



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

LA INMUNOTERAPIA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES Y SUS DERIVADOS

Autora: Nahia Gutiérrez Rodríguez

Director: Manuel Ignacio González-Carreró

Santander, Junio 2016

ÍNDICE

SUMARIO/SUMMARY.....	3
IMPORTANCIA DEL ESTUDIO.....	4
INTRODUCCIÓN A LA INMUNOTERAPIA	5-12
➤ La inmunidad innata	
➤ La inmunidad adaptativa	
➤ Las inmunoglobulinas	
➤ La inmunidad artificial	
ASPECTOS HISTÓRICOS	13-15
DESARROLLO ACTUAL DE LA TÉCNICA	16-40
➤ Tipos de anticuerpos monoclonales	
➤ Derivados de anticuerpos monoclonales	
➤ Tecnologías de obtención de anticuerpos monoclonales	
▪ Generación de hibridomas	
▪ Uso de animales transgénicos	
▪ Tecnología ADN recombinante	
– “Phage-display”	
– “Ribosomal-display”	
▪ Ingeniería vegetal	
▪ Proteínas de fusión	
– Inmunotoxinas	
– Conjugados de anticuerpos monoclonales y enzimas	
– Conjugados de anticuerpos monoclonales y radioisótopos	
– Anticuerpos biespecíficos	
– Inmunocitoquinas	
USO EN MEDICINA.....	41-48
• Inmunoterapia contra el cáncer	
• Anticuerpos antiobesidad	
• Anticuerpos anti-ébola	
• VIH	
• Artritis reumatoide	
ASPECTOS ECONÓMICOS Y SOCIALES.....	49-51
ANEXOS	
AGRADECIMIENTOS Y BIBLIOGRAFÍA	

“... el objetivo es (...) encontrar sustancias químicas con una afinidad especial por los organismos patógenos que, como balas mágicas, vayan directas en pos de sus objetivos...”

Paul Ehrlich, principios del siglo XX

“Imaginemos una gran mezcla de sustancias químicas entre las cuales nos interesa sólo una de ellas. Una sustancia entre millones y millones. Es como una aguja en un pajar. Si tenemos un anticuerpo específico contra una sustancia, ese anticuerpo puede funcionar como un imán capaz de ignorar la existencia del pajar y reconocer exclusivamente la aguja. A los ojos de un anticuerpo, el pajar no existe.”

Dr. César Milstein, 1975

SUMARIO

Los anticuerpos monoclonales poseen dos características relevantes como potenciales agentes terapéuticos: alta especificidad y elevada afinidad por la diana; además, son susceptibles de un “diseño a la carta”. Desde el primer uso de anticuerpos policlonales a principios del siglo pasado como agentes terapéuticos, su espectro de aplicación había quedado limitado a un número reducido de patologías debido a su rechazo por el receptor al tratarse de proteínas obtenidas en animales. Desde la segunda mitad del siglo pasado y gracias al desarrollo de hibridomas y, posteriormente, de técnicas de ingeniería genética y proteica, así como de organismos transgénicos, se pueden hoy en día obtener en un tiempo razonable anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra dianas terapéuticas específicas. Además, la ingeniería de proteínas nos permite modificar la estructura de la inmunoglobulina de tal forma que, manteniendo su diana, incrementen su eficiencia.

A día de hoy son muchos los fármacos inmunoterapéuticos aprobados para su uso y existen otros muchos en fase de ensayos clínicos, siendo estos uno de los productos con mayor desarrollo y mejores perspectivas en la industria farmacéutica.

PALABRAS CLAVE: Anticuerpos monoclonales, diseño a la carta, hibridomas, ingeniería genética y proteica, organismos transgénicos, dianas terapéuticas, inmunoterapéuticos, industria farmacéutica.

SUMMARY

Monoclonal antibodies have two important characteristics as potential therapeutic agents: a high specificity and strong affinity for its targets; in addition, they are susceptible to be designed “à la carte”. Since the first use of polyclonal antibodies as therapeutic agents in the beginning of the past century, due to their animal origins and human host rejection, the therapeutic range of these antibodies was limited to a short number of pathologies.

Since the second half of the past century and thanks to the development of hybridomas, genetic and protein engineering as well as transgenic animals, nowadays it is possible to obtain, in a reasonable period of time, human monoclonal antibodies directed to specific therapeutic targets. In addition, protein engineering brings de opportunity to modify the structure of the immunoglobulin in a way that it maintains its target meanwhile its efficiency is increased.

Many immunotherapeutic drugs are used today in the treatment of various diseases and there are more of them on clinical trials, immunotherapy together with vaccination are considered nowadays as true bestsellers of bio-pharmaceutical industry with good perspectives for future.

KEY WORDS: Monoclonal antibodies, “à la carte” design, hybridomas, genetic and protein engineering, transgenic organisms, therapeutic targets, immunotherapeutics, pharmaceutical industry.

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

Los anticuerpos monoclonales y sus derivados constituyen desde hace algún tiempo los pilares de la terapia biológica de múltiples enfermedades: infecciosas, inflamatorias, degenerativas, autoinmunes, neoplásicas, etc. Hoy en día, son auténticos productos estrella de la industria biotecnológica de aplicación en el campo de la medicina y sanidad con grandes expectativas de futuro.

Su gran eficacia y variedad de dianas terapéuticas compensan en muchos casos sus efectos adversos a la hora de convertirlos en fármacos de primera línea de tratamiento. Pero los proyectos de investigación en el ámbito de la inmunoterapia no dejan de desarrollar nuevos y eficientes productos, por lo que probablemente con el tiempo, estos fármacos constituirán el tratamiento de base de muchas de las enfermedades más comunes hoy en día.

Por lo tanto -y este es el objetivo del presente trabajo-, es importante conocer los aspectos más básicos y relevantes de las inmunoglobulinas: como la estructura de sus genes, y su conformación molecular, la evolución de las diferentes técnicas para su producción, así como el amplio abanico de patologías en las que pueden ser utilizadas.

En este trabajo se ha realizado una síntesis de los aspectos mencionados, así como de los efectos secundarios derivados del uso de anticuerpos monoclonales en el ser humano y de los problemas económicos y éticos que se plantean a la hora de considerar facetas tales como su producción, ensayo y comercialización.

INTRODUCCIÓN A LA INMUNOTERAPIA

Antes de comenzar con el análisis de la inmunoterapia basada en el uso de anticuerpos monoclonales y sus derivados, es necesario definir una serie de conceptos sobre inmunología:

La **inmunología** es la ciencia que estudia todos los mecanismos fisiológicos y sus factores coadyuvantes de defensa de la integridad biológica del organismo, consistentes esencialmente en la identificación y destrucción de las posibles amenazas exógenas o endógenas y en la tolerancia de agentes no patogénicos.

En presencia de una amenaza, el cuerpo humano posee dos mecanismos de defensa: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.

La **inmunidad innata** también se denomina natural porque se adquiere de manera congénita y produce una respuesta rápida y local ante un daño celular o tisular. Este tipo de inmunidad no es específica de antígeno, carece de memoria específica, sus componentes se encuentran siempre presentes y no requieren tiempo de latencia para desencadenar la respuesta inmune. Sus respuestas no registran un aumento de eficacia en sucesivas exposiciones al mismo agente.

Aunque no es específica de antígeno, este sistema es capaz de diferenciar patrones de estructuras microbianas conservadas o pertenecientes a grandes grupos de microorganismos denominadas PAMP (pathogen-associated molecular patterns), estimulando así diferentes mecanismos de activación intracelular, que condicionarán la respuesta adaptativa idónea¹. También tiene la capacidad de reconocer señales endógenas de daño celular, como, por ejemplo, el ácido úrico, llamadas en su conjunto DAMP (danger-associated molecular patterns).

Los componentes de la inmunidad innata o natural son, entre otros:

- Barreras epiteliales
- Inmunidad innata celular: fagocitos (monocitos-macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, encargados de la destrucción de agentes infecciosos) y células natural killer (reconocimiento y destrucción de células infectadas o atípicas).
- Inmunidad innata humoral: lisozima, complemento, interferones, inmunidad nutricional (Fe), etc.

El otro tipo de respuesta inmune, la **inmunidad adaptativa**, se denomina también específica debido a la especificidad de sus componentes por el antígeno a reconocer y por poseer memoria inmunológica, lo que hace que exposiciones posteriores al mismo patógeno produzcan una respuesta inmunitaria cada vez más potente y rápida.

El tiempo de respuesta es mayor que en el caso de la inmunidad innata, siendo de horas o días. Tras la entrada del agente patógeno en el organismo por primera vez, se desarrolla una respuesta primaria que se puede estructurar en tres etapas:

- Reconocimiento del antígeno
- Periodo de latencia. Dura varios días en los que los linfocitos específicos amplifican su número (expansión clonal), a la vez que se diferencian en células efectoras.
- Respuesta efectora, que consiste en:
 - Secreción de anticuerpos específicos
 - Desarrollo de actividad citolítica específica.
 - Liberación de factores que activan las células fagocíticas.
 - Adquisición de memoria inmunitaria.

Los linfocitos, tanto los de tipo T como los de tipo B, son las principales células responsables de la respuesta inmune adaptativa. Están distribuidos por todo el organismo en órganos bien delimitados (como el bazo y los ganglios linfáticos), o en forma de acumulaciones difusas (como en la médula ósea o el tejido linfoide asociado a mucosas).

Otro tipo de elementos celulares que toman parte en esta respuesta inmunitaria son los neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, monocitos, macrófagos y las células dendríticas. En el contexto de inmunidad adaptativa, encontramos la inmunidad humoral (mediada por anticuerpos que reconocen y se unen a antígenos específicos) y la celular (mediada principalmente por los linfocitos T citotóxicos y “Natural Killer” que atacan a las células infectadas por los microorganismos intracelulares).

Las inmunoglobulinas y el origen de su especificidad

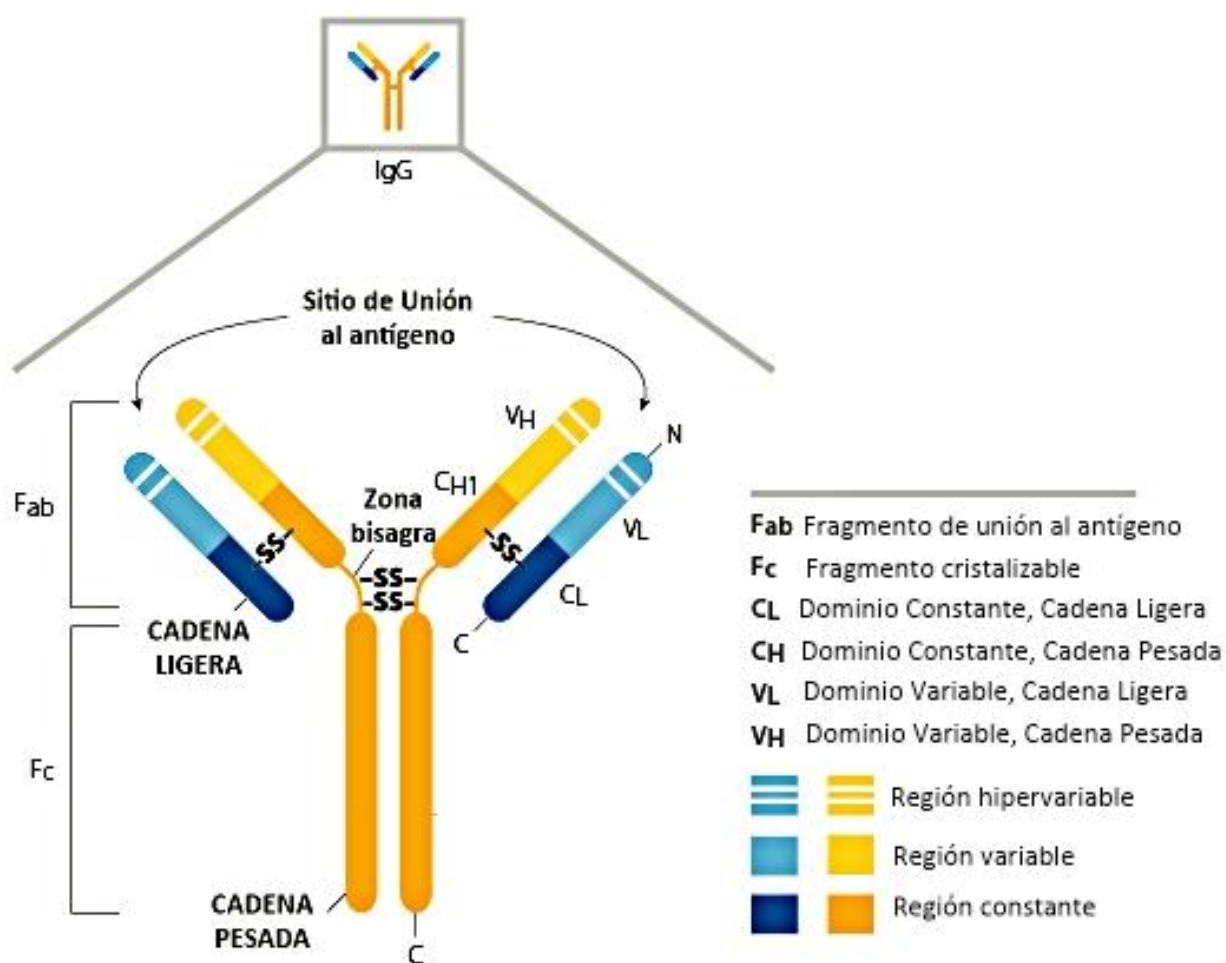
Los anticuerpos, también denominados inmunoglobulinas, son glucoproteínas sintetizadas por los linfocitos B (en los que se pueden encontrar en forma de receptores de membrana) y células plasmáticas (que los secretan como proteínas solubles) en respuesta al estímulo antigénico. Su característica fundamental es que tienen la propiedad de unirse específicamente al antígeno que indujo su formación, lo que los convierte en uno de los elementos fundamentales de la respuesta inmune específica.

El nombre inmunoglobulina se debe a que son proteínas globulares; además, son capaces de transferir pasivamente la inmunidad al administrarse a otro individuo. Cumplen dos funciones esenciales en la defensa del organismo: el reconocimiento y unión al antígeno del material extraño y, en caso de que esto no sea suficiente para neutralizarlo, la activación de moléculas y células efectoras del sistema inmune (cascada del complemento o fagocitos del sistema inmune) para la eliminación del mismo.

Existen cinco clases básicas o isotipos de inmunoglobulinas, pero antes de analizar cada uno de ellos, como modelo básico estructural de estas moléculas tomaremos la IgG, ya que es la más frecuente en el suero. Se trata de un tetrámero (lo que significa que posee cuatro cadenas peptídicas) formado por dos cadenas pesadas (H) (de un peso molecular de 50 kDa) idénticas entre sí en una misma molécula de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras (L) (cuyo peso molecular es de 25 kDa), también idénticas, que se ensamblan adoptando una configuración espacial en forma de “Y”, por lo que se le denomina “unidad Y”. Cuatro puentes disulfuro (enlaces covalentes) unen ambas cadenas pesadas

y éstas a las cadenas ligeras, formando una región flexible denominada zona bisagra² (figura 1).

Para poder cumplir su cometido los anticuerpos están estructurados de manera que se combinan zonas variables (V), en el extremo amino-terminal, que permitirán el reconocimiento de multitud de antígenos, con zonas constantes (C), en la porción carboxilo-terminal, que servirán de lugar de reconocimiento del propio sistema inmune³. Estas cadenas se nombran como VL y CL para las cadenas ligeras y VH y CH para las cadenas pesadas (figura 1). De esta manera, el conjunto de inmunoglobulinas de un individuo es capaz de reconocer millones de antígenos diferentes, pero cada molécula es específica para un único antígeno.



En un principio, para el análisis estructural de las inmunoglobulinas se utilizaron técnicas de proteólisis controlada, así, mediante la digestión enzimática de las inmunoglobulinas con papaína, se obtienen 3 fragmentos que corresponden a sus diferentes dominios funcionales (figura 2):

- Dos idénticos llamados Fab; cada uno contiene la zona de la molécula responsable de la unión al antígeno (fracción antígeno-binding). Un Fab está constituido por la mitad amino-terminal de una cadena pesada unida a la cadena ligera (contiene los dominios variables y un dominio constante de la cadena pesada y de la ligera).
- Un fragmento Fc (fracción cristizable), formado por las dos mitades carboxilo-terminales de las cadenas pesadas (sólo contiene dominios constantes). Ejerce las funciones efectoras de las inmunoglobulinas (activación del complemento, unión a receptores de Fc presentes en las membranas de algunas células).

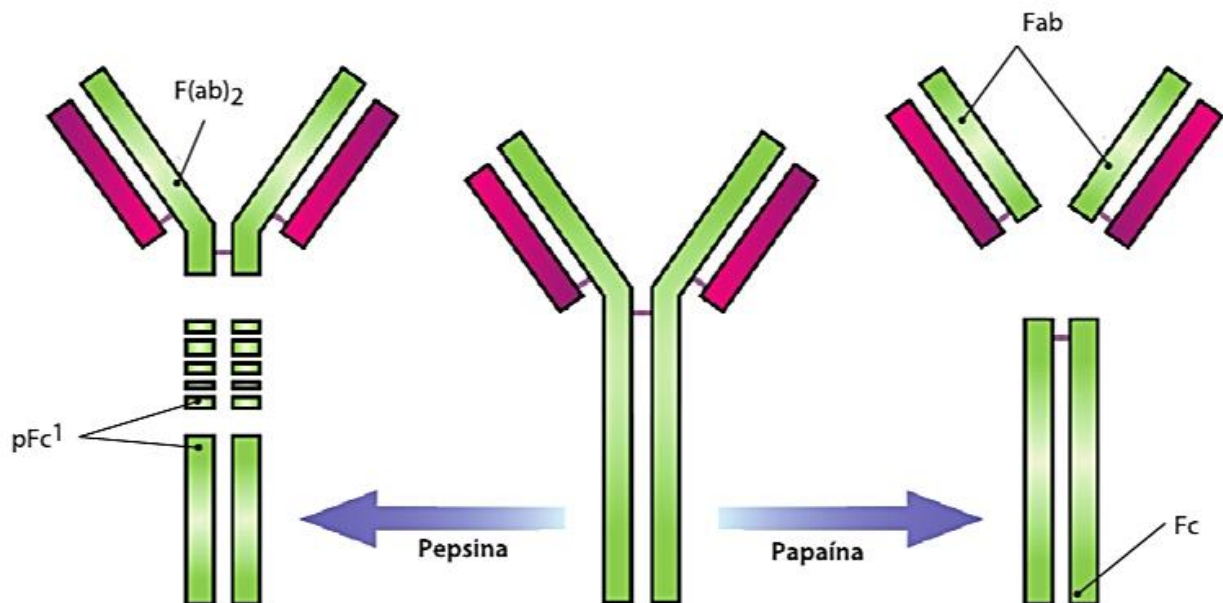


Figura 2. Digestión enzimática de la IgG. Adaptada de la original en manual de la academia CTO de Inmunología 2016-2017

Las inmunoglobulinas funcionan como enlace entre el antígeno, que reconocen mediante Fab, y la respuesta inmunitaria que desencadenan a través de Fc, que puede interactuar con diversos componentes solubles (complemento) y celulares (macrófagos, células NK) a los cuales activa.

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada es la que determina la clase y subclase de la inmunoglobulina. Existen cinco tipos de inmunoglobulinas basados en el número de unidades "Y" y en el tipo de cadena pesada denominada con las letras griegas gamma, mu, alpha, delta y epsilon (γ , μ , α , δ y ϵ): IgG, IgM, IgA, IgD e IgE (figura 2).

Únicamente existen dos tipos de cadenas ligeras: kappa (κ) y lambda (λ). En una molécula de inmunoglobulina determinada, las dos cadenas ligeras son siempre idénticas, independientemente de las cadenas pesadas a las que estén unidas, es decir, que pueden existir moléculas de inmunoglobulina de clase G (γ) con cadenas ligeras κ y moléculas de inmunoglobulina de clase G (γ) con cadenas ligeras λ , y así para cada clase de inmunoglobulina.

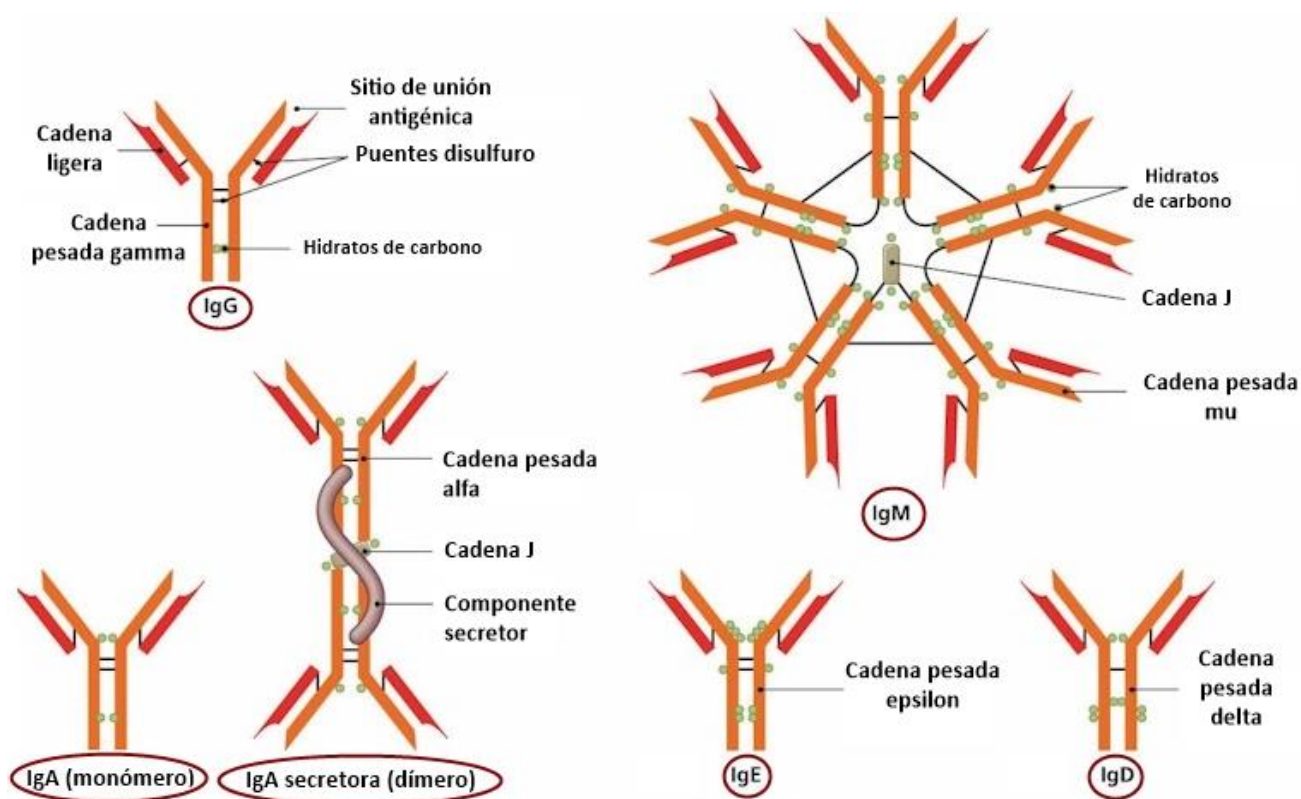


Figura 3. Estructura de los diferentes tipos de inmunoglobulinas. Adaptada de la original⁴ de la página jspot.pcc.edu.

