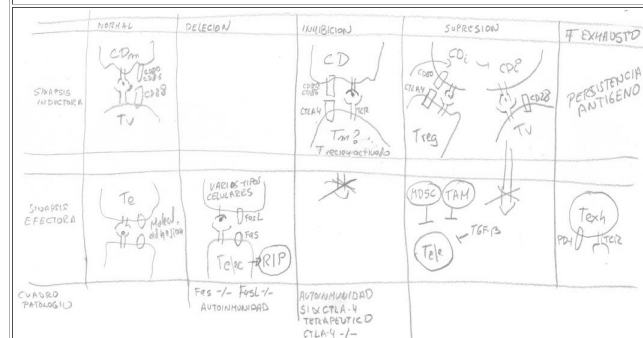


**TEMA 18. TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR E INMUNOESTIMULADOR.**

- Mecanismos de **tolerancia periférica**.
- No siempre la **Tolerancia central (Timo o médula ósea)** consigue eliminar todos los timocitos autorreactivos, convirtiéndose algunos de ellos en linfocitos T vírgenes. Estos linfocitos T vírgenes NO se convierten en efectores por un mecanismo de **Ignorancia** y de **anergia**. En ocasiones este control puede fallar y se generan linfocitos T autorreactivos efectores. Estos linfocitos autorreactivos también pueden ser **INHIBIDOS O ELIMINADOS**, mediante mecanismos que se despiertan cuando el antígeno NO PUEDE ELIMINARSE (antígeno propio). Si un microorganismo hace una infección crónica a veces los linfocitos T anti-microorganismo también se inactivan por los mismos procesos.
  - IMPEDIR ACTIVACIÓN LINFOCITOS T VÍRGENES AUTORREACTIVOS**
    - Ignorancia.** Hay una barrera anatómica (barrera hemato encefálica y otras en hojo, testículo, etc) que impide reconocimiento de antígeno por linfocitos T efectores y anticuerpos. Si se rompe se puede producir autoinmunidad por llegada antígeno a ganglio y llegada de efectores a tejido.
    - Anergia.** En alguna imagen no se representa el fenómeno de **Anergia**, en donde linfocitos T vírgenes pueden reconocer antígenos propios o no-propios (alimentos, polen, etc) no presentes en timo con alta afinidad sobre células que NO sean células dendríticas inmaduras.
  - INHIBIR FUNCIÓN DE LINFOCITO T EFECTOR AUTORREACTIVO.** Estos mecanismos juegan un papel en el control de una respuesta inmune, probablemente para evitar una respuesta inmune excesiva.
    - Delección.** Además de selección negativa, que ocurre en timocitos en timo o en precursores B en médula ósea, existe una **delección de linfocitos T efectores**. Este mecanismo de muerte por activación tiene importancia en tolerancia, dado que el sistema inmune intenta tolerar todos los antígenos que permanecen en el tiempo. Las células T autorreactivas pueden expresar **Fas** (al no poder eliminar el auto-antígeno) y mueren. Una prueba de la existencia de este mecanismo es el **desarrollo de cuadros autoinmunes en ratones deficientes en Fas o Fas-L**.
    - Inhibición/Extenuación:** Un cuadro muy semejante al anterior, pero donde no se produce la muerte del linfocito T efector, sino que entra en un estado baja respuesta funcional, que expresa moléculas co-inhibidoras como CTL-4 o PD1. De nuevo existen modelos animal donde el déficit de CTLA-4 o PD-1 induce un cuadro autoinmune.
    - Supresión.** A diferencia de los anteriores la supresión se hace por productos secretados por linfocitos Treg, tales como TGF-beta o IL-10, que inhiben la función de linfocitos T efectores, y probablemente también de células dendríticas.
    - Polarización** a respuestas T de baja capacidad inflamatoria. Aunque no hay un acuerdo, la polarización de linfocitos T autorreactivos hacia Th2 parece tener un efecto anti-inflamatorio.
    - Senescencia:** Parada irreversible del ciclo celular ligada al acortamiento de telómeros.



Además de la selección negativa en timo (Tolerancia central) existe una tolerancia periférica a autoantígenos (pMHC) en la que juegan un papel diferentes mecanismos. Cuando alguno de ellos falla se puede producir autoinmunidad

**AUTOINMUNIDAD.** En ocasiones estos mecanismos de tolerancia central o periférica fallan y se produce un cuadro de autoinmunidad, en donde se generan células plasmáticas o linfocitos T efectores que reconocen componentes propios.

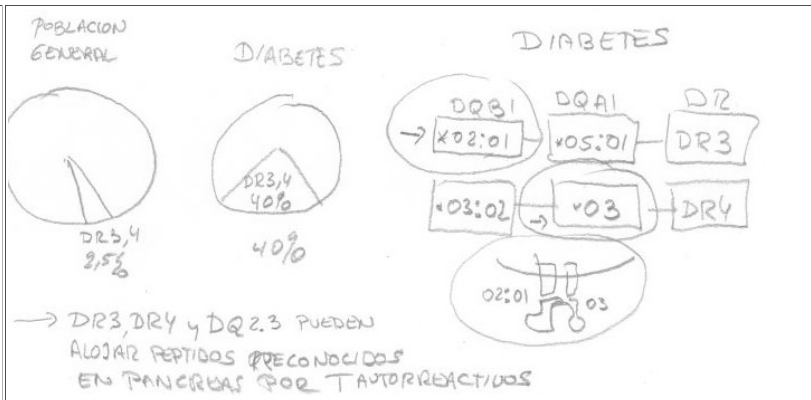
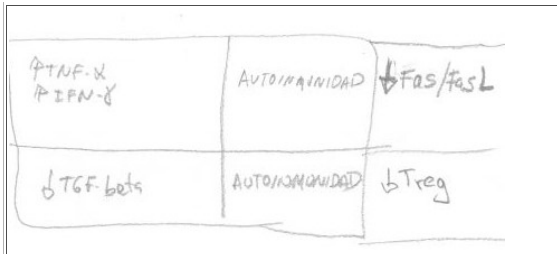
- Autoanticuerpos.** Se denominan autoanticuerpos a anticuerpos presentes en sangre o tejidos que reconocen moléculas propias. Un ejemplo serían anticuerpos anti-DNA, anti-transglutaminasa, anti-receptor de TSH, etc. Estos anticuerpos pueden formar **inmunocomplejos** si el antígeno está en **sangre o inflamación en los tejidos** en donde ese autoantígeno se exprese. Los antígenos propios reconocidos por autoanticuerpos y que forman inmunocomplejos que pueden provocar vasculitis sorprendentemente pueden ser **intracelulares**. Por el contrario los anticuerpos que reconocen estructuras en tejidos suelen reconocer estructuras de membrana (por ejemplo receptor de TSH o el receptor de acetilcolina)
  - Se considera que **existen numerosos linfocitos B autorreactivos**, dado que la tolerancia central de linfocitos B es mucho menos sofisticada y efectiva que la de linfocitos T en timo. Sin embargo estos linfocitos B autorreactivos **NO** se diferencian a células plasmáticas dado que no reciben cooperación T de linfocitos T autorreactivos (seleccionados negativamente en timo o que han sufrido tolerancia periférica). La generación de autoanticuerpos se realiza
    - Cuando se activan linfocitos T autorreactivos
    - Cuando reciben cooperación de linfocitos T que reconocen estructuras no propias (ver generación autoanticuerpos frente a transglutaminasa a glicolípidos presentes en eritrocitos en infecciones por micoplasma).
  - Los linfocitos T autorreactivos reconocen complejos pMHC en donde el péptido es propio. Pueden ser linfocitos CD4+ o CD8+. Se ha demostrado la importancia de estos linfocitos T autorreactivos en ciertas enfermedades autoinmunes, como por ejemplo **esclerosis múltiple** o **artritis reumatoide**.
  - Los linfocitos T CD4+ autorreactivos juegan un papel muy importante en la secreción de autoanticuerpos, dado que los antígenos propios reconocidos NO son de alta organización. A veces estos autoanticuerpos **no juegan papel en la patología, mientras que otras veces sí**.

	Pérdida de moléculas co-inhibidoras (tolerancia periférica)	Alteración de moléculas implicadas en apoptosis (tolerancia periférica)	Pérdida de Treg (tolerancia periférica)	Pérdida de expresión de antígenos periféricos en células epiteliales tímicas (tolerancia central)
Desarrollo autoinmunidad por ruptura tolerancia periférica o central	<a href="#">Pérdida CTLA-4</a> Pérdida PD-1	<a href="#">Pérdida de Fas o de Fas-L</a> Sobre expresión de bcl2 (anti-apoptótica)	<a href="#">Pérdida de FoxP3.</a>	<a href="#">Pérdida de AIRE</a>

Ensayos experimentales que muestran como existe anergia in vivo y como puede **revertirse**, lo que puede explicar desarrollo de autoinmunidad y abre campos de intervención terapéutica

A veces en los cuadros de autoinmunidad juega un papel relevante la producción de autoanticuerpos, que se pueden formar por cooperación T:B en donde un linfocito B autorreactivo recibe cooperación de linfocitos T NO autorreactivos. En el cuadro inferior se describen dos casos de cooperación T:B en donde los linfocitos T cooperadores reconocen estructuras no propias (gluten o micoplasma), cooperando con linfocitos B autorreactivos.

	Complejo antigénico reconocido por linfocito B	Localización de Epitopo reconocido relevante	Especificidad antigénica de linfocito B que endocita vacuna conjugada	Proteína de la que proviene el péptido del complejo pMHC-II presentado a linfocitos Tfh	Especificidad antigénica de linfocito Tfh	Consecuencias
<a href="#">Gluten-transglutaminasa (Gluten-TG)</a>	Gluten-TG	Transglutaminasa (Ag propio en donde hay B autorreactivas pero no T-autorreactivas)	Transglutaminasa (propio)	Gluten (no propio)	Gluten	Auto-anticuerpos anti-transglutaminasa.
<a href="#">Micoplasma-glicolípido</a>	Micoplasma-glicolípido (lo arranca de la membrana)	Glicolípido (Ag propio en donde hay B autorreactivas)	Glicolípido (propio)	Proteínas del micoplasma	Anti-micoplasma. Contra proteínas del micoplasma que generen péptidos capaces de enclavarse en alelos MHC-II del paciente infectado por micoplasma.	Auto-anticuerpos contra glicolípidos presentes en la membrana del eritrocito. Anemia hemolítica.



La activación de linfocitos T autorreactivos conducen a la **SOBREEXPRESIÓN** de Interleucinas PROINFLAMATORIAS. En a Tabla superior se describen las enfermedades autoinmunes asociadas a un aumento de expresión de ciertas interleucinas.

Por otra parte también aparecen cuadros autoinmunes como **DISMINUYE** la expresión de interleucinas antiinflamatorias, como TGF-beta que en enfermedades autoinmunes puede ocurrir en situaciones en donde no se produzcan T reguladores.

Muchos de estos cuadros autoinmunes se asocian a **ciertos alelos HLA**. La justificación de este hecho puede radicar en la posibilidad de expresar **complejos pMHC propios inmunogénicos**. Esta preferencia de ciertos alelos por unir un determinado péptido propio modificado (citruación) o sin modificar probablemente es responsable de la asociación de ciertas enfermedades autoinmunes a la presencia de ciertos alelos MHC. La protección se puede deber a la imposibilidad de presentar esos péptidos propios contra los que se despierta una respuesta T en ciertos individuos

A veces la asociación no es fácil. En este caso, los pacientes que expresan DQ2 y DQ8 pueden generar una nueva molécula MHC-II compuesta por la cadena beta DQB1\*02:01 con la cadena alfa DQA\*03, aunque estén en haplotipos diferentes. Normalmente eso no ocurre porque no es fácil que una a una a una cadena alfa de DQ. Si lo hacen las que están en el mismo haplotipo porque se ha seleccionado ese par de cadenas (alelos) ya que se unen bien entre ellos. Sorprendentemente este nuevo alelo DQ se asocia a diabetes más fuertemente que en pacientes que solo expresan DQ2 o D o sólo expresan DQ8.

Alelos asociados a diabetes: DR3,4  
Alelos protectores: DR2,x, siendo x aleos diferentes de DR3 o DR4. Ahora DR2 se denomina DR15 o DR16. es una figura un poco envejecida....

En esta figura se especula con los posibles auto-antígenos que pueden presentarse en ciertos alelos MHC asociados a una mayor frecuencia de aparición de cuadros autoinmunes.

HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DP	HLA-DM and HLA-DO
Serology	Serology	Serology	Serology
α-Chain	α-Chain	α-Chain	α-Chain
DR	DQ	DP	DM
DRB1	DQB1	DPB1	DMB
DRB2	DQB2	DPB2	DMB*
DRB3	DQB3	DPB3	DMB*
DRB4	DQB4	DPB4	DMB*
DRB5	DQB5	DPB5	DMB*
DRB6	DQB6	DPB6	DMB*
DRB7	DQB7	DPB7	DMB*
DRB8	DQB8	DPB8	DMB*
DRB9	DQB9	DPB9	DMB*
DRB10	DQB10	DPB10	DMB*
DRB11	DQB11	DPB11	DMB*
DRB12	DQB12	DPB12	DMB*
DRB13	DQB13	DPB13	DMB*
DRB14	DQB14	DPB14	DMB*
DRB15	DQB15	DPB15	DMB*
DRB16	DQB16	DPB16	DMB*
DRB17	DQB17	DPB17	DMB*
DRB18	DQB18	DPB18	DMB*
DRB19	DQB19	DPB19	DMB*
DRB20	DQB20	DPB20	DMB*
DRB21	DQB21	DPB21	DMB*
DRB22	DQB22	DPB22	DMB*
DRB23	DQB23	DPB23	DMB*
DRB24	DQB24	DPB24	DMB*
DRB25	DQB25	DPB25	DMB*

# Tipaje molecular

Ejemplos de tipaje molecular de los alelos del paciente A25 y DR 11:

- HLA-A\*2505
- DRA\*0102;
- DRB1\*1102

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
Serology	Alleles	Serology	Alleles	Serology	Alleles
A1	A*0101-0124	B7	B*0702-0758	Cw1	Cw*0102-0118
A2	A*0201-0299	B8	B*0801-0833	Cw2	Cw*0202-0218
A3	A*0301-0329	B13	B*1301-1318	Cw3	Cw*0302-0340
A11	A*1101-1130	B14	B*1401-1407N	Cw4	Cw*0401-0427
A23(9)	A*2301-2315	B15	B*1501-1599	Cw5	Cw*0501-0516
A24(9)	A*2402-2476	B18	B*1801-1826	Cw6	Cw*0602-0615N
A25(10)	A*2501-2506	B27	B*2701-2737	Cw7	Cw*0701-0748
A26(10)	A*2601-2634	B35	B*3501-3575	Cw8	Cw*0801-0814
A29(19)	A*2901-2916	B37	B*3701-3712	---	Cw*1202-1221
A30(19)	A*3001-3021	B39(16)	B*3901-3916	---	Cw*1402-1408
A31(19)	A*3101-3117	B39(16)	B*3901-3941	---	Cw*1502-1520
A32(19)	A*3201-3215	B40	B*4001-4075	---	Cw*1601-1609
A33(19)	A*3301-3310	B41	B*4101-4108	---	Cw*1701-1704
A34(10)	A*3401-3408	B42	B*4201-4209	---	Cw*1801-1803
A36	A*3601-3604	B44(12)	B*4402-4453	---	---
A43	A*4301	B45(12)	B*4501-4507	---	---
A66	A*6601-6606	B46	B*4601-4610	---	---
A68(28)	A*6801-6838	B47	B*4701-4705	---	---
A69(28)	A*6901	B48	B*4801-4816	---	---
A*74(19)	A*7401-7412	B49(21)	B*4901-4905	---	---
	A*8001	B50(21)	B*5001-5004	---	---

Esta hipótesis (preferencia de unión a péptidos inmunogénicos) de ciertos alelos MHC ha sido observada en Enfermedad celíaca, en donde ciertos **péptidos de gluten** se unen preferentemente a ciertos alelos MHC-II, DQ2 (DQ2.5, cadena DQB1\*02 y cadena alfa DQA1\*05 que se puede formar en cis (mismo haplotipo) o en trans (cada una de las cadenas en un haplotipo diferente)) y DQ8 (en este caso no se emplea la terminología DQ3.3).

**CELIACOS**

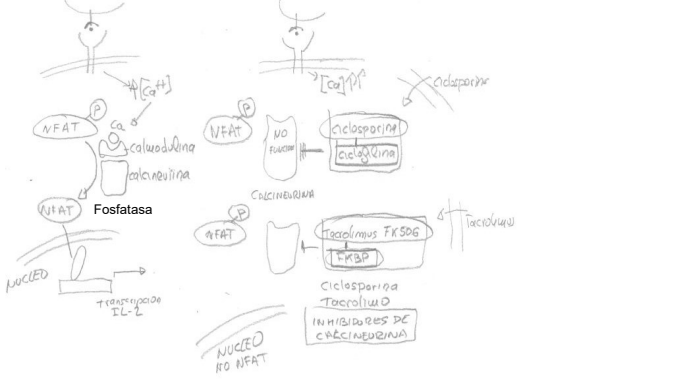
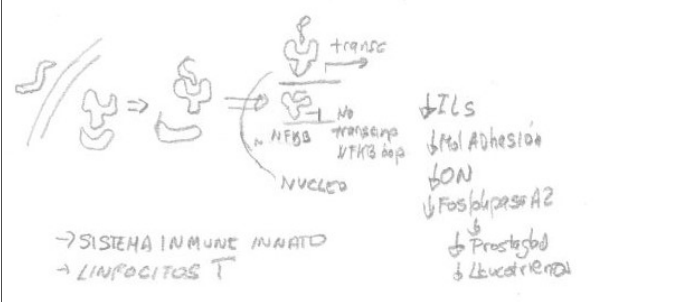
¿UNICOS ALELOS CAPACES DE UNIR PEPTIDOS GLUTEN RELEVANTES?

En esta figura se vuelve a señalar como el heterodímero DQB1:02 co DQA1\*05 se pueden formar en cis o trans y se asocia a enfermedad celíaca. Por otra parte se muestra como el alelo DQ8 (que está formado por DQB1\*03:02 con DQA1\*03) se asocia a celíaca y diabetes, pero que el heterodímero DQB1\*03:02 con DQA1\*05:01 se asocia a celíaca pero mucho más a diabetes. A este heterodímero se le sigue llamando DQ8 (DQ8.5 trans) DQ8 es un split de DQ3, y por eso la cadena beta de DQ8 se le denomina DQB1\*03:02

**TRATAMIENTOS INMUNOSUPRESORES O INMUNOESTIMULADORES**

Los fármacos anti-inflamatorios clásicos son los antiinflamatorios no esteroideos (INE o NSAID en inglés), que inhiben la producción de tromboxanos y prostaglandinas, potentes mediadores de la inflamación (el ácido acetil salicílico es uno de estos fármacos)

Existen otros fármacos con un potente efecto inmunosupresor denominados anti-inflamatorios ESTEROIDEOS. Los esteroides (<https://es.wikipedia.org/wiki/Esteroides>) forman una gran familia de la que forman parte los glucocorticoides (<https://en.wikipedia.org/wiki/Glucocorticoides>) tienen un potente efecto sobre la producción de interleucinas implicados en la inflamación sobre todo producidas por células del sistema inmune innato. También se ha descrito que inhiben la proliferación de linfocitos T y B, e incluso en ciertas circunstancias pueden favorecer su muerte por apoptosis (por ejemplo timocitos)



**Modo de acción de los esteroides.** Son moléculas que atraviesan la membrana celular, y que tras su unión a receptores citosólicos, inducen la modificación de la transcripción genómica. Hay elementos de respuesta a esteroides en el DNA (transactivación). Por otra parte puede Transreprimir la expresión de un gen bien uniéndose a un elemento regulador e impidiendo que un factor de transcripción se una o interactuando directamente con el factor de transcripción (como NFkB) e impidiendo su efecto favorecedor de la transcripción. La administración de glucocorticoides aumenta la transcripción de proteínas antiinflamatorias e inhibe la transcripción de las proinflamatorias.

**Modo de acción de los inhibidores de calcineurina (Ciclosporina y tacrólimo)**

Las señales transmitidas por el receptor de linfocitos T son muy complejas, pero juega un papel muy importante el aumento del calcio intracelular y con ello la activación de una Fosfatasa dependiente de calcio denominada Calcineurina. Esta fosfatasa defosforila un factor de transcripción denominado NFAT que juega un papel muy importante en la transcripción de genes necesarios para la proliferación y ganancia de función o ejecución de funciones efectoras por linfocitos T.

Los inhibidores de calcineurina (tacrólimo o ciclosporina) se unen a proteínas citosólicas permitiéndolas unirse ahora a calcineurina e IMPEDIR su función fosfatasa, con lo que NFAT permanece fosforilado y secuestrado en citoplasma

NFkB tiene una función proinflamatoria tanto de células del sistema inmune innato como específico. En este gráfico se aprecia como NFkB que junto con otros factores de transcripción (NFAT) regula genes implicados en la proliferación y ganancia de función efectora por parte de linfocitos T.

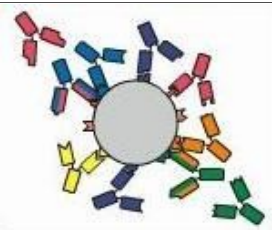
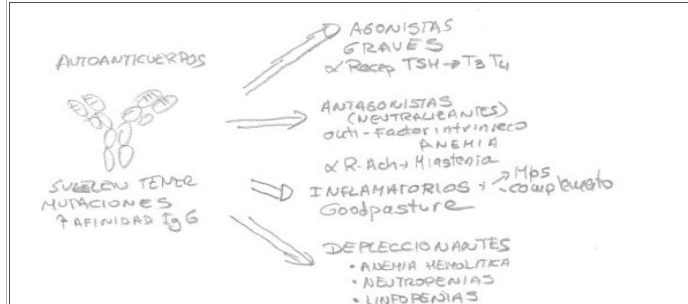
Tacrólimo se une a la proteína citoplásmica FKBP12, y el complejo tacrólimo:FKBP inhibe la acción enzimática de la calcineurina. Ciclosporina también inhibe la acción enzimática de la calcineurina pero lo hace formando un complejo con la proteína citoplásmica Cyclofilina-A

Existe otro fármaco inmunosupresor que se denomina Rapamicina (sírolimus). Rapamicina también se une a la proteína citosólica FKBP12 en una manera similar a tacrólimo, pero el complejo Rapamicina-FKBP12 inhibe la función de la proteína mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) al unirse a ella. La vía de señalización de mTOR es fundamental en la proliferación de linfocitos T y se despierta por ejemplo tras la interacción de IL-2 con el Receptor de IL-2 presente en linfocitos T activados.

	Alteración de células del Sistema Inmune Innato	Alteración de células del Sistema Inmune Específico.	Mecanismo de acción.
Anti-neoplásicos (anti-mitóticos como metotrexato o ciclofosfamida)) <b>Quimioterapia</b>	SÍ (Neutropenia que favorece infecciones por bacterias extracelulares y hongos)	Disminuye proliferación de linfocitos T vírgenes y memoria. Utilizado en autoinmunidad.	Inhibe replicación de DNA o mitosis
<b>Corticosteroides (esteroides)</b> Por ejemplo Dexametasona	Disminuye la secreción de interleucinas proinflamatorias por macrófagos. Disminuye la generación de prostaglandinas y leucotrienos Disminuye la extravasación de neutrófilos, monocitos y linfocitos efectores.	Inhibe la activación de linfocitos T tras su contacto con el antígeno Favorece la apoptosis de linfocitos T activados ¿Favorece la apoptosis de células plasmáticas de vida media corta?	Se une a receptores citoplásmicos después de atravesar la membrana y regula positiva o negativamente la transcripción de varios genes.
<b>Inhibidores de la calcineurina (Ciclosporina y tacrólimo).</b> No inhiben entrada de calcio sino activación calcineurina en presencia de calcio.	Inhibe la exocitosis de gránulos/vesículas (menos importante que inhibición en función de linfocitos T.	Inhibe la secreción de interleucinas por linfocitos T efectores. Indirectamente inhibe proliferación del linfocitos B (no cooperación T). ¿Apoptosis de linfocitos B activados?	Inhibe la actividad fosfatasa de la calcineurina dependiente de Calcio. Ello lo hace al unirse a proteínas implicadas en la transferencia de Calcio a un sitio activo de calcineurina. La inhibición de la calcineurina impide la defosforilación de un factor de transcripción esencial para la producción de interleucinas (NFAT), que sólo pasa a núcleo en su forma NO

			fosforilada. Con ello se inhibe la <b>activación de linfocitos T</b> . Tal vez tenga efectos adicionales sobre otras células del sistema inmune.
<b>Rapamicina</b>	Sin efectos de interés	Inhibe la transmisión de señales del receptor de IL-2, por lo que disminuye proliferación de linfocitos T y parcialmente ganancia de función efectora	Inhibe las señales transmitidas por el receptor de IL-2 (tras su unión a IL-2) impidiendo así la síntesis proteica de linfocitos T activados, su proliferación y su ganancia de función.

**MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS.** Sustancia producida con un organismo vivo o sus productos; se usa para prevenir, diagnosticar o tratar el cáncer y otras enfermedades. Entre los **medicamentos biológicos** se incluyen los anticuerpos, las interleucinas y las vacunas. También se llama producto **biológico** y sustancia **biológica**.



Tal y como hemos visto hay autoanticuerpos capaces de reconocer estructuras propias (autoantígenos). Además de activar complemento cuando se unen a la superficie de células o a proteínas de matriz extracelular, en ocasiones son capaces de cumplir otras funciones:

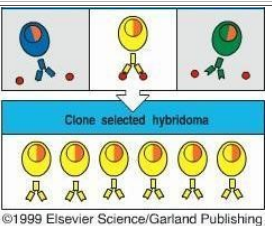
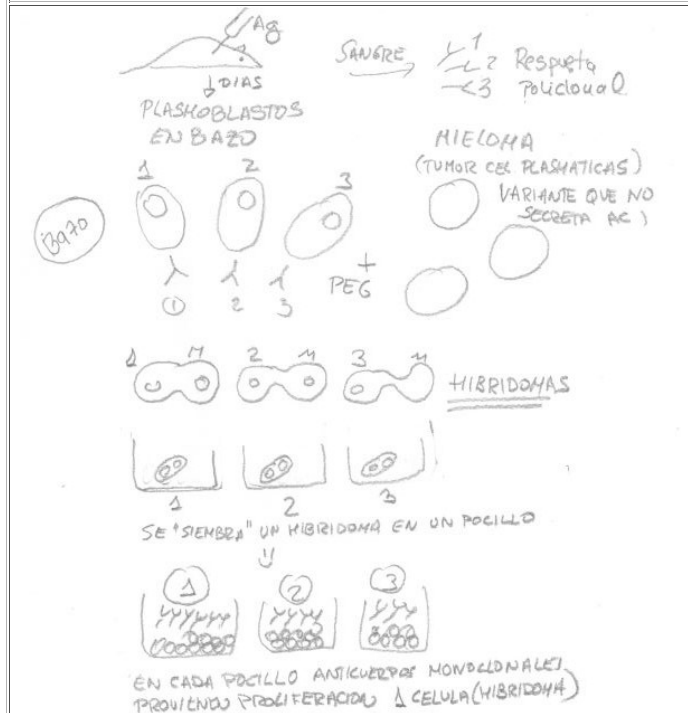
- 1.- Anticuerpos agonistas.** Son capaces de simular el ligando de un receptor de membrana, y hacen que la célula a la que se una se active. Ello ocurre en una enfermedad que se llama Enf de Graves en donde anticuerpos contra el receptor de TSH hace que las células tiroideas secreten T3 y T4
- 2.- Anticuerpos antagonistas o bloqueantes o neutralizantes.** Es el caso opuesto, la unión de un anticuerpo a un receptor de membrana IMPIDE que se una a su ligando y así deja de transmitir señales o de favorecer adhesión o que se cumpla cualquier función que implique una interacción receptor:ligando. Eso ocurre en la Anemia Perniciosa, donde anticuerpos contra el factor intrínseco impide que se una a B12, y que se absorba. Hay muchos otros ejemplos.
- 3.- Anticuerpos depleccionantes.** Son anticuerpos que inducen la fagocitosis o la muerte de las células a las que se unen no por la activación del complejo de ataque, sino por unirse a receptores que interfieren la supervivencia de esas células por mecanismos que en ocasiones no son evidentes.

La existencia de autoanticuerpos que cumplen diferentes funciones al unirse a su ligando en la membrana de células, ha llevado a intentar lograr anticuerpos, tras inmunizar a animales, que cumplan las funciones que deseamos, por ejemplo matar células tumorales o impedir que una interleucina se una a su receptor a activar un linfocito T anti-tumoral al unirse a un co-receptor activados o al revés, bloquear las señales de un receptor-coinhibidor con anticuerpos antagonistas/bloqueantes.

Un problema es que al inmunizar un animal con un antígeno, o con una célula, se produce una **respuesta policlonal**, en donde varios linfocitos B se activan al reconocer diferentes epítopos de un antígeno o diferentes moléculas de membrana (CDs) si inmunizamos a un animal con una célula hematopoyética. Esos diferentes linfocitos B se convierten en plasmáticas que secretan anticuerpos. En el suero de los animales inmunizados tenemos anticuerpos con diferentes regiones VH y VL que reconocen diferentes epítopos o diferentes moléculas del antígeno. Es una **respuesta policlonal** y se dice que los **anticuerpos** que hay en el suero específicos frente al antígeno con el que he inmunizado **son policlonales**, es decir, provienen de la diferenciación de varios linfocitos B.

Desgraciadamente es imposible purificar las células plasmáticas, clonaras (poner una célula plasmática en un pocillo de una placa de las que utilizamos en la práctica de ELISA o de aglutinación) y crecerla para así tener anticuerpos que provengan de una única célula plasmática y de su progenia. NO se pueden purificar ni cultivar células plasmáticas, mueren.

Por ello si quiero tener anticuerpos bloqueantes anti-TNF (que impida su unión al receptor de TNF al estar unidos a TNF) debo tener ratones o conejos inmunizados a los que le extraigo sangre cada cierto tiempo. El suero contendría anticuerpos anti-TNF policlonales (producidas por plasmáticas que reconocen diferentes epítopos de TNF)



Estos **HIBRIDOMAS** crecen de manera tumoral (indefinidamente) y es posible hacer experimentos de **dilución límite** en donde se siembra 1 única célula en un pocillo. Esta célula crece aislada de las demás y en su proliferación secreta un único tipo de inmunoglobulina de membrana con una única especificidad, por ejemplo contra una determinada molécula. Los anticuerpos que se encuentran en el edio de cultivo son todos idénticos, porque provienen de una única célula que se ha multiplicado, son **ANTICUERPOS MONOCLONALES**


Después de la fusión se ajusta a una célula híbrida por pocillo. Su expansión produce la secreción de un anticuerpo de una única especificidad que se denomina **anticuerpo monoclonal**. Los hibridomas de interés se seleccionan y expanden, lo que permite el aislamiento del anticuerpo monoclonal de interés.

Un investigador argentino que trabajaba en Inglaterra llamado Cesar Milstein tuvo una idea genial Aquí podéis ver un vídeo sobre su vida en el que yo aparezco fugazmente (01:03:17) (<https://www.youtube.com/watch?v=iNmbmOGMcbs>) porque tuve el inmenso privilegio de trabajar con él. en Cambridge unos meses. Dado que no podemos cultivar (crecer) células plasmáticas in vitro podemos **fusionar** las células plasmáticas (en realidad plasmoblastos presentes en bazo) con una célula tumoral que sí crezca in vitro. Así se obtuvieron células denominadas **HIBRIDOMAS**, que era el producto de la fusión de un plasmoblasto con una célula tumoral (mieloma). Estos hibridomas secretan el anticuerpo que secretaba el plasmoblasto, pero puede crearse in vitro y obtener así toda la cantidad de anticuerpo que se quiera.

- En el cuadro A se representan plasmoblastos **de bazo** secretores de anticuerpos, Cada célula tiene un color distinto porque produce un anticuerpo de distinta secuencia y de distinta especificidad (todos por ejemplo dirigidos contra linfocito T pero contra

diferentes moléculas del linfocito T).

- En el cuadro B se representan la línea tumoral capaz de fusionarse con linfocitos B.
- En el cuadro C se observan las células fusionadas, que se denominan hibridomas.



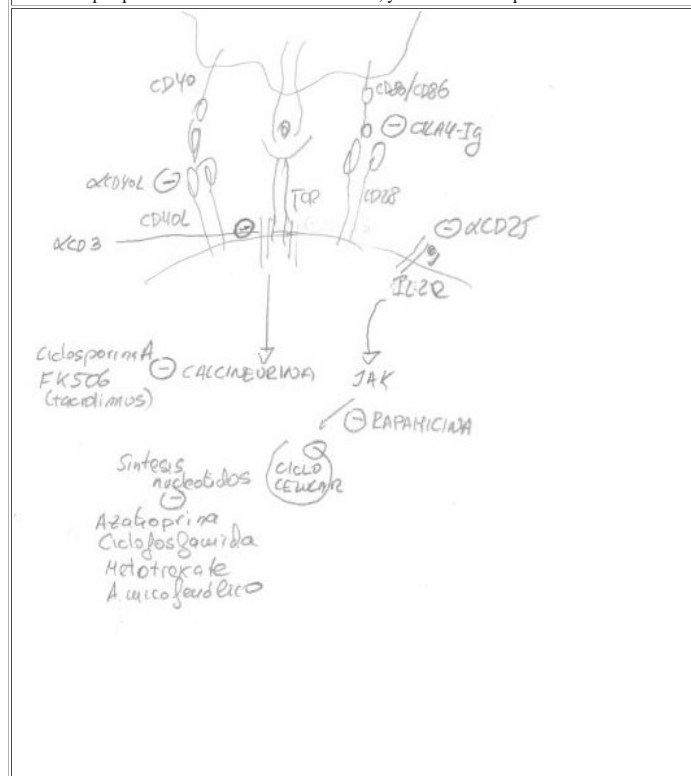
Como se aprecia ahora, hemos aislado en un pocillo un anticuerpo que ya sólo reconoce uno de los epitopos de TNF por ejemplo, pudiendo seleccionar anticuerpos con capacidad neutralizante/bloqueante.

A este anticuerpo se le denomina **ANTICUERPO MONOCLONAL**. dado que está producido por un único hibridoma, resultado de la fusión de una única célula

- **Por qué se clonan estas células fusionadas?** Porque tal y como hemos visto cuando se inmuniza con un antígeno (por ejemplo una célula humana) se despierta en el ratón una respuesta policlonal, en donde diferentes células B del ratón inmunizado presentes en Bazo interactúan con diferentes epitopos, o incluso de diferentes moléculas. El propósito de la técnica de generación de anticuerpos monoclonales es obtener anticuerpos de una única especificidad que estén separados de los demás. Como es imposible separar unos anticuerpos de otros por su secuencia, lo que en esta ocasión podemos hacer es separar los hibridomas que los producen.
- **En un bazo de ratón inmunizado habrá muchas células B memoria y plasmoblastos** presentes en bazo de diferente especificidad que, tras la fusión con el mieloma, secretarán la inmunoglobulina que tienen en membrana sin necesidad de un nuevo contacto con el antígeno. Por ello si separamos las células fusionadas unas de otra, separaremos los anticuerpos que secretan. Ello se puede lograr haciendo que cada célula fusionada (hibridoma secretor de inmunoglobulina) esté en un pocillo diferente. Si se logra, se dice que estos **hibridomas estén clonados** (este proceso es equivalente al cultivo de colonias de bacterias en agar). Ello quiere decir que la población celular que tengamos en un pocillo será la progenie del hibridoma único que sembramos en el pocillo.
- En esta figura encontramos un resumen de todo lo estudiado. Imaginemos que inyectamos de nuevo a un ratón un virus con varias proteínas en su superficie, o una proteína con diferentes epitopos.

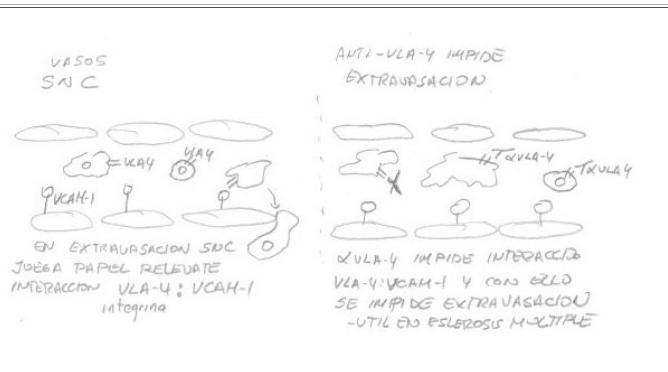
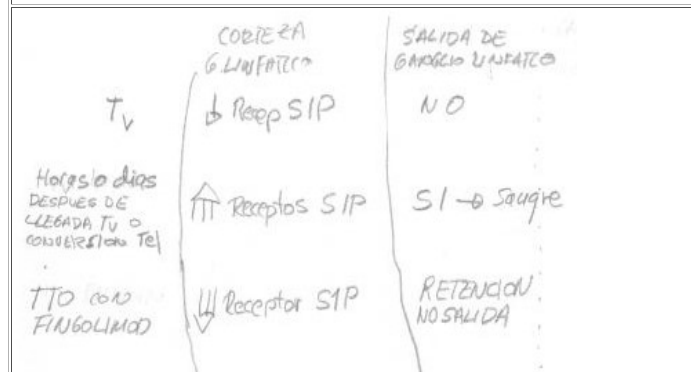
En esta gráfica se muestra como se obtienen anticuerpos monoclonales a partir de la fusión de plasmoblastos con células tumorales, y la clonación de hibridomas. En el sobrenadante del cultivo de los hibridomas tendremos los anticuerpos monoclonales.

