

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC  
Trabalho de Conclusão de Curso | Bacharelado em Química

Bruna Santos Souza

**Imunoterapia para tumores sólidos: uso de anticorpos monoclonais e receptores quiméricos de antígeno tendo como alvo a anidrase carbônica IX**

Santo André  
NOVEMBRO – 2021

Bruna Santos Souza

**Imunoterapia para tumores sólidos: uso de anticorpos monoclonais e receptores quiméricos de antígeno tendo como alvo a anidrase carbônica IX**

Monografia de Trabalho de  
Conclusão de Curso, apresentado ao  
Bacharelado em Química da UFABC  
para obtenção do título de Bacharel  
em Química  
Orientador: Eloah Rabello Suarez

***Dedico este trabalho aos meus que não tiveram a chance de chegar até aqui, mas motivaram toda a minha caminhada.***

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Dr. Urbano Luis Fonseca e sua equipe que me deixaram voltar a enxergar e concluir esta jornada que se iniciou já com muita luta e suor, primeiro dos meus pais, Cicero Batista de Souza e Marisa dos Santos Rosa, e depois com dedicação, disciplina e paciência em construir meu caminho e sustentar a ideia de que cada passo dado em direção a uma vida digna é motivo de comemoração por burlar o destino esperado para uma mulher pobre e favelada.

Agradeço à Prof. Dr. Eloah Suarez, do centro de ciências naturais e humanas (CCNH) da Universidade Federal do ABC (UFABC), por me aceitar no seu grupo de pesquisa mesmo com as minhas limitações. Agradeço especialmente pelo tempo, conselhos, explicações e apoio dedicados no último ano. Agradeço também às integrantes do grupo de pesquisa: Giselle Correia, Najla Pacheco e Victoria Porto pela parceria e compreensão. Agradeço também ao Matheus Vital por sempre segurar minha mão.

Agradeço à banca avaliadora, Prof. Dr. Giselle Cerchiaro (CCNH - UFABC) e Prof. Dr. André Sarto Polo (CCNH – UFABC), não só pela avaliação e contribuição para este trabalho, mas por terem feito parte da vida minha vida acadêmica, dentro da sala de aula e dos laboratórios de pesquisa, e especialmente por terem mantido abertas as portas para acessibilidade que deveria ser, mas não é, direito garantido no cotidiano dos alunos de graduação.

A universidade é formada verdadeiramente por educadores e coordenadores capazes de dedicar um olhar sensível àqueles que procuram na educação a perspectiva de um futuro digno.

Por fim, agradeço à Universidade Federal do ABC, assim como à Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), à Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento público fornecido durante a graduação para os laboratórios utilizados e projeto feito durante a iniciação científica.

*“Eu só quero é ser feliz,*

*Andar tranquilamente na favela onde eu nasci.*

*E poder me orgulhar,*

*E ter a consciência que o pobre tem seu lugar. “*

*- Mc Cidinho e Doca.*

## RESUMO

Embora a anidrase carbônica IX humana (hCA IX) seja expressa em tecidos saudáveis, a superexpressão desta enzima ocorre em diversos tumores, sendo considerada um marcador endógeno de hipóxia. A hipóxia ocorre quando o crescimento do tumor supera a vascularização, com redução no suprimento sanguíneo, levando a regiões de baixa concentração de oxigênio ( $\leq 1\%$  do conteúdo geral de oxigênio) e um decréscimo no pH intracelular (pH  $\sim 6,5$ ) no microambiente do tumor. Tumores hipóxicos apresentam resistência à tratamentos padrões quimioterápicos, alta probabilidade de metástase, mau prognóstico e reincidência. No entanto, as células tumorais desenvolveram vários mecanismos para escapar da vigilância imunológica, como defeitos no mecanismo de apresentação do antígeno. Assim, a imunoterapia baseada no aprimoramento das defesas imunológicas naturais para eliminar células malignas tornou-se um avanço para o tratamento de câncer. Dentre as abordagens usadas neste campo de pesquisa, foram investigadas duas estratégias terapêuticas individualmente ou combinadas: o uso de anticorpos monoclonais, especialmente o G250, e os receptores quiméricos de antígeno (CAR) direcionados para CA IX em estudos clínicos e pré-clínicos.

**Palavras-chave:** anticorpos monoclonais, anidrase carbônica IX, G250, receptores quiméricos de antígeno (CAR), radioimunoterapia.

## **ABSTRACT**

Although human carbonic anhydrase IX (hCA IX) is expressed in healthy tissues, overexpression of this enzyme occurs in several tumors, being considered an endogenous marker of hypoxia. Hypoxia occurs when tumor growth outpaces vascularization, with reduced blood supply, leading to regions of low oxygen concentration ( $\leq 1\%$  of the overall oxygen content) and a decrease in intracellular pH (pH  $\sim 6.5$ ) in the tumor microenvironment. Hypoxic tumors present resistance to standard chemotherapy treatments, high probability of metastasis, poor prognosis and recurrence. However, tumor cells have evolved several mechanisms to evade immune surveillance, such as defects in the antigen presentation mechanism. Thus, immunotherapy based on the enhancement of natural immune defenses to eliminate malignant cells has become an advance in the treatment of cancer. Among the approaches used in this field of research, two therapeutic strategies have been investigated individually or in combination: the use of monoclonal antibodies, especially G250, and chimeric antigen receptors (CAR) targeted to CA IX in clinical and preclinical studies.

**Keywords:** carbonic anhydrase IX, monoclonal antibodies, G250, chimeric antigen receptors (CAR), radioimmunotherapy.

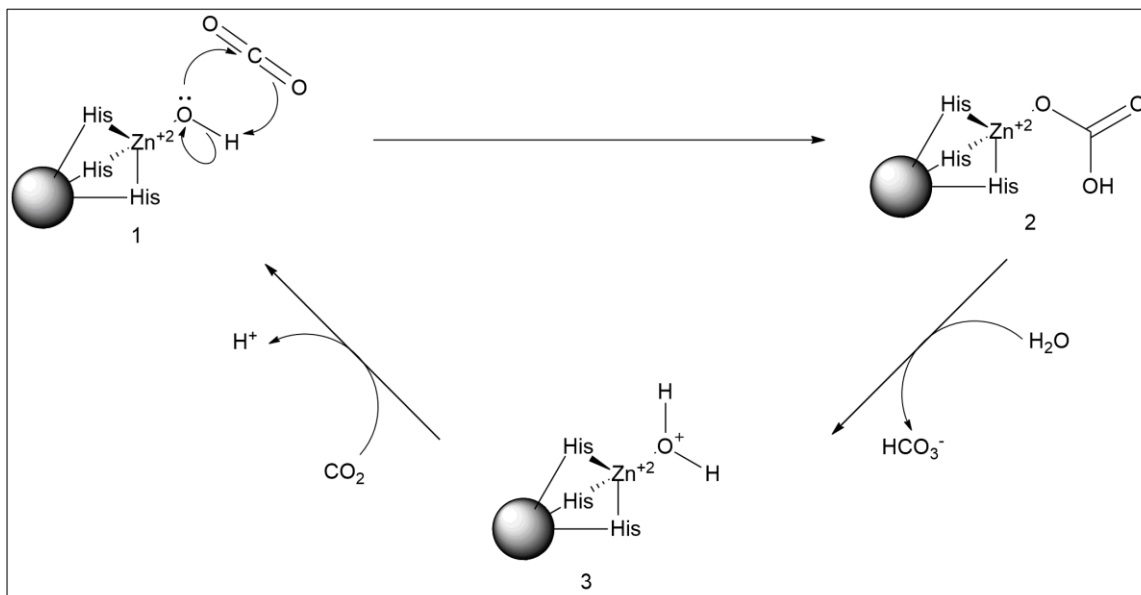
# Sumário

1.	INTRODUÇÃO .....	8
2.	OBJETIVOS .....	14
3.	METODOLOGIA .....	14
4.	DESENVOLVIMENTO .....	14
4.1.	ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS COM ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI CA IX .....	14
4.1.1.	Anticorpo monoclonal murino IgG1 G250.....	14
4.1.2.	Anticorpo monoclonal chimerico G250 (cG250) - uso isolado e associação com citocinas .....	16
4.1.3.	Anticorpo monoclonal chimerico G250 (cG250) conjugado com radionuclídeos.....	19
4.1.4.	cG250 e outras associações .....	20
4.1.5.	Anticorpos derivados de <i>Phage Display</i> .....	21
4.1.6.	Outros anticorpos monoclonais .....	22
4.2.	ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS COM RECEPTORES QUÍMICOS DE ANTÍGENO (CAR) ANTI-CAIX .....	24
5.	DISCUSSÃO .....	29
6.	CONCLUSÃO .....	31
7.	REFERÊNCIAS.....	32



## 1. INTRODUÇÃO

Anidrases carbônicas (CAs, EC 4.2.1.1) são metaloenzimas cuja função enzimática primária é a catálise reversiva da hidratação do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) a íons bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e prótons ( $\text{H}^+$ ) (Figura 1) [1].



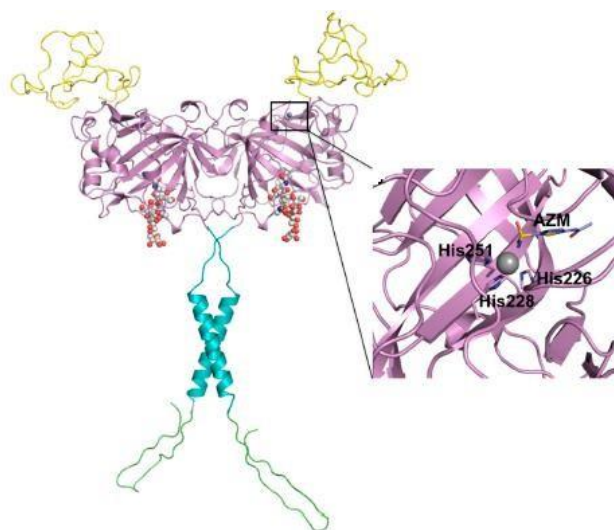
**Figura 1:** Esquema genérico para representação da reação catalisada por anidrases carbônicas alfa, onde o círculo cinza representa a estrutura da enzima. **Fonte:** Autoria própria.

CAs são reguladores essenciais de processos biológicos como a respiração, regulação ácido-base, reabsorção óssea, calcificação e processos biossintéticos [2]. Elas são distribuídas em sete famílias:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$  e  $\theta$  com presença notável em uma vasta gama de espécies biológicas, de plantas e animais. As anidrases carbônicas humanas (hCAs) pertencem a família  $\alpha$  de CAs, cujas quinze isoformas apresentam atributos moleculares, estrutura, cinética, localização, e mecanismos catalíticos distintos [3]. Quatro grupos de CAs podem ser observados baseando-se em sua localização celular e subcelular: citosólicas (CA I, II, III, VII, XIII), secretora (CA VI), mitocondriais (CA VA, VB) e associadas à membrana (CA IV, IX, XII, XIV, XV). As três isoformas restantes (CA VIII, X, XI) são cataliticamente inativas, também chamadas de proteínas relacionadas a ACs [4].

