

## FUNDAMENTOS MOLECULARES Y CELULARES DE LA INMUNOTERAPIA. USOS ACTUALES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO.

### MOLECULAR AND CELLULAR BASIS OF IMMUNOTHERAPY. CURRENT USES AND FUTURE PERSPECTIVES.

#### RESUMEN

A diario, el sistema inmune mantiene en nuestro organismo el frágil equilibrio que nos separa de la enfermedad, evitando comportamientos aberrantes de nuestras propias células o defendiéndonos de agresores externos. El conocimiento cada vez mayor de las interacciones moleculares y celulares en el desarrollo y progresión de diversas patologías permite la identificación de potenciales dianas terapéuticas para la curación o remisión de un amplio abanico de enfermedades. El uso combinado de la inmunoterapia con ingeniería genética permite dirigir al sistema inmune contra dianas específicas convirtiendo a la inmunoterapia en una herramienta altamente selectiva y con un gran potencial terapéutico. Sin embargo, las interacciones del sistema inmune con el resto de las células del organismo, el entorno que las rodea y entre los propios componentes de dicho sistema, hacen que su manejo sea complejo, obteniéndose en muchas ocasiones escasas o impredecibles respuestas que pueden incluso resultar en efectos adversos graves para el paciente. En este trabajo se llevará a cabo una revisión de los distintos tipos de inmunoterapia, así como la descripción de diferentes aplicaciones que se están desarrollando actualmente o que se encuentran en fases de estudio.

**Palabras clave:** inmunoterapia, anticuerpos, terapia celular adoptiva, oncología, vacunas terapéuticas.

#### ABSTRACT

Every day, the immune system maintains in our organism the fragile balance that separates us from the disease, avoiding aberrant behaviors of our own cells or defending ourselves from external aggressors. The growing knowledge of molecular and cellular interactions in the development and progression of various pathologies allows the identification of potential therapeutic targets for the cure or remission of a wide range of diseases. The combined use of immunotherapy with genetic engineering allows targeting the immune system against specific targets, making immunotherapy a highly selective tool with great therapeutic potential. However, the interactions of the immune system with the rest of the organism's cells, the surrounding environment and between the components of that system, make their management complex, often resulting in poor results or unpredictable responses that may even trigger on serious adverse effects for the patient. In this work a review of the different types of immunotherapy will be carried out, as well as the description of different applications that are currently being developed or that are in phases of study.

**Key words:** immunotherapy, antibodies, adoptive cell therapy, oncology, therapeutic vaccines.

## INTRODUCCIÓN

### CONCEPTO DE INMUNOTERAPIA

A grandes rasgos, las terapias de base biológica, también denominadas: bioterapias o terapias modificadoras de la respuesta biológica (MRB), son un tipo de tratamiento que usa sustancias elaboradas por organismos vivos para tratar enfermedades. El cuerpo puede elaborar estas sustancias de forma natural o se pueden producir artificialmente en un laboratorio (mediante procedimientos biotecnológicos). Algunas terapias biológicas estimulan o inhiben el sistema inmune para ayudar al cuerpo a combatir el cáncer, las infecciones, procesos autoinmunes u otras enfermedades; mientras que otras, atacan células cancerosas específicas impidiendo su crecimiento o destruyéndolas. La inmunoterapia sería un tipo de terapia biológica cuya herramienta serían efectores celulares o moleculares del sistema inmune.<sup>1</sup>

### LA INMUNOTERAPIA A LO LARGO DE LA HISTORIA

Durante más de dos siglos, la inmunización activa ha estado a la vanguardia de los esfuerzos para prevenir las enfermedades infecciosas que afectan a la humanidad. En la Europa del siglo XVIII, la viruela causó el 10% de todas las muertes. En 1796 **Edward Jenner** utilizó la vacunación con viruela bovina para inducir inmunidad a la viruela humana. Estos esfuerzos culminaron en la erradicación de la infección natural de la viruela 180 años después. Más tarde, y desde los descubrimientos de Pasteur, utilizando una estrategia paralela que suponía el uso del agente infeccioso muerto, atenuado o partes del mismo, se desarrollaron vacunas profilácticas efectivas para agentes infecciosos como la rabia, la fiebre tifoidea, el cólera, el sarampión, la varicela, las paperas, la poliomielitis, toxinas del tétanos y la difteria, etc.

La creación de las vacunas supuso un gran avance en el campo de la inmunología en la prevención de enfermedades infecciosas, sin embargo, y debido a su carácter profiláctico, no se considera una inmunoterapia propiamente dicha. El inicio de la inmunoterapia como tal se puede entender con el comienzo de la **sueroterapia** de la mano de **Emil Von Behring**. En 1890, Emil von Behring descubrió, en estudios con animales, que era posible producir “inmunidad” contra el tétanos al inyectar suero de otro animal portador de la enfermedad (**inmunización pasiva**). Tras sus éxitos en la lucha contra el tétanos, se concentró en hacer experimentos en casos con difteria logrando en 1891, idénticos resultados que con el suero antitetánico, curando en pocos días a pacientes enfermos de difteria. Poco después se inició la fabricación del suero antidiftérico y, entre 1892 y 1894, se curó a un total de 20,000 niños. En la lucha contra las infecciones, el uso de las vacunas y de los antibióticos, así como medidas de higiene sanitaria hicieron que la terapia sérica pasase a un segundo plano.

El siguiente gran hito en la historia de la inmunoterapia fue en 1891 cuando **William B.Coley**, un importante cirujano del Hospital Memorial de Nueva York, pensó en la potenciación del sistema inmune como tratamiento contra el cáncer a raíz de la observación y el estudio de diferentes casos en los que la fiebre elevada tenía como resultado la reducción de tumores. Para probar esta teoría inoculó estreptococos a un paciente con un sarcoma recurrente e inoperable en el cuello y la amígdala, logrando el

control de la enfermedad durante los 8 años siguientes. Dos años más tarde crea una mezcla filtrada de bacterias y lisados bacterianos, compuestos por *Streptococcus pyogenes* y *Bacillus prodigiosus*, llamados "*Coley's Toxins*", para el tratamiento de tumores.<sup>2</sup>

En 1900 **Paul Ehrlich**, a partir del estudio de la toxina diftérica describe la teoría de que "las células" (linfocitos) tienen en su superficie moléculas receptoras específicas o que se unen a determinados grupos químicos de las moléculas de la toxina; si las células sobreviven a esta unión, se produce una cantidad incrementada de dichas cadenas, algunas de las cuales son liberadas a la sangre en forma de antitoxinas circulantes. Las llamadas por Ehrlich "cadenas laterales" sería lo que hoy conocemos como anticuerpos.

A partir de la década de 1940 se comienza a entender mejor la complejidad del sistema inmune y se confirman descubrimientos anteriores. En 1948, **Astrid Fagraeus** demuestra la producción de anticuerpos por parte de las células plasmáticas, que luego se identificarán como derivadas de linfocitos B.

En 1957 **Alick Isaacs** y **Jean Lindenmann** descubren el interferón, una proteína producida por células animales que combate los virus. Finalmente, se identificarán tres tipos principales (I, II y III) de interferón. Se concluyó que además de combatir las infecciones de virus, los interferones también pueden combatir los tumores.<sup>3</sup> Dentro de la inmunoterapia el conocimiento del interferón es importante pues su presencia es clave en el mantenimiento de la respuesta inmune. Dos años más tarde los Doctores Old, Clarke y Benacerraf demuestran que el *Bacillus-Calmette-Guérin* (BCG), una vacuna contra la tuberculosis, inhibe el crecimiento tumoral en ratones.<sup>4</sup>

En 1975 **Köhler** y **Milstein** desarrollan mediante **la técnica de hibridoma** los anticuerpos monoclonales, lo que revolucionará el tratamiento de enfermedades infecciosas y tumorales. Ambos obtendrían el Premio Nobel en 1984.

Los primeros éxitos con anticuerpos monoclonales en inmunoterapia se obtuvieron en la prevención del rechazo de órganos trasplantados, gracias al anticuerpo monoclonal de origen murino muromonab-CD3 (Orthoclone u OKT3) que se dirige al elemento CD3 del complejo receptor de antígenos de las células T. Muromonab fue el primer anticuerpo monoclonal aprobado como medicamento para su uso en humanos, en 1986. Entre los anticuerpos aprobados posteriormente, también para la profilaxis del rechazo agudo de órganos trasplantados, estaban basiliximab (Simulect), un anticuerpo quimérico, y el anticuerpo humanizado anti-Tac daclizumab (Zenapax), el primer anticuerpo humanizado aprobado por la Food and Drug Administration (FDA). Ambos están dirigidos contra la cadena alfa del receptor de la interleucina-2 (antígeno CD25), el cual se expresa sobre la superficie de los linfocitos-T como respuesta a estímulos antigénicos.<sup>3</sup>

En 1987 se descubre CTLA-4 (antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos) y en la década de 1990 es considerado como un regulador negativo de la actividad de células T. CTLA-4 se relacionó con la vigilancia inmune del cáncer cuando su inhibición con un anticuerpo monoclonal condujo a la reducción del tumor en modelos de ratón con sarcoma y adenocarcinoma de colon.<sup>5</sup> Sin embargo, no es hasta el 2011 que la FDA aprueba el uso

de Yervoy (ipilimumab), un anticuerpo monoclonal humano que se une y bloquea CTLA-4 evitando el “freno” de la respuesta inmune.<sup>6</sup>

En 1993 **Zelig Eshhar** creó los primeros receptores de antígenos quiméricos de células T (CAR-T).<sup>7</sup>

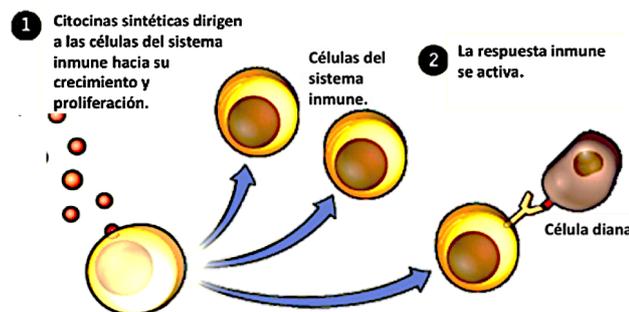
En 1997 se aprueba por la FDA el primer anticuerpo monoclonal contra células malignas, Rituximab (anti CD20), para el tratamiento del linfoma no Hodgkin.

El número de ensayos clínicos de inmunoterapia contra el cáncer en fase III ha aumentado considerablemente desde principios de los 90, mostrando el renovado interés entre investigadores y fabricantes de fármacos por los tratamientos contra el cáncer basados en la inmunoterapia.<sup>8</sup> Tanto a nivel oncológico como en otras aplicaciones (diagnósticas y terapéuticas) la parte de la inmunoterapia que más desarrollo está experimentando y que posee un mayor número de aprobaciones para su uso médico son los anticuerpos monoclonales.

## TIPOS DE INMUNOTERPIA

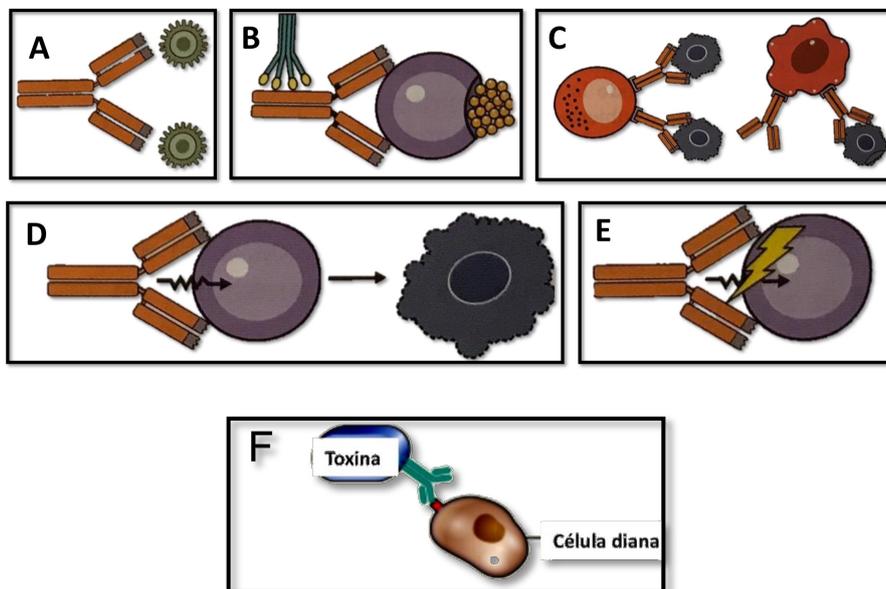
Básicamente se pueden distinguir dos formas de inmunoterapia: la **inmunoterapia pasiva**, que consiste en la transferencia de anticuerpos o de células previamente generados in vitro que se dirigen contra una célula o molécula determinada, y la **inmunoterapia activa**, consistente en estimular el sistema inmune del propio paciente e inducirlo a elaborar una respuesta específica contra los antígenos diana de interés según la patología a tratar, como podría ser el cáncer. Dentro de la inmunoterapia activa tendríamos la específica (dirigida a ciertas células del sistema inmune) y la no específica (afecta a todo el sistema inmune en general).<sup>9</sup> Integrando lo anterior y de forma simplificada, podríamos distinguir los siguientes tipos de inmunoterapia:

- **Inmunoterapia no específica:** el objetivo es potenciar la respuesta inmune. Lo más usado son las **citocinas (Figura 1)**, con la intención de guiar el crecimiento y la proliferación de las células inmunes.<sup>8</sup> Dentro de esta activación inespecífica del sistema inmune se incluye también el uso del Bacilo de **Calmette-Guerin (BCG)** citado anteriormente, derivado atenuado de mycobacterium bovis, el cual induce una fuerte respuesta inflamatoria y por ello se utiliza para el tratamiento y la prevención secundaria del cáncer de vejiga superficial inyectándolo directamente en la zona.<sup>5</sup>



**Figura 1. Uso de citocinas en inmunoterapia.** Las citocinas estimulan la activación de las células del sistema inmune.<sup>8</sup>

- **Anicuerpos monoclonales (mAbs):** son por lo general proteínas de tipo IgG mono-específicas seleccionadas para unirse directamente a moléculas de superficie de la célula o señalizarla para su destrucción. Sus distintas aplicaciones en gran variedad de patologías y su relativa seguridad es lo que hacen que actualmente sean la parte de la inmunoterapia con un mayor peso en el mercado. El número de anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) está aumentando de forma exponencial, existiendo más de 76 anticuerpos monoclonales aprobados para tratamientos médicos.<sup>10</sup> Sus posibles usos incluyen:
  - A. Neutralización de factores solubles (citocinas, factores de crecimiento, factores angiogénicos).
  - B. Activación del complemento.
  - C. Inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).
  - D. Inducción de apoptosis.
  - E. Bloqueo de la activación de receptores de membrana implicados en vías de señalización como, por ejemplo, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).
  - F. Dirigir fármacos o toxinas a una célula diana (por ejemplo, una célula cancerígena).

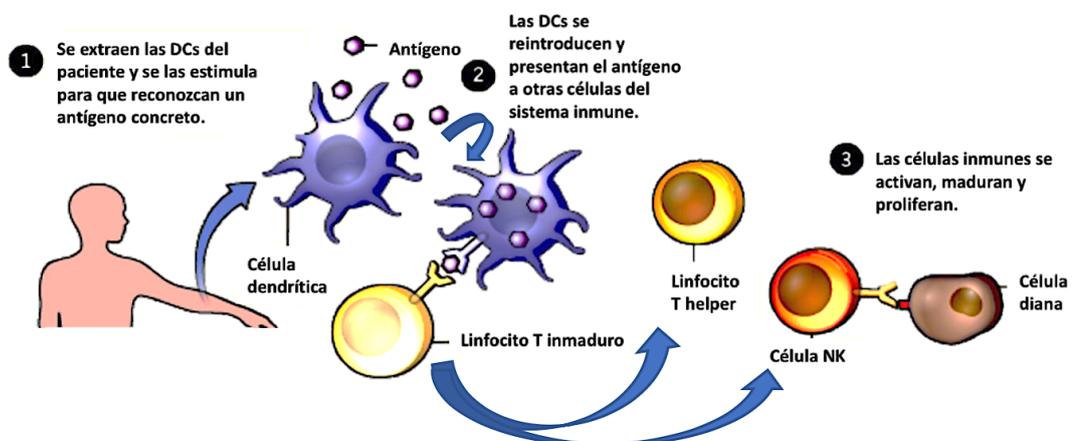


**Figura 2. Aproximaciones terapéuticas en el uso de Anticuerpos.** Véase la explicación en el texto. A, B, C, D, E <sup>11</sup> F. <sup>8</sup>

También es posible diseñar de forma artificial anticuerpos que reconozcan simultáneamente dos tipos diferentes de antígenos, serían los denominados **anticuerpos biespecíficos (BiTEs)**.

