



COMENTARIO EDITORIAL

Anticuerpos anti-eritropoyetina recombinante

R. Peces

Servicio de Nefrología. Hospital Universitario La Paz. Madrid.

El gen de la eritropoyetina humana fue clonado en 1985¹, y la eritropoyetina humana recombinante (rHuEPO) fue comercializada en Europa a partir de 1988 para el tratamiento de la anemia de los pacientes en diálisis. La rHuEPO es una hormona de sialoglicoproteína que parece ser inmunológica y biológicamente equivalente al compuesto endógeno, estimulando la eritropoyesis de manera dosis-dependiente. El producto recombinante es estructuralmente muy similar a la eritropoyetina humana nativa, existiendo un péptido de 193-aminoácidos del cual se escinde una secuencia principal de 27-aminoácidos. Las evidencias indican que el residuo de arginina en el extremo carboxiterminal ha sido también eliminado en ambas, la rHuEPO y la eritropoyetina nativa aislada de la orina humana². La proteína madura de 30.400 daltons y 165-aminoácidos, contiene 2 puentes disulfuro, 3 cadenas de carbohidratos con enlaces (N) a asparragina y 1 cadena de carbohidrato con enlace (O) a serina. Cada una de las cadenas ligada a (N) puede contener un máximo de 4 residuos de ácido siálico y la cadena ligada a (O) puede contener hasta 2 residuos de ácido siálico. Las unidades de carbohidrato y ácido siálico se requieren para la estabilidad *in vivo*³. La extensa glicosilación de la proteína da lugar a cierta heterogeneidad de las moléculas de rHuEPO, existiendo varias isoformas^{4,6}. Las dos eritropoyetinas comercializadas tienen ligeras diferencias en la glicosilación, así la alfa tiene más residuos de ácido siálico que la beta⁷.

A pesar del hecho de que la rHuEPO es producida en líneas celulares de mamíferos y a pesar de su amplia utilización durante los últimos 13 años, inicialmente ha existido relativamente poca informa-

ción disponible con respecto a su carácter inmunogénico. Durante este tiempo sólo se comunicaron algunos casos esporádicos, bien documentados, de formación de anticuerpos anti-rHuEPO^{8,9}. En 1996 tuvimos ocasión de estudiar y comunicar uno de los primeros casos en la literatura mundial de desarrollo de anticuerpos anti-eritropoyetina en un paciente con insuficiencia renal crónica en tratamiento con hemodiálisis⁹. Entonces describimos también una técnica de ELISA sensible y específica para la detección de los anticuerpos, y comprobamos que dichos anticuerpos eran de la clase IgG, estaban dirigidos contra las dos formas, alfa y beta, de rHuEPO y eran capaces de inhibir el crecimiento celular en un ensayo EPO-dependiente^{9,10}. Se llegó a la conclusión de que los anticuerpos anti-eritropoyetina podían neutralizar las proteínas eritropoyéticas bloqueando la producción de células rojas. Posteriormente se comunicó otro caso aislado de anticuerpos anti-eritropoyetina y aplasia pura de células rojas¹¹. Sin embargo, la mayoría de los casos de aplasia pura de células rojas, presuntamente mediada por anticuerpos anti-eritropoyetina, han ocurrido a partir de 1999, habiéndose registrado hasta el 31 de mayo de 2002 unos 141 casos de enfermos renales en todo el mundo, la mayor parte de los cuales se han asociado al tratamiento con rHuEPO alfa por vía subcutánea^{12,13}.