As estruturas de todos os CAs ligados ao substrato e ao produto se correlacionam bem com o mecanismo catalítico de ataque nucleofílico direto de o  $\text{Zn-OH}$  em  $\text{CO}_2$ . A formação de bicarbonato promove uma interação bidentada com o zinco metálico, resultando em um íon metálico penta coordenado com geometria trigonal bipiramidal. Uma molécula de água desloca o bicarbonato ligado ao zinco que é então desprotonado através da rede de água de transferência de prótons para

a rodada subsequente de catálise. Uma molécula de água não identificada anteriormente foi observada em estruturas HCA II ligadas a holo-CO<sub>2</sub> que podem desempenhar o papel de deslocamento do bicarbonato [1].

A anidrase carbônica IX humana (hCA IX) é uma proteína de membrana N-glicosilada de 54/58 kDA com um domínio N-terminal semelhante a um proteoglicano que é importante para a adesão celular. O epitélio da superfície gástrica, as glândulas gástricas, as células da cripta do intestino delgado, as glândulas pilóricas/de Brunner, árvores biliares, incluindo a vesícula biliar, expressam essa enzima em condições saudáveis [1]. Na hCA IX, três resíduos de histidina apresentam-se coordenados a um íon de zinco na base da fenda/sítio ativo como apresentado na Figura 1 [5].



**Figura 2:** Representação esquemática da estrutura cristalina da CA IX. Domínio semelhante a um proteoglicano (PG, amarelo), domínio catalítico (CA, roxo), âncora transmembrana (TM, ciano), e um domínio intracelular (IC, verde). Esferas representam os sítios de glicosilação. Acetazolamida (AZM) ligada no sítio ativo da CA IX (PDB ID: 3IAI). **Fonte:** Adaptado de Mahon, Pinard, and McKenna (2015). [5]

Todas as CAs exibem esquema de catálise semelhante, incluindo a CA IX ( $K_{cat}$  380 ms<sup>-1</sup>;  $K_{cat}/K_m$  55 M<sup>-1</sup>µs<sup>-1</sup>). Isto é, o ataque nucleofílico do Zn-OH no CO<sub>2</sub>. A catálise ocorre por meio de um mecanismo de pingue-pongue de duas etapas. A ligação de CO<sub>2</sub> na região hidrofóbica adjacente ao zinco metálico promove o ataque nucleofílico pelo Zn-OH levando à formação de HCO<sub>3</sub> que é posteriormente deslocado pela difusão aleatória de água no sítio ativo. O transferência de um próton na segunda etapa da molécula de água ligada ao zinco a um aceitador no solvente bruto é necessário para regenerar o hidróxido para um rodada subsequente de catálise por meio do resíduo de transporte de prótons His64. Esta transferência ocorre na ordem de 10<sup>6</sup> s<sup>-1</sup> para hCA e é a etapa de limitação de taxa da velocidade máxima geral de

catálise. O próton intramolecular transporte entre o solvente ligado ao zinco e His64 ocorre por meio de água intermediária moléculas no sítio ativo. Um evento de transferência intermolecular entrega o próton para o solvente principal [1].

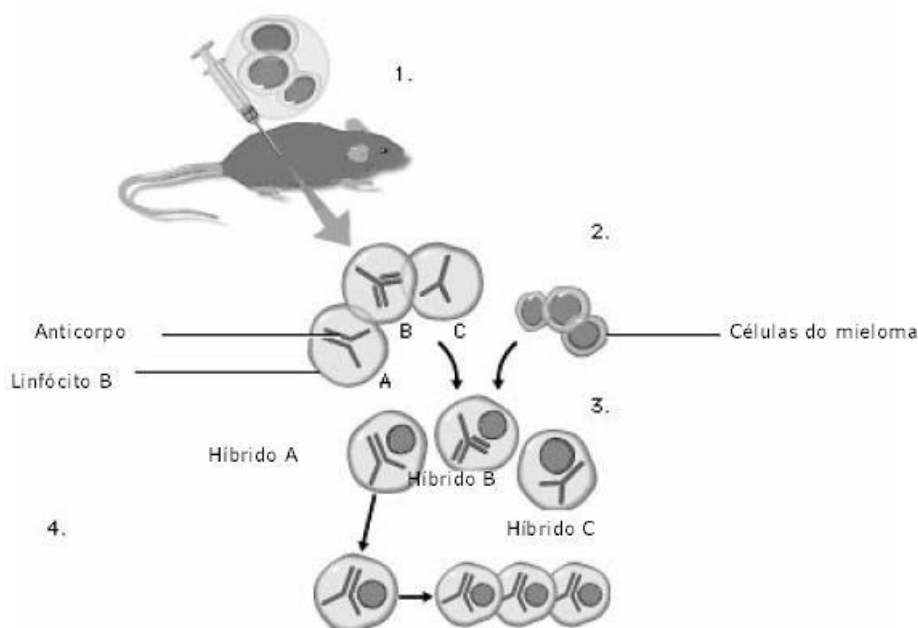
Embora a hCA IX seja expressa em tecidos saudáveis, a superexpressão desta enzima ocorre em diversos tumores, sendo considerada um marcador endógeno de hipóxia [6]. A hipóxia ocorre quando o crescimento do tumor supera a vascularização, com redução no suprimento sanguíneo, levando a regiões de baixa concentração de oxigênio ( $\leq 1\%$  do conteúdo geral de oxigênio) e um decréscimo no pH intracelular (pH  $\sim 6,5$ ) no microambiente do tumor. Tumores hipóxicos apresentam resistência à tratamentos padrões quimioterápicos, alta probabilidade de metástase, mau prognóstico e reincidência [5]. A resposta celular à hipóxia é mediada pelo fator induzido por hipóxia (HIF-1), uma proteína heterodimérica constituída pela unidade  $\alpha$  e  $\beta$ . Em condições normóxicas, a hidroxilação de resíduos de prolina presentes nas subunidades  $\alpha$  de HIF por HIF proлил-hidroxilases permite a ubiquitinação de HIF pela ubiquitina ligase de Von Hippel Lindau (VHL) E3, com a consequente degradação de HIF no proteossoma. A inibição da proлил-hidroxilase do HIF ocorre em condições de hipóxia, uma vez que esta enzima utiliza oxigênio como co-substrato, resultando na ativação do HIF [7].

O fator de transcrição HIF-1 regula a expressão de vários genes, como os envolvidos na angiogênese, eritropoiese, metabolismo de glicose, regulação de pH e apoptose. A hCA IX é considerada um dos melhores sensores endógenos da atividade do HIF-1 e, portanto, um marcador apropriado e confiável para hipóxia tumoral [8].

O papel da CA IX como marcador de HIF-1 para doenças relacionadas a tumores é bem conhecido e revisado na literatura [9-11]. Uma vez que o câncer é uma doença caracterizada por alterações genéticas e epigenéticas, a geração de antígenos tumorais é usual e alguns desses podem ser reconhecidos pelo sistema imunológico, gerando uma resposta imunológica. Respostas imunológicas podem erradicar células malignas, prejudicando seus fenótipos e funções. No entanto, as células tumorais desenvolveram vários mecanismos para escapar da vigilância imunológica, como defeitos no mecanismo de apresentação do antígeno. Assim, a imunoterapia baseada no aprimoramento das defesas imunológicas naturais para eliminar células malignas tornou-se um avanço para o tratamento de câncer [12].

A introdução da imunoterapia como uma nova modalidade de tratamento de câncer ocorreu nas últimas três décadas, mostrando benefícios quando comparada a terapia padrão, como melhoria da taxa de sobrevivência, com redução da toxicidade [13]. O desenvolvimento de estratégias nesse campo levou a diferentes tipos de tratamento para câncer: terapia com vírus oncolíticos que utiliza vírus geneticamente modificados para infectar células tumorais, aumentar o ambiente pró-inflamatório e melhorar a imunidade antitumoral sistêmica [14]; vacinas contra câncer com antígenos específicos que desencadeiam uma resposta imune antitumoral mediada por linfócitos T [15]; terapias com citocinas, que utilizam principalmente interleucina 2 (IL-2) e interferon-alfa (IFN-  $\alpha$ ) para expandir a presença de linfócitos T exercendo propriedades imunoestimulantes determinantes para eficácia antitumoral [16]; inibidores de *checkpoint* imunológico (ICTs), uma classe de anticorpos monoclonais (mAbs) desenvolvidos para aprimorar a resposta imunológica antitumoral interrompendo vias de sinalização co-inibitórias de uma resposta imunológica ostensiva, auxiliando assim na eliminação de um maior número de células tumorais [17]; transferência adotiva de células (ACT), que utiliza células imunes autólogas, em particular linfócitos T, geneticamente modificadas e aplicadas em pacientes com câncer. Atualmente, dois tipos de linfócitos T geneticamente modificadas têm se destacado: linfócitos T expressando receptores quiméricos de antígeno (CAR) e receptores de linfócitos T (TCR) modificados [12].

Anticorpos monoclonais foram feitos pela primeira vez com a técnica de hibridização celular somática, por George J.F. Köhler e Cesar Milstein em 1975, sendo híbridos de células formadoras de antígeno e linhagens celulares de replicação contínua (Figura 3)[18].

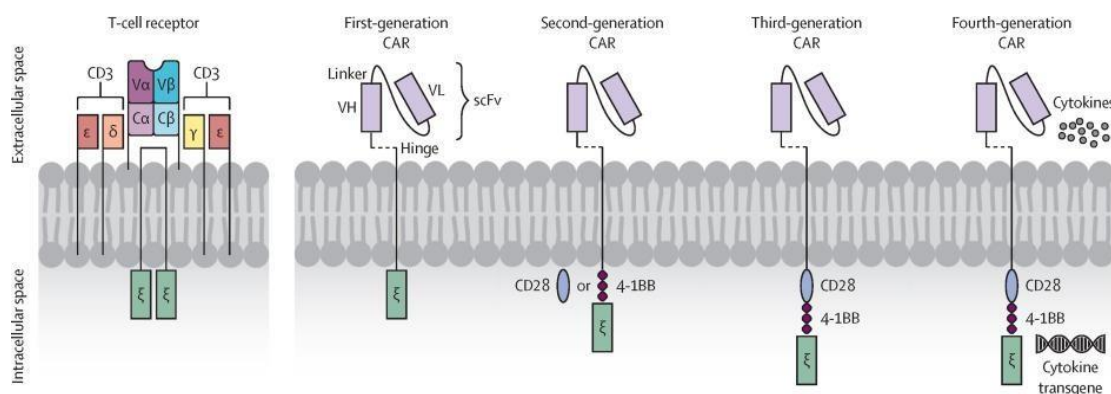


**Figura 3:** Técnica de hibridização celular somática: 1. Células tumorais são injetadas no camundongo para formar diferentes tipos de anticorpos antitumorais. 2. Células de mieloma são coletadas 3. Linfócitos B são fundidos com as células de mieloma para produzir células híbridas produtoras de anticorpos. 4. Híbridos que produzem anticorpos serão selecionados e clonados. **Fonte:** Adaptado de Santos *et al.* (2006) [18].