- **Vacunas terapéuticas:**

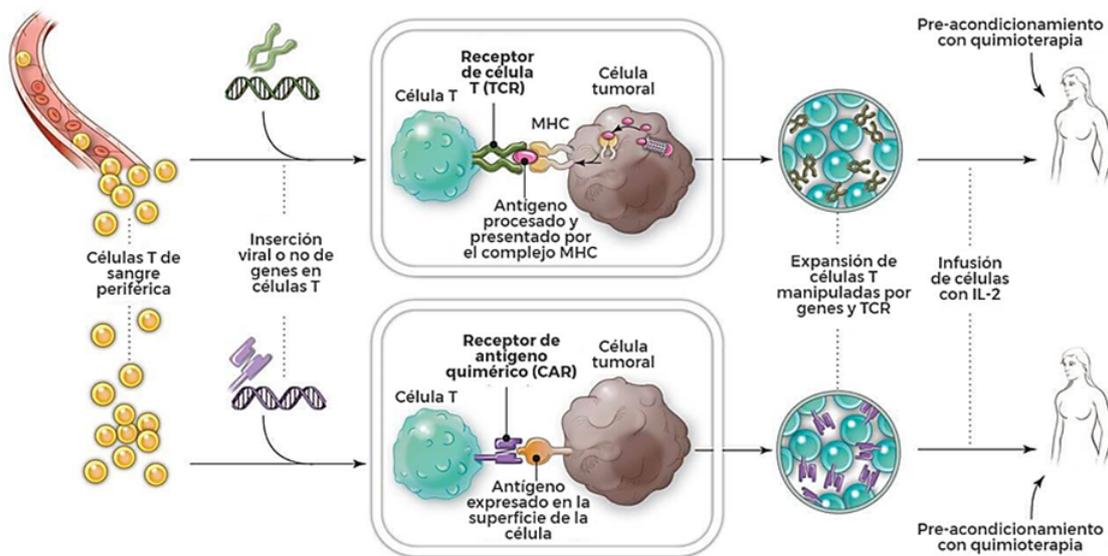
El uso de este término no debe confundirse con el de **vacunas preventivas** (el término clásico para la vacuna profiláctica) ya que buscan conseguir la inmunidad del sujeto a una determinada enfermedad mediante la estimulación del sistema inmune contra el agente responsable y la creación de memoria inmunológica de larga duración, siendo especialmente exitosas contra agentes infecciosos como los virus; y por tanto, mostrando también eficacia en la prevención del cáncer cuando en el origen y desarrollo del mismo están implicados agentes infecciosos como el virus del papiloma humano, el virus de la hepatitis B, etc.. Sin embargo, a lo largo de este trabajo nos referiremos a vacunas, por ejemplo, contra el cáncer, con matices algo diferentes de lo que se entiende tradicionalmente por vacuna. Lo que se conoce como vacuna en inmunoterapia, que es la denominada **vacuna terapéutica**, hace referencia a un tipo de inmunoterapia pasiva, que no tiene carácter profiláctico o preventivo (a diferencia del resto de vacunas) sino que trata de modificar las propias células del sistema inmunitario del paciente para que detecten y destruyan a las células causantes de enfermedad.<sup>3</sup> Las **vacunas terapéuticas** están hechas a partir de células, partes de células o antígenos diseñados para dirigir el sistema inmune del propio paciente, in vitro, frente a una diana concreta. Se han intentado muchas aproximaciones entre las que se incluyen las **vacunas con células dendríticas (DCs) (Figura 3)**. Esto último, de forma simplificada, consistiría en aislar DCs de un paciente, estimularlas para que presenten un antígeno específico que queramos atacar (por ejemplo, contra marcador específico diana en una célula tumoral) y reintroducirlas en el cuerpo del paciente; una vez realizado este paso de la terapia se espera a que las DCs tratadas presenten el antígeno a otras células inmunes, activándose después su maduración y proliferación. En teoría, estas células reconocerán y atacarán al antígeno diana destruyendo a las células que lo porten en su superficie (**Figura 4**).<sup>8</sup> Actualmente solo está admitido el uso de una vacuna terapéutica, Sipuleucel-T (Provenge), aprobada por la FDA en 2010 y por la EMA en 2013 para su uso contra el cáncer de próstata avanzado resistente a castración.<sup>12</sup>



**Figura 3. Vacuna con DCs.** Extracción, estimulación y reintroducción en el organismo de las DCs del propio paciente.<sup>8</sup>

- **Terapia celular adoptiva:** consiste en extraer los linfocitos T del propio paciente y modificarlos in vitro para que se dirijan contra moléculas de superficie o antígenos de tejidos y células diana. Para reintroducirlas de nuevo en el paciente, éste tiene que haber sido sometido a un tratamiento previo de inmunosupresión. Dentro de esta terapia se incluye el uso de linfocitos T infiltrantes de tumor (TILs), células T con receptor de antígeno quimérico (CARTs) y la transfección del receptor de linfocitos T (RLT o TCR).<sup>13</sup>

Como muestra la **figura 4**, para lograr que el CAR y el TCR del linfocito T expresen el antígeno deseado se debe modificar genéticamente dicha célula T. La introducción del material genético se realiza mediante transfección con un plásmido, vector viral, u otras herramientas para la transferencia (como CRISPR); siendo éste, por tanto, un uso solapado de la terapia celular con la terapia génica. Por su parte, el uso de TILs no requiere modificaciones genéticas previas, basta con obtener los linfocitos T del paciente que se encuentran en la masa tumoral atacando a las células malignas, estimularlos in vitro y reintroducirlos de nuevo en el paciente.



**Figura 4. TCR y CAR.** Esquema de la secuencia de pasos en la terapia celular adoptiva usando TCR y CAR. <sup>1</sup>

La inmunoterapia es un tratamiento complejo y para que sea eficaz requerirá no sólo el uso de antígenos diana apropiados, sino también la optimización de la interacción entre el péptido antigénico, la célula presentadora de antígeno (APC) y la célula T; así como el bloqueo simultáneo de mecanismos de regulación negativos del sistema inmune mediante, por ejemplo, el uso de anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión al receptor de la región constante. <sup>3</sup>

## ANTICUERPOS MONOCLONALES

### CONCEPTO

Los trabajos realizados por Kohler y Milstein permitieron desarrollar una metodología de obtención de anticuerpos provenientes de un **mismo clon de linfocitos B** y, por lo tanto, de idéntica porción variable y especificidad antigénica. A estos anticuerpos se los denomina **anticuerpos monoclonales (mAbs)**.

Los anticuerpos son glucoproteínas producidas y secretadas por los linfocitos B del sistema inmunitario. Las moléculas (extracelulares) a las que se unen los anticuerpos son, por definición, **antígenos**, siendo las proteínas y los hidratos de carbono los más comunes. La parte de un antígeno a la que se une el anticuerpo se llama **determinante antigénico** o **epítipo**. La unión de los anticuerpos a un patógeno puede inactivarlo y/o volverlo susceptible a la destrucción por otros componentes del sistema inmunitario. Cada uno de los anticuerpos es específico pudiendo unirse sólo a un tipo de antígeno o a un número muy pequeño de antígenos diferentes.

La célula B madura expresa en su membrana una proteína, la inmunoglobulina (Ig), cuya forma secretada son los anticuerpos, que actuará como receptor para el antígeno. El desarrollo de las células B comprende etapas en las que se ensamblan diferentes componentes de su receptor. En este proceso cada célula B queda restringida a expresar una sola forma del receptor, pero esta forma varía de una célula a otra. Cuando el antígeno se une al receptor las células B son estimuladas para que proliferen y se diferencien en células plasmáticas, que adquirirán entonces capacidad para secretar anticuerpos de la misma especificidad que tenía la inmunoglobulina unida a la membrana.<sup>14</sup> Hay que tener en cuenta, que la respuesta fisiológica al ingreso de un antígeno es siempre policlonal, ya que, aun cuando se trate de un único epítipo antigénico, suele haber más de un clon de linfocitos B con capacidad para reconocerlo. Por otra parte, durante la reacción en el centro germinal, los centroblastos modificarán por hipermutación somática la porción variable de las inmunoglobulinas, dando lugar a distintos clones o subclones de linfocitos B, todos específicos para el antígeno que estimuló la respuesta de anticuerpos.<sup>11</sup>

### ESTRUCTURA Y TIPOS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos están compuestos por una unidad básica de cuatro cadenas polipeptídicas. Esta unidad consiste en dos **cadenas pesadas** (cadenas H) idénticas y dos **cadenas ligeras** (cadenas L) también idénticas, de menor tamaño, que se ensamblan en una estructura parecida a la letra Y (**Figura 5**). Hay diferentes tipos de Ig: IgG, IgM, IgD, IgA e IgE. **La IgG es la clase más común de Igs utilizada como base estructural para la producción/generación de anticuerpos monoclonales terapéuticos**<sup>14</sup>. Típicamente, IgG funciona en la fase secundaria de una respuesta inmune. Es el anticuerpo más abundante, representando el 80% de los anticuerpos en humanos. Hay 4 subclases de IgG (IgG1-IgG4) en humanos que varían en abundancia en el suero y en la afinidad de unión a los receptores del fragmento cristalizante en el sistema inmunitario. IgG1 es la subclase de IgG más abundante, seguida de IgG2, IgG3 e IgG4. Excepto IgG3, que tiene una vida media de eliminación de ≈7 días, los subtipos de IgG tienen vidas medias de

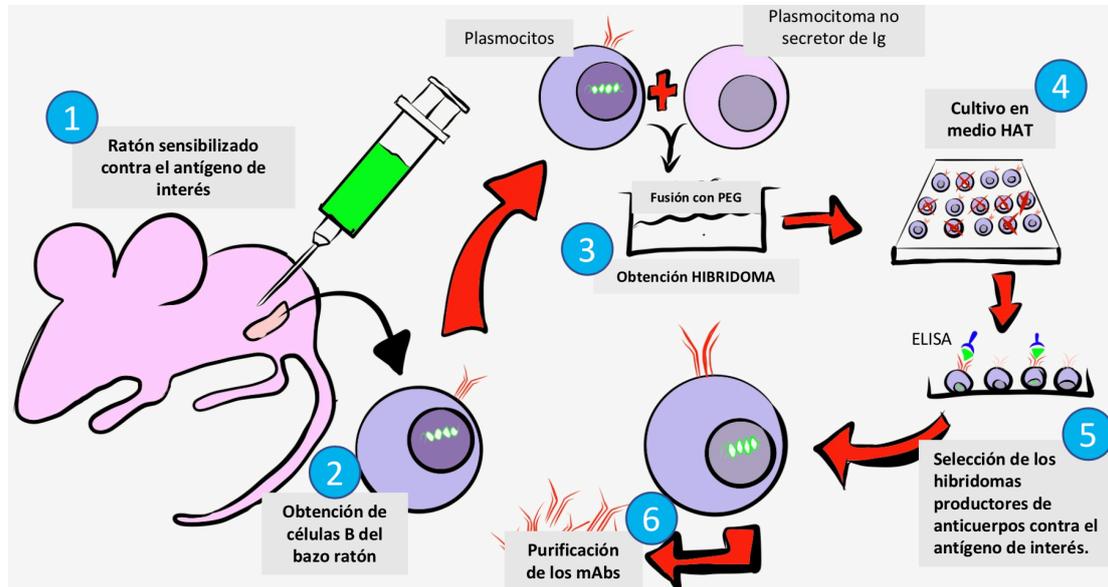
eliminación de ≈20 a 21 días. Generalmente se prefiere el isotipo IgG1, por su mayor estabilidad intrínseca y su mayor capacidad de desarrollar funciones efectoras. Por su parte, la IgG2 y la IgG4 presentan la menor actividad efectora, lo que puede ser interesante cuando no se busque este aspecto, si bien, en contrapartida presentan problemas de estabilidad intrínseca. Aunque la IgG3 tiene una funcionalidad intrínseca similar a la de la IgG1, casi no es empleada porque presenta problemas de estabilidad, su vida media sérica es corta debido a la proteólisis de su región bisagra y expresa polimorfismos alotípicos (pequeñas diferencias estructurales entre individuos de la misma especie).<sup>15</sup>

## TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos policlonales comprenden todas las inmunoglobulinas generadas por las células B en respuesta a un antígeno. El método tradicional para fabricar anticuerpos policlonales de la especificidad deseada consiste en inmunizar animales con el antígeno apropiado y luego preparar **ANTISUEROS** (suero sanguíneo que contiene los anticuerpos) a partir de su sangre. La especificidad y la calidad de estos antisueros depende mucho de la pureza del preparado de antígeno inmunizante, porque el sistema inmunitario producirá anticuerpos contra todos los componentes extraños que contenga este preparado. Por consiguiente, los antisueros específicos contra un determinado antígeno solo pueden elaborarse cuando el antígeno se encuentra disponible en su forma purificada.<sup>14</sup>

El método clásico para obtener anticuerpos monoclonales no parte necesariamente de un antígeno muy purificado. En este método se aíslan las células B del bazo de los animales previamente inmunizados (habitualmente ratones, expuestos al antígeno de interés por vía endovenosa) y se las fusiona con células de mieloma de ratón (plasmocitoma) obteniéndose una célula híbrida denominada **HIBRIDOMA (Figura 5)**. La fusión se realiza en base a un protocolo estricto que emplea polietilenglicol (PEG) para facilitar la fusión celular. Su acción se basa en disminuir las fuerzas eléctricas de repulsión entre células determinadas por la presencia de ácido siálico en las membranas celulares. La fusión espontánea, en ausencia de PEG, ocurre a una tasa muy baja. La tasa de fusión empleando PEG varía entre 1 hibridoma por cada 50.000 linfocitos y 11.000.000 por lo que, utilizando un buen inmunógeno, es posible obtener entre 200 y 500 hibridomas en cada fusión. Los hibridomas se cultivan en un medio selectivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT) ya que en la suspensión celular posterior a la fusión encontraremos también células de mieloma sin fusionar o fusiones de mieloma con mieloma, así como linfocitos no fusionados. Éstas últimas mueren espontáneamente a los pocos días, pero las células tumorales fusionados entre sí y las no fusionadas se multiplican rápidamente, a una tasa igual o mayor que la de los hibridomas productivos y es necesario eliminarlas. Para ello se emplean usualmente células de mieloma carentes en la enzima hipoxantinaganina-fosforibosiltransferasa (HGPRT) o también, aunque de uso menos frecuente, células carentes en la enzima timidinkinasa (TK). Estas enzimas permiten la utilización de bases púricas o pirimidínicas de origen exógeno para la síntesis de DNA celular. El medio selectivo HAT contiene además aminopterina que es un antagonista competitivo del ácido dihidrofólico, vitamina implicada en la síntesis de los nucleótidos necesarios para estructurar el DNA (actúa como coenzima). De esta manera queda bloqueado el empleo de bases

nitrogenadas endógenas para la síntesis de DNA. Los linfocitos B de origen esplénico presentan la información genética para la síntesis de HGPRT y la aportan a la célula híbrida permitiendo su supervivencia al emplear las bases nitrogenadas del medio selectivo externo para su síntesis de DNA. Por tanto, las células de mieloma no fusionadas, carentes de la enzima, son eliminadas en un corto período de tiempo.<sup>16</sup>



**Figura 5. Técnica del hibridoma.** Esquematización del proceso por el que se obtienen anticuerpos monoclonales a partir de la fusión de células B de un ratón previamente inmunizado contra el antígeno de interés y las células de mieloma que les otorgan una capacidad de replicación ilimitada. Ver explicación detallada en el texto.<sup>11 17</sup>

Los hibridomas resultantes presentan dos propiedades: proliferan indefinidamente y secretan anticuerpos específicos contra el antígeno empleado en la inmunización. Esta tecnología revolucionó el empleo de los anticuerpos tanto en lo relativo al enfoque diagnóstico como terapéutico. Las células del hibridoma se separan individualmente y las que producen los anticuerpos de la especificidad deseada se identifican (tamizaje) siendo seleccionadas para su clonación. Todos los anticuerpos producidos por un hibridoma son, en teoría, idénticos y por eso se llaman **anticuerpos monoclonales**.

El uso de anticuerpos monoclonales como agentes terapéuticos tiene limitaciones puesto que tras la administración inicial los pacientes humanos fabricaban anticuerpos específicos contra las regiones C de los anticuerpos de ratón utilizados. La reacción de estos anticuerpos con cualquier dosis siguiente de anticuerpos monoclonales de ratón disminuía su efecto terapéutico y aumentaba la probabilidad de complicaciones. Para superar este obstáculo se implementó la **quimerización (1985)** y la **humanización (1986)** de los anticuerpos monoclonales murinos. Para llevarlo a cabo se emplea la **TECNOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE** (conjunto de técnicas que permiten aislar un gen de un organismo, para su posterior manipulación e inserción en otro diferente), gracias a la cual se consiguen unir los genes que codifican la región variable de las IgG de ratón con genes que codifican la región constante humana para, más tarde, ser insertados en células de mieloma, donde producirán nuevas moléculas de anticuerpo que tendrán el fragmento Fab del ratón y el resto humano (**anticuerpo quimérico**).

De manera similar, la humanización consiste en que las secuencias que codifican las **regiones determinantes de complementariedad** (CDR) de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo monoclonal del ratón se usen para reemplazar las secuencias que codifican las CDR correspondientes de una inmunoglobulina humana (con especificidad irrelevante). Así, las células que expresan las cadenas pesadas y ligeras humanizadas producen un anticuerpo en el que sólo las regiones CDR son de origen murino (portan la especificidad contra el antígeno) y el resto humano (**anticuerpo humanizado**).<sup>14</sup>

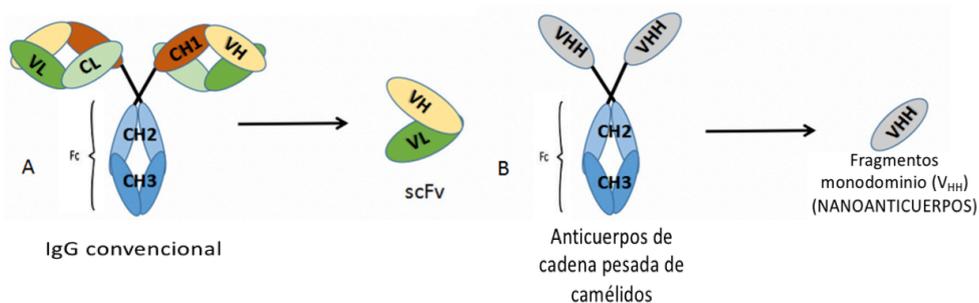
Con la llegada **de la tecnología PHAGE DISPLAY** (tecnología de presentación sobre fagos filamentosos, TPF) aparecieron los primeros mAbs completamente humanos<sup>18</sup>. Esta tecnología se reconoce como una herramienta poderosa para seleccionar nuevos péptidos y anticuerpos que se pueden unir a una amplia gama de antígenos diferentes. Los fagos filamentosos son partículas virales flexibles cuyas cepas M13, f1 y fd infectan bacterias *Escherichia coli* a través de su unión al receptor (proteína pIII- pilus F bacteriano) y la posterior translocación de su material genético al interior. La bacteria hospedadora comienza su ciclo de replicación en el que se encuentra el material genético que contenía el fago, dando lugar a nuevas partículas virales que se ensamblan y se liberan al medio. Esta tecnología se basa en la modificación por ingeniería genética de las partículas de fagos, de tal forma que cada una de ellas puede incorporar a su material genético los genes de interés, y exponer en la cápside viral las secuencias proteicas codificadas (gracias a la maquinaria de la bacteria). El material genético de los anticuerpos se puede obtener gracias al aislamiento del ADN a partir de linfocitos B humanos (cada célula produce un solo tipo de anticuerpo contra un antígeno determinado). La TPF permite seleccionar un péptido o proteína a partir de una biblioteca empleando, un anticuerpo monoclonal, un suero policlonal, una proteína, un receptor, o incluso moléculas de origen lipídico o azúcares, mediante un procedimiento de purificación por afinidad denominado genéricamente selección o “biopanning”. En esencia la biblioteca de anticuerpos sobre fagos se enfrenta al antígeno en ciclos de selección repetidos que incluyen pasos de unión, lavados y elución (extracción) de los fagos unidos. Con los fagos seleccionados se infectan bacterias y se cultivan para producir los fragmentos de anticuerpo. Con el objetivo de incrementar la probabilidad de obtener fragmentos de anticuerpo diversos y de elevada afinidad, se recomienda realizar entre dos y tres ciclos de selección y utilizar técnicas de alto flujo para el tamizaje (ELISA, microarray, inmunoensayos sobre membranas de nitrocelulosa) y la identificación de los anticuerpos deseados. La mayor complejidad de las estrategias de selección se alcanza en los sistemas *in vivo*, en los que la mezcla de fagos se inyecta directamente en animales y se recolectan y examinan los tejidos u órganos de interés, aislándose aquellos fagos portadores de fragmentos de anticuerpo que se acumularon selectivamente en la región blanco producto de las interacciones antígeno-anticuerpo. Este método de selección resulta de interés para la identificación de nuevos fármacos y sus mecanismos de circulación *in vivo*<sup>19</sup>. Adalimumab fue el primer anticuerpo terapéutico derivado de una biblioteca sobre fagos filamentosos que fue aprobado por la FDA (EUA) en el año 2002 para uso en humanos. Este anticuerpo tiene la capacidad de neutralizar al TNF- $\alpha$  y se utiliza en la actualidad principalmente para el tratamiento de la artritis reumatoide.