En el suero de ratones inmunizados tenemos anticuerpos policlonales (producidos por muchas células plasmáticas localizadas en médula ósea o órganos linfoides secundarios). Este conjunto de anticuerpos policlonales se denomina anti-suero, y su obtención depende de la vida del animal, acabándose cuando el animal muera.



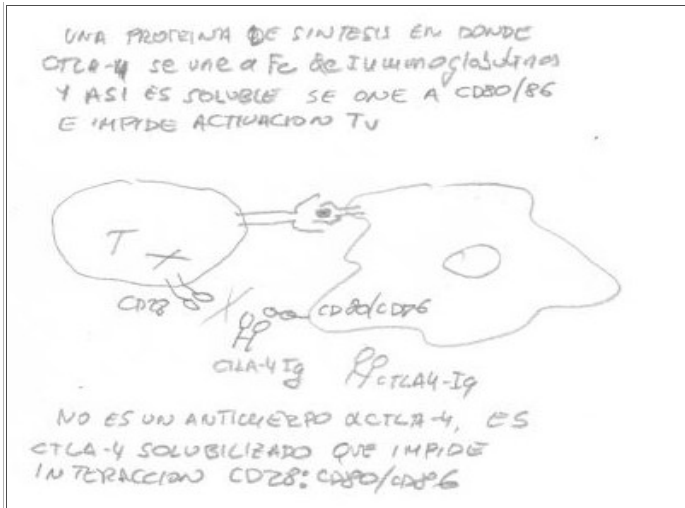
En esta gráfica se muestran diferentes estrategias para poder inhibir una respuesta inmune de linfocitos T, por ejemplo para tratar una enfermedad autoinmune o inhibir el desarrollo de una respuesta frente a aloantígenos en un trasplante

1. **Uso de anticuerpos bloqueantes/antagonistas.** Estos anticuerpos intentan impedir interacciones receptor-ligando que intervienen en la sinapsis inductora o efectora de linfocitos T
  1. Anticuerpos anti-CD3. Impiden la interacción entre el TCR $\alpha$ , $\beta$  y el complejo pMHC. No es exactamente un anticuerpo bloqueante porque la unión a CD3 hace que se transmitan señales al interior de la célula. Por ello, y aunque su función es compleja, los anticuerpos anti-CD3 inhiben la activación de linfocitos T.
  2. Anticuerpos anti-CD40L. Impiden la interacción entre CD40 (presente en macrófagos/monocitos) y CD40L (presente en linfocitos T). Este tratamiento dificulta la realización de sinapsis efectora entre linfocitos T y macrófagos/monocitos. La unión de anti-CD40L a CD40L no induce transducción de señales al interior del linfocito T.
  3. Anticuerpos anti-CD25. CD25 forma parte del receptor de IL-2 de alta afinidad, y por ello dificulta la proliferación de linfocitos T en presencia de IL-2.
2. **Uso de proteínas de membrana solubilizadas al unirse por genética molecular a la región Fc de inmunoglobulinas.** El nombre suele terminar en ept (xxxxept). Actualmente es posible convertir una proteína de membrana en una soluble al unirla a regiones Fc de inmunoglobulinas. La molécula CTLA-4Ig (**Abatacept**) se une a CD80 y CD86 e impide que CD28 se una a CD80/CD86, y por ello dificulta la generación de una sinapsis inductora entre T<sub>v</sub> y células dendríticas.
3. **Inhibidores de calcineurina (FK506 es otro nombre que se da a Tacrólimo).** Como ya hemos visto impiden la defosforilación de NFAT y la síntesis de varias interleucinas por linfocitos T que han reconocido su ligando pMHC.
4. **Inhibidores de proteínas JAK** que son tirosin quinasas que se activan por receptores de citoquinas, en este caso de IL-2.
5. **Fármacos que inhiben la replicación de linfocitos T**
  1. Rapamicina. Como vimos impide la transmisión de señales activadoras por parte de receptores de interleucinas (IL-2)
  2. Fármacos que impiden la síntesis de DNA, y por ello la proliferación de linfocitos T. Entre ellos destaca la Azatioprina, Ciclofosfamida, metotrexate y ácido micofenólico



Se están probando nuevos fármacos que inhiben la salida de células efectoras de ganglio linfático (Fingolimod), inhibiendo la expresión del receptor S1P1 (favoreciendo su internalización) lo que dificulta la salida del ganglio de linfocitos T activados ya que S1P1 percibe el gradiente de S1P que permite al linfocito T salir por linfáticos eferentes. Con ello se inhibe la inflamación. Se emplea en enfermedades autoinmunes como Esclerosis Múltiple.

Otro ejemplo del uso de anticuerpos para evitar la sinapsis efectora de linfocitos T es impedir su extravasación. En este ejemplo, los linfocitos T efectoros **autorreactivos** NO se pueden extravasar en SNC si al paciente se le administra anticuerpos anti-VLA-4, una integrina necesaria para la extravasación en cujietas mucosas, y especialmente es SNC. Por ello es un anticuerpo ampliamente utilizado en **Esclerosis Múltiple** (<https://en.wikipedia.org/wiki/Natalizumab>)



- La proteína CTLA-4 tiene una gran afinidad por CD80 y CD86. Aunque CTLA4 es una proteína de membrana, se ha logrado generar moléculas solubles de CTLA4 al unirlo a dominios constantes de inmunoglobulina. Se utiliza terapéuticamente para evitar la activación de linfocitos T vírgenes sobre células dendríticas dado que CTLA-4 funciona como un antagonista, que se une a CD80 y CD86 de dendríticas e impidiendo que la molécula CD28 de T<sub>H</sub> pueda unirse a CD80/CD86 (bloqueo estéricamente por CTLA4-Ig), imprescindible para la activación de linfocitos T vírgenes. Es análogo a un anti-CD28 antagonista.
- No confundir con los anticuerpos anti-CTLA-4 antagonistas, que lo que hacen es impedir que CTLA-4 transmita señales inhibitorias al unirse a CD80/CD86, que es lo que normalmente hace y que juega tal vez un papel en que no haya respuestas "excesivas". Estos anticuerpos anti-CTLA-4 antagonistas FAVORECEN la activación de linfocitos T efectores, dado que bloquean su inhibición y son los fármacos que se utilizan en la inmunoterapia oncológica (bloquean puntos de control (check point)).

Aquí se aprecia los diferentes pasos que pueden inhibirse con fármacos antiinflamatorios y que impiden la activación y proliferación de linfocitos T.

Aquí se aprecia como hay fármacos o anticuerpos terapéuticos que actúan en diferentes momentos; en la activación y diferenciación de linfocitos B y T, o en su maduración o inhibiendo su función efectora.

CONSECUENCIAS DE LA INMUNOSUPRESIÓN.

- Infecciones por microorganismos. Hongos si inmunosupresión T (microorganismos oportunistas) o neutropenia
- Reactivación de infecciones latentes

CUADRO 86-3 VACUNACIÓN DE PACIENTES CON CÁNCER QUE RECIBEN QUIMIOTERAPIA, PACIENTES CON ENFERMEDAD DE HODGKIN Y RECEPTORES DE TRASPLANTE DE CÉLULAS PRIMORDIALES HEMOPOYÉTICAS

Vacuna	Uso en pacientes indicados		
	Quimioterapia intensiva	Enfermedad de Hodgkin	Trasplante de células primordiales hemopoéticas
Difteria-tétanos <sup>a</sup> Poliomielitis <sup>b</sup>	Serie primaria y refuerzos necesarios Serie primaria completa y refuerzos	Sin recomendación especial Sin recomendación especial	12, 14 y 24 meses después del trasplante 12, 14 y 24 meses después del trasplante
Haemophilus influenzae tipo b conjugada	Serie primaria y refuerzo para niños	Inmunización antes de tratamiento y refuerzo tres meses después	12, 14 y 24 meses después del trasplante
Hepatitis A Hepatitis B	Sin recomendación como rutina Serie completa	Sin recomendación como rutina Sin recomendación especial	Sin recomendación como rutina 12, 14 y 24 meses después del trasplante
Neumocócica polisacárido 23-valente <sup>c</sup>	Cada cinco años	Inmunización antes de tratamiento y refuerzo tres meses después	12 y 24 meses después del trasplante
Meningocócica conjugada 4-valente <sup>d</sup>	Debe aplicarse a pacientes con esplenectomía y los que viven en áreas endémicas, incluidos estudiantes en dormitorios universitarios	Debe aplicarse a pacientes con esplenectomía y los que viven en áreas endémicas, incluidos estudiantes en dormitorios universitarios	Debe aplicarse a pacientes con esplenectomía y los que viven en áreas endémicas, incluidos estudiantes en dormitorios universitarios
Influenza Sarampión-parotiditis-rubéola	Inmunización estacional Contraindicada	Inmunización estacional Contraindicada	Inmunización estacional Después de 24 meses en pacientes sin enfermedad injerto contra hospedador
Varicela-zoster	Contraindicada <sup>e</sup>	Contraindicada	Contraindicada

<sup>a</sup> La combinación Td (tétanos-difteria) se recomienda actualmente para adultos. Antes, las vacunas para tos ferina no se recomendaban para personas >6 años de edad. Sin embargo, los datos recientes indican que el producto Tdap (tétanos-difteria-tos ferina acellular) es seguro y eficaz en los adultos.  
<sup>b</sup> La vacuna de virus vivo está contraindicada: debe usarse vacuna desactivada.  
<sup>c</sup> Hoy en día, la vacuna neumocócica para 7 serotipos se recomienda sólo para niños. Se espera que las vacunas futuras incluyan más serotipos y se recomendarán para adultos.  
<sup>d</sup> Por ahora está autorizada para personas de 11 a 55 años de edad.  
<sup>e</sup> Comuníquese con el fabricante para obtener más información sobre el uso en niños con leucemia linfocítica aguda.

Indicación y contraindicación de vacunas en pacientes sometidos a inmunosupresión o con la inmunosupresión poco definida presente en algunos pacientes oncológicos y que conduce a la aparición de enfermedades infecciosas que participan en la letalidad de estos procesos en fase terminal..

LAS INTERLEUCINAS EN LA ENFERMEDAD AUTOINMUNE

Tanto la sobre-expresión de interleucinas pro-inflamatorias (por ejemplo TNF-alfa) como la deficiencia en interleucinas anti-inflamatorias (TGF-beta) se asocian al desarrollo de cuadros autoinmunes.

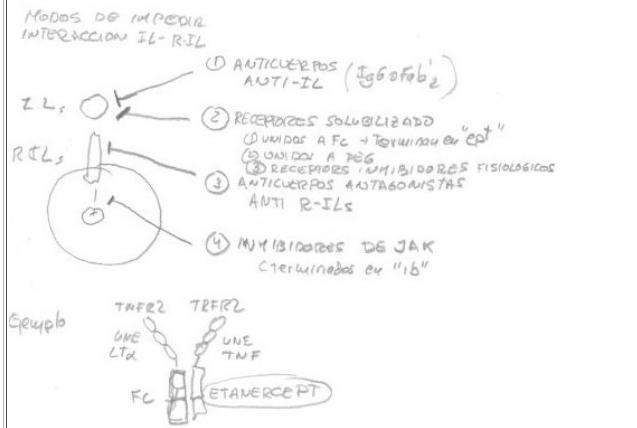
	Anti-TNF	Anti-IL-6	Anti-IL-17
ARTRITIS REUMATOIDE	MEJORA	MEJORA	
ENFERMEDAD CROHN	MEJORA		EMPEORA
PSORIASIS	MEJORA		MEJORA
ESCLEROSIS MULTIPLE	EMPEORA		

CIERTAS INTERLEUCINAS TIENEN UN EFECTO PARTICULARMENTE RELEVANTE EN DIFERENTES ENF. AUTOINMUNES

La mayor parte de las enfermedades autoinmunes que aparecen en esta figura (primera columna) responden al tratamiento con anti-TNF (segunda columna, celda en verde), aunque difiere en la respuesta a anticuerpos frente a otras interleucinas indicando una participación diferente en cada cuadro clínico de estas interleucinas. En la figura se intenta realizar un esquema en

donde se indica la interleucina más relevante en cada grupo de enfermedades autoinmunes. Tiene importancia porque actualmente hay diferentes sistemas por los que se puede impedir la interacción entre las interleucinas proinflamatorias y su receptor específico, y sería mejor inhibir la interacción de la interleucina pro-inflamatoria más relevante

En ocasiones el uso de anticuerpos bloqueantes potencian la gravedad del cuadro clínico (celda en rojo (anti-TNF agrava Esclerosis múltiple y anti-IL-17 agrava la Enf de Crohn). Todavía no se ha encontrado una explicación a este hallazgo clínico que yo sepa.



