from an international multicenter phase II clinical trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(3):308–13.
52. Owen CJ, Stewart DA. Obinutuzumab for the treatment of patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: overview and perspective. *Ther Adv Hematol*. 2015;6(4):161–70.
53. Ema. Resumo das Características do Medicamento Obinutuzumab. 2010;1–29.
54. Ehninger A, Kramer M, Röhlig C, Thiede C, Bornhäuser M, von Bonin M, et al. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2014;4(April):e218.
55. Foran JM. Gemtuzumab: time to bring back on the market? *Clin Adv Hematol Oncol*. 2012;10(5):326–7.
56. Coles AJ. Alemtuzumab Therapy for Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2013;10(1):29–33.
57. Rommer PS, Dudesek A, Stuve O, Zettl UK. Monoclonal antibodies in treatment of multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2014;175(3):373–84.
58. Zinzani PL, Viviani S, Anastasia A, Vitolo U, Luminari S, Zaja F, et al. Brentuximab

vedotin in relapsed/refractory Hodgkin's lymphoma: The Italian experience and results of its use in daily clinical practice outside clinical trials. *Haematologica*. 2013;98(8):1232–6.

59. Emea. Resumo das Características do Medicamento Eculizumab. 2010;1–29.

60. Pro B, Advani R, Brice P, Bartlett NL, Rosenblatt JD, Illidge T, et al. Brentuximab vedotin (SGN-35) in patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large-cell lymphoma: Results of a phase II study. *J Clin Oncol*. 2012;30(18):2190–6.

61. Antwi-Baffour S, Kyeremeh R, Adjei JK, Aryeh C, Kpentey G. The relative merits of therapies being developed to tackle inappropriate (“self”-directed) complement activation. *Autoimmun Highlights* [Internet]. Springer International Publishing; 2016;7(1):6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13317-016-0078-x>

62. Teixeira CI, Mota RG, Afonso BG, Carneiro T V, Meira GS, Mendonca DU. [Use of Eculizumab in atypical hemolytic uremic syndrome after renal transplantation]. *J Bras Nefrol*. 2015;37:127–30.

63. Licht C, Greenbaum L, Muus P, Babu S, Bedrosian CL, Cohen DJ, et al. Efficacy and safety of eculizumab in atypical hemolytic uremic syndrome from 2-year extensions of phase 2 studies. *Kidney Int*. Nature Publishing Group; 2015;87(5):1061–73.

64. Legendre CM, Licht C, Muus P, Greenbaum LA, Babu S, Bedrosian C, et al. Terminal Complement Inhibitor Eculizumab in Atypical Hemolytic–Uremic Syndrome. *N Engl J Med*. 2013;368(23):2169–81.

65. Zuber J, Le Quintrec M, Krid S, Bertoye C, Gueutin V, Lahoche A, et al. Eculizumab for atypical hemolytic uremic syndrome recurrence in renal transplantation. *Am J Transplant*. 2012;12(12):3337–54.

66. Lim SH, Beers SA, French RR, Johnson PWM, Glennie MJ, Cragg MS. Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica*. 2010;95(1):135–43.
67. Goldenberg DM, Rossi EA, Stein R, Cardillo TM, Czuczman MS, Francisco JHI, et al. Properties and structure-function relationships of velizumab (hA20), a humanized anti-CD20 monoclonal antibody. *Blood*. 2009;113(5):1062–70.
68. Morschhauser F, Marlton P, Vitolo U, Lindtner O, Seymour JF, Crump M, et al. Results of a phase I/II study of orelizumab, a fully humanized anti-CD20 mAb, in patients with relapsed/refractory follicular lymphoma. *Ann Oncol*. 2010;21(9):1870–6.
69. Sekeres MA, Lancet JE, Wood BL, Grove LE, Sandalic L, Sievers EL, et al. Randomized, phase IIb study of low-dose cytarabine and lintuzumab versus low-dose cytarabine and placebo in older adults with untreated acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2013;98(1):119–28.
70. Czuczman MS, Leonard JP, Jung S, Johnson JL, Hsi ED, Byrd JC, et al. Phase II trial of galiximab (anti-CD80 monoclonal antibody) plus rituximab (CALGB 50402): Follicular lymphoma international prognostic index (FLIPI) score is predictive of upfront immunotherapy responsiveness. *Ann Oncol*. 2012;23(9):2356–62.
71. Yilmaz M, Richard S, Jabbour E. The clinical potential of inotuzumab ozogamicin in relapsed and refractory acute lymphocytic leukemia. *Ther Adv Hematol*. 2015;6(5):253–61.
72. Advani A, Coiffier B, Czuczman MS, Dreyling M, Foran J, Gine E, et al. Safety, pharmacokinetics, and preliminary clinical activity of inotuzumab ozogamicin, a novel immunoconjugate for the treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Results of a phase I study. *J Clin Oncol*. 2010;28(12):2085–93.

73. Grant BW, Jung SH, Johnson JL, Kostakoglu L, Hsi E, Byrd JC, et al. A phase 2 trial of extended induction epratuzumab and rituximab for previously untreated follicular lymphoma: CALGB 50701. *Cancer*. 2013;119(21):3797–804.
74. Immunomedics I. Immunomedics Epratuzumab [Internet]. Available from: <http://www.immunomedics.com/epratuzumab-demo.shtml>