Os anticorpos de camundongo, também chamados murinos, podem gerar anticorpos humano anti-rato (HAMA), uma resposta do sistema imunológico que elimina rapidamente estes anticorpos do hospedeiro que os recebe. Para contornar este problema, foram desenvolvidos anticorpos humano-camundongo híbridos cuja região variável pertence a camundongos e a região constante provém de anticorpos humanos, chamados de anticorpos quiméricos ou humanizados [18].

A composição do TCR transgênico são duas cadeias,  $\alpha$  e  $\beta$ , ligadas não covalentemente com o complexo CD3 na superfície dos linfócitos T. A ativação das linfócitos T ocorre quando o TCR reconhece peptídeos ligados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) na superfície das células apresentadoras de antígeno ou células tumorais [19]. Já os CAR são receptores sintéticos projetados para redirecionar linfócitos ou células NK para eliminar células que expressam um ligante alvo cognato. Seu design consiste em quatro componentes majoritários, como apresentado na Figura 2 [20]. Os receptores viabilizam o reconhecimento de antígenos associados a tumores (TAAs) por linfócitos T. Essa abordagem demanda esforços para projetar receptores que transponham mecanismos de defesa como a imunossupressão, escape de antígeno e barreiras físicas para adentrar tumores sólidos [21]. Os CARs superar

as principais limitações apresentadas por TCRs: a necessidade de reconhecimento da expressão de antígenos nas células alvo via MHC e co-estimulação. O domínio do antígeno é normalmente reconhecido por um fragmento variável de cadeia única (scFv) derivado de domínios variáveis de anticorpos associados aos domínios de sinalização da cadeia TCR $\zeta$  e domínios co-estimulatórios adicionais de moléculas como CD28, OX40 e CD137. A perda de apresentação de antígenos associados ao MHC pelas células tumorais é um dos principais mecanismos de imunoevasão, o que torna os linfócitos T CAR um grande avanço para o tratamento imunoterapico de câncer devido a não necessidade de apresentação antigênica via MHC pelas células tumorais para ativação dos mesmos [22].



**Figura 2:** Componentes de um receptor sintético: CAR = receptor quimérico de antígeno. scFv = fragmento variável de cadeia única. VH = cadeia pesada variável. VL = cadeia leve variável. **Fonte:** Adaptado de Singh e McGuirk (2020) [22].

Células natural killer (NK) CAR emergiram como uma fonte promissora de células para terapias baseadas em CAR devido ao fato das mesmas não apresentarem o risco de doença do enxerto contra hospedeiro (GvHD) oferecendo o potencial para um produto celular alogeneico sem necessidade de compatibilidade e que poderia estar prontamente disponível para uso clínico [23]. As células CAR podem ser geradas de fontes variadas, autólogas ou alogênicas, incluindo de sangue periférico (PB), sangue do cordão umbilical (CB), células-tronco hematopoiéticas (HSCs), células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) e linhagens de células NK. Nesse sentido, o uso de células NK com CAR é vantajoso por sua curta vida útil, limitando eventuais efeitos colaterais e seu perfil diferenciado de expressão citocinas que podem reduzir o risco de toxicidade após a transferência adotiva. O reconhecimento de células tumorais usando seus receptores permite matar células cancerosas mesmo quando os mecanismos de escape de antígeno, como a desregulação do antígeno alvo do CAR, se desenvolvem. A grande limitação desta terapia é a dificuldade de expansão dessas células para produção em larga escala.[24].

Partindo da perspectiva apresentada, se faz interessante construir um panorama geral do desenvolvimento destas terapias promissoras para melhor visualizar os progressos na área, assim como eficácia e limitações até o presente momento. Portanto, este trabalho apresenta uma pesquisa bibliográfica de aplicações pré-clínicas e clínicas de anticorpos monoclonais (mAbs) e terapias baseadas em CAR tendo como alvo a CA IX.

## **2. OBJETIVOS**

Conduzir uma pesquisa bibliográfica dos principais anticorpos monoclonais e receptores quiméricos de antígeno desenvolvidos e testados, pre-clinicamente ou clinicamente, para anidrase carbônica IX até 2021.

## **3. METODOLOGIA**

Uma pesquisa bibliográfica descritiva sobre mAbs e CAR tendo como alvo a anidrase carbônica IX foi realizada utilizando a plataforma PubMed, um banco de dados aberto para busca de literatura biomédica na área de ciências da vida [25]. O intervalo definido para a busca foi até o ano de 2021, incluindo artigos e revisões bibliográficas. Para encontrar essas publicações, palavras-chave em inglês foram usadas como se segue: “carbonic anhydrase IX” and “antibody”, “CA IX” and “antibody”, “carbonic anhydrase IX” and “monoclonal antibodies”, “carbonic anhydrase IX” and “chimeric antigen receptors”, “carbonic anhydrase IX” and “CAR”, “carbonic anhydrase IX” and “CAR T”, “carbonic anhydrase IX” and “CAR NK”, “CAR” and “CA IX”, “Rencarex”, “Girentuximab”. Os artigos selecionados se referiam total ou majoritariamente a anidrase carbônica IX, exceto revisões literárias extensas. Foram excluídos artigos que tratavam do uso de inibidores químicos de CA IX. Após verificar quais mAbs apareciam na literatura, uma segunda busca específica para cada um deles foi feita. Como resultado, foram obtidas quarenta publicações divididas em três grupos: estudos clínicos com anticorpos monoclonais, estudos pré-clínicos com anticorpos monoclonais e estudos clínicos e pré-clínicos, *in vivo* e *in vitro*, com receptores quiméricos de antígeno (CAR).

## **4. DESENVOLVIMENTO**

### **4.1. ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS COM ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI CA IX**

#### **4.1.1. Anticorpo monoclonal murino IgG1 G250**

O anticorpo monoclonal murino IgG1 G250 foi um dos primeiros anticorpos anti-CA IX a ser desenvolvido e testado para tratamento do ccRCC. Os estudos pré-clínicos realizados em modelo *in vivo* e em experimentos de perfusão *ex vivo* de rins contendo tumores testaram o potencial de aplicabilidade desta molécula



principalmente como agente para bioimageamento, conjugada com  $^{99m}\text{Tc}$  ou  $^{125}\text{I}$  sem focarem na avaliação de respostas clínicas[26-28].

A radioimunoterapia (RIT) é uma combinação entre radioterapia e imunoterapia na qual anticorpos monoclonais são utilizados para fazer o direcionamento seletivo de radionuclídeos contra antígenos específicos expressos na superfície de células tumorais. Isso permite uma entrega de alta dose de radiação terapêutica à células cancerosas, minimizando a exposição de células normais e diminuindo a toxicidade associada à radiação [29]. Divgi *et al.* realizaram testes clínicos de fase I e II com  $^{131}\text{I}$ -mG250 em 33 pacientes com RCC metastático utilizando doses distintas de  $^{131}\text{I}$  (30, 45, 60, 75 e 90 mCi /  $\text{m}^2$ ) para 10 mg de mAb G250 injetados numa dose única. Os resultados se mostraram ótimos para visualização de tumores com 2 cm ou mais de diâmetro, no entanto foi observada toxicidade hepática transitória em doses superiores a 45 mCi/ $\text{m}^2$ . Na fase II, 15 pacientes foram tratados com 90 mCi/ $\text{m}^2$  que foi determinada como a máxima dose tolerada (MTD). Os autores relatam que não houve resultados significativos enquanto terapia, porém, 27 dos 33 pacientes apresentaram estabilização da doença. Todos os pacientes desenvolveram HAMA em quatro *semanas*, impossibilitando a repetição do tratamento [30-32].

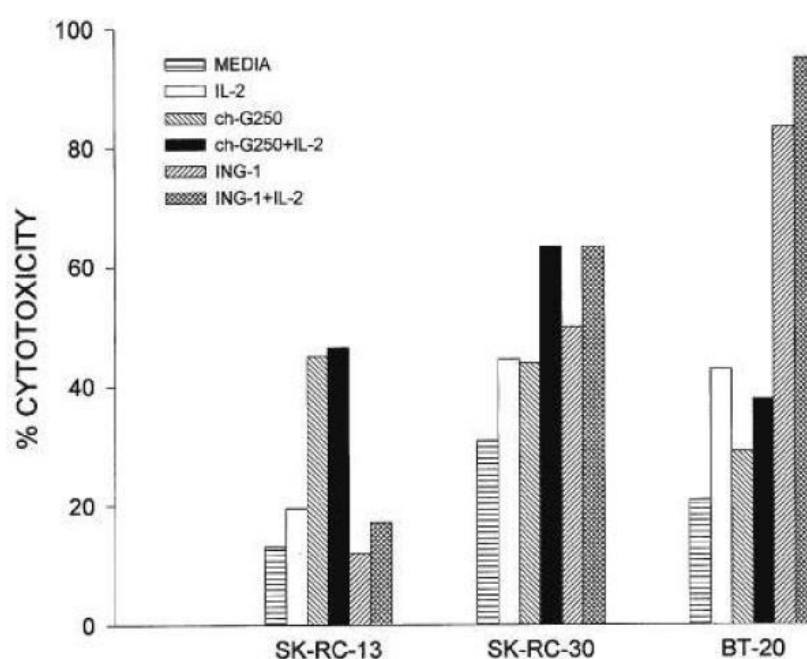
Como prova de conceito, Muselaers e colaboradores objetivaram comparar a radioimunodeteção e RIT utilizando a marcação com os elementos  $^{111}\text{In}$  e  $^{177}\text{Lu}$  conjugados a G250 para ccRCC. No geral, ambos os mAbs foram capazes de detectar diferentes níveis de CA IX após 48h da injeção destes nos camundongos, analisando a eficácia para o tratamento,  $^{177}\text{Lu}$  teve um melhor desempenho. O grupo tratado com o mAb contendo  $^{111}\text{In}$  teve uma sobrevivência geral (OR) de 53 dias, enquanto o controle transplantado com ccRCC teve OR de 49 dias. No entanto, para o G250 conjugado a  $^{177}\text{Lu}$ , a OR foi de 139 dias, o que indica que este radionuclídeo poderia ter desempenho superior na detecção e tratamento de ccRCC [33]

Outro estudo, desenvolvido por Zatovicova *et al.* objetivou mostrar que o anticorpo G250 sem conjugação com radioisótopos podia ter também como alvo outros tumores não relacionados a RCC, utilizando células de carcinoma colorretal (ATCC) humano (HT-29) *in vivo*. O procedimento adotado

incluiu a divisão dos camundongos murinos em três grupos: o primeiro recebeu  $3 \times 10^5$  células (HT-29) de forma subcutânea e, após uma hora, o tratamento de 100  $\mu\text{g}/\text{dose}$  de mG250; o segundo foi transplantado com linfócitos tumorigênicos com aplicação da mesma dose de mG250 assim que o tumor era palpável; comparados a um o terceiro grupo controle com apenas tampão fosfato salino (PBS) após o transplante. Os dois grupos que receberam o tratamento com anticorpo demonstraram redução do peso do tumor quando comparados com o grupo controle, sendo melhor o resultado para o tratamento sequencial à da injeção das células HT-29 [34].