Otra estrategia para la obtención de anticuerpos monoclonales humanos consiste en el empleo de ratones que no expresen genes de inmunoglobulinas funcionales, es decir,

animales transgénicos cuyos linfocitos B expresen las cadenas H y L humanas. La inmunización de estos ratones con el antígeno de interés genera células B que, al ser fusionadas con las células provenientes del mieloma de ratón, producen **hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales “humanos”**.<sup>11</sup>

Se ha conseguido también producir anticuerpos monoclonales capaces de transportar determinadas sustancias, por ejemplo, citotóxicas para ser liberadas en el sitio de unión al antígeno, actuando, de este modo, de una manera mucho más selectiva. También se ha logrado producir anticuerpos con múltiples dominios de unión, capaces de unirse a dos o más antígenos distintos, dando lugar a moléculas biespecíficas o bivalentes, trivalentes y tetravalentes.

Por otra parte, las nuevas técnicas de ingeniería molecular permiten diseñar anticuerpos muy específicos al tiempo que reducen la inmunogenicidad, por ejemplo, minimizando el tamaño del anticuerpo, pero conservando sus sitios de unión al antígeno. Un ejemplo de esto serían los **anticuerpos de cadena sencilla (scFv)**. Este enfoque tiene como objetivo mejorar la biodisponibilidad y reducir la respuesta inmune contra los tratamientos inmunoterápicos. Además, cuando estos fragmentos están diseñados para radioinmunoterapia o imágenes “*in vivo*”, la falta de una región constante permite una mejor depuración renal. Para los métodos de diagnóstico, como la inmunohistoquímica, la falta de Fc (fragmento cristalizante) asegura, además de una mejor distribución del tejido, una unión no específica reducida. Siguiendo este mismo abordaje, cabe señalar a los **nanoanticuerpos**, también llamados anticuerpos monoclonales recombinantes de dominio simple, anticuerpos V<sub>HH</sub> o Heavy-chain antibodies; los cuales únicamente están compuestos por la región variable de la cadena H, sin cadena L y se obtienen a partir de las IgG2 e IgG3 de camélidos, mediante su inmunización previa o con la tecnología del phage display ya comentada.



**Figura 6. Anticuerpos de cadena sencilla (scFv) y nanoanticuerpos.**

Representación esquemática de la estructura de la Ig de camélido (B) compuesta únicamente por dos cadenas pesadas, en contraposición a la IgG convencional (A). La región variable de la cadena pesada del anticuerpo de camélido correspondería al que se denomina nanoanticuerpo<sup>20</sup>.

El sistema de expresión de proteínas ideal debería proporcionar proteínas recombinantes de alta calidad, en cantidad suficiente y a un coste de producción bajo. Sin embargo, especialmente para las proteínas terapéuticas complejas como los anticuerpos monoclonales, quedan muchos desafíos para cumplir con este objetivo. Tradicionalmente, los mAbs se han producido a través de la tecnología del hibridoma sin

embargo, la capacidad de estos sistemas es limitada y el proceso es largo y laborioso. Una alternativa prometedora es la producción de mAbs a través de ingeniería genética utilizando levaduras, células de insectos infectadas por *bacillus sp.* o plantas <sup>21</sup>.

El historial de producción de mAbs en plantas abarca 25 años. El primer mAb producido en una planta se diseñó basándose en un ADNc de una IgG1 catalítica murina derivada de hibridoma llamada 6D4, y se sintetizó y ensambló en plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* dando como resultado un mAb tan funcionalmente activo como su equivalente de mamífero <sup>22</sup>. Las plantas transgénicas de *N. tabacum* también se usaron para producir un mAb secretor de IgA e IgG (sIgA/ IgG) que reconocía al antígeno de superficie I/II de *Streptococcus mutans in vitro* <sup>23</sup> y se evaluó para el tratamiento de caries dental en humanos <sup>24</sup>. En la tabla inferior (**Tabla: 1**) se muestra un resumen de las principales ventajas e inconvenientes en los diferentes métodos, mencionados a lo largo de este apartado, para la obtención de mAbs.

	<b>PRINCIPALES VENTAJAS</b>	<b>PRINCIPALES INCONVENIENTES</b>
<b>BACTERIAS</b>	Bajo coste.	Pocas modificaciones postraduccionales. Endotoxinas.
<b>LEVADURAS</b>	Bajo coste. Célula eucariota.	Diferencias con la forma de glicosilación de los mamíferos.
<b>BACTUBACILUS</b>	Similares modificaciones postraslacionales que las células eucariotas.	Contaminación con las propias partículas del virus, lo que incrementa el coste por precisar más purificación.
<b>CÉLULAS DE MAMÍFEROS</b>	Muchas modificaciones postraslacionales (generación de mAbs complejos).	Problemas en la seguridad como la contaminación por células del huésped, virus o ADN con capacidad oncogénica. Coste mayor.
<b>PLANTAS</b>	Bajo coste. Producción en grandes cantidades. Similares modificaciones postraslacionales que las células eucariotas y menos riesgo de contaminación.	Diferencias estructurales con las proteínas de mamíferos. Potenciales reacciones de hipersensibilidad.

**Tabla 1: Métodos de obtención de mAbs.** Principales ventajas e inconvenientes de los distintos métodos mencionados para la obtención de mAbs. <sup>20,21</sup>

## NOMENCLATURA

La nomenclatura de los anticuerpos monoclonales, como la de otros compuestos farmacológicos, viene determinada por el Programa Internacional de Denominaciones Comunes (International Nonproprietary Names, INN) de la OMS, que ha ido completándolo a lo largo de los años (**Tabla 2**). El nombre consta de varias partes:

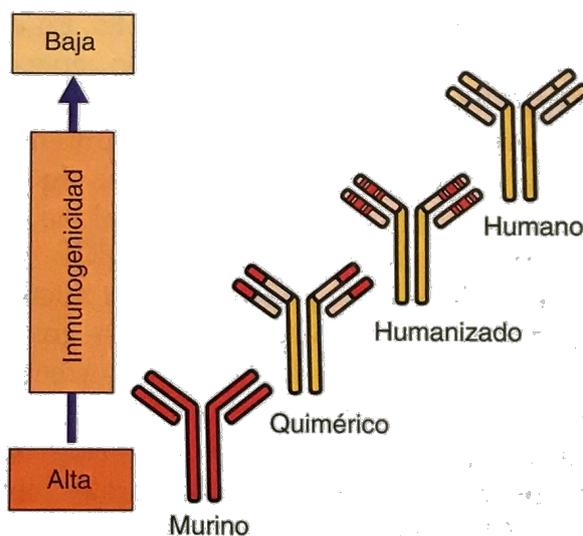
prefijo, sufijo, infijo A y B. Además, la denominación de los mAbs puede contener un segundo término, lo que sucede cuando están conjugados a una molécula.

**PREFIJO:** es libre y puede ser el que desee el propietario o el descubridor. La única condición que debe de cumplir es que contribuya a la eufonía del nombre y a su identificación.

**INFIJO A:** indica la diana frente a la que va dirigido el anticuerpo. Permite identificarla mediante una serie de letras; normalmente se emplea una, pero para que la eufonía de la palabra puede añadirse, si es necesario, una vocal (señalada entre paréntesis en la segunda columna de la tabla inferior).

**INFIJO B:** indica la especie en la que se basa la secuencia del anticuerpo monoclonal (**Figura 7**). Se une a la terminación -mab. De este modo, la finalización de la palabra nos permite deducir el origen del anticuerpo: **-Umab:** 100% proteína humana; **-ZUmab:** aproximadamente 10% proteína murina; **-Omab:** 100% proteína murina; **-Xi(m)ab:** aproximadamente 33% proteína murina.

**SUFIJO:** el sufijo universal para los anticuerpos monoclonales es -mab, que corresponde con la abreviatura inglesa de monoclonal antibody. Las proteínas de fusión utilizan el sufijo -cept (por ejemplo, etanercept, anticuerpo monoclonal constituido por la p75 del receptor del factor de necrosis tumoral y la porción Fc de la IgG1 humana).



**Figura 7. Tipos de mAbs según su origen.** Diferentes tipos de anticuerpos monoclonales desarrollados a fin de disminuir su inmunogenicidad en el ser humano. <sup>(11)</sup>

**SEGUNDO TÉRMINO:** cuando el anticuerpo monoclonal está conjugado con otra proteína o con un compuesto químico, estos se identifican mediante una segunda palabra, que se escribe separada. Por ejemplo, en el caso de una toxina, se emplea el sufijo -tox en esta segunda palabra.

Se puede emplear el prefijo peg- para designar a los Mab unidos a polietilenglicol (pegilados), siempre que no haga el nombre excesivamente largo, en cuyo caso se usaría un segundo término como pegol o similar. Cuando un anticuerpo está unido a un radioisótopo, el nombre de este se coloca delante del nombre del anticuerpo. Por ejemplo, Tecnecio (99mTc) nofetunomab merpentan. <sup>15</sup>

NOMBRE	TIPO DE DIANA	ORIGEN	TIPO DE ANTICUERPO
Elegido por el fabricante.	-b (a)- bacteriana. -c (i)- cardiovascular. -f (u)- hongo. -gr (o)- músculo-esquelética relacionada con factores de crecimiento y receptores. -k (i)- interleukina. -l (i)- inmunomodulador. -n (e)- neural. -s (o)- hueso. -tox (a)- toxina. -t (u)- tumoral. -v (i)- viral.	a rata. axo híbrido rata-ratón. e hámster. i primate. o ratón. u humano. xi quimérico. xizu quimérico humanizado. zu humanizado.	mab: monoclonal. pab: policlonal.
CE	TU	XI	MAB

**Tabla: 2. Nomenclatura anticuerpos monoclonales.** Detalle de las diferentes partes que componen el nombre dado a cada mAb según las normas del INN de la OMS.<sup>15</sup>

## INMUNOTERAPIA Y ANTICUERPOS MONOCLONALES

La eficacia de los anticuerpos monoclonales como herramientas terapéuticas depende de muchas variables, entre ellas, las características del antígeno “diana”, su densidad en la membrana plasmática y su distribución tisular, así como de la avidéz, especificidad e isotipo del anticuerpo monoclonal empleado.<sup>11</sup> Como ya se ha mencionado con anterioridad los mAbs son en la actualidad los agentes más empleados en la inmunoterapia, mostrándose ejemplos de sus aplicaciones en la tabla inferior (**Tabla: 3**). Algunos de los mecanismos de acción mediados por anticuerpos incluyen los siguientes:

1. **Bloqueo de los receptores para el fragmento Fc de IgG expresados por las células fagocíticas.** Son usados por ejemplo, como mecanismo protector en el tratamiento de citopenias inducidas por autoanticuerpos.<sup>25</sup>
2. **Unión a componentes del complemento.** El bloqueo de componentes del complemento evita la formación del complejo atacante de membrana y la destrucción de la célula diana; como sería el eritrocito en el caso de la hemoglobinuria paroxística nocturna. Un ejemplo es el eculizumab, un anticuerpo monoclonal IgG que se dirige contra el factor 5 del complemento (C5) y cuyo uso está aprobado para el tratamiento del síndrome hemolítico urémico y de la hemoglobinuria paroxística nocturna<sup>26</sup>, y se está estudiando en otras patologías como la glomerulopatía C3<sup>27</sup>.
3. **Tratamiento antiinflamatorio.** Se puede llevar a cabo mediante el bloqueo de citocinas y quimiocinas, lo que ha demostrado utilidad en patologías como la enfermedad de Kawasaki y otras vasculitis. Es el caso del uso de infliximab, anticuerpo monoclonal IgG1 quimérico murino-humano, que suprime la inflamación al bloquear el factor de necrosis tumoral alfa.<sup>28</sup>

	NOMBRE	NOMBRE COMERCIAL	DIANA; TIPO	INDICACIÓN (1ª vez)	AÑO DE APROBACIÓN
<b>ONCOLOGÍA</b>	<b>Daratumumab</b>	Darzalex	CD28; IgG1 humano	Mieloma múltiple	2015
	<b>Elotuzumab</b>	Empliciti	SLAMF7; IgG1 humanizado	Mieloma múltiple	2015
	<b>Nivolumab</b>	Opdivo	PD1; IgG4 humano	Melanoma, cáncer de pulmón no microcítico	2014
	<b>Pembrolizumab</b>	Keytruda	PD1; IgG4 humanizado	Melanoma	2014
	<b>Silutiximab</b>	Sylvant	IL-6; IgG1 quimérico	Enfermedad de Castleman	2014
	<b>Trastuzumab</b>	Herceptin	HER2; IgG1 humanizado	Cáncer de mama	1998
	<b>Rituximab</b>	MabThera, Rituxan	CD20; IgG1 quimérico	Linfoma no Hodgkin	1997
<b>AUTOINMUNIDAD</b>	<b>Vedolizumab</b>	Entyvio	Integrina $\alpha4\beta7$ ; IgG1 humanizado	Colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn	2014
	<b>Ustekinumab</b>	Stelara	IL-12/23; IgG1 humano	Psoriasis	2009
	<b>Certolizumab</b>	Cimzia	TNF- $\alpha$ ; Fab humanizado, pegilado	Enfermedad de Crohn	2008
	<b>Adalimumab</b>	Humira, Amjevita	TNF- $\alpha$ ; IgG1 humano	Artritis reumatoide	2002
	<b>Infliximab</b>	Remicade, Inflectra	TNF- $\alpha$ ; IgG1 quimérico	Artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal	1998
<b>OTRAS</b>	<b>Eculizumab</b>	Soliris	C5; IgG2/4 humanizado	Hemoglobinuria paroxística nocturna, síndrome hemolítico urémico atípico	2007
	<b>Natalizumab</b>	Tysabri	Integrina $\alpha4$ ; IgG4 humanizado	Esclerosis múltiple	2004

**Tabla 3. Anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA.** Mención de algunos mAbs en la que se muestra: nombre, marca comercial, diana/tipo, primer uso terapéutico para el que fueron aprobados y el año de dicha aprobación por la FDA. Esta lista no pretende ser exhaustiva, actualmente hay más de 76 mAbs aprobados por la FDA para uso médico<sup>10</sup>. Se puede ampliar la información en [www.antibodysociety.org](http://www.antibodysociety.org)

Las enfermedades de etiología autoinmune, como por ejemplo la artritis reumatoide o la diabetes mellitus tipo I, afectan a un importante grupo de la población. En su mayoría son enfermedades crónicas y todavía no se ha encontrado la cura definitiva para ninguna de ellas, aunque sí existen tratamientos que permiten controlar los síntomas. Aunque se ha avanzado mucho en años recientes en el conocimiento de los mecanismos que conducen hasta la patología autoinmune todavía no existen terapias que incidan de forma específica sobre las alteraciones inmunológicas que existen en estos pacientes. La mayoría de los fármacos utilizados son antiinflamatorios o inmunosupresores.

En la actualidad existen numerosos ensayos para intervenir de forma específica sobre los mecanismos que conducen a la autoinmunidad, uno de ellos es el uso de anticuerpos monoclonales precisamente por su gran selectividad. El ejemplo más llamativo es el TNF-alfa (ya comentado el uso de infliximab en la enfermedad de Kawasaki). Se ha demostrado que esta citocina se produce en exceso en varias enfermedades autoinmunes. Su neutralización con **anticuerpos anti-TNF-alfa**, como adalimumab e infliximab, ha demostrado ser un tratamiento muy eficaz en ciertos casos de artritis reumatoide y enfermedad de Crohn<sup>2930</sup>. Cada vez son más las posibles dianas que se descubren para intervenir de forma específica sobre estas enfermedades y los experimentos que se están llevando a cabo para conseguir tratamientos clínicos específicos y eficaces.

#### 4. Tratamiento antitumoral.

El objetivo es identificar una diana o blanco accesible al anticuerpo. Un ejemplo de ello es el empleo del anticuerpo monoclonal reactivo contra las moléculas CD20 expresada por todos los linfocitos B y que se emplea en el tratamiento de leucemias y linfomas de células B, así como en patologías autoinmunes.

Los anticuerpos monoclonales pueden actuar como **anticuerpos neutralizantes** o **inducir funciones efectoras** a través de sus fragmentos Fc. En el primer grupo se ubican los anticuerpos con capacidad para neutralizar citocinas o factores angiogénicos que pueden favorecer el crecimiento tumoral. Es el caso del **bevacizumab**, una IgG1 humanizada que se une con alta afinidad al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-A). Este anticuerpo inhibe la angiogénesis en el microambiente tumoral y está indicado en combinación con quimioterapia basada en fluoropirimidinas, para el tratamiento de pacientes adultos con carcinoma metastásico de colon o recto, así como para otro tipo de cánceres como el cáncer metastásico de mama y el carcinoma de pulmón no microcítico avanzado.<sup>31</sup>

Otros anticuerpos interfieren en la acción de **factores de crecimiento de células tumorales**. En este grupo se incluye, por ejemplo, **el anticuerpo R1507**, dirigido contra el receptor para el factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1), que está siendo evaluado en pacientes con tumores refractarios a la quimioterapia estándar<sup>32</sup>.

En el grupo de anticuerpos monoclonales que actúan induciendo funciones efectoras a través de su porción Fc debemos destacar, en primer lugar, aquellos que **median la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA)**. El anticuerpo quimérico murino/humano anti CD-20 (**rituximab**), empleado en el tratamiento de leucemias de

células B y también en patologías autoinmunes, o el anticuerpo contra el receptor 2 del factor de crecimiento humano o HER2 (**trastuzumab**), empleado en el tratamiento del cáncer de mama metastásico. Ambos median su actividad, al menos parcialmente, induciendo la CCDA contra sus células diana.<sup>3334</sup>

La **activación de la vía clásica del complemento** es otro de los mecanismos a través de los que actúan muchos anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, el ya mencionado anti-CD20 rituximab, presenta una muy escasa actividad antitumoral en ratones deficientes en C1q, trasplantados con un timoma que expresa el CD20 humano. Ello indica que, junto con la CCDA, se requiere la activación de la vía clásica del sistema del complemento para obtener una acción antitumoral eficaz.

Muchos anticuerpos monoclonales producidos con fines terapéuticos, aun cuando acceden al tejido tumoral, suelen inducir bajos niveles de citotoxicidad. Con la intención de superar esta limitación se han desarrollado **moléculas quiméricas que acoplan al anticuerpo una toxina**, como la ricina o abrina, de origen vegetal o toxinas bacterianas, como la toxina diftérica o la exotoxina de *Pseudomonas*. Todas ellas actúan inhibiendo la síntesis proteica. Estas “inmunotoxinas” ejercen su actividad citotóxica de forma selectiva, a diferencia de la quimioterapia y la radioterapia convencionales, que destruyen las células en división o metabólicamente activas, tanto normales como malignas.

También se han conjugado **anticuerpos monoclonales con radioisótopos o con fármacos utilizados en tratamientos de quimioterapia** a fin de incrementar su potencial citotóxico. En este grupo se incluyen dos radioinmunoligandos, aprobados para el tratamiento de los linfomas B: el yodo 131 o el itrio 90, acoplado con anticuerpos anti-CD20.

## SEGURIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales pueden presentar, al igual que otros fármacos, efectos adversos. En este sentido, las dos preocupaciones más importantes están relacionadas con la inmunomodulación (incluyendo el desarrollo de cáncer) y la aparición de infecciones, lo que ha dado lugar a una estricta regulación por parte de las autoridades sanitarias.