El mecanismo de la formación de los anticuerpos anti-eritropoyetina en estos enfermos tiene considerable interés. Puesto que el polipéptido de la eritropoyetina recombinante está codificado por el gen de la eritropoyetina humana, su estructura es idéntica a la de la hormona endógena. Además, como antes se comentó, ambas la endógena y la proteína construida por ingeniería genética, están fuertemente glicosiladas. Sin embargo, la fina estructura de carbohidratos de la proteína recombinante difiere de la eritropoyetina endógena, al tener ramificaciones más complejas de azúcares unidos a los residuos de asparragina¹⁴. A pesar de esta diferencia en la estructura de carbohidratos, los anticuerpos caracterizados

Correspondencia: Dr. R. Peces
Servicio de Nefrología
Hospital Universitario La Paz
Paseo de la Castellana, 261
28046 Madrid
E-mail: cpeces@varnet.com

en el estudio de Casadevall y cols.^{15,16} no estaban dirigidos contra la parte de los carbohidratos de la eritropoyetina. De hecho, la eliminación del azúcar mediante digestión enzimática no tuvo ningún efecto en la afinidad de los anticuerpos por la porción proteica de la eritropoyetina. En definitiva, los anticuerpos anti-eritropoyetina neutralizantes se unen a la rHuEPO desglicosilada, y en la mayoría de los pacientes están dirigidos contra un epítipo conformacional proteico de la molécula de eritropoyetina. Cabe la posibilidad de que una sutil diferencia en la estructura de carbohidratos, entre la proteína recombinante y la eritropoyetina endógena, origine un epítipo en el polipéptido de la eritropoyetina recombinante, al cual se unen los anticuerpos inactivando no sólo la proteína recombinante sino también, de forma perversa, la hormona endógena¹⁷.

Debido a que más de 3 millones de pacientes en todo el mundo han sido tratados con rHuEPO, la incidencia de anticuerpos anti-eritropoyetina y aplasia pura de células rojas es extremadamente baja. Por ello podría pensarse que se trata de una reacción inmune idiosincrásica en un pequeño subgrupo de pacientes. Hay que destacar el hecho de que la mayor cantidad de casos ha ocurrido recientemente, habiéndose comunicado sobre todo en Europa y menos frecuentemente en USA¹⁵⁻¹⁹. Se ha planteado la cuestión de por qué estos anticuerpos no se observaron anteriormente con la frecuencia con la que se presentan ahora. No parece probable que con anterioridad se hubiera subestimado su frecuencia, ya que la aparición de una anemia tan severa (aplasia pura de células rojas), siempre hubiera llamado la atención de los clínicos. En un artículo reciente se encontró que el 67% de los enfermos tratados con rHuEPO para corregir la anemia de la insuficiencia renal crónica desarrollaron anticuerpos anti-eritropoyetina²⁰. Sin embargo, en este estudio los anticuerpos no fueron bien caracterizados, no neutralizaron la eritropoyetina y parecían ser de baja afinidad. La posibilidad de que un cambio de la membrana de hemodiálisis pudiera producir cambios en la molécula de rHuEPO haciéndola más inmunogénica, no parece probable, ya que algunos de los pacientes descritos en el estudio de Casadevall y cols.¹⁶ que desarrollaron los anticuerpos no estaban en hemodiálisis. Aunque es dudoso que la vía de administración de la rHuEPO pueda afectar a la probabilidad de desarrollar anticuerpos anti-eritropoyetina, hay que señalar que todos los pacientes de este estudio recibieron rHuEPO, alfa o beta, vía subcutánea. Esta sería la razón por la que, para minimizar el riesgo de desarrollar anticuerpos anti-eritropoyetina, se ha aconsejado administrarla por vía intravenosa. Finalmente, una posible explicación

que puede arrojar alguna luz a la existencia del actual brote de casos, podría ser que una ligera modificación en el proceso de producción y manipulación del producto farmacéutico haya modificado la antigenicidad de la hormona. Sin embargo, hasta el momento, no existen pruebas que demuestren esta hipótesis.

Otra característica de los pacientes del mencionado estudio de Casadevall y cols., es que en todos los casos la suspensión del tratamiento con rHuEPO se siguió de una disminución del título de anticuerpos. En varios pacientes que recibieron tratamiento inmunosupresor los anticuerpos anti-eritropoyetina desaparecieron y algunos recuperaron la función eritropoyética. El tratamiento inmunosupresor varió en cada caso, aunque las drogas más frecuentemente utilizadas fueron los esteroides y la ciclosporina. Al igual que en los dos primeros casos inicialmente descritos^{8,9}, los dos pacientes del estudio que recibieron un trasplante renal normalizaron sus niveles de hemoglobina¹⁶.