#### 4.1.2. Anticorpo monoclonal chimerico G250 (cG250) - uso isolado e associação com citocinas

Devido a suas limitações, o anticorpo G250 foi adaptado para uma versão quimérica humanizada utilizando a cadeia leve derivado da região variável do anticorpo monoclonal murino G250, conhecida como cG250, WX-G250 ou girentuximab. Surfus e colegas indicaram, num estudo pré-clínico *in vivo*, que o anticorpo cG250 poderia iniciar lise celular por ADCC em células CA IX positivas. Camundongos com xenoenxertos RCC humanos apresentaram regressão no tumor e demonstraram que a combinação com citocinas como IL-2 eram uma estratégia promissora para o tratamento desse tipo de doença (Figura 4) [35].



**Figura 4:** Especificidade do anticorpo quimérico G250 em ADCC com SK-RC-13, SK-RC-30 (células de carcinoma renal) e BT-20 (células de carcinoma de mama) analisadas por liberação de  $^{51}\text{Cr}$  por 4h. Os efetores foram células de sangue periférico (PBMC) obtidos de doadores saudáveis (controle) cultivados por 24h antes do ensaio em IL-2 100 U/mL, 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de ch-G250, 1  $\mu\text{g/mL}$  ING-1 e essas concentrações de anticorpos combinados com IL-2 a mesma concentração já citada. **Fonte:** Surfus et al. (1996) [35].

Liu *et al.* avaliou o efeito da adição de citocinas, como IL-2, IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$  combinada ao cG250 na ADCC promovida por PBMCs num período de sete dias. Foi observado que 10 IU/mL IL-2 manteve e aprimorou a ADCC mediada por cG250 por todo o período do estudo, resultando em 20 a 44% de citotoxicidade específica direcionada a células SK-RC-52. PBMCs sem pré-tratamento com IL-2 não apresentaram a capacidade de manter a ADCC após o segundo dia de incubação com as células tumorais [36]. Brouwers *et al.* estudou a possibilidade de suprarregulação da expressão de CA IX em RCC por citocinas como IL-2, interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) associados ao anticorpo monoclonal cG250. Para testar tal hipótese, cinco diferentes linhagens celulares humanas de RCC com diferentes níveis de expressão de CA IX foram recrutadas: SK-RC-52 (alta); SK-RC-7 (moderada) e SK-RC-10 (baixa); assim como duas linhagens que não expressam CA IX, sendo SK-RC-17 e SK-RC-59. Estas foram incubadas com concentrações de 0 a 5000 IU/mL das citocinas, por 1 ou 4 dias. A suprarregulação da expressão de G250 foi observada em células cultivadas na presença de IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ , sendo que a adição de IL-2 não apresentou efeito. Para ambos os IFNs, foi observada uma relação dose-resposta entre a expressão do antígeno G250, sendo o IFN- $\gamma$  o agente mais potente. Vale destacar que o efeito da combinação dos dois melhores IFNs, numa concentração de 50 IU/mL de cada um destes, revelou efeito sinérgico, resultando em uma superexpressão de G250 ainda maior do que a observada com o uso isolado de cada um dos IFNs [37].

Em estudos clínicos de fase II, feitos por Bleumer *et al.*, no qual 36 pacientes com RCC receberam 12 infusões de 50 mg do cG250, houve o desenvolvimento de elevados níveis HACA pelos pacientes, porém sem resultar em sintomas clínicos, e os pacientes mantiveram uma sobrevivência média pós estudo de 15 meses [38]. Davis *et al.* demonstraram a segurança de dosagens de variadas (5,10, 25, 50  $\text{mg/m}^3$ ) de cG250 em pacientes com RCC

metastático ou não passíveis de remoção por cirurgia. O grupo indicou que doses de até 50 mg/m<sup>2</sup> são seguras. Dos 13 pacientes testados, 1 paciente teve uma resposta completa, 9 pacientes tiveram estabilização da doença e três apresentaram progressão da doença [39]. Bleumer *et al.* realizaram um estudo com 35 pacientes utilizando o mesmo mAb, desta vez com infusões semanais realizadas durante 11 semanas em combinação com interleucina 2 em baixa dose (LD-IL-2) diariamente, seguido de monitoramento radiológico em pacientes com RCC progressivo. O tratamento teve baixa toxicidade, aumentou o número de células efetoras nos pacientes durante o teste, sendo que foi atingida resposta clínica durável em 8 pacientes (23%), sendo 3 com resposta objetiva parcial e 5 com estabilização a partir da 24<sup>o</sup> semana [40].

Quanto a associação com citocinas, testes clínicos de fase I e II com cG250 combinado com interleucina 2 (IL-2) e interferon-alpha (LD-IFN $\alpha$ ) demonstraram efeito sinérgico possibilitando taxas de sobrevivência de, respectivamente, 22 e 30 meses [41]. No entanto, uma análise de sobrevida livre de RCC e sobrevida global em 864 pacientes, sendo 431 tratados com placebo, concluiu que não houve diferença de sobrevida entre o grupo placebo e o tratado com a imunoterapia [42].

Apesar de apresentar certa eficiência terapêutica, a administração direta de citocinas como o TNF $\alpha$  e IFN  $\gamma$  em associação com anticorpos para de câncer apresenta toxicidade sistêmica com risco de vida ao afetar células endoteliais normais em vasos sanguíneos, tendo seu uso terapêutico restrito a tratamentos loco-regionais [16]. Para solucionar tal toxicidade, foi proposta a associação de cG250 fundida com o fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) e coadministrada com IFN  $\gamma$  em RCC de maneira isolada ou em associação. No processo de engenharia genética as subunidades de TNF foram alteradas para formar um dímero que auxiliaria a restringir sua atividade ao tratamento loco-regional, reduzindo significativamente sua toxicidade, sendo 10 vezes menor quando comparada a forma trimerizada. Este tratamento foi testado em linhagens celulares de RCC com diferentes níveis de expressão de CA IX (SC-RC-52 e SK-RC-17) e carcinoma de colo do útero (Me-180), além de linhagens sensíveis a TNF (HEWI – 164 S) e linhagens resistentes (WEHI-164 R) de fibrossarcoma de camundongo. Os autores observaram um perfil reduzido de toxicidade pré-

clínica na associação com a forma dimérica do TNF e uma a resposta antitumoral significativa - tamanho máximo do tumor para camundongos tratados com cG250-TNF com INF- $\gamma$  ao final do tratamento de 4-5 mm, enquanto os espécimes tratados com cG250 e INF- $\gamma$  tiveram tumores de até 11-12 mm, demonstrando o potencial anti-tumoral da combinação cG250-TNF com INF- $\gamma$  para RCC [43].

Os estudos realizados com cG250 em pacientes com carcinoma renal (RCC) indicaram o potencial de uso desse anticorpo para imunoterapia, sendo que este foi otimizado por uso em alta dosagem e, principalmente, em associação com citocinas [44, 45].

#### **4.1.3. Anticorpo monoclonal chimerico G250 (cG250) conjugado com radionuclídeos**

Em 1999, um estudo determinou a dose máxima de  $^{131}\text{I}$  cG250 em RCC metastático como 2220 MBq / m<sup>2</sup>, sem haver toxicidade hepática e apenas com efeitos adversos de grau um, como náusea moderada sem vômito e fadiga transitória [44]. Posteriormente foram realizados estudos clínicos com anticorpo  $^{131}\text{I}$  cG250 associado à IL-2 onde 9 pacientes receberam seis doses de cG250 (10 mg/m<sup>2</sup>/semana), sendo a primeira e a quinta dose marcadas com  $^{131}\text{I}$  e 1,25x10<sup>6</sup> IU/m<sup>2</sup>/dia de IL-2 por seis semanas. Nenhum evento adverso foi atribuído ao cG250, 2 pacientes necessitaram redução de 50% da dose de IL-2 devido a toxicidade. Foi observado um aumento de células CD3- / CD16 + CD56 + NK circulantes e alguns pacientes apresentaram citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) melhorada, mas nenhuma resposta antitumoral objetiva foi observada [46].

A estabilidade, biodistribuição e o efeito terapêutico de alguns radioimunoconjugados -  $^{131}\text{I}$ ,  $^{88/90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  e  $^{186}\text{Re}$  – com cG250 para RCC (SK-RC-52) foi testada em estudos conduzidos por Brouwers *et al.* Os radionuclídeos  $^{90}\text{Y}$  e  $^{177}\text{Lu}$  levaram a maiores doses de radiação no tumor e foram considerados melhores candidatos para a RIT do que o convencional  $^{131}\text{I}$  com cG250 [47].

Algumas dessas conjugações foram testadas em ensaios clínicos, como no trabalho de fase I desenvolvido por Stillebroer e colaboradores que determinou a máxima dose tolerada (MTD) com múltiplas infusões com lutécio em

girentuximab ( $^{177}\text{Lu}$ -cG250). A MTD foi de 2405 MBq/m<sup>2</sup> dado que doses maiores poderiam gerar mielotoxicidade (caraterística do que é destrutivo para medula óssea e/ou qualquer um dos seus componentes) [48]. Muselaers *et al.* utilizou o mesmo elemento para investigar pacientes com câncer metastático no fígado. Nesse estudo de fase II, quarenta pacientes receberam 2405 MBq/ m<sup>2</sup> de  $^{177}\text{Lu}$ -girentuximab intravenoso, e na ausência de progressão da doença e toxicidade, foram selecionados para retratamento após três meses com 75% dadose ativa previamente. A média de sobrevivência livre de progressão (PFS) para todos os pacientes do estudo foi de 8,1 meses [49].

O anticorpo cG250 é um anticorpo muito eficiente para reconhecer o RCC de células claras, com favorável farmacocinética e baixa toxicidade, podendo gerar ADCC quando em combinação com citocinas. No entanto, em relação à resposta objetiva tal anticorpo apresenta pouca atividade antitumoral como agente único para o tratamento de pacientes com doença renal metastática avançada.

