

## REVISIÓN

# Biotecnología aplicada a la salud: el caso de la Esclerosis Múltiple. Parte 2

Carlucci, Adriana Mónica<sup>1,2</sup>; Olano, Mercedes<sup>3</sup>; Lavallaz, Lucas<sup>3</sup>; Sánchez, Florencia<sup>3</sup>; Rossi, Carla<sup>3</sup>; Sterin Prync, Aída Edith<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Tecnología Farmacéutica I, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>Biotecnología Farmacéutica, Departamento de Farmacia, Instituto Universitario del Hospital Italiano, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup>Biotecnología, Departamento de Bioquímica Aplicada, Instituto Universitario del Hospital Italiano, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Contacto:** Sterin Prync, Aída Edith; Potosí 4234, Ciudad Autónoma de Buenos Aires; aida.sterin@hospitalitaliano.org.ar

## Resumen

Este trabajo de revisión bibliográfica continuó con la profundización de los distintos aportes biotecnológicos que han permitido diseñar y aprobar los abordajes terapéuticos y diagnósticos relacionados con la patología esclerosis múltiple. Se abordaron las temáticas de los biofármacos, las bioterapias y los biomarcadores. Con respecto a los biofármacos, se desarrolló específicamente sobre los inmunoterápicos. En relación con bioterapias, se analizó el rol de la microbiota intestinal y su posible interrelación con el desarrollo de la esclerosis múltiple, y se analizó un ensayo clínico de fase II de terapias celulares y trasplante de células madre hematopoyéticas, que incluye una evaluación post trasplante de cinco años. Finalmente, se abordaron estudios dirigidos a encontrar potenciales biomarcadores diagnósticos.

**Palabras clave:** esclerosis múltiple, anticuerpos monoclonales, microbiota, biomarcadores.

## Abstract

In this review, we continue deepening on the different biotechnological contributions that have allowed to design and approve the therapeutic and diagnostic approaches related to multiple sclerosis in three aspects: biopharmaceuticals, biotherapies and biomarkers. Within biopharmaceuticals, we specifically addressed immunotherapy. In relation to biotherapies, we analyze the role of the intestinal microbiota and its possible interrelation with the development of multiple sclerosis, and a phase II clinical trial of cell therapies and transplantation of hematopoietic stem cells with an evaluation of 5 years post-transplant. Finally, studies aimed at finding potential diagnostic biomarkers are discussed.

**Keywords:** multiple sclerosis, monoclonal antibodies, microbiota, biomarkers.

## Introducción

Como se mostró en el trabajo de revisión “*Biotecnología aplicada a la salud: el caso de la Esclerosis Múltiple. Parte 1*” publicado en esta revista, la esclerosis múltiple (EM) es considerada una patología autoinmune con un componente genético y se caracteriza por episodios delimitados y separados en el tiempo de trastornos neurológicos atribuibles a lesiones de la mielina.

Su histopatología clásica muestra una infiltración perivascular de células del sistema inmunológico a través de la barrera hematoencefálica. Estas células invaden el parénquima encefálico y provocan la desmielinización mediante la destrucción directa de la mielina, activando una reacción inflamatoria local mediada por la microglía residente, o causando la apoptosis oligodendrocitaria por mecanismos tóxicos locales<sup>1</sup>. En la mayor parte de los pacientes con EM, la enfermedad sigue un curso de episodios de deterioro neurológico remitentes y recidivantes.

La mayoría de los tratamientos actuales, con los que se pretende controlar la respuesta inmunitaria, tienen como objetivo disminuir la frecuencia e intensidad de las recaídas, y no están orientados a lograr la recuperación de la función que se ha perdido.

## Tipos de EM

- Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente (EMRR): es el tipo de EM más habitual. Los síntomas se presentan en forma de brotes que pueden durar días, semanas e incluso meses y varían de un episodio a otro, según la zona del sistema nervioso central (SNC) afectada.
- Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva (EMPP): un 12% de los pacientes padece este tipo de EM. La aparición de los síntomas se produce de forma progresiva, especialmente los relacionados con la habilidad de caminar y la fuerza motora.

- Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva (EMSP): un 25% de las personas que padecen EM Remitente Recurrente evolucionan con un empeoramiento neurológico progresivo que deriva, con los años, en este tipo de EM.
- Esclerosis Múltiple Progresiva Recurrente (EMPR): es la variante menos habitual. La sufre sólo un 3% de los pacientes con EM y se caracteriza por una progresión constante de la enfermedad desde su inicio, y por exacerbaciones ocasionales en su evolución<sup>2</sup>.

## Rol de los linfocitos B

Los linfocitos B juegan un papel importante en la patogénesis de la EM, puesto que pueden producir citoquinas proinflamatorias. Estas son potentes células que presentan antígenos y están implicadas en la activación de las células T proinflamatorias. Las mismas, al diferenciarse en células plasmáticas pueden producir autoanticuerpos dirigidos contra la mielina, causando, así, un ataque mediado por el complemento conocido como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)<sup>3</sup>.