### - **Interacción entre el sistema inmunitario y los mAbs.**

Las principales reacciones adversas derivadas de esta interacción son: reacciones anafilácticas, enfermedad del suero, enfermedades autoinmunes, síndrome de lisis tumoral (relacionado en realidad con la lisis de células tumorales) y síndrome de liberación de citocinas. La intensidad de las reacciones puede variar desde leve (por ejemplo, reacciones locales en el lugar de la inyección) a potencialmente mortales (por ejemplo, anafilaxia o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica). Las reacciones anafilácticas pueden estar mediadas o no por IgE. Los mecanismos por los que se produce no siempre son bien conocidos. El desarrollo de una respuesta inmune frente a un mAb implica la aparición de efectos adversos y la pérdida de eficacia. Otro posible efecto secundario de origen inmunológico sería el desarrollo de enfermedades autoinmunes inducidas por biológicos (BIAD). La mayor parte de los casos se presentan

entre el mes y el año de iniciado el tratamiento con el agente biológico y en sus tres cuartas partes se resuelven casi por completo al suspender el tratamiento.

- **Infecciones.**

Uno de los efectos secundarios importantes de tratamiento con fármacos que bloquean el TNF- $\alpha$  es la reactivación de una tuberculosis latente, probablemente porque este agente desempeña un papel en el control del *Mycobacterium tuberculosis*. Por ello, la recomendación actual es tratar las tuberculosis latentes antes de iniciar el tratamiento con anti-TNF (como el etanercept), sobre todo en áreas endémicas. Otra entidad que puede aparecer en el curso del tratamiento con biológicos es la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) producida por el virus JC. En el caso de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra IgE (como los usados para el tratamiento del asma) o en los dirigidos contra la IL-5, hay riesgo de desarrollar parasitosis. Aunque se desconoce el efecto que puede tener la ausencia de eosinófilos en el ser humano, es posible que este efecto no sea de mucha importancia.

- **Anticuerpos monoclonales y desarrollo de cáncer.**

Si bien muchos de los mAbs se emplean en el tratamiento de las neoplasias, algunos de ellos podrían suponer una potencial asociación con el desarrollo de tumores como los dirigidos contra IL-12 pues promueven la infiltración de los linfocitos T citotóxicos en el tumor<sup>35</sup>, o los dirigidos contra IL-23 pues se sospecha que pueden inducir procesos proinflamatorios pro-tumorales<sup>36</sup>. Sin embargo, aún no se pueden extraer conclusiones definitivas a este respecto.

- **Síndrome de liberación de citocinas (CRS).**

**El síndrome de liberación de citocinas** es una reacción inmune grave que se produce en respuesta al uso de inmunoterapia contra ciertos cánceres (por ejemplo, las neoplasias linfoides), en la que la retroalimentación positiva conduce a una elevación progresiva de citoquinas inflamatorias por parte de los linfocitos T<sup>37</sup>. Puede ocurrir en respuesta a un mAb terapéutico u otras terapias basadas en el sistema inmune tales como las CARTs. Algunos consideran que CRS es una forma extrema de reacción a la infusión. El CRS puede estar acompañado de fiebre, dolor de cabeza, náuseas, malestar general, hipotensión, erupción cutánea, escalofríos, disnea y taquicardia. Se pueden observar elevaciones de las aminotransferasas séricas y la bilirrubina, y, en algunas ocasiones, se han notificado casos de coagulación intravascular diseminada (CID), síndrome de fuga capilar y un síndrome similar a la linfohistiocitosis hemofagocítica. El mayor factor de riesgo para CRS es la carga tumoral. Los anticuerpos con mayor probabilidad de causar CRS son aquellos que promueven la activación de linfocitos T como:

- **Blinatumomab**, un mAb bifuncional que se une a la proteína CD3 de superficie de célula T y al marcador CD19 de superficie celular, presente en células de leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células B precursoras. En una serie de 189 individuos tratados con blinatumomab, el 60 por ciento tenía fiebre, el 28 por ciento tenía neutropenia febril y el 2 por ciento tenía CRS grado III<sup>38</sup>.
- **Nivolumab**, un mAb que se une e inhibe PD-1 que se expresa en las células T, células B y células NK; su ligando (PD-L1) se expresa en células tumorales y se

cree que interfiere con la función efectora de células T citotóxicas. Un informe de casos describió el CRS después de una dosis única de nivolumab en un individuo con enfermedad de Hodgkin; el paciente se recuperó, tuvo una reducción drástica en el tamaño del tumor y pudo recibir dosis adicionales <sup>39</sup>.

- Se ha informado que **Rituximab** causa CRS particularmente en individuos con tumores malignos de células B. Se han informado casos raros de CRS asociados con rituximab en otros entornos <sup>40</sup>.

GRADO 1	GRADO 2	GRADO 3	GRADO 4	GRADO 5
Fiebre +/- síntomas constitucionales.	Hipotensión que responde a los líquidos; hipoxia que responde a <40% de O2	Hipotensión a pesar de la infusión de sueros; hipoxia que requiere ≥40% de O2	Consecuencias que amenazan la vida ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos.	Muerte.

**Tabla: 4. Gravedad síndrome de liberación de citocinas.** Graduación del CRS en función de los síntomas, desde más leve (grado 1) precisando únicamente tratamiento con paracetamol y vigilancia, hasta el fallecimiento del paciente (grado 5) <sup>41</sup>.

La profilaxis para el CRS (paracetamol y difenhidramina) a veces se incorpora a los protocolos de terapia. El manejo del SRC depende de la gravedad (**Tabla: 4**) y puede incluir la interrupción de la perfusión, el tratamiento sintomático, los líquidos intravenosos y el soporte ventilatorio <sup>42</sup>. El mAb tocilizumab, dirigido contra la interleucina IL-6, ha sido eficaz en el tratamiento de CRS relacionado con las células receptoras del antígeno quimérico (CAR), que, a diferencia de un mAb, no pueden suspenderse una vez que se han infundido <sup>42</sup>.

## RESISTENCIA

El concepto de resistencia a los medicamentos no se aplica habitualmente a los mAbs, pero en algunos casos se ha observado un comportamiento similar. Se debe principalmente a un cambio en el comportamiento de la enfermedad (mecanismos de escape que se verán en apartados posteriores de este trabajo), como por ejemplo le ocurre a un individuo con cáncer para el que un mAb fue inicialmente efectivo, pero luego se volvió ineficaz. En otros casos, la eficacia reducida puede deberse al desarrollo de **anticuerpos neutralizantes** producidos por el propio sistema inmune del paciente que están dirigidos contra el mAb terapéutico. Esto se ha visto con ciertos mAbs, como los dirigidos contra:

- **Factor de necrosis tumoral (TNF) -alfa.** Son: infliximab, adalimumab, certolixumab pegol, golimumab y etanercept. El riesgo de desarrollar anticuerpos parece ser menos común con el uso de etanercept, una proteína de fusión del receptor, y más común con infliximab.
- Receptor del factor de crecimiento epidérmico (**EGFR**).

- **Proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9).** Se han producido reacciones de hipersensibilidad como erupción cutánea, prurito y urticaria con los inhibidores de PCSK9. Se han descrito reacciones alérgicas graves, que rara vez incluyen eccema numular, urticaria grave y vasculitis por hipersensibilidad.

Se detectaron anticuerpos neutralizadores de fármacos en el 1,2 por ciento de los pacientes tratados con alirocumab. Los pacientes que desarrollaron anticuerpos neutralizantes para alirocumab tuvieron reacciones más frecuentes en el sitio de inyección que aquellos que no desarrollaron anticuerpos neutralizantes (10.2% frente a 5.9%). Sin embargo, la pérdida constante de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) disminuyó la eficacia no se observó entre los pacientes que tenían anticuerpos neutralizantes <sup>43</sup>.

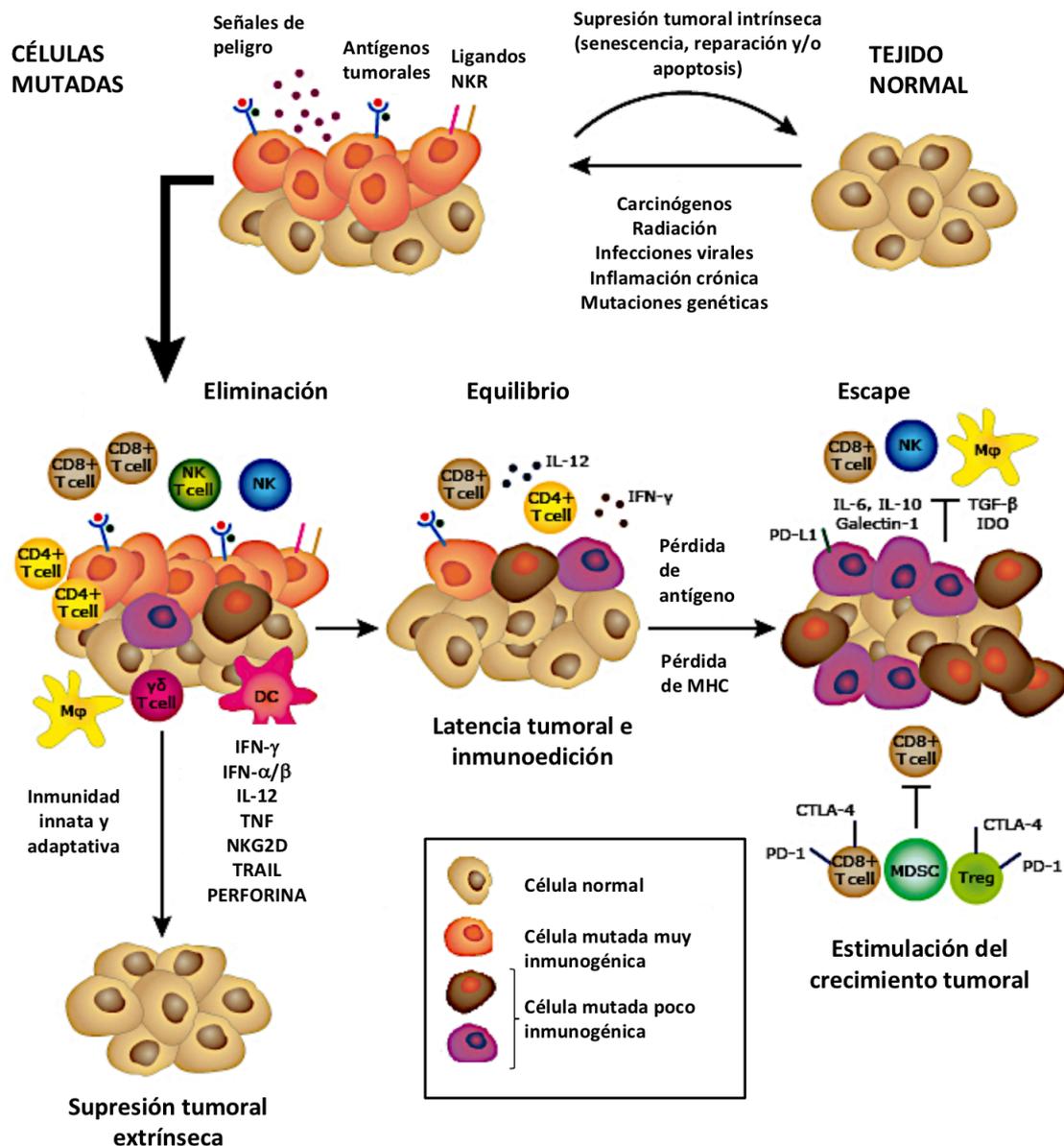
A pesar de esto, no todas las alteraciones en la señalización celular causan que los mAbs se vuelvan ineficaces y no todos los anticuerpos anti-mAb causan que el mAb sea neutralizado.

## PERSPECTIVAS DE FUTURO

Uno de los campos en los que más se está trabajando con la inmunoterapia es la oncología. En este sentido el uso de anticuerpos monoclonales tiene limitaciones:

1. **Pobre accesibilidad a tumores sólidos.** La escasa penetración de los anticuerpos en la masa tumoral supone una limitación importante, ésta se estimó para ciertos tumores, en sólo el 0,01% del anticuerpo administrado. <sup>11</sup>
2. **Escape tumoral** (selección de variantes sin el antígeno reconocido por el mAb).

Actualmente se sabe que el sistema inmune es capaz de reconocer determinados antígenos tumorales y a veces responde frente a ellos. En modelos de animales y en algunos casos excepcionales de humanos se ha demostrado que esta respuesta es capaz de eliminar ciertos tumores. Sin embargo, en la mayoría de los casos, aunque exista una respuesta inmunológica, esta es incapaz de erradicar el tumor. Las razones de esta ineficiencia se están empezando a desentrañar: muchos tumores desarrollan lo que se conoce como **mecanismos de escape**, es decir, estrategias que les permiten evitar la respuesta inmunológica. Las razones por las que un tumor puede evitar ser reconocido y destruido por el sistema inmune son múltiples y se pueden resumir en la **figura 8**.



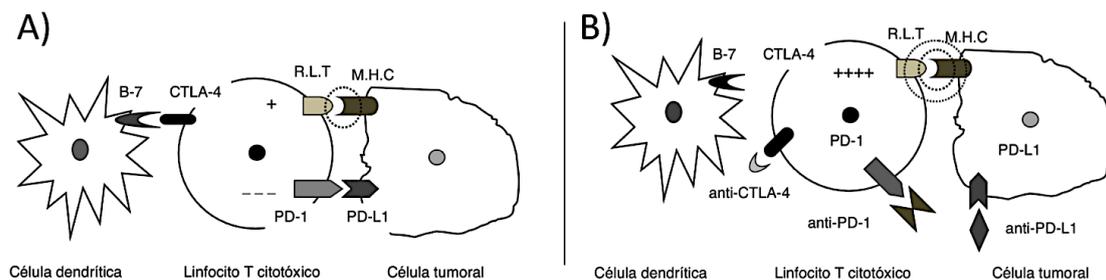
**Figura 8. "Inmunoedición" del cáncer.** Consta de tres fases secuenciales: eliminación, equilibrio y escape. En la fase de eliminación, la inmunidad innata y adaptativa trabajan conjuntamente para destruir los tumores en desarrollo mucho antes de que den manifestaciones clínicas. Se han identificado muchas de las moléculas y células inmunes que participan en la fase de eliminación, pero se necesita más trabajo para determinar su secuencia exacta de acción. Si esta fase llega a completarse no se desarrolla cáncer. Sin embargo, si una variante de célula cancerosa rara no se destruye en la fase de eliminación, puede entrar en la fase de equilibrio, donde su crecimiento se evita mediante mecanismos inmunológicos. Se requieren células T, IL-12 e IFN-γ para mantener a las células tumorales en un estado de latencia funcional, mientras que las células natural killer (NK) y las moléculas que participan en el reconocimiento o la función efectora no intervienen; el equilibrio es únicamente función de la inmunidad adaptativa y es donde tiene lugar la edición de la inmunogenicidad tumoral. El equilibrio también puede llegar a limitar el crecimiento de cánceres ocultos sin embargo, como consecuencia de la constante presión de selección inmune aplicada a las células

tumorales, pueden surgir variantes que (I) ya no serán reconocidas por la inmunidad adaptativa (variantes de pérdida de antígenos o células tumorales que desarrollan defectos en el procesamiento o presentación de antígenos), (II) se vuelven insensibles a mecanismos efectores inmunes, o (III) inducen inmunosupresores estado dentro del microambiente tumoral. Estas células tumorales pueden entrar en la fase de escape, en la que su crecimiento ya no está bloqueado por la inmunidad causando una enfermedad clínicamente manifiesta <sup>544</sup>.

Además del uso de anticuerpos, se están estudiando diferentes abordajes en el tratamiento del cáncer que, debido a su extensión, serán comentados en apartados posteriores <sup>5</sup>. En lo referente al uso de anticuerpo, algunas de las propuestas que se están investigando serían las siguientes:

- Inhibidores de moléculas del punto de control inmune (“**immune checkpoints**”).

Los puntos de control inmune son vías moleculares que impiden que los linfocitos T se vuelvan en contra de los tejidos sanos. Este mecanismo de inhibición es aprovechado por algunas células tumorales para escapar de la respuesta inmune. Una de estas moléculas del punto de control inmune es la llamada muerte celular programada 1 (**PD-1**) ubicada en la membrana de los linfocitos T. Cuando PD-1 se une a su ligando (PD-L1), localizado en la superficie de algunas células tumorales, el linfocito T se inactiva y la célula tumoral escapa al ataque. Por tanto, los anticuerpos monoclonales que inhiben PD-1 (como nivolumab o pembrolizumab) evitan esta unión impidiendo la inhibición del linfocito T contra la célula maligna. Otros anticuerpos conseguirían el mismo efecto dirigiéndose contra PD-L1 en la célula tumoral como atezolizumab, avelumab y durvalumab. Otra molécula de este tipo es el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (**CTLA-4**) pero que, a diferencia de PD-1 y PD-1L, se encuentra más ampliamente distribuida, lo que hace que su bloqueo (mediante ipilimumab) genere gran cantidad de daños colaterales sobre los tejidos sanos.



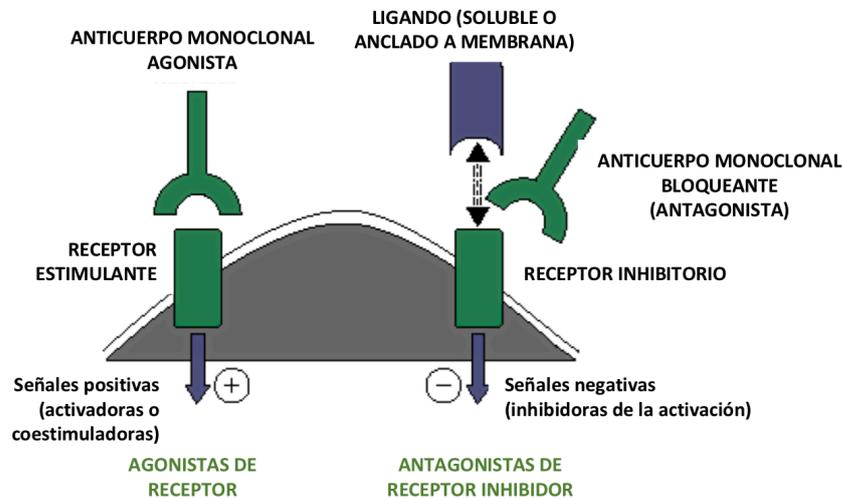
**Figura 9.** Mecanismo de acción de los inhibidores de moléculas del punto de control inmune. La imagen A muestra al Linfocito T bloqueado por las uniones PD1/PD-L1 y B7/CTLA-4. La imagen B muestra al linfocito T “desbloqueado” por la inhibición de PD-1, PD-L1 o CTLA-4 mediante anticuerpos. <sup>45</sup>

Parece que los mejores resultados se obtienen al combinar ambos tipos de anticuerpos (contra PD-1 o PD-L1 y CTLA-4) estando en estudio para el tratamiento de diferentes tumores (**Figura 9**). Así como la combinación del bloqueo de estas moléculas con el uso de quimioterapia, radioterapia y otros tratamientos oncológicos. El mayor problema de estos tratamientos (tanto por sí solos como en combinación) y que supone un reto

futuro es su mala tolerancia y la gran cantidad efectos adversos potencialmente mortales, los más comunes son: *rash* cutáneo, colitis, hepatopatías, neumonitis y endocrinopatías (hipofisitis, tiroiditis). Así mismo, parece que el beneficio producido es muy variable de una persona a otra obteniéndose en algunos casos resultados no superiores a los tratamientos quimioterápicos, lo que supone un gran coste en su investigación. La variabilidad interpersonal hace necesaria la identificación de biomarcadores que permitan predecir la respuesta a un tratamiento determinado, siendo especialmente importante en la inmunoterapia puesto que su coste es elevado y la toxicidad considerable. Uno de estos marcadores podría ser la expresión de PD-L1 para el uso de inhibidores de PD-1 pero también se ha observado respuesta en pacientes con expresiones bajas o nulas por lo que es necesario seguir investigando en este aspecto.<sup>39</sup>

Una mayor comprensión de los mecanismos inmunológicos subyacentes está conduciendo a la identificación de varias dianas potenciales para la inhibición del punto de control y que actualmente se encuentran en fase inicial de desarrollo clínico. Algunas de ellas son: el atenuador de linfocitos BTLA-B y T; VISTA; TIM3; gen 3 de activación de linfocitos (LAG3).<sup>5</sup>

- **Anticuerpos agonistas** de receptores estimuladores de la respuesta inmune. En lugar de bloquear un receptor e impedir la unión del ligando evitando la activación de una determinada respuesta por parte de la célula, los anticuerpos agonistas se unen a diferentes receptores celulares potenciando las funciones de la célula (**Figura 10**).