En 2001, se ha comercializado en Europa un nuevo producto construido mediante ingeniería genética, que introduce una modificación en la molécula de eritropoyetina al sustituir 5 aminoácidos y añadir 2 sitios de glicosilación a los enlaces (N). La introducción de las 2 cadenas extras de oligosacáridos ligados a (N) incrementa el máximo número potencial de residuos de ácido siálico de 14 a 22. El producto resultante de 37.100 daltons, la darbepoetina alfa (Aranesp), tiene la misma eficacia biológica, pero una vida media más prolongada, por lo que sólo precisa administrarse una vez por semana o cada dos semanas²¹. Además, al ser igualmente eficaz por vía subcutánea que por vía intravenosa, en los pacientes en hemodiálisis pueden evitarse los pinchazos. El contenido en carbohidratos de la darbepoetina alfa es aproximadamente de 52% comparado con alrededor de 40% de la rHuEPO. Teniendo en cuenta que la estructura de carbohidratos de este nuevo producto difiere de forma más marcada de la eritropoyetina endógena de lo que lo hacen las rHuEPO, es muy importante poder determinar si la darbepoetina alfa origina anticuerpos que puedan reaccionar de forma cruzada.

Recientemente el laboratorio productor de darbepoetina alfa, preocupado por la proliferación de comunicaciones de nuevos casos de anticuerpos anti-eritropoyetina asociados a aplasia pura de células rojas, ha enviado una carta informativa a los profesionales sanitarios¹³. Hasta ahora no se ha publicado ningún caso en el que la darbepoetina alfa se haya asociado a aplasia pura de células rojas mediada por anticuerpos. Lo que sí se conoce, es que los anticuerpos neutralizantes frente a rHuEPO alfa

reaccionan de forma cruzada con otras proteínas eritropoyéticas incluida la darbepoetina alfa^{13,15}. Por ello se recomienda no tratar con darbepoetina alfa a los pacientes con anticuerpos neutralizantes. Además, acaba de aparecer publicado un caso de aplasia pura de células rojas y anticuerpos anti-rHuEPO beta, que reaccionan de forma cruzada con la darbepoetina alfa²².

El empleo ilícito de la droga por algunos atletas que creen que aumentando la masa de glóbulos rojos pueden mejorar su rendimiento, ha dado lugar a un número de casos de muerte súbita. En estos atletas, la eritropoyetina produce un aumento de hematocrito y de la viscosidad sanguínea que, cuando se agrava por la deshidratación de un ejercicio intenso, origina tromboembolismos fatales. El hecho de que, hasta ahora, los anticuerpos anti-eritropoyetina hayan sido detectados sólo en los pacientes tratados con rHuEPO para controlar la anemia de la insuficiencia renal crónica, no excluye que también puedan desarrollarlos los pacientes tratados con rHuEPO por procesos oncológicos, SIDA, en el preoperatorio de cirugía electiva, e incluso aquellos atletas que usan ilegalmente productos eritropoyéticos para aumentar su rendimiento. La constatación de que el desarrollo de anticuerpos anti-eritropoyetina, que reaccionan de forma cruzada con otras proteínas eritropoyéticas, asociado a un cuadro de aplasia pura de células rojas, es una complicación no tan infrecuente como se creía, añade otro argumento de peso contra el empleo de las proteínas eritropoyéticas al margen de las indicaciones médicas establecidas.

Por último, hasta que las investigaciones en curso aporten nuevos datos, ante cualquier paciente en tratamiento con alguna proteína eritropoyética que presente una anemia inexplicada y tras descartar las causas más habituales de resistencia, debe investigarse la presencia de anticuerpos neutralizantes. Si estos fueran positivos debe suspenderse el tratamiento y no debe cambiarse a otro producto, ya que es muy probable que los anticuerpos reaccionen de forma cruzada con el nuevo.

