Mecanismos inmunomoduladores de ▼rFVIIIFc

PREVENCIÓN DE LA APARICIÓN DE **ANTICUERPOS ANTI-FVIII** Y COMPLICACIONES ARTICULARES ASOCIADAS A **HEMOFILIA A**

Coordinadora
Mireia Coma Camprodon

Co-autores
Cristina Catarino
Saturnino Haya
Víctor Jiménez Yuste
María Fernanda López
Pascual Marco

Con el auspicio de:

SETH
Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia

Con el aval científico de:

SEHH
Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia

▼*Este medicamento está sujeto a seguimiento adicional, lo que agilizará la detección de nueva información sobre su seguridad. Se invita a los profesionales sanitarios a notificar las sospechas de reacciones adversas. rFVIIIFc (Elocta®) es un medicamento comercializado por Sobi AB. Consultar la ficha técnica al final de la obra.*

Mecanismos inmunomoduladores de ▼rFVIIIFc

PREVENCIÓN DE LA APARICIÓN DE **ANTICUERPOS ANTI-FVIII** Y COMPLICACIONES ARTICULARES ASOCIADAS A **HEMOFILIA A**

Coordinadora
Mireia Coma Camprodon

Co-autores
Cristina Catarino
Saturnino Haya
Víctor Jiménez Yuste
María Fernanda López
Pascual Marco

Los contenidos de esta publicación constituyen las conclusiones escritas del proyecto de Big Data, MECANISMOS INMUNOMODULADORES DE ▼rFVIIIFc: PREVENCIÓN DE LA APARICIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-FVIII Y COMPLICACIONES ARTICULARES ASOCIADAS A LA HEMOFILIA A.

Esta obra se distribuye por cortesía de la compañía farmacéutica Sobi como servicio de divulgación científica para los profesionales de la salud. Está prohibida su venta.

Sobi ha contribuido a la financiación de esta obra. El comité científico, formado en su totalidad por profesionales de reconocido prestigio en el campo de la hemofilia, ha velado porque el contenido de la misma sea lo más preciso, exacto, equilibrado y actualizado posible respecto a la evidencia científica actualmente disponible.

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra solo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley. Diríjase a CEDRO (Centro Español de Derechos Reprográficos, www.cedro.org) si necesita fotocopiar o escanear algún fragmento de esta obra.

Edita: ERGON
C/ Arboleda, 1. 28221 Majadahonda (Madrid)

ISBN: 978-84-17844-73-8
Depósito Legal: M-13643-2020

Autores

Coordinadora

Mireia Coma Camprodon
Director of Business Development & Principal Investigator at Anaxomics

Co-autores

Cristina Catarino
Jefa de Sección Centro de Coagulopatías Congénitas. Servicio de Imunohemoterapia. Hospital de Santa Maria. Lisboa

Saturnino Haya
Hematólogo de la Unidad de Hemostasia y Trombosis. Servicio de Hematología. Hospital Universitari i Politècnic La Fe. Valencia

Víctor Jiménez Yuste
Jefe de Servicio de Hematología. Hospital Universitario La Paz. Madrid

María Fernanda López
Responsable del Área de Hemostasia y Trombosis del Servicio de Hematología y Hemoterapia. Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo. La Coruña

Pascual Marco
Jefe de Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital General Universitario. Alicante

Prólogo

Es para mí un placer prologar esta publicación en el campo de la hemofilia. Este texto viene a poner la guinda a una iniciativa de profundización en el conocimiento científico en las áreas donde Sobi está trabajando intensamente para ofrecer innovadoras soluciones terapéuticas a los pacientes afectos de hemofilia.

La disponibilidad de concentrados de factores de la coagulación, desde aproximadamente 1970, cambió de forma drástica el pronóstico de estos pacientes, tanto en su esperanza como en su calidad de vida. A partir de ese momento el desarrollo constante de mejoras en dichos concentrados no ha cesado a lo largo de las décadas subsiguientes. En los años ochenta, los esfuerzos se centraron en conseguir preparados de plasma más puros, que redujesen los riesgos intrínsecos (pureza, infectividad) al empleo de derivados biológicos. Posteriormente ya en los años noventa se obtienen los primeros factores por tecnología recombinante, consiguiendo preparados de máxima pureza de cultivos celulares en bio-reactores, logrando con ello una fuente de producción mucho más previsible, constante, controlable y robusta que la histórica obtención de productos biológicos dependientes de las donaciones de sangre. Los siguientes pasos que se fueron dando, ya en los albores del nuevo siglo XXI, se encaminaron a simplificar y aumentar la producción de la molécula del factor, eliminando el dominio B, inerte en su actividad coagulativa. Y tras ello, en 2014 supuso lo que ha sido el último gran avance, con la aparición de los factores recombinantes de vida media extendida. Para lograr una pauta profiláctica intensiva que mantenga niveles plasmáticos aceptables, y que protejan de forma continua e ininterrumpida al paciente, es necesaria la administración de factor cada dos días. Ello conlleva dos retos intrínsecos y complementarios a la

propia pauta posológica: la adherencia a la alta frecuencia de inyecciones intravenosas, y lograr reducir lo menos posible la calidad de vida derivada de estas inyecciones reiteradas. Por ello, alargar la vida media de los factores proporciona no solo mayor protección al aumentar la capacidad de coagulación en el tiempo, sino que a su vez reduce las veces que hay que inyectarse anualmente, con lo que aumenta la calidad de vida y la autonomía del paciente.

Son distintas las tecnologías que logran ese aumento de vida media del factor de coagulación. De todas ellas, el empleo de la fracción Fc de la inmunoglobulina humana IgG es la que proporciona un mecanismo más fisiológico y natural, evita la aparición de anticuerpos, reduce las posibles reacciones alérgicas, y no lleva aparejado el riesgo de acumulación intracelular (vacuolización) como puede suceder con los preparados pegilados. Pero las ventajas de emplear la fracción constante de un anticuerpo van más allá de lograr simplemente un aumento de la vida media. Su comportamiento inmunológico podría ser un hecho diferencial, afectando positivamente en otras dimensiones como son la vía de la inflamación o la menor capacidad inmunogénica. Por ello, y con el objetivo de aportar más luz y evidencia científica en estos apartados es por lo que surge este proyecto.

Las nuevas herramientas de búsqueda masiva de información y su interpretación nos posibilitan sacar conclusiones que previamente ni siquiera podríamos sospechar. El "big data" analiza cientos de publicaciones, integra sus datos, y sintetiza una evidencia común, fruto de muchas y muy distintas iniciativas de investigación.

Para entender los sistemas biológicos complejos se requiere de la integración experimental y de la investigación computacional: en otras palabras, un enfoque de biología de sistemas. Desde un punto de vista metodológico, el objetivo de este proyecto fue generar un modelado computacional capaz de simular, por un lado, la patología de interés (inflamación, inmunidad) y por otro, el efecto del tratamiento. Para ello fue necesario un paso previo de recopilación de información para la caracterización molecular de ambos procesos, basada tanto en la bibliografía como en los datos de alto rendimiento disponibles de modelos animales que sufren la patología de estudio y datos de alto rendimiento pertenecientes a líneas celulares siendo tratadas con el fármaco.

El modelado por técnicas de Inteligencia Artificial permite en primer lugar integrar la información recopilada junto con el "interactoma" humano funcional, basado en actividad proteica y, en segundo lugar, reproducir los datos integrados en él. Por último nos permite conocer las relaciones entre los componentes que forman parte del modelo. De esta manera se han podido obtener patrones no obvios, diferentes a los ya conocidos, y por tanto funcionar como un generador de hipótesis, dando así respuesta a algunas

inquietudes en el área terapéutica de interés, como es el comportamiento inmunológico de la fracción Fc aplicada a los factores de la coagulación.

Esta excelente obra viene a corroborar el compromiso de Sobi con la divulgación científica continuada. Esperamos que esta publicación sea de su agrado, y que con ello podamos aportar más luz en el campo de la ciencia hemostática, empleando la ventaja de las más novedosas y potentes herramientas de procesamiento informático e inteligencia artificial.

Juan Vila
Director médico y regulatorio, Sobi SL

Madrid, mayo 2020

Índice

1 **INTRODUCCIÓN** 1

Justificación del estudio y objetivo 1

Aproximación utilizada 2

Contexto teórico 3

Respuesta inmune a rFVIIIFc en pacientes hemofílicos 3

Proceso de inducción de la tolerancia inmune (ITI) 5

Artropatía hemofílica 8

Evidencias de los efectos inmunomoduladores de rFVIIIFc 9

¿Cómo se podría modular la producción de anticuerpos anti rFVIII o la ITI? 13

Hipótesis a analizar 18

2 **PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS** 21

Re-análisis de datos de expresión disponibles 21

Caracterización de la artropatía hemofílica en base a los datos de alto rendimiento (high-throughput) 21

Caracterización del rFVIIIFc en base a los datos de alto rendimiento (high-throughput) 22

Análisis de enriquecimiento 22

Métodos biocomputacionales – tecnología TPMS 22
Construcción de la red de proteínas 23
Creación del mapa biológico 23
Generación del modelo matemático 24
Análisis de los modelos 29

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN: POSIBLES MECANISMOS INMUNOMODULADORES DE rFVIIIFc 31

Efectos demostrados experimentalmente para rFVIIIFc 31

Efecto sobre los macrófagos 31
Funciones y fenotipos de los macrófagos 31
Expresión y rol de los FcγR 32
Evidencias del efecto de rFVIIIFc en macrófagos – inducción de fenotipo similar a M2 32
Evaluación de la señalización por FcγR detrás de las observaciones en macrófagos 35

Efecto sobre células Treg 37
Función de las Tregs: nTregs e iTregs 37
Expresión de receptores FcγR 38
Evidencias del efecto de rFVIIIFc en Tregs – inducción de tolerancia mediante epítopos de Treg y microambiente pro-tolerogénico 38
Evaluación del mecanismo mediado por epítopos de Treg e impacto del microambiente pro-tolerogénico detrás de las observaciones para Tregs 39

Efectos hipotéticos de rFVIIIFc 41

Efecto sobre células dendríticas 41
Función de las células dendríticas, rol en la relación inmunidad innata-adaptativa y en establecimiento de tolerancia 41
Expresión de FcγR 41
Evidencias del efecto de rFVIIIFc en Tregs – ¿Hay un rol para las células dendríticas? 41
Evaluación de la señalización por FcγR e impacto del microambiente pro-tolerogénico en las células dendríticas 42

Efecto sobre células dendríticas foliculares 47
Función y biología de las células dendríticas foliculares 47
Expresión de FcγR 48
Evaluación de la señalización por FcγR e impacto del microambiente pro-tolerogénico en las células dendríticas foliculares 49

Efecto sobre células B 50
Función de las células B 50
Expresión de FcγR 51
Evaluación de la señalización por FcγR e impacto del microambiente pro-tolerogénico en las células B 51

Efecto sobre el estado inflamatorio previo y su impacto en salud articular 53
Estado pro-inflamatorio, sangrado articular y sistema inmune 53
Evaluación del posible impacto del efecto de rFVIIIFc en el sistema inmune innato sobre cambios asociados a hemorragia articular 54

4 CONCLUSIONES 59

5 REFERENCIAS 63

1 Introducción

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVO

La hemofilia A es la forma de hemofilia más común, causada por reducción de actividad o cantidad del factor de coagulación VIII (FVIII). La severidad del fenotipo que presentan los pacientes depende de la cantidad de actividad del factor de coagulación que tienen. En sus variantes más extremas, en las que los pacientes presentan menos de un 1% de FVIII, estos sufren a menudo hematomas en músculos profundos o sangrados espontáneos en las articulaciones[3]. Estos sangrados, si no son controlados, acaban por causar hemartrosis, con características compartidas tanto con patologías inflamatorias como la artritis reumatoide y degenerativas, como la osteoartritis[4].

La profilaxis con rFVIII previene las hemorragias espontáneas y puede mejorar la salud articular, disminuyendo así las consecuencias a largo plazo de la hemorragia articular en personas con hemofilia grave[5,6]. Sin embargo, dado que los pacientes con hemofilia A grave prácticamente no tienen FVIII (<1%)[6,7] el tratamiento con rFVIII provoca a menudo (en el 30% de los casos) respuestas inmunes y desarrollo de anticuerpos inhibidores[8,9]. Como consecuencia, se reduce la eficacia del tratamiento y aumenta la morbilidad y los episodios hemorrágicos, implicando un coste adicional para su control[10].

Los tratamientos de inmunotolerancia son los únicos tratamientos que han demostrado eficacia para erradicar los inhibidores[11], que conlleva repetir las infusiones con altas dosis de rFVIII a largo plazo. Esto promueve la inducción de la tolerancia, reduciendo los títulos de los inhibidores, aunque

no se alcanza un control eficaz de la enfermedad. Este tratamiento implica un alto coste y un aumento del riesgo de sufrir complicaciones a largo plazo (debido a hemorragias espontáneas no controladas)[11].

La proteína de fusión recombinante rFVIIIFc (Elocta®) está compuesta por el factor VIII recombinante (rFVIII) unido a la fracción constante (Fc) de la inmunoglobulina G1 (IgG1) humana. Está indicado para el tratamiento y la profilaxis de hemorragias en pacientes con hemofilia A (deficiencia del factor VIII congénito).

La fusión Fc - rFVIII permite prolongar la vida media de rFVIII entre 1,5 y 2 veces. La región Fc de la proteína resultante se une al receptor FcRn, responsable de la vía endógena de reciclaje de las inmunoglobulinas, y redirecciona de nuevo la proteína a la circulación[12-15].

Se ha observado que la fusión con Fc tiene efectos antiinflamatorios o inmunomoduladores, atribuidos a propiedades intrínsecas del Fc o a la interacción con los receptores de Fc (FcγR)[16-18].

En la misma línea, está descrito que la actividad terapéutica de las inmunoglobulinas intravenosas (IVIGs) pueda estar mediada por su interacción con los receptores FcγR[19,20]. Resulta de especial interés conocer mejor los efectos inmunomoduladores de rFVIIIFc ya que, a diferencia de otros productos del rFVIII, hay evidencias a nivel clínico de su implicación en la prevención de la aparición de inhibidores[1,21,22] y en la inducción de la tolerancia inmune (ITI) en pacientes ya con inhibidores[23-25], además de evidencias preclínicas de inmunomodulación[1,26].

Dada la relevancia de evitar la producción de respuesta inmune al fármaco para mantener la respuesta, el objetivo de este proyecto es **identificar el mecanismo molecular que justifica el efecto inmunomodulador de rFVIIIFc en pacientes con hemofilia para: a) prevenir la generación de inhibidores; y b) facilitar la ITI.**

APROXIMACIÓN UTILIZADA

Para conseguir el objetivo del estudio se ha recopilado la información disponible y se ha aplicado la tecnología *Therapeutic Performance Mapping Sys-*

tem (TPMS) (Anaxomics Biotech, Barcelona, España). Esta tecnología, que está basada en la biología de sistemas, describe a los seres vivos de forma multidisciplinar como redes de genes y proteínas. Esto permite un análisis sistémico y global de los efectos de los fármacos en el cuerpo humano.

Así, han sido utilizadas tres estrategias complementarias:

- Revisión de la información existente sobre la respuesta inmune asociada a rFVIIIFc, complicaciones de la hemofilia en las articulaciones y al efecto inmunomodulador de rFVIIIFc (detallada en la sección Contexto teórico).

- Re-análisis de los datos *high-throughput* (alto rendimiento) existentes referentes a la patología y al fármaco.

- Análisis mediante modelos biocomputacionales (TPMS) de los mecanismos más probables mediante los que rFVIIIFc puede mediar sus efectos inmunomoduladores.

CONTEXTO TEÓRICO

Respuesta inmune a rFVIIIFc en pacientes hemofílicos

En los pacientes con hemofilia A grave, los niveles bajos de FVIII (<1%)[6,7] promueven una respuesta inmune contra el FVIII administrado en el 30% de los pacientes. En dicha respuesta se generan anticuerpos inhibidores contra rFVIII o rFVIIIFc[8,27] que inactivan el tratamiento.

Se trata de una respuesta inmune compleja y multifacética que incluye factores de riesgo genéticos y ambientales[28,29]. En ella intervienen varios tipos de células (células presentadoras de antígeno (APCs, células T y células B) y varias moléculas clave, incluyendo proteínas del sistema inmune innato (TNF-α o TGF-β1) y del adquirido (CTLA-4) así como moléculas reguladoras (IL-10)[30-32] (Figuras 1 y 2).

La respuesta (inmunización) varía ligeramente dependiendo de si el sistema inmune ha estado o no expuesto previamente al antígeno (FVIII)[8].

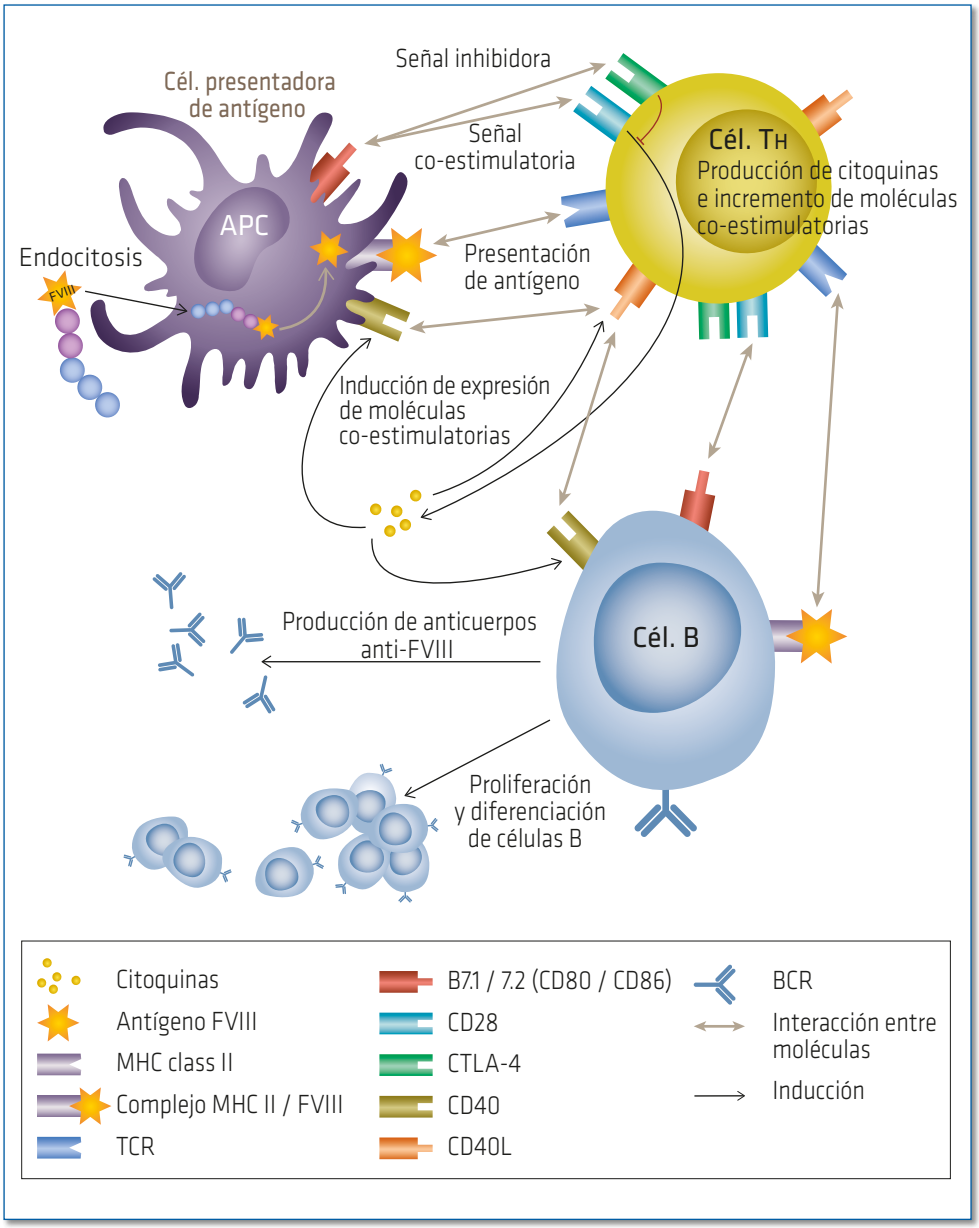


FIGURA 1 ⋮ Modelo esquemático que muestra los principios de la formación de inhibidores en pacientes con hemofilia A. *Modificado de: Astermark J, et al.*[33].

Inmunización primaria (Figura 2A)

Se caracteriza por el procesamiento y presentación de antígenos de FVIII por parte de las APCs, especialmente las células dendríticas (CDs).

Las CDs activan células T específicas de antígeno que a su vez activan células B.

Estas células B pueden convertirse en células B plasmáticas que:

- Producen anticuerpos IgM anti-FVIII.
- Se trasladan al bazo donde se someten a expansión clonal, cambio de clase y selección de afinidad, para obtener finalmente células B de memoria y células plasmáticas (CP) de larga vida[33].

Inmunización secundaria (Figura 2B)

Cuando el paciente ya ha sido expuesto previamente al antígeno, además de que las APCs puedan presentarlo, las células B de memoria y células T pueden inducir recíprocamente su activación y promover una respuesta rápida, caracterizada por la producción de anticuerpos IgG anti-FVIII que inactivan al FVIII.

Proceso de inducción de la tolerancia inmune

Los tratamientos de inmunotolerancia son los únicos que han demostrado eficacia para erradicar los inhibidores. El fundamento para dicha inducción es que la exposición recurrente del sistema inmune al FVIII, en condiciones no inflamatorias, conlleva una modulación descendente de la respuesta establecida de anticuerpos anti-FVIII[34,35]. Se desconocen los mecanismos exactos de este proceso.

Los agentes clave de la respuesta inmune frente a FVIII y, por tanto, las principales dianas de la ITI son: las células T CD4+ y las células B (ambas de memoria específicas del FVIII) y las CP productoras de anti-FVIII (de larga vida).

Una hipótesis planteada es que el éxito de la ITI depende de la eliminación de las células B y T CD4+. La extinción de las CP podría ocurrir al final, debido a la falta de reabastecimiento por las células B de memoria[36,37].

Se han descrito tres mecanismos, que contribuyen a la ITI (Figura 3)[8]:

- Inhibición de la diferenciación de células B de memoria en CP por altas concentraciones de FVIII;

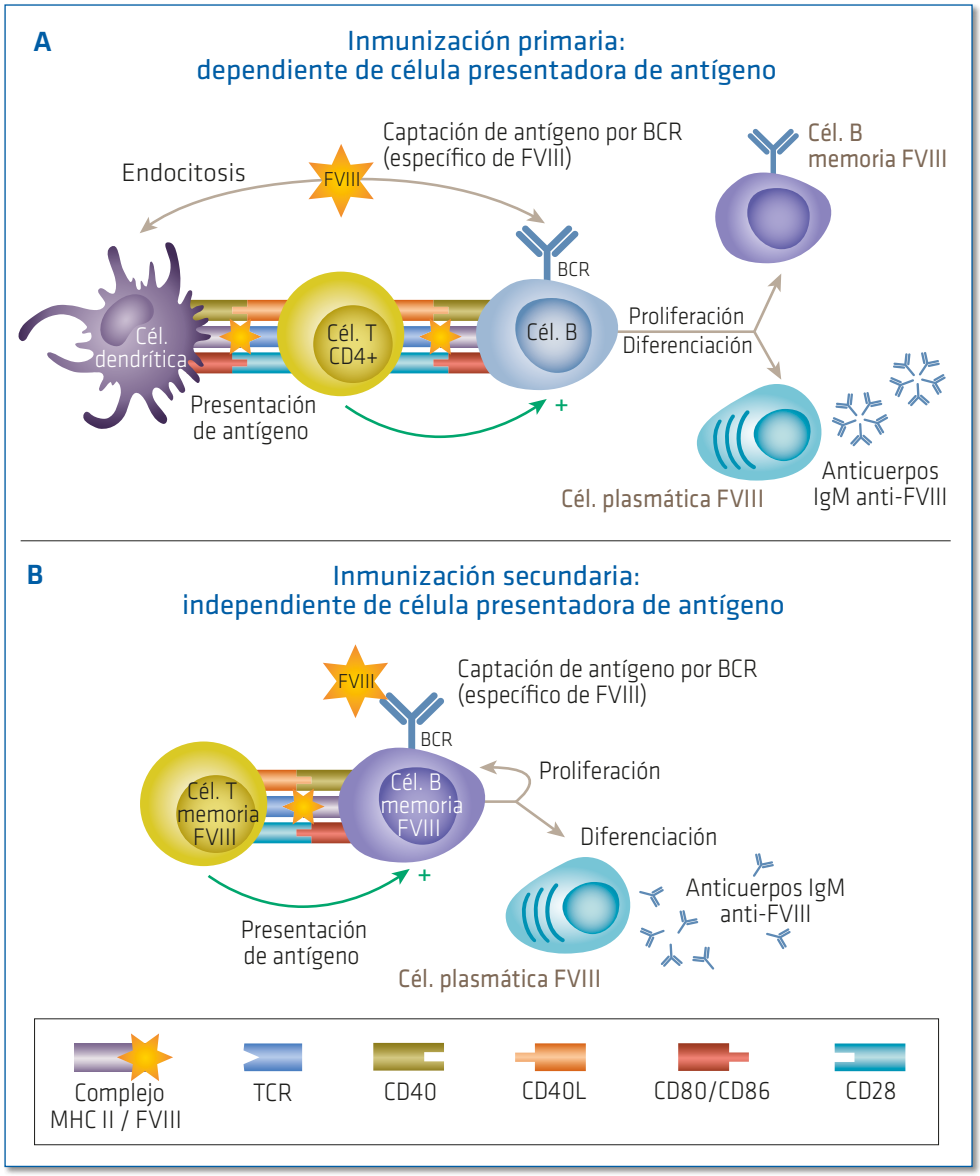


FIGURA 2 ⋮ Representación gráfica de la respuesta inmune a FVIII. *Modificado de Schep et al.*[8].

- Anergia de células T efectoras debido al agotamiento/sobreestimulación e inducción de Tregs debido a la exposición crónica al FVIII en un estado no inflamatorio;

- Desarrollo de anticuerpos anti-idiotípicos, es decir, dirigidos a anticuerpos anti-FVIII.