## Biofármacos inmunoterapéuticos. Nomenclatura y conformación de anticuerpos monoclonales (mAbs)

La nomenclatura establecida por consenso internacional para nombrar a los mAbs, denominada *International Non-proprietary Names*, se compone de un nombre de fantasía seguido de un prefijo, que indica la clase de objetivo y de otro que indica la especie en la cual se basa la secuencia de la inmunoglobulina [tabla I]<sup>4</sup>. Se muestran en la Tabla II algunos ejemplos de los mAbs inmunoterapéuticos<sup>5</sup>.






## Impacto de la formulación en el producto conteniendo un anticuerpo monoclonal

Un mAb es una macromolécula cuya actividad biológica está íntimamente relacionada con su estabilidad estructural.

**Tabla I.** Nomenclatura internacional de anticuerpos monoclonales<sup>4</sup>.

Nombre	Nombre-Target	Origen	Tipo anticuerpo
Elegido por el fabricante	-B[a]- bacteriana	A: rata	mab: monoclonal
	-C[i]- cardiovascular	Axo: híbrido ratón-rata	
	-F[u]- hongo	E: hámster	
	-Gr[o]- musculoesquelética	I: primate	
	-K[i]- interleukina	O: ratón	
	-I[i]- inmunomodulador	U: humano	
	-N[e]- neural	Xi: quimérico	
	-S[o]- hueso	Xizu: quimérico humanizado	
	-Tox[a]- toxina	Zu: humanizado	
	-T[u]- tumoral		
	-V[i]- viral		

**Tabla II.** Caracterización de los distintos anticuerpos monoclonales utilizados como biofármacos inmunoterapéuticos<sup>5</sup>.

Tipo de anticuerpo	Descripción	Forma de obtención	Ejemplo mAb y nomenclatura	Características	Línea celular utilizada	Mecanismo de acción
1ª generación Murino Inmunogenicidad: alta ratón   100%.	Estructura compuesta de proteína murina en un 100%.	Se inmuniza a un ratón, se extraen células B y se fusionan con células B tumorales (mielomas no formadoras de anticuerpos), se selecciona un hibridoma para que se replique y secrete los mAbs.	Ibritumomab Ibri = nombre tu (m) = tumoral o = ratón / murino mab = monoclonal.	IgG1 de ratón marcado con Itrio 90 (isótopo radiactivo) Usado en tratamiento concomitante con Rituximab.	Células NSO	Unión específica al antígeno CD20 de la superficie de linfocitos B malignos y normales.
2ª generación Quimérico Inmunogenicidad: intermedia/alta Quimera   25% ratón.	Las porciones constantes de las cadenas pesadas y livianas provienen de humano (75%) y las regiones variables se obtienen de anticuerpos murinos (25) %.	Se seleccionan los genes de las regiones variables de un hibridoma deseado, se amplifican por PCR y se ligan a un plásmido. Por otro lado, los genes de las regiones constantes de las cadenas pesadas humanas se amplifican y se ligan a otro plásmido. Se co-transfecta con ambos plásmidos una célula huésped que producirá el anticuerpo quimérico recombinante.	Rituximab Ri = nombre tu = tumoral xi = quimérico mab = monoclonal	IgG1 En fase III para EM.	Células CHO	Anticuerpo citotóxico dirigido a los linfocitos B CD20+.
3ª generación Humanizado Inmunogenicidad: Intermedia/ Baja Humanizado   10% ratón	Estructura con componentes de origen murino (10%) y humano (90%).	Similar al quimérico, pero sólo las regiones hipervariables son de origen murino.	Daclizumab Dac = nombre li = inmunomodulador zu = humanizado mab = monoclonal.	IgG1 Aprobado en 2016 para EM.	Células NSO.	Se une a la subunidad $\alpha$ (CD25) del receptor de IL-2. Induce la expansión
4ª generación Humano Inmunogenicidad: baja   100% Humano.	La estructura del anticuerpo se compone de proteína humana en un 100%.	Se modifica genéticamente a un ratón para que produzca inmunoglobulinas humanas. Se fusionan linfocitos B de este ratón con linfocitos B tumorales para crear un hibridoma que generará los anticuerpos humanos.	Ofatumumab Ofa = nombre tu = tumoral u = humano mab = monoclonal	IgG1 En fase III para EM.	células NSO.	Unión a la célula CD20 generando citólisis por medio de CDC y en menor medida por ADCC.
Fab Inmunogenicidad dependiente del origen.  	Es el fragmento de la región de unión al antígeno (Fab).	Se obtienen a partir de digestiones enzimáticas de anticuerpos intactos o sintetizados usando tecnología de ADN recombinante.	Certolizumab Certo = nombre li = inmunomodulador zu = humanizado mab = monoclonal	Fragmento Fab recombinante de anticuerpo humanizado.	Obtenido por recombinación genética y expresión en Escherichia coli.	Unión e inhibición del TNF $\alpha$ . Se utiliza en artritis reumatoide, artritis psoriásica.

► NK: Natural Killer o asesinos naturales; NSO: células de mieloma murino; CHO: Células de Ovario de Hámster chino; CDC: Citotoxicidad Dependiente de Complemento. IL2: Interleukina 2.