**Figura 10. Anticuerpos agonistas.** Representación esquemática de los mecanismos de acción propuestos para los anticuerpos monoclonales inmunoestimuladores.<sup>46</sup>

En la **tabla: 5** se exponen algunos ejemplos de receptores cuya estimulación (bien por su ligando natural o por anticuerpos monoclonales) provoca un aumento de la respuesta inmune que sería en principio beneficioso para la destrucción del tumor.<sup>5</sup> Todas las que se citan están siendo estudiadas en modelos animales o se hallan en fases tempranas de desarrollo clínico:

RECEPTOR/ CÉLULAS QUE LO EXPRESAN	LIGANDO NATURAL/CÉLULAS QUE LO EXPRESAN	ANTICUERPO EN ESTUDIO	POTENCIAL EFECTO
<b>4-1BB (CD137)</b> Linfocitos T activos; Tregs; NK; CDs	<b>4-1BBL</b> Linfocitos B activados, CDs, macrófagos.	Urelumab	Activación linfocitos T, CDs, monocitos y neutrófilos.
<b>OX40 (CD135)</b> T CD4+; T CD8+; CDs; neutrófilos; Tregs	<b>OX40L</b> APC y linfocitos T activos.		Revertir la función supresora de los Tregs.
<b>GITR (CD357)</b> T CD4+ y CD8+ (1-3 días tras la estimulación)		Anticuerpo murino anti-GITR DTA-1 deteriora la función Treg y mejora la actividad antitumoral de los linfocitos T citotóxicos.	Proliferación T CD8+, CD4+. Inhibe la AICD. Adhesión y migración de leucocitos. Revertir la supresión por Tregs, Induce memoria.
<b>ICOS</b> T activadas	<b>B7h, ICOSL</b>		Conmutación de isotipos, formación de centros germinales. ↑ Tregs. Compromiso del ICOS con ICOSL junto con el bloqueo de CTLA4 aumentó la eficacia de este último. <sup>47</sup>
<b>CD40</b> APC	<b>CD40L</b> Células T auxiliares.	Dacetuzumab. Lucatumumab	Activación CDs que se unen a su ligando.
<b>CD28</b> Células T	<b>CD80 o B7.1/CD86</b> o <b>B7.2</b> APC	Ya no están en desarrollo por su gran toxicidad (liberación de citoquinas).	Coestimulación CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2). Estimulador de células T ex vivo

**Tregs:** linfocitos T reguladores.

**CDs:** células dendríticas.

**APC:** células presentadoras de antígenos.

**GITR:** receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) inducido por glucocorticoides.

**AICD:** muerte celular inducida por activación.

**ICOS:** coestimulador inducible de células T.

**Tabla 5. Receptores involucrados en la estimulación de la respuesta inmune:**

implicación y mecanismo de estimulación de diferentes receptores celulares dentro de la respuesta inmune <sup>(5)</sup>.

- **Anticuerpos biespecíficos (BiTEs).**

Los BiTEs funcionan como anclaje entre los linfocitos T y los antígenos diana con independencia de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC o

HLA). Estos anticuerpos consisten en un fragmento de proteína que contiene dos regiones variables de cadena única separadas; un extremo reconoce C3 (que se expresa en todos los linfocitos T) y el otro reconoce el antígeno diana (CD19, CD20, CD33, CD123, HER2, molécula de adhesión a célula epitelial [EpCAM], BCMA, CEA, y otras). La ventaja que aportan este tipo de anticuerpos con respecto a los monoclonales es que consiguen una mayor implicación de los linfocitos T en la respuesta inmune contra el tumor y por tanto un ataque más potente. Además, los BiTEs son más específicos que los anticuerpos monoclonales en su unión al antígeno puesto que interactúan con dos moléculas de superficie de forma simultánea y podrían usarse también para la neutralización de dos cascadas de señalización diferentes a través de la inactivación a nivel del receptor o los ligandos. Sin embargo, los BiTEs no son muy selectivos puesto que muchos subtipos celulares (no solo los linfocitos T citotóxicos) expresan CD3: Th1, Th2, CD4+ y Tregs. El BiTE más desarrollado es el **blinatumomab**, que tiene especificidad por el antígeno CD19 que se encuentra en muchos tumores malignos de células B y en la fracción constante del receptor CD3 de los linfocitos T. Este anticuerpo fue aprobado de forma acelerada por la FDA para el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda con cromosoma Filadelfia negativo basándose en resultados prometedores de pequeños estudios en fase inicial que más tarde se confirmaron en un estudio de mayor tamaño en fase III.<sup>48</sup> En Europa también está aprobado el uso de catumaxomab que se dirige contra EpCAM para el tratamiento intraperitoneal de la ascitis maligna en adultos con carcinomas positivos para ese antígeno. Parece que el uso de BiTEs se relaciona con una respuesta prolongada tras el tratamiento lo que podría proporcionar inmunidad antitumoral duradera en el organismo. En el caso de catumaxomab, se debe a la afinidad de su región Fc por las células dendríticas que presentan el antígeno.<sup>49</sup>

Hay más de 60 BiTEs en fases preclínicas y 30 en ensayos clínicos, de ellos, **dos tercios están centrados en el tratamiento del cáncer**, lo que nos da una idea de hacia donde se está enfocando principalmente la investigación en el uso de la inmunoterapia. Sin embargo, fuera del ámbito de la oncología, las aplicaciones tanto de anticuerpos monoclonales como de BiTEs son innumerables, desarrollándose aplicaciones diagnósticas y terapéuticas para enfermedades autoinmunes (artritis, asma y diabetes), enfermedades infecciosas (como la neumonía), hemofilia A (sustitución de la actividad del factor VIII de la coagulación por un BiTEs) y la enfermedad de Alzheimer. En este sentido y a modo de ejemplo, se pueden mencionar las siguientes líneas de investigación:

- **Enfermedad de Alzheimer:**

El anticuerpo monoclonal tipo IgG<sub>1</sub> Aducanumab, se dirige contra la proteína  $\beta$ -amiloide cuya acumulación parece ser uno de los principales mecanismos implicados en la patogenia de esta enfermedad. Las primeras conclusiones muestran un moderado enlentecimiento en la progresión de la sintomatología de la enfermedad en pacientes en fases iniciales de la misma. Actualmente se encuentra en ensayo clínico en fase 3, implica a 1350 personas, se inició en junio de 2015 y está prevista su finalización en marzo de 2022<sup>50</sup>. Otro abordaje que se está estudiando y que se ha probado con éxito en modelos de ratón<sup>51</sup>, es usar un anticuerpo biespecífico que se dirija al receptor de la transferrina y a la proteasa BACE1 (implicada en la acumulación de amiloide). El hallazgo de que la unión al receptor de la transferrina facilita el paso del anticuerpo a través de

la barrera hemato-encefálica es importante no solo para la enfermedad de Alzheimer, sino también para el diseño de nuevos anticuerpos en el tratamiento de otras tauopatías.<sup>52</sup>

- **Hiperlipidemias:**

PCSK9 es una serin-proteasa que se une al receptor de colesterol LDL (LDLc) y promueve su degradación lisosómica<sup>53</sup>. A través de este mecanismo postranscripcional, PCSK9 limita el catabolismo de LDL y aumenta los niveles plasmáticos de LDLc. PCSK9 también se dirige a la síntesis de lipoproteínas en el intestino contribuyendo a un perfil de lípidos en plasma alterado. De esta forma, los pacientes homocigotos para mutaciones de ganancia de función en el gen PCSK9 presentan el fenotipo clínico de hipercolesterolemia familiar (HF) con xantomas tendinosos, antecedentes de enfermedad cardiovascular, infarto de miocardio temprano y accidente cerebrovascular. Por el contrario, los sujetos con mutaciones de pérdida de función en el gen PCSK9 presentan niveles plasmáticos de LDLc más bajos y están protegidos contra las enfermedades de las arterias coronarias<sup>54,55,56</sup>. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra PCSK9 circulante han sido aprobados para el tratamiento de pacientes con riesgo cardiovascular muy alto, pacientes con HF e intolerancia a estatinas. Se han desarrollado tres anticuerpos dirigidos a PCSK9 (evolocumab, alirocumab, bococizumab) y uno, LY3015014 está en desarrollo<sup>57</sup>. Evolocumab y alirocumab están disponibles en el mercado mientras que el desarrollo de bococizumab se ha detenido ya que se observó una reducción en la eficacia como consecuencia de la inducción de anticuerpos neutralizantes<sup>58</sup>. Los resultados de los estudios de Fase II indicaron que la terapia PCSK9 reduce el colesterol LDLc en un 60% -70%<sup>59</sup>. Las terapias anti-PCSK9 no solo reducen los niveles de LDLc sino que también favorecen la regresión de la placa aterosclerótica, como lo demuestra el ensayo GLAGOV, donde en pacientes con enfermedad coronaria angiográfica tratados con estatinas, la adición de evolocumab produjo una disminución del -0.95% en el porcentaje de ateroma después 76 semanas de tratamiento<sup>60</sup>. Más recientemente, el ensayo FOURIER demostró que la inhibición de PCSK9 con evolocumab, en un contexto de terapia con estatinas, redujo el riesgo de eventos cardiovasculares (duración media del seguimiento de 26 meses) apoyando aún más el beneficio de esta estrategia farmacológica<sup>61</sup>.

- **Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH):**

El desarrollo de la terapia antirretroviral combinada para limitar la infección por VIH y sus complicaciones ha sido un importante logro de la medicina moderna, sin embargo, estos medicamentos no erradican el virus; sólo suprimen su ciclo de replicación celular. Para tratar de erradicar el virus del organismo surge la propuesta de usar anticuerpos biespecíficos. Algunos **BiTEs anti-VIH** están dirigidos contra el linfocito CD4+ y además se unen a la región variable V3 de la proteína gp120 (superficie del virus) dando lugar a ScFvs biespecíficos anti-VIH1, que han demostrado efecto sinérgico tanto in vivo como in vitro. Otra variante es la unión contra gp41 (de la cápside viral), CD4 o CCR5 (del linfocito T CD4+) como forma de prevención de la infección por VIH.<sup>62,63</sup>

**Anticuerpos ampliamente neutralizantes (bNAbs):** son anticuerpos neutralizantes, es decir, que defienden por completo a la célula diana de un antígeno, pero cuyo efecto se

extiende a una gran gama de antígenos, por ello su denominación de “ampliamente neutralizantes”. Los avances en el descubrimiento de bNAbs dirigidos a las glicoproteínas de la envoltura del VIH-1 (Env) han despertado gran interés en su uso como profilaxis previa a la exposición para la prevención y como agentes terapéuticos, particularmente en combinación con tratamiento antirretroviral para la remisión y erradicación del VIH <sup>6465</sup>. El aislamiento y caracterización de bNAb se ha acelerado mediante la integración de información funcional y estructural emergente y nuevas tecnologías de clasificación y clonación de células B individuales <sup>6667</sup>. Los bNAbs son terapéuticamente beneficiosos ya que poseen una gran capacidad de neutralización viral. Además, los bNAbs pueden facilitar las funciones efectoras mediadas por fragmento (Fc) que promueven la lisis celular y el aclaramiento de las células infectadas que expresan el Env del VIH-1 en la superficie celular mediante citotoxicidad dependiente de anticuerpos y citotoxicidad dependiente del complemento

Otro enfoque es la combinación de Bi-ScFvs (contra V3 y CD4) con un anticuerpo ampliamente neutralizante que reconozca la región externa de la membrana Env (MPER) dando como resultado un anticuerpo triespecífico que tenga la amplitud de reconocimiento antigénico propia de los anticuerpos neutralizantes y además la especificidad de los BiTEs <sup>68</sup>.

#### - **Vacunas terapéuticas anti-ébola.**

La inmunidad humoral juega un papel importante en la protección contra la enfermedad producida por el virus del Ébola. Sin embargo, los datos derivados de los estudios de transferencia pasiva a primates muestran que algunos anticuerpos protegen a los animales de la infección posterior pero no neutralizan el virus, mientras que otros lo neutralizan, pero no protegen. La importancia relativa de los anticuerpos que neutralizan frente a aquellos que pueden conferir protección a través de otros mecanismos (por ejemplo, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, mecanismos mediados por complemento o dependientes de Fc) no está clara. De acuerdo con estos datos, los regímenes de transferencia pasiva más exitosos, incluido el uso del cóctel de anticuerpos monoclonales ZMapp (Mapp Biopharmaceutical), que protegen y tratan a los animales de experimentación expuestos al virus del Ébola, incluyen combinaciones de anticuerpos dirigidos a diferentes funciones del efector de la inmunidad humoral. <sup>69</sup>

Los anticuerpos monoclonales contra la glicoproteína de la envoltura representan una plataforma terapéutica prometedora para controlar las infecciones por filovirus. Sin embargo, los mAb que exhiben propiedades de neutralización o protección contra múltiples filovirus son raros. <sup>70</sup>

Otras aplicaciones que están siendo investigadas son el desarrollo de las llamadas vacunas **anti-idiotipo**, que consistirían en anticuerpos que reproducen la morfología del antígeno induciendo la inmunidad. Actualmente no hay ninguno diseñado para el ébola u otros filovirus pero hay ejemplos de su uso en la prevención del dengue <sup>71</sup> o de la malaria por lo que podría ser una opción a investigar.

#### - **Nanoanticuerpos.**

Se ha propuesto que los nanoanticuerpos podrían reemplazar a los anticuerpos convencionales debido a su manejo más sencillo, alta estabilidad fisicoquímica, mayor solubilidad, mejor penetración en los tejidos, rápida eliminación y su coste de producción más asequible. Al igual que ocurre con los anticuerpos monoclonales tienen infinidad de potenciales usos, incluso en campos fuera de la inmunoterapia (como la detección de sustancias químicas en el medio ambiente <sup>72</sup> o de toxinas en alimentos <sup>20</sup>) algunas de las aplicaciones que se están desarrollando en el ámbito médico son:

- Detección de virus en alimentos como en el caso del rotavirus y norovirus humano → kit de diagnóstico.
- Prevención, detección y control de enfermedades tropicales <sup>73</sup>.

#### - **Otras patologías:**

**Osteoporosis:** BiTEs que bloquea los factores de la vía de transducción de señal Wnt (esclerostina y Dkk1); mejora la formación de osteoblastos y el crecimiento del tejido óseo. <sup>74</sup>

**Hemofilia A:** el BiTEs ACE910 se une a los factores de coagulación sanguínea IX y X reduciendo la tasa de hemorragia en esta enfermedad. La unión a ambos factores mejora la cascada de coagulación. <sup>75</sup>

**Uso en reumatología:** los BiTEs que se centran en las enfermedades autoinmunes generalmente se unen a las citoquinas: TNF, IL1, IL4, IL14, IL17, IL23 y otros. <sup>7677</sup> Se ha demostrado que el uso simultáneo de dos mAb contra citoquinas en enfermedades autoinmunes tiene efectos secundarios graves sin una eficacia superior. A este respecto, los BiTEs contra las enfermedades autoinmunes normalmente combinan dos sitios de unión al antígeno y proporcionan un mayor potencial terapéutico que la mezcla de dos mAbs. <sup>7879</sup> En particular, las citoquinas más terapéuticamente relevantes en la psoriasis son IL17, IL23, IL6 y TNF. <sup>80</sup> ABT122 contra TNF $\alpha$  e IL17A tiene efectos clínicos en artritis reumatoide y artritis psoriásica. <sup>81</sup> En contraste, los ensayos clínicos de Fase I/II de COVA322 (misma especificidad que ABT122) en la psoriasis <sup>82</sup> fueron cancelados por motivos de seguridad. <sup>78</sup> ABT981 está dirigido contra IL1 $\alpha$  e IL1 $\beta$ , citoquinas inflamatorias localizadas en el cartílago y el líquido sinovial de pacientes con osteoartritis <sup>83</sup>.

## TERAPIA CELULAR ADOPTIVA

Los procesos inmunológicos están desencadenados por antígenos y consisten en dos tipos de respuesta inmunitaria estrechamente relacionadas: respuesta mediada por células T (inmunidad celular) y respuesta mediada por anticuerpos (inmunidad humoral). Hasta ahora, este trabajo se ha centrado en describir el papel de los linfocitos B y de los anticuerpos en la respuesta inmune contra antígenos de diferentes tipos (inmunidad mediada por anticuerpos) y su utilidad en diferentes campos de la medicina. Sin embargo, hay muchas más células implicadas en la inmunidad, tanto innata como adaptativa, siendo una de las más relevantes en esta última el linfocito T.

La terapia celular adoptiva o transferencia de células T adoptivas se refiere en general a la práctica de manipular células T, de los propios pacientes, *ex vivo* para hacerlas más reactivas a antígenos específicos.<sup>5</sup> Dentro de ella hay diferentes modalidades terapéuticas cuyas ventajas y limitaciones se resumen, más adelante, en la **tabla 6**. El uso de células T dirigidas directamente contra antígenos específicos ha demostrado ser una terapia prometedora contra el cáncer y el VIH. Dentro de los usos terapéuticos de los linfocitos T, el que parece más prometedor es el uso de linfocitos T modificados genéticamente para que expresen el receptor de antígenos deseado (en el caso del cáncer, los antígenos asociados a tumor o TAAs), serían las llamadas CART (células T con receptor de antígeno quimérico)<sup>84</sup>.

### **CÉLULAS T CON RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO (CARTs)**

Las CARTs son linfocitos T genéticamente modificados, donde las células T propias (autólogas) del paciente se manipulan *ex vivo* para expresar el dominio de unión a antígeno de un receptor de células B que se fusiona con el dominio intracelular de un CD3 del receptor de linfocitos T (TCR). Como resultado, el reconocimiento de un antígeno de superficie celular específico activa la respuesta de los linfocitos T independientemente del reconocimiento por parte del MHC<sup>5</sup>.