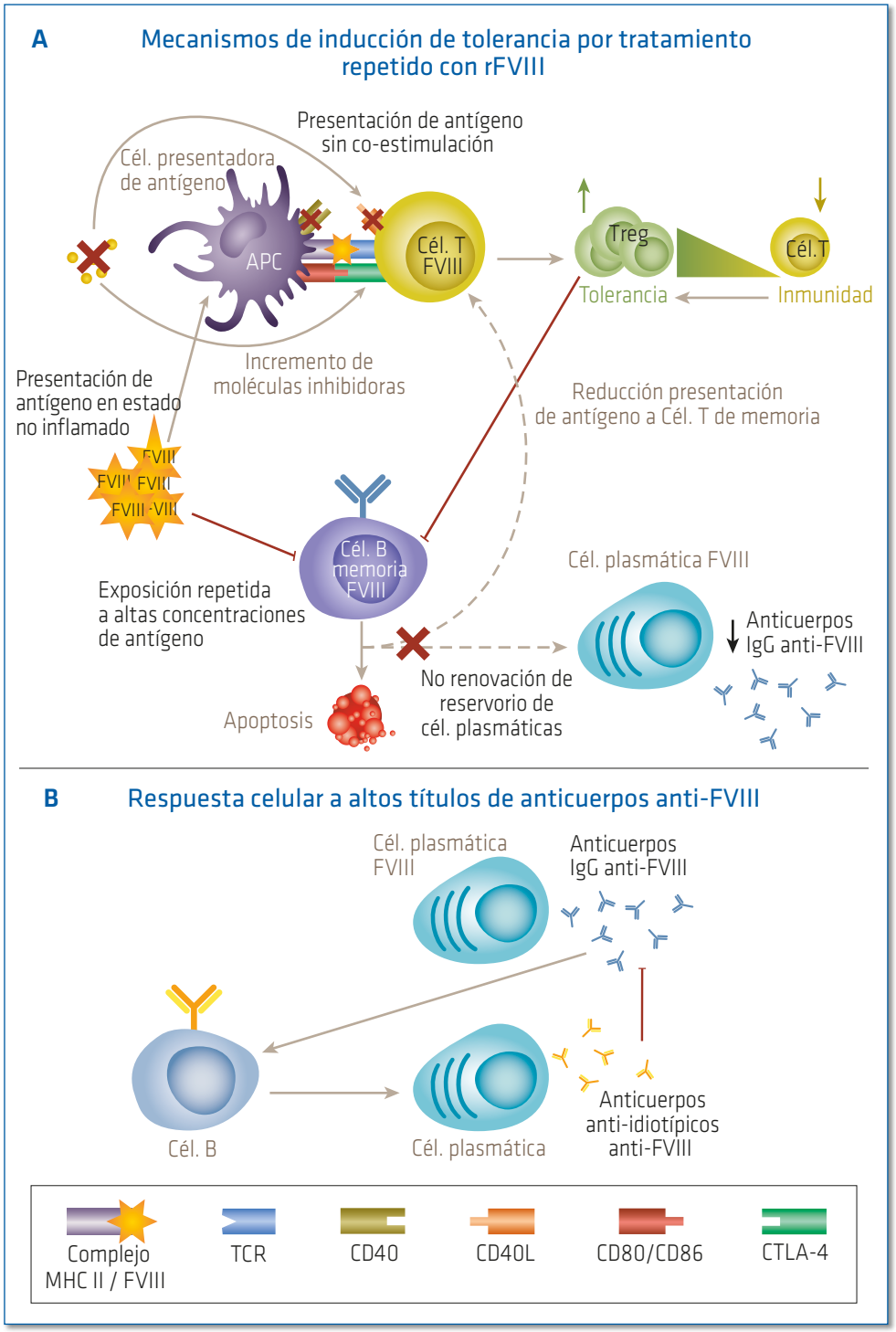


FIGURA 3 ⋮ Resumen del mecanismo de acción potencial de la terapia ITI. *Modificado de Schep et al.*[8].

Artropatía hemofílica

Los sangrados musculoesqueléticos suponen el 80% del total de las hemorragias que se producen en la hemofilia. Estos sangrados se localizan más frecuentemente en las articulaciones sinoviales (codos, rodillas y tobillos) por la vascularización y la reducción de la vía extrínseca de la coagulación que se observa en la sinovia. Esto justifica que sea una zona susceptible de hemorragias espontáneas[38].

En la zona sinovial inflamada se forma una capa invasiva y destructiva compuesta por macrófagos, fibroblastos, osteoclastos y otras células inflamatorias (células T) que liberan enzimas colagenolíticas que afectan al cartílago. Este también sufre alteraciones por las citoquinas inflamatorias y las metaloproteinasas liberadas a la circulación sanguínea por monocitos/macrófagos activados, así como por radicales hidroxilo que inducen la apoptosis de los condrocitos.

Debido a los recurrentes sangrados en las articulaciones (hemartrosis), que causan hipertrofia sinovial y destrucción ósea y del cartílago, se desarrolla la **artropatía hemofílica**[39] que implica una mayor morbilidad posterior (Figura 4). Se trata de una condición discapacitante que se inicia frecuentemente a una edad temprana y está asociada a dolor crónico, deterioro articular y una reducción en la calidad de vida.

Las vías inflamatorias, el hierro (que proviene de eritrocitos no eliminados y se acumula como depósitos de hemosiderina) y la activación de los sistemas fibrinolíticos juegan un papel fundamental en este proceso sinovial[4] (Figura 4).

Todos estos procesos interaccionan unos con otros generando un círculo vicioso, ya que la hemartrosis promueve la hipertrofia sinovial y la neoangiogénesis aumentándose la susceptibilidad al daño mecánico y posterior sangrado.

Según progresa la degeneración del cartílago y la sinovitis, resulta afectado el hueso subyacente. Se produce un desequilibrio en la reabsorción y formación ósea (disminución de osteoblastos y aumento de la actividad de los osteoclastos) que provoca la disminución de la densidad mineral ósea (BMD) y osteoporosis. De forma adicional, el dolor en la artropatía hemofílica produce un deterioro de la movilidad de los pacientes, que hace que se reduzcan las actividades al aire libre, con la consiguiente disminución de producción de vitamina D que a su vez produce BMD[40].

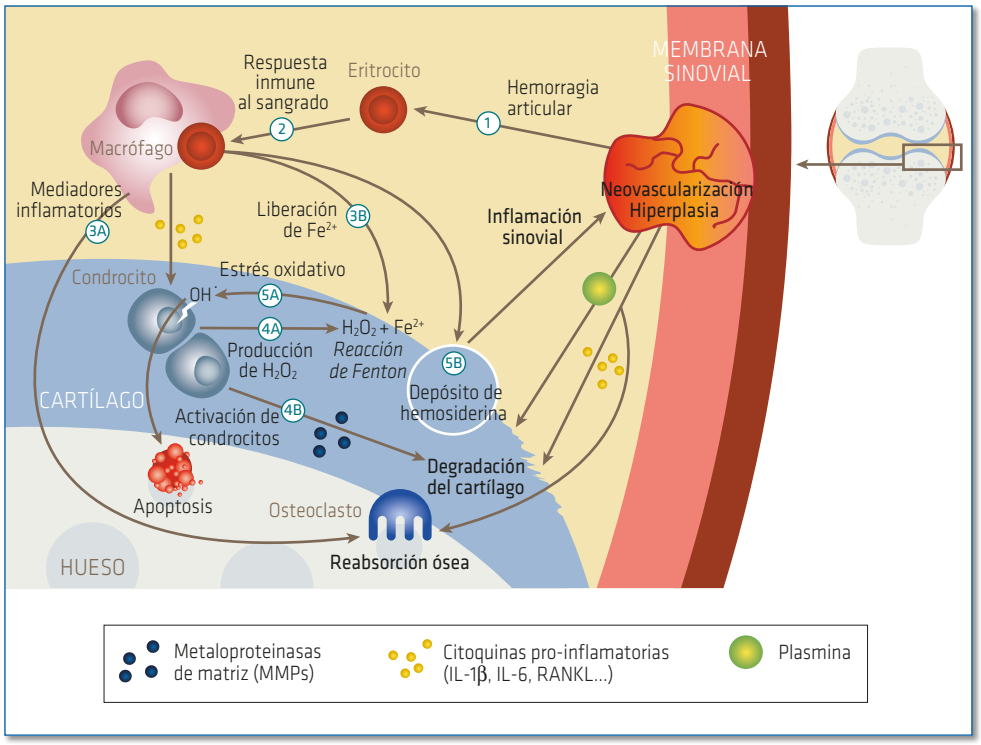


FIGURA 4 ⋮ Representación esquemática de la fisiopatología de la artropatía hemofílica. *Modificado de Pulles et al.*[4].

Evidencias de los efectos inmunomoduladores de rFVIIIFc

Experiencia clínica y pre-clínica

Existe literatura específica que apunta al efecto inmunomodulador de rFVIIIFc frente a otros productos rFVIII.

Evidencias clínicas

En una familia con propensión al desarrollo de inhibidores, se ha descrito el caso de dos primos sin tratamiento previo, en los que tras administrar rFVIII o rFVIIIFc, el que recibió rFVIIIFc mostró una mejor respuesta en cuanto a que desarrolló títulos más bajos de inhibidores y, a diferencia del que recibió rFVIII, no necesitó ITI, evitando las molestias de dicho tratamiento (colocación de dispositivos de acceso venoso permanente, etc.)[22].

Por otro lado, se han publicado casos de pacientes que habían desarrollado inhibidores en los que, el empleo posterior de rFVIIIFc logró inducir ITI, ocurriendo en algunos de ellos de forma más rápida y necesitando una menor frecuencia de dosis que con tratamientos de vida media más corta[23-25].

Evidencias preclínicas y detalle molecular/celular

Experiencia en modelos murinos muestran que las respuestas de anticuerpos inducidas en ratones tratados con rFVIIIFc son más bajas que las alcanzadas con el rFVIII[1,21].

Existen dos estudios en los que se ha profundizado en el impacto de rFVIIIFc en el sistema inmune a nivel molecular y celular. Estos son:

- *Krishnamoorthy et al.*[1]: sobre las células Tregs y CDs en ratones.
  El rFVIIIFc induce la activación de Treg (nTreg [D4+CD25+Foxp3+ células T] e iTreg (marcadores de anergia como Egr2, Dgka y CBL-B, PTGS2 y PTGER2])[1] y la producción de proteínas inmunosupresoras *in vivo* (modelo murino).
  Demostraron un papel para los epítopos Treg, (probablemente el epítopo Treg 289, localizado en el dominio CH2 de Fc en el rFVIIIFc). Mediante la presentación del epítopo Treg, rFVIIIFc es capaz de activar nTregs[1,9], generando un microambiente pro-tolerogénico (IL-10, TGF-β, IL-35) e induciendo anergia y fenotipos tolerogénicos (expresión de IL-10) en células T CD4+ efectoras (conocidas como Tregs adaptativas o inducidas – iTregs)[8].
  Se propusieron algunos efectos sobre la inducción de un fenotipo tolerogénico en CDs, probablemente a través del microambiente pro-tolerogénico. De hecho, las CDs resultan clave en el mantenimiento de la tolerancia periférica generando células T anérgicas y reguladoras[41,42]. Se observó un efecto mediado por FcγR dependiente de dosis. Dosis bajas de rFVIIIFc (50 UI/kg) indujeron tolerancia (activación de Treg, falta de anticuerpos inhibidores), mientras que dosis altas (250 UI/kg) resultaron inmunogénicas, desarrollándose inhibidores en un nivel comparable al de un tratamiento con dosis similares de rFVIII. Los efectos inmunogénicos a dosis altas fueron suprimidos por la mutación de FcγR.
  En el trabajo experimental no se aborda si el rFVIIIFc modula el fenotipo de la CD a través de la señalización de FcγR y los receptores exactos implicados en esta modulación.

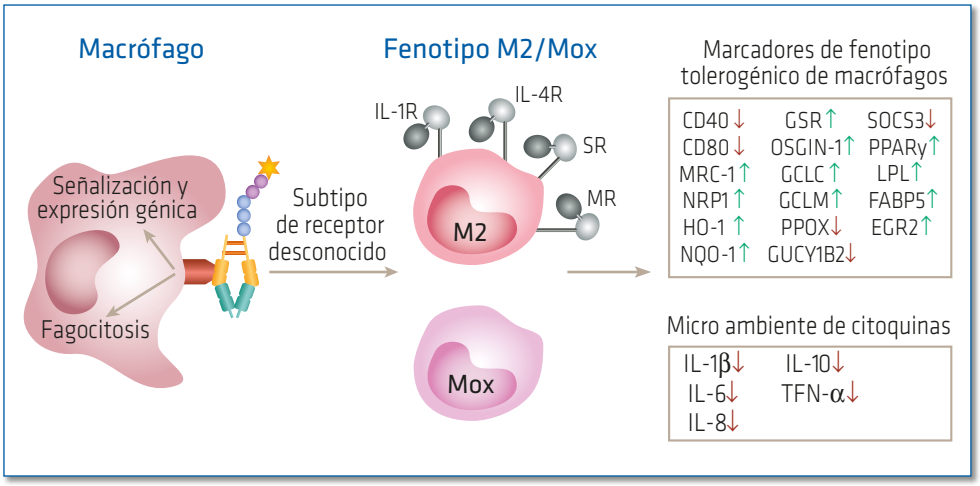


FIGURA 5 ⋮ Resumen de los resultados. *Adaptado de Kis-Toth et al.*[26].

- *Kis-Toth et al.*[26]: sobre el fenotipo de macrófagos humanos. Mostraron que los macrófagos humanos expuestos a rFVIIIFc se diferencian en un fenotipo M2/tipo Mox (*in vitro*). Este fenotipo se caracteriza por presentar características antiinflamatorias antioxidantes y reparadoras de tejidos[26] (Figura 5). Sin embargo, se desconoce si puede reducir la inflamación sistémica potencial (por ejemplo, en el daño articular causado por un evento de sangrado espontáneo) que es un factor de riesgo conocido para el desarrollo de inhibidores[43], o si puede impactar positivamente en la patología articular.
  Esta actividad puede ser importante para establecer un ambiente tolerogénico que evite el desarrollo de inhibidores y/o favorecer la ITI. Aunque demostraron que está mediada por FcγR, se desconoce el receptor exacto (o combinación de receptores) que interviene(n).

Receptores FcγR: señalización mediante FcγR tipo I

En los dos estudios descritos (*Krishnamoorthy et al.*[1] y *Kis-Toth et al.*[26]) se demostró que los efectos inmunomoduladores de rFVIIIFc (al menos en parte) están mediados por los FcγR tipo I, aunque el Fc de la IgG1 puede interaccionar con los dos tipos de FcγR presentes en las células inmunes (tipo I y tipo II).

Receptores tipo I, o receptores IgG canónicos (Figura 6), son una familia de Igs con diferentes patrones de expresión, diferentes funciones[18,44-46] y diferente afinidad para los diferentes tipos de IgG (IgG1-4)[17,18,47,48]:

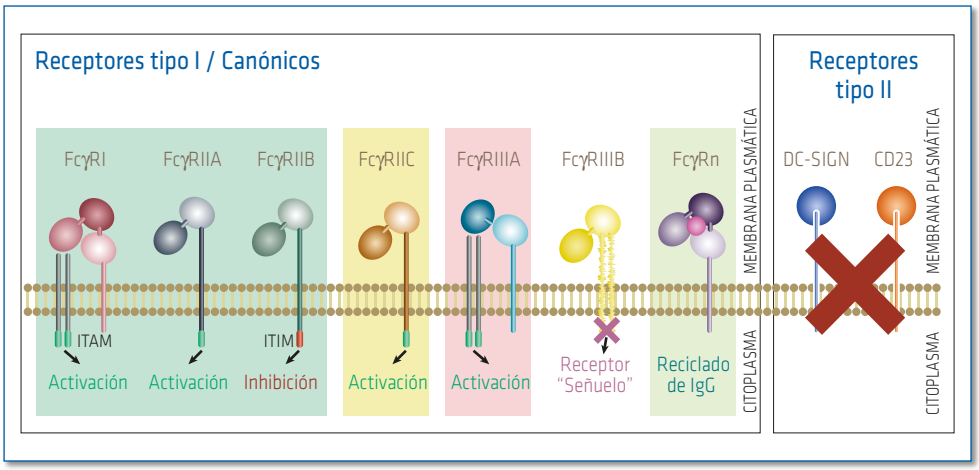


FIGURA 6 ⋮ Resumen de la información recopilada para la señalización de rFVIIIFc a través de FCγR. *Modificado de Levin et al.*[52].

- **Receptor de alta afinidad FcγRI** que puede unirse a anticuerpos individuales.

- Los receptores de baja afinidad se unen preferentemente a los inmunocomplejos que se forman cuando hay una gran cantidad de antígenos y anticuerpos.

  – **FcγRIIa, FcγRIIc y FcγRIIIa:** activadores de respuestas inflamatorias en células inmunes.
  La expresión de FcγRIIc a nivel de proteína está limitada al 10-25% de la población debido a la variación genética[17]. Esto sugiere que los efectos inmunomoduladores del rFVIIIFc podrían no estar mediados por este receptor.

  – **FcγRIIb**: receptor inhibitorio.

  – **FcγRIIIb**: parece ser un receptor "señuelo" de señalización, es decir, que después de la unión a su ligando, no induce ninguna cascada de señalización. Hay evidencias que sugieren que tras unirse a su ligando podría unirse a FcγRIIa y aumentar su función[49].

- FcRn: funciona como un receptor de reciclaje; media la internalización y la recirculación de las IgG, ampliando su vida útil en el torrente sanguíneo[50,51].

Receptores tipo II (CD23 y DC-SIGN) (Figura 6): receptores IgG no canónicos que pueden inducir una sobrerregulación del FcγRIIb en las células efectoras, principalmente en las células B (17) y los macrófagos[46].

Dadas las evidencias de glicosilación, los receptores marcados en verde son los que con más probabilidad median las respuestas observadas para rFVIIIFc, mientras que los marcados en rojo son menos probables. El receptor FcγRIIc es poco probable de ser responsable de los efectos observados debido a la variabilidad de su expresión en la población.

La glicosilación en la región Fc de las IgG, puede modificar la afinidad por los receptores del tipo I[18,53-55] y también influir en la unión con los receptores tipo II[17,53].

La afinidad exacta de rFVIIIFc a los diferentes receptores tipo I debe ser evaluada para definir mejor la función inmunomoduladora; por ello todos los receptores tipo I se tendrán en cuenta para el análisis. Sin embargo, y a consecuencia de la información disponible, los receptores con más probabilidad de mediar los efectos de rFVIIIFc, y que por ello se evaluarán especialmente en el estudio, son FcγRIIa y FcγRIIb.

Papel de los epítopos de Treg e inducción de ambiente pro-tolerogénico

Los epítopos de Treg (también llamados *Tregitopes* en inglés) se presentan en auto-proteínas con alto grado de variación, como la Fc de las Igs, y que activan específicamente las nTregs, ayudando a mantener la auto-tolerancia[56,57]. *Krishnamoorthy et al.*[1] demostraron un rol para los epítopos de Treg en los efectos inmunomoduladores mediados por rFVIIIFc; la proteína de fusión contiene al menos el *Tregitope* 239, localizado en el dominio CH2 la fracción Fc. Los epítopos de Treg activan las nTregs de manera similar a la activación de las células T efectoras: las APCs captan los epítopos de Treg y los presentan al receptor de célula T (TCR) de las nTregs. Este proceso produce la inducción de tolerancia, como se refleja en los resultados de *Krishnamoorthy et al.*[1], que describe un ambiente pro-tolerogénico (IL-10, TGF-β, IL-35) que puede estar detrás de otros mecanismos de rFVIIIFc. El impacto de este microambiente se evaluará en este estudio.

¿Cómo se podría modular la producción de anticuerpos anti rFVIII o la ITI?

Los siguientes procesos (Tabla 1) podrían ser modulados para: a) reducir la producción de anticuerpos inhibidores; o b) facilitar la ITI.

TABLA 1 : Procesos de modulación para cambiar la respuesta inmune a rFVIIIFc.

Procesos del sistema inmune	Reducción de la producción de inhibidores	Facilitar la ITI
A. Reducción del ambiente pro-inflamatorio	✓	✓
B. Activación de nTregs	✓	✓
B.2 Inducción de iTregs	-	✓
C. Inducción de CDs tolerogénicas	✓	✓
D. Modulación de la selección clonal de células B– producción de anticuerpos de respuesta de baja afinidad	~	~
E. Apoptosis de células B de memoria y de CPs	-	✓

Abreviaturas: ITI: inducción de la tolerancia inmune; CDs: células dendríticas; Tregs: células T reguladoras; nTregs: Tregs naturales; iTregs: Tregs inducibles; CPs: células plasmáticas.

Reducción del ambiente pro-inflamatorio

Se ha propuesto que la existencia de una lesión celular significativa o un ambiente pro-inflamatorio facilitan la inducción de anticuerpos inhibidores, ya que pueden asociarse a "señales de peligro"[43] que amplifican una respuesta inmunológica contra antígenos[58-60]. Existen algunas evidencias clínicas en pacientes con hemofilia que apoyan esta hipótesis[61,62].

Por otro lado, experimentos en modelos murinos de hemofilia sugieren que los sangrados articulares podrían estar relacionados con una inflamación sistémica de bajo grado[63], comparable al nivel de inflamación asociado a otras artropatías típicamente inflamatorias, como la artritis reumatoide[64]. Adicionalmente, el estrés oxidativo (asociado a inflamación) se relaciona con una mayor inmunogenicidad[65,66].

Se podría alcanzar una reducción del ambiente pro-inflamatorio mediante la modulación de las células de inmunidad innata hacia fenotipos inmunorreguladores [como los fenotipos M2 en macrófagos[67-70] o en células natural killer no variantes[71]].

Activación de Tregs naturales (nTregs)

Las nTregs (células T CD4+CD25+Foxp3+) se generan en el timo a partir de precursores naïve. Están implicadas en el mantenimiento de la auto-tolerancia regulando a las células T efectoras (Teff) que se activan cuando se presentan antígenos específicos a su receptor (TCR). Los antígenos que activan las nTregs son epítopos de Treg, presentes en auto-proteínas con un alto grado de variación e implicados en mantener la auto-tolerancia[56,57].

En modelos murinos de hemofilia las células Treg inducen tolerancia a los auto-antígenos y a las proteínas (tratamientos) inyectadas, incluyendo el rFVIII[72]. La activación de estas células se relaciona con la inducción de proteínas tolerogénicas, incluyendo Foxp3, CTLA-4 e IL-10, TGF-β, IL-35 e IDO-1, así como con la disminución de la regulación de IL-2, IL-4 e IL-6[73].

Inducción de Tregs inducibles (iTregs)

Las iTregs se generan periféricamente, sin la participación del timo. Aparecen con la estimulación antigénica bajo condiciones muy específicas, incluyendo la presentación repetida de antígenos a las células T por parte de CDs inmaduras (tolerogénicas) o células estromales[74], o la exposición crónica de un sistema inmune naïve a antígenos en ausencia de señales de peligro[75,76].

De forma similar a las nTregs, producen citoquinas inmunosupresoras IL-10 y TGF-β1 que conlleva a la inhibición de la activación de las células T y la formación de células Teff, y/o a la supresión de las funciones de las Teff[8,77]. Por consiguiente, el ajuste de las iTregs específicas del rFVIII es un requisito esencial para el éxito de la ITI[8].

Inducción de células dendríticas tolerogénicas

Las células presentadoras de antígenos más eficientes del sistema inmune, las células dendríticas (CDs), son clave para iniciar, regular y suprimir las respuestas inmunes adaptativas[78-81]. Pero también son fundamentales para mantener la tolerancia central y periférica mediante la generación de células T anérgicas y reguladoras[41,42].

Las CDs pueden clasificarse en diferentes grupos según su fenotipo (IDO, CD123, CCR6 or DC-SIGN) y funciones[80,82-86]. En condiciones homeostáticas, las CDs periféricas suelen presentar un fenotipo “inmaduro” caracteri-

zado por la expresión de bajos niveles de superficie de MHC II y moléculas coestimuladoras. Las CDs inmaduras promueven la tolerancia bien eliminando las células T específicas del antígeno o expandiendo las Treg[87-90]. El receptor de señalización de FcγRIIb promueve la activación de la tolerancia periférica inhibiendo la activación de las CDs[91].

La promoción de fenotipos inmaduros en las CDs durante el tratamiento con rFVIII podría reducir la producción de anticuerpos mediante la supresión de la presentación de los antígenos en estado inflamatorio o de alerta.

Modulación de la selección clonal de células B-producción de anticuerpos de respuesta de baja afinidad

La señalización de FcγRIIb con la colaboración de CD23 puede conducir a una producción de anticuerpos de mayor afinidad[17] (Figura 7). Este mecanismo, que actualmente se está investigando, encuentra su mayor aplicación en la obtención de respuestas de alta afinidad a vacunas[17,92]. La modulación de la selección clonal podría inducir una respuesta celular menos efectiva, promoviendo que el poder terapéutico de FVIII se mantuviera más que con una respuesta de alta afinidad.

La modulación de la selección de afinidad también podría afectar a la producción de anticuerpos anti-idiotípicos, asociado al restablecimiento de la tolerancia a FVIII mediante la ITI[93,94]. Sin embargo, las pruebas determinantes sobre su impacto clínico son limitadas[8]. Se ha hipotetizado que los anticuerpos anti-idiotípicos neutralizan los anticuerpos auto-reactivos potencialmente dañinos, suprimen las funciones de las células B auto-reactivas[95] e inducen la inhibición de células B o su apoptosis mediante su unión al receptor de los linfocitos B (BCR)[16].

Apoptosis de células B de memoria y células plasmáticas

La exposición a altos niveles de antígeno en condiciones de homeostasis inhibe la reactivación de las células B de memoria específicas de dicho antígeno. Esto impide que se diferencien en CP secretoras de anticuerpos[96,97]. Considerando una vida útil de las CP de larga duración de hasta varios años, el éxito de la ITI implica la deleción de las CP-B de memoria específicas de FVIII. Sin embargo, el mecanismo de eliminación en humanos sigue siendo desconocido[8].

FcγRIIb se expresa en células B/CP y su unión al BCR media su apoptosis como una vía fisiológica hacia el mantenimiento de la auto-tolerancia[98].