La cantidad total de anticuerpos que un individuo puede producir en respuesta a un primer estímulo antigénico viene determinada por el número de diferentes clones de linfocitos B existentes previamente a la inmunización, que suele encontrarse alrededor de 10^9 . Cada linfocito B es monoespecífico, es decir, llevan un único epítipo del antígeno, que hace referencia a la porción de la macromolécula antigénica que es reconocida por el sistema inmune. A esto se debe la especificidad antigénica de las inmunoglobulinas y por ello, para garantizar el correcto funcionamiento del sistema inmune es necesario generar una enorme diversidad de las mismas, de manera que el organismo pueda reconocer y neutralizar el mayor número de antígenos⁵.

Existen mecanismos de diversificación separados para cada una de las cadenas de las inmunoglobulinas ya que, en las células productoras de anticuerpos, los segmentos de ADN que codifican las regiones constante (C) y variable (V) de las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas pertenecen a cromosomas diferentes (tabla 1).

Genes	Cromosoma y loci
Lambda (λ)	22 (22q11)
Kappa (κ)	2 (2p12)
H	14 (14q32)

Tabla 1. Localización de genes codificadores para las cadenas de inmunoglobulinas.

Los genes que codifican las inmunoglobulinas están organizados en diferentes regiones del genoma⁶. Existe un complejo genético para los elementos codificantes de las cadenas pesadas (figura 4), denominado complejo H, y dos complejos para las cadenas ligeras, uno para la cadena κ (complejo κ) y otro para la cadena λ (complejo λ). Como se muestra en la tabla, el complejo H se encuentra localizado en la región terminal del brazo corto del cromosoma 14 y está formado por los de elementos codificantes determinados: V_H , D_H , J_H , hH y CH . Los complejos κ y λ contienen elementos V_L , J_L , y CL , pero no poseen segmentos D ni h, y están ubicados en los cromosomas 2 y 22, respectivamente. Cada complejo posee una serie de elementos V y otra de elementos D (complejo H) y J. Los elementos codificantes h y C constituyen exones completos que contienen la información estructural para la síntesis de la región bisagra (en la cadena pesada) y de los diferentes dominios constantes, respectivamente.

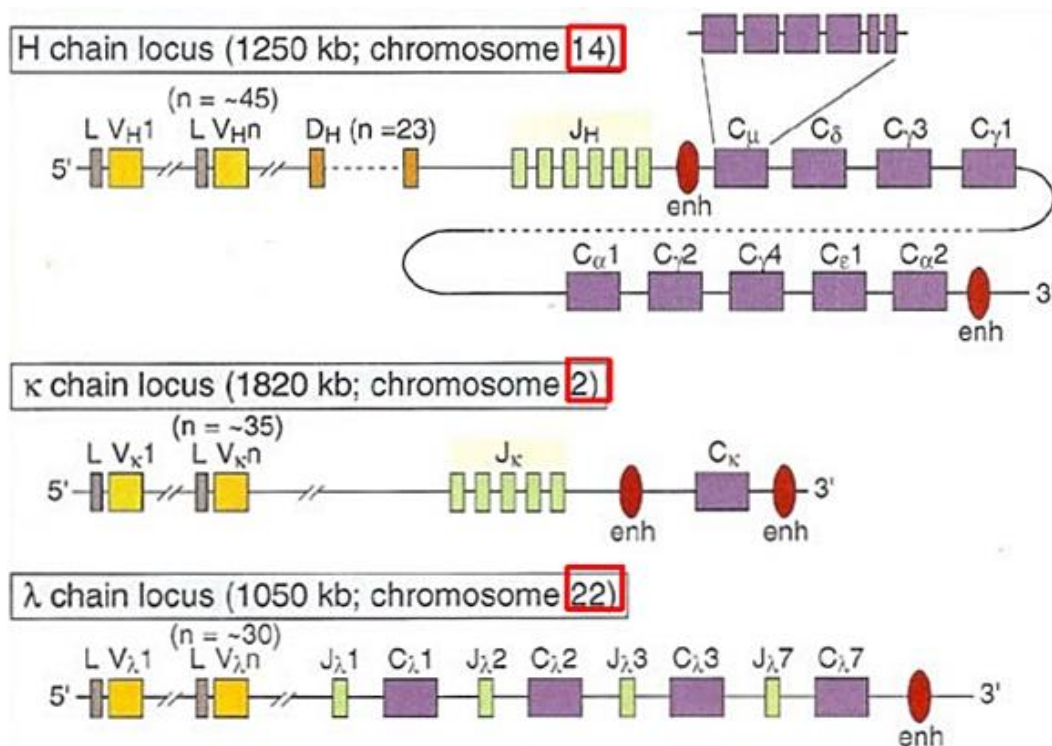


Figura 4. Estructura de genes codificadores para las cadenas de inmunoglobulinas. Imagen⁷ procedente de biosiva.50webs.org/immunediversity.

La región variable de la inmunoglobulina está codificada por un exón que se forma a partir de varios segmentos genómicos llamados V, D y J en el caso de las cadenas pesadas, y por segmentos V y J en el caso de las cadenas ligeras.

Durante la maduración de los linfocitos, para la formación de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, se dan eventos de recombinación por los que se yuxtapone un segmento D a un segmento J, y después este segmento D-J se yuxtapone a un segmento V. El resultado es un segmento V-D-J que conforma el exón que codifica la región

variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina⁴. Después de la transcripción, este exón se une a otro exón codificante de la región constante (C).

En el caso de la transcripción de la cadena ligera, ocurre el mismo proceso, pero con la yuxtaposición de únicamente los segmentos V-J y posterior unión del exón C.

Todo este proceso se puede analizar visualmente a continuación, en la figura 4.

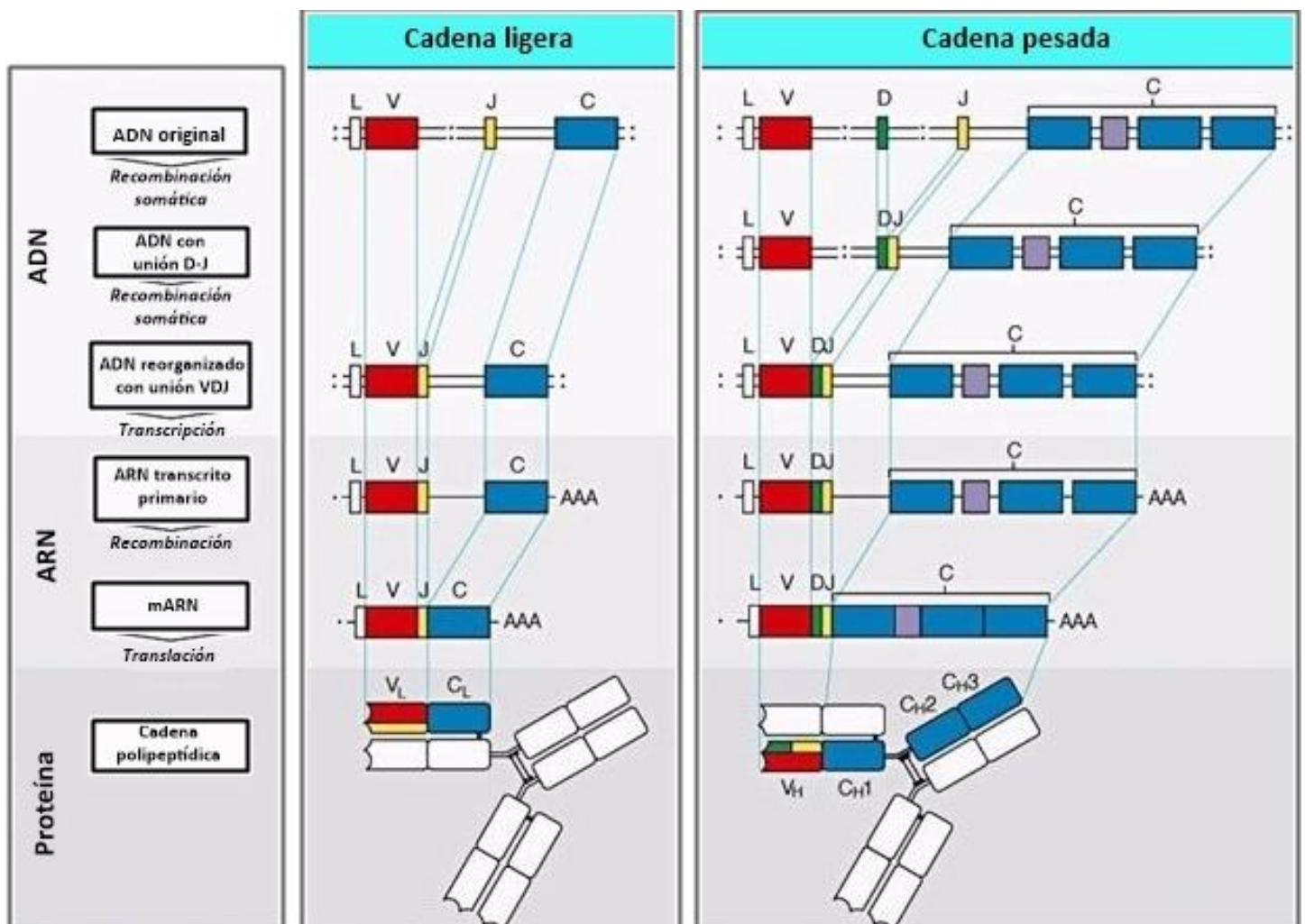


Figura 4. Transcripción genética IgG. Adaptada de la original en <http://epidemiologiamolecular.com/generacion-diversidad-inmunoglobulinas>

Dado el gran número de segmentos V, D y J que tiene este locus génico, el número de posibles combinaciones es altísimo. Como se ve en la tabla, el locus IGH tiene alrededor de 40 segmentos V, 23 segmentos D y 6 segmentos J, lo cual puede originar hasta 6.000 combinaciones diferentes de regiones variables. Como cada cadena pesada puede unirse a dos tipos distintos de cadena ligera, el número de posibilidades es todavía mayor. A esto hay que añadir otros procesos que todavía generan más diversidad, al

introducir mutaciones en la propia secuencia del gen, y que hacen posible que una persona pueda generar millones de anticuerpos distintos.

Es importante recordar que el paso más importante en la inmunología llegó a manos de Edward Jenner (1749-1823) y Louis Pasteur (1822-1895), los llamados padres de la vacunación. Mientras que el primero descubrió la manera de inmunizar frente a una enfermedad mediante la inoculación de un microorganismo similar al causante y de virulencia atenuada, y realizó la primera campaña de vacunación masiva de la historia, el segundo demostró el fundamento mediante el que se podía inmunizar a las personas frente a una enfermedad con la inoculación del microorganismo causante de la misma atenuado de forma artificial. Así, la primera vacuna (Jenner) descubierta protegía frente a la viruela humana³.

Pero la vacunación se considera una medida preventiva, y el tema que nos ocupa en este trabajo trata sobre medidas terapéuticas, concretamente, sobre la inmunoterapia, aunque muchas veces este tipo de terapias aparecen asociadas al nombre de “vacuna”. Es momento, por lo tanto, de introducir dos nuevos conceptos:

- ❖ La **inmunoterapia** es la rama de la inmunología que utiliza agentes inmunorreguladores o efectores naturales u obtenidos en laboratorio con el fin de modificar de manera directa o indirecta una función inmune específica del individuo con fines tanto profilácticos como curativos.
- ❖ Los **anticuerpos monoclonales** son inmunoglobulinas dirigidas -cada tipo- frente a un antígeno específico, producidas y purificadas de manera artificial y que comenzaron a utilizarse como agentes inmunoterapéuticos frente a enfermedades de muy diversa etiología.

Desde su primer éxito, en 1982, como agentes terapéuticos en el tratamiento de un linfoma B en un paciente de 64 años terminal, en el año 2010 los anticuerpos monoclonales cumplieron 30 años, dejando de ser una curiosidad biológica para ser una forma de tratamiento y diagnóstico muy importante en diversas enfermedades. Además, su uso se ha ampliado a métodos de estudio de las interacciones patógeno-hospedador y a marcación, detección y cuantificación de diversas moléculas⁸.

Debido a su gran éxito terapéutico, la manera de utilizar los anticuerpos monoclonales también ha variado, llegando a ser modificados o conjugados, como se verá más adelante, con agentes que aumenten aún más su eficacia como toxinas, quimioterápicos, moléculas radiactivas, etc.

Como se verá más adelante (tabla 2), existen un número elevado de anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA, y cada vez más se encuentran en fase de ensayo clínico.

ASPECTOS HISTÓRICOS

Se podría decir que el primer paso en el desarrollo de la inmunoterapia vino a manos del médico alemán Emil von Behring (1854-1917), galardonado con el premio Nobel de Medicina (1901) por su descubrimiento de las vacunas frente al tétanos y la difteria. Durante su estudio sobre estas dos enfermedades, Behring descubrió que, al inyectar suero sanguíneo de un animal afectado por el tétanos a otro, se genera inmunidad a la enfermedad en el segundo⁹. Especuló, por tanto, que los animales inmunizados contra el tétanos presentaban esta cualidad porque debían disponer de alguna sustancia capaz de controlar la infección.

Tras su éxito en la lucha contra el tétanos, en 1890 Behring se dedicó, junto a Shibasabō Kitasato en el laboratorio de Koch a experimentar con casos de difteria⁹. En este caso, inoculó en cobayas la toxina diftérica y posteriormente, les inyectó suero de animales supervivientes a la enfermedad. De esta manera, se demostró que lo que él denominó antitoxina diftérica (que era en realidad el suero que contenía los anticuerpos generados por los animales supervivientes a la enfermedad) no sólo proporcionaba inmunidad posterior a su inoculación, sino que también podía ayudar a combatir la enfermedad cuando estaba presente en humanos; por lo tanto, concluyó que la inmunidad natural reside en los líquidos del organismo e inició la teoría humoral de la inmunidad⁹.

En el año 1900, Paul Ehrlich sugiere que las moléculas que reaccionan frente a los tumores pueden jugar un papel clave en la terapia contra el cáncer, lo que presagió una inmunoterapia pasiva mediada por anticuerpos¹⁰. 50 años más tarde, Lewis Thomas y Frank MacFarlane Burnet demuestran que la célula T es el pilar principal en la respuesta del sistema inmune contra el cáncer¹⁰, acuñándose la expresión "vigilancia inmune": alerta constante del sistema inmunitario contra las células cancerosas¹¹.

De esta manera, comienzan a concebirse los componentes humorales y celulares del sistema inmune como un arma que puede dirigirse contra procesos patológicos; así, a estos primeros pasos les siguió toda una línea de investigación para el desarrollo y producción de terapias inmunológicas dirigidas.

En 1975, George Köhler y Cesar Milstein desarrollan la tecnología hibridoma para la producción de anticuerpos¹⁰, que, como se analizará más adelante, consiste en la obtención de anticuerpos monoclonales a partir de linfocitos B de un animal estimulado con el antígeno diana¹².

Finalmente, en 1982 se reporta el primer caso de tratamiento con éxito en humanos de un linfoma de células B mediante el uso de un anticuerpo monoclonal paciente-específico anti-idiotipo¹⁰.

Posteriormente, en 1988 se introduce la metodología para aislar antígenos tumorales reconocidos por el sistema inmune, y en 1991 se aísla el primer antígeno humano de melanoma¹⁰. Estos dos sucesos se consideran un gran paso en el desarrollo de inmunoterapia dirigida, puesto que gracias al aislamiento de antígenos tumorales y con

métodos eficaces para la obtención de anticuerpos monoclonales, se puede dirigir la respuesta inmune de manera específica frente a diferentes tumores que amenacen la integridad del organismo. Hecho que también puede extrapolarse al tratamiento de diferentes patologías no tumorales, como se puede apreciar en la siguiente tabla (Tabla 2) sobre anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA^{13,14,15} a fecha de mayo de 2016. Por motivos de espacio, sólo se muestran algunos de los anticuerpos monoclonales aprobados en los últimos 5 años (tabla completa en el ANEXO I).

NOMBRE	DIANA	TIPO	Año	INDICACIONES TERAPÉUTICAS
Brentuximab	CD30 (conjugado de Mab y MMAE)	IgG1 quimérico (conjugado con fármaco)	2011	Linfoma Hodgkin Linfoma anaplásico de células grandes
Denosumab	RANK-L	IgG2 humana	2011	Prevención de eventos esqueléticos en metástasis óseas de tumores sólidos
Ipilimumab	CTLA-4	IgG1 humana	2011	Melanoma
Pertuzumab	HER2	IgG1 humanizada	2012	Cáncer de mama
Raxibacumab	Antígeno protector de <i>Bacillus anthracis</i>	IgG1 humana	2012	Prevención y tratamiento del antrax inhalatorio
Obinutuzumab	CD20	IgG1 humanizada	2013	Leucemia linfocítica crónica
Trastuzumab emtansine	HER2	IgG1 humanizada (conjugado con fármaco)	2013	Cáncer de mama
Necitumumab	Receptor EGF*	IgG1 recombinante humano	2015	Cáncer de pulmón no microcítico
Nivolumab	Receptor PD-1	IgG4 humana	2015	Cáncer de pulmón no microcítico Melanoma
Pembrolizumab	Receptor PD-1	Humanizado	2015	Melanoma
Ramucirumab	Receptor 2 de VEGF*	IgG1 humano	2015	Cáncer gástrico
Daratumumab	CD38	IgG1 humano	2015	Mieloma múltiple
Elotuzumab	CD319 (SLAMF7)	IgG1 humanizado	2015	Mieloma múltiple
Blinatumomab	CD19, CD3	Ratón	2015	Leucemia linfoblástica aguda
Dinutuximab	GD2	Quimérico	2015	Neuroblastoma
Obiltoxaximab	<i>Bacillus anthracis</i>	Quimérico	2016	Exposición al antrax
Ixekizumab	IL-17 ligando	IgG4 humanizado	2016	Psoriasis, artritis psoriásica
Secukinumab	IL-17 ligando	IgG 1 humano	2016	Psoriasis en placa
Reslizumab	IL-5	IgG4 humanizado	2016	Asma severa

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales terapéuticos aprobados por la FDA; diana, tipo, año, procedencia e indicaciones. Adaptada de la original en www.actip.org¹³.

**MMAE (monometil austatina E, agente antineoplásico), PD-1 (proteína de muerte celular programada), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), EGFR (receptor de factor de crecimiento endotelial).*

Existen numerosos anticuerpos monoclonales en fases avanzadas de ensayo clínico¹⁴. Como se muestra en la tabla 2, a inicios del año 2016 ya se han aprobado más de tres anticuerpos monoclonales y se prevé que por lo menos 12 más (tabla 3) conseguirán lo mismo para finales de año.

NOMBRE	DIANA	TIPO	INDICACIONES TERAPÉUTICAS
Brodalumab	Receptor A IL-17	Humano	Psoriasis
Atezolizumab	Inhibidor de PD-L 1	Completamente humanizado	Cáncer de pulmón no microcítico Colangiocarcinoma Cáncer de células renales Cáncer de mama
Reslizumab	IL-5	Humanizado	Asma
Dupilumab	IL-4, IL-13	Humano	Asma Eccema Dermatitis atópica
Farletuzumab	Receptor de folatos alfa de superficie tumoral	IgG1 humanizado	Cáncer ovárico
Ibalizumab	CD4	Humano de murina	VIH
Inotuzumab ozogamicin	CD22	Conjugado	Leucemia linfoblástica aguda
Ocrelizumab	Linfocitos B CD20 positivos	Humanizado	Esclerosis múltiple primaria progresiva Esclerosis múltiple recidivante
Sarilumab	IL-6	Humano	Artritis reumatoide
Tildrakizumab	IL-23	Humanizado	Psoriasis
Tremelimumab	CTLA-4 de linfocitos T activados	Completamente humanizado	Mesotelioma Cáncer de pulmón no microcítico Cáncer de cabeza y cuello
Daclizumab	Subunidad CD25 de IL-2	Humanizado	Esclerosis múltiple

Tabla 3. Anticuerpos monoclonales de probable aprobación en 2016. Adaptada de la original en <http://www.biopharminternational.com>¹⁴.

Los tipos de anticuerpos y técnicas de obtención de los mismos se explican en el siguiente apartado (desarrollo actual de la técnica).

DESARROLLO ACTUAL DE LA TÉCNICA

El desarrollo de tecnologías ADN recombinante y obtención de anticuerpos monoclonales, así como el conocimiento extenso de la estructura molecular y función de las inmunoglobulinas humanas, ha permitido el uso de anticuerpos específicos en el tratamiento de determinadas patologías. Además, se ha conseguido unir elementos como fármacos, profármacos o enzimas a las inmunoglobulinas para incrementar su éxito terapéutico. Incluso, en algunas ocasiones, es posible el uso de enzimas modificadas genéticamente como terapia¹⁶.