Las primeras composiciones de CART (figura 11) solo tenían un único dominio de señalización CD3, mientras que las actuales (3ª generación) poseen tres dominios de señalización: CD3, 41BB y CD28, lo que aumenta la persistencia del linfocito T y su proliferación<sup>84</sup>. Además se puede mejorar aun más su función efectora si se administran conjuntamente con citocinas como la IL12<sup>85,86</sup>. En la actualidad hay más de 250 ensayos clínicos con CART, siendo más estudiado su uso en neoplasias hematológicas. Los ensayos clínicos dirigidos a CD19, el pan-antígeno de los linfocitos B, han demostrado un éxito notable en la leucemia linfoblástica aguda de células B (LLAB-B)<sup>87</sup>. En ciertos pacientes se han descrito efectos secundarios graves asociados al uso de CART, como el ya comentado síndrome de liberación de citocinas, fiebre, hipotensión, alteración del estado mental y convulsiones, requiriendo incluso en algunas ocasiones la necesidad de cuidados intensivos. Los ensayos en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) también han mostrado resultados prometedores<sup>88,89</sup>. Están en marcha numerosos ensayos clínicos en tumores hematológicos, así como fases tempranas de algunos tumores sólidos utilizando como dianas el antígeno carcino-embriionario (CEA), la mesotelina o el HER2.

### **LINFOCITOS T INFILTRANTES DE TUMOR (TILs)**

Los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) representan una población de células inmunes que reconocen el antígeno tumoral pero que puede haber desarrollado un fenotipo agotado debido al microambiente generado por el tumor. Se entiende por fenotipo agotado o “T-cell exhaustion” a la pérdida gradual y progresiva de las funciones de los linfocitos T y que puede culminar en la eliminación física de las células que responden. El agotamiento se puede desarrollar en condiciones de persistencia del antígeno, como después de infecciones crónicas por el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C e infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana, así como durante la expansión tumoral. Ahora se dispone de más información sobre los mecanismos moleculares que

atenúan la capacidad de respuesta de las células T agotadas. Las células T agotadas en el microambiente tumoral muestran receptores inhibidores sobreexpresados, producción disminuida de citoquinas efectoras y actividad citolítica, lo que conduce a un fallo en la eliminación de las células malignas. La restauración de las células T agotadas representa una estrategia esperanzadora para el tratamiento del cáncer; dando resultados prometedores en este aspecto y convirtiéndose en un gran avance en la inmunoterapia del cáncer <sup>90</sup>.

La expansión *ex vivo* de TIL utiliza tejido tumoral recién resecado para extraer TILs y cocultivarlos junto con IL2 para estimular su expansión *in vitro*. Antes de la reinfusión de TIL expandidos, el paciente recibe regímenes quimioterapéuticos no mieloablativos como ciclofosfamida o irradiación corporal total, que funciona para reducir el número de linfocitos T reguladores, inhibidores u otros tipos de linfocitos en el paciente que estaban frenando la respuesta inmune contra el tumor <sup>91</sup>. Los TILs estimulados *in vitro*, compuestos en gran parte por CD8+ y en menor medida por linfocitos T CD4+, se reintroducen en el paciente a dosis elevadas junto con altas dosis de IL2 donde pueden reconocer antígenos tumorales específicos en un microambiente que ahora es menos propenso a inducir tolerancia.

Este enfoque terapéutico ha demostrado eficacia en un grupo de pacientes con melanoma <sup>92</sup> y también ha mostrado respuestas en otras enfermedades malignas como el carcinoma de células escamosas del cuello uterino y el colangiocarcinoma <sup>93,94</sup>. Además, recientemente, se ha visto también eficaz para el cáncer de mama metastásico utilizando, para este último, una estrategia combinada con inhibidores del punto de control inmune <sup>95</sup> (ver apartado “**terapias combinadas**” más adelante).

Principales limitaciones:

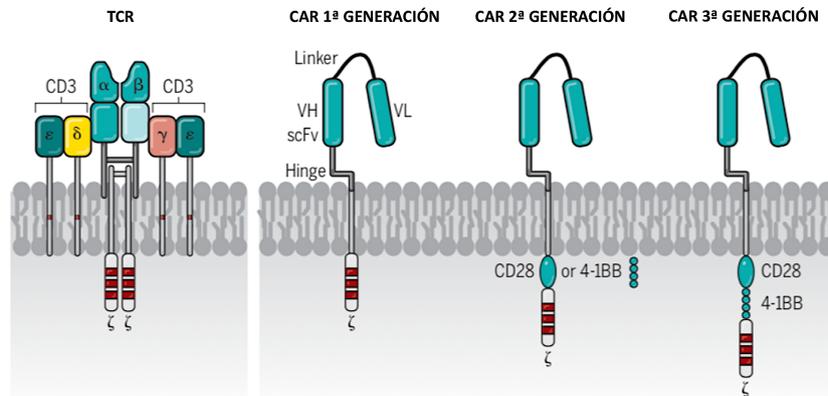
- No todos los tejidos tienen TIL extraíbles ni todos los TIL se pueden expandir *in vitro*.
- Es un proceso largo, semanas desde la extracción de TIL hasta el inicio de la reinfusión.

### RECEPTOR DE LINFOCITOS T (RLT o TCR) MODIFICADOS GENÉTICAMENTE

El complejo de receptores de células T (TCR) consisten en una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$  (receptores CD4 o CD8) asociadas de manera no covalente con el complejo CD3 en la superficie de las células T (**figura 11**). La activación de las células T se produce cuando el TCR reconoce péptidos unidos de forma no covalente al MHC en la superficie de células presentadoras de antígeno o de las células tumorales <sup>96</sup>. Por tanto, TCR tiene dos componentes transmembrana:

- **Los receptores CD4 o CD8** que se unen al MHC. Las proteínas CD4/CD8 en muchas células T consisten en una alta variabilidad de subunidades alfa unidas a la subunidad beta. Estas regiones variables se parecen a la fracción Fab de un anticuerpo y son responsables de la especificidad de una célula T por su antígeno particular.

- **Las moléculas CD3** que codifican los complejos de proteínas transmembranas transmembrana con una tirosina intracelular que genera señales intracelulares dando lugar a una cascada de activación de los efectores.



**Figura 11. Diseñando linfocitos T.** Diseño de TCR frente a CART. Las células T se pueden redireccionar para que tengan especificidad hacia los tumores mediante la introducción de proteínas TCR transgénicas (izquierda) (receptores de células T) o (derecha) CAR (receptor de antígeno quimérico). Los CAR son proteínas de fusión de una porción extracelular que generalmente se deriva de un anticuerpo y módulos de señalización intracelular derivados de proteínas de señalización de células T. Las CAR de primera generación contienen CD3, mientras que las CAR de segunda generación poseen un dominio coestimulante (CD28 o 4-1BB) fusionado a CD3. Los CAR de tercera generación constan de dos dominios coestimuladores vinculados a CD3z. scFv, fragmento variable monocatenario; VH, cadena pesada variable; VL, cadena ligera variable.

La primera inmunoterapia contra el cáncer de células T TCR utilizada en la clínica fue probada contra el melanoma metastásico y utilizó un TCR que unía un antígeno A2 de los linfocitos humanos (HLA-A2) de un antígeno de diferenciación melanocítica <sup>97</sup>. Posteriormente, se desarrolló un TCR de mayor avidéz dirigido al epítipo MART-1 (antígeno de melanoma reconocido por células T 1), con el objetivo de lograr un reconocimiento mejorado de células malignas con menor expresión de MART-1. Aunque se demostró una tasa de respuesta mejorada, se incluyó un costo para los melanocitos normales en la piel, los ojos y la cóclea <sup>98</sup>. Tal toxicidad ocurrió en más de la mitad de los pacientes tratados, lo que mostró que la línea que separa la eficacia y la toxicidad cuando señalizan antígenos compartidos puede ser delgada. Por otro lado, el uso de TCR contra el antígeno NY-ESO-1 de cáncer de testículo ha producido eficacia clínica sin toxicidad apreciable, lo que ha supuesto un esperanzador resultado en el uso de esta terapia <sup>99</sup>; las células T modificadas NY-ESO-1 se encuentran actualmente bajo evaluación en un ensayo clínico en fase tardía (NCT01343043, clinicaltrials.gov).

Otro enfoque para aumentar la función de las células T efectoras contra un antígeno particular, es diseñar un TCR soluble (CD8) y fusionarlo con el fragmento variable que reconoce a la célula efectora, como CD3 <sup>100</sup>. Mediante ingeniería genética se introduce en los linfocitos genes que codifican para un TCR específico de un complejo antígeno/MHC, y de esta manera una vez la célula lo exprese, será capaz de detectar y destruir únicamente a la célula tumoral que presente ese antígeno. Las ventajas que

tiene el diseñar un TCR en lugar de un fragmento de anticuerpo son una mayor afinidad por la cadena peptídica y permitir la selección de fragmentos peptídicos intracelulares <sup>101</sup>.

		VENTAJAS	LIMITACIONES
<b>INTEGRACIÓN</b>	<b>CART</b>	Reconocimiento de antígenos independientemente del MHC.	Solo reconocen antígenos extracelulares (membrana). Síndrome de liberación de citocinas más grave que el producido por TCR.
	<b>TILs</b>	Buenos resultados en cánceres como el melanoma. Toxicidad baja.	Se desconoce la causa de su efectividad. Tratamiento individualizado a cada paciente. Dificultad para saber cuáles son los linfocitos más sensibilizados contra el tumor. Requiere uso conjunto de otras terapias (inmunosupresores, coestimuladores).
	<b>TCR</b>	Reconoce antígenos intracelulares y extracelulares.	Requiere MHC-1 y HLA. Reconocimiento cruzado de TCR de otros antígenos <sup>102</sup> . Ataque a tejidos sanos, toxicidad difícil de prevenir. Corta duración.

**Tabla 6. Tipos de terapia celular adoptiva.** Tabla comparativa de las diferentes modalidades de terapia celular adoptiva en la que se resumen las principales ventajas y limitaciones de cada una de ellas<sup>5848586</sup>.

Uno de los mayores desafíos en el desarrollo de enfoques terapéuticos basados en células es la escasez de modelos preclínicos para evaluar la seguridad y eficacia de estas terapias antes de su uso en humanos. Aunque la terapia celular adoptiva está transformando el tratamiento de las neoplasias malignas hematológicas, todavía existen muchos obstáculos para aplicar con éxito estos enfoques terapéuticos en los tumores sólidos. Los avances en la ingeniería de células T, edición de genes y fabricación de células tienen el potencial de ampliar las terapias basadas en células T a otros tipos de células tales como células madre pluripotentes, células madre hematopoyéticas y natural killer, así como de fomentar nuevas aplicaciones más allá de la oncología en enfermedades infecciosas, trasplante de órganos y autoinmunidad <sup>96</sup>.

## VIRUS ONCOLÍTICOS

Los virus oncolíticos han demostrado eficacia en la infección de células tumorales y su lisis; median sus efectos antitumorales de varias maneras:

- Pueden modificarse para infectar preferentemente las células tumorales sobre las células sanas.
- Promueven la presentación de antígenos asociados a tumores.
- Activan “señales de peligro” (PAMPs y DAMPs) que promueven un microambiente tumoral menos tolerante.
- Sirven como vehículos de transducción para la expresión de citocinas inmunomoduladoras.

El agente más avanzado en el desarrollo clínico es talimogene laherparepvec (T-VEC), que utiliza un virus herpes simple (VHS1) para sobreexpresar el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), que promueve la preservación de antígenos mediada por células dendríticas. Desde el 2015 T-VEC está aprobado para el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico irresecable <sup>103</sup>. En un ensayo aleatorio que comparó inyecciones intratumorales de T-VEC y de GM-CSF solo, se vio que las inyecciones intratumorales con T-VEC produjeron mayor tasa de respuesta y de más duración <sup>104,105</sup>. Otros virus están en fases de investigación clínica o preclínica, incluyendo adenovirus <sup>106,107</sup>, reovirus <sup>108</sup>, virus de la enfermedad de Newcastle <sup>109</sup> y otros.

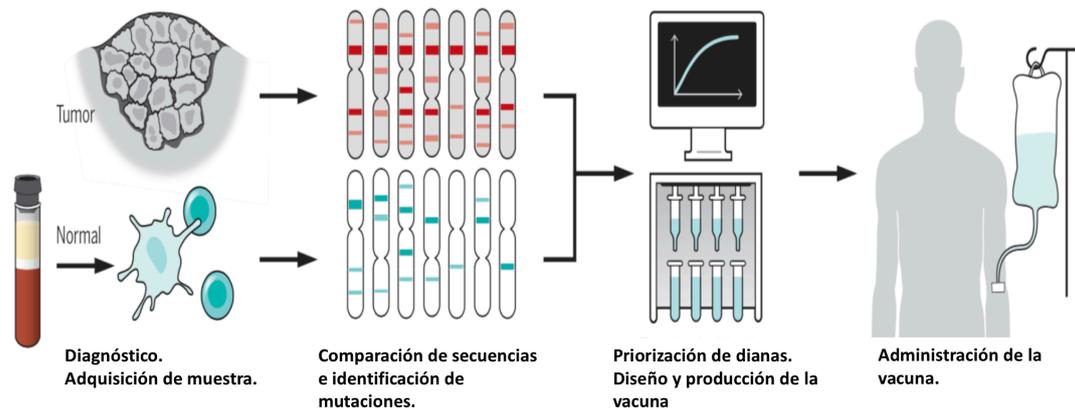
## VACUNAS ANTICÁNCER

Un importante avance en el campo de la inmunoterapia activa se produjo al descubrir la posibilidad de obtener gran cantidad de células dendríticas a partir de precursores monocitarios en presencia de GM-CSF e IL-4 <sup>110,111</sup>. Las CD son las encargadas de la correcta presentación de antígenos a los linfocitos T, y la falta de estas o una deficiencia en sus funciones son algunos de los principales mecanismos que aprovechan las células tumorales para escapar de la respuesta inmune.

Existe un largo historial de intentos de aprovechar el reconocimiento por parte del sistema inmune adaptativo de un antígeno relacionado con el cáncer para provocar respuestas antitumorales. Los tipos de vacuna varían ampliamente, todos se basan en que los diferentes tipos de antígenos, las pautas de administración y los adyuvantes inmunes que los acompañan pueden influir en la respuesta inmune adaptativa. Las opciones de antígeno varían desde **péptidos simples**, que son fáciles de administrar, pero afectan a un estrecho espectro antigénico y suelen estar restringidos por la expresión específica de moléculas MHC de clase 1; hasta preparaciones de **células completas** que ofrecen una gama más amplia de antígenos, pero son más costosas y requieren mucho tiempo para prepararse <sup>112</sup>. La única "vacuna" aprobada para el cáncer actualmente es sipuleucel-T que es una preparación autóloga de células dendrítica diseñada para atacar la fosfatasa ácida prostática (PAP) y que ha demostrado mejorar la supervivencia global en hombres con adenocarcinoma de próstata resistente a la castración <sup>113</sup>. La sangre del paciente se somete a leucoféresis y se expone *ex vivo* a PAP fusionado a GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos humanos) fomentando la maduración de las células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos, para presentar PAP a las células T del paciente que luego serán capaces de reconocerla. Sin embargo, el grado de proliferación de las células T específicas de PAP en la semana 6 no se correlacionó con la supervivencia en el estudio, lo que sugiere que debe haber mecanismos inmunológicos adicionales que puedan explicar ese beneficio observado en la supervivencia.

Otro enfoque de vacuna terapéutica utiliza un virus *vaccinia* (viruela bovina) y de la viruela aviar genéticamente modificado para contener una copia del gen del antígeno prostático específico (PSA) humano (denominado PROSTVAC-VF). Este virus se combina con un "cóctel" patentado de adyuvantes inmunes para reforzar la respuesta inmune local. <sup>114,115</sup> En varios estudios de fase I y II, el tratamiento fue bien tolerado y la toxicidad fue mínima <sup>116,117</sup>.

Dado el conocimiento cada vez mayor de la importancia del reconocimiento inmune de múltiples antígenos específicos de paciente y de tumor, los esfuerzos actuales para desarrollar vacunas terapéuticas contra el cáncer están comenzando a explorar el uso de antígenos individualizados agrupados, lo que podríamos llamar vacunas personalizadas (**Figura 12**). Esto sugiere que los enfoques de vacunación individualizados a cada paciente pueden ser factibles, especialmente en tumores inmunógenos como el melanoma (hasta ahora los resultados no han demostrado una eficacia superior a los otros tratamientos <sup>118</sup>), el cáncer de pulmón no microcítico, el carcinoma colorrectal y el carcinoma de vejiga <sup>119,120</sup>.



**Figura 12. Vacunas personalizadas.** Las biopsias de tumores de pacientes y el tejido sano (por ejemplo, glóbulos blancos de sangre periférica) se secuencian. Al comparar las secuencias obtenidas de ADN tumoral y normal, se identifican variaciones de nucleótido, inserciones o deleciones en genes que codifican proteínas. Se examinan las regiones peptídicas mutantes para la unión a los alelos HLA del paciente (en base a la afinidad predicha) y otras características de la proteína mutada que se consideran relevantes para la priorización de posibles dianas de las vacunas. Estos datos pueden facilitar la selección de mutaciones múltiples para diseñar vacunas con nuevos epítopos, únicas <sup>121</sup>.

## CITOCINAS INMUNOMODULADORAS

Se trata de aprovechar los numerosos efectos de las citoquinas y otras sustancias que influyen en la actividad de las células inmunes para potenciar la respuesta inmune. Ejemplos incluyen el uso de:

- **Interleucina-2 (IL-2)** se descubrió inicialmente como factor de crecimiento de células T. IL-2 tiene efectos pleiotrópicos tanto en la función de las células T citotóxicas como en el mantenimiento de los linfocitos T reguladores (Treg). Los efectos dependen parcialmente de la dosis y el momento de administración de IL-2 <sup>122</sup>. A dosis altas, IL-2 promueve la actividad citolítica de los linfocitos T efectores CD8+ y NK y promueve la diferenciación de los linfocitos T CD4+ en las subclases T helper (Th) 1 y Th2 <sup>123</sup>. A dosis más bajas, la IL-2 parece expandir preferentemente las poblaciones de Treg, probablemente debido a la mayor afinidad del receptor de IL-2 trimérico (IL-2R o CD25) en esas células, e inhibe la formación de células Th17 implicadas en autoinmunidad <sup>124125126</sup>. Aunque el uso de IL-2 ha sido sustituido en gran parte por el uso de inhibidores del punto de

control, el bolo y la dosis alta de IL-2 logró respuestas objetivas duraderas en algunos pacientes con melanoma y carcinoma de células renales (CCR), lo que se consideró una prueba más de que el sistema inmune es capaz de eliminar las células cancerosas<sup>127,128</sup>.

- **Lenalidomida y pomalidomida** son agentes inmunomoduladores que tienen una supervivencia prolongada en el mieloma múltiple. Estos agentes median sus efectos antitumorales principalmente a través de la destrucción de proteínas de la familia Ikaros mediada por cereblon, que inhiben la secreción de IL-2<sup>129,130,131</sup>.
- **Interferón (IFN) alfa-2b** estimula la respuesta de las células efectoras mediada por los linfocitos Th1, como la secreción de IL-12 a través de la vía de señalización STAT-1 y STAT-2<sup>132,133</sup>. IFN alfa se ha utilizado como tratamiento adyuvante del melanoma de alto riesgo, aunque su impacto a largo plazo en la supervivencia global es controvertido; datos más recientes han demostrado el papel de los inhibidores del punto de control inmune como tratamiento adyuvante con un índice terapéutico probablemente mejor<sup>134,135</sup>.
- **Bacilo de Calmette-Guerin (BCG)**, derivado atenuado de *Mycobacterium bovis*, induce una respuesta inflamatoria robusta cuando se inyecta en la vejiga y se utiliza para el tratamiento y la prevención secundaria del cáncer de vejiga superficial<sup>136</sup>.