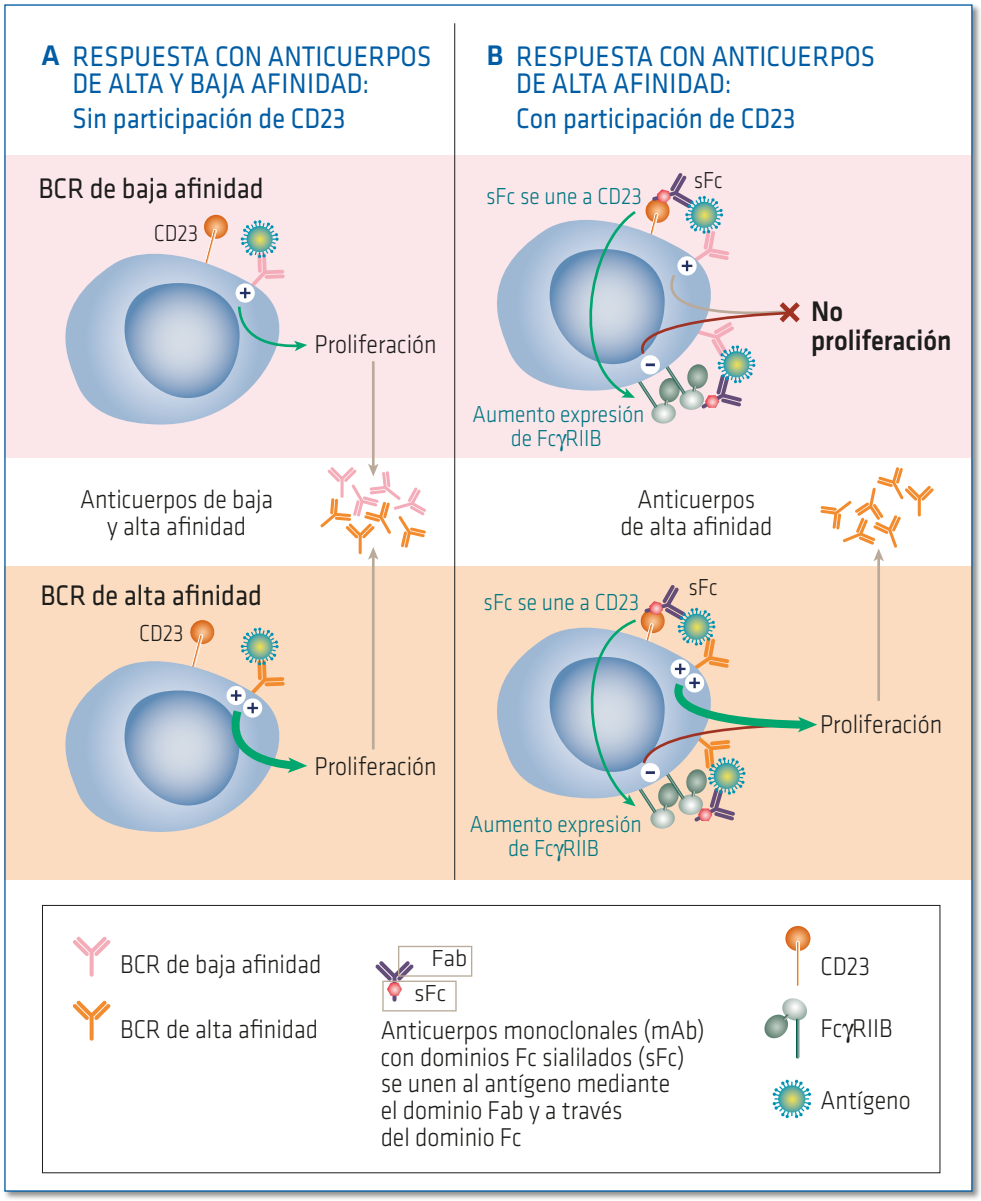


FIGURA 7 ⋮ Modelo para la producción de anticuerpos de alta afinidad a través de la unión de CD23 de células B. *Modificado de Maamary et al.*[92].

De hecho, este mecanismo ha sido propuesto como un mecanismo de ITI asociado a la presencia de anticuerpos anti-idiotípicos[16,99]. La depleción e inhibición de células B (por ejemplo, con anticuerpos anti-CD20) se ha asociado con una mejoría de la ITI[11], incluso de una forma determinante para el éxito de la misma[34,35].

HIPÓTESIS A ANALIZAR

Tras la recopilación y evaluación de toda la información relevante y disponible para presentar los mecanismos inmunomoduladores del rFVIIIFc, se plantean los mecanismos hipotéticos del dominio Fc de rFVIIIFc para inducir la inmunomodulación presentados en la Figura 8. En primer lugar, se abordarán dos posibles efectos "diana" mediados por rFVIIIFc:

- Presentación del epítopo de Treg y activación de Treg[1], y generación de un microambiente pro-tolerogénico (IL-10, TGF-β, IL-35).

- Señalización de FcγR en células inmunes[1,26]. Estudios del perfil de glicosilación en el dominio Fc de rFVIIIFc[53] sugieren que rFVIIIFc podría unirse preferentemente al receptor tipo I (o canónico) de FcγR frente al receptor tipo II, y que tiene una afinidad reducida con FcγRIIIa.

El impacto de modular estas dianas se evaluará en diferentes tipos celulares inmunes, incluyendo aquellos tipos celulares para los que hay evidencia clara, como las Tregs[19] y macrófagos[26], y también para los que hay menos apoyo experimental, como las CDs. Aunque no existe una base experimental que sugiera un efecto de rFVIIIFc sobre las células B, estas células expresan el receptor FcγRIIb típicamente inhibidor[16,17,98], y el receptor tipo II de CD23[17], que están implicados en:

- La apoptosis de células B y CP: la unión cruzada de FcγRIIb con BCR en células B de memoria y CP induce la apoptosis de estas células[98], que podría ser determinante para una ITI exitosa y rápida[34,35].

- La selección de afinidad: la señalización de FcγRIIb sin CD23 puede conducir a la selección de clones de células B que producen anticuerpos de baja afinidad[17] –este proceso podría ser importante para establecer la respuesta inmune humoral a rFVIII que promueve la generación de inhibidores o la producción de anticuerpos anti-idiotípicos.

Por ello, el linaje B también se evaluará.

Por último, el impacto de los cambios conocidos en células del sistema inmune innato sobre los efectos de la hemorragia en la articulación también se evaluará.

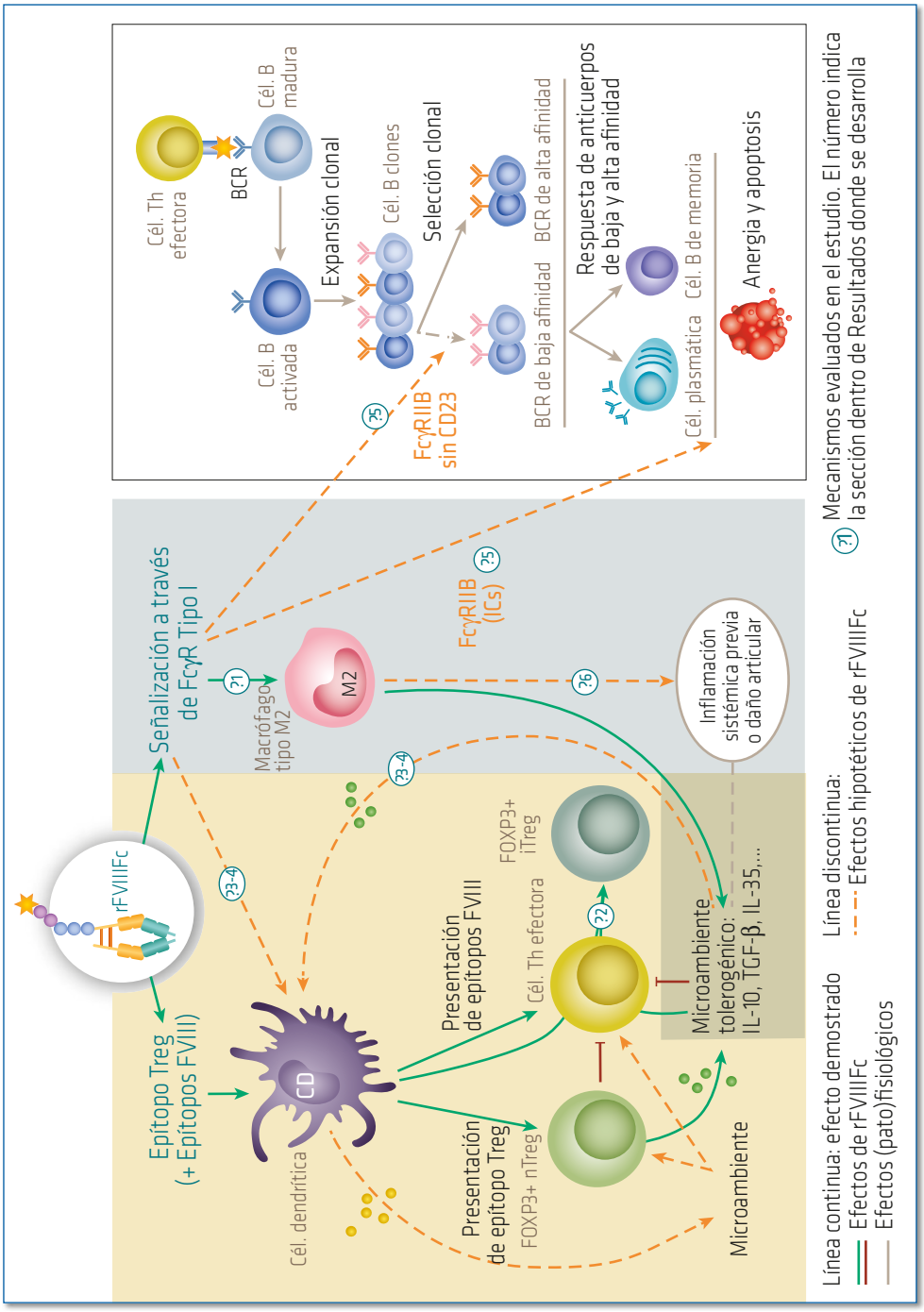


FIGURA 8 ⋮ Efectos conocidos e hipotéticos del rFVIIIFc sobre la respuesta del sistema inmune en la inflamación hemofílica. los signos de interrogación indican los mecanismos potenciales explorados en el proyecto y discutidos en las secciones siguientes.

De acuerdo con la información obtenida, se han formulado y evaluado las siguientes preguntas y/o hipótesis sobre los posibles mecanismos inmunomoduladores de rFVIIIFc (Figura 8):

1. ¿Cómo contribuye rFVIIIFc a la inmunomodulación mediante de la regulación del fenotipo del macrófago?

    a. ¿Qué procesos biológicos están afectados por rFVIIIFc en los macrófagos humanos?
    b. ¿Qué combinación de receptores podría mediar los cambios derivados en rFVIIIFc en macrófagos?

2. ¿El ambiente de citoquinas creado por rFVIIIFc facilita la activación de nTreg y/o iTreg?

3. ¿Cómo afecta rFVIIIFc al fenotipo de la CD?

    a. ¿Qué impacto tiene el FcγR (FcγRIIa/IIb) de la CD sobre el fenotipo de la CD?
    b. ¿Es necesario el microambiente derivado del Treg creado por rFVIIIFc para mantener un fenotipo tolerogénico en la CD?

4. ¿Cómo afecta rFVIIIFc a las CDs foliculares?

5. ¿Cómo podría rFVIIIFc afectar a las células B?

    a. ¿La falta de señalización CD23 puede inducir una respuesta de baja afinidad?
    b. ¿Podría un microambiente tolerogénico de Treg inducido por rFVIIIFc favorecer la apoptosis y la depleción de células B?

6. ¿Podrían los efectos de rFVIIIFc (sobre los macrófagos) modular el estado inflamatorio sistémico previo o los cambios fisiopatológicos articulares relacionados con el sangrado?

Para la evaluación de las diferentes hipótesis se ha utilizado información bibliográfica, datos de alto rendimiento *(high-throughput)* disponibles, biología de sistemas, modelización matemática y técnicas de inteligencia artificial (incluyendo análisis de enriquecimiento, redes neuronales artificiales –ANN– y métodos de muestreo). En los siguientes apartados se detallan los análisis y resultados obtenidos para abordar cada una de las cuestiones planteadas.

Procedimientos utilizados 2

RE-ANÁLISIS DE DATOS DE EXPRESIÓN DISPONIBLES

Caracterización de la artropatía hemofílica en base a los datos de alto rendimiento *(high-throughput)*

Se buscó información sobre la expresión en el repositorio público *Gene Expression Omnibus* (GEO)[100], para obtener un modelo mejor para la artropatía hemofílica, de acuerdo con la siguiente búsqueda/consulta [10 de noviembre de 2018]: *hemofilia [TITLE]*. Se obtuvieron 5 series como resultado. Tras una revisión manual de los diseños de los estudios, tejido de muestra y número real de muestras útiles, únicamente fue considerado relevante un estudio GSE85051 - *Acute hemarthrosis in the hemophilia A rat generates a local and systemic pro-inflammatory response, published by Lövgren et al.*[63].

En este estudio se infligió daño en una rodilla a ratas hemofílicas y se analizaron los ganglios linfáticos de la rodilla contralateral (no dañada, sin hemorragia) comparándose con los ganglios linfáticos de la rodilla de ratas hemofílicas sin daño articular. Se analizaron usando el software GEO2R y se consideraron positivos los resultados con significación estadística a p-valor de 0,05 tras una corrección multi-test. Se detectaron un total de 545 genes/proteínas como diferenciales. Estos resultados se analizaron y evaluaron a nivel de proceso (análisis de enriquecimiento hipergeométrico)[101].

Caracterización del rFVIIIFc en base a los datos de alto rendimiento *(high-throughput)*

Se buscó información sobre la expresión en el repositorio público *Gene Expression Omnibus* (GEO)[100], para obtener un modelo mejor de artropatía hemofílica, de acuerdo a la siguiente búsqueda/consulta [10 de noviembre de 2018]: *"rFVIIIFc" O ELOCTA O ELOCTATE [todo]*. Únicamente se consideró relevante un estudio: GSE118157 - *Effects of rFVIIIFc on human macrophages,* publicado por *Kis-Toth et al.*[26]. Los datos de los macrófagos humanos tratados con rFVIIIFc se compararon con los de los macrófagos tratados con IgG1- y rFVIII y se analizaron utilizando dos procedimientos diferentes para calcular la expresión diferencial, edgeR[102] y limma[103]. Se utilizó el método Stouffer para la combinación de ambos análisis de expresión diferencial[104], y los valores-T equivalentes al valor p <0,05 fueron consideraron significativos. Para los análisis posteriores solo se consideraron las proteínas que, de forma consistente, eran diferenciales al comparar entre macrófagos tratados con rFVIIIFc frente a los tratados con IgG1 y con rFVIII. Se detectaron un total de 70 genes/proteínas como diferenciales. Estos resultados se analizaron y evaluaron a nivel de proceso (análisis de enriquecimiento hipergeométrico)[101].

Análisis de enriquecimiento

Realizamos un análisis de enriquecimiento hipergeométrico[101] para identificar los conjuntos de proteínas enriquecidos en los datos utilizando KEGG[105], Gene Ontology[106,107], PHARMGKB[108], SMPDB[108], TRRUST[109] y BED[110]. El objetivo del análisis de enriquecimiento es proporcionar una visión global de los datos diferenciales, ya que este tiene en cuenta el conocimiento biológico acumulado sobre cómo trabajan los genes juntos, permitiendo la identificación de las vías predominantes o enriquecidas. Finalmente, utilizamos Cytoscape (v. 3.6.0)[111] para mostrar los resultados.

MÉTODOS BIOCOMPUTACIONALES – TECNOLOGÍA TPMS

El TPMS (Anaxomics Biotech, Barcelona, España) es una aproximación vertical a la biología de sistemas con aplicaciones en biomedicina. Se basa en modelos de Inteligencia Artificial y de reconocimiento de patrones que integra todos los conocimientos biológicos, farmacológicos y médicos disponibles

para crear modelos matemáticos que simulan el comportamiento *in silico* de la fisiología humana, tal como se describe en[112] y aplica en[113-115], entre otros.

La tecnología TPMS se basa en cuatro pasos principales: construcción de redes de proteínas, creación de un mapa biológico, generación de modelos matemáticos y análisis de modelos.

Construcción de la red de proteínas

La red humana de interacciones proteína-proteína creada incorporó las relaciones disponibles (márgenes) o (conexiones) entre proteínas (nodos) a partir de una base de datos interna actualizada periódicamente y procedente de fuentes públicas: obtenidos de INTACT[116], REACTOME[117,118], BIOGRID[119,120], DIP[121], HPRD[122] y TRRUST[109] y de las bases de datos internas de Anaxomics.

Aunque la diana principal de rFVIIIFc es la cascada de la coagulación, debido al dominio Fc (fusionado con rFVIII) podría dirigirse a otras proteínas, como por ejemplo los receptores FcγR, e inducir efectos inmunomoduladores. Con el fin de filtrar falsos positivos e incluir toda la información relevante en los modelos, se realizó una revisión completa de la bibliografía para analizar la evidencia que pudiera apoyar estas interacciones fuera de la vía de la coagulación, con el fin de utilizarlas como entrada de los modelos.

En este punto, la información sobre la interacción de las proteínas alrededor de los receptores FcγR (incluyendo FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa, FcγRIIIb y FcRn) tipo I fue seleccionada manualmente (Figura 9). Los receptores activadores (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIc, FcγRIIIa, FcγRIIIb) comparten algunas proteínas de interacción, así como con el receptor inhibidor FcγRIIb. FcRn es el receptor con mayor número de interacciones y también el más diferente del resto de FcγR. Esta información ha sido utilizada para construir y preparar los modelos.

Creación del mapa biológico

La red humana de las interacciones proteína-proteína se enriquece con todo tipo de información biológica (por ejemplo: dianas farmacológicas, efectores de enfermedades, expresión en tejidos, biomarcadores), con el fin de dotar al mapa de proteínas de un nivel funcional[112].

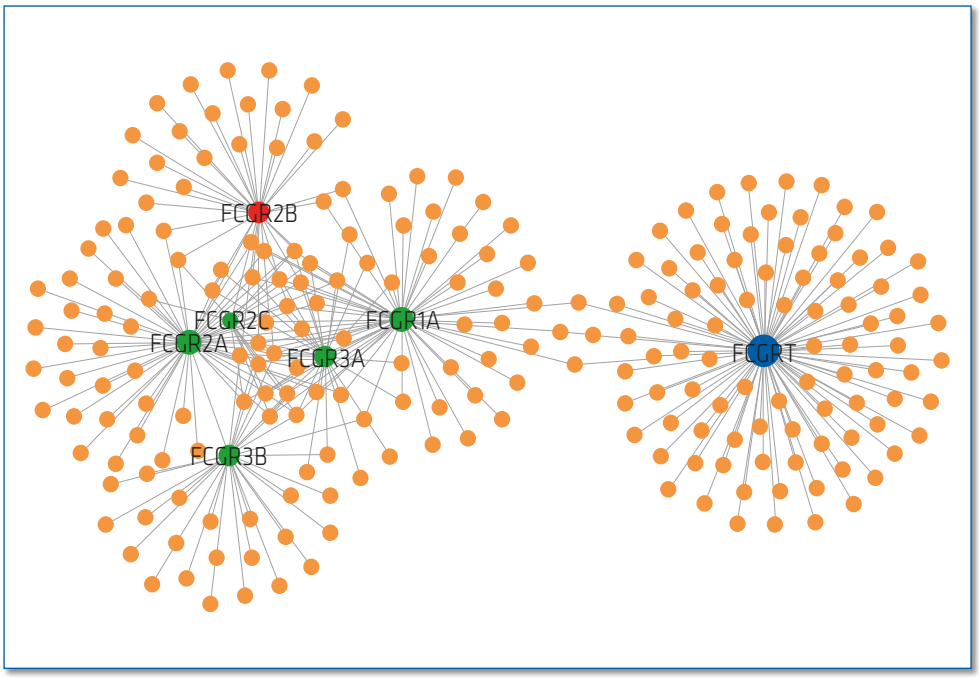


FIGURA 9 ⋮ Red seleccionada manualmente. Los nodos amarillos son proteínas que interactúan con FCγR, los nodos verdes son receptores activadores, los nodos rojos son receptores inhibitorios, los nodos azules son receptores recicladores. Los receptores están marcados por su nombre genético correspondiente. El tamaño de los nodos de los receptores indica el número de interacciones directas que tienen.

En este punto se seleccionó e incluyó la función biológica FcγR, de acuerdo con el conocimiento actual.

La distribución de la expresión celular de FcγR y las funciones célula-específicas se caracterizaron a través de la selección manual de la literatura científica. Las funciones célula-específicas se caracterizaron según lo descrito por la comunidad científica en el *Gene Ontology Consortium*[106,107] [fecha: 2/10/2018] (Tabla 2).

Generación del modelo matemático

Los mapas biológicos se transformaron en un modelo matemático capaz de reproducir los conocimientos existentes y predecir nuevos datos. La tecnología TPMS utiliza un conjunto de algoritmos de inteligencia artificial para reproducir la fisiología sobre la red biológica humana[139-142].

TABLA 2. Información seleccionada de la expresión celular y función de FcγR.

Receptor	Acción general	Expresión en células			Función (término)
		Alto	Bajo	No	
FcγRI	Activación	Mastocitos, monocitos, células dendríticas (I), macrófagos (S)	Eosinófilos (I), neutrófilos	Células B, células T, células NK	• Activación de células dendríticas mieloides, células dendríticas foliculares, monocitos macrófagos, neutrófilos • Fagocitosis, absorción • Estallido respiratorio tras fagocitosis, estallido respiratorio, estallido respiratorio implicado en la respuesta inflamatoria, • Producción de citoquinas implicadas en la respuesta inflamatoria
FcγRIIa		Células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células de Langerhans, plaquetas	Basófilos	Células B, células T, células NK	• Activación de monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos • Fagocitosis, absorción • Migración de granulocitos • Degranulación de neutrófilos, eosinófilos y basófilos • Citotoxicidad mediada por neutrófilos, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos • Diferenciación de células dendríticas convencionales maduras, activación de células dendríticas mieloides, activación de células dendríticas foliculares • Procesamiento y presentación de antígenos • Regulación de la diferenciación de las células T de memoria • Proceso biosintético de especies reactivas de oxígeno • Producción de citoquinas implicadas en la respuesta inflamatoria, producción de citoquinas de células dendríticas plasmocitoides

.../...

TABLA 2. *(Continuación)* Información seleccionada de la expresión celular y función de FcγR.

Receptor	Acción general	Expresión en células			Función (término)
		Alto	Bajo	No	
FcγRIIc	Activación	Células NK, neutrófilos, células dendríticas	-	Monocitos, macrófagos, eosinófilos	• Citotoxicidad mediada por células natural killer, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
FcγRIIIa		Macrófagos, monocitos, células NK, células dendríticas (I)	-	Mastocitos, células B, células T, neutrófilos, eosinófilos	• Activación de monocitos, macrófagos y células natural killer • Citotoxicidad mediada por células natural killer, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, degranulación de células natural killer • Fagocitosis, absorción
FcγRIIIb	Activación (señalización)	Neutrófilos	Basófilos, eosinófilos (I)	-	• Similar a FcγRIIa
FcγRIIb	Inhibición	Basófilos, células B / células plasmáticas, células dendríticas, eosinófilos, células de Langerhans	Neutrófilos, células NK (S), macrófagos, monocitos	Mastocitos, células T	• Activación de monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos • Eliminación del complejo inmune por monocitos y macrófagos; fagocitosis, absorción. • Diferenciación de células dendríticas convencionales maduras, activación de células dendríticas mieloides, activación de células dendríticas foliculares • Proceso de apoptosis de células B • Activación y selección de células B

.../...

TABLA 2. *(Continuación)* Información seleccionada de la expresión celular y función de FcγR.

Receptor	Acción general	Expresión en células			Función (término)
		Alto	Bajo	No	
FcRn	Reciclado	Ubicuo		-	• Transcitosis
DC-SIGN	Modulación	Células dendríticas, macrófagos (S), monocitos (S)		Células B células T, células NK, neutrófilos, eosinófilos	• Diferenciación de células T reguladoras
CD23		Células B, células T, monocitos, macrófagos, granulocitos (I)		Células dendríticas, células NK	• Selección de células B [FcγRIIb+CD23+BCR]

(I): expresión inducible; (S): expresión restringida a ciertos subtipos. Datos construidos usando la información procedente de (17, 18, 44, 45, 49-51, 123-138).

Se seleccionó un conjunto de señales fisiológicas de entrada-salida ya conocidas, que fueron consideradas "verdades" y recopiladas en una tabla (tabla de verdad) para preparar los modelos[143]. La tabla de verdad se construye utilizando un compendio de bases de datos que acumula datos biológicos y clínicos[144,145] y proporciona relaciones de entrada-salida biológicas y farmacológicas (tales como pares de fármaco-indicación). En este ejercicio las funciones de FcγR también se utilizaron como "verdades" para preparar los modelos. Los modelos deben ser capaces de reproducir cada una de las reglas contenidas en la tabla de verdad, de forma que se calcula el error de un modelo como la suma de todas las reglas con las que no cumple dicho modelo.

Las condiciones biológicas o patológicas incluidas en la tabla de verdad son caracterizadas molecularmente a través de la búsqueda específica de bibliografía científica y mediante la asignación manual de proteínas a las condiciones seleccionadas. Esta información que relaciona los procesos biológicos (reacciones adversas, indicaciones, enfermedades y vías moleculares) con sus efectores moleculares, es decir, con cada una de las proteínas implicadas en el proceso fisiológico, se recopiló en la base de datos de efectores biológicos (BED)[110,146].

Se utilizaron dos estrategias de modelos complementarios: las redes neuronales artificiales (ANNs, por sus siglas en inglés) y los métodos basados en el muestreo.

Redes neuronales artificiales

Las ANNs son algoritmos supervisados que identifican relaciones entre proteínas (en este caso, dianas farmacológicas) y elementos clínicos de la red[114,141,147], al inferir la probabilidad de la existencia de una relación específica entre dos o más conjuntos de proteínas basada en la validación de la capacidad predictiva del modelo hacia la tabla de verdad.

Las ANNs son un grupo interconectado de nodos (proteínas humanas) que simulan de alguna manera a las neuronas en un cerebro biológico. Cada conexión, como las sinapsis en un cerebro biológico, puede transmitir una señal de una neurona artificial a otra. Este sistema crea un entorno para que muchos algoritmos diferentes de aprendizaje automático (del inglés *machine learning*) trabajen juntos y procesen entradas complejas de datos.

Esta estrategia permite identificar relaciones entre las regiones de la red (predicción de relaciones, generalización), y por ello una de sus aplicaciones es la evaluación del perfil de eficacia y seguridad de un fármaco.

La validación cruzada con la tabla de verdad mostró que la precisión de los ANNs respecto a los fármacos con las dianas de la red biológica humana es del 81% para reproducir las indicaciones recopiladas en el DrugBank[144,148]. Se utilizó esta estrategia para la evaluación de la eficacia.

Métodos basados en el muestreo

Los métodos basados en el muestreo de TPMS generan modelos similares a un perceptrón multicapa de una ANN sobre la red de proteínas humanas: las neuronas son las proteínas y los márgenes de la red son las vías de transmisión. Utilizan algoritmos de optimización[140] para resolver cada parámetro de la ecuación, o lo que es lo mismo, el peso relativo de un enlace que conecta nodos (genes/proteínas) en un gráfico (mapa de proteínas).

Debido a que el número de restricciones del modelo matemático es más pequeño que los parámetros requeridos para el algoritmo, cualquier proceso simulado por TPMS tiene en cuenta un conjunto de varias soluciones. TPMS describe las vías más probables (en términos biológicos y matemáticos) entre todas las posibles que llevan del estímulo a la respuesta dentro de la red biológica. Dicho de otra manera, identifica los mecanismos moleculares más probables para alcanzar una respuesta fisiológica. Por tanto, los modelos matemáticos específicos de fármaco-enfermedad cumplen con el conjunto de restricciones, dadas por los conocimientos biológicos acerca de las redes construidas, junto con la información procedente de DrugBank[100].

Se obtuvieron modelos que cumplían con la información de la tabla de verdad con una precisión media del 95%.

Análisis de los modelos

Una vez generados los modelos matemáticos, estos se utilizaron para resolver las hipótesis evaluadas del mecanismo molecular de rFVIIIFc.

Redes neuronales artificiales

Se evaluó la relación entre los efectos de rFVIIIFc –señalización de FcγR o microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc– y los procesos biológicos evaluados, según el tipo celular, obteniéndose y comparándose valores de probabilidad.