Origen de los anticuerpos terapéuticos

Los anticuerpos monoclonales de primera generación para uso en humanos fueron los **murinos**, obtenidos en animales (ratón, conejo o rata) mediante la técnica del hibridoma, que se analiza en el siguiente apartado. Pero la limitada penetración tumoral, la reducida estimulación de la función citotóxica dependiente de anticuerpo y del complemento, la formación de complejos inmunes tras la administración prolongada, su corta supervivencia *in vivo* y su baja eficiencia en la destrucción de células diana obligó a desarrollar modificaciones en los mismos con el fin de solventar estos inconvenientes¹⁶. Además, otro problema que nos encontramos con este tipo de anticuerpos es que, al proceder de un animal, incluyen secuencias antigénicas que pueden inducir la formación de anticuerpos y, por lo tanto, no están exentos de posibles efectos secundarios tales como “rash” cutáneo o fiebre.

Posteriormente, se desarrolló la producción de anticuerpos **quiméricos**, y, aunque se redujo sustancialmente esta complicación, no la eliminó. Se trata de anticuerpos híbridos integrados por regiones de inmunoglobulinas humanas con una estructura murina, de manera que derivan de dos especies diferentes. El anticuerpo combina las partes de unión al antígeno, presentes en la región variable del anticuerpo murino, con las porciones efectoras presentes en la región constante de un anticuerpo humano¹⁷, consiguiendo así un anticuerpo constituido por un 70% de secuencia humana y por un 30% de ratón¹⁶ (figura 5).

Los anticuerpos monoclonales de segunda generación son los “**humanizados**”, es decir, sin secuencias murinas, y que, por lo tanto, no producen el rechazo que aparece con los anteriores. Este tipo de anticuerpos se obtiene mediante la sustitución de la región CDR del anticuerpo monoclonal de ratón en una inmunoglobulina humana, obteniendo, en este caso, un anticuerpo constituido por un 95% de DNA humano y un 5% de DNA de ratón. El resultado combina la especificidad antigénica de la inmunoglobulina de ratón junto con todas las demás propiedades de una inmunoglobulina humana¹⁶. Se considera, por tanto, que esta nueva generación de anticuerpos monoclonales mejora en diversos aspectos a sus predecesores quiméricos²⁴.

A pesar de ello, el hecho de que también contengan, aunque mínimamente, secuencias no humanas conlleva una serie de inconvenientes tales como reacciones cruzadas o sensibilización del paciente en tratamiento con múltiples fármacos; por este motivo se comenzaron a desarrollar los **anticuerpos monoclonales “humanos”**¹⁶.

En esta clase de anticuerpos, la región determinante de la complementariedad no es de origen humano. El anticuerpo combina sólo los aminoácidos que intervienen en la unión con el antígeno, la denominada región hipervariable, de origen murino con el resto de la molécula del anticuerpo humano. Este tipo de anticuerpos se generan mediante la inmortalización de linfocitos B humanos con el virus Epstein- Barr y el uso de ratones inmunodeficientes¹⁷.

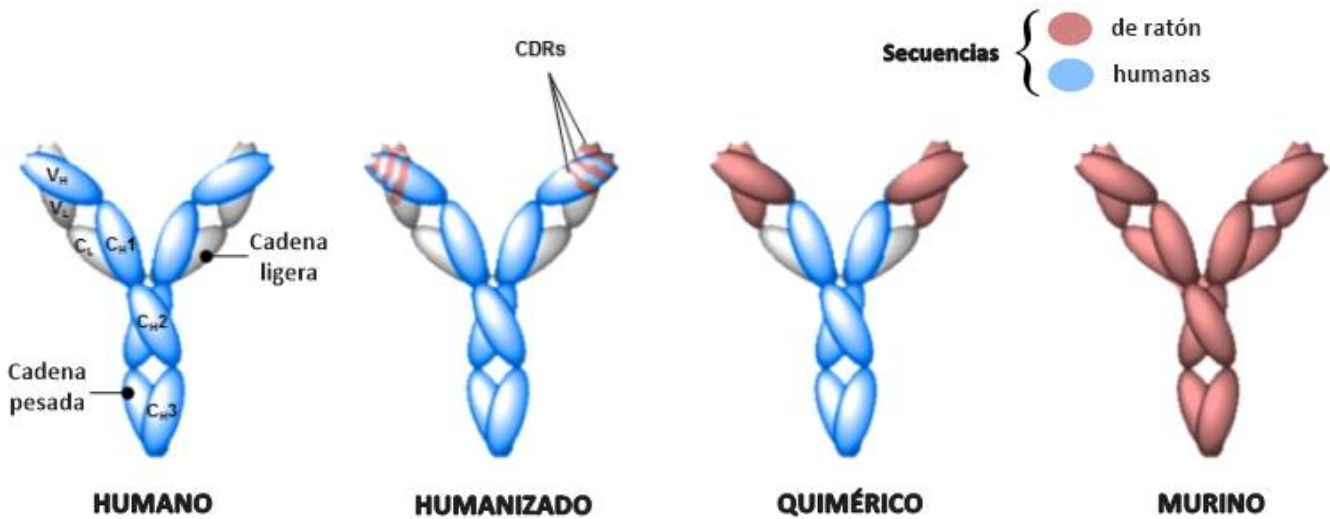


Figura 5. Imagen esquemática de la estructura de los diferentes tipos de anticuerpos monoclonales. Adaptada de la original¹⁸ en www.pvanuden.com.

La nomenclatura genérica de los diferentes tipos de anticuerpos monoclonales en función de su origen y diana terapéutica se puede sintetizar de la siguiente manera (tabla 4):

PREFIJO	DIANA		FUENTE		SUFIJO
Variable, generalmente eufónicos	-o(s)-	Hueso	-u-	Humano	-mab
	-v(i)-	Viral	-o-	Ratón	
	-b(a)-	Bacteriano	-a-	Rata	
	-l(i)-	Inmunomodulador	-e-	Hamster	
	-c(i)-	Cardiovascular	-i-	Primate	
	-k(i)-	Interleucina	-xi-	Quimérico	
	-t(u)-	Tumor misceláneo	-zu-	Humanizado	
	-tox(a)-	Toxina	-axo-	Híbrido ratón/rata	
	-f(u)-	Fúngico			

Tabla 4. Nomenclatura genérica de anticuerpos monoclonales. Adaptada de la original en WHO Guidelines 2009¹⁹.

Respecto a su uso como agentes terapéuticos, los anticuerpos monoclonales se pueden clasificar en dos grupos: conjugados y no conjugados, en función de si se unen covalentemente o no a otras moléculas efectoras diferentes.

Los anticuerpos monoclonales **no conjugados** no se han unido a otras moléculas tales como fármacos o material radiactivo. Estos anticuerpos se unen a los antígenos específicos de las células diana y se utilizan, por lo tanto, como marcaje para atraer y activar efectores del sistema inmunológico. Los anticuerpos monoclonales **conjugados**, por el contrario, se utilizan para liberar radionúclidos, toxinas o drogas citotóxicas en la proximidad de un tejido específico afectado o en una población de células neoplásicas. Este tipo de anticuerpos liberan la sustancia tóxica en un lugar concreto próximo al tejido o célula diana, minimizando así el daño celular subyacente (figura 6).

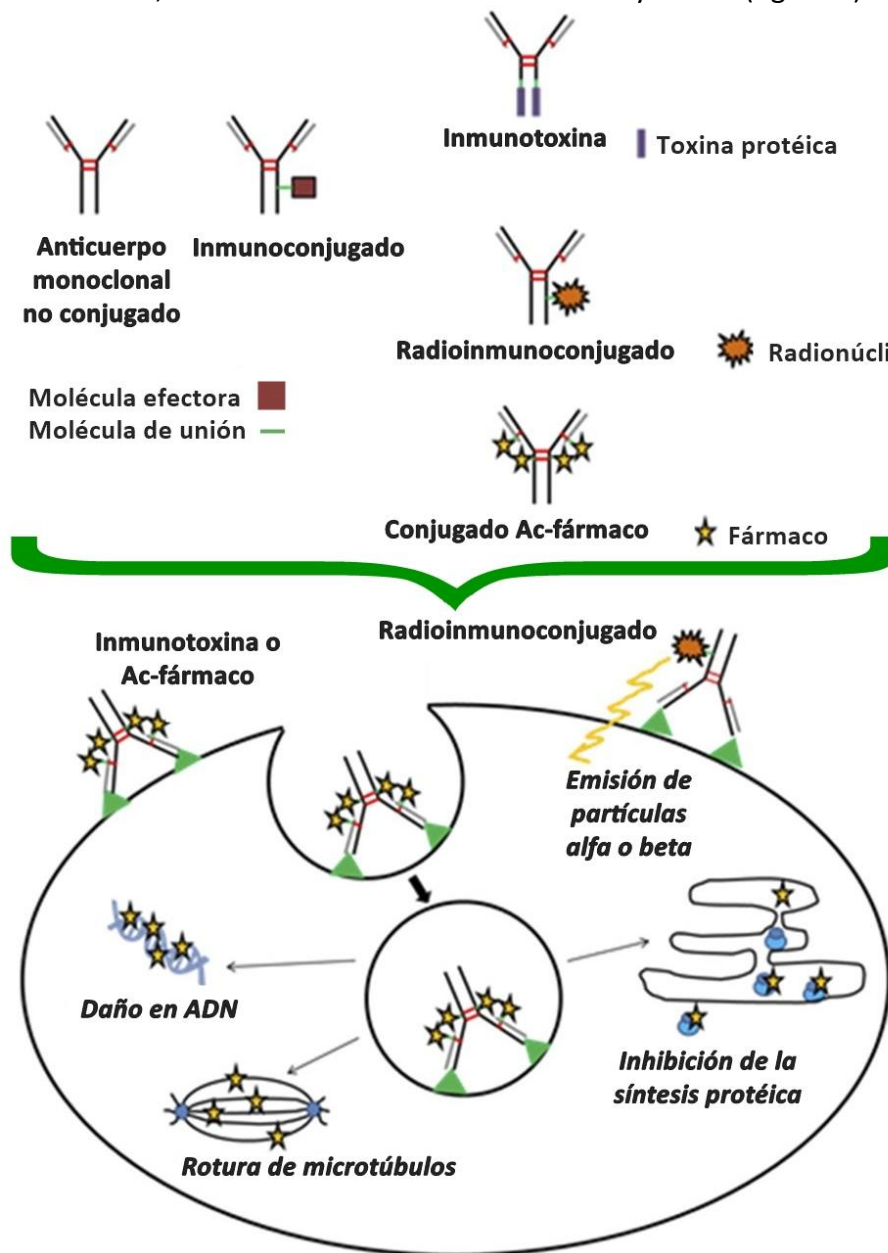


Figura 6. Mecanismo de acción de los anticuerpos monoclonales conjugados. Adaptada de la original en <http://www.bloodjournal.org/content/123/15/2293?sso-checked=true>

❖ **DERIVADOS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES**

Hasta ahora sólo se han nombrado los anticuerpos monoclonales estructuralmente similares a las inmunoglobulinas humanas en los que están presentes los dos elementos que permiten la funcionalidad de la molécula (Fab y Fc): anticuerpos quiméricos y humanizados; pero, si englobáramos ambos tipos en un grupo, podríamos decir que existe otro grupo de anticuerpos monoclonales constituido por un conjunto más heterogéneo de proteínas de nueva estructura, basadas en la estructura de las inmunoglobulinas clásicas. Éstas pueden encontrarse en la forma de entidades recombinantes autónomas (fragmentos tipo Fab, Fv de cadena sencilla -scFv-, “diabodies”, “triabodies”, etc), o como proteínas de fusión en las que se combina la porción Fc o una toxina, una enzima, un receptor celular, una citoquina... con el fin de proporcionarle nuevas y propiedades (figura 7).

La fragmentación de anticuerpos resulta en una alteración de las características fisicoquímicas y, en algunos casos, estructurales de estas moléculas, que, como ventaja²⁰, desde el punto de vista económico, presenta una elaboración más fácil y barata. Además, al perder la región Fc encargada de la estabilidad estructural del anticuerpo y el reciclaje mediante su receptor, los fragmentos de anticuerpos son eliminados de manera más rápida del organismo, reduciendo así su vida media en la circulación.

En contraposición, el hecho de perder la región Fc y la ausencia de selección *in vivo* de las células B productoras de anticuerpos estables y específicos puede ocasionar una agregación de los mismos durante su producción o purificación, lo que, a su vez, podría incrementar la inmunogenicidad en pacientes. Además, otra desventaja de perder la región Fc es que estos fragmentos pierden la capacidad de desencadenar la respuesta inmunológica dependiente de esta región (citotoxicidad celular mediada por anticuerpo o citotoxicidad inducida por la cascada del complemento) a no ser que sean conjugados con una fracción efectora²⁰.

Los **fragmentos de anticuerpos** comenzaron su desarrollo debido a que, como se ha mencionado, los efectos de la porción Fc de la IgG no son siempre necesarios en el ámbito terapéutico, e incluso pueden llegar a ser no deseados.

Como curre tradicionalmente en biotecnología, las bacterias son las herramientas más utilizadas para la producción de proteínas recombinantes y, en el caso de los fragmentos de anticuerpos, concretamente se utiliza *E.coli* debido a las ventajas que ofrece en cuanto a manipulación, transformación, cinética de crecimiento, bajo coste y condiciones de fermentación⁶.

Los fragmentos Fv y Fab de las inmunoglobulinas son los que poseen la capacidad de unión antigénica. En 1988 se produjeron versiones recombinantes funcionales de estos fragmentos en el periplasma bacteriano por primera vez⁶, de manera que constituyen la clase más antigua de fragmentos de anticuerpos terapéuticos. Hasta ese momento, se había buscado la obtención de los fragmentos mediante expresión intra-citoplasmática, pero ésta resultó fallida puesto que el microambiente intracelular bacteriano no es adecuado para el procesamiento post-traducción e induce la formación de cuerpos de

inclusión que impiden un correcto plegamiento. Estas inclusiones citoplasmáticas contienen la proteína en una forma no funcional y su recuperación es bastante compleja y frecuentemente con bajo rendimiento. La expresión de fragmentos de anticuerpos en el periplasma bacteriano, por el contrario, sigue una vía de ensamblaje similar a la que ocurre en el retículo endoplásmico de los linfocitos B. Así, se producen moléculas activas en un pequeño volumen y en un compartimiento subcelular donde se encuentran relativamente protegidas frente a la acción de enzimas proteolíticas.

La mayor ventaja de estos anticuerpos “fragmentados” frente a los anticuerpos monoclonales convencionales es que, gracias al reducido tamaño que presentan, poseen una mayor accesibilidad a dianas antigénicas. Por otra parte, pueden tener múltiples zonas de unión para los mismos, e incluso zonas de unión específicas para dos o más dianas¹⁶.

Como desventaja se presenta su incapacidad para desencadenar una respuesta inmune completa debido a la pérdida de su región Fc¹⁶.

Un paso más en el desarrollo de estos derivados de anticuerpos monoclonales se dio al desarrollar los denominados *Single Chain Fv (scFv)*. Se trata de una versión recombinante del fragmento Fv en la que los dominios VH y VL se encuentran unidos físicamente a través de un “linker” peptídico²¹ compuesto por alrededor de 15 aminoácidos y que tiene la longitud y flexibilidad necesarias para permitir la estabilidad estructural espacial adecuada de los dominios VH y VL, generándose un Fv funcional. Los scFv presentan la ventaja de que, aun conservando la capacidad de unión antigénica, son más estables que el Fv convencional (figura 7).

Años más tarde, se consiguió la expresión de scFv en otros hospedadores como la levadura *P. pastoris*²², hongos filamentosos²³, células de insecto²⁴ y células de mamífero²⁵.

Tanto los fragmentos Fab como los scFv poseen un único lugar de unión al antígeno, es decir, son monovalentes, por lo que su eficacia en una situación que requiere una gran afinidad puede ser reducida. Con el fin de solventar esta desventaja, se comenzaron a desarrollar versiones multivalentes de estos fragmentos, así como dímeros o polímeros de anticuerpos recombinantes que combinan dos especificidades distintas.

Una de las estrategias para el desarrollo de lo mencionado se basa en la reducción de la longitud del “linker” en la construcción del scFv a 5 aminoácidos, de manera que se imposibilita la formación de un Fv funcional entre dos dominios VH y VL en una misma molécula. Por ello, dos moléculas de scFv interactuarán entre sí, conduciendo a la formación de un dímero que posee dos sitios de combinación con el antígeno. Si la especificidad de los dominios VH y VL es la misma, el producto obtenido es un homodímero bivalente conocido como “**diabody**”²⁶ (figura 7).

De la misma manera, las moléculas scFvs pueden ser producidas en tándem, creando lo que se denomina “**tascFv**”²⁰. Utilizando este mismo método es posible producir moléculas recombinantes con dos especificidades diferentes diseñando dos

construcciones tipo scFv, cada una con una especificidad distinta, pudiendo encontrarse en el mismo vector. Estos polipéptidos tampoco son capaces de formar scFv funcionales de manera individual, pero, sí que tienen la capacidad de aparearse apropiadamente para generar heterodímeros en los que ambas especificidades son restauradas y se encuentran físicamente asociadas. Por ello, a estas moléculas se les ha denominado **anticuerpos biespecíficos** (figura 7).

Si el péptido utilizado como “linker” es eliminado y los dominios VH y VL son expresadas como un polipéptido continuo, lo que se obtiene es un trímero funcional con capacidad de unión de tres determinantes antigénicos. A estos fragmentos se les ha denominado **“triabodies”**^{27,28}.

Siguiendo esta línea, y con el objetivo de reducir al máximo posible el tamaño de las proteínas recombinantes mediante la eliminación de los dominios no esenciales para su función, existe otro tipo de péptidos constituidos por 61 aminoácidos: los **“minibodies”**. Se trata de moléculas monovalentes o bivalentes que contienen una región variable de la cadena ligera, otra región variable del dominio de unión al antígeno de la cadena pesada, y uno o dos dominios efectores constantes, todos unidos mediante un “linker”²⁰. El péptido adopta una conformación tipo hoja beta plegada con dos asas correspondientes a regiones hipervariables exhibiendo así su capacidad para ligar determinantes antigénicos a la vez que conserva otras características del dominio V de las inmunoglobulinas, como tolerancia a variabilidad de la secuencia en regiones específicas de la proteína²⁶.

Un tipo diferente de “minibody”, a los que se ha denominado como proteínas inmunes pequeñas (**SIP**, “small immune proteins”), fue descrito en 1996. Se trata de una variante del fragmento scFv en el que un dominio CH3 está asociado físicamente, en una misma cadena polipeptídica, a un scFv a través de un “linker” que contiene residuos de cisteína en su secuencia.

Alrededor del año 2000, se comenzaron a desarrollar los denominados **“Unibodies”**, en los que se elimina la zona bisagra de las IgG4, de manera que las moléculas IgG4 se vuelven inestables y pueden intercambiar las cadenas pesada y ligera entre sí. Además, esta delección de la zona bisagra evita el apareamiento entre dos regiones pesadas, dando como resultado heterodímeros de cadenas ligera y pesada de alta especificidad, mientras que retiene la región Fc para asegurar la estabilidad de la molécula y la longevidad de su vida media *in vivo*²⁰. Pero esta configuración estructural podría minimizar la activación del sistema inmune o activar el crecimiento oncogénico, puesto que la IgG4 interactúa de manera muy débil con los receptores de la región Fc y los “unibodies” monovalentes no promueven la formación del complejo de señalización intracelular²⁰.

En esa misma fecha se descubrió que los **anticuerpos de camello** están constituidos por dímeros de cadena H, sin cadena L^{29,30} y esto motivó a la creación de anticuerpos recombinantes humanos constituidos por un único dominio VH⁶. Para simular la estructura de los anticuerpos de camello, se introdujeron mutaciones en los residuos 44 (Gly44Glu), 45 (Leu45Arg) y 47 (Trp47Gly) en un dominio VH humano preseleccionado.

Estos cambios evitan la interacción del VH mutado con el VL humano homólogo y así es posible obtener dominios VH solubles con la capacidad para combinar Ag con una alta afinidad.

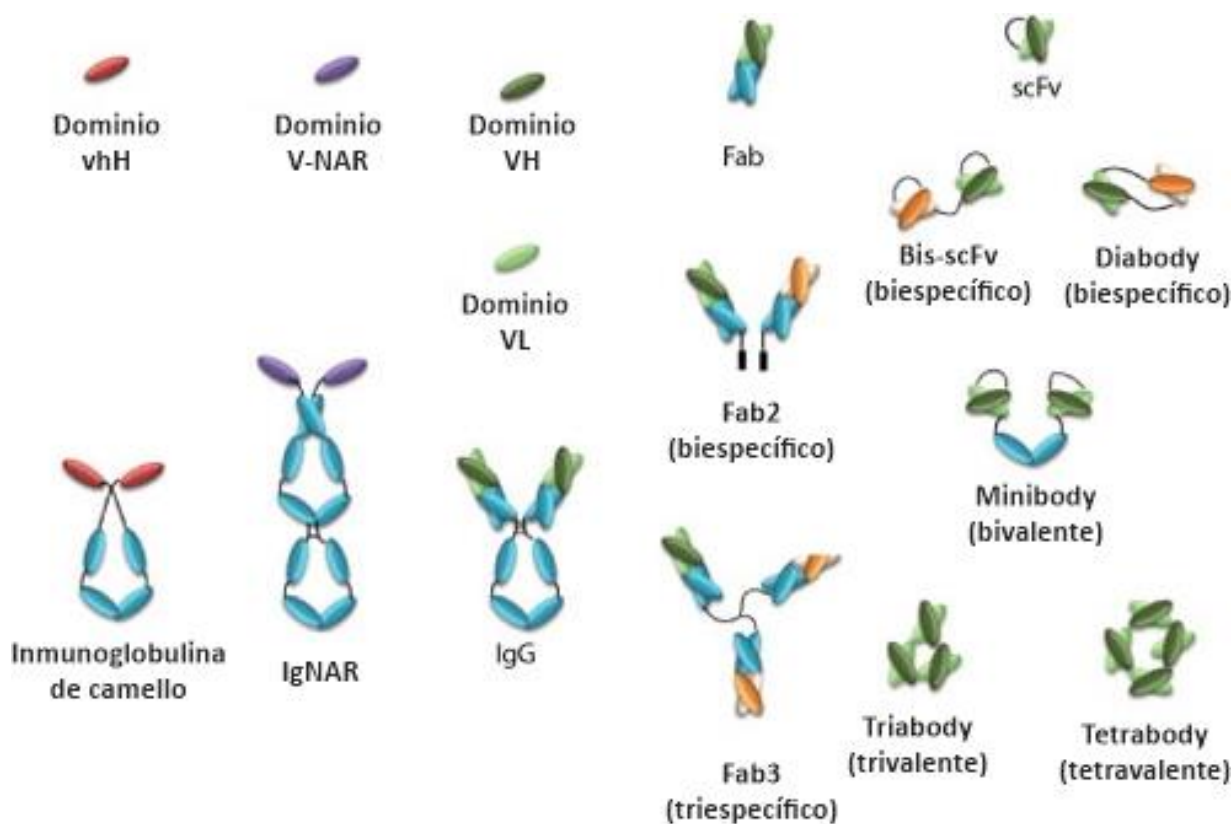


Figura 7. Representación esquemática de los diferentes formatos de anticuerpos. Adaptada de la original en www.biopharminternational.com³¹.