**Tablas III.** Tipos de degradación más frecuentes<sup>6</sup>.

Tipo degradación	Características		Factores que inducen degradación	
Física	La más común es la agregación, las moléculas se unen para formar oligómeros u agregados que pueden ser solubles o insolubles, invisibles o visibles.		Temperatura	
			Stress mecánico	
			Proceso de congelamiento / descongelamiento	
			Formulación	pH
Fuerza iónica				
Concentración				
Química	A través de modificaciones en los aminoácidos.	Oxidación	Fundamentalmente el pH: influye en la ionización de los grupos de los aminoácidos de la superficie proteica, que establecen las interacciones electrostáticas para mantener la estructura nativa.	
		Fragmentación		
		Entrecruzamiento		
		Deamidación		

ral, conformacional y química, al igual que otros biofármacos. Su patrón de degradación es similar a estos, y puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo. Por ello, es aconsejable tener una comprensión integral de las potenciales vías de degradación, tanto física como química (tablas III y IV). Sólo un 0,01 % de la dosis aplicada de numerosos mAbs es capaz de llegar al objetivo a tratar, por lo que las concentraciones aplicadas suelen ser elevadas. Administrar una alta dosis es posible sólo por vía intravenosa y conlleva a un alto costo sanitario. Por lo tanto, es deseable que la formulación sea adecuada para la administración subcutánea, aunque presenta una mayor inmunogenicidad y un límite de 2 mL / dosis. Dentro de los biofármacos, los mAbs son el segmento de mayor crecimiento y por sus características representan un desafío en cuanto a la formulación, el tipo de envase primario, la conservación y la manipulación de disolventes en la dilución pre-administración; información que se determina durante los estudios de estabilidad<sup>6</sup>.

#### Inmunoterapéuticos usados en EM

En la tabla V se muestra un resumen de los sistemas de producción, los blancos terapéuticos y los efectos clínicos de los biofármacos inmunoterapéuticos aprobados para el tratamiento de la EM<sup>7</sup>.

En la tabla VI se describen las características de las formulaciones de los mAbs utilizados como inmunoterapéuticos en esta patología<sup>7-12</sup>.

#### Ocrelizumab

Es el primer tratamiento autorizado para la EMPP y la EMRR. Fue aprobado en el año 2017 por la FDA y la EMA. Su seguridad a largo plazo se evalúa en los programas de post comercialización<sup>13</sup>.

Su antecedente es el Rituximab, un mAb de 2º generación [quimérico] anti CD20, que comenzó a utilizarse en la EM *off level* sin el estudio clínico correspondiente, pero con resultados preliminares alentadores; que llevaron al desarrollo de un mAb anti CD20 de 3º generación (humanizado): el Ocrelizumab.

Con esta última droga se realizaron los estudios clínicos

**Tabla IV.** Estrategias de estabilización en la formulación de biofármacos<sup>6</sup>.

Estabilizadores	Función
Tensioactivos	Estabilizan la estructura nativa de moléculas que presentan fenómenos de inestabilidad interfacial.
Azúcares y Polioles	Son crioprotectores durante la liofilización y estabilizan la conformación proteica en fórmulas líquidas.
Sales	Se usan como solubilizantes y / o estabilizadores de conformación.