En esta gráfica se muestra como los receptores de Interleucinas están en la membrana citoplásmica de las células que responden a esas interleucinas. Existen varias estrategias para evitar la unión de la interleucina de interés a su receptor

- 1.- Anticuerpos bloqueantes que se unen a la interleucina e inhiben su unión al receptor (terminan en "ab"), si humanizados terminan en "uab"
2. Anticuerpos antagonistas que se unen al receptor de interleucinas, no transmiten señales e impiden que se una a la interleucina (terminan en ab) No existen estos receptores en el caso de TNF pero sí en el caso de IL-6
3. Solubilización del receptor de interleucina, que puede unirse a las interleucinas y así impedir que se unan a los receptores de la membrana citoplásmica. Su nombre termina en "ept".

**Fármacos antiinflamatorios**

	Pacientes	Coste medio por paciente (€)	Gasto (€)
Adalimumab <sup>a</sup>	1.368	7.667,19	10.488.720,63
Etanercept <sup>a</sup>	944	5.966,34	5.632.226,09
Infliximab <sup>a</sup>	667	6.746,59	4.499.972,76
Total	2.979		20.620.919,48

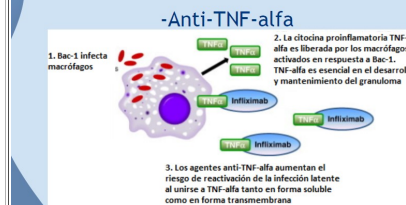
<sup>a</sup>anti-TNF; <sup>b</sup>inhibidor del TNFα

Se aprecia el coste medio de estos tratamientos, que suponen el 5% del gasto en farmacia hospitalaria de la Región de Murcia

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359610114000781>

En esta figura se muestra la estructura de las moléculas que se usan en clínica que impiden la interacción entre TNF y su receptor. Infliximab es un anticuerpo NO humanizado, aunque por ingeniería genética los dominios constantes de cadena pesada y ligera son humanos, pero no los dominios V1 y HL que son de ratón. En los anticuerpos humanizados (terminan un "uab" (Adalimumab)) los dominios VH y VL son humanos. También se muestra como Etanercept es el eceptr de TNF unido a los dominios CH2 y CH3 de IgG humana para que sea soluble y se pueda uir a TNF soluble. Por último hay dos moléculas en donde se une a PEG (pegilados), lo que aumenta la vida media. En un caso se une PGE al receptor de TNF y en la otra a una de las cadenas Fab (V:CH1) formando una estructura F(ab')<sub>2</sub>-PEG

Se sustituye las regiones constantes de ratón por humanas para que no se formen anticuerpos contra las regiones constantes de ratón y se formen inmunocomplejos que sean fagocitados.



Lo anticuerpos anti-TNF favorecen la re-activación de tuberculosis latente dado que TNF juega un papel muy importante en el mantenimiento de granulomas. Se debe hacer una prueba de tuberculina cutánea antes de instaurar tratamiento. Si es positiva no administrar anti-TNF o añadir antibióticos anti-tuberculosos

[https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613\(19\)30143-8](https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(19)30143-8)

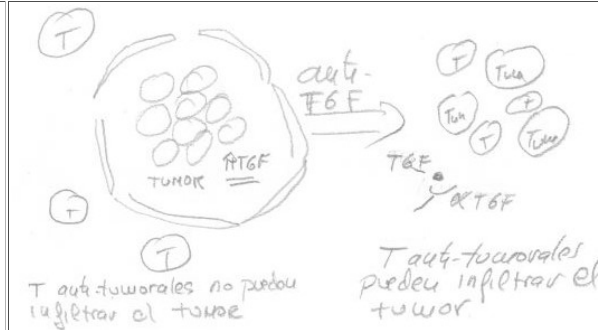
La IL-6 es un elemento esencial en la respuesta inmune, pero su desregulación y producción excesiva induce patologías. Como ya se ha omentado hay anticuerpos tanto anti-IL-6 como antagonistas que se unen al receptor de IL-6. Entre estos anticuerpos destaca **Tocilizumab**, anti-IL-6R que se empleado en el tratamiento de la tormenta de citocinas que ocurre en COVID-19 y en la secundaria a la administración de células Car-T antitumorales (ver más bajo)

En el caso de IL-1 además de anticuerpos anti-IL1 (Canakinumab) o del receptor de IL-1 unido a regiones constantes de IgG (Rinolacept) hay un compuesto que se une al receptor de IL-1 (Anakinra) que es la proteína recombinante de un receptor presente en células humanas (IL-1Ra) que se une al receptor de IL1 pero esta interacción no transmite señales pero sí impide que IL-1 se una al receptor de IL-1 ahora ocupado

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3219035/>

[https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613\(19\)30138-4](https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(19)30138-4)

IL-17 (y también IL-23) está implicado en el reclutamiento de neutrófilos que ocurre en psoriasis. Se nuevo hay anticuerpos que se unen a IL-17 o anticuerpos antagonistas que se unen al Receptor de IL-7



ANTICUERPOS ANTI-ILs QUE FAVORECEN LA RESPUESTA INMUNE. Tal y como veremos hay tumores que no se infiltran por linfocitos T y que se denominan tumores fríos. Se ha demostrado que la inhibición de las señales transmitidas por TFG-beta permiten la infiltración por linfocitos T.

Se han descrito tres formas de inhibir esa señalización del receptor de TFG-beta

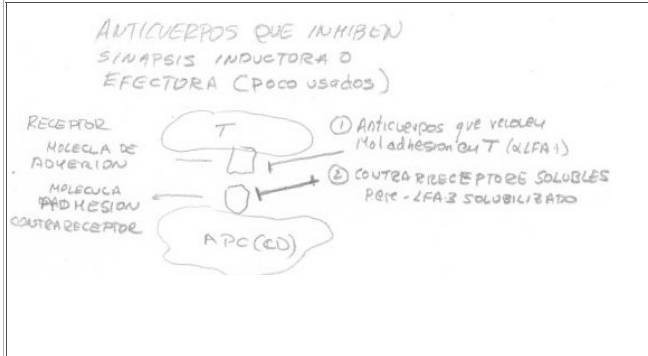
- 1.- **Anticuerpos monoclonales anti-TGF-beta**
- 2.- Inhibición de la actividad quinasa del receptos de TGF-beta
3. Ruptura del RNAm de TGF-beta

**ARASTAMIENTO AC MONOCLONALES EN HIPERSENSIBILIDAD**

RELACIONADOS CON POLARIZACION IA TH2	anti-IL-25 anti-IL-33 anti-TSLP
MOLECULAS SECRETADAS POR TH2 O POR APASMATICAS	anti-IgE anti-IL-5 anti-IL-4 anti-IL-13

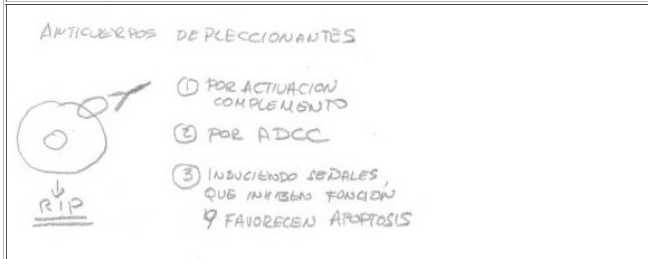
Aquí se refleja como hay otros anticuerpos monoclonales que se intentan introducir en la hipersensibilidad tipo-I, anti-TSLP y anti-IgE, que reconoce el dominio C-epsilon-3 de la IgE e impide su unión al receptor de IgE (Fc-epsilonR).

De nuevo los anticuerpos monoclonales contra interleucinas (anti-IL-5) o anti-IL-4Ralfa (cadena que forma parte del receptor de IL-4 e IL-13) se están intentando introducir en la clínica de hipoersensibilidad. El precio de estos Medicamentos Biológicos, es el principal problema



Otra estrategia es intentar inhibir la formación de sinapsis inductora y efectora. La estrategia utilizada es emplear anticuerpos monoclonales bloqueantes que se unen a moléculas de adhesión implicadas en estas sinapsis. En esta figura se muestran algunos de ellos

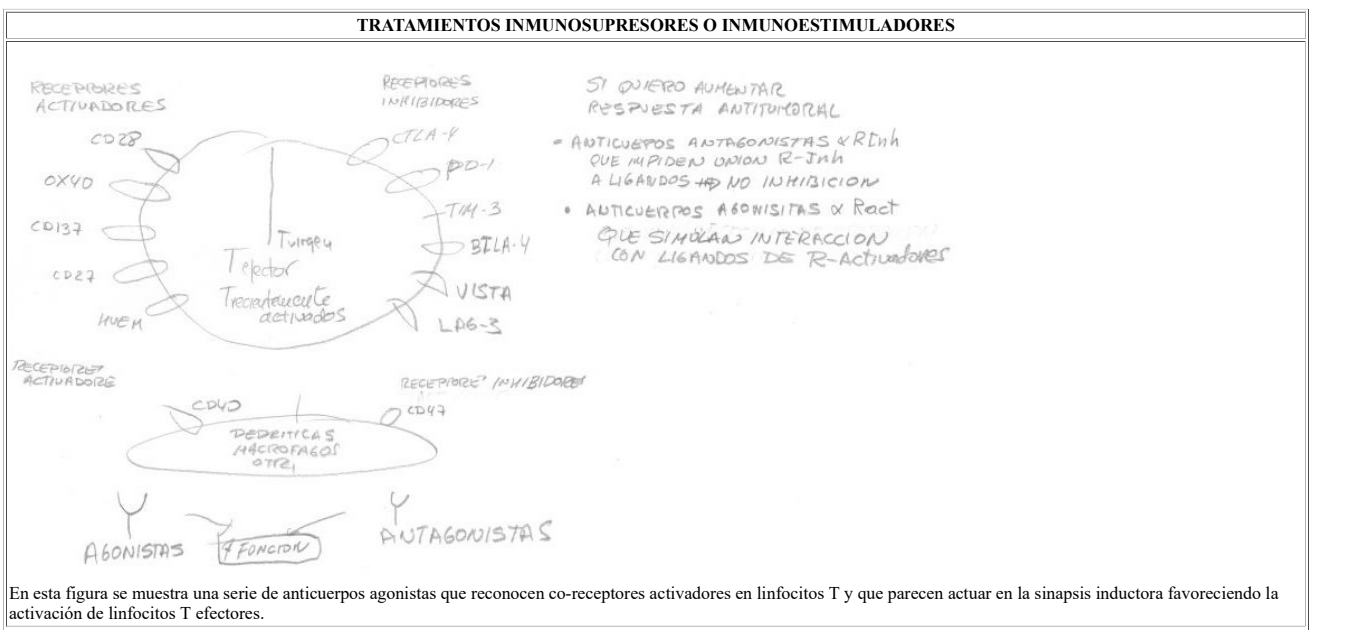
1. Anticuerpos anti-LFA-1 (efalizumab). Impide la interacción entre LFA-1 y su ligando ICAM-1 (CD54) tanto en la sinapsis inductora y efectora como en la extravasación ya que LFA-1 juega un papel en este proceso como vimos en la inmunodeficiencia primaria donde hay una deficiencia en el proceso de adhesión y extravasación (LAD, leukocyte adhesion deficiency).
2. Una molécula soluble en donde la molécula de adhesión LFA-2 se une a los dominios constantes de inmunoglobulina. Esta molécula (Alefacept) se une al ligando de LFA-3, que se denomina CD2, y dificulta la formación de la sinapsis efectora. Por otra parte las células CD2+ podrían ser matadas por ADCC ya que Alecept tiene los segmentos constantes de IgG humana. Como son células T las que expresan CD2, induciría una disminución de la concentración de linfocitos T y una cierta inmunosupresión, que es lo que se busca con estos fármacos.