Métodos basados en el muestreo

Se simularon estímulos específicos relacionados con rFVIIIFc para evaluar su impacto en los procesos del sistema inmune, específicamente en el fenotipo de las CDs. Para ello se utilizó la "intensidad" de la respuesta, en la que rFVIIIFc se define como una medida de la fuerza o la media de la señal de salida de los efectores (es decir, una medida global de la señal de salida, denominada TSignal); asumiendo que γ_i es el valor alcanzado por una proteína efectora "i", υ_i es su signo efector esperado (activo o inactivo) y η es el número total de efectores descritos para un fenotipo:

$$TSignal = \frac{\sum_{i}^{\eta} = 1 \left(\frac{\upsilon_i}{|\upsilon_i|} * \frac{\gamma_i}{|\gamma_i|} \right) * (-|\gamma_i|)}{\eta}$$

Los valores de TSignal para un grupo de proteínas o para proteínas individuales pueden utilizarse como parámetros biológicos, con el fin de evaluar la actividad diferencial entre dos condiciones distintas.

Los datos se analizaron aplicando los siguientes tests:

- El método Lillieforsse aplicó para analizar la normalidad[149-151].
- El test T-student se aplicó para determinar si TSignal era estadísticamente diferente entre cohortes[152,153] cuando las muestras tienen una distribución normal.
- La prueba de Wilcoxon-rank sum se aplicó para determinar si TSignal era estadísticamente diferente entre cohortes cuando las muestras no mostraban una distribución normal[154,155].
- La prueba de ANOVA también fue aplicada a las muestras.

La corrección multi-test se realiza según el método de tasa de falsos descubrimientos (FDR) de Benjamini-Hochberg[156].

Resultados y discusión: posibles mecanismos inmunomoduladores de rFVIIIFc

3

Se ha evaluado el rol de rFVIIIFc sobre procesos relacionados con cada una de las células inmunes implicadas en la respuesta inmune a rFVIII en pacientes hemofílicos, así como sobre el impacto negativo del sangrado asociado a complicaciones articulares.

Los resultados están divididos en efectos observados y efectos hipotéticos para rFVIIIFc.

EFECTOS DEMOSTRADOS EXPERIMENTALMENTE PARA rFVIIIFc

Efecto sobre los macrófagos

Funciones y fenotipos de los macrófagos

Los macrófagos regulan muchos procesos biológicos, incluyendo tanto la inmunidad innata como la adquirida, además del metabolismo sistémico, la hematopoyesis, la angiogénesis, la malignidad de tumores y la reproducción[157-160]. Estas potentes células efectoras inmunes intervienen en la homeostasis de los tejidos y también en procesos regenerativos[161-163]. Los macrófagos muestran una gran heterogeneidad y plasticidad, lo que les confiere gran capacidad de participar en diferentes procesos a través de variedad de funciones[164,165].

La polarización del macrófago es el proceso mediante el que los macrófagos adquieren un fenotipo específico y una respuesta funcional frente a un estímulo y a las señales del microambiente de cada tejido. Básicamente, se dividen en dos poblaciones principales: los activados clásicamente o inflamatorios (M1) y los activados de forma alternativa o antiinflamatorios (M2). Según el estímulo que produce la activación se define el estado M1 o M2[166].

Los M1 se inducen por citoquinas Th1 como IFN-γ y TNF-α, y también por LPS u otros estímulos bacterianos. Este tipo de macrófagos secretan mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias como TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23 y COX2, y bajos niveles de IL-10[166].

Los M2 se polarizan por citoquinas Th2, como IL-4 o IL-13, IL-33 e IL-21. Secretan un perfil de citoquinas de tipo antiinflamatorio con una baja producción de IL-12 y con una alta producción de IL-10 y TGF-β. Dependiendo del estímulo que reciben y según definiciones recientes, los M2 se pueden dividir a su vez en 4 sub-poblaciones que son M2a, M2b (activados, entre otros, por inmunocomplejos (ICs) y agonistas del receptor TLR) M2c y M2d[166].

Expresión y rol de los FcγR

Los macrófagos expresan mRNA de los receptores FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, y FcγRIIIa (activadores) y FcγRIIb (inhibidores) (Tabla 2). Aunque la unión a los FcγRs y su activación en macrófagos induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias, la señalización promovida por ICs (compuestos por antígeno e IgG) a través de los FcγRs activadores, junto con la unión de LPS al receptor tipo Toll (TLR), promueve el estado M2 de los macrófagos (anti-inflamatorios y reguladores de la respuesta inmune)[167].

Evidencias del efecto de rFVIIIFc en macrófagos – inducción de fenotipo similar a M2

Kis-Toth et al.[26] mostraron que rFVIIIFc es capaz de inducir un fenotipo similar a M2/Mox en macrófagos humanos. El experimento evaluó los cambios de expresión en macrófagos humanos después del tratamiento con rFVIII, IgG1 y rFVIIIFc.

En este estudio demostraron que tratando los macrófagos con rFVIIIFc, se inducían o inhibían de forma diferencial más de 200 genes, al compa-

rar con el tratamiento con IgG1 o con rFVIII. Dentro del diferente perfil metabólico observado entre el tratamiento con rFVIIIFc frente a IgG1 o rFVIII, se vio un aumento en la utilización de glucosa, con un aumento en la producción de UDPglucosa/galactosa, un aumento en la β-oxidación de los ácidos grasos y un incremento en la actividad mitocondrial. Entre los genes afectados de forma diferencial, se vio que había genes/vías empleadas como marcadores de los macrófagos tipo M2/Mox. Todo ello apuntó hacia un estado de fosforilación oxidativa, característico de los macrófagos activados alternativamente. La ausencia de marcadores de activación de macrófagos pro-inflamatorios y la inducción de la fosforilación de SHIP1, junto con la expresión de marcadores de macrófagos reguladores, sugieren que rFVIIIFc no induce respuesta inmunogénica a los macrófagos *in vitro*.

Los cambios específicos en la expresión de genes, asociados a cambios en el fenotipo y metabolismo de los macrófagos, observados en comparación con rFVIII están necesariamente mediados por la unión del Fc de rFVIIIFc a FcγR. *Kis-Toth et al.*[26] también mostraron que para observar los cambios inducidos por rFVIIIFc en los macrófagos, eran necesarias: 1) la vía de activación (FcγRIa/IIa/IIIa), reflejada en la actividad de la proteína adaptadora syk; 2) la vía de señalización inhibidora (FcγRIIb), mediada por la proteína SHIP1; y 3) el receptor de reciclaje FcRn. La fracción unida a la proteína recombinante podría actuar de forma similar a ICs, involucrados en la activación alternativa del fenotipo de los macrófagos[69,70,168]. Sin embargo, se desconoce el receptor exacto (o combinación de receptores) que median los efectos observados.

¿Qué procesos biológicos se ven afectados por rFVIIIFc en macrófagos humanos?

Para explorar el impacto de rFVIIIFc en la biología de los macrófagos hemos reevaluado los datos de expresión generados por *Kis-Toth et al.*[26] disponibles en el repositorio público *Gene Expression Omnibus* (GEO)[100] con código de acceso GSE118157. Las proteínas identificadas como expresadas diferencialmente de forma consistente, en las muestras tratadas con rFVIIIFc frente a rFVIII e IgG1, se sometieron a un análisis de enriquecimiento, con el fin de identificar los procesos biológicos modulados diferencialmente por rFVIIIFc en macrófagos (Figura 10).

De acuerdo con los resultados de *Kis-Toth et al.*[26] nuestros análisis muestran que rFVIIIFc induce cambios en la expresión de procesos que se sabe que

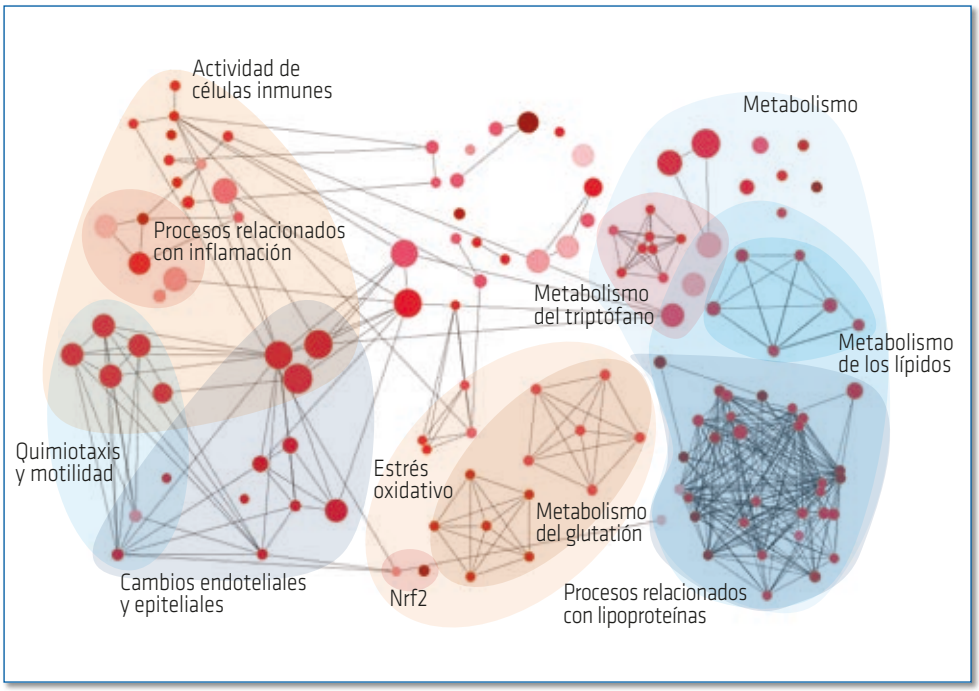


FIGURA 10 ⋮ Imagen de la red de procesos de enriquecimiento de los genes expresados diferencialmente de forma consistente en macrófagos tratados con rFVIIIFc frente a macrófagos tratados con rFVIII e IgG1. El tamaño del nodo indica el tamaño del conjunto de proteínas (cuanto mayor sea el nodo, más proteínas se incluyen en el conjunto). El color del nodo indica el nivel de enriquecimiento (cuanto más oscuro sea el nodo, más significativo será el enriquecimiento). Los nodos han sido agrupados por función biológica. *Calculado en base a los datos generados por Kis-Toth et al.*[26].

determinan el fenotipo del macrófago, como los procesos del metabolismo de lípidos y triptófano[67,169,170] y procesos relacionados con el estrés oxidativo (Nrf2 o glutatión)[67,68].

Otros cambios inducidos por rFVIIIFc observados en macrófagos implican:

- Procesos relacionados con la inflamación, como la regulación de IL-1β, una interleuquina pro-inflamatoria expresada por macrófagos M1 activados de forma clásica[168];
- Regulación de la respuesta inmune, como la inducción de anergia de células T - se ha reportado la capacidad de los macrófagos M2b para activar las Tregs[69,70];

- Procesos anti-oxidantes y otros reguladores de estrés, capacidades incrementadas en macrófagos activados alternativamente y que intervienen en los efectos reparadores[26,171,172];

- Procesos relacionados con la angiogénesis, también observados en los macrófagos activados alternativamente y relacionados con sus capacidades de reparación tisular[168,173].

De acuerdo con los resultados comunicados y comentados por Kis-Toth et al. [3] el análisis de enriquecimiento de los datos muestra que rFVIIIFc induce cambios en macrófagos hacia un fenotipo tipo M2, sugiriendo propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y reparadoras para los macrófagos tratados con rFVIIIFc.

Evaluación de la señalización por FcγR tras las observaciones en macrófagos

Para evaluar el rol de rFVIIIFc respecto a los efectos observados en referencia a los macrófagos, definimos, por un lado, los cambios inducidos por rFVIIIFc en macrófagos humanos como las proteínas expresadas diferencialmente de forma consistente en muestras tratadas con rFVIIIFc *versus* las tratadas con rFVIII y IgG1 (*Kis-Toth et al.*[26], GSE118157). Por otro lado, definimos como dianas moleculares de rFVIIIFc los receptores FcγR expresados en los macrófagos (FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγIIIa, FcγRIIIb y FcRn).

¿A través de qué combinación de receptores FcγR señaliza rFVIIIFc para mediar los cambios sobre los macrófagos?

Con el fin de evaluar el receptor o la combinación de receptores que con más probabilidad podrían mediar los cambios observados experimentalmente en macrófagos, se llevó a cabo un análisis de probabilidad de relación. A través de los modelos predictivos basados en ANN, se evaluó la relación de las combinaciones de 2, 3 y 4 receptores FcγR (incluyendo siempre el receptor inhibidor FcγRIIb) con los cambios inducidos por rFVIIIFc en macrófagos humanos (Figura 3). Este análisis muestra que la combinación de dos receptores con mayor probabilidad de relación es FcγRIIa+FcγRIIb, y al

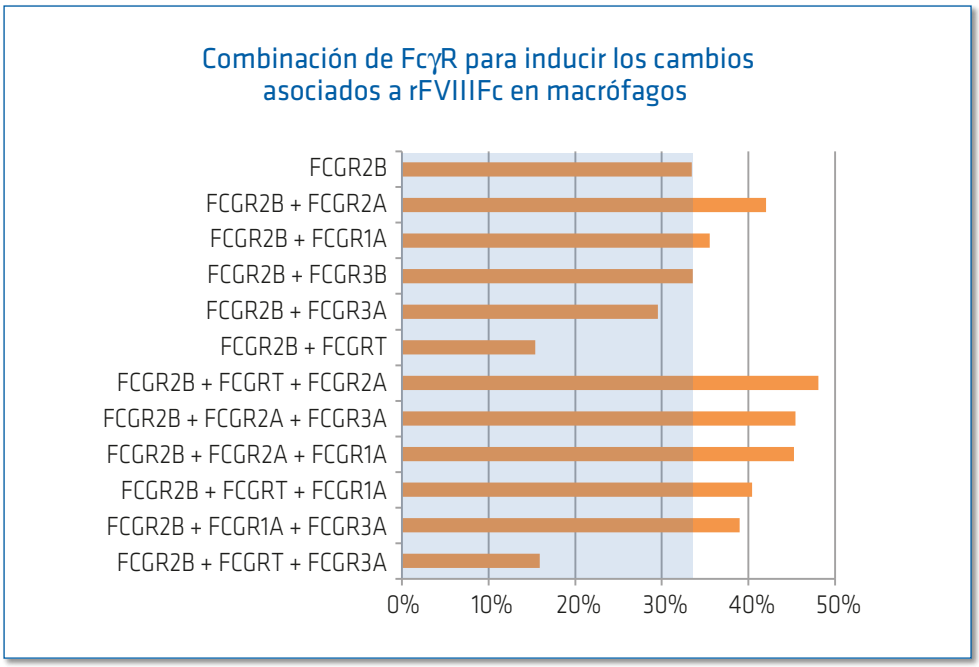


FIGURA 11 ⋮ Resultados del análisis ANN entre FcγRIIb + uno o dos receptores Fc *versus* activación de macrófagos. FcγR se identifican con los nombres de genes correspondientes. La zona de sombreado azul muestra únicamente el nivel de relación predicha para FcγRIIb.

combinarla con el resto receptores, la combinación FcγRIIa+FcγRIIb+FcRn se presenta como la más probable de mediar los cambios inducidos por rFVIIIFc. Las combinaciones de cuatro receptores vuelven a niveles más bajos de probabilidad de relación (datos no mostrados en la Figura 11).

Estos resultados podrían resultar sorprendentes dado el papel general de FcγRIIa como activador inmune. Sin embargo, una investigación más profunda sobre las funciones de los diferentes FcγR en los distintos tipos de células inmunes, muestra varias excepciones al papel de los receptores inhibidores/activadores[52], lo que muestra la complejidad de las funciones de FcγR, y la flexibilidad que aportan a la respuesta inmune.

Los cambios inducidos por rFVIIIFc sobre los macrófagos (fenotipo tipo M2) podrían estar mediados por la señalización combinada de los receptores clásicamente activadores (FcγRIIa) e inhibidores (FcγRIIb), y de FcRn.

Efecto sobre células Treg

Función de las Tregs: nTregs e iTregs

La regulación de la respuesta inmune es un proceso complejo que implica la autotolerancia hacia lo propio, pero simultánea a la capacidad de una respuesta eficaz frente al antígeno externo. Las células T reguladoras (Tregs) juegan un papel importante en la regulación del sistema inmune. Se han definido dos poblaciones de células Treg CD4+: las naturales o innatas (nTreg) y las inducibles o adaptativas (iTreg)[77]. Ambas difieren en su desarrollo, especificidad, mecanismo de acción y dependencia del TCR y señales coestimuladoras.

Las nTregs se desarrollan en el timo durante las fases iniciales de desarrollo en el feto y en el recién nacido. Son policlonales con relación a la diferente utilización del TCR, expresan altos niveles de CD25 y son capaces de reconocer diferentes auto-antígenos. Requieren una combinación del TCR con una máxima coestimulación con CD28 para su maduración. Una vez generadas en el timo, se dirigen a los tejidos periféricos para evitar la activación de otras células T a células efectoras de la respuesta inmune. Siempre están presentes en el individuo en situación normal.

Por otro lado, las iTregs se generan a partir de poblaciones de células T maduras, específicas para antígeno no necesariamente propios, bajo determinadas circunstancias de estimulación antigénica. Su origen también es el timo, pero a diferencia de las nTregs, se propone que requieren una diferenciación posterior como consecuencia de la exposición al antígeno en un contexto inmunológico diferente. El desarrollo de las iTregs de forma periférica se podría generar por un antígeno de baja afinidad o una transducción alterada de la señal del TCR. No dependen de la coestimulación con CD28 y la expresión de CD25 es variable[77].

Aparte de la activación de nTreg, un paso importante en la adquisición de tolerancia o inducción de tolerancia es la anergia de las células T efectoras y la generación de iTregs.

En cuanto a su función, se ha propuesto[77] que las nTregs funcionan principalmente evitando la repuesta inmune frente a auto-antígenos. Por el contrario, las iTregs funcionarían principalmente para mantener el control homeostático ante diferentes respuestas inmunes inducidas hacia antígenos tanto extraños como específicos de tejidos propios.

Expresión de receptores FcγR

Las células T no expresan FcγR[18] (Tabla 2), por tanto se espera que los efectos del rFVIIIFc sobre las células T no estén mediados directamente a través de la señalización de estos receptores. De hecho, como se ha comentado previamente, los efectos del rFVIIIFc en estas células, si bien son derivados de la fracción Fc, deben implicar epítopos de Treg.

Evidencias del efecto de rFVIIIFc en Tregs – inducción de tolerancia mediante epítopos de Treg y microambiente pro-tolerogénico

Krishnamoorthy et al.[1] mostraron que rFVIIIFc es capaz de activar Tregs, principalmente a través de la presentación del epítopo de Treg y la activación de TCR+CD28[174]. Demostraron que dosis bajas de 50 UI/kg de rFVIIIFc inducen la generación de un microambiente tolerogénico (IL-10, TGF-β, IL-35). Estas citoquinas son bien conocidas por su potencial tolerogénico; también, se ha observado que los pacientes con hemofilia sin inhibidores producen más TGF-β que los pacientes con inhibidores[8].

Además, demostraron que rFVIIIFc induce el aumento tanto del fenotipo de Tregs como de las moléculas asociadas a la vía inmunosupresora PD-L1:PD1, lo cual potencialmente reduce la inmunogenicidad e induce tolerancia hacia FVIII. Sus resultados sugirieron la existencia de Tregs en el bazo de ratón que, habiendo recibido dosis bajas de rFVIIIFc, podrían participar en la supresión de la respuesta de las células T frente a rFVIII, al inhibir la producción de IFNγ. Los datos mostraron que las vías activadas por rFVIIIFc y que producen la tolerogenicidad podrían implicar una combinación de la vía de los FcγR, en concreto el FcγRI-Ib, y potencialmente otras, como la presencia de epítopos de Treg en la fracción Fc.

Dosis bajas de rFVIIIFc inducen la activación de Tregs y la producción de un microambiente tolerogénico (IL-10, TGF-β, IL-35), que está asociada a la reducción de respuesta inmunogénica contra rFVIII.

TABLA 3 ⋮ Diferencias en la puntuación de la relación basada en ANN de la señalización TCR+CD28 *versus* procesos relacionados con células t cuando se añade un microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc como estímulo, expresado en aumento de porcentaje.

Procesos	Aumento de la relación
Diferenciación de células Tregs	4%
Inducción de anergia en células T (activación de iTregs)	631%
Cambios mediados por rFVIIIFc *(Krishnamoorthy et al.[1])*	4130%

Evaluación del mecanismo mediado por epítopos de Treg e impacto del microambiente pro-tolerogénico detrás de las observaciones para Tregs

Para evaluar el rol de rFVIIIFc respecto a los efectos observados referentes a las Tregs, definimos, en primer lugar, la diferenciación de las células Tregs según lo descrito por la comunidad científica en el *Gene Ontology Consortium*[98,175] [fecha: 2/10/2018]; en segundo lugar, definimos inducción de anergia en células T (activación de iTregs) mediante la revisión manual de la literatura científica según los protocolos internos de Anaxomics, ya que no están descritos en las bases de datos revisadas por la comunidad científica; y en tercer lugar, definimos los cambios mediados por rFVIIIFc sobre las células T según *Krishnamoorthy et al.*[1] como el conjunto de moléculas alteradas en las células T tras el tratamiento con rFVIIIFc (PD1, TNF-α, CTLA4, IL-10 y STAT3).

Por otro lado, definimos como dianas moleculares de rFVIIIFc en primer lugar: la activación de la señalización por TCR y su molécula coestimuladora CD28 (TCR+CD28) y en segundo lugar el microambiente pro-tolerogénico (IL-10, TGF-β y IL-35).

¿Facilita el ambiente de citoquinas creado por rFVIIIFc, además de la señalización de los epítopos de Treg (TCR+CD28), la activación de nTreg y/o iTreg?

La relación del microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc en combinación con la señalización TCR+CD28 respecto a la activación de tres procesos relacionados con células T se ha evaluado mediante análisis de probabilidad de relación (ANN) (Tabla 3).

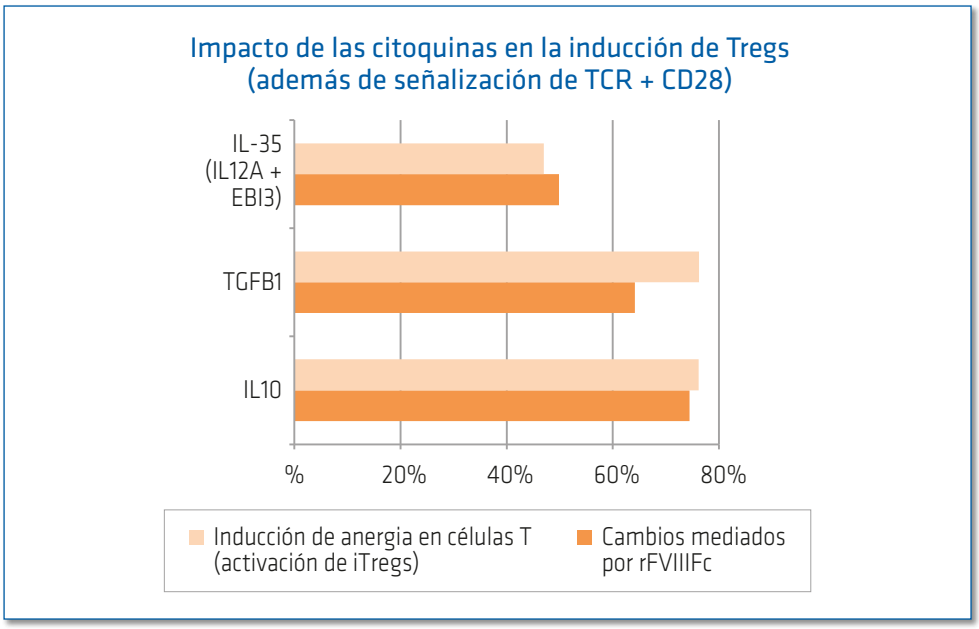


FIGURA 12 ⋮ Relación de la señalización de TCR+CD28 basado en ANN más cada una de las citoquinas indicadas *versus* la activación de iTreg a través de la anergia de células T y *versus* cambios en células T comunicados por *Krishnamoorthy et al.*[1].

No se observa apenas impacto del microambiente en la diferenciación de nTregs, lo que sugiere que la activación de TCR a través de los epítopos de Treg es suficiente para inducir la activación de nTreg independientemente del microambiente. Por otro lado, la inducción de anergia y activación de iTreg a través de la anergia de las células T efectoras y los cambios en las células T comunicados por *Krishnamoorthy et al.*[1] parecen estar afectados de forma importante por el microambiente pro-tolerogénico.

Dado el impacto del microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc sobre la inducción de anergia y los cambios en células T comunicados por *Krishnamoorthy et al.*[1], se llevó a cabo una investigación para identificar la citoquina con el mayor impacto en estos efectos (Figura 12). IL-10 y TGF-β1 son las citoquinas que parecen tener los mayores niveles de impacto, seguido por IL-35.

El microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc facilita la anergia de células T y el desarrollo de iTreg (principalmente a través de IL-10 y TGF-β1), lo que puede ayudar a prevenir el desarrollo de inhibidores y facilitar la ITI.

EFECTOS HIPOTÉTICOS DE rFVIIIFc

Efecto sobre las células dendríticas

Función de las células dendríticas, rol en la relación inmunidad innata-adaptativa y en el establecimiento de tolerancia

Las células dendríticas, en función de su estado de desarrollo, están especializadas en procesar antígenos, presentándolos como péptidos unidos al MHC (CDs inmaduras) e iniciar la respuesta inmune (CDs maduras). Intervienen tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa[78,79]. Además, las CDs inducen tolerancia central y periférica, mediante la deleción de células T y la inducción de células Treg[87,90]. Aunque se ha descrito alguna excepción, de forma general, se ha considerado que las CDs inmaduras promueven la tolerogenicidad, mientras que las CDs maduras inducen respuesta inmunitaria[41].

Las CDs pueden clasificarse en diferentes grupos según su fenotipo (IDO, CD123, CCR6 o DC-SIGN) y funciones[80,82-86]. En condiciones homeostáticas, las CDs periféricas suelen presentar un fenotipo "inmaduro" caracterizado por la expresión de bajos niveles de MHC II y moléculas coestimuladoras.

Expresión de FcγR

Las CDs expresan diferentes tipos de FcγRs (Tabla 2). Se ha observado que FcγRIIb promueve la activación de la tolerancia periférica inhibiendo la activación de las CDs[91].

Evidencias del efecto de rFVIIIFc en Tregs – ¿Hay un rol para las células dendríticas?

Krishnamoorthy et al.[1] mostraron que rFVIIIFc a bajas dosis terapéuticas (50 UI/kg) es capaz de activar Tregs, principalmente a través de la presentación del epítopo Treg y la activación de TCR+CD28. También mostraron que, a bajas dosis, rFVIIIFc podría activar moléculas inmunosupresoras en CDs en el timo (el llamado ligando 1 de muerte celular programada 1, PD1: PD-L1 o CD274, e indolamina 2,3-dioxigenasa 1 o IDO1). Sin embargo, a altas dosis (250 UI/kg), rFVIIIFc es altamente inmunogénico, y estas dosis

inducen respuestas de anticuerpos inhibidores, que son dependientes de la señalización de FcγR.