**Tabla V.** Comparación de los distintos biofármacos inmunoterapéuticos para EM<sup>7-10</sup>.

	Producción	Target	Efectos en el SI	Indicación	Mejoras clínicas	Efectos adversos
<b>Natalizumab [2004] *</b>	mAb humanizado recombinante anti $\alpha$ 4 integrina IgG4k producido en células NS0.	Se une a la $\alpha$ 4 integrina VLA4 implicada en la migración de linfocitos T.	Aumenta el número de leucocitos circulantes (incluyendo linfocitos, monocitos, basófilos y eosinófilos). No afecta neutrófilos.	US: EMRR Europa: segunda línea en EMRR, primera línea en EMRR severo / agresivo.	Reducción de: TAR: 68 % y PVC: 44 %. Cambios MRI: 92 % menos lesiones de Gd+ y 83 % de reducción de las lesiones hiperintensas T2 nuevas o de reciente ampliación. Reducción progresión de la discapacidad: 24 % <sup>1</sup> .	Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva. Hipersensibilidad Inmunosupresión / Infecciones <sup>1</sup> .
<b>Alemtuzumab [2014] *</b>	mAb humanizado contra la glicoproteína de superficie celular CD 52. IgG1 $\kappa$ . Producción: células CHO en suspensión.	Antígeno CD52 expresado en altos niveles en linfocitos T y B (en menor medida en monocitos, macrófagos y linfocitos citolíticos naturales).	Disminución del nivel de los linfocitos T y B circulantes muy rápidamente, los valores más bajos se observan dentro de los días postratamiento.	US: Tercera línea de tratamiento para EMRR. Europa: EMRR activa.	Reducción de la TAR: 49%. Reducción PVC: 24 – 42 % . Cambios MRI: menos lesiones T2 y T1. Libres de signos por MRI: 68,4 % a los 3 años. 70 % igual o mejor a los 4 años <sup>1</sup> .	Por la infusión: náuseas, cefalea, taquicardia, urticaria, exantema, prurito, fiebre y fatiga. Infección del tracto respiratorio superior y urinario. Enfermedades autoinmunes: trastornos tiroideos y púrpura trombocitopénica inmune <sup>1</sup> .
<b>Daclizumab [2016] *</b>	mAb IgG1 humanizado anti-CD25. IgG1k humanizada, expresada en células NS0.	Se une a la subunidad $\alpha$ del receptor de la IL2 conduciendo a un antagonismo selectivo de las respuestas de células T activadas y la expansión de las células NK de inmunorregulación.	Expansión en células CD56 bright NK. Los linfocitos totales, los linfocitos T CD4 + y CD8 + y los recuentos de células B disminuyen $\leq$ 10 % de la línea de base durante el primer año de tratamiento.	USA: Tercera línea para EMR Europa: segunda línea para EMR o primera línea para EMR agresiva.	Reducción de la TAR: 45 % menos Reducción PVC: 7 % Cambios MRI: reducción del 85 % en probabilidades de nuevas lesiones de Gd+; Reducción del 54 % en el número de lesiones hiperintensas T2 nuevas o de nueva ampliación [96 semanas] Reducción progresión de la discapacidad: 57 % <sup>2</sup> .	Alteraciones hepáticas e Inmunológicas. Reacciones cutáneas. Infecciones. Depresión y suicidio <sup>1</sup> .
<b>Ocrelizumab [2017] *</b>	mAb humanizado recombinante expresado en células CHO.	Se dirige selectivamente a células B que expresan CD20.	Afecta a las células pre-B, células B maduras y células B de memoria; las células madre linfoides y las células plasmáticas no se ven afectadas.	EMR o EMPP	Reducción de la TAR: 46 % Reducción PVC: No hay datos. Cambios MRI: 94 % de reducción en las lesiones de Gd+; 77 % de reducción en las lesiones hiperintensas T2 nuevas o que se agrandan. Reducción progresión de la discapacidad: 40 % <sup>2</sup> .	Infecciones respiratorias, reacciones a la infusión, reactivación de hepatitis B, probable riesgo aumentado de cáncer <sup>2</sup> .

► \*Año de aprobación. SI: sistema inmune, TAR: tasa anual de recaídas; PVC: volumen cerebral; MRI: imagen por resonancia magnética, Gd+: mejorado con gadolinio.

de seguridad y eficacia como tratamiento específico para EM. En el ensayo clínico "Oratoria" con Ocrelizumab para pacientes con EMPP, se aplicó el criterio de "No Evidencia de Progresión o Actividad de la Enfermedad", un nuevo objetivo clave para determinar en qué medida se consigue controlar la EM<sup>13</sup>.

En un estudio comparativo se concluyó que Ocrelizumab es menos inmunogénico que el Rituximab, aumenta los efectos de ADCC, disminuye la citotoxicidad dependiente de complemento y mejora la unión al receptor de inmunoglobulinas FcγRIIIa (CD16)<sup>7</sup>.

### **Bioterapias. Microbiota intestinal. Eje Gastrointestinal-Sistema Nervioso**

La microbiota humana esta constituida por las diez a cien trillones de células microbianas simbióticas albergadas en cada persona, principalmente bacterias en el intestino. El microbioma humano consiste en los genes que estas células albergan.

La microbiota se adquiere con rapidez durante y después del nacimiento, y cambia de forma continua durante el crecimiento. Las condiciones iniciales del parto (natural o cesárea), del entorno inmediato, así como la alimentación (lactancia materna o artificial) condicionan qué microorganismos colonizan nuestro intestino, el resto de las mucosas y la piel.

Las funciones más importantes de la microbiota intestinal son: metabólicas, nutritivas o tróficas, protectoras e inmunitarias; además produce neurotransmisores como la serotonina, la acetilcolina, la triptamina, las catecolaminas y el ácido gamma aminobutírico (GABA).

Por otra parte, los metabolitos microbianos pueden inducir la secreción de sustancias neuromoduladoras por células enterocromafines del epitelio, neuronas o células inmunitarias. Su alteración cuali y/o cuantitativa se denomina disbiosis, pudiendo tener consecuencias digestivas y sistémicas como alteraciones metabólicas e inmunológicas, entre otras.

El tracto gastrointestinal (TGI) tiene un sistema nervioso intrínseco, el sistema nervioso entérico (SNE), que controla las funciones del intestino.

El TGI es el sistema que tiene un mayor número de neuronas, luego del cerebro, comparables a las que se encuentran en la médula espinal. Su comunicación con el SNC se establece través de dos vías: la eferente, que proporciona señales retransmitidas al SNE, para controlar el intestino; y la aferente, que envía información sobre el contenido y el estado mecánico de la pared intestinal.

El eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal (HPA) libera glucocorticoides, mineralocorticoides y catecolaminas en respuesta al estrés, y puede alterar la composición microbiana del epitelio intestinal, los procesos metabólicos y las respuestas inmunes.