#### **4.1.4. cG250 e outras associações**

O trabalho de Oosterwijk-Wakka *et al.* testou a associação de cG250 a três inibidores de tirosina quinase (TKIs): sorafenibe, sunitinibe, e vandetanibe. Camundongos portadores de xenoenxertos de RCC humanos foram tratados utilizando o seguinte esquema terapêutico: 35 mg/kg de sunitinibe ou 50 mg/kg de sorafenibe ou 50 mg/kg vandetanibe, todos via oral por 7 ou 14 dias. Todos os camundongos receberam de forma intravenosa 185 kBq/5 $\mu$  de  $^{125}\text{I}$ -cG250. Como resultado (Figura 5), o grupo destaca que sorafenibe e vandefenibe tem a menor porcentagem de captação pelo tecido em 24h, e a maior é com sunitinib em 7 dias [50].

Tendo sunitinib o melhor desempenho dentre os inibidores, Oosterwijk-Wakka *et al.* analisou sua associação de cG250 para o tratamento de xenoenxertos humanos de RCC (SK-RC-52 e NU12) em camundongos. Estes foram injetados por via intravenosa com  $^{111}\text{In}$ -cG250 (0,4 MBq, 5 $\mu$ ) 3 dias pré ou após o tratamento com o sunitinib 40 a 50 mg/kg/dia oralmente, por 7 ou 14 dias. Como resultado, no modelo NU12, o tratamento prévio com sunitinib gerou uma redução da captação de anticorpos pelo tumor. Essa queda na captação dos anticorpos foi menos pronunciada em trabalhos anteriores do grupo em que

inibidor e mAb foram administrados simultaneamente. A captação de anticorpos não foi afetada quando o tratamento com sunitinibe ocorreu três dias após a administração do anticorpo, mostrando ser uma via preferencial para essa associação. Análises de microscopia demonstraram a presença de um menor número de células tumorais viáveis no grupo tratado com sunitinib, aparentemente devido a destruição massiva dos microvasos do tumor [51].

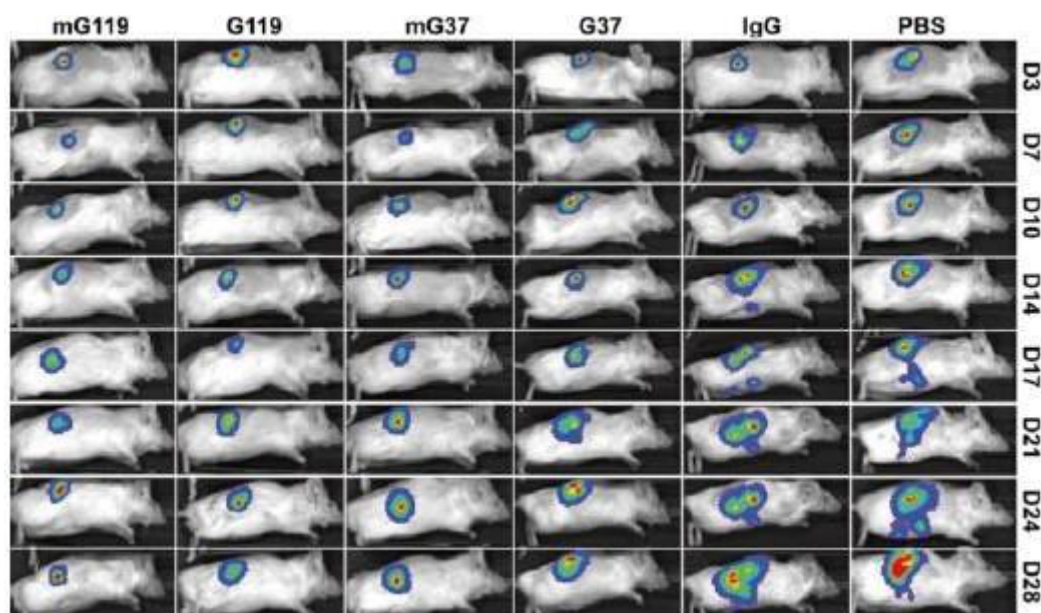
#### **4.1.5. Anticorpos derivados de *Phage Display***

O *Phage Display* é uma tecnologia de seleção *in vitro* que não depende da resposta imune *in vivo* e pode ser usada para descobrir anticorpos para diversos tipos de antígenos. A abordagem é baseada no trabalho de George P. Smith sobre o fago filamentosso *E. coli* M13 e a fusão de peptídeos às proteínas do envelope do fago, o que permite a seleção fenotípica do fragmento de gene codificador [52]. Alguns trabalhos foram desenvolvidos utilizando esta tecnologia para selecionar novos anticorpos anti-CA IX. Dois mAbs foram reportados por Ahlskog *et al.* (2009) com as denominações A3 e CC7. Estes apresentaram alta afinidade com CA IX, porém não há testes, até o presente momento, que demonstrem eficácia antitumoral [53].

Xu *et al.* questionaram se anticorpos direcionados a outro epítopo (menor porção de um antígeno que gera uma resposta imune) de CA IX podem ser mais efetivos do que G250 em recrutar células efetoras até o sítio tumorigênico, antagonizando os efeitos de proliferação e transformações mediadas por CA IX. Como estratégia para responder essa questão, os pesquisadores desenvolveram um painel de anticorpos monoclonais humanos de alta afinidade anti-CA IX e testado contra RCC. De todos os quarenta anticorpos testados, apenas seis exibiram diferentes graus de efetividade para induzir internalização de CA IX expresso na superfície. Os anticorpos G119 e G36 permitiram a internalização em endossomos [54].

Chang *et al.* testaram anticorpos humanos anti-CA IX em carcinoma renal de células claras (ccRCC) SK-RC-09 (CA IX altamente expressa), SK-RC-52 (CA IX moderadamente expressa) e SK-RC-59 (CA IX não expressa) *in vitro*. Os fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) G37 e G39 foram escolhidos devido a habilidade de inibir a atividade da CA, mas não a internalizar. G10, G36

e G119, que internalizam CA IX, mostraram comparável ativação de ADCC em relação aos não internalizados. Ainda, todos os anticorpos monoclonais limitam a migração de RCC, sendo G37 com a menor porcentagem de migração (90%, enquanto o controle 100%), seguido por G119 com quase a mesma taxa de migração, classificados como alta e moderada, respectivamente, pelos autores. Testes *in vivo* feitos em camundongos utilizou células mononucleadas de sangue humano alogênico periférico (PBMC) para mediar a inibição do crescimento de tumores RCC. Após 28 dias, os camundongos tratados com PBS ou partes irrelevantes de IgG apresentaram, partindo de imageamento por bioluminescência (BLI), região de interesse (ROI) entre  $6-7 \times 10^7$  enquanto os indivíduos que receberam mG119 apresentaram ROI menor que  $2 \times 10^7$ , o que representa uma diferença significativa na taxa de progressão do crescimento dos tumores (Figura 6) [55].



**Figura 6:** Acompanhamento do crescimento de tumores RCC com o tratamento de mAbs anti-CA IX com imageamento por bioluminescência (BLI). **Fonte:** Adaptado de Chang *et al.* (2015) [55].

#### 4.1.6. Outros anticorpos monoclonais

Estudos conduzidos por Zatovicova *et al.* permitiram o desenvolvimento de anticorpos monoclonais murinos direcionados ao sítio



catalítico da CA IX, incluindo o mAb VII/20 capaz de induzir internalização mediada por receptores de forma eficiente [56]. O mesmo grupo testou esse anticorpo num modelo de xenoenxerto em camundongo para a análise da ação do anticorpo em células de carcinoma colorretal. O anticorpo mostrou potencial para internalização testada em células CLG3 que expressam altos níveis de CA IX à 37°C. Na testagem com camundongos, dois esquemas terapêuticos diferentes foram adotados: no primeiro, as células tumorais foram injetadas e o tratamento foi administrado imediatamente por via intravenosa; no segundo, o camundongo recebeu o tratamento após a formação do tumor, no dia 10. Em ambos os casos, a administração ocorreu duas vezes por semana, durando 39 e 28 dias, respectivamente. O peso do tumor controle atingiu 180 mg, enquanto o peso atingido pelo tumor no espécime que recebeu o tratamento imediato (IT) foi de 20 mg; já o tumor submetido a tratamento tardio atingiu 100 mg, mostrando que o mAb selecionado gerou grande redução do tumor para o tratamento IT e uma regressão significativa para o tratamento tardio (LT). Isso indica que o tratamento IT limita o crescimento do tumor, mas o mAb tem um efeito menos expressivo quando o tumor está estabelecido antes do início do tratamento [57].

Petruš *et al.* estudou os anticorpos monoclonais com afinidade de ligação, numa ordem nanomolar de um único dígito para CAIX foram derivados por *panning* para o ecdomínio recombinante de CAIX contra a biblioteca MorphoSys HUCAL Gold de fragmentos de anticorpos (Fabs) humanos. Os Fabs de altíssima afinidade foram convertidos em IgGs de comprimento total e submetidos a caracterização adicional com base em sua avidéz e seletividade para CA IX, sua capacidade de internalização em células expressando CA IX, e seu direcionamento seletivo para tumores xenoenxertados humanos positivos para CAIX quando administrados a camundongos como conjugados fluorescentes. Destes, apenas 3ee9 (BAY 79-4620) e 1aa1 foram seletivos para CA IX, enquanto os outros não foram seletivos e coprecipitaram muitas proteínas além da CA IX. O anticorpo BAY 79-4620, conjugado a monometil auristatina não se ligou a outras 13 CAs testadas pelo grupo. O anticorpo BAY 79-4620 foi testado num modelo *in vitro* de câncer no pâncreas mostrou eficácia antitumoral,

apresentando regressão de 20%, 90%,100% e 100% de inibição total de crescimento (TGI) nas doses de 1.25, 2.5, 5 e 10 mg/kg, respectivamente [58].

Já o mAb chKM4927 foi testado em um estudo pré-clínico no qual demonstrou atividade antitumoral em células tumorais que expressam CA IX. Os anticorpos foram isolados de hibridomas e selecionadas pela capacidade de se ligar a células HT-29. Testes *in vitro* mostraram a capacidade do mAb em se direcionar apenas a CA IX e nenhuma outra anidrase carbônica. Os autores também mostraram que 10 µg/mL foi suficiente para causar ADCC. Modificações foram feitas no anticorpo para diminuir ADCC, sendo chamado de chKM4927\_N297D. Este foi injetado de forma subcutânea em camundongos numa dosagem de 10 mg/kg, assim como o mAb inicial e o controle com PBS. Após 18 dias, o chKM4927 apresentou ação antitumoral, enquanto o mAb modificado só apresentou esta atividade após 32 dias. Os autores argumentam que outros fatores podem ter interferido nos resultados, como a concentração de CA IX e a presença de biomarcadores [59].