De acuerdo con estos resultados, y con el objetivo de evaluar el efecto del rFVIIIFc en CDs, se han utilizado métodos de análisis ANN y de muestreo basados en la biología de sistemas para evaluar:

1) El impacto de la señalización a través de FcγR, que muestra la mayor expresión en CDs (FcγRIIa y FcγRIIb) sobre el fenotipo de este tipo de células, y

2) Si el microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc podría modular esta expresión del fenotipo.

La divergencia de respuesta entre altas y bajas dosis hace pensar en algún mecanismo o combinación de mecanismos complejos implicando diferentes señales (epítopos de Treg, FcγR) y diversidad de células inmunes.

Evaluación de la señalización por FcγR e impacto del microambiente pro-tolerogénico en las células dendríticas

Para evaluar el rol de rFVIIIFc respecto a los efectos potenciales sobre las CDs, definimos en primer lugar, la activación de las células dendríticas mieloides según lo descrito por la comunidad científica en el *Gene Ontology Consortium*[106,107] [fecha: 2/10/2018]; y en segundo lugar, definimos la activación de células dendríticas tolerogénicas mediante el procesamiento manual de la literatura científica según protocolos internos de Anaxomics, ya que no están descritos en las bases de datos procesadas por la comunidad científica.

Por otro lado, definimos como dianas moleculares de rFVIIIFc, en primer lugar, los receptores FcγR expresados en las células dendríticas (FcγRIIa, FcγRIIb) y, en segundo lugar, el microambiente pro-tolerogénico (IL-10, TGF-β y IL-35).

¿Qué impacto tiene la interacción de rFVIIIFc y FcγR (FcγRIIa/IIb) en el fenotipo de las células dendríticas?

La relación de FcγRIIa y FcγRIIb con la activación de la CD, bien como pro-inflamatoria (activación de CD mieloides) o como pro-tolerogénica (ac-

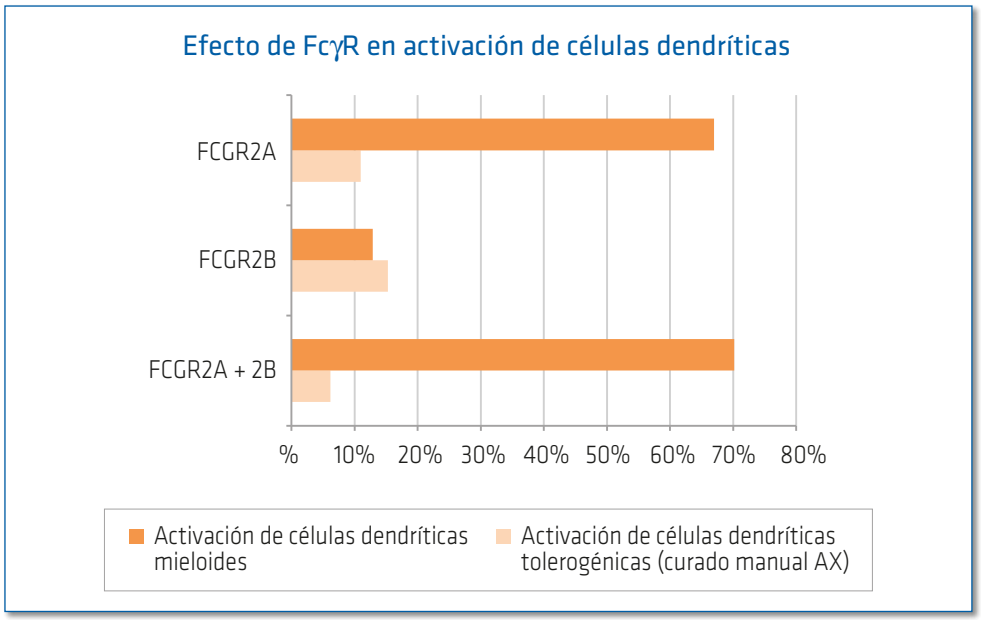


FIGURA 13 ⋮ Relación de la señalización FcγR frente a la activación de diferentes fenotipos de CD según ANN.

tivación de CD tolerogénicas) se ha evaluado mediante un análisis de probabilidad de relación (ANN) (Figura 13).

FcγRIIa y FcγRIIb presentan una baja relación con las proteínas relacionadas con el fenotipo tolerogénico de las CDs. Por otro lado, mientras que FcγRIIb aparentemente no está relacionado con la activación mieloide de las CDs(91), FcγRIIa (y la combinación de FcγRIIa y FcγRIIb) parecen estar fuertemente relacionadas con la activación de CDs mieloides pro-inflamatorias.

Se espera que la señalización FcγR en CDs induzca una activación mieloide de CDs pro-inflamatorias

¿Es capaz el ambiente pro-tolerogénico de modificar el impacto de la señalización por FcγR y mantener el fenotipo tolerogénico en las células dendríticas?

Según *Krishnamoorthy et al.*[(1)], bajas dosis de rFVIIIFc son capaces de inducir un fenotipo tolerogénico en CDs, a la vez que producen un microambiente

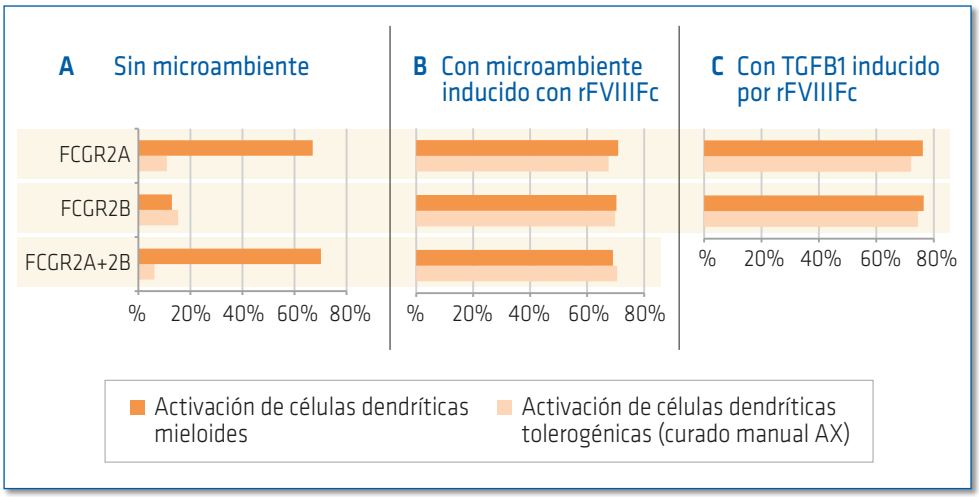


FIGURA 14 ⋮ Relación de la señalización de FcγR solo o en combinación con el microambiente inducido por rFVIIIFc frente a la activación de diferentes fenotipos de CDs. También se muestran los resultados de la señalización FCγR + TGF-β1, ya que es la citoquina individual con la relación más fuerte con las proteínas tolerogénicas de CDs (no mostrados los resultados de IL-10 e IL-35).

pro-tolerogénico derivado de la activación de las Tregs. Dado el impacto previsto sobre los FcγR más expresados en CDs (Figura 13), el impacto del microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc (IL-10, TGF-β, IL-35) se ha evaluado de forma adicional a la señalización de FcγR mediante un análisis de probabilidad de relación (ANN) (Figura 14).

El microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc en combinación con la señalización de FcγR está fuertemente relacionado con la activación de las CDs, en referencia tanto a funciones tolerogénicas de las CDs como a la activación de CDs mieloides. Así, el microambiente pro-tolerogénico se relaciona con la inducción de fenotipos tolerogénicos aun con señalización por FcγRIIa y FcγRIIb, mientras que no se observa un cambio relevante en la activación de CDs mieloides al añadir el microambiente a la (ya activadora) señalización por FcγRIIa y FcγRIIb. Basado en las citoquinas evaluadas, TGF-β1 es la responsable principal del aumento en la relación (no se muestran los resultados de IL-10 e IL-35).

Para explorar en profundidad los mecanismos exactos por los cuales un microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc favorece el equilibrio hacia los fenotipos tolerogénicos en las CDs, se ha evaluado cómo se modulan las proteínas implicadas en la activación de la CD mieloide y las funciones tolerogénicas de CDs en los modelos construidos mediante métodos de

TABLA 4 : Resumen comparativo de impacto previsto FcγR y de FcγR + microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc sobre los fenotipos de CDs.

Respuesta evaluada (TSignal)	FcγR	Microambiente inducido por rFVIIIFc + FcγR	Significación estadística de diferencia de medias[1]
Células dendríticas tolerogénicas (procesamiento manual de AX)	0,101	0,245	SÍ
Activación de células dendríticas mieloides	0,509	0,513	NO

1Test T de Student, umbral de significación: FDR <0,01.

muestreo. En primer lugar, se ha evaluado el impacto global de esta señalización sobre los fenotipos de CDs (TSignal según se define en la sección de métodos) para identificar las diferencias globales (Tabla 4).

Los mecanismos de acción derivados de la señalización a través de FcγR+-microambiente tolerogénico inducido por rFVIIIFc inducen una señal significativamente mayor en las proteínas involucradas en funciones tolerogénicas de las CDs, mientras que el microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc no parece aumentar la señal que llega a las proteínas involucradas en la activación de la CD mieloide pro-inflamatoria cuando se estimula con FcγR (FcγRIIa y FcγRIIb).

Tras confirmar que los mecanismos de acción de FcγR +microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc son capaces de inducir más fuertemente funciones tolerogénicas en CDs, se exploraron las proteínas específicas moduladas por esta señalización. La Tabla 5 muestra las proteínas relacionadas con la activación de CDs tolerogénicas que presentan un nivel de activación (TSignal) estadísticamente diferencial tras la estimulación con FcγR y con FcγR+microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc.

La proteína que se prevé que presente el mayor cambio en la actividad entre la señalización por FcγR y FcγR + microambiente inducido por rFVIIIFc es la hemo oxigenasa-1 (HO-1) (codificada por el gen HMOX1). HO-1 es una proteína de respuesta al estrés con actividad antiinflamatoria[176], y se sabe que su inducción estabiliza el fenotipo inmaduro/pro-tolerogénico en CDs[177] y atenúa las respuestas inflamatorias de las CDs y células T[178].

TABLA 5 : Resultados que muestran la comparación del impacto del FcγR y FcγR + microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc sobre la actividad de las proteínas de CDs (TSignal). Test t de student de dos colas no pareadas, test de Wilcoxon rank-sum de dos colas no pareadas y test de ANOVA. Todas las proteínas presentadas muestran diferencias estadísticamente significativas (umbral de significación: FDR < 0,05).

Nombre del GEN	FcγR (TSignal)	FcγR +microambiente inducido por rFVIIIFc (TSignal)
HMOX1	-0,47	0,51
SLAMF1	-0,34	-0,02
TGFB1	0,28	0,97
TGFBR2	0,33	0,78
TRAF6	0,94	0,77
IRF4	0,94	0,88
SPI1	0,07	0,44
PYCARD	0,02	-0,21
CD86	-0,75	-0,48
CD40	0,61	0,81

Las alteraciones en la función de esta proteína en pacientes hemofílicos se asocian con una mayor capacidad para producir anticuerpos inhibidores de rFVIII[179]. La actividad de esta proteína parece estar fuertemente inducida por el microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc.

Se sabe que la señalización SLAMF1 (molécula de activación linfocítica de señalización o CD150) inhibe la producción de citoquinas inflamatorias inducida por CD40 en CDs [180]; además, se ha observado que la señalización a través de esta molécula (por interacción con el virus del sarampión) es suficiente para inducir un fenotipo no inflamatorio en CDs, con marcadores de activación reducidos y una disminución de IL-12[181]. El modelo generado muestra que la señalización por FcγR inhibe con fuerza esta proteína (Tabla 5).

Se prevé que TGF-β1 y el receptor 2 de TGF presenten una mayor actividad en respuesta al FcγR+microambiente inducido por rFVIIIFc. TGF-β1 es una citoquina con un claro rol pro-tolerogénico[182]. De hecho, los pacientes he-

mofílicos sin anticuerpos inhibidores de rFVIII han mostrado que producen más TGF-β que los pacientes con inhibidores[8].

Por último, el modelo prevé que algunas proteínas coestimuladoras (CD86 y CD40) tengan mayor actividad en las CDs en el MdA de FcγR+microambiente inducido por rFVIIIFc que en el MdA de FcγR. Aunque este hallazgo podría parecer apuntar hacia un mayor potencial coestimulador y respuestas inmunogénicas más fuertes, la coestimulación también es necesaria para la inducción de células Treg[183]; por lo tanto, el aumento en la actividad de estas proteínas no está necesariamente asociado a una respuesta aumentada de las células T.

Los hallazgos del modelo podrían explicar las observaciones experimentales de *Krishnamoorthy et al.*[1]. Si se asume que a dosis más bajas (Figura 15A), la concentración de rFVIIIFc no activa la señalización FcγR, la activación de Treg a través de los epítopos de Treg promueve un ambiente pro-tolerogénico que a su vez induce anergia en las células T efectoras, evitando respuestas humorales anti-rFVIII. Por el contrario, si se asume que a dosis más altas (Figura 15B) rFVIIIFc es capaz de alcanzar una concentración con una señalización de FcγR efectiva, más fuerte, en CDs, se podría desarrollar un fenotipo de CDs pro-inflamatorio, reduciendo la activación de Treg e induciendo la activación de las células T efectoras inmunogénicas.

El aumento de la afinidad a FcγR y señalización más fuerte a través de FcγR sobre las CDs con el incremento de dosis de rFVIIIFc podría explicar las observaciones hechas por Krishnamoorthy et al.[1], y están de acuerdo con los resultados del análisis ANN y de los modelos generados por método de muestreo. El microambiente pro-tolerogénico inducido por dosis bajas de rFVIIIFc induce el desarrollo de fenotipos pro-tolerogénicos en CDs, principalmente a través de TGF-β1, incluso cuando se combina con la señalización de FcγR. Los efectores de inducción de tolerancia más implicados en estos efectos son HO-1 y SLAMF1.

Efecto sobre células dendríticas foliculares

Función y biología de las células dendríticas foliculares

Las CDs foliculares (CDFs) son una población no hematopoyética y no migratoria que se encuentra en los folículos primarios y secundarios de las áreas de las células B de los ganglios linfáticos, el bazo y el tejido linfoide

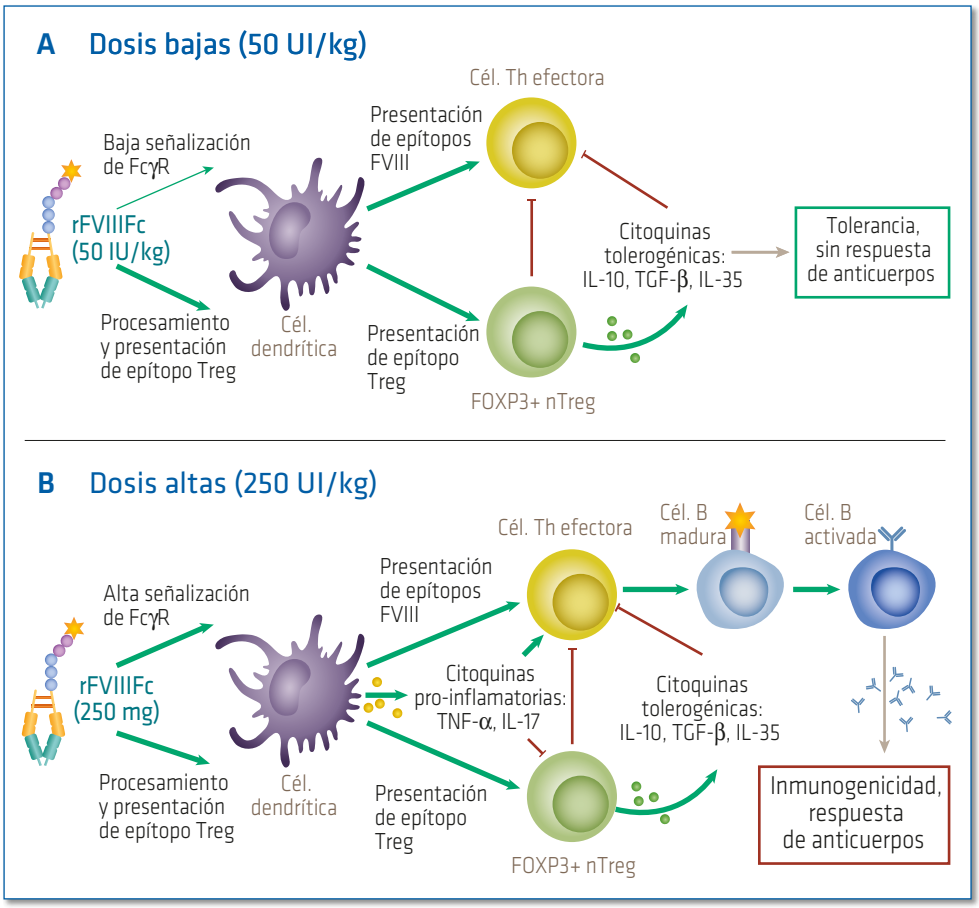


FIGURA 15 ⋮ Hipótesis de la señalización de rFVIIIFc a diferentes dosis para ajustar los hallazgos experimentales y las predicciones basadas en la biología de sistemas obtenidas en este proyecto. Diseño de la imagen basado en elementos obtenidos de varias referencias[184-188].

asociado a la mucosa (MALT). Forman una red estable debido a las conexiones intercelulares entre los procesos citoplasmáticos de la CDF y la íntima interacción con las células B foliculares[189]. Son de gran importancia para el desarrollo de las respuestas de las células B de memoria[190,191].

Expresión de FcγR

Estas células expresan CR1, CR2 y FcγRIIb (Tabla 2) que unen ICs, conduciendo a la unión del BCR en las células B y activando respuestas humorales[192,193]. Además, la unión de ICs al FcγRIIb de la CDF induce la activación de la CDF[194].

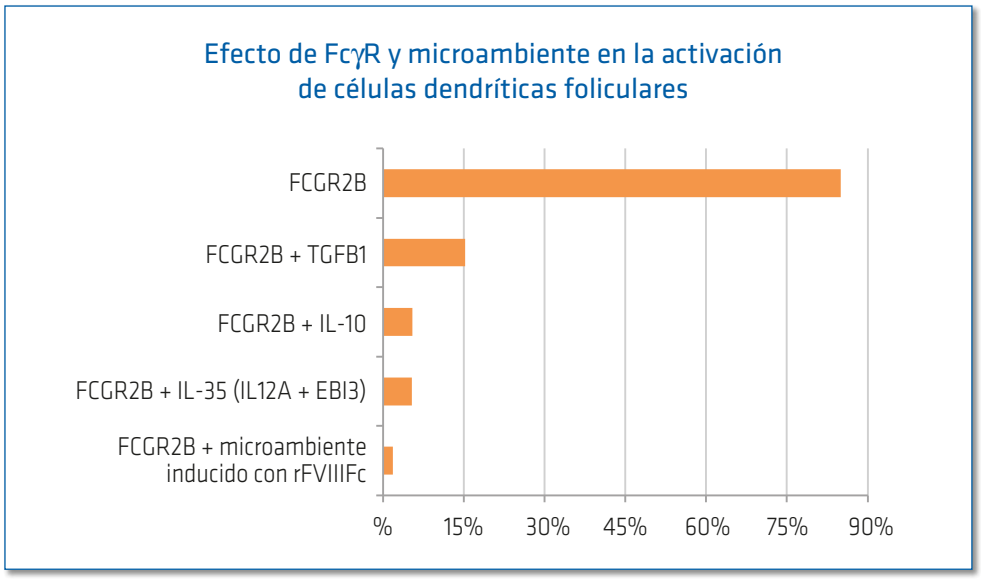


FIGURA 16 ⋮ Relación, basada en ANN, de la señalización de FcγRIIb sola o en combinación con el microambiente inducido por rFVIIIFc *versus* activación de CDFs.

Evaluación de la señalización por FcγR e impacto del microambiente pro-tolerogénico en las células dendríticas foliculares

Para evaluar el rol de rFVIIIFc respecto a las funciones de las CDFs, definimos, por un lado, la activación de las células dendríticas foliculares según lo descrito por la comunidad científica en el *Gene Ontology Consortium*[106,107] [fecha: 2/10/2018]; y por otro lado, definimos como dianas moleculares de rFVIIIFc, en primer lugar, los receptores FcγR expresados en las CDFs (FcγRIIb), y en segundo lugar, el microambiente pro-tolerogénico (IL-10, TGF-β y IL-35).

¿Qué rol tiene FcγRIIb en la función de las células dendríticas foliculares, y cómo le influye el microambiente pro-tolerogénico?

El dominio Fc del rFVIIIFc puede unirse al receptor FcγRIIb en las CDFs imitando al IC, y conduciendo a la activación de las CDFs, activándose la respuesta humoral derivada de células B frente al rFVIII. Sin embargo, el microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc podría reducir el impacto de FcγRIIb en las CDFs y, por tanto, reducir la inmunogenicidad de rFVIIIFc. Se ha realizado un análisis de probabilidad de relación (ANN) para evaluar esta hipótesis (Figura 16), y muestra que el microambiente pro-tolerogénico

inducido por rFVIIIFc podría reducir la activación de CDFs tras la unión a FcγRIIb, principalmente a través de IL-10 e IL-35.

Los hallazgos encontrados para las CDFs según el modelo, estarían de acuerdo con lo descrito por *Krishnamoorthy et al.*[1], en cuanto a que dosis bajas de rFVIIIFc (50 UI/kg) promueven un microambiente pro-tolerogénico, que podría contrarrestar la respuesta inmunogénica promovida por la activación del FcγRIIb de la CDF. Como resultado se disminuiría la activación de las células B de memoria, y consecuentemente la producción de anticuerpos inhibidores del FVIII.

La unión de FcγRIIb en CDFs puede conducir a la presentación de rFVIIIFc a células B y aumentar la generación de anticuerpos inhibidores; sin embargo, los modelos muestran que el microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc reduce la relación entre FcγRIIb y la activación de la CDF, sugiriendo que el microambiente pro-tolerogénico podría reducir la activación de CDFs y presentación de rFVIII a las células B.

Efecto sobre células B

Función de las células B

Las células B constituyen aproximadamente el 15% de los leucocitos de sangre periférica[195]. Actúan en la respuesta inmunitaria humoral mediante la producción de Igs tras su interacción con la célula T activada por el antígeno. Las células B de memoria son células con experiencia frente al antígeno, que responden más rápida y eficazmente cuando se exponen de nuevo al antígeno. Comparado con las células B *naïve* (células maduras que no han tenido contacto con su antígeno específico), el BCR de las células B de memoria muestra una alta afinidad hacia el antígeno inmunizante, ya que tras la activación sufren hipermutación somática y selección clonal de las células B con mayor afinidad al antígeno en el centro germinal. Tras una respuesta inmune dada, deben suprimir su programa de activación y permanecer quiescentes durante un tiempo, para mantener su capacidad de respuesta. Como consecuencia de la reactivación por el antígeno, la célula B de memoria se activa y diferencia a célula plasmática o continúa su maduración entrando de nuevo en el centro germinal para alcanzar una afinidad adicional[187]. Las células plasmáticas son responsables de mantener los niveles de anticuerpo séricos mediante la producción continua

de anticuerpos de alta afinidad y se localizan de forma preferente en la médula ósea.

Expresión de FcγR

En cuanto a la expresión de los FcγR, dentro de los receptores de tipo I, las células B expresan el receptor inhibitorio FcγRIIb que, mediante unión cruzada con el BCR a través de ICs, está implicado en el proceso de apoptosis[98], y en la activación y selección de estas células (Tabla 2). Existen varias evidencias que apuntan a la señalización de FcγRIIb en estas células como acelerador de la ITI[11,99]. Del grupo de receptores FcγR tipo II, expresan el receptor CD23 que colabora con FcγRIIb para la selección de las células B (Tabla 2) con la producción de anticuerpos de mayor afinidad. La señalización de FcγRIIb sin la colaboración de CD23 puede conducir a una selección ineficaz de producción de anticuerpos de alta afinidad[17]. Este mecanismo está actualmente siendo estudiado y usado para el diseño de las vacunas para obtener respuestas de alta afinidad[17,92].

Evaluación de la señalización por FcγR e impacto del microambiente pro-tolerogénico en las células B

Para evaluar el rol de rFVIIIFc en la modulación de las células B, definimos, por un lado, la selección de células B y el proceso apoptótico de células B según lo descrito por la comunidad científica en el *Gene Ontology Consortium*[106,107] [fecha: 2/10/2018]. Por otro lado, definimos como dianas moleculares de rFVIIIFc, en primer lugar, los receptores FcγR expresados en las células B (FcγRIIb, CD23), y en segundo lugar, el microambiente pro-tolerogénico (IL-10, TGF-β y IL-35).

¿Puede un microambiente tolerogénico inducido por rFVIIIFc favorecer la apoptosis y depleción de células B?

Para evaluar si otros mecanismos asociados a rFVIIIFc pueden acelerar la apoptosis de células B mediada por unión cruzada de BCR+FcγRIIb, se ha realizado un análisis de probabilidad de relación (ANN) añadiendo citoquinas del microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc a la señalización BCR+FcγRIIb en células B y células plasmáticas. El análisis mostró que estas moléculas aumentan la relación entre BCR+FcγRIIb y la apoptosis de las células B en un 70%. Al evaluar cada una de las citoquinas

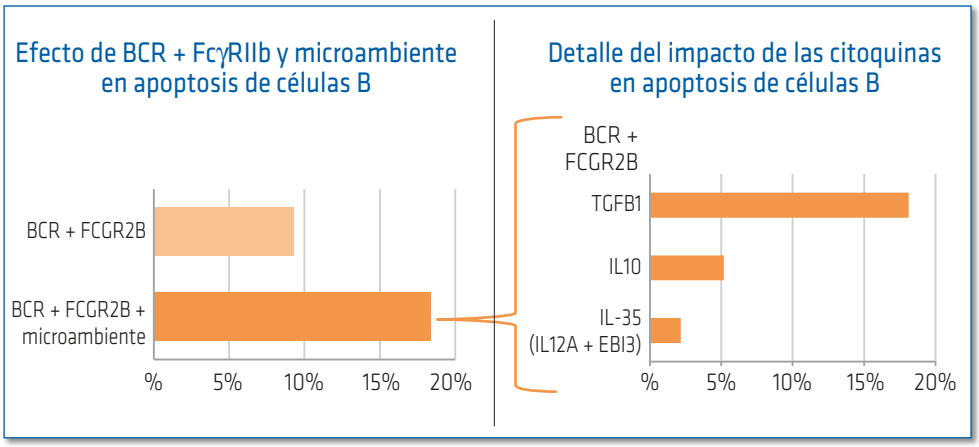


FIGURA 17 ⋮ Resultados del análisis ANN mostrando FcγRIIb + BCR + cada una de las citoquinas inducidas por rFVIIIFc frente apoptosis de células B. Citoquinas IL-10 y TGF-β1 se identifican con los nombres de los genes correspondientes.

inducidas por rFVIIIFc (Figura 17), se encontró que TGF-β es la citoquina con el mayor efecto.

De acuerdo con las evidencias bibliográficas, rFVIIIFc podría inducir la apoptosis de células B de memoria y células plasmáticas a través de la unión cruzada de FcγRIIb y BCR, acelerando la ITI.
Además, el análisis ANN muestra que el microambiente pro-tolerogénico inducido por dosis bajas de rFVIIIFc (concretamente TGF-β1) podría aumentar este efecto.