## TERAPIAS COMBINADAS

### ESTRATEGIAS COMBINADAS DE BLOQUEO DEL PUNTO DE CONTROL INMUNE

Actualmente hay múltiples ensayos clínicos que investigan la combinación de varios inhibidores del punto de control basándose en los resultados obtenidos con inhibidores del punto de control en monoterapia.

El bloqueo concurrente de CTLA-4 y PD-1 es el que está más avanzado a nivel clínico. La combinación de ipilimumab con nivolumab ha demostrado una tasa de respuesta significativamente mayor, así como mayor supervivencia libre de progresión y supervivencia global en comparación con el ipilimumab en monoterapia para el melanoma metastásico<sup>137</sup>. De manera similar, la combinación de nivolumab e ipilimumab ha demostrado una mejor tasa de respuesta, supervivencia general y tolerabilidad en comparación con sunitinib en pacientes con carcinoma de células renales avanzado. El principal inconveniente de estas estrategias es la tasa de eventos adversos, que fueron mayores y de más gravedad en el abordaje combinado que con el uso de nivolumab o ipilimumab en monoterapia<sup>138</sup>. Se están desarrollando más ensayos clínicos que combinan ipilimumab y nivolumab para su aplicación en otras enfermedades. Durvalumab más tremelimumab, otra combinación que utiliza PD-L1 y bloqueo CTLA-4, también se está investigando en diferentes cánceres<sup>5</sup>.

### TILs CON INHIBIDORES DEL PUNTO DE CONTROL INMUNE

El uso combinado de TILs contra la versión mutada de 4 proteínas (SLC3A2, KIAA0368, CADPS2 y CTSB) junto con inhibidores del punto de control inmune ha logrado una regresión completa y duradera (>22 meses) en una paciente de 49 años con cáncer metastásico de mama<sup>95</sup>. Aunque se trate de una única paciente, estos resultados

aportan una nueva estrategia de actuación para el tratamiento de este tipo de pacientes.

### VIRUS ONCOLÍTICOS CON INHIBIDORES DEL PUNTO DE CONTROL INMUNE

La inyección de virus oncolíticos puede hacer sinergia con inhibidores del punto de control al aumentar la infiltración de linfocitos T CD8 + y la señalización gamma de IFN, así como la regulación positiva de PD-L1 en el microambiente tumoral <sup>139</sup>. En un ensayo aleatorizado de ipilimumab con o sin T-VEC, se observó una tasa de respuesta más alta con la combinación que con ipilimumab solo (39% versus 18%)<sup>140</sup>.

### VIRUS ONCOLÍTICOS Y CART

Varios grupos de investigación están demostrando con éxito el uso de virus oncolíticos armados con quimiocinas para conseguir atraer a las CART hasta el tumor. Usando un vector adenoviral oncolítico que expresaba CCL5 y GD2 se logró controlar la progresión del neuroblastoma en ratones y se mejoró la afluencia de las CART <sup>141</sup>, resultados similares a los obtenidos con el uso de CART, HER2 y virus oncolíticos <sup>142</sup>.

### TERAPIAS DIRIGIDAS A OTROS TIPOS CELULARES EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

En la inmunología tumoral, los tipos celulares distintos de los linfocitos T contribuyen a una respuesta inmune efectiva y representan objetivos adicionales para la inmunoterapia más allá del uso de células T o de anticuerpos:

**Células asesinas naturales (NK):** las NK se infiltran en tumores sólidos y metástasis y se asocian con un mejor pronóstico <sup>143,144,145</sup>, aunque los marcadores usados para comprobar su presencia, CD56 o CD57, también se expresan en subconjuntos de otras células T (como los linfocitos T CD8+) por lo que estos hallazgos pueden no ser del todo fiables. Los genes del receptor tipo inmunoglobulina de las células NK (KIR) se unen a moléculas de HLA presentes en las células sanas y reconocen a las cancerosas, que a menudo pierden la expresión de HLA; en consecuencia, las células NK las destruyen <sup>146</sup>.

Los anticuerpos anti-KIR han demostrado eficacia preclínica en el linfoma <sup>147</sup>, el mieloma múltiple <sup>148</sup> y la leucemia mielógena aguda (LMA) <sup>149</sup>. En ensayos clínicos, un estudio de fase I de IPH2101 fue seguro en pacientes con LMA en la primera remisión <sup>150</sup>. No obtuvo respuestas objetivas como agente único en pacientes con mieloma múltiple recurrente / refractario <sup>151</sup>, pero los resultados fueron más prometedores cuando se administraron junto con lenalidomida en esta misma población <sup>152</sup>. Lirilumab (BMS986015) es el otro anticuerpo anti-KIR que se está sometiendo a ensayos que se encuentran en etapa temprana, tanto solo como en combinación para su posible uso en neoplasias malignas hematológicas y tumores sólidos.

**Macrófagos:** la presencia de macrófagos intratumorales, al contrario de lo que pueda parecer, puede indicar un mal pronóstico. De forma simplificada se pueden diferenciar dos fenotipos en los macrófagos, el que se activa por la vía clásica o M1, y el activado por vía alternativa o M2. En el contexto de malignidad, los macrófagos M2 desempeñan un papel protumoral debido a su participación en la inmunosupresión, angiogénesis y la activación de células tumorales <sup>153</sup>. La mayor parte de los macrófagos intratumorales

son reclutados por el ligando de quimiocina CC 2 (**CCL2**) o por el factor estimulante de colonias 1 (**CSF-1**). El efecto antitumoral de la inhibición del receptor CSF-1 (CSF-1R) en los modelos preclínicos tiene resultados variables <sup>154</sup>, pero hay datos prometedores de su uso en combinación con otras modalidades terapéuticas como la quimioterapia <sup>155</sup><sup>154</sup>, la radioterapia <sup>156</sup>, los inhibidores angiogénicos <sup>157</sup>, la transferencia de células adoptivas <sup>158</sup>, así como cuando se utiliza junto con CTLA-4 y el bloqueo PD-1 en el adenocarcinoma ductal pancreático <sup>159</sup>. Emactuzumab (inhibidor CSF-1R) mostró resultados prometedores en un ensayo de fase I realizado en pacientes con sinovitis villonodular pigmentada, obteniéndose respuestas objetivas en 24 de 28 pacientes <sup>160</sup>.

**Indoleamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO1)**. IDO es producida por parte de las células dendríticas y los macrófagos para regular la activación de los linfocitos B y T. Se ocupa de catalizar la conversión del aminoácido esencial L-tryptophan (Trp) en L-kinurena (Kyn), es decir, degrada el triptófano, lo que tiene como resultado el freno de la proliferación de los linfocitos. La expresión de IDO1 por parte de las células tumorales puede promover la evasión de la vigilancia inmunológica al suprimir la función de los linfocitos T <sup>161</sup> y deteriorar la vigilancia inmunitaria <sup>162</sup>.

Los inhibidores de IDO, como epacadostat, están ahora en estudios clínicos de fase I, II y III en varias combinaciones. En el melanoma, los datos de fase II que combinan epacadostat con pembrolizumab sugieren una tasa de respuesta del 56%, con un 17% de efectos adversos graves <sup>163</sup>.

## ASPECTOS ECONÓMICOS

El uso de la inmunoterapia está todavía muy restringido debido a su elevado coste que suponen tanto el diseño de los fármacos como los ensayos clínicos que les suceden, en muchas ocasiones con modestos resultados. En USA los ingresos por ventas globales de mAb terapéuticos fueron de casi 75 mil millones de dólares en 2013, representando aproximadamente el 50% de las ventas totales de todos los productos biofarmacéuticos, y se estima que crecerá a casi 125 mil millones de dólares en 2020, con aproximadamente 70 productos de mAb en el mercado <sup>164</sup>.

El campo de la inmuno-oncología ha surgido como una de las grandes historias de éxito de la última década. Sin embargo, se debe considerar no solo el coste del tratamiento por sí mismo, sino de lo que implica a largo plazo. El uso de numerosas terapias dirigidas, pero a menudo no curativas, supone un aumento de la esperanza de vida y de la prevalencia de pacientes que viven con cáncer. Es notable que existen diferencias en las ubicaciones geográficas de los ensayos clínicos, con puntos críticos para la investigación en China y Estados Unidos, realizándose muchos menos ensayos en Europa, Japón y el hemisferio sur. Las razones de estas diferencias geográficas son complejas y están relacionadas con la voluntad de adoptar e invertir en nuevas terapias, políticas reguladoras por parte de las autoridades sanitarias y diferencias sociales. Las cargas financieras impuestas por estas terapias presentan desafíos, por ejemplo, en el caso de la LLC (forma más común de leucemia en los Estados Unidos) su prevalencia en el año 2000 era de 100.000 pacientes; debido a terapias dirigidas como ibrutinib e idelalisib, se proyecta un aumento de 200.000 casos en los Estados Unidos. Las terapias dirigidas para LLC presentan una carga económica sustancial tanto para los pacientes como para la

economía del país, que ahora se estima en un costo de por vida de 604,000 dólares por paciente, estimándose que el costo total del manejo de la LLC (solo en los Estados Unidos) superará los 5 billones por año para el 2025 <sup>165</sup>.

Los procesos de fabricación a medida, que ahora se utilizan para las terapias de células T altamente personalizadas, conllevan un coste muy elevado, aunque se espera que el coste de fabricación tanto de las CART <sup>166</sup> como del resto de inmunoterapias, disminuya a medida que se incremente la competencia entre fabricantes y se automaticen los procedimientos de diseño y elaboración .

## **AGRADECIMIENTOS**

*Finalizo este trabajo agradeciendo a mi tutor **Manuel Ignacio González-Carreró** el tiempo invertido en la realización de este Trabajo de Fin de Grado, tanto en la corrección del contenido y su estructuración, como en las recomendaciones bibliográficas, su paciencia y por estar siempre disponible, resolviendo las posibles dudas y dificultades con rapidez y eficacia. A **Roberto Martín Melón** por su ayuda para la descarga y utilización de Mendeley, así como las sugerencias en la elección del formato bibliográfico más adecuado para este tipo de trabajos. También me gustaría agradecerle a **Aníbal Cabanzón San Emeterio** su siempre buena disposición para ayudarme en la búsqueda de libros, no solo durante la realización de esta revisión, sino también a lo largo de estos 6 años del grado.*

*De verdad, muchas gracias.*

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cáncer en español - National Cancer Institute, <https://www.cancer.gov/espanol> (accedido 19 de febrero de 2018).
2. Coley WB. Contribution to the knowledge of sarcoma. *Ann Surg* 1891; 14: 199-200.
3. Waldmann TA. Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med* 2003; 9: 269-277.
4. OLD LJ, CLARKE DA, BENACERRAF B. Effect of Bacillus Calmette-Guerin infection on transplanted tumours in the mouse. *Nature* 1959; 184(Suppl 5): 291-2.
5. Shoushtarl AN, Wolchok J, Hellman M. Principles of cancer immunotherapy. *UpToDate*, [https://www-uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/principles-of-cancer-immunotherapy/print?search=immunotherapy&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www-uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/principles-of-cancer-immunotherapy/print?search=immunotherapy&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1) (2017).
6. Ledford H. Cancer treatment: The killer within. *Nature* 2014; 508: 24-26.
7. Rosenbaum L. Tragedy, Perseverance, and Chance — The Story of CAR-T Therapy. *N Engl J Med* 2017; 377: 1313-1315.
8. Couzin-Frankel J. Cancer Immunotherapy. *Science (80- )* 2013; 342: 1432-1433.
9. Navarre (Spain). Departamento de Salud. S, Rodríguez Calvillo M, López Díaz de Cerio A, et al. Anales del sistema sanitario de Navarra. *An Sist Sanit Navar* 2004; 27: 45-62.
10. Monoclonal Antibodies Approved by the EMA and FDA for Therapeutic Use (status 2017). *The Animal Cell Technology Industrial Platform (ACTIP)*, <http://www.actip.org/products/monoclonal-antibodies-approved-by-the-ema-and-fda-for-therapeutic-use/> (2017, accedido 25 de enero de 2018).
11. Fainboim L, Geffner J. *Introducción a la Inmunología Humana*. 6ª. 2012.
12. Raquel Tejada Valdez D, Llanos Méndez A. Inmunoterapia activa para el tratamiento del cáncer de próstata, [http://www.aetsa.org/download/publicaciones/AETSA\\_2011-2-2\\_Inmunoterapia\\_CaProstata.pdf](http://www.aetsa.org/download/publicaciones/AETSA_2011-2-2_Inmunoterapia_CaProstata.pdf) (accedido 22 de febrero de 2018).
13. Whiteside TL, Demaria S, Rodriguez-Ruiz ME, et al. Emerging opportunities and challenges in cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 1845-1855.
14. Parham P. *Inmunología*. 2ª. 2006.
15. González ID. Generalidades del tratamiento con anticuerpos monoclonales. *fmcsepar*.

16. Toro H. Producción de anticuerpos monoclonales y su aplicación en identificación y caracterización de agentes virales. *Monogr Med Vet*; 12.
17. Universidad de Chile. Monografías Medicina Veterinaria, [https://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon\\_vet\\_simple/0,1420,SCID%253D13992%2526ISID%253D420%2526PRT%253D13990,00.html](https://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_simple/0,1420,SCID%253D13992%2526ISID%253D420%2526PRT%253D13990,00.html) (2004, accedido 19 de febrero de 2018).
18. Hoogenboom HR, Chames P. Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol Today* 2000; 21: 371-8.
19. Domínguez Odio A, Pérez Polanco R, González Marrero I, et al. Tecnología de presentación sobre fagos filamentosos en la búsqueda de agentes biológicos antiinfectivos Display technology on filamentous phage in the search for anti-infective biological agents, <http://www.revistabionatura.com> (accedido 18 de marzo de 2018).
20. Wang J, Mukhtar H, Ma L, et al. VHH antibodies: Reagents for mycotoxin detection in food products. *Sensors (Switzerland)*; 18. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.3390/s18020485.
21. Hempel F, Maurer M, Brockmann B, et al. From hybridomas to a robust microalgal-based production platform: molecular design of a diatom secreting monoclonal antibodies directed against the Marburg virus nucleoprotein. *Microb Cell Fact* 2017; 16: 131.
22. Hein MB, Tang Y, McLeod DA, et al. Evaluation of immunoglobulins from plant cells. *Biotechnol Prog* 1991; 7: 455-461.
23. Szövényi P, Rensing SA, Lang D, et al. Generation-Biased Gene Expression in a Bryophyte Model System. DOI: 10.1093/molbev/msq254.
24. Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, et al. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med* 1998; 4: 601-6.
25. Giordano M. Aspectos inmunológicos del empleo de gammaglobulinas en citopenias inmunes Immunological aspects of the use of gammaglobulins in immune cytopenias, <http://www.sah.org.ar/revista/numeros/2014/vol18/ex/12-51-52.pdf> (accedido 29 de marzo de 2018).
26. Martí-Carvajal AJ, Anand V, Cardona AF, et al. Eculizumab for treating patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cochrane Database Syst Rev*. Epub ahead of print 30 de octubre de 2014. DOI: 10.1002/14651858.CD010340.pub2.
27. Welte T, Arnold F, Kappes J, et al. Treating C3 glomerulopathy with eculizumab. *BMC Nephrol* 2018; 19: 7.
28. Salas Salguero J, Gómez-Pastrana Durán D, Salido Peracaula C, et al. Enfermedad

- de Kawasaki refractaria con aneurismas coronarios tratada con infliximab. *An Pediatr* 2010; 73: 268-271.
29. Camargo Barrios CB, Rivas Ibargüen JE, Quintana-López G. Terapia biológica en la artritis reumatoide temprana: eficacia en la remisión de la enfermedad. *Rev Colomb Reumatol* 2017; 24: 164-176.
  30. Gellona V J, Zarraonandia A A, Zúñiga D A, et al. Infliximab en el tratamiento de la enfermedad de Crohn: Estudio preliminar. *Rev Med Chil* 2006; 134: 320-325.
  31. Europa Health. Avastin. Ficha técnica o resumen de las características del producto. 2014; 1-41.
  32. Pappo AS, Patel SR, Crowley J, et al. R1507, a Monoclonal Antibody to the Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor, in Patients With Recurrent or Refractory Ewing Sarcoma Family of Tumors: Results of a Phase II Sarcoma Alliance for Research Through Collaboration Study. *J Clin Oncol* 2011; 29: 4541-4547.
  33. Del O. Rituximab. 2007; 26: 107-109.
  34. INFORME SEOM DE EVALUACIÓN DE FÁRMACO, [https://seom.org/seomcms/images/stories/Informes\\_SEOM/Informe\\_SEOM\\_Kadcyla\\_trastuzumab\\_emtansina.pdf](https://seom.org/seomcms/images/stories/Informes_SEOM/Informe_SEOM_Kadcyla_trastuzumab_emtansina.pdf) (accedido 29 de marzo de 2018).
  35. Weiss JM, Subleski JJ, Wigginton JM, et al. Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7: 1705-21.
  36. Langowski JL, Zhang X, Wu L, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 2006; 442: 461-465.
  37. Catapano AL, Papadopoulos N. The safety of therapeutic monoclonal antibodies: implications for cardiovascular disease and targeting the PCSK9 pathway. *Atherosclerosis* 2013; 228: 18-28.
  38. Topp MS, Gökbuget N, Stein AS, et al. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2015; 16: 57-66.
  39. Nivolumab in Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2016; 374: 492-494.
  40. Williams M, Khalid T, Hughes S, et al. Rituximab-induced Cytokine Storm in the Absence of Overt Lymphoproliferative Disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 2016; 38: e29-31.
  41. Savarese DM. Common terminology criteria for adverse events. *UpToDate* 2015; 0-71.
  42. Frey N V, Porter DL. Cytokine release syndrome with novel therapeutics for acute

- lymphoblastic leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr* 2016; 2016: 567-572.
43. Llc SUS. PRALUENT- alirocumab injection , s olution HIGHLIGHT S OF PRESCRIBING INFORMAT ION FULL PRESCRIBING INFORMATION : CONTENTS \* 1 INDICATIONS AND USAGE 1 . 1 Primary Hyperlipidemia 1 . 2 Limitations of Use 2 DOSAGE AND ADMINISTRATION 2 . 1 Dosing Information.
  44. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, et al. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 235-271.
  45. Sánchez de Cos Escuín J. Nueva inmunoterapia y cáncer de pulmón. *Arch Bronconeumol* 2017; 53: 682-687.
  46. Navarre (Spain). Departamento de Salud. C, Murillo O, Tirapu I, et al. *Anales del sistema sanitario de Navarra*. Gobierno de Navarra, Departamento de Salud, [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272006000100007](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272006000100007) (2006, accedido 8 de marzo de 2018).
  47. Fan X, Quezada SA, Sepulveda MA, et al. Engagement of the ICOS pathway markedly enhances efficacy of CTLA-4 blockade in cancer immunotherapy. *J Exp Med* 2014; 211: 715-25.
  48. Kantarjian H, Stein A, Gökbüget N, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2017; 376: 836-847.
  49. Lindhofer H, Menzel H, Günther W, et al. Bispecific antibodies target operationally tumor-specific antigens in two leukemia relapse models. *Blood* 1996; 88: 4651-8.
  50. Study E. CLINICAL TRIALS WATCH ACCESSIBLE EASY READ INFORMATION ON : ENGAGE STUDY.
  51. Ruderisch N, Schlatter D, Kuglstatler A, et al. Potent and Selective BACE-1 Peptide Inhibitors Lower Brain A $\beta$  Levels Mediated by Brain Shuttle Transport. *EBioMedicine* 2017; 24: 76-92.
  52. Kanodia J, Gadkar K, Bumbaca D, et al. Prospective Design of Anti-Transferrin Receptor Bispecific Antibodies for Optimal Delivery into the Human Brain. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 2016; 5: 283-291.
  53. Lagace TA. PCSK9 and LDLR degradation. *Curr Opin Lipidol* 2014; 25: 387-393.
  54. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, et al. Sequence Variations in PCSK9, Low LDL, and Protection against Coronary Heart Disease. *N Engl J Med* 2006; 354: 1264-1272.
  55. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, et al. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet* 2005; 37: 161-165.