El intestino contiene la mayor tasa de colonización del organismo y alberga al 70 - 80% del sistema inmune (SI). El SNE interactúa con el SI, que regula su desarrollo tanto

innato como adaptativo. El SI adaptativo interactúa con la microbiota intestinal; las células T auxiliares Th17 que prevalecen en intestino y que son importantes para la defensa del huésped, porque secretan citoquinas implicadas en la regulación de la inflamación (IL-17A, IL-17F, IL-22). Por otro lado, las células T reguladoras antiinflamatorias (Treg) se encuentran en una proporción dos a tres veces mayor en el TGI que en otros tejidos, el desarrollo del SI y sus respuestas, están influenciadas por la microbiota<sup>14</sup>.

### **Rol del eje TGI - SNC en la EM**

Estudios preclínicos y clínicos indicaron que en la EM el eje TGI-SNC exhibe el potencial para atenuar los mecanismos patológicos en el contexto de la autoinmunidad del SNC. El modelo experimental más utilizado en animales es la encefalitis alérgica experimental (EAE). En este y otros modelos experimentales se ha demostrado un vínculo claro entre la composición de la microbiota gastrointestinal y los efectos patológicos en el SNC. En ratones con EAE tratados con antibióticos o mantenidos libres de gérmenes, se observó una disminución significativa en la gravedad de la EM. Por otra parte, el efecto protector observado se asocia con una corrección del desequilibrio en las respuestas de las células T en el TGI y el SNC, a través de la disminución de las células Th1 y Th17 y de las citoquinas IFN e IL-17 y el incremento de la respuesta celular antiinflamatoria Treg y la secreción de IL-10 e IL-13<sup>14</sup>.

En resumen, el microbioma intestinal está implicado en la modulación de la neuro-inflamación de la EAE. Es por eso que, se postula que la modificación programada de la microbiota intestinal podría promover mecanismos intrínsecos de protección antiinflamatoria.


















### **Prebióticos y Probióticos. Bacterias involucradas en la EM**

Los prebióticos son aquellos compuestos no digeribles que favorecen el desarrollo y establecimiento de la flora bacteriana benéfica en el colon. Un probiótico es aquel microorganismo vivo que, cuando se consume en cantidades adecuadas como parte de un alimento, confiere al huésped un beneficio para la salud; un simbiótico es aquel producto que incorpora conjuntamente prebióticos y probióticos.

El tratamiento con el probiótico *Lactobacillus farciminis* disminuye la hiper-permeabilidad intestinal en ratones con EAE, esto resulta en una disminución de respuesta del eje HPA y de la actividad neuro-inflamatoria. *Faecalibacterium prausnitzii* exhibe propiedades antiinflamatorias mediadas por producción de butirato, así como la secreción de moléculas antiinflamatorias microbianas. Además, las especies probióticas de *Lactobacillus* reducen las respuestas del eje HPA relacionadas al stress y niveles elevados de glucocorticoides, atenuando la neuro-inflamación.

Por otro lado, se realizaron estudios con pacientes con EM y controles sanos en los que se reportaron diferencias significativas en la composición de la microbiota, en cuanto a diversidad y riqueza<sup>14</sup>.

**Tabla VI.** Características de las formulaciones de los mAbs utilizados como inmunoterápicos para el tratamiento de EM<sup>7-12</sup>.

	Composición cualitativa	Forma farmacéutica-vía administración	Dosis	Conservación
Alemtazumab	Alemtuzumab 10 mg/ml Fosfato disódico Edtato disódico Cloruro de potasio. Dihidrógeno fosfato de potasio Polisorbato 80 Cloruro de sodio Agua calidad inyectable (WFI).	Solución concentrada, IV.	12 mg/día IV en 2 cursos de tratamiento. -1º: 12 mg/día durante 5 días - 2º: 12 mg/día durante 3 días, 12 meses después del tratamiento inicial.	  
Natalizumab	Natalizumab 20 mg/ml. Fosfato monobásico sodio monohidrato Fosfato dibásico de sodio heptahidrato Cloruro sódico Polisorbato 80 WFI.	Solución concentrada, IV.	300 mg cada 4 semanas.	    Solución diluida: usar inmediatamente o conservar a 2 – 8 °C y perfundir dentro de las 8 horas.
Daclizumab	Daclizumab 150 mg Succinato de sodio Ácido succínico Cloruro de sodio Polisorbato 80 WFI.	Solución, vía SC.	150 mg/ mes.	  
Ocrelizumab	Ocrelizumab 30 mg/ml Ácido acético glacial Polisorbato 20 Acetato de sodio trihidratado Trehalosa dihidratada WFI.	Solución, IV.	Inicial: 300 mg, 2da dosis a las 2 semanas. Mantenimiento: 600 mg cada 6 meses.	    No agitar. Si no se usa inmediatamente, guardar hasta 24 horas en heladera u 8 horas a temperatura ambiente, incluyendo el tiempo de infusión.
Rituximab	Rituximab. 10 mg/ml Citrato sódico Polisorbato 80 Cloruro de sodio (Hidróxido de sodio y/o Ácido clorhídrico). WFI	Solución, IV.	Uso off label*	 
Ofatumumab	Ofatumumab 20 mg/ml L-Arginina Acetato de Sodio Cloruro de Sodio Polisorbato 80 EDTA Ácido clorhídrico WFI.	Solución, IV.	Uso off label*	  