¿Puede la señalización mediada por rFVIIIFc –mediante FcγRIIb sin CD23– inducir respuesta humoral de baja afinidad?

Estudios de los perfiles de glicosilación en el dominio Fc de rFVIIIFc[53] sugieren que rFVIIIFc podría unirse preferentemente a los receptores de tipo I de FcγR (que incluye FcγRIIb) más que a los receptores tipo II (que incluye CD23) (más detalle en la *Sección 1.3 Contexto teórico – Receptores FcγR: señalización mediante FcγR tipo I*). De acuerdo con esto (Figura 7), rFVIIIFc podría promover la selección clonal de células B no eficientes y desencadenar respuestas de anticuerpos de baja afinidad a rFVIII, y/o mover el equilibrio de afinidad para facilitar la producción de anticuerpos anti-idiotípicos (anticuer-

pos contra los anticuerpos inhibidores que se asocian con el restablecimiento de la tolerancia a rFVIII por ITI en pacientes con hemofilia[93]).

Sin embargo, las pruebas funcionales apuntan a la inhibición total de la producción de anticuerpos inhibidores[1,21,22] más que a la reducción de la afinidad de los inhibidores. Por lo tanto, este mecanismo ha sido descartado como parte de los mecanismos inmunomoduladores de rFVIIIFc.

No se espera que la selección clonal de células B específicas de rFVIII no eficientes sea un mecanismo inmunomodulador mediado por rFVIIIFc para reducir la producción de anticuerpos inhibidores o facilitar la ITI.

Efecto sobre el estado inflamatorio previo y su impacto en la salud articular

Estado pro-inflamatorio, sangrado articular y sistema inmune

Un ambiente pro-inflamatorio facilita la inducción de anticuerpos inhibidores de rFVIIIFc, ya que esto puede asociarse con "señales de peligro"[43] que amplifican la respuesta inmunológica frente a los antígenos[58]. Además, los estados oxidativos son propensos a facilitar el desarrollo de anticuerpos inhibidores durante el tratamiento con rFVIIIFc[26,65], ya que se ha observado que la oxidación de rFVIII aumenta su inmunogenicidad[65]. El daño articular asociado al sangrado en hemofilia está relacionado con el aumento del estrés oxidativo y la subsiguiente respuesta antioxidante, y con la inflamación sistémica de bajo grado[63]. En este estudio, *Lövgren et al.* analizaron datos de expresión de ganglios linfáticos de ratas hemofílicas, evaluando ganglios de articulaciones con hemorragia activa, y ganglios de articulaciones contralaterales (articulaciones no afectadas de un animal con hemorragia en otra articulación), que están disponibles en el repositorio público *Gene Expression Omnibus* (GEO)[100], con código de acceso GSE85051. Los datos asociados a articulaciones contralaterales se han reanalizado y sometido a un análisis de enriquecimiento, con el fin de identificar los procesos biológicos modulados en ganglios linfáticos por el sangrado en una articulación contralateral. Los resultados del análisis de enriquecimiento (Figura 18) asocian el daño articular con cambios que sugieren la activación de varios mecanismos: reparación tisular (entre otros, angiogénesis, diferenciación, movilidad celular y proliferación), mecanismos antioxidantes y alteraciones

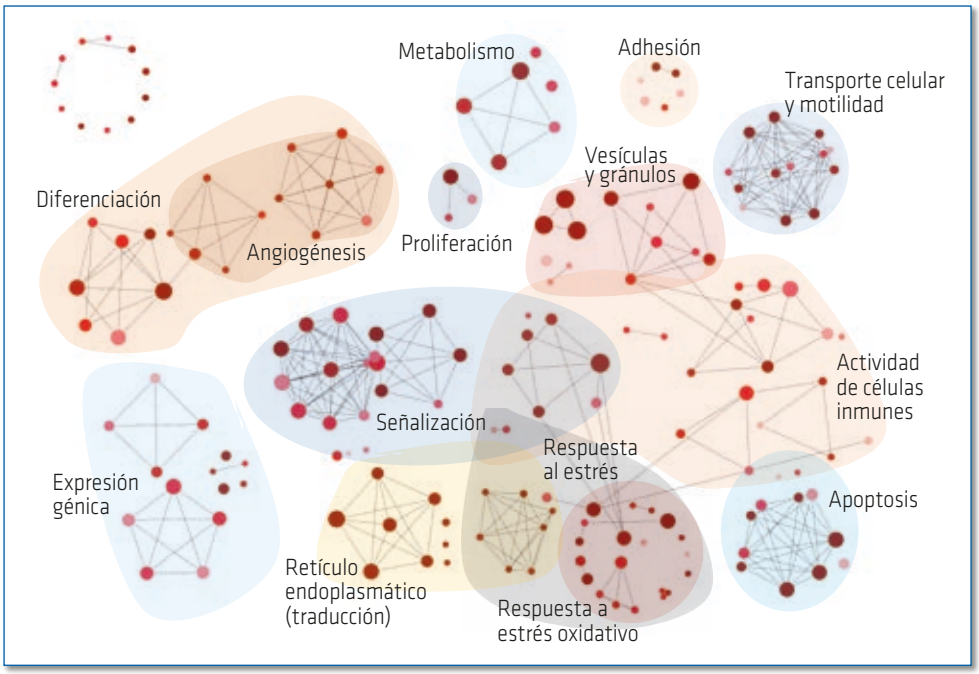


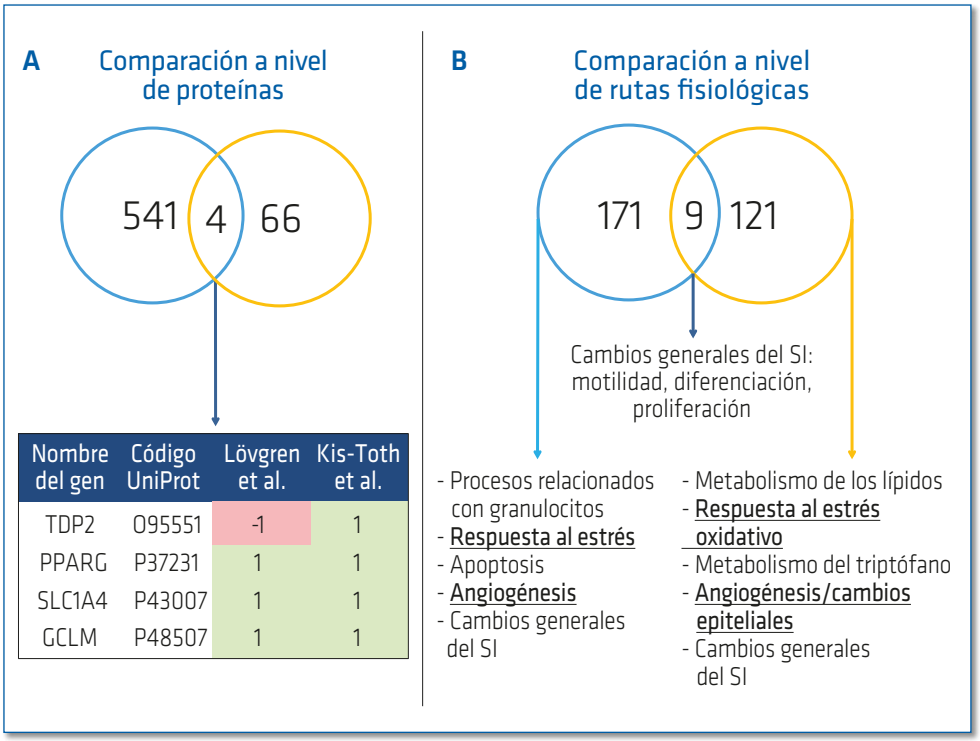
FIGURA 18 ⋮ Imagen de la red de los procesos enriquecidos en la expresión de los ganglios linfáticos de la articulación contralateral después del daño articular hemofílico. El tamaño del nodo indica el conjunto de proteínas (cuanto más grande es el nodo, más proteínas se incluyen en el conjunto). El color del nodo indica el nivel de enriquecimiento (cuanto más oscuro sea el nodo, más significativo será el enriquecimiento). Los nodos han sido agrupados por función biológica. Calculado en base a los datos generados por *Lövgren et al.*[63].

del sistema inmunológico (por ejemplo, procesos relacionados con granulocitos o la actividad de células inmunes).

Por otro lado, *Kis-Toth et al.*[26] mostraron que rFVIIIFc es capaz de modular los macrófagos hacia el fenotipo similar a M2/Mox. Los M2 secretan un perfil de citoquinas de tipo antiinflamatorio con una baja producción de IL-12 y con una alta producción de IL-10 y TGF-β. Considerando esto, el efecto de rFVIIIFc sobre el sistema inmunológico podría ayudar en la resolución del sangrado articular y el daño articular asociado.

Evaluación del posible efecto de rFVIIIFc en el sistema inmune innato sobre los cambios asociados a la hemorragia articular

Para explorar estas hipótesis, se compararon los datos publicados por *Lövgren et al.*[63], disponibles en el repositorio público *Gene Expression Omni-*



Nombre del gen	Código UniProt	Lövgren et al.	Kis-Toth et al.
TDP2	O95551	-1	1
PPARG	P37231	1	1
SLC1A4	P43007	1	1
GCLM	P48507	1	1

FIGURA 19 ⋮ Resumen del solapamiento de proteínas diferenciales (A) y vías enriquecidas (B) entre los resultados de *Lövgren et al.*[63] (círculos azules) y de *Kis-Toth et al.*[26] (círculos amarillos).

bus (GEO)[100], con código de acceso GSE85051, que reflejan los cambios de expresión de los ganglios linfáticos de la articulación contralateral después hemorragia articular en un modelo hemofílico (Figura 18) y los datos publicados por *Kis-toth et al.*[26], disponibles en el repositorio público *Gene Expression Omnibus* (GEO)[100], con código de acceso GSE118157, que reflejan los cambios de expresión inducidos por rFVIIIFc en macrófagos humanos (Figura 10).

¿Pueden los macrófagos tipo M2/Mox inducidos por rFVIIIFc contrarrestar los efectos inflamatorios/patológicos de la hemorragia articular, observados a nivel sistémico?

El primer paso en la comparación de los grupos de datos de expresión fue la evaluación del solapamiento directo, ya sea a nivel de proteína (Figura 19A) o a nivel de proceso biológico (Figura 19B). A parte de la falta o del bajo nivel de solapamiento directo en las proteínas diferenciales o en las vías enriquecidas, parecen existir algunos grupos de procesos alterados en ambos

grupos de datos, concretamente los relacionados con el sistema inflamatorio/inmunológico, los procesos antioxidantes y los procesos angiogénicos.

Se ha demostrado que la activación alternativa de los macrófagos protege contra el daño del cartílago inducido por sangre[2], aunque no se ha encontrado ninguna afectación significativa a la sinovitis, lo que sugiere que el efecto de los macrófagos sobre la membrana sinovial no está totalmente mediado por las propiedades antiinflamatorias, lo que subraya la importancia de las funciones de los macrófagos que implican otros procesos aparte de la inflamación, como son la reparación tisular.

Como discutieron *Kis-Toth et al.*[26], los pacientes con hemofilia A pueden tener una actividad antioxidante afectada, o incluso un aumento del estrés oxidativo debido al estrés endoplásmico[66]. Se ha visto que macrófagos con baja actividad antioxidante (baja actividad de HO-1, concretamente) promueven lesiones articulares en pacientes hemofílicos por déficit de una actividad que contrarreste el estrés oxidativo inducido por el sangrado[175]. Desde otro punto de vista, las alteraciones genéticas en el promotor del gen HO-1, HMOX1, se han asociado al desarrollo de anticuerpos inhibidores[179], cuya producción, como se ha discutido previamente, se ve favorecida por un ambiente oxidativo[26]. El análisis de los cambios sistémicos inducidos por daño articular en ratas hemofílicas[63] (Figura 18) muestra un aumento de las moléculas antioxidantes en los ganglios linfáticos articulares no afectados, así como en los procesos relacionados con el estrés endoplásmico, como respuesta al daño inducido por el sangrado articular. Para ver si los cambios observados están relacionados en las dos fuentes de datos evaluadas, macrófagos tratados con rFVIIIFc de *Kis-Toth et al.*[26] y ganglios linfáticos articulares en ratas hemofílicas después de una lesión articular de *Lövgren et al.*[63], se han evaluado las relaciones entre las proteínas asociadas a los procesos antioxidantes en ambos grupos de datos y se ha observado una estrecha relación entre ellas (Figura 20A), sugiriendo que ambas condiciones modulan procesos similares o relacionados.

El tratamiento con rFVIIIFc en macrófagos[26] (Figura 10) también induce cambios en los procesos relacionados con las células endoteliales y epiteliales, apuntando hacia procesos de reparación tisular y angiogénesis[168,173]. El análisis de los cambios sistémicos inducidos por el daño articular en ratas hemofílicas[63] (Figura 18) muestra un aumento en los procesos relacionados con la angiogénesis como respuesta al daño inducido por el sangrado articular. Para ver si los cambios observados están relacionados en las dos fuentes de datos evaluadas, macrófagos tratados con rFVIIIFc de *Kis-Toth et al.*[26] y ganglios linfáticos articulares en ratas hemofílicas después de una

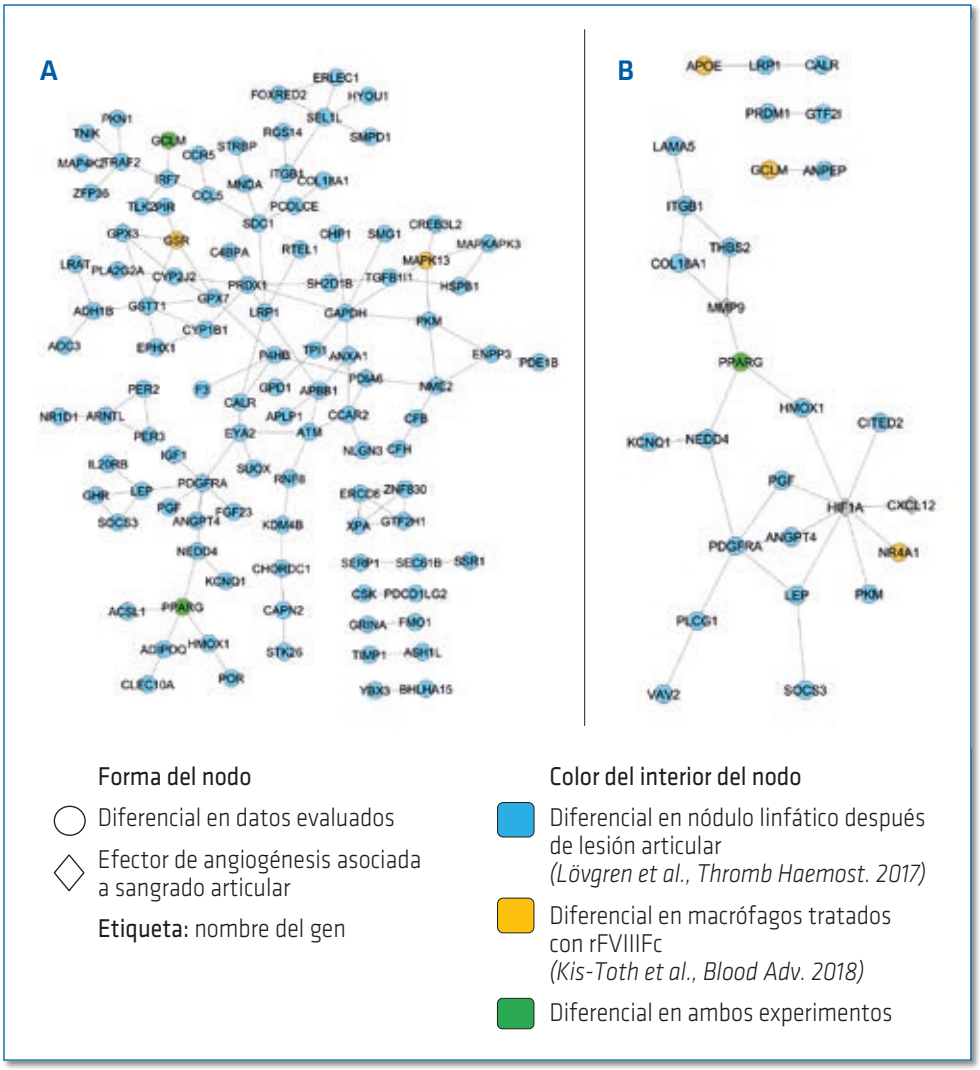


FIGURA 20 ⋮ Red de proteínas que conectan proteínas diferenciales relacionadas con mecanismos anti-oxidantes (A) y de angiogénesis (B) procedente de *Lövgren et al.*[63], nodos azul y verde y procedentes de *Kis-toth et al.*[26], nodos amarillos y verdes.

lesión articular de *Lövgren et al.*[63], se han evaluado las relaciones entre las proteínas asociadas a los procesos angiogénicos en ambos grupos de datos y se ha observado una estrecha relación entre ellas (Figura 20B), y con efectores claros de la modulación de la angiogénesis.

Una proteína importante que ha aumentado en ambos grupos de datos es PPAR-γ. Esta proteína está implicada en el metabolismo de los lípidos, y

también tiene un papel en los procesos antioxidantes y en los procesos de angiogénesis. De hecho, PPAR-γ regula la expresión de HMOX1[196], entre otros efectores de angiogénesis y antioxidantes, incluyendo NEDD4, implicado en la degradación del VEGFR2[197], MMP9, implicado en la angiogénesis relacionada con el sangrado en articulaciones hemofílicas[198], o la adiponectina (ADIPOQ), conocida por reducir el estrés oxidativo[199,200].

Otra proteína modulada por rFVIIIFc en macrófagos es la glutatión reductasa (GSR), una enzima clave en la respuesta antioxidante conectada a otros diferentes efectores antioxidantes inducidos en los ganglios linfáticos de ratas hemofílicas en respuesta al daño articular (por ejemplo, GPX3, GSTT1 o GPX7).

Por lo tanto, los datos de expresión sugieren que los cambios inducidos por rFVIIIFc en macrófagos podrían imitar la respuesta del cuerpo después del daño articular inducido por sangrado, sugiriendo que rFVIIIFc induce un fenotipo de macrófagos que podría facilitar la resolución del daño, con:

- ***Inducción de señales antiinflamatorias** que podrían contrarrestar la inflamación en las articulaciones hemorrágicas, aunque la evidencia experimental apunta a un papel débil de los macrófagos M2 en el control de la inflamación en este entorno clínico[2].*
- *Aumento de las **capacidades anti-oxidantes** en pacientes hemofílicos:*
  - *Mejor protección de las articulaciones frente al **daño oxidativo** inducido por el sangrado.*
  - *Reducción de la **inmunogenicidad de rFVIIIFc** para evitar el desarrollo de inhibidores.*
- *Inducción de la **reparación de tejido y señales angiogénicas,** que podrían acelerar la resolución del sangrado.*

NOTA: *este efecto podría ayudar a controlar el sangrado continuo (en los tratamientos a demanda), pero podría ser negativo si no se controla el sangrado articular, ya que un aumento la angiogénesis derivado del sangrado continuado, podría empeorar la patología articular.*
No se han encontrado evidencias que indiquen un efecto de los macrófagos tratados con rFVIIIFc para ayudar a controlar o reducir un estado inflamatorio sistémico inducido por sangrados articulares y daños articulares previos.

4 Conclusiones

HIPÓTESIS CON EVIDENCIA EXPERIMENTAL

1. **rFVIIIFc modula la diferenciación de macrófagos hacia fenotipos tipo M2 a través de los receptores FcγRIIb, FcγRIIa y FcRn.**

   - Macrófagos tratados con rFVIIIFc presentan cambios en[26]:

     – Nrf2 y el metabolismo de lípidos – polarización hacia fenotipo antiinflamatorio.
     – Metabolismo del triptófano – regulación de la tolerancia inmune.
     – Expresión de genes de respuesta a estrés oxidativo y angiogénesis – propiedades antioxidantes y de reparación tisular.

   - De acuerdo al análisis con ANN, la combinación FcγRIIb,FcγRIIa y FcRn es la que con más probabilidad es responsable de inducir estos cambios.

2. **rFVIIIFc induce la activación de Treg.**

   - rFVIIIFc activa nTregs mediante la señalización por TCR a través de epítopos Treg presentes en el dominio Fc, a la vez que promueve la expresión de moléculas marcadoras de tolerancia (IL-10, PD1)[1]. Además, rFVIIIFc induce un microambiente tolerogénico[1], que ha demostrado estar asociado con la ausencia de producción de anticuerpos inhibidores[8].

- De acuerdo al análisis con ANN, el microambiente tolerogénico (inducido por el tratamiento con rFVIIIFc), especialmente IL-10, es necesario, junto a la activación de la señalización por el TCR, para la anergia de células T cell y la activación de iTregs.

- Los resultados de modelos matemáticos y experimentales[1] sugieren un bucle de retroalimentación positiva entre la activación de las células Tregs a través de los epítopos Treg, un microambiente tolerogénico y el desarrollo de otros Tregs (ya sea iTregs o activación de nTregs).

HIPÓTESIS SIN EVIDENCIA EXPERIMENTAL (O EVIDENCIA INDIRECTA)

3. **rFVIIIFc podría modular el fenotipo y la biología de las CDs.**

- La evidencia experimental sugiere una regulación compleja de la respuesta inmune por parte de rFVIIIFc, ya que a dosis bajas induce tolerancia, pero a dosis altas induce inmunogenicidad[1]. Además, dosis bajas del fármaco inducen la expresión de moléculas inmunosupresoras (PD-L1, IDO1).

- Los análisis mediante modelos matemáticos (ANN y métodos de muestreo) predicen que:

  - La señalización de FcγR (FcγRIIa y FcγRIIb) induce la activación de CD mieloides pro-inflamatorias.
  - El microambiente pro-tolerogénico inducido por rFVIIIFc produce un fenotipo pro-tolerogénico en CDs, principalmente a través de TGF-β1, y de manera independiente a la señalización por FcγR. Las principales proteínas que se prevé que medien el potencial fenotipo tolerogénico de CDs inducido por rFVIIIFc son HO-1 y SLAMF1.
  - rFVIIIFc (probablemente a altas dosis) podría señalizar a través de FcγRIIb en CDFs del timo, activándolas e induciendo la respuesta humoral[192-194].

- Considerando el aumento de la afinidad y del nivel de señalización en FcγR de CD con concentraciones crecientes (dosis altas), los

resultados coinciden con los datos experimentales[1] y sugieren una hipótesis para explicar las observaciones:

- A dosis bajas, no hay una señalización significativa de FcγR en CDs, por lo que nada se opone al efecto del microambiente derivado de Treg activadas por rFVIIIFc, y se induce tolerancia.
- A dosis altas, la señalización de FcγR produce fenotipos pro-inflamatorios en CDs e induce la activación de las CDFs, desplazando el equilibrio hacia la inmunogenicidad y el desarrollo de inhibidores.

4. **rFVIIIFc podría inducir la apoptosis de células B de memoria y de células plasmáticas**.

   - rFVIIIFc podría mediar la apoptosis de células B de memoria y células plasmáticas específicas de rFVIII, a través de la unión cruzada de FcγRIIb + BCR[98], facilitando la ITI.

   - De acuerdo al análisis con ANN, se prevé que este proceso se vea potenciado por el microambiente derivado de rFVIIIFc, especialmente por TGF-β.

5. **Los efectos de rFVIIIFc sobre los macrófagos podrían imitar respuestas sistémicas tras el sangrado articular, y podrían ayudar a resolver el daño asociado con el sangrado.**

   - De acuerdo a los datos de expresión evaluados, la modulación del fenotipo del macrófago inducida por rFVIIIFc[26] promueve cambios relacionados con los observados sistemáticamente en respuesta al sangrado articular[63].

   - rFVIIIFc induce un fenotipo en macrófagos con capacidades anti-oxidantes, de reparación tisular y angiogénicas. Estos fenotipos de macrófagos han demostrado ser beneficiosos para la resolución del daño articular[175], por lo que las propiedades inmunomoduladoras de rFVIIIFc podrían también mejorar la resolución del sangrado articular.

   - PPAR-γ y HO-1 podrían tener un papel importante en la mediación de estos efectos, dado su presencia en ambos experimentos y su conexión a otras proteínas relevantes.

6. **Los efectos de rFVIIIFc sobre los macrófagos inducen propiedades antioxidantes[26] que podrían ayudar a prevenir el desarrollo de inhibidores en pacientes con hemofilia, independientemente de si han tenido o no sangrados articulares previos[26,65,66,175,179].**

HIPÓTESIS DESCARTADAS

7. **rFVIIIFc podría producir una respuesta de anticuerpos de baja afinidad:** este mecanismo no está respaldado por evidencias funcionales actuales del efecto inmunomodulador de rFVIIIFc.

8. **No se espera que el fenotipo antiinflamatorio inducido por rFVIIIFc en macrófagos contrarreste la inflamación sistémica derivada del sangrado articular y sea un mecanismo que contribuya a prevenir la producción de anticuerpos,** según los datos experimentales sobre macrófagos M2[2] y la comparación de los perfiles de datos de expresión realizados en el presente estudio[26,63].

En resumen:

1. Se prevé que los efectos inmunomoduladores de rFVIIIFc estén mediados principalmente por:

   - Señalización de FcγRIIa y FcγRIIb.
   - Presentación de epítopo Treg derivado de Fc y activación de Treg.
   - La secreción posterior de TGF-β1 e IL-10 podría tener un papel importante en el mantenimiento de la tolerogenicidad en otros tipos celulares, como iTregs o células dendríticas.

2. Los efectos inmunomoduladores de rFVIIIFc podrían estar implicados en:

   - Prevenir el desarrollo de inhibidores.
   - Facilitar la ITI.
   - Reducción de las alteraciones fisiopatológicas del sangrado articular, mediante propiedades antioxidantes y de reparación tisular, que contribuirían a la resolución del daño.

Referencias 5

1. Krishnamoorthy S, Liu T, Drager D, Patarroyo-White S, Chhabra ES, Peters R, et al. Recombinant factor VIII Fc (rFVIIIFc) fusion protein reduces immunogenicity and induces tolerance in hemophilia A mice. Cell Immunol. 2016; 301: 30-9.

2. van Vulpen LFD, Popov-Celeketic J, van Meegeren MER, Coeleveld K, van Laar JM, Hack CE, et al. A fusion protein of interleukin-4 and interleukin-10 protects against blood-induced cartilage damage in vitro and in vivo. J Thromb Haemost. 2017; 15(9): 1788-98.

3. Lobet S, Hermans C, Lambert C. Optimal management of hemophilic arthropathy and hematomas. J Blood Med. 2014; 5: 207-18.

4. Pulles AE, Mastbergen SC, Schutgens RE, Lafeber FP, van Vulpen LF. Pathophysiology of hemophilic arthropathy and potential targets for therapy. Pharmacol Res. 2017; 115: 192-9.

5. Elocta. WWW2019 [Available from: https://elocta.com].

6. Holford N, Kimko H, Monteleone J, Peck C. Simulation of clinical trials. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2000; 40: 209-34.