❖ TÉCNOLOGÍAS PARA LA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y SUS DERIVADOS

1. Generación de hibridomas

Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de obtención de anticuerpos monoclonales fue descrito por Kohler y Milstein en el año 1975. La técnica¹⁷ (figura 8) consiste en la fusión de una línea de células de mieloma con pérdida de su capacidad secretora de anticuerpos con células B productoras de anticuerpos obtenidas del bazo de un ratón estimulado con el antígeno diana¹². Esta fusión se realiza con el fin de immortalizar las células B, puesto que éstas mueren a los pocos días en un cultivo *in vitro*. Las células de mieloma son modificadas previamente mediante la eliminación del gen HGPRT¹², lo que convierte su membrana celular más permeable y permite que puedan reproducirse con mayor rapidez. Esta fusión genera un clon de células, denominado **hibridoma**, con capacidad para sobrevivir de manera indefinida en medios de cultivo y de producir un único tipo de anticuerpo durante largos períodos de tiempo.

Una vez obtenidos estos clones celulares, son inyectados en el abdomen de otro ratón, de manera que se multiplican y producen abundante líquido ascítico (**técnica ascítica**) en el que se concentra una gran cantidad de anticuerpos monoclonales frente al antígeno en estudio. Este procedimiento permite obtener grandes cantidades de anticuerpos que permiten su uso directo como agentes terapéuticos. Sin embargo, presenta como inconveniente que es necesaria la observación diaria de los animales, y que, además, los preparados de anticuerpos monoclonales obtenidos mediante este proceso están contaminados por varias proteínas murinas (procedentes del animal) y otros compuestos que deben ser eliminados. Esta técnica es considerada sencilla y asequible desde el punto de vista económico, pero presenta dilemas éticos referentes al uso de animales como medio de cultivo, así como de rendimiento del producto.

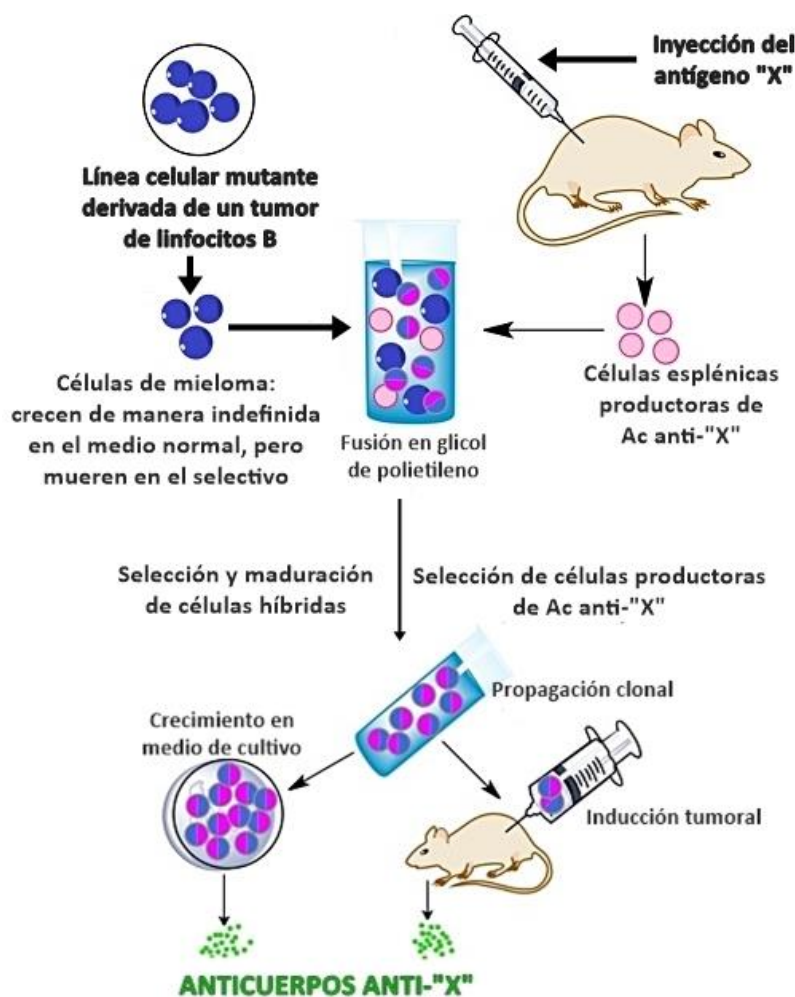


Figura 8. Técnica hibridoma para la obtención de anticuerpos monoclonales. Adaptada de la original³² en medicine.nevada.edu.

Una alternativa a este último aspecto reside en lograr el cultivo del hibridoma en un medio tisular rico en factores que optimicen su crecimiento; no obstante, el proceso es más complicado y, por tanto, costoso. Uno de los procedimientos más simples para la producción de anticuerpos monoclonales *in vitro*¹⁷ (figura 8) consiste en el crecimiento de los hibridomas en cultivos celulares y posteriormente en la purificación de los anticuerpos obtenidos a partir del medio de cultivo. Como inconveniente en este caso

cabe destacar que la técnica aporta una cantidad pequeña de anticuerpos monoclonales y que, además, una parte de los mismos se desnaturalizan durante la concentración o la purificación. Además, la denominación “*in vitro*” es relativa, puesto que se sigue requiriendo la presencia de un animal en su proceso obtención.

Existe un tercer sistema de obtención de anticuerpos monoclonales basado en el uso de **membranas semipermeables**¹⁷ que permiten una densidad elevada de crecimiento celular en el medio de cultivo. El proceso se basa en aislar las células y los anticuerpos monoclonales que producen en un compartimento reducido separado de otro de mayor tamaño donde se encuentra el medio de cultivo mediante membranas con un filtro de peso molecular bajo (10.000-30.000 kD). El medio de cultivo podrá ser enriquecido con factores que favorezcan el crecimiento del hibridoma, de manera que estos y los productos de desecho celulares difundirán por la membrana mientras que las células y los anticuerpos quedan retenidos (figura 9). Al ser prácticamente independientes ambos compartimentos, el medio de cultivo agotado puede renovarse sin ocasionar la pérdida celular o de anticuerpos, de la misma manera que las células y los anticuerpos pueden ser extraídos sin modificar el medio de crecimiento.

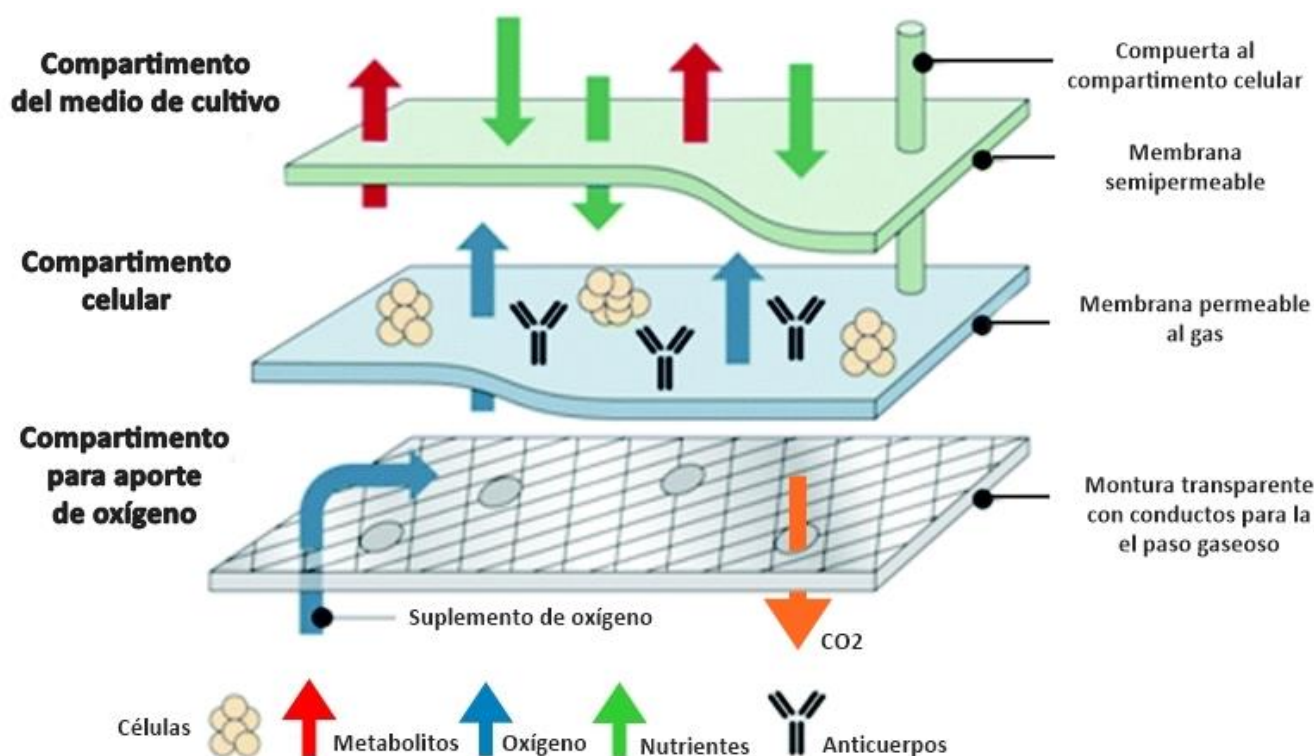


Figura 9. Esquema del mecanismo de acción de las membranas semipermeables en la obtención de anticuerpos monoclonales *in vitro*. Adaptada de la original en pubs.rsc.org.

Este proceso presenta como ventaja³³ que permite la producción de grandes cantidades de anticuerpos monoclonales en volúmenes de cultivo relativamente pequeños y que no presenta los contaminantes característicos del fluido ascítico animal. Como desventaja aparece que los anticuerpos monoclonales obtenidos pueden haber sido contaminados con productos de desecho celular.

Éste sería el método más utilizado para la producción a nivel industrial de anticuerpos monoclonales, ya que evita el uso de animales y la cantidad de anticuerpos monoclonales producidos es muy grande.

Los procedimientos efectuados *in vitro* son efectivos en casi el 90% de los casos¹⁷; sin embargo, en una minoría son ineficaces porque los hibridomas no desarrollan un crecimiento adecuado o se pierden en estas condiciones experimentales.

2. Uso de animales transgénicos

Un enfoque diferente para abordar la humanización de anticuerpos monoclonales, con el fin de disminuir al máximo los posibles efectos adversos e incrementar la efectividad terapéutica de los mismos, es la producción de anticuerpos humanos mediante el uso de ratones transgénicos. Estos animales se denominan *XenoMouse* y son híbridos descendientes de un progenitor en el que se han inactivado los genes necesarios para la producción de inmunoglobulinas y de otro progenitor en cuyas células productoras de anticuerpos se han introducido el locus IgH y los loci κ y λ de la IgL humanos¹⁶. Una vez cruzados ambos ratones, se consigue mediante selección previa una cepa que expresa únicamente inmunoglobulinas humanas, el *XenoMouse*, de manera que, si se inmuniza frente a un antígeno concreto, se obtendrán una gran cantidad de anticuerpos frente al mismo que se podrán utilizar como terapia en humanos. Debido a que las inmunoglobulinas humanas se dividen en cinco isotipos, se han generado ratones transgénicos diferentes para la producción de cada uno de ellos³⁴.

Las características del primer progenitor se consiguen mediante delecciones específicas de genes codificadores de las cadenas IgH e Ig κ de inmunoglobulinas en células madre embrionarias, de manera que esa cepa de ratón no es capaz de producir anticuerpos¹⁶. Para la obtención del segundo progenitor, es necesario incorporar al ADN de sus células madre embrionarias un transgén que contenga varios segmentos génicos de las cadenas κ y λ de la cadena ligera y segmentos génicos de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana. Un transgén es una construcción de ADN que consta de una secuencia codificadora de la proteína específica aporta la mejora genética deseada, una región que le confiere capacidad de expresión de forma ubicua o en tejidos específicos (promotor); y una serie de secuencias aisladoras y reguladoras que protegen y modulan la expresión del gen introducido.

En este caso, los segmentos génicos mencionados son incorporados mediante un receptor al ADN animal utilizando los denominados YAC (*yeast artificial chromosome* – cromosoma artificial de levadura), que se fusionan con células madre embrionarias de ratón, de manera que se consigue una completa integración de los genes codificadores de inmunoglobulinas humanas en el ADN del mismo¹⁶.

Para la construcción³⁵ de un YAC, se combinan secuencias “TEL” (teloméricas) con secuencias “ARS” (orígenes replicativos) y “CEN” (centroméricas) de la levadura; a éstas se les añade ADN con genes seleccionados de levadura y suficiente ADN humano para confeccionar una molécula de un peso molecular mayor de 50 kb. A estas unidades funcionales, explicadas a continuación, se añaden marcadores de selección metabólica y un lugar selectivo para el clonaje.

- Centrómero (CEN). Asegurará una replicación estable y precisión en la repartición cromosómica en la fase de mitosis.
- Secuencia de replicación autónoma (ARS - *Autonomous Replicating Sequence*). Permite que el YAC se replique de manera independiente, sin ser integrado en el cromosoma de la levadura.
- Secuencias teloméricas (TEL). Indispensables para la formación de telómeros que permiten al YAC replicarse en forma de molécula lineal.

Para confeccionar la estructura del cromosoma (figura 10), se realiza la apertura de un plásmido y se fracciona en tres fragmentos mediante la acción enzimática de BamHI (enzima de restricción de tipo II producida por *Bacillus amyloliquefaciens*) y SmaI (enzima de restricción de tipo II producida por *Serratia*). El brazo izquierdo del cromosoma contendrá el centrómero, la ARS y el telómero izquierdo; el brazo derecho, a su vez, contendrá el telómero derecho; entre ellos, quedará un fragmento de separación. Cada brazo portará un marcador de selección y, gracias al mismo, serán sometidos a la acción de la fosfatasa alcalina para impedir que se vuelvan a unir.

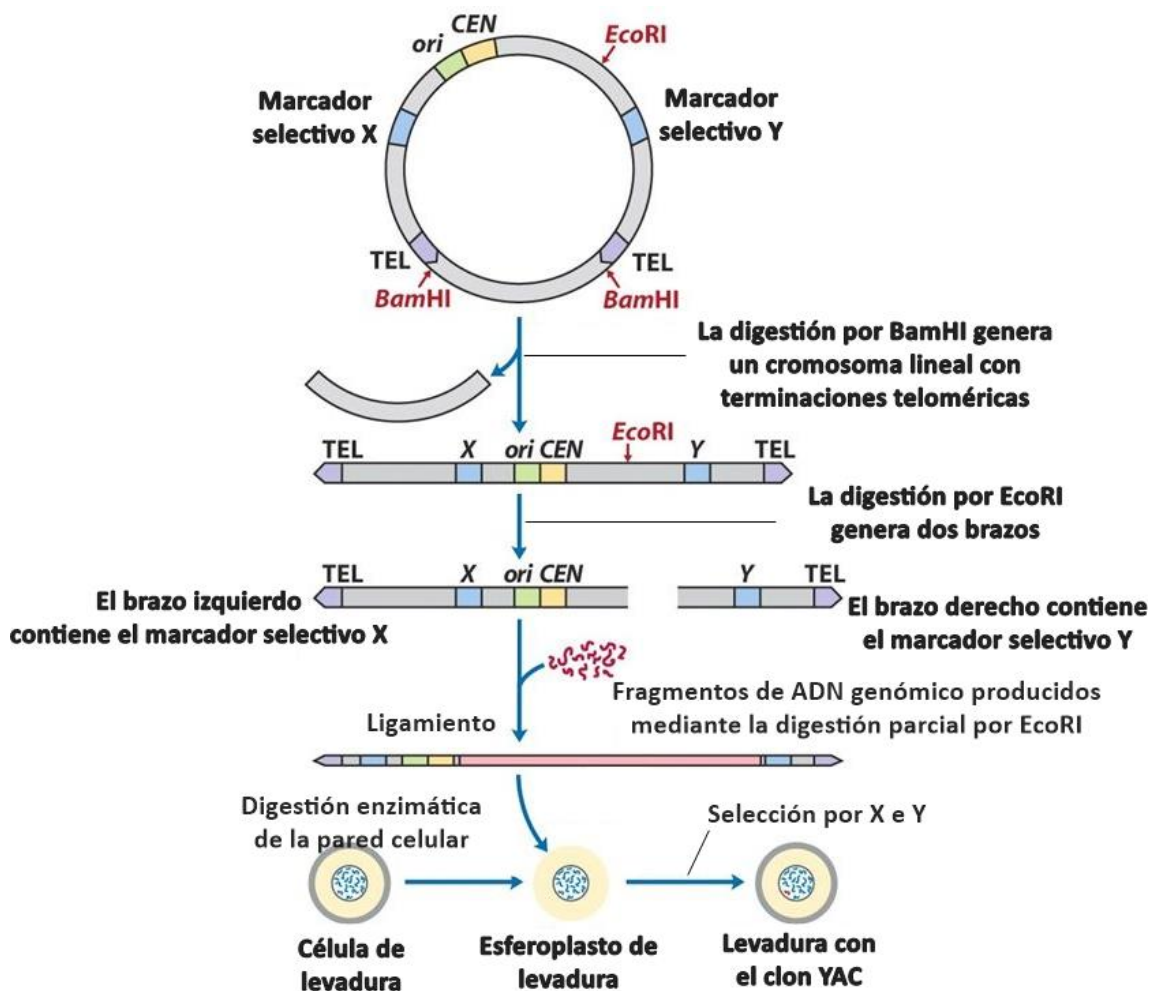


Figura 10. Confección de un YAC. Adaptada de la original³⁶ en slideshare.net

Estos cromosomas artificiales se replican en células de levadura y son retenidos de manera casi total, es decir, que sólo un pequeño porcentaje de las células hijas no recibe el cromosoma tras el ciclo celular³⁵.

Posteriormente, utilizando los marcadores de selección metabólica mencionados, se seleccionan las levaduras que contienen los YAC portadores de los genes de las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina humana para su posterior introducción en las células madre embrionarias de uno de los progenitores el *Xenomouse*. Este proceso se realiza mediante la microinyección del YAC en el pronúcleo de oocitos fecundados de ratón y a continuación, estos se reimplantan en una hembra pseudopreñada, de manera que un porcentaje de sus descendientes presentará el gen introducido.

Una vez adultos los ratones, se aparean con el primer progenitor mencionado anteriormente, procedente de una cepa incapaz de producir anticuerpos de ratón. Así, los descendientes de ambos presentarán la cualidad de producir anticuerpos humanos frente a los antígenos con los que sean estimulados.

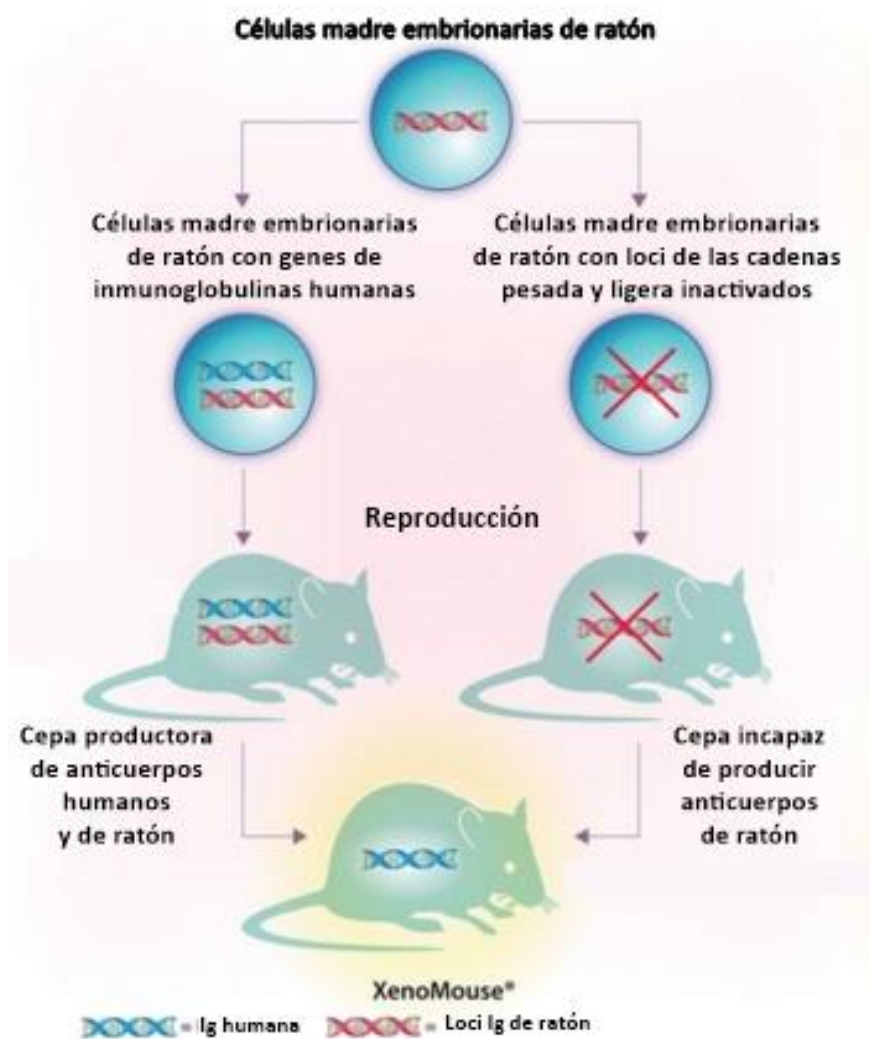


Figura 11. Esquema de la obtención del Xenomouse a partir de progenitores modificados genéticamente. Adaptada de la original³⁷ en <http://circ.ahajournals.org/content/127/22/2222/F3.expansion.html>.