No congelar



Conservar en heladera



Conservar al abrigo de la luz

► \*Indicaciones médicas fuera de prospecto (*off label*) indicaciones cuya finalidad no fue evaluada respecto de la calidad, eficacia y seguridad en el proceso de registro solicitado. Las indicaciones *off label* son de exclusiva responsabilidad del médico tratante.

En conclusión, el eje intestinal-CNS representa un objetivo prometedor para modular los procesos inflamatorios crónicos mediante el apoyo de mecanismos intrínsecos de protección-regulación inmune.

**Terapias Celulares. Trasplante de Células Madre Hematopoyéticas**

**Ensayo clínico fase II**

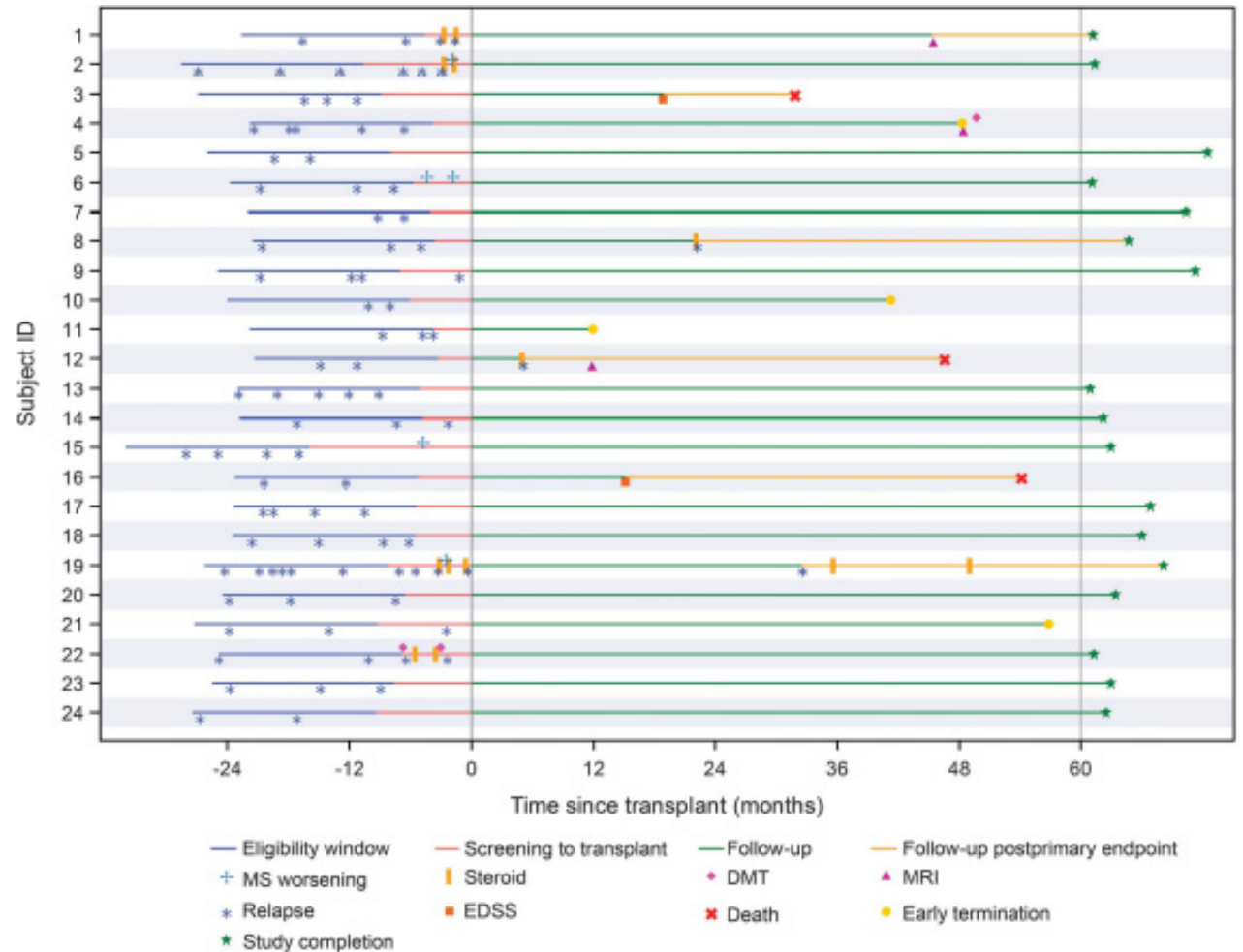
Nash A y col. realizaron un ensayo clínico de terapia con altas dosis de inmunosupresión (TADI) seguido de trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas (TCMH) en pacientes con EM. Este ensayo clínico de fase II consistió en seleccionar pacientes con EMRR que presentaban recaídas con progresión de la discapacidad, y se habían tratado con más de dos inmunoterapéuticos. Para llevar a cabo el ensayo Nash A y col. se desarrollaron los siguientes pasos:

1. Extraer las células madre hematopoyéticas (CMH) [CD34] de sangre periférica, de los pacientes.
2. Administrar altas dosis de quimioterapia en un esquema carmustina, etopósido, citarabina y melfalán (BEAM) e inmunoglobulina de conejo antitimocitos humano.
3. Infundir las CHM [CD34] extraídas previamente.