7. Knobe K, Berntorp E. Haemophilia and joint disease: pathophysiology, evaluation, and management. J Comorb. 2011; 1: 51-9.

8. Schep SJ, Schutgens REG, Fischer K, Boes ML. Review of immune tolerance induction in hemophilia A. Blood Rev. 2018; 32(4): 326-38.

9. Holford NHG HM, Ko HC, Steimer J-L, Sheiner LB, Peck CC. Simulation in Drug Development: Good Practices; 1999.

10. Kessler C, Oldenburg J, Ettingshausen CE, Tiede A, Khair K, Negrier C, et al. Spotlight on the human factor: building a foundation for the future of haemophilia A management: report from a symposium on human recombinant FVIII at the World Federation of Hemophilia World Congress, Melbourne, Australia on 12 May 2014. Haemophilia. 2015; 21 Suppl 1: 1-12.

11. Adair P, Su Y, Scott DW. Tolerance induction in hemophilia A animal models: battling inhibitors with antigen-specific immunotherapies. Discov Med. 2013; 15(84): 275-82.

12. Dumont JA, Liu T, Low SC, Zhang X, Kamphaus G, Sakorafas P, et al. Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. Blood. 2012; 119(13): 3024-30.

13. Rath T, Baker K, Dumont JA, Peters RT, Jiang H, Qiao SW, et al. Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics. Crit Rev Biotechnol. 2015; 35(2): 235-54.

14. Peters RT, Toby G, Lu Q, Liu T, Kulman JD, Low SC, et al. Biochemical and functional characterization of a recombinant monomeric factor VIII-Fc fusion protein. J Thromb Haemost. 2013; 11(1): 132-41.

15. Powell JS, Josephson NC, Quon D, Ragni MV, Cheng G, Li E, et al. Safety and prolonged activity of recombinant factor VIII Fc fusion protein in hemophilia A patients. Blood. 2012; 119(13): 3031-7.

16. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors as regulators of immune responses. Nat Rev Immunol. 2008; 8(1): 34-47.

17. Bournazos S, Ravetch JV. Fcgamma receptor pathways during active and passive immunization. Immunol Rev. 2015; 268(1): 88-103.

18. Bournazos S, Wang TT, Dahan R, Maamary J, Ravetch JV. Signaling by Antibodies: Recent Progress. Annu Rev Immunol. 2017; 35: 285-311.

19. Samuelsson A, Towers TL, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. Science. 2001; 291(5503): 484-6.

20. Debre M, Bonnet MC, Fridman WH, Carosella E, Philippe N, Reinert P, et al. Infusion of Fc gamma fragments for treatment of children with

acute immune thrombocytopenic purpura. Lancet. 1993; 342(8877): 945-9.

21. Liu T, Hoehn T, Patarroyo-White S, Pierce G, Jiang H. Evaluation of antibody responses to rFVIIIFc compared to Xyntha (R) and Advate (R) in hemophilia A mice. Haemophilia. 2012; 18: 41.

22. Ragni MV, Alabek M, Malec LM. Inhibitor development in two cousins receiving full-length factor VIII (FVIII) and FVIII-Fc fusion protein. Haemophilia. 2016; 22(5): e462-4.

23. Carcao M, Shapiro A, Staber JM, Hwang N, Druzgal C, Lieuw K, et al. Recombinant factor VIII Fc fusion protein for immune tolerance induction in patients with severe haemophilia A with inhibitors-A retrospective analysis. Haemophilia. 2018; 24(2): 245-52.

24. Groomes CL, Gianferante DM, Crouch GD, Parekh DS, Scott DW, Lieuw K. Reduction of Factor VIII Inhibitor Titers During Immune Tolerance Induction With Recombinant Factor VIII-Fc Fusion Protein. Pediatr Blood Cancer. 2016; 63(5): 922-4.

25. Malec LM, Journeycake J, Ragni MV. Extended half-life factor VIII for immune tolerance induction in haemophilia. Haemophilia. 2016; 22(6): e552-e4.

26. Kis-Toth K, Rajani GM, Simpson A, Henry KL, Dumont J, Peters RT, et al. Recombinant factor VIII Fc fusion protein drives regulatory macrophage polarization. Blood Adv. 2018; 2(21): 2904-16.

27. Ing M, Gupta N, Teyssandier M, Maillere B, Pallardy M, Delignat S, et al. Immunogenicity of long-lasting recombinant factor VIII products. Cell Immunol. 2016; 301: 40-8.

28. Alvarez T, Soto I, Astermark J. Non-genetic risk factors and their influence on the management of patients in the clinic. Eur J Haematol. 2015; 94 Suppl 77: 2-6.

29. Bardi E, Astermark J. Genetic risk factors for inhibitors in haemophilia A. Eur J Haematol. 2015; 94 Suppl 77: 7-10.

30. Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E, et al. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. Blood. 2006; 108(12): 3739-45.

31. Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK; MIBS Study Group. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. Blood. 2006; 107(8): 3167-72.

32. Astermark J, Wang X, Oldenburg J, Berntorp E, Lefvert AK; MIBS Study Group. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. J Thromb Haemost. 2007; 5(2): 263-5.

33. Astermark J. Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia. Haemophilia. 2006; 12 Suppl 3: 52-60.

34. Reipert BM, van Helden PM, Schwarz HP, Hausl C. Mechanisms of action of immune tolerance induction against factor VIII in patients with congenital haemophilia A and factor VIII inhibitors. Br J Haematol. 2007;136(1):12-25.

35. Waters B, Lillicrap D. The molecular mechanisms of immunomodulation and tolerance induction to factor VIII. J Thromb Haemost. 2009; 7(9): 1446-56.

36. Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Maintenance of serum antibody levels. Annu Rev Immunol. 2005; 23: 367-86.

37. McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. Annu Rev Immunol. 2005; 23: 487-513.

38. Sobi. Elocta [updated 18-05-15. Available from: https://elocta.com/.

39. Wyseure T, Mosnier LO, von Drygalski A. Advances and challenges in hemophilic arthropathy. Semin Hematol. 2016; 53(1): 10-9.

40. Weiskopf K, Weissman IL. Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. MAbs. 2015;7(2):303-10.

41. Manicassamy S, Pulendran B. Dendritic cell control of tolerogenic responses. Immunol Rev. 2011; 241(1): 206-27.

42. Raker VK, Domogalla MP, Steinbrink K. Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man. Front Immunol. 2015; 6: 569.

43. Witmer C, Young G. Factor VIII inhibitors in hemophilia A: rationale and latest evidence. Ther Adv Hematol. 2013; 4(1): 59-72.

44. Hayes JM, Wormald MR, Rudd PM, Davey GP. Fc gamma receptors: glycobiology and therapeutic prospects. J Inflamm Res. 2016; 9: 209-19.

45. Bournazos S, Ravetch JV. Fcgamma Receptor Function and the Design of Vaccination Strategies. Immunity. 2017; 47(2): 224-33.

46. Takai T. Mechanism of Action of Immunoglobulin: Sialylated IgG. In: Saji B, Newburger J, Burns J, Takahashi M, eds. Kawasaki Disease. Springer; 2017. p. 223-30.

47. Yamada K, Ito K, Furukawa J, Nakata J, Alvarez M, Verbeek JS, et al. Galactosylation of IgG1 modulates FcgammaRIIB-mediated inhibition of murine autoimmune hemolytic anemia. J Autoimmun. 2013; 47: 104-10.

48. Bruhns P, Jonsson F. Mouse and human FcR effector functions. Immunol Rev. 2015; 268(1): 25-51.

49. Hargreaves CE, Rose-Zerilli MJ, Machado LR, Iriyama C, Hollox EJ, Cragg MS, et al. Fcgamma receptors: genetic variation, function, and disease. Immunol Rev. 2015; 268(1): 6-24.

50. Story CM, Mikulska JE, Simister NE. A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. J Exp Med. 1994; 180(6): 2377-81.

51. Martins JP, Kennedy PJ, Santos HA, Barrias C, Sarmento B. A comprehensive review of the neonatal Fc receptor and its application in drug delivery. Pharmacol Ther. 2016; 161: 22-39.

52. Levin D, Golding B, Strome SE, Sauna ZE. Fc fusion as a platform technology: potential for modulating immunogenicity. Trends Biotechnol. 2015; 33(1): 27-34.

53. Kannicht C, Kroning M, Solecka-Witulska BA, Kohla G, Rosenlocher J. Comparative N-Glycosylation Analysis of the Fc Portions of a Chimeric Human Coagulation Factor VIII and Immunoglobulin G1. Bioengineering. 2017; 4(2).

54. Jennewein MF, Alter G. The Immunoregulatory Roles of Antibody Glycosylation. Trends Immunol. 2017; 38(5): 358-72.

55. Yagi H, Yanaka S, Kato K. Structure and Dynamics of Immunoglobulin G Glycoproteins. Adv Exp Med Biol. 2018; 1104: 219-35.

56. Su Y, Rossi R, De Groot AS, Scott DW. Regulatory T cell epitopes (Tregitopes) in IgG induce tolerance in vivo and lack immunogenicity per se. J Leukoc Biol. 2013; 94(2): 377-83.

57. De Groot AS, Moise L, McMurry JA, Wambre E, Van Overtvelt L, Moingeon P, et al. Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide "Tregitopes". Blood. 2008; 112(8): 3303-11.

58. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. Science. 2002; 296(5566): 301-5.

59. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. Nat Rev Immunol. 2008; 8(4): 279-89.

60. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. Curr Opin Immunol. 2001; 13(1): 114-9.

61. Gouw SC, van der Bom JG, Marijke van den Berg H. Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. Blood. 2007; 109(11): 4648-54.

62. Santagostino E, Mancuso ME, Rocino A, Mancuso G, Mazzucconi MG, Tagliaferri A, et al. Environmental risk factors for inhibitor development in children with haemophilia A: a case-control study. Br J Haematol. 2005; 130(3): 422-7.

63. Lovgren KM, Christensen KR, Majewski W, Ostrup O, Skov S, Wiinberg B. Acute Haemarthrosis in the Haemophilia A Rat Generates a Local and Systemic Proinflammatory Response. Thromb Haemost. 2017; 117(11): 2092-104.

64. van Vulpen LF, van Meegeren ME, Roosendaal G, Jansen NW, van Laar JM, Schutgens RE, et al. Biochemical markers of joint tissue damage increase shortly after a joint bleed; an explorative human and canine in vivo study. Osteoarthritis Cartilage. 2015; 23(1): 63-9.

65. Peyron I, Dimitrov JD, Delignat S, Gangadharan B, Srivastava A, Kaveri SV, et al. Oxidation of factor VIII increases its immunogenicity in mice with severe hemophilia A. Cell Immunol. 2018; 325: 64-8.

66. Malhotra JD, Miao H, Zhang K, Wolfson A, Pennathur S, Pipe SW, et al. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105(47): 18525-30.

67. Serbulea V, Upchurch CM, Ahern KW, Bories G, Voigt P, DeWeese DE, et al. Macrophages sensing oxidized DAMPs reprogram their metabolism to support redox homeostasis and inflammation through a TLR2-Syk-ceramide dependent mechanism. Mol Metab. 2018; 7: 23-34.

68. Zhao H, Kalish FS, Wong RJ, Stevenson DK. Hypoxia regulates placental angiogenesis via alternatively activated macrophages. Am J Reprod Immunol. 2018; 80(3): e12989.

69. Sironi M, Martinez FO, D'Ambrosio D, Gattorno M, Polentarutti N, Locati M, et al. Differential regulation of chemokine production by Fcgamma receptor engagement in human monocytes: association of CCL1 with a distinct form of M2 monocyte activation (M2b, Type 2). J Leukoc Biol. 2006; 80(2): 342-9.

70. Saradna A, Do DC, Kumar S, Fu QL, Gao P. Macrophage polarization and allergic asthma. Transl Res. 2018; 191: 1-14.

71. Luan YY, Dong N, Xie M, Xiao XZ, Yao YM. The significance and regulatory mechanisms of innate immune cells in the development of sepsis. J Interferon Cytokine Res. 2014; 34(1): 2-15.

72. Matsui H, Shibata M, Brown B, Labelle A, Hegadorn C, Andrews C, et al. A murine model for induction of long-term immunologic tolerance to factor VIII does not require persistent detectable levels of plasma factor VIII and involves contributions from Foxp3+ T regulatory cells. Blood. 2009; 114(3): 677-85.

73. Moghimi B, Sack BK, Nayak S, Markusic DM, Mah CS, Herzog RW. Induction of tolerance to factor VIII by transient co-administration with rapamycin. J Thromb Haemost. 2011; 9(8): 1524-33.

74. Baptista AP, Roozendaal R, Reijmers RM, Koning JJ, Unger WW, Greuter M, et al. Lymph node stromal cells constrain immunity via MHC class II self-antigen presentation. Elife. 2014; 3.

75. Chen TC, Cobbold SP, Fairchild PJ, Waldmann H. Generation of anergic and regulatory T cells following prolonged exposure to a harmless antigen. J Immunol. 2004; 172(10): 5900-7.

76. Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. J Exp Med. 2004; 199(10): 1401-8.

77. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. Nat Rev Immunol. 2003; 3(3): 253-7.

78. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2003; 21: 685-711.

79. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(1): 351-8.

80. Pulendran B. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. Immunol Rev. 2004; 199: 227-50.

81. Pulendran B, Tang H, Manicassamy S. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. Nat Immunol. 2010; 11(8): 647-55.

82. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. Nature. 2007; 449(7161): 419-26.

83. Pulendran B, Tang H, Denning TL. Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. Curr Opin Immunol. 2008; 20(1): 61-7.

84. Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, et al. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. Science. 2002; 297(5588): 1867-70.

85. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. Nat Rev Immunol. 2004; 4(10): 762-74.

86. Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TM, et al. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. J Allergy Clin Immunol. 2005; 115(6): 1260-7.

87. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. J Exp Med. 2001; 193(2): 233-8.

88. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. J Exp Med. 2000; 192(9): 1213-22.

89. Mahnke K, Qian Y, Knop J, Enk AH. Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. Blood. 2003; 101(12): 4862-9.

90. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. J Exp Med. 2001; 194(6): 769-79.

91. Wenink MH, Santegoets KC, Roelofs MF, Huijbens R, Koenen HJ, van Beek R, et al. The inhibitory Fc gamma IIb receptor dampens TLR4-mediated immune responses and is selectively up-regulated on dendritic cells from rheumatoid arthritis patients with quiescent disease. J Immunol. 2009; 183(7): 4509-20.

92. Maamary J, Wang TT, Tan GS, Palese P, Ravetch JV. Increasing the breadth and potency of response to the seasonal influenza virus vaccine by immune complex immunization. Proc Natl Acad Sci USA. 2017; 114(38): 10172-7.

93. Gilles JG. Role of anti-idiotypic antibodies in immune tolerance induction. Haemophilia. 2010; 16(102): 80-3.

94. Sakurai Y, Shima M, Tanaka I, Fukuda K, Yoshida K, Yoshioka A. Association of anti-idiotypic antibodies with immune tolerance induction for the treatment of hemophilia A with inhibitors. Haematologica. 2004; 89(6): 696-703.

95. Coutinho A. Will the idiotypic network help to solve natural tolerance? Trends Immunol. 2003; 24(2): 53-4.

96. Hausl C, Ahmad RU, Sasgary M, Doering CB, Lollar P, Richter G, et al. High-dose factor VIII inhibits factor VIII-specific memory B cells in hemophilia A with factor VIII inhibitors. Blood. 2005; 106(10): 3415-22.

97. Reipert BM, Allacher P, Hausl C, Pordes AG, Ahmad RU, Lang I, et al. Modulation of factor VIII-specific memory B cells. Haemophilia. 2010; 16(102): 25-34.

98. Xiang Z, Cutler AJ, Brownlie RJ, Fairfax K, Lawlor KE, Severinson E, et al. FcgammaRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. Nat Immunol. 2007; 8(4): 419-29.

99. Georgescu MT, Lai JD, Hough C, Lillicrap D. War and peace: Factor VIII and the adaptive immune response. Cell Immunol. 2016; 301: 2-7.

100. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. Nucleic Acids Res. 2013; 41(Database issue): D991-5.

101. Rivals I, Personnaz L, Taing L, Potier MC. Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: which test? Bioinformatics. 2007; 23(4): 401-7.

102. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics. 2010; 26(1): 139-40.

103. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. Nucleic Acids Res. 2015; 43(7): e47.

104. Stouffer S. A study of attitudes. Sci Am. 1949; 180(5): 11-5.

105. Berger ML, Sox H, Willke RJ, Brixner DL, Eichler HG, Goettsch W, et al. Good practices for real-world data studies of treatment and/or comparative effectiveness: Recommendations from the joint ISPOR-ISPE Special Task Force on real-world evidence in health care decision making. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2017; 26(9): 1033-9.

106. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet. 2000; 25(1): 25-9.

107. The Gene Ontology C. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. Nucleic Acids Res. 2017; 45(D1): D331-D8.

108. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. Clin Pharmacol Ther. 2012; 92(4): 414-7.

109. Han H, Shim H, Shin D, Shim JE, Ko Y, Shin J, et al. TRRUST: a reference database of human transcriptional regulatory interactions. Sci Rep. 2015; 5: 11432.

110. Jorba G, Aguirre-Plans J, Junet V, Segú-Vergés C, Ruiz JL, Pujol A, et al. TPMS technology to infer biomarkers of macular degeneration prognosis in silico simulated prototype-patients under the study of heart failure treatment with sacubitril and valsartan. bioRxiv. 2019: 625889.

111. Perera S, Artigas L, Mulet R, Mas JM, Sardón T. Systems biology applied to non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): treatment selection based on the mechanism of action of nutraceuticals. Nutrafoods. 2014; 13(2): 61-8.

112. Pipe SW, Montgomery RR, Pratt KP, Lenting PJ, Lillicrap D. Life in the shadow of a dominant partner: the FVIII-VWF association and its clinical implications for hemophilia A. Blood. 2016; 128(16): 2007-16.

113. Loren V, Garcia-Jaraquemada A, Naves JE, Carmona X, Manosa M, Aransay AM, et al. ANP32E, a Protein Involved in Steroid-Refractoriness in Ulcerative Colitis, Identified by a Systems Biology Approach. J Crohns Colitis. 2019; 13(3): 351-61.

114. Romeo-Guitart D, Fores J, Herrando-Grabulosa M, Valls R, Leiva-Rodriguez T, Galea E, et al. Neuroprotective Drug for Nerve Trauma Revealed Using Artificial Intelligence. Sci Rep. 2018; 8(1): 1879.

115. Iborra-Egea O, Galvez-Monton C, Roura S, Perea-Gil I, Prat-Vidal C, Soler-Botija C, et al. Mechanisms of action of sacubitril/valsartan on cardiac remodeling: a systems biology approach. NPJ Syst Biol Appl. 2017; 3: 12.

116. Orchard S, Ammari M, Aranda B, Breuza L, Briganti L, Broackes-Carter F, et al. The MIntAct project--IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. Nucleic Acids Res. 2014; 42(Database issue): D358-63.

117. Milacic M, Haw R, Rothfels K, Wu G, Croft D, Hermjakob H, et al. Annotating cancer variants and anti-cancer therapeutics in reactome. Cancers (Basel). 2012; 4(4): 1180-211.

118. Croft D, Mundo AF, Haw R, Milacic M, Weiser J, Wu G, et al. The Reactome pathway knowledgebase. Nucleic Acids Res. 2014; 42(Database issue): D472-7.

119. Stark C, Breitkreutz BJ, Reguly T, Boucher L, Breitkreutz A, Tyers M. BioGRID: a general repository for interaction datasets. Nucleic Acids Res. 2006; 34(Database issue): D535-9.

120. Chatr-Aryamontri A, Breitkreutz BJ, Oughtred R, Boucher L, Heinicke S, Chen D, et al. The BioGRID interaction database: 2015 update. Nucleic Acids Res. 2015; 43(Database issue): D470-8.

121. Salwinski L, Miller CS, Smith AJ, Pettit FK, Bowie JU, Eisenberg D. The Database of Interacting Proteins: 2004 update. Nucleic Acids Res. 2004; 32(Database issue): D449-51.

122. Keshava Prasad TS, Goel R, Kandasamy K, Keerthikumar S, Kumar S, Mathivanan S, et al. Human Protein Reference Database--2009 update. Nucleic Acids Res. 2009; 37(Database issue): D767-72.

123. Daeron M. Fc receptors as adaptive immunoreceptors. Curr Top Microbiol Immunol. 2014; 382: 131-64.

124. Hartnell A, Kay AB, Wardlaw AJ. IFN-gamma induces expression of Fc gamma RIII (CD16) on human eosinophils. J Immunol. 1992; 148(5): 1471-8.

125. Ioan-Facsinay A, de Kimpe SJ, Hellwig SM, van Lent PL, Hofhuis FM, van Ojik HH, et al. FcgammaRI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection. Immunity. 2002; 16(3): 391-402.

126. Schwartz SL, Cleyrat C, Olah MJ, Relich PK, Phillips GK, Hlavacek WS, et al. Differential mast cell outcomes are sensitive to FcepsilonRI-Syk binding kinetics. Mol Biol Cell. 2017; 28(23): 3397-414.

127. Su K, Wu J, Edberg JC, Li X, Ferguson P, Cooper GS, et al. A promoter haplotype of the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing FcgammaRIIb alters receptor expression and associates with autoimmunity. I. Regulatory FCGR2B polymorphisms and their association with systemic lupus erythematosus. J Immunol. 2004; 172(11): 7186-91.

128. van der Heijden J, Breunis WB, Geissler J, de Boer M, van den Berg TK, Kuijpers TW. Phenotypic variation in IgG receptors by nonclassical FCGR2C alleles. J Immunol. 2012; 188(3): 1318-24.

129. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors: old friends and new family members. Immunity. 2006;24(1):19-28.

130. Huizinga TW, van Kemenade F, Koenderman L, Dolman KM, von dem Borne AE, Tetteroo PA, et al. The 40-kDa Fc gamma receptor (FcRII) on human neutrophils is essential for the IgG-induced respiratory burst and IgG-induced phagocytosis. J Immunol. 1989; 142(7): 2365-9.

131. Davoine F, Lavigne S, Chakir J, Ferland C, Boulay ME, Laviolette M. Expression of FcgammaRIII (CD16) on human peripheral blood eosinophils increases in allergic conditions. J Allergy Clin Immunol. 2002; 109(3): 463-9.

132. Ghetie V, Ward ES. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I- related receptor FcRn. Annu Rev Immunol. 2000; 18: 739-66.

133. Bohm S, Kao D, Nimmerjahn F. Sweet and sour: the role of glycosylation for the anti-inflammatory activity of immunoglobulin G. Curr Top Microbiol Immunol. 2014; 382: 393-417.

134. Yu X, Vasiljevic S, Mitchell DA, Crispin M, Scanlan CN. Dissecting the molecular mechanism of IVIg therapy: the interaction between serum IgG and DC-SIGN is independent of antibody glycoform or Fc domain. J Mol Biol. 2013; 425(8): 1253-8.

135. Lee YH, Ji JD, Song GG. Associations between FCGR3A polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a metaanalysis. J Rheumatol. 2008; 35(11): 2129-35.

136. Daeron M, Nimmerjahn F. High amounts of specific antibodies are produced upon antigen stimulation during adaptive immune responses. Preface. Curr Top Microbiol Immunol. 2014; 382: v-xi.

137. Deusch K, Fernandez-Botran R, Konstadoulakis M, Baur K, Schwartz RS, Madaio MP. Autoreactive T cells from MRL-lpr/lpr mice secrete multiple lymphokines and induce the production of IgG anti-DNA antibodies. J Autoimmun. 1991; 4(4): 563-76.

138. Woodward J, Jenkinson E. Identification and characterization of lymphoid precursors in the murine intestinal epithelium. Eur J Immunol. 2001; 31(11): 3329-38.

139. Kirkpatrick S, Gelatt CD, Vecchi MP. Optimization by Simulated Annealing. Science. 1983; 220(4598): 671-80.

140. Collet P, Rennard J-P. Stochastic Optimization Algorithms. arXiv e-prints [Internet]. 2007 April 01, 2007. Available from: https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2007arXiv0704.3780C.

141. Bishop CM. Pattern Recognition and Machine Learning (Information Science and Statistics). In: Jordan M, Kleinberg J, Schölkopf B, eds. Springer; 2006.

142. Russell SJ, Norvig P, Davis E. Artificial Intelligence: A Modern Approach, 3rd ed. Upper Saddle River, NJ : Prentice Hall; [2010]. 2009.

143. Anellis IH. Peirce's Truth-functional Analysis and the Origin of the Truth Table. History and Philosophy of Logic. 2012; 33(1): 87-97.

144. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, et al. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. Nucleic Acids Res. 2008; 36(Database issue): D901-6.

145. Kuhn M, Letunic I, Jensen LJ, Bork P. The SIDER database of drugs and side effects. Nucleic Acids Res. 2016; 44(D1): D1075-9.

146. Anaxomics Biotech SL. Biological Effectors Database. TPMS technology [Available from: http://www.anaxomics.com/biological-effectors-database.php.

147. Pujol A, Mosca R, Farres J, Aloy P. Unveiling the role of network and systems biology in drug discovery. Trends Pharmacol Sci. 2010; 31(3): 115-23.

148. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. Nucleic Acids Res. 2018; 46(D1): D1074-D82.

149. Massey FJ. The Kolmogorov-Smirnov Test for Goodness of Fit. Journal of the American Statistical Association. 1951; 46(253): 68-78.

150. Miller LH. Table of Percentage Points of Kolmogorov Statistics. Journal of the American Statistical Association. 1956; 51(273): 111-21.

151. Lilliefors HW. On the Kolmogorov-Smirnov Test for Normality with Mean and Variance Unknown. Journal of the American Statistical Association. 1967; 62(318): 399-402.

152. Huber W, von Heydebreck A, Sultmann H, Poustka A, Vingron M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. Bioinformatics. 2002; 18 Suppl 1: S96-104.

153. Best CJ, Gillespie JW, Yi Y, Chandramouli GV, Perlmutter MA, Gathright Y, et al. Molecular alterations in primary prostate cancer after androgen ablation therapy. Clin Cancer Res. 2005; 11(19 Pt 1): 6823-34.

154. Gibbons JD. Nonparametric Statistical Inference. New York: Marcel Dekker.

155. Hollander M, Wolfe DA. Nonparametric Statistical Methods. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.

156. Benjamini YH, Yosef Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J R Statist Soc B. 1995; 57(1): 289-300.

157. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. Science. 2010; 327(5966): 656-61.

158. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nat Rev Immunol. 2011; 11(11): 723-37.

159. Tugal D, Liao X, Jain MK. Transcriptional control of macrophage polarization. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013; 33(6): 1135-44.

160. Loveland KL, Klein B, Pueschl D, Indumathy S, Bergmann M, Loveland BE, et al. Cytokines in Male Fertility and Reproductive Pathologies: Immunoregulation and Beyond. Front Endocrinol (Lausanne). 2017; 8: 307.

161. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. J Pathol. 2013; 229(2): 176-85.

162. Mantovani A, Locati M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013; 33(7): 1478-83.

163. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. J Clin Invest. 2005; 115(1): 56-65.