**ANTICUERPOS DEPLECCIONANTES.** Por último hay anticuerpos que inducen inmunosupresión pero que no son bloqueantes. El ejemplo más importante es anti-CD20 utilizado en alguna enfermedad autoinmune y en tumores de linfocitos B. El modo por el que estos anticuerpos depleccionan las poblaciones a las que se unen no son fáciles. En la gráfica se señala como la activación del complemento en la membrana de la célula a la que se une puede jugar un papel, o la fagocitosis por parte de macrófagos, que pueden fagocitar células, pero también influye lo que en la figura denomina signaling induction, ya que tanto CD3 como CD20 transmiten señales que pueden colaborar en la deplección de estas células al activarse señales de suicidio

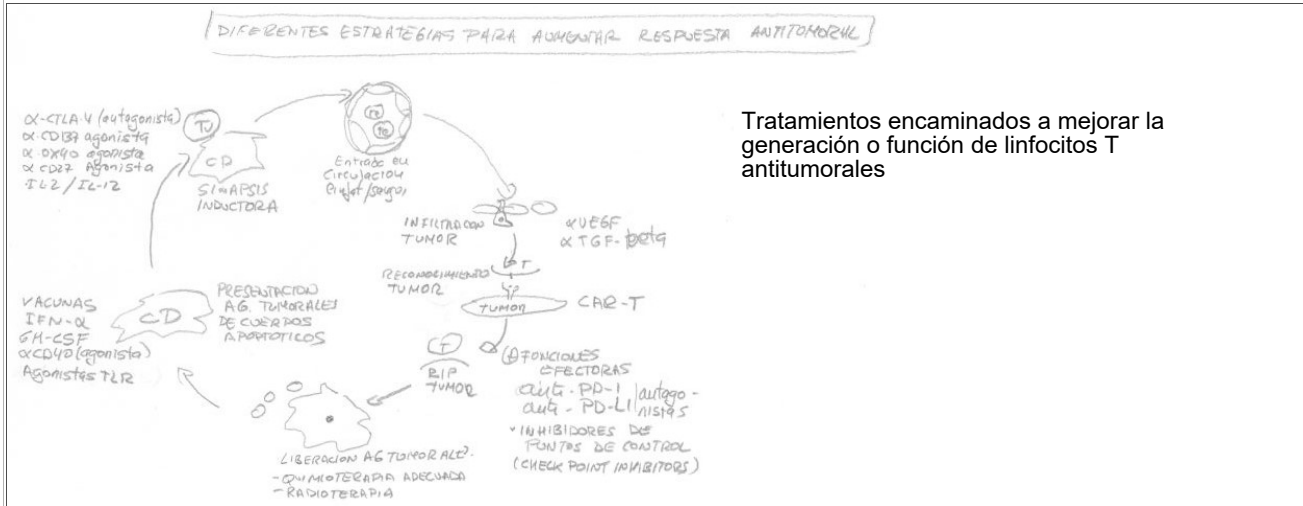
Diferentes posibles dianas terapéuticas en el uso de anticuerpos terapéuticos en enfermedades autoinmunes en donde hay inflamación

	Anticuerpos frente a Interleucinas o receptores de interleucinas	Anticuerpos frente a integrinas	Anticuerpos depleccionantes de linfocitos T o B o que inhiben su función	Interleucinas añadidas que modulan respuesta inmune
Anticuerpos o interleucinas utilizados que inducen inmunosupresión	Anti-TNF-alfa, Anti-IL1, Anti-IL6, anti-IL17,	Anti-VLA-4 (integrina formada por alfa4 y beta 1) Anti-LFA-1 que inhibe formación de sinapsis	Anti-CD3 (linfocitos T) o anti-CD20 (linfocitos B y plasmoblastos)	
Que activan la respuesta inmune	anti-TGF-beta	Anticuerpos que bloquean señales de receptores inhibidores (check-point blockers) como anti-CTLA-4, anti-PD-1 y anti-PD-L1 Anticuerpos agonistas que reconocen receptores co-activadores		
De Mecanismo por dilucidar				Interferón-I en Esclerosis múltiple



En esta figura se muestra una serie de anticuerpos agonistas que reconocen co-receptores activadores en linfocitos T y que parecen actuar en la sinapsis inductora favoreciendo la activación de linfocitos T efectores.

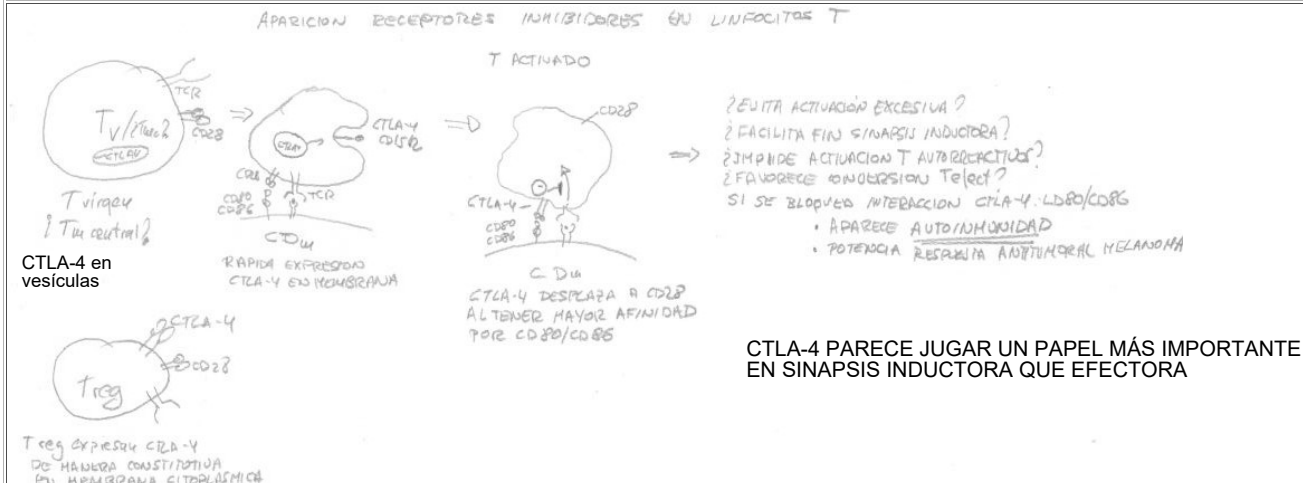




Tratamientos encaminados a mejorar la generación o función de linfocitos T antitumorales

Tal y como se ve en esta diapositiva casi todos los pasos de generación de linfocitos T anti-tumorales se puede intentar mejorar la respuesta. En el punto 3 se analiza la sinapsis inductora, y se plantea como esa sinapsis se puede favorecer con anticuerpos agonistas frente a co-receptores activadores, tales como CD137, OX-40 o CD27

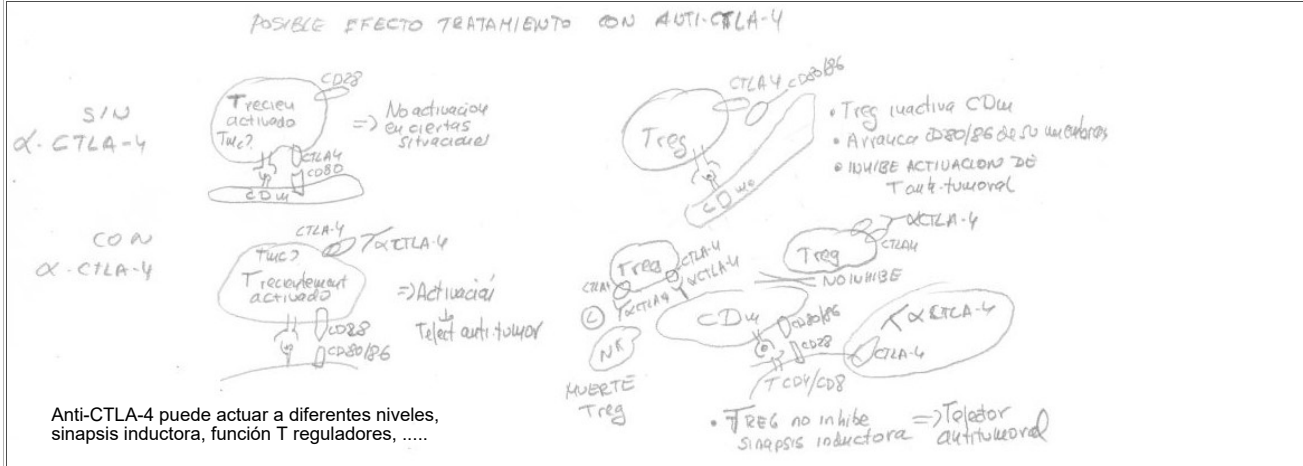
**Receptores Co-inhibidores de expresados por T reguladoras y T recién activados. Efectos de la adición de anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 (bloqueantes de puntos de control)**



CTLA-4 PARECE JUGAR UN PAPEL MÁS IMPORTANTE EN SINAPSIS INDUCTORA QUE EFECTORA

Los receptores co-inhibidores son esenciales para la regulación de la respuesta inmune y evitar una respuesta excesiva cuando no se elimina el microorganismo. Además juega un papel fundamental en la tolerancia y en evitar autoinmunidad

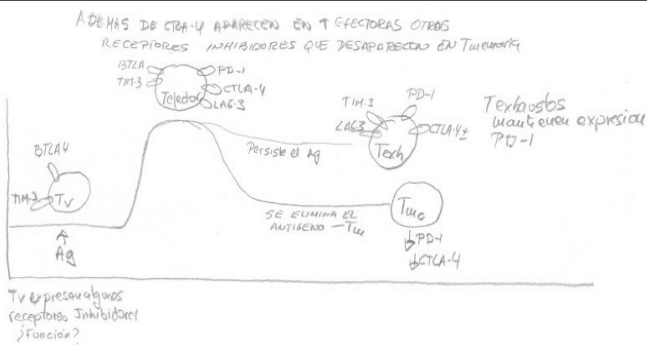
1. El receptor co-inhibidor CTLA-4 está en la membrana de linfocitos T reguladores y en vesículas en linfocitos T vírgenes. Ello permite que los linfocitos T vírgenes puedan reconocer CD80 y CD86 con el co-receptor CD28 y activarse (no reflejado ni en el panel a ni en el b)
2. La activación del linfocito T virgen induce el transporte a membrana del receptor co-inhibidor CTLA-4, cuyos ligandos son CD80 y CD86 y tiene por ellos una mayor afinidad que CD28 (panel b)
3. La interacción entre CTLA-4 y CD80 o CD86 transmite señales negativas al linfocito T activado recientemente. Esa señal puede hacer que el linfocito T se separe de la célula dendrítica que ya estaría capacitada para activar T CD8+. También podría tal vez impedir que se activen linfocitos T autorreactivos con una afinidad por autoantígenos muy próximas al umbral y que podría activarse al tener más moléculas de adhesión y expresar receptores co-activadores. Ello podría explicar la **autoinmunidad despertada en el tratamiento** con anti-CTLA-4 en algunos pacientes (panel c)
4. Los linfocitos T reguladores son capaces de adquirir las moléculas CD80 y CD86 de la célula presentadora de antígeno, lo que dificultaría la activación de T vírgenes al tener una baja cantidad de moléculas CD80 y CD86. A este proceso se le llama **transendocitosis** (panel c)
5. El tratamiento con anticuerpos anti-CTLA-4 BLOQUEANTES logra:
  1. Permitir que CD28 de células T recientemente activadas interactuara con CD80 y CD86 y capacite a dendríticas para activar linfocitos T CD8+ en condiciones en las que esta interacción parece estar atenuada
  2. Evita que se extraigan moléculas CD80 y CD86 por parte de T reguladoras
  3. Si la región Fc de CTLA-4 que se ha unido a células reguladoras se une a macrófagos, esos macrófagos pueden matar las células T reguladoras facilitando la activación de T vírgenes en sinapsis inductora



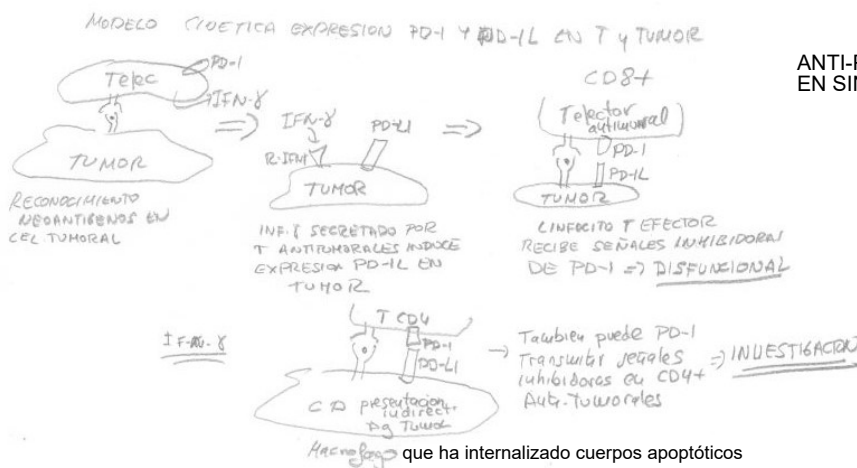
Anti-CTLA-4 puede actuar a diferentes niveles, sinapsis inductora, función T reguladores, ....