4. Administrar el factor estimulante de granulocitos Filgrastim, hasta recuperar el recuento celular apropiado.
5. Administrar el corticoide prednisona durante aproximadamente un mes.

Se tomó como punto de evaluación la primera actividad de la enfermedad, ya sea a través de la progresión de la discapacidad (EDSS), recaída o presencia de una nueva lesión en las imágenes del estudio por resonancia magnética (MRI). Los efectos adversos que observaron fueron principalmente citopenias e infecciones. De los 24 pacientes que participaron en el ensayo: 3 murieron a causa de la progresión de la enfermedad, no asociado a efectos adversos del trasplante; 7 no mantuvieron una sobrevida libre de eventos; 2 aumentaron en 0,5 puntos el EDSS; 3 tuvieron recaídas clínicas y 2 desarrollaron nuevas lesiones comprobadas por MRI. La sobrevida de los pacientes a los cinco años post tratamiento fue del 91,3 % libre de progresión, 86,9 % libre de recaídas, 86,3 % libre de actividad por MRI. La probabilidad estimada de sobrevida libre de eventos a los 5 años fue del 69,2 %. La actividad de la EM se redujo en los participantes después del trasplante, en comparación con la actividad previa al tratamiento<sup>15</sup>.

**Figura 1.** Diagrama de flujo de los participantes del estudio clínico de Nash A. y col.<sup>18</sup>.



**Tabla VII.** Biomarcadores estudiados para detección y seguimiento de EM<sup>16</sup>.

Posibles marcadores		
Tipo	Ejemplos	Observaciones
Lípidos	Colesterol	En el SNC, la mayoría del colesterol está en las vainas de mielina de los axones neuronales.
	Fosfolípidos oxidados	Los compuestos resultantes de la oxidación de fosfolípidos celulares se observaron en lesiones del SNC de pacientes con EM, en particular los isoprostanos.
	Oxysteroles	Dado su especificidad los niveles del 24S-hidroxicolesterol en suero y del 7-cetocolesterol en LCR se han propuesto como biomarcadores de EM.
Proteínas	Marcadores de superficie celular	Se observó disminución de VLA-4 en las células T CD8+ y CD4+ (CD45RO+) después del tratamiento con IFN- $\gamma$ . Se observó un aumento de linfocitos T CD45RA <sup>+</sup> ICAM-3 <sup>+</sup> en sangre periférica y LCR de pacientes con EMRR. <sup>1</sup>
	Citoquinas y quimiocinas	Están siendo estudiados como posibles biomarcadores: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF), interleucina (IL)-6, IL-17, IL-17A e IL-17F, IL-1, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$ , la expresión de CXCL12 y CXCL13 y la combinatoria de CSF CXCL13, IL-8 e IL-12p40.
	Marcadores inflamatorios	Las metaloproteinasas de matriz (MMP), como MMP-2 y MMP-9 se encontraron aumentadas en el LCR y / o el suero durante las recaídas de la EM y se correlacionaron con la actividad de la EM.
	Proteínas específicas del SNC	Se informó que un aumento del péptido MBP (producto de degradación de la proteína básica de la mielina), correlaciona con la actividad de la enfermedad.
Anticuerpos	Bandas oligoclonales (OCB) en Líquido Céfalo Raquídeo (LCR)	Un grupo distintivo de dos o más bandas de inmunoglobulina (Ig) derivadas de un conjunto restringido de clones de células B.
	Autoanticuerpos	Aumento de autoanticuerpos anti-mielina en la circulación y el LCR de pacientes.
microRNA (miARN) <sup>2</sup>	ARN pequeño y no codificante, con función regulatoria sobre la expresión de genes. Se encuentra dentro de vesículas extracelulares (Exosomas) que se liberan de las células tras la fusión de la membrana plasmática con un compartimento endocítico intermedio, el cuerpo multivesicular (MVB).	Se identificaron miARNs que discriminan entre individuos sanos y pacientes con EMRR o EMPP y, miARNs que distinguen entre estos dos grupos de pacientes.

## Perspectivas

Estos resultados, muestran que el tratamiento de TADI con TCMH, sin terapia de mantenimiento post trasplante, fue efectiva para inducir una remisión sostenida a largo plazo (cinco años) en EMRR activa. Esto representa una potencial opción terapéutica para pacientes con EMRR que fracasan con inmunoterapia convencional, a confirmar con otros ensayos clínicos en curso.