Lin *et al.* (2017) demonstra que um anticorpo anti-CA IX (IgG direcionado ao domínio da CA IX) modificado para expressar superfícies lisossômicas e com triptólido encapsulado (TLP) pode aumentar significativamente a captação celular e de esferoides tumorais para aumentar a citotoxicidade de TPL em células cancerosas CA IX-positivas. Análises *in vitro* mostrou que o TPL liberado a partir desses anticorpos pode ser sustentado por até 96h, e a biodistribuição *in vivo* não foi diferente: após 96h os lipossomas ainda foram detectados em camundongos. Os lipossomos TPL não direcionados podem prolongar a sobrevivência média em camundongos por no máximo 71 dias, enquanto os lipossomos TPL direcionados aumentam essa taxa para 90 dias, o que indica a melhora de prognóstico em camundongos e abre caminho para uma possível terapia [60].

#### **4.2. ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS COM RECEPTORES QUÍMICOS DE ANTÍGENO (CAR) ANTI-CAIX**

Receptores quiméricos de antígeno (CAR) são uma estratégia de imunoterapia na qual células do sistema imunológico (linfócitos T e NK) são

modificadas por engenharia genética para expressar um receptor sintético que se liga a um antígeno específico. Essa estratégia já é clinicamente utilizada em pacientes com diversos tipos de carcinomas, sendo que CAR T já foi aprovada pelo FDA (food and drug administration) para o tratamento de alguns tipos de leucemias e linfomas CD19 positivos[61]. Neste sentido, alguns trabalhos, clínicos e pré-clínicos *in vitro* e/ou *in vivo*, foram desenvolvidos utilizando esta tecnologia com direcionamento a CAIX para o tratamento de carcinomas.

Lamers *et al.* realizou um estudo clínico para verificar a segurança de um receptor scFv desenvolvido com base no anticorpo murino G250 de forma que o receptor scFv(G250) fosse expresso na superfície de linfócitos T humanos primários, permitindo o reconhecimento de CA IX e ativação de funções efetoras como produção de citocinas, resultando em citotoxicidade de RCC *in vitro*. O protocolo aplicado tratou 3 pacientes com linfócitos T scFv (G250)-transduzidas num esquema de doses intravenosas totalizando  $2.13 \times 10^9$  células para o paciente 1,  $0.43 \times 10^9$  células para o paciente 2, e  $0.38 \times 10^9$  células para o paciente 3. Apesar do tratamento ser inicialmente bem tolerado, após cinco infusões, houve o desenvolvimento de distúrbios das enzimas hepáticas atingindo classificação 2-4 graus nos Critérios Comuns de toxicidade (CTC) do National Institute of Cancer. Isso fez com que o tratamento fosse interrompido nos pacientes 1 e 3, necessitando tratamento com corticoides no paciente 1 e redução da dose máxima no paciente 2 para  $2 \times 10^8$  células. Após o tratamento, os pacientes apresentaram progressão da doença entre os dias 36 e 106. Para elucidar as causas da toxicidade no fígado, uma biopsia foi feita no paciente e os autores apontam que esta toxicidade foi gerada pelo ataque do CAR a células epiteliais do duto biliar CA IX positivas. As técnicas citadas acima foram utilizadas e determinaram que a detecção dos anticorpos na circulação dos pacientes foi de 32 dias por citometria de fluxo e 53 dias por PCR [62].

Lamers *et al.*, utilizando o CAR de primeira geração scFv(G250) - CD4TM- $\gamma$ , resumiu os achados de um estudo clínico que divide 11 pacientes em três grupos, sendo o primeiro grupo descrito no trabalho acima citado. No segundo grupo, 5 pacientes foram tratados com células CAR T numa estratégia clínica convencional de fase I, com o máximo de 10 infusões de linfócitos T CAR nos dias 1-5 e 29-33 em associação com IL-2 ( $5 \times 10^5$  IU/m<sup>2</sup>) duas vezes ao dia

nos dias 1-10 e 29-38. Os pacientes receberam como menor dose  $1 \times 10^8$  células CAR T, sendo que 2 pacientes desenvolveram toxicidade no fígado de grau 3 CTC após 10 e 3 infusões, respectivamente. Os 3 pacientes do terceiro grupo foram tratados como os pacientes do segundo grupo, com a adição de uma estratégia para bloquear o reconhecimento do antígeno cognato no tecido normal do fígado: uma infusão intravenosa extra de 5 mg do mAb anti-CAIX cG250 três dias antes do início das infusões de células CAR T objetivando bloquear as células do tecido normal e deixar disponível apenas as CA IX do sítio tumora;. Células CAR T foram detectáveis em todos os pacientes do segundo e terceiro grupo após a primeira série de infusões (dias 1-5) e persistiram até o dia 29, quando se iniciou o segundo ciclo de tratamento (dias 29-33). Após o tratamento, as células foram detectáveis por 2-18 para o segundo grupo e 18-34 dias para o terceiro. Nenhum paciente do terceiro grupo precisou ter o tratamento interrompido devido à toxicidade. Os pacientes do terceiro grupo, tratados com o mAb, não apresentaram HACA. Nenhuma resposta clínica foi obtida e a média de sobrevivência geral dos pacientes foi de 9.5 meses [63].

Em 2013, Lamers e colaboradores estenderam suas observações num novo estudo com nove pacientes com RCC metastático com objetivo de obter a MTD para células CAR T desenvolvidas pelo grupo, observar o efeito da redução das doses na estratégia terapêutica, testar o uso do anticorpo monoclonal cG250 como estratégia de pré-tratamento para redução ou eliminação da toxicidade e possivelmente possibilitar o uso de doses maiores de células CAR T. O bloqueio efetivo de interações entre o CAR e a CA IX determinado *in vitro* usando linhagens celulares de RCC só é observado em concentrações acima de 10  $\mu\text{g/mL}$  de anti-CAIX mAb. Uma vez que nenhum dos pacientes pré-tratados com o mAb apresentou sinal de distúrbio das enzimas hepáticas, pode-se concluir que a estratégia ajudar a mitigar os efeitos de toxicidade a tecidos normais e permite o tratamento com células CAR T. A MTD não foi obtida e nem foi constatada a dose de células CAR T que gera resposta antitumoral eficaz no tratamento combinado de CAR e anticorpo monoclonal [64].

Em 2014, a fim de melhorar a eficácia da terapia com linfócitos T, Lamers e colaboradores redefiniram as condições *in vitro* para gerar linfócitos T modificadas por genes com um fenótipo jovem, testando várias condições de

ativação e expansão de linfócitos T baseadas no mAb anti-CD3 / CD8 , bem como citocinas antes e depois da transferência de genes usando os receptores CAIX CAR e MAGE-C2 (ALK) / HLA-A2 TCR. Suas descobertas sugerem que o uso de mAbs sCD3 + CD28 com IL-15 e IL-21 desde o início da ativação de linfócitos T induz linfócitos T CAR com expressão aumentada do receptor, uma proporção aumentada de linfócitos T CD8 +, uma proporção menor de linfócitos T CD4 + CD25 + CD127 e também função específica mediada por receptor melhorada [65].

Suarez *et al.* desenvolveram células CAR T direcionadas a CA IX utilizando um vetor antiviral bicistrônico para expressar o scFv anti-CA IX (G36) ligado a domínios de sinalização CD8 CD3-ζ (G36-CD28z CAR) no primeiro cassete e ligante humano anti-morte programada 1 (PD-L1) IgG1 or IgG4 em um cassete de segunda expressão depois de um sítio de entrada de ribossomo interno (IRES). Os lentivirus gerados foram transduzidos em linfócitos T CD8 e cultivamos na presença de IL-21, rendendo uma proliferação moderadamente melhorada de células CAR T quando comparada a IL-2, mantendo a atividade específica de gerar a morte em células de RCC que são CA IX positivas. Linfócito T CD8 transduzidas com todos os CARs atingiram níveis de transdução de 65-90% após 4 dias na presença de IL-21 e beads anti-CD8/CD28. A estabilidade de expressão a longo prazo do CAR manteve-se em torno de 20-50% para todos os CAR após 14 dias. A determinação de níveis totais de IgG secretado por CD8+ transduzido alcançou 300-650 ng/mL após quatro dias. Após a indução de exaustão, um decréscimo de 50% na exaustão de marcadores LAG-3, TIM-3 e PD-1 foi apresentada pelo anti-CAIX CAR T secretor de anti-PD-L1 IgG1 e IgG4, o que mostra que o bloqueio do *checkpoint* provocado pelos IgGs anti-PD-L1 secretados pode resultar numa exaustão de linfócitos T diminuída. As linfócitos T CAR anti-CAIX que secretam IgGs anti-PD-L1 foram capazes de induzir cerca de 60% de ADCC em células CAIX + / PD-L1 + RCC quando incubadas com células natural killer (NK). Um modelo NSG ortotópico RCC foi usado com injeção de células SK-RC-59 CAIX + / PD-L1 + / luciferase + RCC sob a cápsula renal seguida por uma injeção intravenosa de  $1.0 \times 10^7$  CAR T ou linfócitos T não transduzidas. O tratamento foi repetido no dia 17 com uma dose inferior ( $2,5 \times 10^6$ ) das mesmas células. Como resultado, após um mês, o grupo de camundongos tratados com células CAR T que

secretam anticorpos anti-PD-L1 tinha tumores 5 vezes menores do que os grupos de controle. No geral, seus resultados demonstram que linfócitos T anti-CAIX CAR que secretam IgG1 ou IgG4 anti-PD-L1 podem diminuir a exaustão de linfócitos T e melhorar o tratamento de linfócitos T CAR de ccRCC *in vivo* [66]. Zhang et al. apresenta uma estratégia que combina Bortezomibe – um inibidor de proteassoma para o tratamento da doença de mieloma múltiplo recidivado - com um CAR-NK-92 de terceira geração específico para CAIX (CAIX-CAR-NK92), consistindo em um scFv de um anticorpo monoclonal anti-CAIX (G250), dobradiça (hinge) CD8 e regiões transmembranares, e domínios de sinalização intracelulares de CD28, CD137 e CD3 $\zeta$ . As células Ketr-3 e OSRC-2 foram tratadas com bortezomibe 10 nM por 24h a fim de testar a citotoxicidade dos CAR-NK92 e NK92. Os resultados demonstraram aumentar significativamente a sensibilidade das células Ketr-3 e OSRC-2 às células CAR-NK92 e células NK92 específicas de CAIX, de maneira que a eficácia sinérgica independia do antígeno. Para determinar a eficácia deste tratamento combinado para RCC CA IX positivo *in vivo*, foi utilizado um modelo de xenoenxerto subcutâneo em camundongos NOD / SCID usando a linhagem celular de câncer renal humano Ketr-3 expressando luciferase ( $3 \times 10^6$  células Ketr-3luc+ inoculadas por via subcutânea). Após cinco dias bortezomibe (5  $\mu$ g / camundongo) foi aplicado por injeção na cavidade peritoneal, seguido, após um dia, por  $2,5 \times 10^6$  células CAR-NK92 por injeção na veia da cauda. Como controle, eles também fizeram grupos que receberam apenas células NK92, células CAR-NK92 sem o uso de bortezomibe e apenas bortezomibe. Todos os grupos receberam injeção intraperitoneal diária de IL-2. Os resultados de imagem mostraram entre os dias 55 e 60 que o tumor do controle chegou a 2.000 mm<sup>2</sup>, seguido por Ctrl-NK92, CAR-NK92, Bortezomibe e CAR-NK92 + Bortezomibe, respectivamente, com menos de 1000 mm<sup>2</sup> [67].