1. En esta Figura se vuelve a resaltar el papel que tiene CTLA-4 en la regulación de la activación de linfocito T recientemente activados que expresan CTLA-4 en membrana.

- En infecciones crónicas o tumores esa señal de inhibición impide la activación de linfocitos T CD8+ que requiere la capacitación de dendríticas.
- El tratamiento con anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 permite que los linfocitos T recién activados siga haciendo sinapsis con dendríticas, capacitándolas y permitiendo la generación de linfocitos T CD8+ efectores. En la figura son T anti-tumorales
- Tal y como se ha señalado el tratamiento con anticuerpos anti-CTLA-4 favorece el desarrollo de enfermedades autoinmunes que afectan especialmente a piel, hipófisis y sistema digestivo. Se supone que la imposibilidad de que CTLA-4 regule la respuesta de linfocitos T recién activados permite la diferenciación de linfocitos T autorreactivos que no se han eliminado en timo por tener una afinidad por autoantígenos muy cercana al umbral de la selección negativa.



En otras ocasiones los microorganismos no se eliminan, generándose infecciones crónicas. En estos casos no se llegan a generar linfocitos T memoria, dado que el antígeno persiste. Los linfocitos T CD8+ se convierten en células T "exhaustas", que no son capaces de hacer adecuadas sinapsis efectoras. Expresan en membrana una serie de receptores inhibidores, distintos de los de células NK, que NO reconocen MHC-I, sino ligandos presentes en células infectadas o células cancerosas. Se especula que este mecanismo intenta impedir una inflamación excesiva y no útil en la eliminación del microorganismo. Estos receptores inhibidores (IR) presentes en linfocitos T NO se expresan únicamente en linfocitos T exhaustos, sino en linfocitos Tm (en muy baja cantidad) o linfocitos T efectores o en proliferación. Aparentemente los linfocitos T se parecen más de lo que creíamos a células NK en relación a la existencia de señales positivas y negativas que modulan la respuesta. Como ya os he dicho es un campo de intensa investigación.

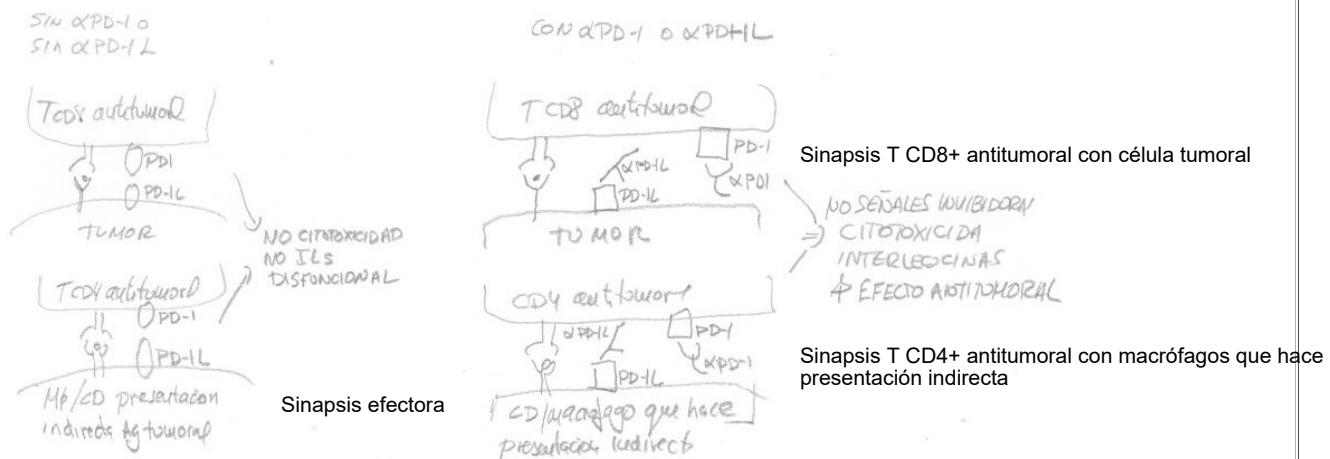


En esta figura se aprecia como la interacción de estas células T efectoras PD-1+ al hacer sinapsis efectora induce la expresión del ligando PD-L1 (por la unión de IFN-gamma a su receptor en células tumorales o mieloides) tanto en el tumor como en células mieloides que infiltran el tumor. La unión de PD-1 a su ligando PD-L1 induce la inhibición de los linfocitos T efectores y su conversión en T exhaustos que no matan el tumor no secretan ILs inflamatorias tanto cuando contactan con la célula tumoral como con la célula mielóide que infiltra el tumor

**Anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-1L que desiertan una función anti-tumoral al generar linfocitos T citotóxicos en el entorno tumoral.**

En esta figura se aprecia como las células T efectoras se inhiben en el entorno tumoral ya que las células T antitumorales expresan PD-1 y las células mieloides infiltrantes y las células tumorales PD-1L. Esa interacción induce señales negativas en el linfocito T que no puede cumplir su función efectora. La adición de anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-1L antagonistas permiten la reactivación de estos linfocitos T exhaustos, si bien hay otras alternativas. A este proceso por el que una T exhausta se convierte en efectora se la denominó **revigorización**.

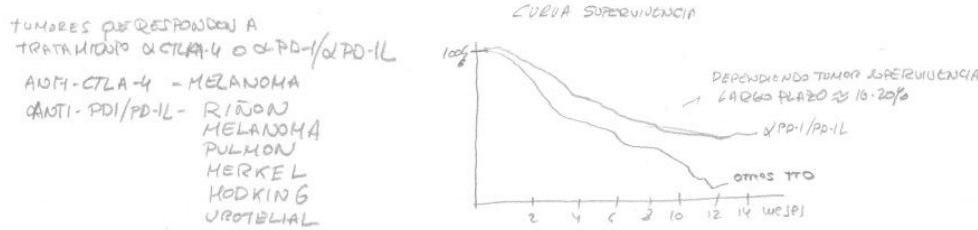
Se ve más grande el bloqueo de la interacción entre PD-1 y PD-1L con anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-1L



En esta gráfica se muestra como los anticuerpos anti-CTLA-4 actúan en la sinapsis inductora y los anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-1L en la sinapsis efectora

Es un motivo de intensa investigación cuáles son los mecanismos por los que los anticuerpos anti-CTLA-4, anti-PD-1 y anti-PD-L1 son capaces de generar una respuesta antitumoral ya que se duda de que los anticuerpos sean capaces de revigorizar a T exhaustos. En el modelo se proponen otras funciones como eliminación de T reguladoras, permisividad de interacciones entre T CD4+ y macrófagos que han captado cuerpos apoptóticos del tumor y en donde la presencia de CTLA-4 o PD-1 en linfocitos T infiltrante y CD80/CD86 o PD-L1 en macrófagos inhibían esa sinapsis que se ve favorecida por anti-CTLA-4, anti-PD-1 o anti-PD-L1.

Otros investigadores proponen que el tratamiento con anti-PD-1 o anti-PD-L1 es capaz de actuar sobre unas células precursoras de T exhaustas (Tex-stem) capaces de generar células efectoras que eliminan las células tumorales en presencia de estos anticuerpos bloqueantes.



No todos los tumores son capaces de responder al tratamiento con anticuerpos bloqueantes de los puntos de control. Hay una intensa investigación en cuáles son las razones por las que algunos tumores responden y otros no. Aunque parece relacionarse con tumores con muchos neoantígenos, es un tema que dista mucho de estar aclarado.

Aquí se observa como la supervivencia de pacientes tratados con anti-PD-1 es superior a las de pacientes tratados con tratamientos convencionales.

Hasta el momento los anticuerpos anti-PD-1, anti-PD-L1 y anti-CTLA-4 son fármacos de segunda o tercera línea que se utilizan en pacientes sin otra alternativa terapéutica (uso compasivo), aunque esto está cambiando. Normalmente son efectivos en el 20% de los pacientes con tumores susceptibles de responder a estos tratamientos.

Ejemplo de anticuerpos agonistas anti-CD137

<https://clincancerres.aacrjournals.org/content/21/14/3113>

Se propone que los anticuerpos agonistas anti-CD137 favorecen la generación de linfocitos T antitumorales e incluso de células NK al aumentar su estado de activación o su diferenciación

El uso de anticuerpos anti-PD-1 no sólo tiene aplicación en tratamiento de tumores, sino en otras situaciones en donde se quiere potenciar una respuesta inmune que no es eficaz y en la que hay linfocitos T exhaustos como puede ser INFECCIONES VIRALES CRÓNICAS.

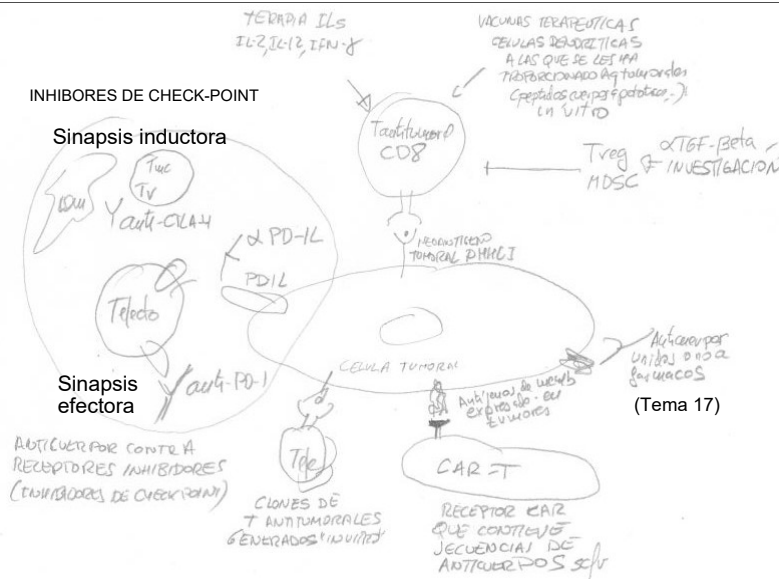
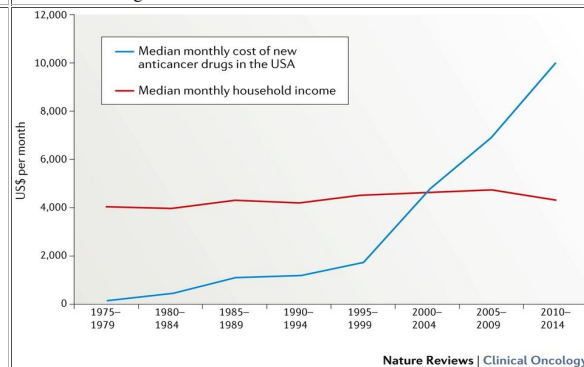
Sin embargo los resultados no han sido tan esperanzadores como en el caso del tratamiento de algunos tumores

### How Much Longer Will We Put Up With \$100,000 Cancer Drugs?

Paul Workman,<sup>1</sup> Giulio F. Draetta,<sup>2</sup> Jan H.M. Schellens,<sup>3,4</sup> and René Bernards<sup>5\*</sup>  
<sup>1</sup>Cancer Research UK Cancer Therapeutics Unit, The Institute of Cancer Research, London, UK  
<sup>2</sup>Department of Genomic Medicine and Institute for Applied Cancer Science, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA  
<sup>3</sup>Division of Clinical Pharmacology, the Netherlands Cancer Institute, 1066 CX Amsterdam, the Netherlands  
<sup>4</sup>Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences (UIPS), Utrecht University, Utrecht, the Netherlands  
<sup>5</sup>Division of Molecular Carcinogenesis and Cancer Genomics Centre Netherlands, the Netherlands Cancer Institute, 1066 CX Amsterdam, the Netherlands  
 \*Correspondence: r.bernards@nki.nl  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.034>

The spiraling cost of new drugs mandates a fundamentally different approach to keep life-saving therapies affordable for cancer patients. We call here for the formation of new relationships between academic drug discovery centers and commercial partners, which can accelerate the development of truly transformative drugs at sustainable prices.