## Nuevos blancos diagnósticos y terapéuticos

### Biomarcadores diagnósticos para EM

Un biomarcador es un indicador que refleja un proceso biológico, una actividad de una enfermedad o una respuesta a una intervención terapéutica. Se investigaron principalmente en modelos animales de EAE biomarcadores de diversas estructuras para ayudar al diagnóstico y seguimiento de EM (Tabla VII).

La identificación de nuevos biomarcadores para EM continúa siendo un desafío debido a la naturaleza de la enfermedad, a su etiología y a los numerosos aspectos fisiopatológicos, aún desconocidos. Cabe destacar que el biomarcador ideal debe proporcionar información diagnóstica, pronóstica y terapéutica adicional a la que se obtiene a partir de los datos clínicos del paciente, entre otras características<sup>16</sup>.

## Discusión

En los últimos años ha habido un gran avance en la comprensión de la patogénesis de la EM. Un abordaje más detallado de su inmunopatología debería conducir a una mejor comprensión de la enfermedad, de su evolución y de nuevos blancos terapéuticos, si se sigue la tendencia actual de dirigir las respuestas terapéuticas de manera de equilibrar los mecanismos relacionados con el SI. El avance en el diseño y optimización, tanto de los procesos de obtención y purificación como de la elaboración y control de una formulación biofarmacéutica apropiada, es posible gracias a la colaboración interdisciplinaria, en campos como la medicina, la biología, la microbiología, la genética, la genómica, la bioquímica, la farmacología, la bioinformática y la biotecnología. Sus aportes acelerarán los tiempos para que nuevas alternativas terapéuticas y diagnósticas se sumen a las que ya se encuentran disponible, con nuevos enfoques y abordajes alternativos y complementarios de las inmunoterapias aprobadas, dando así, esperanzas al padecer de los enfermos. Sin ninguna duda, esta historia continuará.

## Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Susana Llesuy y al Dr. Miguel De Cristófano, por su apoyo y colaboración en la corrección de este artículo.

El trabajo de revisión fue realizado de manera conjunta para la asignatura Biotecnología del último año de la carrera de Bioquímica, del Instituto Universitario del Hospital Italiano de Buenos Aires.

## Referencias Bibliográficas

1. Aved, A., Reder AT., 2006. Therapeutic role of beta-interferons in multiple sclerosis. *Pharmacol Ther.* 110:35–56.
2. Hutchinson M., 2007. Natalizumab: A new treatment for relapsing remitting multiple sclerosis. *Ther Clin Risk Manag*; 3: 259–268.
3. Wu G.F, Álvarez E, 2011. The immuno-pathophysiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin.*; 29 (2): 257–278. doi: 10.1016/j.ncl.2010.12.009.
4. WHO Report, 2017. Revised monoclonal antibody (mAb) nomenclature scheme Geneva, 26 May 2017. Disponible en: [https://www.who.int/medicines/services/inn/Revised\\_mAb\\_nomenclature\\_scheme.pdf](https://www.who.int/medicines/services/inn/Revised_mAb_nomenclature_scheme.pdf)
5. Scheen AJ 2009. Nomenclature internationale des différents types d'anticorps monoclonaux. *Rev Med Liège* 64: 5-6: 244-247.
6. Goswami S, Wang W, Arakawa T et al, 2013. Developments and Challenges for mAb-Based Therapeutics. *Antibodies*; 2: 452-500.
7. Sorensen PS, Blinkenberg M., 2016. The potential role for ocrelizumab in the treatment of multiple sclerosis: current evidence and future prospects. *Ther Adv Neurol Disord.*; 9: 44-52
8. Ficha técnica Tysabri®. Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_Product\\_Information/human/000603/WC500044686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_Product_Information/human/000603/WC500044686.pdf)
9. Ficha técnica Lemtrada®. Disponible en: [https://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2013/20130912126598/anx\\_126598\\_es.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2013/20130912126598/anx_126598_es.pdf)
10. Ficha técnica Zinbryta®. Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_Product\\_Information/human/003862/WC500210598.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_Product_Information/human/003862/WC500210598.pdf)
11. Ficha técnica de Rebif®. Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_Product\\_Information/human/000136/WC500048681.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_Product_Information/human/000136/WC500048681.pdf)
12. Ficha técnica Azerra®. Disponible en [https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/azerra-epar-product-information\\_es.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/azerra-epar-product-information_es.pdf)
13. OCREVUS® [ocrelizumab] injection, for intravenous use Initial U.S. Approval: 2017. Disponible en: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/761053lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/761053lbl.pdf)
14. Fleck AK, Schuppan D, Wiendl H, et al. 2017. Gut-CNS-Axis as Possibility to Modulate Inflammatory Disease Activity-Implications for Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.*; 18: 1526.
15. Nash RA et al 2017. High-dose immunosuppressive therapy and autologous HCT for relapsing-remitting MS. *Neurology*; 88 :842-852.
16. Harris VK, Sadiq SA, 2014. Biomarkers of Therapeutic Response in Multiple Sclerosis: Current Status *Mol Diagn Ther.*; 18(6): 605–617.