56. Kathiresan S, Myocardial Infarction Genetics Consortium. A *PCSK9* Missense Variant Associated with a Reduced Risk of Early-Onset Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 2008; 358: 2299-2300.
57. Kastelein JJP, Nissen SE, Rader DJ, et al. Safety and efficacy of LY3015014, a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (*PCSK9*): a randomized, placebo-controlled Phase 2 study. *Eur Heart J* 2016; 37: 1360-1369.
58. Paul M Ridker, M.D., Jean-Claude Tardif, M.D., Pierre Amarencu MD, William Duggan, Ph.D., Robert J. Glynn, Sc.D., J. Wouter Jukema MD, John J.P. Kastelein, M.D., Albert M. Kim, M.D., Ph.D., Wolfgang Koenig MD, et al. Lipid-Reduction Variability and AntidrugAntibody Formation with Bococizumab. *N Engl J Med* 2017; 16376: 1517-26.
59. Norata GD, Ballantyne CM, Catapano AL. New therapeutic principles in dyslipidaemia: focus on LDL and Lp(a) lowering drugs. *Eur Heart J* 2013; 34: 1783-1789.
60. Nicholls SJ, Puri R, Anderson T, et al. Effect of Evolocumab on Progression of Coronary Disease in Statin-Treated Patients. *JAMA* 2016; 316: 2373.
61. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, et al. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* 2017; 376: 1713-1722.
62. Huang Y, Yu J, Lanzi A, et al. Engineered Bispecific Antibodies with Exquisite HIV-1-Neutralizing Activity. *Cell* 2016; 165: 1621-1631.
63. Bournazos S, Gazumyan A, Seaman MS, et al. Bispecific Anti-HIV-1 Antibodies with Enhanced Breadth and Potency. *Cell* 2016; 165: 1609-1620.
64. Horwitz JA, Halper-Stromberg A, Mouquet H, et al. HIV-1 suppression and durable control by combining single broadly neutralizing antibodies and antiretroviral drugs in humanized mice. *Proc Natl Acad Sci* 2013; 110: 16538-16543.
65. Barouch DH, Deeks SG. Immunologic strategies for HIV-1 remission and eradication. *Science (80- )* 2014; 345: 169-174.
66. Walker LM, Huber M, Doores KJ, et al. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* 2011; 477: 466-470.
67. Burton DR, Barbas CF, Persson MA, et al. A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 10134-7.
68. Steinhardt JJ, Guenaga J, Turner HL, et al. Rational design of a trispecific antibody targeting the HIV-1 Env with elevated anti-viral activity. *Nat Commun*; 1-12.
69. Murin CD, Fusco ML, Bornholdt ZA, et al. Structures of protective antibodies reveal sites of vulnerability on Ebola virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111:

17182-7.

70. Nyakatura EK, Zak SE, Wec AZ, et al. Design and evaluation of bi- and trispecific antibodies targeting multiple filovirus glycoproteins. *J Biol Chem* 2018; jbc.RA117.001627.
71. Wang M, Yang F, Huang D, et al. Anti-Idiotypic Antibodies Specific to prM Monoantibody Prevent Antibody Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7: 157.
72. Bever CS, Dong J-X, Vasylieva N, et al. VHH antibodies: emerging reagents for the analysis of environmental chemicals. *Anal Bioanal Chem* 2016; 408: 5985-6002.
73. Rydahl MG, Kračun SK, Fangel JU, et al. Development of novel monoclonal antibodies against starch and ulvan -implications for antibody production against polysaccharides with limited immunogenicity. DOI: 10.1038/s41598-017-04307-2.
74. Lee N-K, Zhang Y, Su Y, et al. Cell-type specific potent Wnt signaling blockade by bispecific antibody. *Sci Rep* 2018; 8: 766.
75. Lenting PJ, Denis C V, Christophe OD. Emicizumab, a bispecific antibody recognizing coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII? *Blood* 2017; 130: 2463-2468.
76. Spiess C, Zhai Q, Carter PJ. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Mol Immunol* 2015; 67: 95-106.
77. Brinkmann U, Kontermann RE. The making of bispecific antibodies. *MAbs* 2017; 9: 182-212.
78. Baker KF, Isaacs JD. Novel therapies for immune-mediated inflammatory diseases: What can we learn from their use in rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, Crohn's disease and ulcerative colitis? *Ann Rheum Dis* 2018; 77: 175-187.
79. Genovese MC, Cohen S, Moreland L, et al. Combination therapy with etanercept and anakinra in the treatment of patients with rheumatoid arthritis who have been treated unsuccessfully with methotrexate. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1412-1419.
80. Torres T, Romanelli M, Chiricozzi A. A revolutionary therapeutic approach for psoriasis: bispecific biological agents. *Expert Opin Investig Drugs* 2016; 25: 751-754.
81. Khatri A, Goss S, Jiang P, et al. Pharmacokinetics of ABT-122, a TNF- $\alpha$ - and IL-17A-Targeted Dual-Variable Domain Immunoglobulin, in Healthy Subjects and Patients with Rheumatoid Arthritis: Results from Three Phase I Trials. *Clin Pharmacokinet*. Epub ahead of print 25 de julio de 2017. DOI: 10.1007/s40262-017-0580-y.

82. Silacci M, Lembke W, Woods R, et al. Discovery and characterization of COVA322, a clinical-stage bispecific TNF/IL-17A inhibitor for the treatment of inflammatory diseases. *MAbs* 2016; 8: 141-9.
83. Kosloski MP, Goss S, Wang SX, et al. Pharmacokinetics and Tolerability of a Dual Variable Domain Immunoglobulin ABT-981 Against IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in Healthy Subjects and Patients With Osteoarthritis of the Knee. *J Clin Pharmacol* 2016; 56: 1582-1590.
84. Newick K, O'Brien S, Moon E, et al. CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. *Annu Rev Med* 2017; 68: 139-152.
85. Davila ML, Brentjens R, Wang X, et al. How do CARs work? *Oncoimmunology* 2012; 1: 1577-1583.
86. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design. *Cancer Discov* 2013; 3: 388-398.
87. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-Targeted T Cells Rapidly Induce Molecular Remissions in Adults with Chemotherapy-Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci Transl Med* 2013; 5: 177ra38-177ra38.
88. Maude SL, Teachey DT, Porter DL, et al. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015; 125: 4017-23.
89. Corraliza-Gorjón I, Somovilla-Crespo B, Santamaria S, et al. New Strategies Using Antibody Combinations to Increase Cancer Treatment Effectiveness. *Front Immunol*. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01804.
90. Jiang Y, Li Y, Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis* 2015; 6: e1792.
91. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science (80- )* 2015; 348: 62-68.
92. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, et al. Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 4550-4557.
93. Tran E, Turcotte S, Gros A, et al. Cancer Immunotherapy Based on Mutation-Specific CD4+ T Cells in a Patient with Epithelial Cancer. *Science (80- )* 2014; 344: 641-645.
94. Stevanović S, Draper LM, Langan MM, et al. Complete Regression of Metastatic Cervical Cancer After Treatment With Human Papillomavirus-Targeted Tumor-Infiltrating T Cells. *J Clin Oncol* 2015; 33: 1543-1550.
95. Zacharakis N, Chinnasamy H, Black M, et al. Immune recognition of somatic mutations leading to complete durable regression in metastatic breast cancer. *Nat Med*; 01. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1038/s41591-018-0040-8.

96. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science (80- )* 2018; 359: 1361-1365.
97. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science (80- )* 2006; 314: 126-129.
98. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 2009; 114: 535-546.
99. Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, et al. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med* 2015; 21: 914-921.
100. Liddy N, Bossi G, Adams KJ, et al. Monoclonal TCR-redirection tumor cell killing. *Nat Med* 2012; 18: 980-987.
101. Oates J, Hassan NJ, Jakobsen BK. ImmTACs for targeted cancer therapy: Why, what, how, and which. *Mol Immunol* 2015; 67: 67-74.
102. Cameron BJ, Gerry AB, Dukes J, et al. Identification of a Titin-Derived HLA-A1-Presented Peptide as a Cross-Reactive Target for Engineered MAGE A3-Directed T Cells. *Sci Transl Med* 2013; 5: 197ra103-197ra103.
103. INFORME SEOM DE EVALUACIÓN DE FÁRMACOS, [https://seom.org/seomcms/images/stories/Informes\\_SEOM/IPT\\_TVEC.pdf](https://seom.org/seomcms/images/stories/Informes_SEOM/IPT_TVEC.pdf) (accedido 13 de mayo de 2018).
104. de Gruijl TD, Janssen AB, van Beusechem VW. Arming oncolytic viruses to leverage antitumor immunity. *Expert Opin Biol Ther* 2015; 15: 959-971.
105. Andtbacka RHI, Kaufman HL, Collichio F, et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol* 2015; 33: 2780-2788.
106. Westphal M, Ylä-Herttuala S, Martin J, et al. Adenovirus-mediated gene therapy with sitimagene ceradenovec followed by intravenous ganciclovir for patients with operable high-grade glioma (ASPECT): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013; 14: 823-833.
107. Dong J, Li W, Dong A, et al. Gene therapy for unresectable hepatocellular carcinoma using recombinant human adenovirus type 5. *Med Oncol* 2014; 31: 95.
108. Kicielinski KP, Chiocca EA, Yu JS, et al. Phase 1 Clinical Trial of Intratumoral Reovirus Infusion for the Treatment of Recurrent Malignant Gliomas in Adults. *Mol Ther* 2014; 22: 1056-1062.
109. Zamarin D, Holmgaard RB, Subudhi SK, et al. Localized Oncolytic Virotherapy Overcomes Systemic Tumor Resistance to Immune Checkpoint Blockade

Immunotherapy. *Sci Transl Med* 2014; 6: 226ra32-226ra32.

110. Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. Generation of Large Numbers of Dendritic Cells from Mouse Bone Marrow Cultures Supplemented with Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor, [https://pdfs.semanticscholar.org/c476/d74202aa6efee404cd6367bf1212b7c020ed.pdf?\\_ga=2.260928585.579481068.1526210554-189296771.1526210554](https://pdfs.semanticscholar.org/c476/d74202aa6efee404cd6367bf1212b7c020ed.pdf?_ga=2.260928585.579481068.1526210554-189296771.1526210554) (accedido 13 de mayo de 2018).
111. Sallusto BF, Lanzavecchia A. From the "Basel Institute for Immunology, CH-4005, Basel, Switzerland; and the \*Department of Immunology, Istituto Superiore di SanitY, 1-00161, Rome, Italy. *J Exp Med*; 179.
112. Dany M, Nganga R, Chidiac A, et al. Advances in immunotherapy for melanoma management. *Hum Vaccin Immunother* 2016; 12: 2501-2511.
113. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 411-422.
114. Eder JP, Kantoff PW, Roper K, et al. A phase I trial of a recombinant vaccinia virus expressing prostate-specific antigen in advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1632-8.
115. Kantoff PW, Schuetz TJ, Blumenstein BA, et al. Overall Survival Analysis of a Phase II Randomized Controlled Trial of a Poxviral-Based PSA-Targeted Immunotherapy in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1099-1105.
116. Kaufman HL, Wang W, Manola J, et al. Phase II randomized study of vaccine treatment of advanced prostate cancer (E7897): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2122-32.
117. McNeel DG, Chen Y-H, Gulley JL, et al. Randomized phase II trial of docetaxel with or without PSA-TRICOM vaccine in patients with castrate-resistant metastatic prostate cancer: A trial of the ECOG-ACRIN cancer research group (E1809). *Hum Vaccin Immunother* 2015; 11: 2469-74.
118. Obeid J, Hu Y, Slingluff CL, et al. Vaccines, Adjuvants, and Dendritic Cell Activators-Current Status and Future Challenges. *Semin Oncol* 2015; 42: 549-61.
119. Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* 2017; 547: 222-226.
120. Ott PA, Hu Z, Keskin DB, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 2017; 547: 217-221.
121. Sahin U, Türeci Ö. Personalized vaccines for cancer immunotherapy. *Science (80-)* 2018; 359: 1355-1360.

122. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 180-190.
123. Krieg C, Létourneau S, Pantaleo G, et al. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 11906-11.
124. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, et al. Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood* 2006; 108: 390-9.
125. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007; 26: 371-81.
126. Kryczek I, Wei S, Zou L, et al. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol* 2007; 178: 6730-3.
127. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2105-16.
128. Rosenberg SA, Yang JC, Topalian SL, et al. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA*; 271: 907-13.
129. Quintana FJ, Jin H, Burns EJ, et al. Aiolos promotes TH17 differentiation by directly silencing Il2 expression. *Nat Immunol* 2012; 13: 770-7.
130. Avitahl N, Winandy S, Friedrich C, et al. Ikaros sets thresholds for T cell activation and regulates chromosome propagation. *Immunity* 1999; 10: 333-43.
131. Lu G, Middleton RE, Sun H, et al. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins. *Science* 2014; 343: 305-9.
132. Lesinski GB, Anghelina M, Zimmerer J, et al. The antitumor effects of IFN-alpha are abrogated in a STAT1-deficient mouse. *J Clin Invest* 2003; 112: 170-80.
133. Carson WE. Interferon-alpha-induced activation of signal transducer and activator of transcription proteins in malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2219-28.
134. Eggermont AMM, Chiarion-Sileni V, Grob J-J, et al. Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy. *N Engl J Med* 2016; 375: 1845-1855.
135. Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, et al. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *N Engl J Med* 2017; 377: 1824-1835.

136. Redelman-Sidi G, Glickman MS, Bochner BH. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer--a current perspective. *Nat Rev Urol* 2014; 11: 153-62.
137. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 2017; 377: 1345-1356.
138. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 2015; 373: 23-34.
139. Ribas A, Dummer R, Puzanov I, et al. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell* 2017; 170: 1109-1119.e10.
140. Chesney J, Puzanov I, Collichio F, et al. Randomized, Open-Label Phase II Study Evaluating the Efficacy and Safety of Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab Versus Ipilimumab Alone in Patients With Advanced, Unresectable Melanoma. *J Clin Oncol* 2017; JCO2017737379.
141. Nishio N, Diaconu I, Liu H, et al. Armed Oncolytic Virus Enhances Immune Functions of Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Solid Tumors. *Cancer Res* 2014; 74: 5195-5205.
142. VanSeggelen H, Hammill JA, Dvorkin-Gheva A, et al. T Cells Engineered With Chimeric Antigen Receptors Targeting NKG2D Ligands Display Lethal Toxicity in Mice. *Mol Ther* 2015; 23: 1600-1610.
143. Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002; 35: 23-8.
144. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 577-83.
145. Kmiecik J, Zimmer J, Chekenya M. Natural killer cells in intracranial neoplasms: presence and therapeutic efficacy against brain tumours. *J Neurooncol* 2014; 116: 1-9.
146. Shifrin N, Raulet DH, Ardolino M. NK cell self tolerance, responsiveness and missing self recognition. *Semin Immunol* 2014; 26: 138-44.
147. Kohrt HE, Thielens A, Marabelle A, et al. Anti-KIR antibody enhancement of anti-lymphoma activity of natural killer cells as monotherapy and in combination with anti-CD20 antibodies. *Blood* 2014; 123: 678-86.
148. Nijhof IS, Lammerts van Bueren JJ, van Kessel B, et al. Daratumumab-mediated lysis of primary multiple myeloma cells is enhanced in combination with the human anti-KIR antibody IPH2102 and lenalidomide. *Haematologica* 2015; 100: 263-8.

149. Romagné F, André P, Spee P, et al. Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood* 2009; 114: 2667-77.
150. Vey N, Bourhis J-H, Boissel N, et al. A phase 1 trial of the anti-inhibitory KIR mAb IPH2101 for AML in complete remission. *Blood* 2012; 120: 4317-23.
151. Benson DM, Hofmeister CC, Padmanabhan S, et al. A phase 1 trial of the anti-KIR antibody IPH2101 in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood* 2012; 120: 4324-33.
152. Benson DM, Cohen AD, Jagannath S, et al. A Phase I Trial of the Anti-KIR Antibody IPH2101 and Lenalidomide in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 4055-61.
153. Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci* 2014; 105: 1-8.
154. Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell* 2015; 27: 462-72.
155. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov* 2011; 1: 54-67.
156. Shiao SL, Ruffell B, DeNardo DG, et al. TH2-Polarized CD4(+) T Cells and Macrophages Limit Efficacy of Radiotherapy. *Cancer Immunol Res* 2015; 3: 518-25.
157. Priceman SJ, Sung JL, Shaposhnik Z, et al. Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy. *Blood* 2010; 115: 1461-71.
158. Mok S, Koya RC, Tsui C, et al. Inhibition of CSF-1 receptor improves the antitumor efficacy of adoptive cell transfer immunotherapy. *Cancer Res* 2014; 74: 153-161.
159. Zhu Y, Knolhoff BL, Meyer MA, et al. CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res* 2014; 74: 5057-69.
160. Cassier PA, Italiano A, Gomez-Roca CA, et al. CSF1R inhibition with emactuzumab in locally advanced diffuse-type tenosynovial giant cell tumours of the soft tissue: a dose-escalation and dose-expansion phase 1 study. *Lancet Oncol* 2015; 16: 949-56.
161. Hwu P, Du MX, Lapointe R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 2000; 164: 3596-9.
162. Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell

tolerance and tumoral immune escape. *Immunol Rev* 2008; 222: 206-21.

163. Robert C, Larkin J, Ascierto PA, et al. 12130 Characterization of complete responses (CRs) in patients with advanced melanoma (MEL) who received the combination of nivolumab (NIVO) and ipilimumab (IPI), NIVO or IPI alone. *Ann Oncol*; 28. Epub ahead of print 1 de septiembre de 2017. DOI: 10.1093/annonc/mdx377.
164. Langjahr I P, Sotelo Iii P. Presente y futuro de los anticuerpos recombinantes terapéuticos. *Investig Cienc Salud Investig Cienc Salud*; 1401414. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(02)110-121.
165. Chen Q, Jain N, Ayer T, et al. Economic Burden of Chronic Lymphocytic Leukemia in the Era of Oral Targeted Therapies in the United States. *J Clin Oncol* 2017; 35: 166-174.
166. Levine BL, June CH. Perspective: Assembly line immunotherapy. *Nature* 2013; 498: S17-S17.