Cui et al. desenvolveram um trabalho focado no uso de células CAR-T em quatro linhagens de células de glioblastoma (A172, LN229, T98G e U251) e duas linhagens de células-tronco de glioblastoma (GSC827 e GSC923) testadas *in vitro* e *in vivo*. Por meio da coloração imunohistoquímica, eles mostraram que cerca de 60% das 30 amostras de glioblastoma eram positivas para CAIX. A alta expressão de CAIX foi induzida por hipóxia, diferindo da baixa expressão apresentada em condições de cultivo padrão, exceto para GSC827.

U251 mostrou a maior sensibilidade à expressão de CAIX induzida por hipóxia quando comparado com as outras 3 linhagens celulares de glioblastoma, sendo utilizada para gerar um modelo de camundongo xenoinxerto ortotópico (camundongos NOD-Prkdcscidll2rgtmiWjl (NSG) intracranialmente inoculados com 100.000 células U251-luc). Um total de 2 milhões de linfócitos T anti-CAIX CAR-T ou linfócitos T transduzidas com vetor vazio (linfócitos T de controle) em 2 a 2,5  $\mu$ L de HBSS foram injetadas nos tumores após uma semana. Os resultados de imagem bioluminescentes demonstraram crescimento tumoral limitado e sobrevida prolongada dos camundongos com linfócitos T anti-CAIX CAR quando comparados ao controle, gerando cura completa de 20% dos camundongos tratados sem recorrência do tumor em 2 meses de acompanhamento. Eles também combinaram o bevacizumabe com o tratamento anti-CAIX CAR T observando um efeito antitumoral superior à terapia isolada [68].

Assim como no uso de bortezomibe ou bevacizumabe, Li et al. estudou um uso combinado de linfócitos T CAR anti-CAIX com sunitinibe. Para esse fim, um CAR de segunda geração direcionado para CA IX humana foi construído, usando um construto semelhante sem anti-CAIX-scFv como controle (Ctrl-CAR). A taxa positiva de expressão da superfície celular de c-myc em células CAIX-CAR-T e células Ctrl-CAR-T foi de 51,8% e 87,6%, respectivamente. O protocolo estabelecido pelo grupo de pesquisa resultou em um enriquecimento de células CAR-T citotóxicas CD8+ e de TSCM menos diferenciadas.. Usando concentrações variáveis de sunitinibe (0,625, 1,25, 2,5 ou 5  $\mu$ M), o estudo concluiu que ele não tem efeito negativo significativo na proliferação, liberação de citocinas e citotoxicidade das células CAIX CAR T em um ambiente clínico e que pode exercer uma terapêutica com efeitos sinérgicos contra RCC [69].

## 5. DISCUSSÃO

A imunoterapia focada anidrase carbônica XI foi escolhida como enfoque desta revisão bibliográfica, que abordou o uso de anticorpos monoclonais e/ou receptores quiméricos de antígeno contra este alvo. Diferentes estudos em fase clínica foram apresentados, todos envolvendo o anticorpo monoclonal chamado

de Girentuximab, Rencarex, cG250 ou derivados deste, sendo majoritariamente testados em pacientes com carcinoma renal. Dentre os resultados, podemos ressaltar o estabelecimento de dosagens que não geram citotoxicidade significativa na escala CTC, melhoria na citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC), com discreta melhora clínica quando conjugada a radionuclídeos ou associado a citocinas. É interessante observar que este anticorpo não foi desenvolvido com foco terapêutico e sim, para melhorar o diagnóstico de RCC, o que explica a baixa eficiência terapêutica deste.

Os estudos pré-clínicos, *in vivo* e *in vitro*, com anticorpos monoclonais tiveram produção mais significativa, representando cerca de 63% da produção científica aqui abordada. Os estudos foram realizados majoritariamente em linhagens celulares ou xenoinxertos de carcinomas renais, porém também foram feitos estudos com carcinoma colorretal, adenocarcinoma pancreático e carcinoma de colo do útero, sendo que que 14% destes estudos citaram diretamente diminuição de peso ou tamanho dos tumores estudados. Dentre as tentativas de produção de novos anticorpos anti-CAIX além do G250 e seus derivados, outros grupos de pesquisa desenvolveram os seguintes anticorpos que foram citados por terem resultados superiores em estudos pré-clínicos em comparação ao G250/cG250 e derivados. São eles os clones scFv de G119, G36, G37, G39 e G10, A3, CC7, VII/20, 1aa1, chKM4927, chKM4927\_N279D e BAY 79-4620. Ademais, os avanços apresentados colocam em perspectiva a tendência de que mais imunoterapias utilizando anticorpos monoclonais anti-CAIX sejam testadas clinicamente nos próximos anos.

Para a imunoterapia que utiliza linfócitos T ou NK CAR, onze trabalhos que apresentam desenvolvimento e testagem clínica e pré-clínica *in vivo* e *in vitro* foram selecionados, sendo testados para carcinoma renal e glioblastoma. Inicialmente, a perspectiva de que estas células modificadas tivessem toxicidade em tecidos hepáticos, gerando distúrbios de enzimas do fígado graves, adicionaram um maior grau de dificuldade em avaliar clinicamente sua ação anti-tumoral. Mas, nos últimos cinco anos, os trabalhos pré-clínicos apresentaram resultados efetivos, com e sem associação a inibidores, que colocam a luz à



necessidade de novos estudos clínicos desenvolvidos com as gerações mais recentes de CAR T e NK.

## 6. CONCLUSÃO

Enquanto alvo, a anidrase carbônica IX foi extensamente testada como marcador endógeno de hipóxia em diversos tipos de tumores que a superexpressam, se provando um alvo efetivo para o direcionamento de imunoterapias como anticorpos monoclonais e receptores quiméricos de antígeno em células T e NK.

O anticorpo monoclonal cG250 e derivados deste se mostraram um dos principais anticorpos monoclonais explorados para o imageamento e tratamento de tumores, algumas vezes em associação à citocinas, por pesquisadores que utilizaram a CA IX como alvo no período de análise deste estudo. Esse anticorpo monoclonal apresenta eficácia no auxílio de diagnóstico por imagem para células de variados tipos de câncer, porém baixa eficácia terapêutica quando utilizado sem associações. Dado que o cG250 é o único anticorpo testado clinicamente tendo como alvo a CA IX, há ainda, como apresentado acima, uma gama de novos anticorpos desenvolvidos como terapia que podem fornecer uma nova perspectiva para estudos clínicos na área, enunciando melhores prognósticos para pacientes com carcinoma renal e outros tipos de carcinoma.

Assim como para anticorpos monoclonais, há potencial inexplorado clinicamente nos receptores quiméricos de antígeno em células T e NK, dado que a toxicidade destes - nas doses adotadas em estudos iniciais - interferiram na observação de seu efeito terapêutico e no aprimoramento da imunoterapia. Com o desenvolvimento de novas gerações de CAR e de estratégias que impeçam a toxicidade aos tecidos que expressam CA IX em seu funcionamento normal, se torna evidente a necessidade do desenvolvimento de novos estudos clínicos que explorem o potencial observado nos trabalhos pré-clínicos mais recentes, feitos *in vitro* e *in vivo*.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Robert McKenna, R.M.S.C.F.S.C.F., *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*. 1 ed. Subcellular Biochemistry 75. 2014: Springer Netherlands.
2. McDonald, P.C., et al., *Recent Developments in Targeting Carbonic Anhydrase IX for Cancer Therapeutics*. *Oncotarget*, 2012. **3**(1): p. 84-97.
3. Thacker, P.S., et al., *Design, synthesis and biological evaluation of coumarin-3-carboxamides as selective carbonic anhydrase IX and XII inhibitors*. *Bioorg Chem*, 2019. **86**: p. 386-392.
4. Waheed, A. and W.S. Sly, *Carbonic anhydrase XII functions in health and disease*. *Gene*, 2017. **623**: p. 33-40.
5. Mahon, B.P., M.A. Pinard, and R. McKenna, *Targeting carbonic anhydrase IX activity and expression*. *Molecules*, 2015. **20**(2): p. 2323-48.
6. Lau, J., K.-S. Lin, and F. Bénard, *Past, Present, and Future: Development of Theranostic Agents Targeting Carbonic Anhydrase IX*. *Theranostics*, 2017. **7**(17): p. 4322-4339.
7. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. *Nature*, 1999. **399**(6733): p. 271-275.
8. Takacova, M., et al., *Carbonic Anhydrase IX-Mouse versus Human*. *Int J Mol Sci*, 2019. **21**(1).
9. Pezzuto, A. and E. Carico, *Role of HIF-1 in Cancer Progression: Novel Insights. A Review*. *Curr Mol Med*, 2018. **18**(6): p. 343-351.
10. Nocentini, A. and C.T. Supuran, *Carbonic anhydrase inhibitors as antitumor/antimetastatic agents: a patent review (2008-2018)*. *Expert Opin Ther Pat*, 2018. **28**(10): p. 729-740.
11. Janoniene, A. and V. Petrikaite, *In Search of Advanced Tumor Diagnostics and Treatment: Achievements and Perspectives of Carbonic Anhydrase IX Targeted Delivery*. *Mol Pharm*, 2020. **17**(6): p. 1800-1815.
12. Zhang, Y. and Z. Zhang, *The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications*. *Cell Mol Immunol*, 2020. **17**(8): p. 807-821.
13. Lisa H. Butterfield, F.M.M.H.L.K., *Cancer Immunotherapy Principles and Practice*. 1 ed. 2017: Springer.
14. Russell, L. and K.W. Peng, *The emerging role of oncolytic virus therapy against cancer*. *Chin Clin Oncol*, 2018. **7**(2): p. 16.
15. Hollingsworth, R.E. and K. Jansen, *Turning the corner on therapeutic cancer vaccines*. *NPJ Vaccines*, 2019. **4**: p. 7.
16. Conlon, K.C., M.D. Miljkovic, and T.A. Waldmann, *Cytokines in the Treatment of Cancer*. *J Interferon Cytokine Res*, 2019. **39**(1): p. 6-21.
17. Wilky, B.A., *Immune checkpoint inhibitors: The linchpins of modern immunotherapy*. *Immunol Rev*, 2019. **290**(1): p. 6-23.
18. DOS SANTOS, R.V., et al., *Aplicações terapêuticas dos anticorpos monoclonais*. 2006, *Rev. bras. alerg. imunopatol.* p. 78-85.
19. June, C.H., et al., *CAR T cell immunotherapy for human cancer*. *Science*, 2018. **359**(6382): p. 1361-1365.
20. Rafiq, S., C.S. Hackett, and R.J. Brentjens, *Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020. **17**(3): p. 147-167.