Como ventajas³⁸ en el uso de esta técnica se presentan la producción de anticuerpos con secuencias proteicas completas, lo que reduce la posibilidad de generar anticuerpos frente a proteínas murinas y sus consecuentes efectos adversos, la generación de anticuerpos de alta afinidad que no requieren modificaciones posteriores, y un desarrollo eficiente de los productos con vistas a su posterior comercialización.

3. Tecnología de ADN recombinante

Debido a los dilemas éticos que puede suponer el uso de animales en la obtención de anticuerpos monoclonales, puesto que se ha demostrado que les provoca malestar, dolor y estrés³⁹, se han desarrollado diversas técnicas alternativas: tecnología de ADN recombinante en bacterias mediante uso de fagos. Además, La ingeniería genética vegetal (en plantas transgénicas) representa una buena opción para la producción de estos anticuerpos, ya que carece de contaminantes de origen animal, se produce a bajo costo y es sencilla su fabricación a gran escala.

Mediante la tecnología de **ADN recombinante**, se utilizan genes de anticuerpos producidos en el laboratorio o extraídos de células humanas para la obtención de los denominados anticuerpos recombinantes, pudiendo ser utilizados en las mismas aplicaciones que los anteriores, incluso con mayores ventajas³⁹. En este caso, en lugar de inmortalizar la célula productora de anticuerpos, se produce la inmortalización de los genes que los codifican⁶.

- **“Phage-display” (presentación de anticuerpos en la superficie de fagos)**

Los bacteriófagos son virus que, en el proceso de infección de bacterias, introducen su material genético en el genoma bacteriano y emplean las funciones vitales de la bacteria para la producción de más unidades virales.

En 1990, John McCaferty et al. demostraron que los genes codificantes de los diferentes fragmentos de las inmunoglobulinas podían ser introducidos mediante vectores en virus bacteriófagos para la infección posterior de bacterias, con la consiguiente introducción de esa información genética en las mismas⁴⁰. Fue entonces cuando se crearon librerías o genotecas de genes de anticuerpos para ser utilizados en el proceso.

Una genoteca de anticuerpos se construye mediante la fusión, utilizando un vector, de los fragmentos de ADN codificantes de las regiones variables de inmunoglobulinas humanas con el gen de un bacteriófago que codifica sus proteínas capsulares pIII o pVIII¹¹. De esta manera, tras la transcripción de la mezcla de ADNs, se genera una proteína de fusión formada por un fragmento de anticuerpo humano completamente funcional y la proteína de superficie viral (figura 12).

Debido al uso de virus bacteriófagos en el proceso, a esta técnica se le denominó **“phage-display”**. Los vectores transportadores de los genes de las librerías de anticuerpos se introducen en el interior de una bacteria que posteriormente es infectada por el bacteriófago modificado. La fusión de ambos provoca la disrupción del funcionamiento normal de la bacteria, haciendo que produzca nuevos fagos que contendrán los genes de las cadenas variables de las inmunoglobulinas y expresarán

fragmentos funcionales de anticuerpos en su superficie unidos a las proteínas capsulares⁴¹ pIII o pVIII.

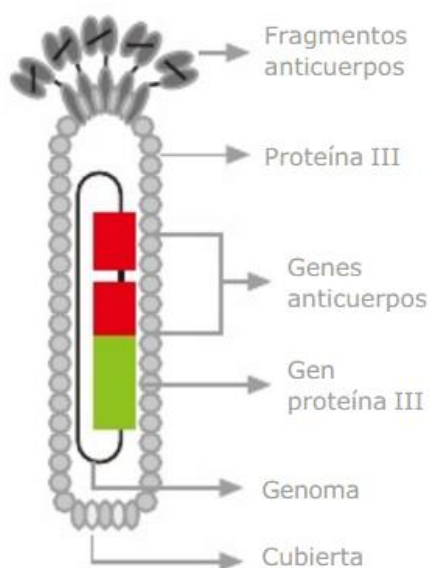


Figura 12. Presentación de fragmentos de anticuerpos en superficie de un fago recombinante. Adaptada de la original⁴² en *The FASEB Journal*.

Como progreso de esta técnica se encuentra un proceso de expresión de anticuerpos completos basado en la bacteria *E.coli* y denominado **E-Clonal**, que expresa moléculas IgG completas, en lugar de únicamente fragmentos de las mismas, en la superficie de la membrana bacteriana⁴¹.

En la actualidad, en lugar del uso del bacteriófago como tal, se prefiere utilizar los denominados fagómidos, vectores plasmídicos artificiales formados por el gen III del fago, secuencias genómicas necesarias para la infección de *E.coli* y la secuencia de ADN del anticuerpo de interés. Así, ha sido posible crear amplias colecciones de fragmentos de anticuerpos para diferentes antígenos que se denominan bibliotecas de fragmentos de anticuerpos o genotecas de expresión de fagos. Con estas bibliotecas es posible generar anticuerpos completamente humanos para su uso terapéutico⁴³.

El procedimiento empleado para la producción de estas genotecas se basa en la generación de múltiples fagos recombinantes, en concreto, que contengan múltiples combinaciones genéticas de las regiones variables de las inmunoglobulinas humanas. Mediante la extracción de estas secuencias de los linfocitos B humanos y generación de una gran cantidad de copias utilizando la técnica de la PCR, es posible obtener todos los fagos constituyentes de las bibliotecas de anticuerpos monoclonales humanos. Al entrar en contacto con el antígeno seleccionado, estas colecciones son capaces de identificar y aislar al anticuerpo con mayor afinidad, de manera que, a partir de él, la tecnología “phage-display” (figura 13) permite obtener numerosas copias del anticuerpo monoclonal deseado⁴⁴.

Una vez conseguida la expresión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo, se realiza su aislamiento mediante técnicas como ELISA, citometría de flujo o inmunoensayo.

Básicamente, los microorganismos que expresan el anticuerpo en su superficie son incubados en un medio que contiene el antígeno, de manera que los que no producen la unión antígeno-anticuerpo son descartados⁴¹. Posteriormente, se separan los anticuerpos con mayor afinidad de los que tienen una menor, para realizar la modificación de estos últimos. El proceso de maduración de la afinidad de los anticuerpos se produce de manera natural en el cuerpo humano, así que para realizarlo *in vitro* se recurre a un proceso análogo.

Una vez que el anticuerpo específico es seleccionado, sus genes son transferidos mediante vectores de expresión a sistemas de expresión, que pueden ser bacterias, levaduras o líneas celulares de mamíferos diseñadas especialmente para la expresión de proteínas exógenas. La elección del vector y el sistema de expresión dependerá del tipo de anticuerpo que se busca producir⁴¹.

Esta tecnología de ADN recombinante hace posible la obtención tanto de anticuerpos completos como de fragmentos de los mismos. Tanto en su variante de expresión de fragmentos de anticuerpos como en la de expresión de anticuerpo completo, presenta como mayor ventaja la rapidez, puesto que una vez seleccionada la genoteca, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse en alrededor de 8 semanas, en contraposición de los 4 meses necesarios en el caso de la técnica del hibridoma⁴¹. Otra ventaja frente a la técnica anterior es el control sobre el estado del antígeno frente al que se están produciendo los anticuerpos, puesto que ni uno ni otro están sufriendo modificaciones en el interior de un animal⁴¹. Y respecto a este tema, se evitan también los problemas morales debidos al uso de animales de laboratorio.

Además, desde el punto de vista terapéutico presentan la ventaja de que, al derivar de genes humanos, no contienen fragmentos de proteínas animales como los anteriores, por lo que las reacciones adversas en su uso disminuyen significativamente.

Como mayor inconveniente de esta técnica se presenta la gran complejidad a la hora de crear librerías de genes, puesto que es necesario conseguir *in vitro* las mismas características que presenta el sistema inmune en la selección de anticuerpos teniendo en cuenta su afinidad. Y, en el caso de que los genes de inmunoglobulinas sean extraídos de células B humanas, son necesarios un gran número de voluntarios humanos⁴¹.

La mayor desventaja que presenta la técnica de ADN recombinante frente al hibridoma es la necesidad de maduración de la afinidad de los anticuerpos. En el caso de la producción en animales, la exposición repetida a un mismo antígeno genera una respuesta cada vez mayor y más rápida, debido a la mayor afinidad de los nuevos anticuerpos generados (fenómeno de memoria inmunológica). En el caso de la tecnología recombinante, esta maduración de la afinidad tendría que ser desarrollada mediante técnicas moleculares.

También se presenta en este caso el problema de los falsos positivos, ya que los fagos pueden unirse a antígenos no específicos y generar, por consiguiente seleccionar anticuerpos monoclonales inespecíficos.

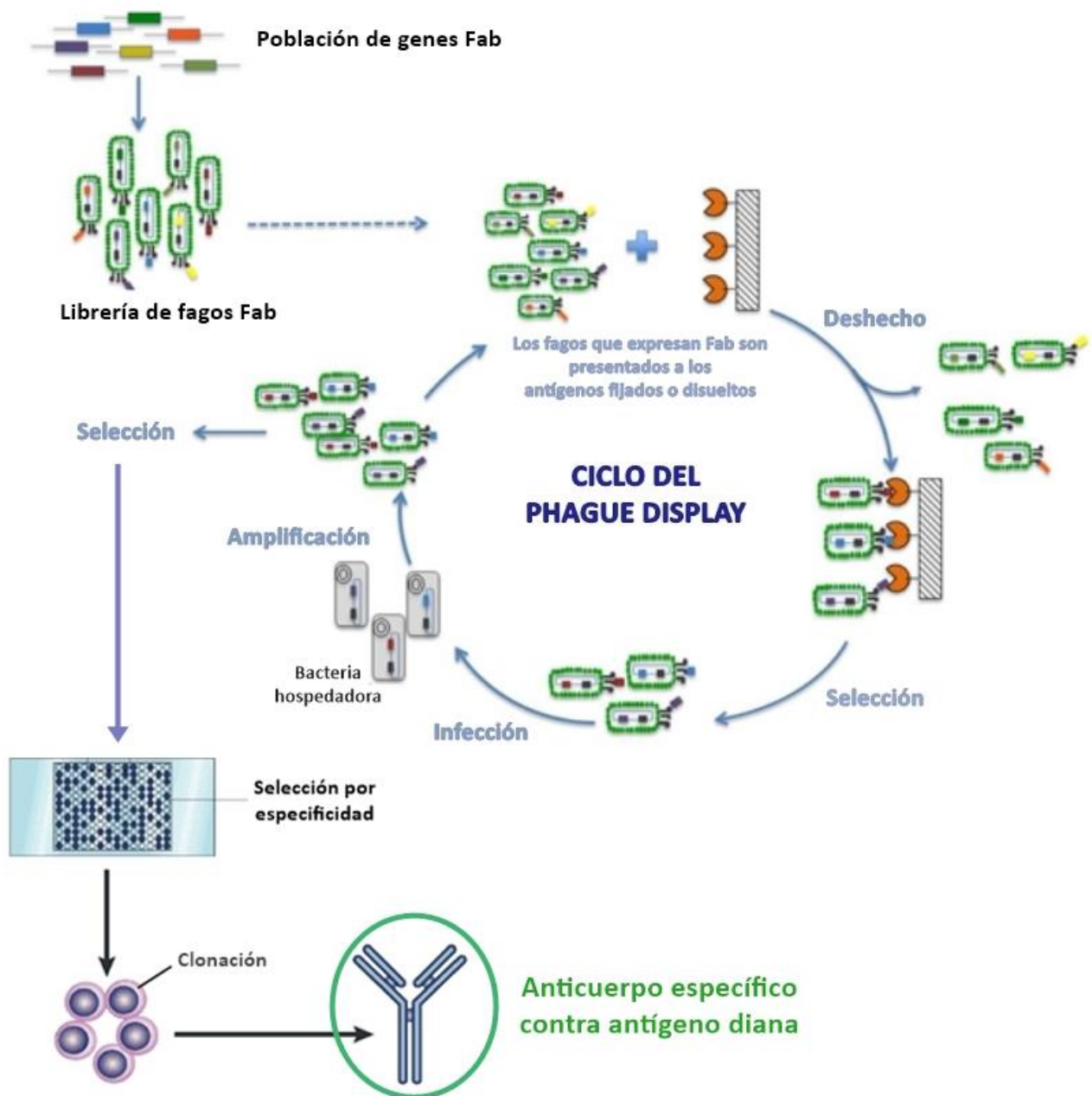


Figura 13. Técnica “phage-display”. Adaptada de la original de FairJourney biologics.

- **Tecnología del “Ribosomal-display”**

Se trata de otro tipo de técnica de producción de fragmentos de anticuerpos monoclonales. Al igual que la técnica del “phage-display”, ésta también hace posible la generación de genotecas.

La tecnología del “Ribosoma-display”⁴⁴ se basa en la síntesis de fragmentos de anticuerpos monoclonales *in vitro* (figura 14) sin emplear las propias células como medio de producción.

Mediante la técnica de PCR, se amplifican los genes codificadores de inmunoglobulinas humanas, obteniendo así un gran número de copias de los mismos. Posteriormente, se realiza su transcripción, que da como resultado moléculas de ARN mensajero (ARNm). Estas moléculas son incubadas junto con ribosomas aislados⁴⁵ que, una vez realizada la lectura del ARNm, llevan a cabo la síntesis de los fragmentos de anticuerpos. El complejo ARNm-ribosoma-fragmento de anticuerpo se estabiliza *in vitro* hasta el momento de selección de la molécula de interés, momento en el cual se ponen en contacto estos complejos con el antígeno diana de interés, de manera que queda aislado el fragmento de anticuerpo que lo reconoce específicamente. Como ésta molécula lleva unidos el ribosoma que lo ha sintetizado y su ARNm, mediante la técnica de RT PCR es posible obtener su secuencia génica codificadora para su posterior clonaje.

La técnica RT PCR ("Reverse Polymerase Chain Reaction" o reacción en cadena de la polimerasa reversa) es una técnica de amplificación genética que permite obtener millones de copias de un fragmento de ADN a partir de ARN mensajero maduro.

Mediante este método es posible generar grandes colecciones de complejos ARNm-ribosoma-fragmento de anticuerpo que, al igual que en la técnica del "phage-display" constituirán las genotecas de anticuerpos. Como ventaja de esta tecnología se presenta que el sistema de producción de anticuerpos no depende del uso de células ni otros organismos (como fagos), que podrían limitar el proceso por el hecho de estar utilizando seres vivos. Por esto, ofrece un potencial de generación de genotecas de anticuerpos incluso mayor que la técnica del "phage-display"⁴⁴.

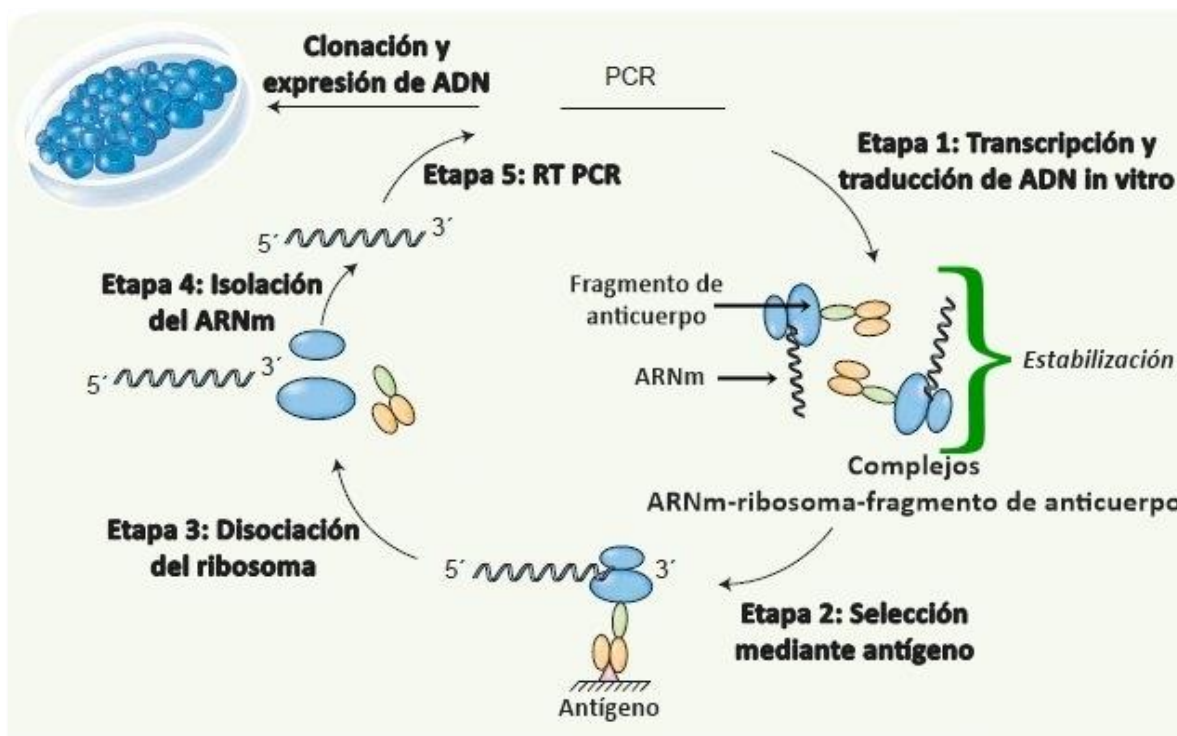


Figura 14. Generación de fragmentos de anticuerpos mediante tecnología "Ribosomal-display". Imagen adaptada de la original en www.ec21.com.

4. Plantas transgénicas

Un método alternativo y actual para la producción de anticuerpos monoclonales se basa en la expresión de los mismos en plantas o en cultivos de células vegetales. Entre las variedades de plantas empleadas⁴⁴ como biorreactores de producción de anticuerpos monoclonales se encuentran: la planta de maíz, el arroz, la planta del tabaco, *Arabidopsis thaliana* y *Lemna minor* (planta acuática).

Como primer paso⁴⁶ de esta técnica, es necesario clonar en cADN de las cadenas pesada y ligera de la IgG a partir de una célula hibridoma. Una vez obtenido el gen de interés, se pueden utilizar dos procesos diferentes: la introducción del transgén mediante vectores en el genoma de la planta (planta transgénica) de manera que se consiga una **expresión permanente** del anticuerpo monoclonal, o la **expresión temporal** del mismo, proceso en el que el cADN aislado es introducido en la célula vegetal donde es transcrito y traducido por la maquinaria de síntesis de proteínas, estando posteriormente presente en la célula durante un tiempo limitado.

Al igual que ocurre en las células animales, la presencia de sistemas de glicosilación y mecanismos pos-traduccionales de las células vegetales, permiten la síntesis de péptidos pequeños, polipéptidos y complejos multiprotéicos funcionales. Además, también presentan chaperonas (proteínas encargadas del plegamiento, ensamble y movilidad de las nuevas proteínas producidas dentro de la célula) homólogas a las presentes en células humanas, lo que facilita que una gran diversidad de biomoléculas pueda ser potencialmente producidas en estos sistemas⁴⁷. El retículo endoplásmico celular presenta un ambiente idóneo para que se produzca la fusión de las cadenas de inmunoglobulinas transcritas por la célula vegetal, ya que la glicosilación proteica se produce en este orgánulo y en el aparato de Golgi. Los anticuerpos monoclonales, por tanto, son producidos en el retículo endoplásmico y posteriormente, pueden ser secretados al citoplasma celular o ser acumulados en apoplastos (espacio extracelular periférico a la membrana celular vegetal por el que fluyen agua y otras sustancias).

Una vez que la planta ha producido los anticuerpos monoclonales de interés, el tejido vegetal es sometido a procesos de centrifugación y filtración para obtener un extracto que, como primer paso antes de la extracción de los anticuerpos, ha de ser sometido a técnicas de purificación para eliminar restos y detritus celulares. Uno de los métodos utilizados para conseguirlo son las técnicas de precipitación; en concreto, el polietilenglicol se utiliza para eliminar los compuestos fenólicos y alcaloides, y la polietilenimina para eliminar las proteínas ácidas nativas⁴⁸.

La tecnología más utilizada para la purificación de anticuerpos monoclonales a partir de cultivos celulares animales son las técnicas de cromatografía de columna. La técnica básicamente consiste en efectuar una cromatografía de afinidad en columna. Para ello, se une de manera covalente el mismo antígeno que se utilizó para la generación del anticuerpo a la matriz que ocupa la columna, y se pasa a través de ella el suero que se desea purificar. Así, se produce la unión de los anticuerpos específicos para el antígeno retenido y el resto de los anticuerpos y proteínas contaminantes del suero se eliminan por la parte inferior de la columna. El paso final es la ruptura de las uniones antígeno-anticuerpo, para lo que se añade a la columna una solución hipertónica u otra con pH

ácido, con lo que las uniones se rompen y los anticuerpos específicos para el antígeno seleccionado se eluyen por la parte inferior de la columna⁴⁹.

Pero en el caso de las células vegetales, esta técnica no es la idónea, por lo que se han propuesto una serie de técnicas alternativas como la cromatografía de membrana⁵⁰, que utiliza membranas con macro- o micro-poros en cuya superficie interna se localizan antígenos específicos para los anticuerpos monoclonales de interés. El extracto obtenido a partir de la planta se vierte sobre la membrana y se genera un flujo que hace que los anticuerpos monoclonales queden adheridos a los poros. En comparación con la cromatografía de columna, esta técnica presenta como ventajas una menor presión del extracto y un flujo más rápido del mismo⁵¹.

Una alternativa a esta técnica es la co-expresión de anticuerpos monoclonales junto con péptidos que facilitan la extracción de los mismos, como las ELP (elastin-like proteins), que precipitan de manera reversible ante cambios de temperatura, o las proteínas hidrofóbicas, como las oleosinas e hidrofobinas, que contienen los anticuerpos en la fracción lipídica.

También se ha estudiado el uso de ligandos con afinidad por las uniones de celulosa para conseguir la captura directa de anticuerpos monoclonales a partir del extracto de la planta del tabaco⁵⁰.