BIBLIOGRAFÍA

- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, Kawakita M, Shimizu T, Miyake T: Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313: 806-810, 1985.
- Recny M, Scoble HA, Kim Y: Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. *J Biol Chem* 262: 17156-17163, 1987.
- Faults D, Sorkin EM: Epoetin (recombinant human erythropoietin). A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in anemia and the stimulation of erythropoiesis. *Drugs* 38: 863-899, 1989.
- Tsuda E, Goto M, Murakami A, Akai K, Ueda M, Kawanishi G, Takahashi N, Sasaki R, Chiba H, Ishihara H, Mori M, Tejima S, Endo S, Arata Y: Comparative study of N-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins. *Biochemistry* 27: 5646-5654, 1988.
- Takeuchi M, Takasaki S, Miyazaki H, Kato T, Hoshi S, Kochibe N, Kobata A: Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the cell culture medium of recombinant chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 263: 3657-3663, 1988.
- Ersler AJ: Erythropoietin. *N Engl J Med* 324: 1339-1344, 1991.
- Storring PL, Tiplady RJ, Gaines Das RE, Stennig BE, Lamikaura A, Rafferty B, Lee J: Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. *Br J Haematol* 100: 79-89, 1998.
- Bergrem H, Danielson BG, Eckardt KU, Kurtz A, Stridsberg M: A case of antierythropoietin antibodies following recombinant human erythropoietin treatment. En: Bauer C, Koch KM, Scigalla P, Wiecek L (eds): Erythropoietin. Molecular physiology and clinical applications. Marcel Dekker Inc., New York: 266-273, 1993.
- Peces R, De la Torre M, Alcázar R, Urra JM: Antibodies against erythropoietin in a patient with erythropoietin resistant anemia. *N Engl J Med* 335: 523-524, 1996.
- Urra JM, De la Torre M, Alcázar R, Peces R: Rapid method for detection of anti-recombinant human erythropoietin antibodies as a new form of erythropoietin resistance. *Clinical Chem* 43: 848-849, 1997.
- Prabhakar SS, Muhlferder R: Antibodies to recombinant human erythropoietin causing pure red-cell aplasia. *Clin Nephrol* 47: 331-335, 1997.
- Comunicación sobre riesgos de medicamentos para profesionales sanitarios. Agencia Española del Medicamento, 18 de julio de 2002.
- Carta de Amgen a los profesionales sanitarios de 31 de julio de 2002.
- Skibeli V, Nissen-Lie G, Torjesen P: Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood* 98: 3626-3624, 2001.
- Casadevall N, Nataf J, Viron B, Kolta A, Kiladjian JJ, Martin-Dupont P, Michaud P, Papo T, Ugo V, Teyssandier I, Varet B, Mayeux P: Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med* 346: 469-475, 2002.
- Casadevall N: Antibodies against rHuEPO: native and recombinant. *Nephrol Dial Transplant* 17 (Supl. 5): 42-47, 2002.
- Bunn HF: Drug-induced autoimmune red-cell aplasia. *N Engl J Med* 346: 522-523, 2002.
- Mercadal L, Sutton L, Casadevall N, Bagnis C, Jacobs C: Immunological reaction against erythropoietin causing red-cell aplasia. *Nephrol Dial Transplant* 17: 943, 2002.
- Gershon SK, Luksenburg H, Cote TR, Braun MM: Pure red-cell aplasia and recombinant erythropoietin. *N Engl J Med* 346: 1584-1586, 2002.
- Castelli G, Famularo A, Semino C, Machi AM, Ceci A, Cannella G, Meliali G: Detection of antierythropoietin antibodies in haemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin. *Pharmacol Res* 41: 313-318, 2000.
- Egrie JC, Browne JL: Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol Dial Transplant* 16 (Supl. 3): 3-13, 2001.
- Weber G, Gross J, Kromminga A, Loew HH, Eckardt KU: Allergic skin and systemic reactions in a patient with pure cell aplasia and anti-erythropoietin antibodies challenged with different epoetins. *J Am Soc Nephrol* 13: 2381-2383, 2002.