21. Chen, Q., et al., *The importance of Src signaling in sarcoma*. *Oncology Letters*, 2015. **10**(1): p. 17-22.
22. Singh, A.K. and J.P. McGuirk, *CAR T cells: continuation in a revolution of immunotherapy*. *Lancet Oncol*, 2020. **21**(3): p. e168-e178.
23. Rafei, H., M. Daher, and K. Rezvani, *Chimeric antigen receptor (CAR) natural killer (NK)-cell therapy: leveraging the power of innate immunity*. *Br J Haematol*, 2021. **193**(2): p. 216-230.
24. Cui, J., et al., *Targeting hypoxia downstream signaling protein, CAIX, for CAR T-cell therapy against glioblastoma*. *Neuro Oncol*, 2019. **21**(11): p. 1436-1446.
25. Pautasso, M., *Ten simple rules for writing a literature review*. *PLoS computational biology*, 2013. **9**(7): p. e1003149-e1003149.
26. Oosterwijk E Fau - Ruiter, D.J., et al., *Monoclonal antibody G 250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney*. (0020-7136 (Print)).
27. van Dijk, J., et al., *Localization of monoclonal antibody G250 and bispecific monoclonal antibody CD3/G250 in human renal-cell carcinoma xenografts: relative effects of size and affinity*. (0020-7136 (Print)).
28. van Dijk, J., et al., *Perfusion of tumor-bearing kidneys as a model for scintigraphic screening of monoclonal antibodies*. *J Nucl Med*, 1988. **29**(6): p. 1078-82.
29. Larson, S.M., et al., *Radioimmunotherapy of human tumours*. *Nat Rev Cancer*, 2015. **15**(6): p. 347-60.
30. Divgi, C.R., et al., *Phase I/II radioimmunotherapy trial with iodine-131-labeled monoclonal antibody G250 in metastatic renal cell carcinoma*. (1078-0432 (Print)).
31. Oosterwijk, E., et al., *Antibody localization in human renal cell carcinoma: a phase I study of monoclonal antibody G250*. (0732-183X (Print)).
32. Oosterwijk, E., et al., *Monoclonal antibody-based therapy for renal cell carcinoma*. *Urol Clin North Am*, 2003. **30**(3): p. 623-31.
33. Muselaers, C.H.J., et al., *Optimizing lutetium 177-anti-carbonic anhydrase IX radioimmunotherapy in an intraperitoneal clear cell renal cell carcinoma xenograft model*. *Molecular Imaging*, 2014. **13**: p. 1-7.
34. Zatovicova, M., et al., *Monoclonal antibody G250 targeting CA IX: Binding specificity, internalization and therapeutic effects in a non-renal cancer model*. *International Journal of Oncology*, 2014. **45**(6): p. 2455-2467.
35. Surfus, J.E., et al., *Anti-renal-cell carcinoma chimeric antibody G250 facilitates antibody-dependent cellular cytotoxicity with in vitro and in vivo interleukin-2-activated effectors*. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*, 1996. **19**(3): p. 184-91.
36. Liu, F.E.S.C.R.Z., *Anti-renal cell carcinoma chimeric antibody G250: cytokine enhancement of in vitro antibody-dependent cellular cytotoxicity*. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2002. **51**(3): p. 171-177.
37. Brouwers, A.H., et al., *Interferons Can Upregulate the Expression of the Tumor Associated Antigen G250-MN/CA IX, a Potential Target for (Radio)Immunotherapy of Renal Cell Carcinoma*. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 2003. **18**(4): p. 539-547.
38. Bleumer, I., et al., *A phase II trial of chimeric monoclonal antibody G250 for advanced renal cell carcinoma patients*. *British Journal of Cancer*, 2004. **90**(5): p. 985-990.

39. Davis, I.D., et al., *A phase I multiple dose, dose escalation study of cG250 monoclonal antibody in patients with advanced renal cell carcinoma*. *Cancer Immun*, 2007. **7**: p. 13.
40. Bleumer, I., et al., *A Clinical Trial With Chimeric Monoclonal Antibody WX-G250 and Low Dose Interleukin-2 Pulsing Scheme for Advanced Renal Cell Carcinoma*. *Journal of Urology*, 2006. **175**(1): p. 57-62.
41. Siebels, M., et al., *A clinical phase I/II trial with the monoclonal antibody cG250 (RENCAREX®) and interferon-alpha-2a in metastatic renal cell carcinoma patients*. *World J Urol*, 2011. **29**(1): p. 121-6.
42. Chamie, K., et al., *Adjuvant Weekly Girentuximab Following Nephrectomy for High-Risk Renal Cell Carcinoma: The ARISER Randomized Clinical Trial*. *JAMA oncology*, 2017. **3**(7): p. 913-920.
43. Bauer, S., et al., *Targeted therapy of renal cell carcinoma: Synergistic activity of cG250-TNF and IFNg*. *International Journal of Cancer*, 2009. **125**(1): p. 115-123.
44. Steffens, M.G., et al., *Phase I radioimmunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with 131I-labeled chimeric monoclonal antibody G250*. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(10 Suppl): p. 3268s-3274s.
45. Stillebroer, A.B., *Radiolabeled antibodies in renal cell carcinoma*. *Cancer Imaging*, 2007. **7**(1): p. 179-188.
46. Davis, I.D., et al., *A pilot study of monoclonal antibody cG250 and low dose subcutaneous IL-2 in patients with advanced renal cell carcinoma*. *Cancer Immun*, 2007. **7**: p. 14.
47. Brouwers, A.H., et al., *Optimization of Radioimmunotherapy of Renal Cell Carcinoma: Labeling of Monoclonal Antibody cG250 with 131I, 90Y, 177Lu, or 186Re*. *Journal of Nuclear Medicine*, 2004. **45**(2): p. 327-337.
48. Stillebroer, A.B., et al., *Phase I radioimmunotherapy study with lutetium 177-labeled anti-carbonic anhydrase IX monoclonal antibody girentuximab in patients with advanced renal cell carcinoma*. *European urology*, 2013. **64**(3): p. 478-485.
49. Muselaers, C.H.J., et al., *Phase 2 Study of Lutetium 177-Labeled Anti-Carbonic Anhydrase IX Monoclonal Antibody Girentuximab in Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma*. *European Urology*, 2016. **69**(5): p. 767-770.
50. Oosterwijk-Wakka, J.C., et al., *Effect of tyrosine kinase inhibitor treatment of renal cell carcinoma on the accumulation of carbonic anhydrase IX-specific chimeric monoclonal antibody cG250: EFFECT OF TKIs ON THE ACCUMULATION OF CAIX-SPECIFIC cG250 IN RCC*. *BJU International*, 2011. **107**(1): p. 118-125.
51. Oosterwijk-Wakka, J.C., et al., *Successful Combination of Sunitinib and Girentuximab in Two Renal Cell Carcinoma Animal Models: A Rationale for Combination Treatment of Patients with Advanced RCC*. *Neoplasia*, 2015. **17**(2): p. 215-224.
52. Frenzel, A., T. Schirrmann, and M. Hust, *Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy*. *MAbs*, 2016. **8**(7): p. 1177-1194.
53. Ahlskog, J.K., et al., *Human monoclonal antibodies targeting carbonic anhydrase IX for the molecular imaging of hypoxic regions in solid tumours*. (1532-1827 (Electronic)).
54. Xu, C., et al., *Unique Biological Properties of Catalytic Domain Directed Human Anti-CAIX Antibodies Discovered through Phage-Display Technology*. *PLoS ONE*, 2010. **5**(3): p. e9625.

55. Chang, D.-K., et al., *Human anti-CAIX antibodies mediate immune cell inhibition of renal cell carcinoma in vitro and in a humanized mouse model in vivo*. *Molecular Cancer*, 2015. **14**(1): p. 119.
56. Zat'ovicová, M., et al., *Monoclonal antibodies generated in carbonic anhydrase IX-deficient mice recognize different domains of tumour-associated hypoxia-induced carbonic anhydrase IX*. (0022-1759 (Print)).
57. Zatovicova, M., et al., *Carbonic Anhydrase IX as an Anticancer Therapy Target: Preclinical Evaluation of Internalizing Monoclonal Antibody Directed to Catalytic Domain*. *Current Pharmaceutical Design*, 2010. **16**(29): p. 3255-3263.
58. Petrul, H.M., et al., *Therapeutic mechanism and efficacy of the antibody-drug conjugate BAY 79-4620 targeting human carbonic anhydrase 9*. (1538-8514 (Electronic)).
59. Yamaguchi, A., et al., *The novel CA IX inhibition antibody chKM4927 shows anti-tumor efficacy in vivo*. *Anticancer Research*, 2015. **35**(4): p. 1997-2004.
60. Lin, C., et al., *Pulmonary delivery of triptolide-loaded liposomes decorated with anti-carbonic anhydrase IX antibody for lung cancer therapy*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 1097.
61. Feins, S., et al., *An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer*. *Am J Hematol*, 2019. **94**(S1): p. S3-s9.
62. Lamers, C.H., et al., *Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience*, in *J Clin Oncol*. 2006: United States. p. e20-2.
63. Lamers, C.H., et al., *Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo-engineered T cells*. *Blood*, 2011. **117**(1): p. 72-82.
64. Lamers, C.H.J., et al., *Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma With CAIX CAR-engineered T cells: Clinical Evaluation and Management of On-target Toxicity*. *Molecular Therapy*, 2013. **21**(4): p. 904-912.
65. Lamers, C.H., et al., *T cell receptor-engineered T cells to treat solid tumors: T cell processing toward optimal T cell fitness*. *Hum Gene Ther Methods*, 2014. **25**(6): p. 345-57.
66. Suarez, E.R., et al., *Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model*. *Oncotarget*, 2016. **7**(23): p. 34341-55.
67. Zhang, Q., et al., *Bortezomib improves adoptive carbonic anhydrase IX-specific chimeric antigen receptor-modified NK92 cell therapy in mouse models of human renal cell carcinoma*. *Oncology Reports*, 2018.
68. Cui, J., et al., *Targeting hypoxia downstream signaling protein, CAIX, for CAR T-cell therapy against glioblastoma*. *Neuro-Oncology*, 2019. **21**(11): p. 1436-1446.
69. Li, H., et al., *CAIX-specific CAR-T Cells and Sunitinib Show Synergistic Effects Against Metastatic Renal Cancer Models*. *J Immunother*, 2020. **43**(1): p. 16-28.