Actualmente, las semillas de cereales como maíz, arroz, cebada y trigo se consideran buenos almacenes de proteínas recombinantes, ya que éstas pueden ser almacenadas por largos periodos y, gracias a la ausencia de compuestos fenólicos, la estabilidad proteica no se ve alterada. Además, la extracción del producto final a partir de semillas es más sencilla; en algunas ocasiones se han hecho fusiones de la proteína de interés a moléculas oleosas que se asocian a membranas permitiendo su rápida separación del sistema vegetal⁴⁷.

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los posibles métodos de producción de anticuerpos monoclonales en plantas es la generación de plantas transgénicas. Para ello, se pueden utilizar dos sistemas: la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* o el “bombardeo” de partículas con genes. La transgenización de la planta consiste en la introducción del DNA codificante de las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina humana en el compartimento nuclear de la célula vegetal mediante un vector. También se pueden introducir los genes de la cadena ligera y pesada de forma independiente en diferentes células vegetales, de manera que, al cruzar ambas líneas celulares, se produce una co-expresión de las dos cadenas en las plantas descendientes. Las líneas de plantas transgénicas en las que se han introducido ambas secuencias genéticas simultáneamente son cruzadas entre sí para obtener plantas homocigotas que expresen la inmunoglobulina; de esta manera, se obtiene una fuente permanente de anticuerpos monoclonales.

Aunque el proceso de transgénesis sea relativamente rápido, son necesarios unos meses para el crecimiento de las primeras plantas transgénicas, además del tiempo que requiera el posterior procesamiento de las mismas para la producción masiva de

anticuerpos monoclonales. El proceso completo puede tener una duración de dos años⁴⁶.

Existe otra variante de esta técnica en la que los genes de las inmunoglobulinas son introducidos en el genoma de cloroplastos⁵² (orgánulo vegetal que contiene la clorofila y donde se realiza la fotosíntesis) y que produce la expresión de anticuerpos monoclonales unidos mediante puentes disulfuro. La ventaja que presenta esta variante es que no existe el efecto de silenciamiento de genes, por lo que se expresan todos los genes introducidos en su genoma, y que permite la expresión y acumulación de una gran cantidad de anticuerpos. Como desventaja se presenta que la expresión de transgenes heterólogos es alta (para la expresión de anticuerpos monoclonales funcionales es necesaria la expresión de genes homólogos) y que el cloroplasto carece de la capacidad de glicosilación post-traducciona l de proteínas, de manera que en ocasiones requiere glicosilación artificial para estabilizar la proteína.

Como alternativa a la generación de plantas transgénicas, puesto que su desarrollo conlleva mucho tiempo y costes asociados, se presenta el método de **expresión temporal**⁵², que reduce el tiempo de producción a días o semanas⁴⁶. Este método se utiliza generalmente para evaluar la actividad de expresión genética de la planta o para evaluar la funcionalidad de un anticuerpo recombinante antes de introducir sus genes en una planta transgénica. En el caso de que sea posible producir una cantidad suficiente de anticuerpos, la expresión temporal puede utilizarse también como método de producción de los mismos. Para llevarla a cabo, los métodos utilizados son la agroinfiltración⁴⁶ y los virus recombinantes de plantas.

El primer método consiste en la infiltración de una solución de *Agrobacterium tumefaciens*, que contiene en el T-DNA el gen de interés, en el interior de las células de hojas de tabaco, facilitando la transferencia del T-transgén a las esas células⁴⁷. En este caso, la producción de anticuerpos es muy rápida, pero aparece la desventaja de que los costes de ampliación son muy altos.

Los virus recombinantes de plantas se utilizan como vectores modificados de transgenes y presentan un alto grado de expresión de los mismos; además, tras la inoculación del material genético viral, su propagación es muy rápida y afecta al tejido de la planta en su totalidad. La ventaja que presenta el uso de virus frente a la agroinfiltración es que las cosechas de anticuerpos son mucho mayores tanto por la alta tasa de expresión genética de los virus como por la rapidez de diseminación viral en el tejido vegetal.

Como desventaja del uso de vectores se presenta que el movimiento sistémico del virus post-infección se encuentra limitado por el tamaño de los transgenes que han sido integrados en su genoma. Además, durante la replicación del ARN viral en la planta, se produce una alta tasa de mutaciones y deleciones en el genoma integrado.

En el año 2005, se desarrolló un sistema⁵² de transfección viral de replicones mediado por *Agrobacterium tumefaciens* para una expresión de anticuerpos temporal más eficaz. Tras la infección por un virus vector de plantas que lleva los genes de interés, la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* utiliza como precursores de ADN los vectores virales de ARN, de manera que se produce una amplificación genómica simultánea en todas las

células de la planta. Como resultado, se obtiene una gran expresión de genes heterólogos en células infectadas por una sola bacteria, así que no es necesaria la infección viral sistémica, por lo que se resuelve el problema de movilidad viral mencionado anteriormente.

A la hora de seleccionar el tipo de planta donde se van a producir los anticuerpos monoclonales, se han de valorar una serie de características⁴⁶. Por ejemplo, los anticuerpos que se expresan en las patatas o en los cereales se mantienen estables durante largos periodos de tiempo a temperatura ambiente una vez purificados, mientras que aquellos obtenidos de la planta de tabaco han de ser liofilizados para que mantengan su actividad una vez almacenados. Además, la extracción de anticuerpos a partir de semillas o frutos es mucho más cara que la extracción directa del tejido vegetal, como ocurre en el caso de los tomates.

El virus tabaco mosaico (ARN virus) y el virus X de la patata (ARN virus) han sido ya utilizados como vectores en la producción de anticuerpos monoclonales en plantas de tabaco, incluyendo fragmentos scFv e inmunoglobulinas completas^{53,54}. En la tabla 5 se muestran los anticuerpos monoclonales obtenidos hasta el año 2015 a partir de plantas.

PLANTA	TIPO DE ANTICUERPO	APLICACIONES
Haba de soja	IgG frente a Virus del Herpes Simple-2	Tratamiento de la infección
Tabaco	IgG frente al virus de la rabia	Tratamiento de la infección
Tabaco	IgG frente al virus del Ébola	Tratamiento de la infección
Tabaco	IgG frente al VIH	Tratamiento de la infección
Tabaco	IgG frente al Virus Respiratorio Sincitial	Tratamiento de la infección
Tabaco	IgG frente al Virus del Nilo Occidental	Tratamiento de la infección
Tabaco	ScFv frente al CEA (Antígeno carcinoembrionario)	Marcaje tumoral y cribado
Arroz	ScFv frente al CEA (Antígeno carcinoembrionario)	Marcaje tumoral y cribado
Cereales	ScFv frente al CEA (Antígeno carcinoembrionario)	Marcaje tumoral y cribado
Tabaco	IgG frente al antígeno tumoral Lewis Y	Tratamiento del cáncer de mama
Tabaco	IgG frente al antígeno tumoral GA733-2	Tratamiento del cáncer de colon
Tabaco	IgG frente a <i>S. mutans</i>	Prevención de las caries dentales

Tabaco	IgG frente a <i>S. mutans</i>	Prevención de las caries dentales
Tabaco	Híbrido IgA-G	Anthrax

Tabla 5. Anticuerpos monoclonales obtenidos a partir de plantas y sus utilidades terapéuticas. *Adaptada de la original⁵⁹ en Biomed Research International.*

El método de la ingeniería vegetal ofrece como ventaja principal un aumento de la productividad a la vez que ocasiona reducción de costes de producción⁵². Además, la infraestructura para el cultivo de la mayoría de las cosechas está ya establecida, de manera que el único requerimiento adicional es cultivar de nuevo el terreno cuando disminuya su fertilidad⁴⁶.

Por otra parte, el uso de plantas como biorreactores para la producción de anticuerpos monoclonales evita la contaminación de los mismos por productos animales indeseados y, al contrario que con las técnicas que utilizan animales, no es necesario conservar una cepa inicial puesto que las plantas pueden ser almacenadas como semillas⁴⁶.

Como ventaja más importante, algunos autores consideran las plantas como un medio prometedor para la rápida producción de anticuerpos en el contexto de bioterrorismo o de una posible epidemia de una enfermedad natural⁵⁶.

5. Proteínas de fusión

La tecnología de ADN recombinante ha hecho posible la elaboración de moléculas artificiales denominadas **proteínas de fusión**⁶ en las que se combinan características estructurales y funcionales de varias proteínas naturales.

El uso de anticuerpos monoclonales para la elaboración de proteínas de fusión presenta como ventaja una mayor diversidad y especificidad antigénica, mínimo riesgo de reacciones cruzadas, y propiedades específicas requeridas en ciertas aplicaciones como vida media, tamaño y funciones efectoras.

En la actualidad existe un gran número de péptidos y proteínas terapéuticas que presentan limitaciones a la hora de utilizarlos debido a su toxicidad a nivel sistémico o a su corta vida media debida a la inactivación o degradación enzimática de los mismos. Se ha demostrado que su combinación con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los tejidos diana de estos agentes terapéuticos optimiza su efecto y acción terapéutica⁵⁷.

Así, existe un importante número de proteínas de fusión en las que se combinan porciones de moléculas de anticuerpos diferentes, o se fusionan con toxinas, interleucinas, moléculas de adhesión, componentes de la matriz extracelular, hormonas,

factores de crecimiento, superantígenos, moléculas CD, receptores celulares, incluso lípidos⁶.

Inmunotoxinas

La unión de anticuerpos monoclonales a toxinas forma las denominadas inmunotoxinas, fusión que conlleva una disminución de su toxicidad y, por tanto, posibilita el uso de éstas como agentes terapéuticos⁴⁴. La unión entre ambas moléculas se realiza químicamente o a nivel genético en el caso de los anticuerpos recombinantes, de manera que se conserva su actividad biológica.

El mecanismo de acción de estas moléculas se basa en el reconocimiento de la célula diana mediante el anticuerpo. Posteriormente, la molécula se internaliza y ambos elementos constituyentes de la misma son separados, generalmente, en los lisosomas, debido al medio celular ácido que presentan. Así, la toxina ejerce su efecto de destrucción celular.

Aunque una gran cantidad de inmunotoxinas se encuentran en fase de estudio¹⁶, actualmente ya se han desarrollado una serie de ellas con capacidad antitumoral *in vitro* y en modelos animales, como anticuerpos contra la subunidad p55 del receptor de IL2, receptor de transferrina, carbohidratos, factor de crecimiento epidérmico y algunas proteínas de células cancerígenas.

Un ejemplo de fusión entre toxina y anticuerpo monoclonal lo constituye la exotoxina A de la *Pseudomonas aeruginosa*, en la que se sustituye el dominio I de la bacteria, encargado de la unión celular, por un fragmento scFv¹⁶. De esta manera, se une la especificidad del fragmento de anticuerpo junto con los dominios II y III de la exotoxina A, encargados de la translocación proteica dentro de la célula y la ribosilación del ADP, respectivamente.

Otro ejemplo de estas moléculas lo constituye la ricina, toxina vegetal obtenida de las semillas de *Ricinus communis*, que interviene con el proceso celular de síntesis proteica, provocando, por consiguiente, la muerte de la célula.

Entre las limitaciones⁴⁴ de esta técnica se encuentra el elevado coste de producción y la posible reacción sistémica frente a la toxina. Los ensayos de toxicidad realizados en modelos animales suponen un gasto económico alto y los resultados no siempre se pueden extrapolar a su uso en seres humanos.

Como posibles aplicaciones de estos elementos se encuentran: linfoma Hodgkin, linfomas B y T no-Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, tumor cerebro-espinal metastásico, cáncer de pulmón, leucemia linfoblástica aguda, cáncer de mama y mesotelioma.

Conjugados de anticuerpos monoclonales y enzimas

Esta estrategia se denomina **ADEPT** (*Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy*) y se basa en la fusión de anticuerpos monoclonales a enzimas activadores de toxinas o fármacos. La técnica se basa en la administración sistémica de una pre-toxina o un profármaco y la posterior inoculación de la molécula de fusión. De esta manera,

mediante el reconocimiento específico del tejido diana por el anticuerpo monoclonal, se transporta el enzima conversor al lugar donde ya habrá llegado la pre-toxina o el profármaco y se produce su transformación en principios activos. Así, se consigue una acción terapéutica local, evitando los efectos a nivel sistémico.

Esta técnica resuelve el problema de efectividad que presentan algunos fármacos, ya que, en ocasiones, estos no son tan efectivos a nivel orgánico como muestran en su estudio *in vitro*, lo que generalmente es debido a que no alcanzan una concentración óptima en la zona diana donde tienen que actuar. Cuando el aumento de dosis farmacológica no es una opción debido al riesgo de toxicidad, la ADEPT es una buena alternativa.

También se puede realizar la fusión de un **profármaco** junto con un enzima conversor a un mismo anticuerpo monoclonal. En todo caso, este anticuerpo debe ser muy específico para el antígeno de la célula diana, estable ante condiciones fisiológicas y fácilmente depurable de la sangre¹⁶.

Conjugados de anticuerpos monoclonales y radioisótopos

La aplicación más clara para este tipo de conjugados es el tratamiento de neoplasias, puesto que, de esta manera, se consigue transportar la dosis necesaria del elemento radiactivo al tejido diana reduciendo el tiempo de circulación y la eventual radiación de tejidos sanos. Los isótopos más utilizados son el Itrio 90 y el Yodo 131⁵⁸. Además de estos, también se utilizan el Lutecio 177, Renio 188, Cobre 67, Astato 211, Bismuto 213, Yodo 125 e Indio 111.

Los fragmentos de anticuerpos monoclonales más utilizados para la construcción de estas moléculas de fusión son los scFv y los Fab, ya que muestran menor tiempo de permanencia en sangre y, por tanto, evitan la radiación continua de tejidos sistémicos. Por este mismo motivo, su eliminación renal es más rápida y, por consiguiente, su actividad terapéutica es menor que si se utilizaran anticuerpos monoclonales completos⁴⁴.

Como posibles aplicaciones de estos elementos se encuentran: leucemia mieloide aguda, linfoma B no-Hodgkin, tumores CD20 positivos y otros linfomas.

Anticuerpos bi-específicos

Los anticuerpos biespecíficos son moléculas de inmunoglobulinas construidas mediante técnicas de ingeniería genética en las que se combinan dos sitios de unión al antígeno con especificidades diferentes. Se han diseñado este tipo de anticuerpos destinados a dirigir toxinas, radionúclidos, enzimas, antígenos, citoquinas y fármacos citotóxicos frente a células tumorales⁴⁴. Existe otro tipo de anticuerpos biespecíficos diseñados para reconocer un antígeno tumoral sobre-expresado y una molécula efectora del sistema inmune, siendo de entre estas últimas las más utilizadas las del complejo TCR/CD3 del linfocito T y los receptores de la región Fc (CD16, CD64 y CD89) para el reclutamiento y activación de otras células como NK, macrófagos y neutrófilos^{59,60}.

Hoy en día, el tipo de anticuerpo biespecífico más utilizado es el derivado del fragmento Fv⁶¹.

Inmunocitoquinas

Las citoquinas son péptidos sintetizados por células del sistema inmune para la regulación de la respuesta inmunológica, puesto que inducen el reclutamiento y activación linfocitaria y de macrófagos, como se ha explicado en el apartado de introducción a la inmunoterapia.

De entre inmunocitoquinas como TNF-alfa, interferón-gamma y el factor GM-CSF, la más estudiada respecto a la generación de proteínas de fusión está siendo la IL-2⁴⁴, que estimula la activación y reclutamiento de linfocitos T, células NK y macrófagos en las células tumorales.

El TNF-alfa también posee propiedades antitumorales, pero su uso a nivel sistémico se encuentra limitado por su toxicidad. Su uso como proteína de fusión con un anticuerpo monoclonal muestra índices terapéuticos no alcanzables administrando la molécula sin conjugar⁵⁷.

Existe otro tipo de inmunocitoquina, denominado factor de crecimiento hematopoyético, que no se utiliza como inmunoterapia, pero sí para contrarrestar los efectos del tratamiento quimioterápico. Su importancia reside en que todas las células sanguíneas se producen en la médula ósea roja del hueso a partir de células madre hematopoyéticas; y, debido a que los agentes quimioterápicos cumplen su acción frente a células en proceso de proliferación, ni las células madre hematopoyéticas ni las células en desarrollo evitan sufrir este efecto, lo que conlleva a una pancitopenia con todos los síntomas físicos que ésta implica: sangrado excesivo, inmunodepresión, anemia...

USOS EN MEDICINA

Desde la aprobación por parte de la FDA del primer anticuerpo monoclonal terapéutico en 1986, los avances tecnológicos en metodología de producción y las modificaciones estructurales de los mismos han llevado a estas moléculas a convertirse en agentes terapéuticos de segunda y tercera línea en un amplio abanico de patologías. A medida que pasa el tiempo, se van descubriendo nuevas aplicaciones para los anticuerpos monoclonales, como las que se nombran en el ANEXO I y TABLA 5; pero, sin duda, su aplicación más importante es la terapia anticancerígena, donde se utilizan junto a la quimioterapia y radioterapia para incrementar su efecto.

INMUNOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER

Existen varias técnicas en este ámbito: inmunoterapias no específicas que utilizan citoquinas, vacunas anticancerígenas que estimulan el ataque del sistema inmune mediante la inoculación directa de antígenos tumorales, e inmunoterapias con anticuerpos monoclonales y sus derivados, que son el motivo de este trabajo.

Los anticuerpos monoclonales constituyen la denominada terapia biológica dirigida, que tiene como objetivo el refuerzo general del sistema inmunitario, por ejemplo, incrementando la actividad de células presentadoras de antígeno a través del uso de un coadyuvante, o acentuando la respuesta inmunitaria frente a tumores utilizando citoquinas como interferones o factores de necrosis tumoral⁶².

También son capaces de estimular la respuesta inmune mediante la unión a receptores de las células constituyentes del sistema inmune e inhibiendo las señales que impiden a estas células atacar a tejidos propios del organismo, lo que incluiría a las células cancerígenas. Otro mecanismo de acción de los anticuerpos monoclonales consiste en la interferencia de los mismos con las proteínas necesarias para el crecimiento tumoral, de manera que se modifican el ambiente donde se encuentra el tumor haciéndolo no viable.

Además de los mencionados anteriormente, existe un objetivo adicional de la inmunoterapia anticancerígena que se basa en superar la capacidad de evasión de las células tumorales a la respuesta inmune dirigiendo el tratamiento antitumoral contra un antígeno concreto, aprovechando la especificidad antigénica de los anticuerpos monoclonales. Actualmente, como diana de este tipo de anticuerpos monoclonales se toma alguna proteína sobre-expresada por las células cancerígenas. Pero, en este caso, surge el problema de citotoxicidad en células sanas, puesto que otras células tisulares del organismo, aunque en menor medida, también expresan el antígeno proteico o alguno con estructura similar. Así que, como posible solución, se sopesa la posibilidad de generar anticuerpos monoclonales contra proteínas expresadas por las células cancerígenas únicamente en respuesta al tratamiento quimioterápico, como ocurre, por ejemplo, en el caso del cáncer de colon. Cuando se pauta el tratamiento quimioterápico con *irinotecan*, un fármaco inhibidor de la topoisomerasa, se induce la producción por parte de las células tumorales de una gran cantidad de nuevas proteínas en la superficie celular¹⁶.

Debido a que el linfocito T es la célula efectora fundamental en la respuesta inmune contra el cáncer, era de esperar que surgiera una técnica que combinara las propiedades de especificidad antigénica de los anticuerpos monoclonales con la función citolítica de las células T. Pero antes de la aparición de este modelo de inmunoterapia biológica, aparecieron métodos alternativos para la modificación de la especificidad antigénica de los linfocitos T o de sus receptores.

Antes de introducirse en las técnicas mencionadas, es importante conocer algunos aspectos importantes sobre los linfocitos T. Como se ha mencionado anteriormente, estas células juegan un papel esencial en la función de la inmunidad celular y tienen diversas funciones como reguladoras, colaboradoras o citotóxicas¹⁶. A grandes rasgos, diferencian de los linfocitos B en que poseen el receptor de célula T (RCT), que, al contrario que las inmunoglobulinas, se encuentra anclado a la superficie celular y no se secreta al medio extracelular. Este receptor únicamente reconoce el antígeno cuando es presentado formando un complejo con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presentes en las células presentadoras de antígeno, que serán de tipo I en caso de los linfocitos T CD8 (citotóxicos) o de tipo II en el caso de los linfocitos T CD4 (colaboradores).

El receptor de linfocitos T¹⁶ es un heterodímero compuesto por dos cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes disulfuro. Las combinaciones de cadenas pueden ser alfa (α) y beta (β) o gamma (γ) y delta (δ), siendo las cadenas α y γ muy parecidas genéticamente a las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas (sólo tienen regiones genómicas para V y J), y las cadenas β y δ muy parecidas las cadenas pesadas (poseen genes para V, D y J).

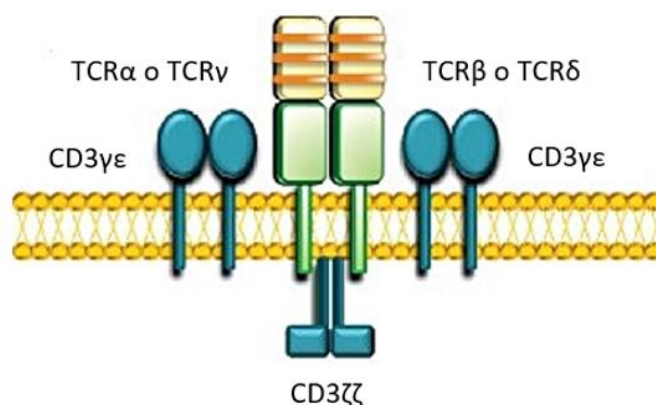


Figura 15. Estructura básica de un receptor de linfocitos T. Imagen⁶³ obtenida en www.elsevier.es.

Para que se produzca la activación del linfocito T, es necesaria la sinapsis inmunológica, es decir, la interacción entre el linfocito T y la célula presentadora de antígeno. Una vez que el TCR reconoce el antígeno presentado por la molécula MHC, se produce una primera señal de activación mediada por la molécula CD3. Posteriormente, es necesaria una segunda señal activadora mediada, en este caso, por la unión entre la molécula CD28 (presente en el linfocito T) y la molécula B7 (presente en la célula presentadora de antígeno). Así, una vez activados, los linfocitos T llevarán a cabo su función inmunológica como colaboradores o como citotóxicos.