Uno de los problemas de estos medicamentos biológicos es su precio, que puede llegar a 100.000 dólares por paciente, lo que dificulta el uso de un recurso terapéutico tan prometedor

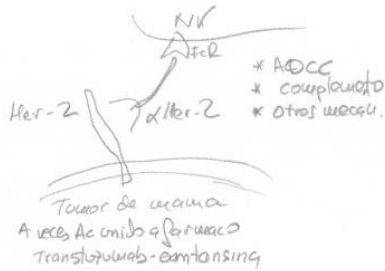


Estrategias para generar y optimizar respuesta T anti-tumoral

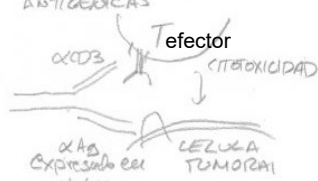
En esta gráfica se muestran diferentes estrategias terapéuticas para el tratamiento de tumores. Nos vamos a centrar en aquellas que se centran en el reconocimiento de proteínas NO MUTADAS que se presentan ÍNTEGRAS en la membrana de las células tumorales y no tumorales. Al ser proteínas NO PROCESADAS y presentes en la MEMBRANA de la célula tumoral, NO son neoantígenos, sino proteínas contra las que se pueden generar anticuerpos. Por último veremos como se puede lograr crear un receptor quimérico (CAR) con las regiones VH y VL del anticuerpo formen parte de una única proteína (scFv) que además tiene una región transmembranosa y una región intracelular capaz de señalizar a linfocitos T. Este gen creado por ingeniería genética (CAR) se puede trasfectar a en linfocitos T, a los que se denomina CAR-T, y se inyectan en el paciente

Tema 17

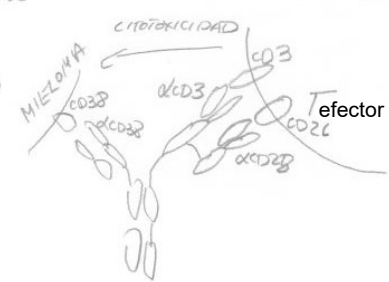
ANTICUERPOS QUE RECONOCEN ANTIGENOS EXPRESADOS EN LA MEMBRANA DE CÉLULAS TUMORALES



ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS (ANTICUERPOS CON DOS ESPECIFICIDADES ANTIGÉNICAS)



ANTICUERPO TRIESPECÍFICO



Algunos cánceres de mama expresan en su membrana la moléculas HER-2. Se dispone de una anticuerpo anti-HER-2 (trastuzumab) que, cuando se administra a una paciente, se une a HER-2 y facilita su destrucción por diferentes mecanismos, entre los que parece incluirse la citotoxicidad mediada por anticuerpos

La ingeniería molecular permite manipular los genes de inmunoglobulinas y crear anticuerpos bi-específicos, en donde uno de los brazos del anticuerpo tiene unas regiones VH y VL anti-Ag presente en tumores y el otro brazo tienen unos VH y VL que les permite unirse a CD3. Estos anticuerpos ponen en contacto linfocitos T de cualquier especificidad (CD3 es igual en todos los linfocitos T) con la célula tumoral, y la mata si el linfocito T es citotóxico.

Incluso se pueden hacer anticuerpos trispecíficos, en donde se ponen en contacto linfocitos T con células tumorales (en este caso el tumor es un mieloma, son plasmáticas que expresan en su membrana CD38)

Otra estrategia para aumentar la capacidad de destruir el tumor por parte del anticuerpo es añadirle un fármaco citotóxico. Es lo que ocurre con el fármaco biológico Trastuzumab emtansina, en donde emtansina tiene un efecto sobre los microtúbulos que favorece la destrucción de la célula que ha internalizado el anticuerpo

Fármacos antitumorales

	Pacientes	Coste medio por paciente (€)	Gasto (€)
Trastuzumab <sup>3</sup>	351	11.658,75	4.092.220,26
Trastuzumab emtansina <sup>4</sup>	30	33.402,23	1.002.066,88
Pertuzumab <sup>3</sup>	134	18.316,57	2.454.420,65
Bevacizumab <sup>5</sup>	331	10.362,96	3.430.138,90
Cetuximab <sup>6</sup>	164	8.026,86	1.316.405,83
Panitumumab <sup>6</sup>	65	11.286,19	733.602,21
Rituximab <sup>7</sup>	526	7.120,02	4.050.207,98
Total	1.601		17.079.062,71

<sup>3</sup>anti-HER2; <sup>4</sup>inhibidor microtubular; <sup>5</sup>anti-VEGF; <sup>6</sup>anti-EGFR; <sup>7</sup>anti-CD20

En esta Tabla se muestran los fármacos antitumorales más utilizados en la región de Murcia, el número de pacientes tratados y su coste. El presupuesto ejecutado de la Región de Murcia en farmacia hospitalaria es de unos 400 millones de euros al año

**MEDICAMENTOS DE TERAPIAS AVANZADAS.** Los medicamentos de terapia avanzada son medicamentos de uso humano basados en genes (terapia génica), células (terapia celular) o tejidos (ingeniería tisular) e incluyen productos de origen autólogo, alogénico o xenogénico. Constituyen nuevas estrategias terapéuticas y su desarrollo contribuirá a ofrecer oportunidades para algunas enfermedades que hasta el momento carecen de tratamientos eficaces. [https://www.aemps.gob.es/medicamentos-de-uso-humano/terapias-avanzadas/preg-resp\\_ta/#preg1](https://www.aemps.gob.es/medicamentos-de-uso-humano/terapias-avanzadas/preg-resp_ta/#preg1)

Otra estrategia aplicada a enfermedades infecciosas es la denominada "Transferencia de células T específicas". Como los linfocitos T reconocen complejos pMHC la transferencia de linfocitos T sólo se puede dar entre pacientes que compartan alelos HLA (allogénico) o que sean linfocitos T del propio individuo (autólogos). Los linfocitos T se cultivan in vitro con antígenos del microorganismo (por ejemplo EBV) y se expanden in vitro. Posteriormente estos linfocitos T se inyectan en el paciente. En este caso el propósito de este tratamiento es evitar la aparición de tumores de linfocitos B en trasplantes de médula ósea por la presencia de infecciones crónicas por el virus EBV (Virus de Epstein-Barr). También se está intentando hacer esta transferencia de linfocitos T en tumores. Para ello se **generan linfocitos T anti-tumorales in vitro** (por ejemplo incubando células dendríticas con cuerpos apoptóticos de células tumorales extraídas en una biopsia), crecerlas in vitro y re-inyectarlas en el paciente. Por ahora este tratamiento es anecdótico y en pacientes sin ninguna otra alternativa terapéutica

se clonase Receptor CAR

ANTICUERPO CONTRA AG EXPRESADO EN TUMOR (POR EJEMPLO αCD19)

1) 2) 3)

Construcción por Biología Molecular Receptor CAR

se logra transfectar a célula T (VIRUS)

Receptores CAR Células CAR-T

Receptor CAR α CD19

• linfocito CAR-T α CD19 NO procesado NO pMHC

• CD19 conjugación nativa

Transfección a linfocitos T de receptor CAR

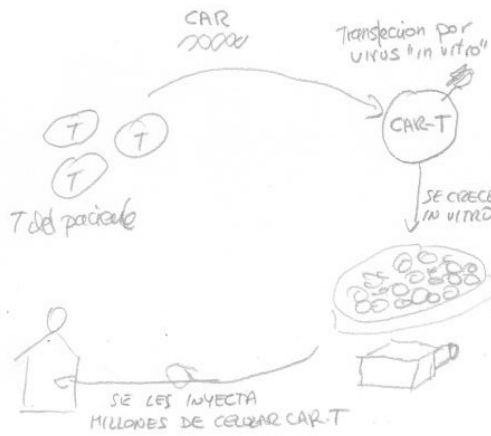
Otra estrategia terapéutica que se está intentando lograr es introducir en los linfocitos T del paciente portador del tumor genes que le permitan reconocer antígenos presentes en las células tumorales. Hay dos estrategias

1. Transfectar las cadenas alfa y beta del receptor de un linfocito T-anti-tumoral a otros linfocitos T, y así tener más linfocitos T anti-tumorales. Reconocerían complejos pMHC-I en las células tumorales. No es fácil de hacer porque hay cientos de neoantígenos en tumores
2. Transfectar unas moléculas denominadas CAR a linfocitos T. CAR es un receptor

Aquí se representa de una manera visual como la molécula CAR proviene de un anticuerpo, que por ejemplo reconozca la molécula CD20 o CD38 o HER-2, presente en células tumorales. Esta molécula CAR se debe transfectar en linfocitos T. Al expresarla en membrana se activa el linfocito T CAR-T (se le llama así porque es un linfocito T que expresa la molécula CAR) tras la unión

quimérico que en su región extracelular tiene los dominios VH y VL de un ANTICUERPO y el resto de la molécula CAR (transmembranosa e intracelular) está diseñada para poder transmitir señales a los linfocitos T. Los dominios VL y VH se unen a través de un péptido formando una estructura denominada scFv que se une al antígeno al que se unía el anticuerpo del que se han clonado sus regiones VH y VL

del CAR a su ligando presente en tumores. Por ello la región intracelular del receptor CAR tienen dominios presentes en moléculas que activan linfocitos T.

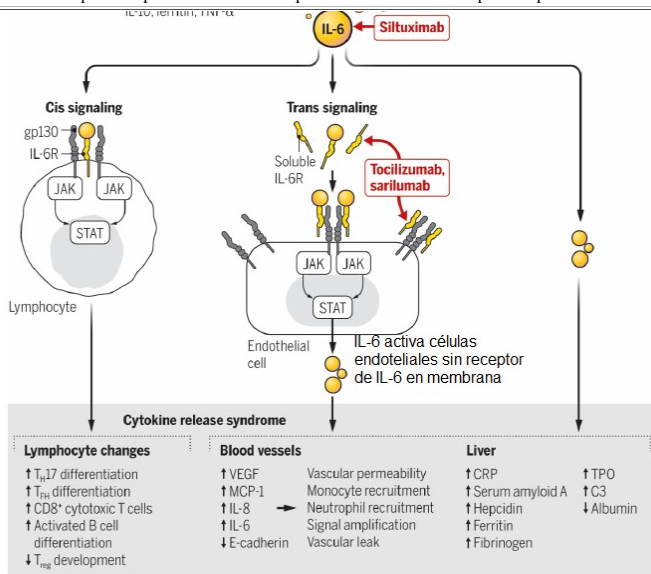


### Uso terapéutico de células CAR-T

Una complicación es el desarrollo de una respuesta hiperinflamatoria (tormenta de citoquinas) que se previene con la administración de anticuerpos anti-IL-6, aunque IL-6 no está producida por linfocitos CAR-T

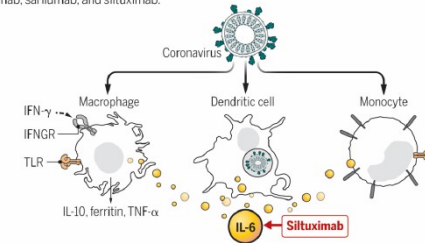
Puede que se produzca IL-6 en respuesta a los DAMPs liberados por células tumorales destruidas que inducen la producción de IL-6 por otras células (macrófagos, etc)

Este es el esquema de tratamiento con CAR-T. Se extraen linfocitos T del paciente, se les introduce (por infección viral) el receptor CAR, se crecen in vitro hasta tener millones de células CAR-T que son específicas frente a una proteína de membrana expresada por la célula tumoral, se le administra al paciente y si todo va bien se puede eliminar el tumor



### Pathways leading to cytokine release syndrome

Coronavirus infection results in monocyte, macrophage, and dendritic cell activation. IL-6 release then instigates an amplification cascade that results in cis signaling with T<sub>H</sub>17 differentiation, among other lymphocytic changes, and trans signaling in many cell types, such as endothelial cells. The resulting increased systemic cytokine production contributes to the pathophysiology of severe COVID-19, including hypotension and acute respiratory distress syndrome (ARDS), which might be treated with IL-6 antagonists such as tocilizumab, sarilumab, and siltuximab.



Tal y como hemos tratado en el tema 12-coronavirus, los pacientes con COVID-19 grave tienen la IL-6 elevada y ello también ocurre cuando se administra CAR-T cells.

Por ello en estos tratamientos es a veces necesario el uso de anticuerpos anti-IL-6

Un hecho interesante es como IL-6 se puede unir al receptor soluble de IL-6 en espacio extracelular y unirse el receptor soluble unido a IL-6 a otro receptor de membrana expresado en células endoteliales. Por ello IL-6 puede actuar sobre células que no expresan el receptor de IL-6, algo sorprendente.

C3, complement 3; CRP, C reactive protein; IFN-γ, interferon-γ; IFNGR, IFN-γ receptor; IL, interleukin; IL-6R, IL-6 receptor; JAK, Janus kinase; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; T<sub>H</sub>1, T follicular helper cell; T<sub>H</sub>17, T helper 17 cell; TNF-α, tumor necrosis factor-α; TLR, Toll-like receptor; TPO, thrombopoietin; T<sub>reg</sub>, T regulatory cell; VEGF, vascular endothelial growth factor.

<https://science.sciencemag.org/content/early/2020/04/16/science.abb8925>