Un ejemplo las técnicas que utilizan linfocitos T como terapia anticancerígena es la **transferencia adoptiva celular**. Previamente al desarrollo de esta técnica, se sopesó la posibilidad de que algunos pacientes no obtenían el estímulo antigénico necesario por parte del tumor para desencadenar la respuesta celular citotóxica del sistema inmune mediada por linfocitos T. Por eso, se fomentó el uso de una serie de técnicas que produjeran la muerte de las células neoplásicas y la consiguiente liberación de antígenos que atraerían con mayor intensidad a los linfocitos T. Entre los mecanismos que se utilizaron, se encuentran la radioterapia o las vacunas anticancerígenas, con las que se inocular directamente el antígeno tumoral en el paciente con el fin de incrementar la respuesta inmunitaria.

En el caso de la técnica de transferencia adoptiva celular, el primer paso se basa en identificar las células T que han invadido el tumor y aislar aquellas con una mayor afinidad por el antígeno de sus células. Este tipo de linfocitos T constituyen un grupo minoritario de los mismos denominado linfocitos infiltrantes de tumor (TILs). Posteriormente, se cultivan esos linfocitos junto con IL-2 con el fin de obtener grandes cantidades de los mismos y reintroducirlos en el paciente; así, se consigue un número mucho mayor que en condiciones naturales de linfocitos T activados y con alta afinidad antigénica. Para evitar una reacción adversa grave, el paciente ha de ser inmunosuprimido previamente a la inoculación de los linfocitos T. Este tipo de terapia se encuentra en estudio para el tratamiento de diversos tipos de neoplasias como el melanoma, nefrocarcinoma o el cáncer de ovario⁶⁴, mostrando resultados favorables pero limitados por el hecho que los TILs no pueden ser aislados del tumor en el 100% de los pacientes.

Como variante de la técnica anterior, se encuentra la **reorientación de linfocitos T**. Esta técnica se basa en la premisa de que la especificidad antigénica de los linfocitos T puede ser manipulada genéticamente y redirigida concretamente hacia los antígenos expresados en la superficie celular tumoral. En concreto, la técnica se basa en conseguir que estas células expresen un TCR modificado o un receptor antigénico quimérico en los que se ha aumentado la afinidad por el antígeno.

Las terapias basadas en la **modificación genética del TCR** alteran genéticamente las subunidades catenarias α y β del receptor de linfocitos T, encargadas del proceso de reconocimiento antigénico⁶⁵. Para su modificación, es necesario detectar secuencias diana del TCR en linfocitos T reactivos al tumor o, en caso de no ser posible, mediante el uso de tecnologías que generen antígenos hiperactivos del tumor que induzcan la respuesta de células T. Posteriormente, las cadenas son aisladas y clonadas en vectores de transducción de linfocitos T, y, como resultado de la introducción del material genético modificado en el linfocito, se generan células T específicas y con una afinidad mayor para un antígeno tumoral concreto.

Respecto a la construcción de **receptores antigénicos quiméricos (CARs)**, se busca combinar el tipo de reconocimiento que realizan las inmunoglobulinas con la función efectora de los linfocitos T⁶⁵. Por eso, estos receptores están constituidos por una región de unión al antígeno, generalmente derivada de un anticuerpo monoclonal, un dominio

transmembrana para el anclaje del receptor, y una o más vías de señalización intracelular, que serán las encargadas de la función efectora de las células T.

La especificidad del CAR se suele determinar mediante un scFv, que está unido por una región flexible a una vía de señalización intracelular, generalmente formado por el correceptor CD3⁶⁵. Así, la activación de la célula T se produce tras la unión de los ligandos CD28, OX40 (un receptor del factor de necrosis tumoral) o CD40L, siendo éstas las moléculas que generan una respuesta inmunológica mayor y más duradera. Pero, en ocasiones, las células neoplásicas no expresan este tipo de ligandos, por lo que se lleva al organismo a un estado de anergia (ausencia de respuesta antigénica) y a un fracaso de la expansión sistémica de los linfocitos T. Por este motivo, se desarrollaron los CAR de segunda generación, que incluyen vías de señalización intracelular dependientes de moléculas como CD28 o CD137 y que, por tanto, abarcan una mayor capacidad para el reconocimiento de ligandos. Como tercer paso en el desarrollo de estos linfocitos T CAR, se han modificado los receptores antigénicos quiméricos de manera que incluyan más de una molécula intracelular coestimuladora.

Una vez realizadas las modificaciones genéticas en el receptor, estos linfocitos son también cultivados y posteriormente inoculados nuevamente en el paciente una vez esté inmunodeprimido. Así, el CAR los orienta hacia el tejido neoplásico y permite la acción citotóxica en las células que expresen el antígeno concreto para el que es específico, por lo que se consigue la muerte selectiva del tejido tumoral respetándose el tejido sano.

Como ventaja frente a los TCR modificados se presenta que, en el momento del reconocimiento antigénico, los CAR no necesitan que la molécula sea procesada y presentada en MHC.

Esta terapia inicialmente se estudió para el tratamiento del melanoma metastásico, pero actualmente se está ampliando al tratamiento de otros tumores, tanto sólidos como hematológicos⁶⁶. Ya se ha demostrado el éxito de esta terapia en el tratamiento de tumores hematológicos con células que expresan el CD19⁶⁸, pero su aplicación en tumores sólidos es mucho más controvertida, puesto que los linfocitos T no sólo atacan a las células que expresan el antígeno en cuestión, sino que también pueden actuar sobre células sanas que expresen proteínas similares y, por tanto, generar un daño tisular que puede llevar a la muerte del paciente. Por esto, empresas como Inmuno-Core comenzaron a desarrollar estrategias de detección de posibles antígenos tumorales en células de tejido sano⁶⁷.

Por tanto, el desarrollo actual de esta técnica se está centrando en detectar antígenos tumorales que sólo se expresen en células del tejido neoplásico, orientándose principalmente hacia el tratamiento del melanoma y el cáncer renal, debido a su buena respuesta a inmunoterápicos en fases iniciales de ensayos clínicos, así como por su buen reconocimiento por parte del sistema inmune⁶⁷.

Por otra parte, se han desarrollado los fármacos denominados **inhibidores del punto de control**. Estos fármacos son derivados de anticuerpos que se encargan de solventar uno de los métodos de evasión del sistema inmune que han desarrollado las células

cancerígenas: la expresión de proteínas de células sanas. Mediante este método, los linfocitos T reconocen las células neoplásicas como propias y no desencadenan su respuesta frente a ellas. Los fármacos inhibidores del punto de control bloquean estas proteínas o receptores de las mismas presentes en los linfocitos T, de manera que al no ser reconocidas como propias, los linfocitos T provocan su muerte. Las proteínas que han sido estudiadas para este tipo de terapia han sido PD-1 y CTLA-4. La proteína PD-1 es un receptor inhibidor de la respuesta inmune mediada por células T, que se activa mediante la unión al ligando PD-1L presente en las células del organismo, incluidas las células tumorales. La proteína CTLA-4 es otro receptor presente en las células T que provoca la inhibición de la función de los mismos cuando se produce la interacción entre la molécula linfocítica CD28 y la molécula B7 de la célula presentadora de antígeno.

La FDA ya ha aprobado tres fármacos inhibidores de ambos receptores⁶⁹: ipilimumab (Yervoy[®], inhibidor CTLA-4), pembrolizumab (Keytruda[®], inhibidor PD-1/PD-L1) y nivolumab (Opdivo[®], inhibidor PD-1/PD-L1). Todos estos fármacos han demostrado ser útiles en el tratamiento del melanoma⁷⁰; además, los inhibidores del PD-1/PD-L1 han demostrado también eficacia en el cáncer de pulmón no microcítico y están mostrando buenos resultados en otro tipo de neoplasias como en nefrocarcinoma o en cáncer colorrectal⁷¹. Diversos estudios están investigando la posible asociación de estos fármacos, con el objetivo de actuar al mismo tiempo frente a CTLA-4 y PD-1; de hecho, la asociación de nivolumab e ipilimumab ya ha mostrado una eficacia mayor que la monoterapia en el tratamiento del melanoma⁶⁴.

A pesar de ser, probablemente, la más importante, la inmunoterapia contra el cáncer no es la única aplicación terapéutica de los anticuerpos monoclonales. Cada vez aparecen nuevas y más novedosas posibles aplicaciones para los mismos, como, por ejemplo:

ANTICUERPOS ANTI-ÉBOLA

Debido a la gran epidemia mundial que se sufrió entre 2014 y 2015, cabía esperar que la terapia biológica se desarrollara como medio para combatir la infección por el virus del Ébola (EBOV). Una serie de estudios^{72,73} han demostrado que el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la glicoproteína de superficie del EBOV puede proteger a roedores y primates de su infección. La primera evidencia al respecto surgió al demostrarse que la inyección de anticuerpos provenientes de un macaco superviviente a la infección por el virus del Ébola producía protección frente al mismo tras ser administrada en otros primates no humanos dos días después de que se produjera la infección⁷⁴.

Existen numerosas vacunas y tratamientos antivíricos en fase experimental para combatir la infección por el virus del Ébola⁵⁶, pero no son motivo de este trabajo. Respecto a los tratamientos biológicos que se han desarrollado frente a la infección, dos de los más estudiados contra la infección por el EBOV han sido el ZMab y el MB-003, ambos compuestos por un cóctel de tres anticuerpos monoclonales. Todos los

componentes de estos tratamientos fueron obtenidos a partir de ratones inmunizados y tanto el uno como el otro mostraron cierta eficacia contra el EBOV en ratones, cerdos de guinea y primates no humanos⁶⁴. Posteriormente, se desarrolló un nuevo cóctel de anticuerpos monoclonales que combina dos de los componentes del ZMab y uno de los componentes de MB-003, denominado ZMapp. Gracias a la optimización de sus componentes y a su mayor potencia terapéutica, el ZMapp es capaz de revertir los síntomas de la infección por el virus del Ébola en macacos cuando es administrado como tarde cinco días después de la exposición⁶⁴.

Este fármaco fue inicialmente probado en humanos en la epidemia de Ébola que asoló el este de África en 2014. Se está realizando un estudio aleatorio para comprobar la eficacia del fármaco, pero los resultados aún no han sido publicados. Lo que sí se ha publicado es que el tratamiento con ZMapp fue utilizado en dos individuos africanos infectados por el virus del Ébola y se consiguió la recuperación de ambos⁷⁵. Aun así, la administración del mismo tratamiento a dos profesionales sanitarios fracasó y no sobrevivieron⁷⁶.

A pesar de la importancia de este fármaco, aún no se ha determinado el mecanismo de acción mediante el cual produce la inhibición de las glicoproteínas de superficie virales, ni siquiera cómo se produce la unión a las mismas⁷⁴. Pero un aspecto esperanzador respecto al ZMapp es su posibilidad de obtención mediante técnicas de ingeniería genética en vegetales, concretamente, en planta del tabaco (*Nicotiana benthamiana*), que ha mostrado la capacidad de producir proteínas terapéuticas bajo condiciones rigurosamente controladas⁵⁶. La mayor ventaja que se presenta en esta técnica, como se ha mencionado anteriormente, es la gran velocidad de producción y la posibilidad de producción en masa.

Para el proceso de obtención, inicialmente se lleva a cabo la plantación de plantas de tabaco durante 6 semanas bajo condiciones muy controladas. Al mismo tiempo, se inmunizan cepas de ratones con una cepa de virus de la estomatitis vesicular en el que se ha reemplazado su glicoproteína de superficie por la del virus del Ébola. De esta manera, se podrán obtener en el suero del ratón inmunoglobulinas frente al EBOV.

A partir de esas inmunoglobulinas, y mediante las técnicas mencionadas en el apartado “Desarrollo actual de la técnica” se obtienen anticuerpos monoclonales IgG humanos frente al EBOV, cuya información genética es transferida mediante técnicas de agroinfiltración a las plantas de tabaco inicialmente cultivadas. Así, las plantas comienzan a llevar a cabo la expresión de anticuerpos monoclonales humanos anti-Ébola, proceso que necesita alrededor de 4 días para producir una cantidad suficiente de los mismos. Finalmente, los anticuerpos monoclonales son aislados y purificados⁵⁶.

ANTICUERPOS ANTIPOBESIDAD

La obesidad se ha convertido en la epidemia del siglo XXI, y, como en el caso anterior, las terapias biológicas podrían jugar un papel importante a la hora de combatirla.

La enzima que mayormente se ha implicado en este proceso ha sido la ghrelina, cuyos niveles aumentan durante los periodos de ayuno, y se encarga de estimular la ingesta e impedir la pérdida de peso durante un tiempo prolongado. Debido a esto, se cree que, reduciendo los niveles de esta enzima en sangre, se reduciría necesidad de ingesta calórica y se estimularía la pérdida de peso en la persona.

La ghrelina es acetilada con serina 3 mediante el ácido n-octanóico para actuar como péptido activo, por lo que se busca obtener anticuerpos monoclonales capaces de separar ambos fragmentos y evitar por tanto que este enzima se vuelva funcional. Para ello, se probó a unir químicamente numerosos análogos de ghrelina a hemocianina de lapa y se inocularon en ratones. La hemocianina de lapa es un polipéptido que se suele utilizar como transportador inerte de anticuerpos, puesto que contiene una gran cantidad de residuos de lisina en su superficie que permiten la unión de numerosos haptenos (porción de la molécula antigénica que no es capaz de desencadenar la respuesta inmune).

Los ratones tratados se convirtieron en una gran fuente de anticuerpos monoclonales que producían la división del ácido n-octanóico y la ghrelina, convirtiendo, por tanto, ésta última en un enzima carente de actividad biológica¹⁶.

Aunque este trabajo se encuentra en fases muy precoces de estudio, se prevé que la técnica será, en un futuro, efectiva como estrategia terapéutica.

Como método aún más novedoso en el tratamiento de la obesidad, se ha propuesto el uso de los linfocitos T CARs mencionados para el tratamiento contra el cáncer como medio para la destrucción permanente de adipocitos⁷⁷. Los antígenos celulares que se tomarían como diana en este caso son el AD3 y el receptor huérfano 1 análogo de la tirosina kinasa 1 (ROR). Siguiendo esta línea, también se ha propuesto el uso de la técnica de terapia adoptiva celular o la infusión de anticuerpos monoclonales o sus derivados de manera simultánea a los linfocitos T con el fin de eliminar los adipocitos de los depósitos de grasa⁷⁷.

ANTICUERPOS CONTRA EL VIH

El mecanismo de acción de los fármacos antirretrovirales consiste en la interferencia con el ciclo de vida del VIH. A pesar de la eficacia de este tratamiento en la disminución de la mortalidad de los enfermos de SIDA, los fármacos antirretrovirales no eliminan la infección por el VIH, sino que la cronifican y con el tiempo aparecen resistencias a los mismos.

Recientemente, se ha publicado un estudio (Schoofs *et al*⁷⁸) en el que se demuestra la eficacia de un anticuerpo monoclonal (3BNC117) en la disminución de la carga viral en pacientes infectados por el VIH-1. Este anticuerpo monoclonal está dirigido frente a la cubierta proteica del virus y no sólo impide la infección de nuevas células por parte del mismo, sino que también acelera el proceso de eliminación de células ya infectadas. Es

más, los autores han demostrado que el tratamiento con este anticuerpo monoclonal incrementa la respuesta del sistema inmune de la persona infectada frente al virus.

Así, se ha concluido que la inmunoterapia pasiva con este anticuerpo monoclonal acelera la eliminación del VIH-1 de las células infectadas del organismo.

ANTICUERPOS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria articular en cuyo desarrollo toman parte principalmente el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina 6 (IL-6), por lo que el tratamiento biológico de la enfermedad se basa en atacar ambos elementos⁷⁹.

Hasta hace unos años, la artritis reumatoide era considerada una enfermedad benigna y su tratamiento básicamente era antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), corticoides y, como último recurso, inmunosupresores, los denominados fármacos modificadores de la enfermedad (FARMEs). Posteriormente, al demostrarse la agresividad de la enfermedad, así como un aumento de la mortalidad al padecerla, se invirtió la línea de tratamiento, considerando los FARMEs de primera línea. Además, diferentes ensayos clínicos han demostrado que el uso de terapia biológica en asociación con estos FARMEs puede detener la enfermedad e incluso llevar al paciente a la remisión⁸⁰.

LA terapia biológica para la artritis reumatoide incluye los siguientes fármacos: infliximab, adalimumab, certolizumab pegol y etanercept, así como tocilizumab, el anticuerpo anti-receptor de la IL-6 humanizado. Aunque los tratamientos biológicos hayan demostrado una efectividad mayor que los sintéticos, se han reportado casos de pacientes en los que han fallado como respuesta primaria y secundaria⁷⁹.

Debido a que la AR es una enfermedad muy heterogénea en la que el TNF-alfa y la IL-6 juegan papeles muy diferentes, pero cuyos efectos se solapan, son necesarios más estudios para determinar el mejor uso de los inhibidores del TNF y tocilizumab⁷⁹.

ASPECTOS ECONÓMICOS Y SOCIALES

Desde su descubrimiento, las aplicaciones terapéuticas constituyen -junto con el diagnóstico- el campo más importante de los anticuerpos monoclonales. Tal éxito ha tenido en este ámbito, que su uso se ha extendido a muchos otros campos tales como:

- Investigación biomédica, la identificación y clonación de genes, la identificación y aislamiento de proteínas, la activación de enzimas, y el estudio de la estructura molecular y morfogénesis.
- Técnicas diagnósticas: detección de hormonas, vitaminas, citocinas; monitorización de drogas; detección de microorganismos infecciosos en microbiología; detección de alérgenos en casos de alergia; detección de diversos marcadores tumorales y de daño miocárdico; diversas aplicaciones forenses.
- Biosensores: Los anticuerpos monoclonales acoplados a transductores que pueden detectar tanto moléculas orgánicas como inorgánicas como contaminantes metálicos en alimentos y agua, detección de sustancias tóxicas, elementos traza, etc.

Uno de los grandes problemas que se plantean en el uso de anticuerpos monoclonales como agentes terapéuticos es su cada vez más frecuente falta de reproducibilidad⁸¹, es decir, plantean grandes limitaciones a la hora de obtener exactamente los mismos resultados utilizando el métodos empleados anteriormente, lo que también implica con cierta frecuencia una escasa reproducibilidad en los resultados de los experimentos biomédicos en los que se utilizan.

Los investigadores no suelen poner en duda los materiales de diagnóstico que adquieren de los diferentes proveedores para realizar sus experimentos, esta circunstancia resulta particularmente delicada y crítica en el caso de monoclonales, debido a que su propiedad más valorada, su alta especificidad, reside en elementos estructurales muy inestables y por ello fácilmente alterables por causas diversas. Este inconveniente no se limita sólo al ámbito de su aplicación como reactivo, sino que repercute tanto en el económico como en el social, ya que se invierten una gran cantidad de tiempo y dinero, así como miles pacientes, en la realización de un amplio estudio cuyos resultados se basan principalmente en la especificidad del anticuerpo monoclonal en estudio. Como posible solución de esta situación, se plantea que los investigadores deberían cerciorarse que el anticuerpo monoclonal que van a utilizar para su estudio ha sido probado en un uso y tejido particulares, y no sólo bajo condiciones ideales. El problema es que las compañías proveedoras ponen, con frecuencia, trabas a esta demanda al no proporcionar los datos necesarios para la comprobación del mismo y, en el caso de que los datos necesarios sean accesibles, la competitividad que existe entre compañías deja en manos del investigador el poder comprobar este aspecto. .

Pero no es cuestión de culpar a las compañías proveedoras de anticuerpos monoclonales, ya que los investigadores buscan vías rápidas de obtención de los

mismos, dejando que en muchas ocasiones prime la rapidez de llegada del material frente a la calidad del mismo.

Este problema se ha vuelto tan conocido que se han puesto a disposición del público una serie de páginas web donde se proporciona tanto información concreta sobre los anticuerpos monoclonales como opiniones y experiencias personales de los investigadores con los mismos^{82,83,84,85}.

El problema más relevante desde el punto de vista sanitario respecto al uso de anticuerpos monoclonales, es la determinación por parte del sistema de salud sobre cuáles costear y cuáles no. Pese a su gran eficacia en el tratamiento de enfermedades incluso terminales, no se puede determinar durante cuánto tiempo prolongarán la vida del paciente y si es así, qué grado de sufrimiento tendrá que soportar. Por lo tanto, “la incorporación de los nuevos tratamientos plantea situaciones muy difíciles que no deberían recaer ni sobre el médico ni sobre el gestor hospitalario. Un organismo superior debería evaluar cada fármaco y decidir en qué casos está justificado y cómo ha de administrarse” (Xavier Carné, Jefe de Farmacología del Hospital Clínico de Barcelona)⁸⁶.

Por otra parte, y siguiendo esta misma línea, en el uso de terapias biológicas aparece el inconveniente de que cuando los fármacos se retiran, la enfermedad con frecuencia reaparece. Así, con el uso de estas terapias se produce la cronificación de enfermedades tales como el cáncer, lo que conlleva un gasto anual mayor a la hora de financiar tratamientos⁸⁶.

En ambos casos es necesario valorar el coste que supone el tratamiento en el momento actual frente al ahorro económico que le supondrá al sistema sanitario en un futuro el hecho de haber remitido o cronificado la enfermedad en cada paciente⁸⁶.

Pero los problemas que presentan los anticuerpos monoclonales no se limitan al aspecto económico. Existen además una serie de problemas éticos respecto a su mecanismo de producción. Por una parte, no sólo se utilizan animales como biorreactores de producción de estos fármacos, sino que se les inducen neoplasias y enfermedades, y son sometidos a diversos procesos que, como se ha mencionado anteriormente, se ha demostrado que les provoca malestar, dolor y estrés³⁹.

Otro dilema ético, aparece que una vez obtenidos los anticuerpos monoclonales y pasadas las fases I, II y III de ensayo clínico, estos han de ser probados en humanos, lo que supone un riesgo que, en teoría, los voluntarios conocen. El problema surge cuando aparecen reacciones adversas graves como el fallo multiorgánico que puede llevar al paciente a la muerte y, entonces, ¿dónde se buscan los culpables?

Los problemas éticos incluso se han extendido hasta el ámbito de la ingeniería vegetal. Como ya se ha mencionado, para obtener anticuerpos monoclonales mediante estas técnicas, es necesaria la generación de plantas transgénicas. Al igual que ocurre con las plantas transgénicas generadas para el consumo, se ha determinado la posibilidad de que éstas supongan un riesgo medioambiental, puesto que pueden difundir los genes que les han sido introducidos a otras plantas, al ambiente donde se encuentran o a

insectos que entren en contacto con ellas, con lo que, en un futuro, podrían aparecer nuevas enfermedades a las que enfrentarse⁸⁷.

ANEXO I

NOMBRE	DIANA	TIPO	Año	INDICACIONES TERAPÉUTICAS
Muromonab-CD3	CD3	IgG2a murínico	1986	Rechazo post-trasplante
Abciximab	GPIIb/IIIa	Quimérico IgG1 Fab	1994	Prevención de coágulos en angioplastia de alto riesgo
Rituximab	CD20	IgG1 quimérico	1997	Linfoma No-Hodking Leucemia linfocítica crónica Artritis reumatoide
Daclizumab	CD25 (cadena del receptor IL2)	IgG1 humanizada	1997	Rechazo post-trasplante
Basiliximab	CD25 (cadena del receptor IL2)	IgG1 quimérico	1998	Rechazo post-trasplante
Infliximab	TNF α *	IgG1 quimérico	1998	Enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa Artritis reumatoide Espondilitis anquilosante Artritis psoriásica Psoriasis en placa
Etanercept	TNF*	Receptor de p75 TNF ligado a la Fc de IgG1	1998	Artritis reumatoide Enfermedad de Crohn Espondilitis anquilosante Artritis psoriásica Artritis idiopática juvenil
Palivizumab	Proteína F del virus respiratorio sincitial	IgG1 humanizada	1998	Virus Respiratorio Sincitial
Trastuzumab	HER-2	IgG1 humanizada	1998	Cáncer de mama Adenocarcinoma metastásico gástrico o de la unión gastroesofágica
Gemtuzumab ozogamicin	CD33	IgG4 humanizada conjugada con toxina	2000	Leucemia mieloide aguda
Adalimumab	TNF α *	IgG1 humana	2001	Artritis reumatoide Artritis idiopática juvenil Artritis psoriásica Espondilitis anquilosante Enfermedad de Crohn Psoriasis en placa
Alemtuzumab	CD52	IgG1 humanizada	2001	Leucemia linfocítica crónica de células B

Ibritumomab tiuxetan	CD20	Murina IgG1 radiomarcada	2002	Linfoma no Hodgkin
Efalizumab	CD11a	IgG1 humanizada	2003	Psoriasis
Omalizumab	IgE	IgG1 humanizada	2003	Asma
Tositumomab Iodina-131 tositumomab	CD20	IgG2a murínico	2003	Linfoma no Hodgkin
Bevacizumab	VEGF*	IgG1 humanizada	2004	Cáncer colorectal metastásico Cáncer no microcítico de pulmón Cáncer de mama metastásico Glioblastoma multiforme Cáncer metastásico de células renales
Cetuximab	EGFR*	IgG1 quimérico	2004	Cáncer de cabeza y cuello Cáncer colorrectal
Natalizumab	Integrina α -4	IgG4 humanizada	2004	Recidiva de esclerosis múltiple Enfermedad de Crohn
Catumaxomab	CD3, EpCAM	Mab humanizado	2005	Cáncer de cabeza y cuello
Panitumumab	EGFR*	IgG2 humana	2006	Carcinoma colorectal metastásico
Ranibizumab	VEGF-A*	Fragmento Fab de IgG1 humanizada	2006	Degeneración macular asociada a la edad (neovascular) Oclusión de venas retinianas secundaria a edema macular
Eculizumab	Factor C5 del complemento	IgG2/4 humanizada	2007	Hemoglobinuria paroxística nocturna
Certolizumab pegol	TNF α *	Fragmento Fab de IgG humanizada	2008	Enfermedad de Crohn Artritis reumatoide
Canakinumab	IL-1 β	IgG1 humana	2009	Síndromes periódicos asociados a criopirina (síndrome autoinflamatorio familiar inducido por frío y síndrome de Muckle-Wells)
Golimumab	TNF α *	IgG1 humana	2009	Artritis reumatoide Artritis psoriásica Espandilitis anquilosante
Ofatumumab	CD20	IgG1 humana	2009	Leucemia linfocítica crónica
Ustekinumab	IL-12 / IL-23	IgG1 humana	2009	Psoriasis en placa
Tocilizumab	Receptor de IL-6	IgG1 humanizada	2010	Artritis reumatoide

Denosumab	RANK-L	IgG2 humana	2010	Osteoporosis
Belimumab	BLyS	IgG1 humana	2011	Lupus Eritematoso Sistémico
Brentuximab	CD30 (conjugado de Mab y MMAE)	IgG1 quimérico (conjugado con fármaco)	2011	Linfoma Hodgkin Linfoma anaplásico de células grandes
Denosumab	RANK-L	IgG2 humana	2011	Prevención de eventos esqueléticos en metástasis óseas de tumores sólidos
Ipilimumab	CTLA-4	IgG1 humana	2011	Melanoma
Pertuzumab	HER2	IgG1 humanizada	2012	Cáncer de mama
Raxibacumab	Antígeno protector de <i>Bacillus anthracis</i>	IgG1 humana	2012	Prevención y tratamiento del antrax inhalatorio
Obinutuzumab	CD20	IgG1 humanizada	2013	Leucemia linfocítica crónica
Trastuzumab emtansine	HER2	IgG1 humanizada (conjugado con fármaco)	2013	Cáncer de mama
Necitumumab	Receptor EGF*	IgG1 recombinante humano	2015	Cáncer de pulmón no microcítico
Nivolumab	Receptor PD-1	IgG4 humana	2015	Cáncer de pulmón no microcítico Melanoma
Pembrolizumab	Receptor PD-1	Humanizado	2015	Melanoma
Ramucirumab	Receptor 2 de VEGF*	IgG1 humano	2015	Cáncer gástrico
Daratumumab	CD38	IgG1 humano	2015	Mieloma múltiple
Elotuzumab	CD319 (SLAMF7)	IgG1 humanizado	2015	Mieloma múltiple
Blinatumomab	CD19, CD3	Ratón	2015	Leucemia linfoblástica aguda
Dinutuximab	GD2	Quimérico	2015	Neuroblastoma
Obiltoxaximab	<i>Bacillus anthracis</i>	Quimérico	2016	Exposición al antrax
Ixekizumab	IL-17 ligando	IgG4 humanizado	2016	Psoriasis Artritis psoriásica
Secukinumab	IL-17 ligando	IgG 1 humano	2016	Psoriasis en placa
Reslizumab	IL-5	IgG4 humanizado	2016	Asma severa

Anticuerpos monoclonales terapéuticos aprobados por la FDA; diana, tipo, año, procedencia e indicaciones. Tabla modificada de la original: www.actip.org¹³.

**MMAE (monometil austatina E, agente antineoplásico), PD-1 (proteína de muerte celular programada), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), EGFR (receptor de factor de crecimiento endotelial).*

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al tutor de este trabajo de fin de grado, Manuel I. González-Carreró, el tiempo invertido tanto en la organización como en las múltiples correcciones del mismo. También agradecerle toda la información que me ha proporcionado a lo largo de este año, su manera de dirigir la realización de este documento y su flexibilidad a la hora de adaptarse a mis horarios.

BIBLIOGRAFÍA

1. *Manual de Inmunología de la academia de preparación al examen MIR*: CTO. 2016
2. *Immunoglobulin Structure*:
www.ebioscience.com/knowledge-center/antigen/immunoglobulin/structure.htm
3. P. J. Delves, S. J. Martin, D. R. Burton, I. M. Roitt. *Roitt inmunología: fundamentos*. 11^ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2008.
4. http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lec/8_9defenses/9_host_defense2b_L.htm
5. *Organización y expresión de los genes de las inmunoglobulinas*:
<http://www.unav.es/ocw/genetica/tema3-4.html>
6. *Anticuerpos monoclonales de primera y segunda generación. Aplicaciones biomédicas*: http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_2673.pdf
7. *Immune diversity*: <http://biosiva.50webs.org/immunediversity.htm>
8. N. P. Machado, G. A. Tellez and J. C. Castano. *Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas*. *Infect* 2006 [online].10 (3): 186-197.
9. M. Villanueva Meyer, MD. *GALENUS: Revista para los médicos de Puerto Rico*; 2006. 37: 40-42.
10. T. A. Waldmann. *Inmunotherapy: past, present and future*. *Nature Medicine*; March 2003. 9 (3); 277: 269-275.
11. *Inmunoterapia*: <http://www.inmunoterapia.cl/inmunoterapia.htm>
12. C. M. Hammers and J. R. Stanley. *Antibody Phage Display: Technique and Applications*. *J Invest Dermatol*; 2014. 134(2): e17.
13. *Monoclonal antibodies approved by the EMA and FDA for therapeutic use (status 2013)*: <http://www.actip.org/products/monoclonal-antibodies-approved-by-the-ema-and-fda-for-therapeutic-use>
14. *mAbs to watch in 2016*: <http://www.biopharminternational.com/mabs-watch-2016>
15. *European medicines agency's antibody priority medicines*:
<http://www.antibodysociety.org>
16. B. R. Glick, T. L. Delovitch and C. L. Patten. *Medical Biotechnology*. 6^ª ed WASHINGTON DC: ASM PRESS, 2016.
17. J. Kaur, D. K. Badyal, P. P. Khosia. *Monoclonal Antibodies: Pharmacological Relevance*. *Indian Journal of Pharmacology*; 2007. 39(1): 5-14.
18. *Antibody Drug Conjugates (ADCs) a new type of compound that potentially cures end-stage terminal patients*; 2014 [digital]. Disponible en: www.pvanuden.com.
19. *General policies for monoclonal antibodies*:
<http://www.who.int/medicines/services/inn/Generalpoliciesformonoclonalantibodies2009.pdf>
20. A. L. Nelson. *Antibody fragments; hope and hype*. *PMC*; 2010; 2(1): 77-83.
21. R. E. Bird, K.D. Hardman, J.W. Jacobson, S. Johnson, B.M. Kaufman, S.M. Lee, T. Lee, S.H. Pope, G.S. Riordan y M. Whitlow. *Single-chain antigen binding proteins*. *Science*; 1988. 242: 423-6.
22. D. Luo, N. Mah, M. Krantz, D. Wishart, F. Jacobs, and L. Martin. *High level secretion of single-chain antibody in Pichia expression system*. *Biotechnol. Techn.*; 1997. 11: 759-61.

23. L.G.J. Frenken, J.G.M. Hessing, C.A.M.J.J. Van den Hondel y C.T. Verrips. *Recent advances in the large-scale production of antibody fragments using lower eukaryotic microorganisms.* Res. Immunol.; 1998. 149: 589-99.
24. Holvoet, P. Laroche, H.R. Lijnen, R. Van Cauwenberge, E. Demarsin, E. Brouwers, G. Matthyssens y D. Collen. *Characterization of a chimeric plasminogen activator consisting of a single chain Fv fragment derived from a fibrin fragment D-dimer-specific antibody and a truncated single chain urokinase.* J. Biol. Chem.; 1991. 266: 19717-24.
25. Rode, H.J., M. Little, P. Fuchs, H. Dorsam, H. Schooltink, C. de Ines, S. Dubel y F. Breiling. *Cell surface display of a single-chain antibody for attaching polypeptides.* BioTechniques; 1996. 21: 652-9.
26. P. Holliger, G. Winter. *Diabodies: small bispecific antibody fragments.* Cancer Immunol. Immunother; 1997. 45: 128-30.
27. Hudson, P.J. *Recombinant antibody fragments.* Curr. Opin. Biotechnol.; 1998. 9: 395-402.
28. A. A. Kortt, M. Lah, G.W. Oddie, L.C. Gruen, J.E. Burns, L.A. Pearce, J.A. Atwell, A.J. McCoy, G.J. Howlett, D.W. Metzger, R.G. Webster y P.J. Hudson. *Single chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five and ten residue linkers form dimers and with zero residue linker a trimer.* Protein Eng.; 1997. 10: 423-33.
29. C. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E.B. Songa, N. Bendahman y R. Hamers. *Naturally occurring antibodies devoid of light chains.* Nature; 1993. 363: 446-8.
30. V. K. Nguyen, R. Hamers, L. Wyns y S. Muyldermans. *Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire CH1 domain of the functional camel IgG2A heavy-chain antibodies.* Mol. Immunol.; 1999. 36: 515-24.
31. A. Lalatsa, D. M. Leite. *Single-Domain Antibodies for Brain Targeting.* BioPharm International; 2014. 27 (8).
32. *Diagnostics discovery laboratory. Monoclonal antibodies.*
<http://medicine.nevada.edu/ddl/technology/monoclonal-antibodies>
33. *National Research Council (US) Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies. MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION. Washington (DC): National Academies Press (US). 1999.*
34. L. Álvarez-Vallina. *ANTICUERPOS MONOCLONALES, realidades y expectativas.* Editorial complutense 1; España, 2014.
35. Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. *BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR.* 5ª ed. Editorial Médica Panamericana, 2005.
36. *Recombinant DNA technology:* <http://www.slideshare.net/shrutuav/cloning-2429661>
37. *Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies:*
<http://circ.ahajournals.org/content/127/22/2222/F3.expansion.html>
38. L. DeFrancesco. *Transgenic Mice That Produce Fully Humanized Antibodies- Abgenix Granted Patent.* Bioprocess online. 1999.

39. Australia. National Health and Medical Research Council. *Guidelines for Monoclonal Antibody Production*; 2008.
40. J. McCafferty, A. D. Griffiths, G. Winter, D. J. Chiswell. *Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains*. *Nature*; 1990. 348(6301), 552-554.
41. M. M. Echko and S. K. Dozier. Ph.D. *Recombinant antibody technology for the production of antibodies without the use of animals*. AltTox.org (online); 2010.
42. S. J. et al. *Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis*. *The FASEB Journal*; 2005. 19: 331-341.
43. C. A. Janeway et al. *Inmunobiología. El Sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. Ed. Masson. 2000.
44. Genoma España. *Anticuerpos monoclonales terapéuticos. Informe de vigilancia tecnológica*; 2007.
45. C. Zahnd, P. Amstutz, A. Plückthun. *Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target*. *Nat Methods*, 2007. 4 (3): 269-79.
46. R. Fischer, R. M. Twyman, S. Schillberg. *Production of antibodies in plants and their use for global health*. *Vaccine* 21, Elsevier; 2003. 820-825.
47. D. J. García. *PLANTAS COMO FÁBRICAS DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES HUMANAS*. UNIVERSIDAD LIBRE - SECCIONAL PEREIRA, 2010.
48. DEQIANG YU, B.E., MBA. *APPLICATION OF MEMBRANE CHROMATOGRAPHY IN BIOPROCESSING*. McMaster University; 2009.
49. *Anticuerpos monoclonales y policlonales. Producción y purificación. Aplicaciones:* <http://ucmfarmaciadatos.netai.net/segundo/Inmunologia/fity/19.pdf>
50. M. Mayani, C. D.M. Filipe, M. D. McLean, J. C. Hall, R. Ghosh. *Purification of transgenic tobacco-derived recombinant human monoclonal antibody*. *Biochemical Engineering Journal*, 2013. 72:33-41.
51. X. Zeng, E. Ruckenstein. *Membrane Chromatography: Preparation and applications to protein separation*. *Biotechnol. Prog.*; 1999. 15: 1003-1019.
52. K. Ko, R. Brodzik and Z. Steplewski. *Production of Antibodies in Plants: Approaches and Perspectives*. *Curr Top Microbiol Immunol.*; 2009. 332: 55-78.
53. S. Hendy, Z. C. Chen, H. Barker, S. Santa Cruz, S. Chapman, L. Torrance, et al. *Rapid production of single-chain Fv fragments in plants using a potato virus X episomal vector*. *J Immunol Methods*; 1999. 231(1/2):137-46.
54. T. Verch, V. Yusibov, H. Koprowski. *Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector*. *J Immunol Methods*; 1998. 220(1/2):69-75.
55. G. Moussavou, K. Ko, J. H. Lee, Y. K. Choo. *Production of Monoclonal Antibodies in Plants for Cancer Immunotherapy*. *Biomed Research International*; 2015. 9.
56. Ala Ahmadi Fard. *Ebola hemorrhagic fever: outbreaks, modeling, and vaccine development*. Kansas State University, 2016.
57. Mc Carron, P. A. et al. *Antibody Conjugates and Therapeutic Strategies*. *Mol Interv*; 2005. 5 (6); 368-380.
58. Fundación COTEC para la innovación tecnológica. *Biotecnología en la medicina del futuro*. 2006.

59. Y. M. Deo, K. Sundarapandiyam, T. Keler, P. K. Wallace, R. F. Graziano. Bispecific molecules directed to the Fc receptor for IgA (Fc alpha RI, CD89) and tumor antigens efficiently promote cell-mediated cytotoxicity of tumor targets in whole blood. *J Immunol*; 1998. 160: 1677-86.
60. L. Sanz, B. Blanco, L. Álvarez-Vallina. Antibodies and gene therapy: teaching old 'magic bullets' new tricks. *Trends Immunol*; 2004. 25:85-91.
61. F. Le Gall, U. Reusch, M. Little, S. M. Kipriyanov. Effect of linker sequences between the antibody variable domains on the formation, stability and biological activity of a bispecific tandem diabody. *Protein Eng Des Sel*; 2004. 17:357-66.
62. R. A. Goldsby, T. J. Kindt, B. A. Osborne, J. Kuby. *INMUNOLOGÍA DE KUBY*. 6ª ed. México: McGrawHill; 2007.
63. A. García-Mariscal, B. del Blanco, C. Hernández-Munain. Generación de diversidad de los receptores de antígeno en linfocitos: validación del «modelo de accesibilidad» en el control de la recombinación V(D)J. *Inmunología*; 2013 [online]. 32 (2).
64. What's new in cancer immunotherapy research? American cancer society. July 27 2015.
65. M. Sharpe and N. Mount. Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Disease Models and Mechanisms* 8; 2015. 337-350.
66. Biological therapies for cancer. National Cancer Institute; 2016.
67. S. J. Russell, K. W. Peng, J. C. Bell. Oncolytic virotherapy. *Nature Biotechnology*; 2012. 30 (7): 658-670.
68. H. Ledford. The Killer Within. *Nature*; 2014. 508; 24-26.
69. U.S. food and drug administration: <http://www.fda.gov/>
70. J. A. Sosman. Immunotherapy of advanced melanoma with immune checkpoint inhibition. *UpToDate* [online]; 2016. Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/immunotherapy-of-advanced-melanoma-with-immune-checkpoint-inhibition>
71. Immune checkpoint to treat cancer. American cancer society; 2015.
72. J. Petitt, L. Zeitlin, D. H. Kim, C. Working, J. C. Johnson, O. Bohorov, B. Bratcher, E. Hiatt, S. D. Hume, A. K. Johnson, J. Morton, M. H. Pauly, K. J. Whaley, M. F. Ingram, A. Zovanyi, M. Heinrich, A. Piper, J. Zelko, G. G. Olinger. Therapeutic Intervention of Ebola Virus Infection in Rhesus Macaques with the MB-003 Monoclonal Antibody Cocktail. *Science Translational Medicine*; 2013. 5 (199).
73. X. Qiu, G. Wong, L. Fernando, J. Audet, A. Bello, J. Strong, J. B. Alimonti, G. P. Kobinger. mAbs and Ad-Vectored IFN-α Therapy Rescue Ebola-Infected Nonhuman Primates When Administered After the Detection of Viremia and Symptoms. *Science Translational Medicine*; 2013. 5 (207).
74. E. Davidson, C. Bryan, R. H. Fong, T. Barnes, J. M. Pfaff, M. Mabila, J. B. Rucker, and B. J. Doranz. Mechanism of Binding to Ebola Virus Glycoprotein by the ZMapp, ZMAb and MB-003 Cocktail Antibodies. *J Virol*. 2015. 89 (21): 10982–10992.
75. G. M. Lyon, A. K. Mehta, J. B. Varkey, K. Brantly, L. Plyler, A. K. McElroy, C. S. Kraft, J. S. Towner, C. Spiropoulou, U. Ströher, T. M. Uyeki, and B. S. Ribner. Clinical care of two patients with Ebola Virus Disease in the United States. *New England Journal of Medicine*; 2014. 371:2402-2409.

76. T. W Geisbert. *Medical research: Ebola therapy protects severely ill monkeys*. Nature; 2014 [online].
77. Ridell, S. R. Hudecek, M. Rader. *METHOD FOR THE TREATMENT OF OBESITY*. Driving it forward [online]; 2016. Disponible en:
<http://www.freepatentsonline.com/y2016/0095883.html>
78. Ching-Lan Lu, et al. *Enhanced clearance of HIV-1–infected cells by broadly neutralizing antibodies against HIV-1 in vivo*. Science; 2016. 352 (6288): 1001-1004.
79. T. Tanaka, Y. Hishitani, A.Ogata. *Monoclonal antibodies in rheumatoid arthritis: comparative effectiveness of tocilizumab with tumor necrosis factor inhibitors*. Biologics; 2014. 8: 141-153.
80. G. N. Amay Sánchez. *Comparación de la eficacia terapéutica entre Infliximab, Adalimumab y Etanercept, en el tratamiento de la artritis reumatoidea en el IESS de Loja*. Universidad nacional de Loja, Ecuador. 2015.
81. M. Baker. *BLAME IT ON THE ANTIBODIES*. Nature; 2015. 251; 274-276.
82. Base de datos de anticuerpos monoclonales: Antibodypedia.com
83. Base de datos de anticuerpos monoclonales: antibodies-online.com
84. Base de datos de anticuerpos monoclonales: antibodyregistry.org
85. Base de datos de anticuerpos monoclonales: pabmabs.com/wordpress
86. M. Pérez Oliva. *Fármacos a precio de oro, solo si funcionan*. El País; 2013. 22:01
87. M. L. Sarricolea Erasquin, M. P. García-Noblejas Ferrer. *BIOTECNOLOGÍA: APLICACIONES Y PROBLEMAS ETICOS*. Biblioteca Católica Digital [online]. Disponible en: <http://www.mercaba.org/FICHAS/bioetica/biotecnologia.htm>

Material visual online:

TECNOLOGÍA HIBRIDOMA:

<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/monoclonalantibodies.html>

PCR: <https://www.youtube.com/watch?v=kvQWKcMdyS4>

PCR RT: <https://www.youtube.com/watch?v=HdK-Fe6wnm8>