164. London A, Benhar I, Mattapallil MJ, Mack M, Caspi RR, Schwartz M. Functional macrophage heterogeneity in a mouse model of autoimmune central nervous system pathology. J Immunol. 2013; 190(7): 3570-8.

165. Gordon S, Pluddemann A. Tissue macrophage heterogeneity: issues and prospects. Semin Immunopathol. 2013; 35(5): 533-40.

166. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. J Cell Physiol. 2018; 233(9): 6425-40.

167. Guilliams M, Bruhns P, Saeys Y, Hammad H, Lambrecht BN. The function of Fcgamma receptors in dendritic cells and macrophages. Nat Rev Immunol. 2014; 14(2): 94-108.

168. Chen Z, Klein T, Murray R, Crawford R, Chang J, Wu C, et al. Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials. Materials Today. 2016; 19(6).

169. Jha AK, Huang SC, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, et al. Network integration of parallel metabolic and trans-

criptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. Immunity. 2015; 42(3): 419-30.

170. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. J Exp Med. 1999; 189(9): 1363-72.

171. Bretscher P, Egger J, Shamshiev A, Trotzmuller M, Kofeler H, Carreira EM, et al. Phospholipid oxidation generates potent anti-inflammatory lipid mediators that mimic structurally related pro-resolving eicosanoids by activating Nrf2. EMBO Mol Med. 2015; 7(5): 593-607.

172. Hua S, Ek CJ, Mallard C, Johansson ME. Perinatal hypoxia-ischemia reduces alpha 7 nicotinic receptor expression and selective alpha 7 nicotinic receptor stimulation suppresses inflammation and promotes microglial Mox phenotype. Biomed Res Int. 2014; 2014: 718769.

173. Kloc M, Ghobrial RM, Wosik J, Lewicka A, Lewicki S, Kubiak JZ. Macrophage functions in wound healing. J Tissue Eng Regen Med. 2019; 13(1): 99-109.

174. Fine A, Nasiri K, Fotinos K, Anand L, Furtado M, Armata RS, et al. Examining predictors of help-seeking behaviours in patients with mood and anxiety symptoms. Psychiatry Res. 2018; 265: 190-7.

175. Bertling A, Brodde MF, Visser M, Treffon J, Fennen M, Fender AC, et al. Components in Plasma-Derived Factor VIII, But Not in Recombinant Factor VIII Downregulate Anti-Inflammatory Surface Marker CD163 in Human Macrophages through Release of CXCL4 (Platelet Factor 4). Transfus Med Hemother. 2017; 44(5): 351-7.

176. Ricchetti GA, Williams LM, Foxwell BM. Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositol-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide. J Leukoc Biol. 2004; 76(3): 719-26.

177. Zhao Y, Jia Y, Wang L, Chen S, Huang X, Xu B, et al. Upregulation of Heme Oxygenase-1 Endues Immature Dendritic Cells With More Potent and Durable Immunoregulatory Properties and Promotes Engraftment in a Stringent Mouse Cardiac Allotransplant Model. Front Immunol. 2018; 9: 1515.

178. Campbell NK, Fitzgerald HK, Malara A, Hambly R, Sweeney CM, Kirby B, et al. Naturally derived Heme-Oxygenase 1 inducers attenuate in-

flammatory responses in human dendritic cells and T cells: relevance for psoriasis treatment. Sci Rep. 2018; 8(1): 10287.

179. Repesse Y, Peyron I, Dimitrov JD, Dasgupta S, Moshai EF, Costa C, et al. Development of inhibitory antibodies to therapeutic factor VIII in severe hemophilia A is associated with microsatellite polymorphisms in the HMOX1 promoter. Haematologica. 2013; 98(10): 1650-5.

180. Rethi B, Gogolak P, Szatmari I, Veres A, Erdos E, Nagy L, et al. SLAM/SLAM interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte-derived dendritic cells. Blood. 2006; 107(7): 2821-9.

181. Romanets-Korbut O, Kovalevska LM, Seya T, Sidorenko SP, Horvat B. Measles virus hemagglutinin triggers intracellular signaling in CD150-expressing dendritic cells and inhibits immune response. Cell Mol Immunol. 2016; 13(6): 828-38.

182. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. Nat Immunol. 2008; 9(3): 239-44.

183. Adams AB, Ford ML, Larsen CP. Costimulation Blockade in Autoimmunity and Transplantation: The CD28 Pathway. J Immunol. 2016; 197(6): 2045-50.

184. Edwards DH, Kravitz EA. Serotonin, social status and aggression. Curr Opin Neurobiol. 1997; 7(6): 812-9.

185. Comabella M, Montalban X, Munz C, Lunemann JD. Targeting dendritic cells to treat multiple sclerosis. Nat Rev Neurol. 2010; 6(9): 499-507.

186. Aras S, Zaidi MR. TAMeless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. Br J Cancer. 2017; 117(11): 1583-91.

187. Schrezenmeier E, Jayne D, Dorner T. Targeting B Cells and Plasma Cells in Glomerular Diseases: Translational Perspectives. J Am Soc Nephrol. 2018; 29(3): 741-58.

188. Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014; 15(2): 81-94.

189. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998; 392(6673): 245-52.

190. McCloskey ML, Curotto de Lafaille MA, Carroll MC, Erlebacher A. Acquisition and presentation of follicular dendritic cell-bound antigen by lymph node-resident dendritic cells. J Exp Med. 2011; 208(1): 135-48.

191. El Shikh ME, Pitzalis C. Follicular dendritic cells in health and disease. Front Immunol. 2012; 3: 292.

192. Aydar Y, Balogh P, Tew JG, Szakal AK. Follicular dendritic cells in aging, a "bottle-neck" in the humoral immune response. Ageing Res Rev. 2004; 3(1): 15-29.

193. Aydar Y, Wu J, Song J, Szakal AK, Tew JG. FcgammaRII expression on follicular dendritic cells and immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif signaling in B cells. Eur J Immunol. 2004; 34(1): 98-107.

194. El Shikh ME, El Sayed R, Szakal AK, Tew JG. Follicular dendritic cell (FDC)-FcgammaRIIB engagement via immune complexes induces the activated FDC phenotype associated with secondary follicle development. Eur J Immunol. 2006; 36(10): 2715-24.

195. Chaplin DD. Overview of the immune response. J Allergy Clin Immunol. 2010; 125(2 Suppl 2): S3-23.

196. Kronke G, Kadl A, Ikonomu E, Bluml S, Furnkranz A, Sarembock IJ, et al. Expression of heme oxygenase-1 in human vascular cells is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007; 27(6): 1276-82.

197. Hasseine LK, Murdaca J, Suavet F, Longnus S, Giorgetti-Peraldi S, Van Obberghen E. Hrs is a positive regulator of VEGF and insulin signaling. Exp Cell Res. 2007; 313(9): 1927-42.

198. Acharya SS, Kaplan RN, Macdonald D, Fabiyi OT, DiMichele D, Lyden D. Neoangiogenesis contributes to the development of hemophilic synovitis. Blood. 2011; 117(8): 2484-93.

199. Botta A, Liu Y, Wannaiampikul S, Tungtrongchitr R, Dadson K, Park TS, et al. An adiponectin-S1P axis protects against lipid induced insulin resistance and cardiomyocyte cell death via reduction of oxidative stress. Nutr Metab (Lond). 2019; 16: 14.

200. Gradinaru D, Margina D, Borsa C, Ionescu C, Ilie M, Costache M, et al. Adiponectin: possible link between metabolic stress and oxidative stress in the elderly. Aging Clin Exp Res. 2017; 29(4): 621-9.

▼Este medicamento está sujeto a seguimiento adicional, lo que agilizará la detección de nueva información sobre su seguridad. Se invita a los profesionales sanitarios a notificar las sospechas de reacciones adversas. Ver la sección de Reacciones adeversasver, en la que se incluye información sobre cómo notificarlas.

NOMBRE DEL MEDICAMENTO ELOCTA 250 UI polvo y disolvente para solución inyectable. ELOCTA 500 UI polvo y disolvente para solución inyectable. ELOCTA 750 UI polvo y disolvente para solución inyectable. ELOCTA 1000 UI polvo y disolvente para solución inyectable. ELOCTA 1500 UI polvo y disolvente para solución inyectable. ELOCTA 2000 UI polvo y disolvente para solución inyectable. ELOCTA 3000 UI polvo y disolvente para solución inyectable. ELOCTA 4000 UI polvo y disolvente para solución inyectable. ELOCTA 5000 UI polvo y disolvente para solución inyectable. ELOCTA 6000 UI polvo y disolvente para solución inyectable. **COMPOSICIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA** ELOCTA 250 UI polvo y disolvente para solución inyectable. Cada vial contiene nominalmente 250 UI de efmoroctocog alfa. Tras la reconstitución, cada ml de solución inyectable contiene aproximadamente 83 UI de efmoroctocog alfa. ELOCTA 500 UI polvo y disolvente para solución inyectable. Cada vial contiene nominalmente 500 UI de efmoroctocog alfa. Tras la reconstitución, cada ml de solución inyectable contiene aproximadamente 167 UI de efmoroctocog alfa. ELOCTA 750 UI polvo y disolvente para solución inyectable. Cada vial contiene nominalmente 750 UI de efmoroctocog alfa. Tras la reconstitución, cada ml de solución inyectable contiene aproximadamente 250 UI de efmoroctocog alfa. ELOCTA 1000 UI polvo y disolvente para solución inyectable. Cada vial contiene nominalmente 1000 UI de efmoroctocog alfa. Tras la reconstitución, cada ml de solución inyectable contiene aproximadamente 333 UI de efmoroctocog alfa. ELOCTA 1500 UI polvo y disolvente para solución inyectable. Cada vial contiene nominalmente 1500 UI de efmoroctocog alfa. Tras la reconstitución, cada ml de solución inyectable contiene aproximadamente 500 UI de efmoroctocog alfa. ELOCTA 2000 UI polvo y disolvente para solución inyectable. Cada vial contiene nominalmente 2000 UI de efmoroctocog alfa. Tras la reconstitución, cada ml de solución inyectable contiene aproximadamente 667 UI de efmoroctocog alfa. ELOCTA 3000 UI polvo y disolvente para solución inyectable. Cada vial contiene nominalmente 3000 UI de efmoroctocog alfa. Tras la reconstitución, cada ml de solución inyectable contiene aproximadamente 1000 UI de efmoroctocog alfa. ELOCTA 4000 UI polvo y disolvente para solución inyectable. Cada vial contiene nominalmente 4000 UI de efmoroctocog alfa. Tras la reconstitución, cada ml de solución inyectable contiene aproximadamente 1333 UI de efmoroctocog alfa. ELOCTA 5000 UI polvo y disolvente para solución inyectable. Cada vial contiene nominalmente 5000 UI de efmoroctocog alfa. Tras la reconstitución, cada ml de solución inyectable contiene aproximadamente 1667 UI de efmoroctocog alfa. ELOCTA 6000 UI polvo y disolvente para solución inyectable. Cada vial contiene nominalmente 6000 UI de efmoroctocog alfa. Tras la reconstitución, cada ml de solución inyectable contiene aproximadamente 2000 UI de efmoroctocog alfa. La potencia (Unidades Internacionales) se determina utilizando el ensayo de sustrato cromogénico de la Farmacopea Europea frente a un estándar interno referenciado al estándar del factor VIII de la OMS. La actividad específica de ELOCTA es de 4.000 - 10.200 UI/mg de proteína. Efmoroctocog alfa (factor VIII de coagulación recombinante humano, proteína de fusión Fc [rFVIIIFc]) consta de 1.890 aminoácidos. Se produce mediante tecnología de DNA recombinante en una línea celular embrionaria de riñón humano (HEK) sin la adición de ninguna proteína exógena de origen humano o animal en el proceso de cultivo celular, la purificación o la formulación final. Excipiente con efecto conocido 0,6 mmol (o 14 mg) de sodio por vial. Para consultar la lista completa de excipientes, ver sección de Lista de excipientes. **FORMA FARMACÉUTICA** Polvo y disolvente para solución inyectable. Polvo: liofilizado, suelto o sólido de color blanco a blanquecino. Disolvente: agua para preparaciones inyectables, una disolución transparente e incolora. **DATOS CLÍNICOS. Indicaciones terapéuticas.** Tratamiento y profilaxis de las hemorragias en pacientes con hemofilia A (deficiencia congénita de factor VIII). ELOCTA se puede usar en todos los grupos de edad. **Posología y forma de administración** El tratamiento se debe iniciar bajo la supervisión de un médico con experiencia en el tratamiento de la hemofilia. Posología La dosis y la duración del tratamiento de sustitución dependen de la gravedad de la deficiencia de factor VIII, de la localización y la magnitud de la hemorragia y del estado clínico del paciente. El número de unidades de Fc de factor VIII recombinante administradas se expresa en Unidades Internacionales (UI), en relación con el estándar actual de la OMS para los productos de factor VIII. La actividad plasmática del factor VIII se expresa como un porcentaje (en relación con el plasma humano normal) o en Unidades Internacionales (en relación con un estándar internacional para el factor VIII plasmático). La actividad de 1 UI de Fc de factor VIII recombinante equivale a la cantidad de factor VIII presente en 1 ml de plasma humano normal. Tratamiento a demanda El cálculo de la dosis necesaria de Fc de factor VIII recombinante se basa en el hallazgo empírico de que 1 Unidad Internacional (UI) de factor VIII por kg de peso corporal aumenta la actividad plasmática del factor VIII en 2 UI/dl. La dosis necesaria se determina mediante la siguiente fórmula: Unidades necesarias = peso corporal (kg) x aumento deseado del factor VIII (%) (UI/dl) x 0,5 (UI/kg por UI/dl) La dosis y la frecuencia de administración se establecerán siempre en función de la eficacia clínica observada en cada caso. No se prevé un retraso en el tiempo transcurrido hasta la actividad máxima. En el caso de los siguientes episodios hemorrágicos, la actividad del factor VIII no debe caer por debajo del nivel de actividad plasmática establecido (en % del nivel normal o UI/dl) durante el periodo correspondiente. La Tabla 1 se puede usar como guía posológica en los episodios hemorrágicos y durante la cirugía:

Tabla 1: Guía posológica de ELOCTA para el tratamiento de los episodios hemorrágicos y durante la cirugía

Grado de hemorragia / Tipo de procedimiento quirúrgico	Nivel requerido de factor VIII (%) (UI/dl)	Frecuencia de dosificación (horas) / Duración del tratamiento (días)
Hemorragia		
Hemartrosis precoz, hemorragia muscular o hemorragia oral	20 - 40	Repetir la inyección cada 12 a 24 horas durante al menos 1 día, hasta que, en función del dolor, el episodio hemorrágico se haya resuelto o hasta que se produzca la cicatrización. [1]
Hemartrosis, hemorragia muscular o hematoma más extenso	30 - 60	Repetir la inyección cada 12 a 24 horas durante 3-4 días o más hasta que el dolor y la discapacidad aguda se hayan resuelto. [1]
Hemorragias potencialmente mortales	60 - 100	Repetir la inyección cada 8 a 24 horas hasta que desaparezca el riesgo.
Cirugía		
Cirugía menor, incluidas las extracciones dentales	30 - 60	Repetir la inyección cada 24 horas, durante al menos 1 día hasta que se produzca la cicatrización.
Cirugía mayor	80 - 100 (antes y después de la cirugía)	Repetir la inyección cada 8 a 24 horas según sea necesario hasta la cicatrización adecuada de la herida y después continuar el tratamiento al menos otros 7 días para mantener una actividad del factor VIII del 30 % al 60 % (UI/dl).

[1]En ciertos pacientes y circunstancias, el intervalo de dosificación se puede prolongar hasta 36 horas.

Profilaxis Para la profilaxis a largo plazo, la dosis recomendada es de 50 UI/kg cada 3 a 5 días. La dosis se puede ajustar en función de la respuesta del paciente dentro de un intervalo comprendido entre 25 y 65 UI/kg. En algunos casos, especialmente en pacientes jóvenes, es posible que sea necesario acortar los intervalos de administración o usar dosis más elevadas. Control del tratamiento Durante el transcurso del tratamiento se recomienda controlar adecuadamente los niveles de factor VIII (mediante el ensayo de coagulación en una fase o el ensayo cromogénico) para estimar la dosis que se debe administrar y la frecuencia de repetición de las inyecciones. La respuesta individual de los pacientes al factor VIII puede variar y presentar distintas semividas y niveles de recuperación. La dosis basada en el peso corporal puede precisar ajustes en los pacientes con bajo peso o sobrepeso. En el caso de las intervenciones de cirugía mayor en particular, es indispensable controlar con precisión el tratamiento de sustitución mediante pruebas de coagulación (actividad plasmática del factor VIII). Cuando se utilice una prueba de coagulación de una etapa basada en el tiempo de tromboplastina (TTPa) in vitro para determinar la actividad del factor VIII en las muestras de sangre de los pacientes, los resultados de la actividad plasmática del factor VIII se pueden ver afectados considerablemente tanto por el tipo de reactivo TTPa como por el patrón de referencia utilizado en el análisis. Esto es importante, sobre todo cuando se cambia de laboratorio o de reactivo para la prueba. Personas de edad avanzada Se dispone de experiencia limitada en los pacientes ≥65 años. Población pediátrica Los niños menores de 12 años pueden precisar dosis más altas o más frecuentes. En los adolescentes de edad igual o superior a 12 años, las recomendaciones posológicas son las mismas que en los adultos. Forma de administración ELOCTA es para uso por vía intravenosa. ELOCTA se debe inyectar por vía intravenosa durante varios minutos. La velocidad de administración se debe determinar en función del grado de comodidad del paciente y no debe superar los 10 ml/min. Para consultar las instrucciones de reconstitución del medicamento antes de la administración, ver sección de Precauciones especiales de eliminación y otras manipulaciones. **Contraindicaciones** Hipersensibilidad al principio activo (factor VIII de coagulación recombinante humano, o dominio Fc) o a alguno de los excipientes incluidos en la sección de Lista de excipientes. **Advertencias y precauciones especiales de empleo** Hipersensibilidad Es posible que se produzcan reacciones de hipersensibilidad de tipo alérgico con ELOCTA. Si aparecen síntomas de hipersensibilidad, se debe aconsejar a los pacientes que interrumpan inmediatamente el uso del medicamento y se pongan en contacto con su médico. Se debe informar a los pacientes sobre los signos de las reacciones de hipersensibilidad, como habón urticarial, urticaria generalizada, opresión en el pecho, sibilancia, hipotensión y anafilaxia. En caso de shock anafiláctico, se debe instaurar el tratamiento médico habitual para el shock. Inhibidores La formación de anticuerpos neutralizantes (inhibidores) contra el factor VIII es una complicación conocida del tratamiento de los pacientes con hemofilia A. Estos inhibidores son generalmente inmunoglobulinas IgG dirigidas contra la actividad procoagulante del factor VIII, que se cuantifica en Unidades Bethesda (UB) por ml de plasma, utilizando el ensayo modificado. El riesgo de desarrollar inhibidores se correlaciona con la gravedad de la enfermedad, así como la exposición al factor VIII y es mayor en los primeros 20 días de exposición. Raramente se pueden desarrollar inhibidores tras los primeros 100 días de exposición. Se han observado casos de inhibidor recurrente (titulación baja) después de cambiar desde un producto de factor VIII a otro, en pacientes tratados anteriormente con más de 100 días de exposición que tenían antecedentes de desarrollo de inhibidores. Por lo tanto, se recomienda vigilar cuidadosamente a todos los pacientes en cuanto a la aparición de inhibidores después de cualquier cambio de producto. La relevancia clínica del desarrollo de inhibidores dependerá del título de inhibidores, a saber: un título bajo de inhibidores que está presente de forma transitoria o se mantiene bajo de forma constante entraña un menor riesgo de obtener una respuesta clínica insuficiente que un título alto de inhibidores. En general, todos los pacientes tratados con productos del factor VIII de coagulación deben ser controlados cuidadosamente por si desarrollan inhibidores, mediante las observaciones clínicas y pruebas analíticas adecuadas. Si no se alcanzan los niveles esperados de actividad plasmática del factor VIII o si la hemorragia no se controla con la dosis adecuada, se deben realizar pruebas para descartar la presencia de inhibidores del factor VIII. En los pacientes con niveles altos de inhibidor, el tratamiento con factor VIII puede no ser eficaz y se deben considerar otras opciones terapéuticas. El tratamiento de estos pacientes deben dirigirlo médicos con experiencia en pacientes con hemofilia y en inhibidores del factor VIII. Acontecimientos cardiovasculares En pacientes con factores de riesgo cardiovascular ya existentes, el tratamiento de sustitución con FVIII puede aumentar el riesgo cardiovascular. Complicaciones asociadas al catéter Si para la administración es necesario un dispositivo de acceso venoso central (DAVC), se debe tener en cuenta el riesgo de complicaciones relacionadas con el DAVC, incluidas las infecciones locales, la bacteriemia y la trombosis en el lugar de colocación del catéter. Registro del número de lote Se recomienda encarecidamente que cada vez que se administre ELOCTA a un paciente, se registren el nombre y el número de lote del producto con el fin de tener una relación entre el paciente y el lote del medicamento. Población pediátrica Las advertencias y precauciones descritas son válidas tanto para adultos como para niños y adolescentes. Consideraciones relativas a los excipientes Este medicamento contiene menos de 1 mmol de sodio (23 mg) por vial; esto es, esencialmente "exento de sodio". **Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción** No se han notificado interacciones del factor VIII de coagulación humano (rDNA) con otros medicamentos. No se han realizado estudios de interacciones con ELOCTA. **Fertilidad, embarazo y lactancia** Embarazo y lactancia No se han realizado estudios de reproducción animal con ELOCTA. Se realizó un estudio de transferencia placentaria en ratones. Dado que la hemofilia A aparece raramente en las mujeres, no se dispone de experiencia sobre el uso del factor VIII durante el embarazo y la lactancia. Por lo tanto, solo se debe usar el factor VIII durante el embarazo y la lactancia si está claramente indicado. Fertilidad No se dispone de datos sobre la fertilidad. No se han realizado estudios de fertilidad en animales con ELOCTA. **Efectos sobre la capacidad para conducir y utilizar máquinas** La influencia de ELOCTA sobre la capacidad para conducir y utilizar máquinas es nula. **Reacciones adversas** Resumen del perfil de seguridad Se han observado raramente reacciones alérgicas o de hipersensibilidad (entre las que se pueden encontrar hinchazón de la cara, erupción, habón urticarial, opresión en el pecho y dificultad para respirar, escozor y punzadas en el lugar de la perfusión, escalofríos, rubefacción, urticaria generalizada, cefalea, hipotensión, letargia, náuseas, inquietud y taquicardia), que en algunos casos pueden evolucionar a anafilaxia grave (incluido shock). En los pacientes con hemofilia A tratados con factor VIII, incluido ELOCTA, puede producirse el desarrollo de anticuerpos neutralizantes (inhibidores). Si aparecen dichos inhibidores, la situación se manifestará en forma de respuesta clínica insuficiente. En estos casos, se recomienda ponerse en contacto con un centro especializado en hemofilia. Tabla de reacciones adversas Las frecuencias mostradas en la Tabla 2 siguiente se observaron en un total de 276 pacientes con hemofilia A grave en ensayos clínicos de fase 3 y en un estudio de extensión con una duración de hasta cuatro años. Las reacciones adversas se supervisaron para un total de 893,72 años-paciente. El número total de días de exposición fue de 80.848 días, con una mediana de 294 (intervalo 1 - 735) días de exposición por sujeto. La Tabla 2, que figura a continuación, está ordenada conforme a la clasificación de órganos del sistema MedDRA (COS y nivel terminológico preferido). Las frecuencias se han evaluado según la siguiente convención: muy frecuente (≥1/10); frecuente (≥1/100 a <1/10); poco frecuente (≥1/1.000 a <1/100); rara (≥1/10.000 a <1/1.000); muy rara (<1/10.000), frecuencia no conocida (no puede estimarse a partir de los datos disponibles). Las reacciones adversas se enumeran en orden decreciente de gravedad dentro de cada intervalo de frecuencia.

Tabla 2: Reacciones adversas notificadas con ELOCTA en los ensayos clínicos		
Clasificación de órganos del sistema MedDRA	**Reacciones adversas**	**Categoría de frecuencia**
Trastornos de la sangre y del sistema linfático	Inhibición del factor VIII	Poco frecuentes (PTP)[1] Muy frecuentes (PUP)[1]
Trastornos del sistema nervioso	Cefalea, mareo, disgeusia	Poco frecuente
Trastornos cardiacos	Bradicardia	Poco frecuente
Trastornos vasculares	Hipertensión, sofoco, angiopatía[2]	Poco frecuente
Trastornos respiratorios, torácicos y mediastínicos	Tos	Poco frecuente
Trastornos gastrointestinales	Dolor en la zona inferior del abdomen	Poco frecuente
Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo	Erupción	Poco frecuente
Trastornos musculoesqueléticos y del tejido conjuntivo	Artralgias, mialgias, dolor de espalda, tumefacción articular	Poco frecuente
Trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración	Malestar general, dolor torácico, sensación de frío, sensación de calor	Poco frecuente
Lesiones traumáticas, intoxicaciones y complicaciones de procedimientos terapéuticos	Hipotensión por procedimiento terapéutico	Poco frecuente

[1] La frecuencia se basa en estudios con todos los productos de FVIII que incluyeron a pacientes con hemofilia A grave. PTP = sujetos tratados previamente, PUP = pacientes no tratados previamente.
[2] Término del investigador: *dolor vascular tras la inyección de ELOCTA.*

Población pediátrica No se han observado diferencias específicas debidas a la edad entre los sujetos pediátricos y los sujetos adultos con respecto a las reacciones adversas. Notificación de sospechas de reacciones adversas Es importante notificar sospechas de reacciones adversas al medicamento tras su autorización. Ello permite una supervisión continuada de la relación beneficio/riesgo del medicamento. Se invita a los profesionales sanitarios a notificar las sospechas de reacciones adversas a través del Sistema Español de Farmacovigilancia de Medicamentos de Uso Humano: https://www.notificaram.es. **Sobredosis** No se han notificado síntomas de sobredosis. **DATOS FARMACÉUTICOS Lista de excipientes** Polvo Sacarosa, cloruro de sodio, L-histidina, cloruro de calcio dihidrato, polisorbato 20, hidróxido de sodio (para ajuste del pH), ácido clorhídrico (para ajuste del pH). Disolvente Agua para preparaciones inyectables. **Incompatibilidades** En ausencia de estudios de compatibilidad, este medicamento no debe mezclarse con otros. Solo se debe usar el equipo de perfusión suministrado, ya que el factor VIII de coagulación se puede adsorber a las superficies internas de otros equipos de inyección con el consiguiente fracaso terapéutico. **Periodo de validez** Vial sin abrir 4 años. Durante el periodo de validez, el medicamento se puede conservar a temperatura ambiente (hasta 30 °C) durante un periodo único que no supere los 6 meses. Se debe anotar en la caja la fecha de extracción del medicamento de la nevera. Tras la conservación a temperatura ambiente, el medicamento no se puede reintroducir en la nevera. No utilizar después de la fecha de caducidad impresa en el vial o seis meses después de retirar la caja de la nevera, según cuál de estas circunstancias se produzca primero. Tras la reconstitución Tras la reconstitución, la estabilidad química y física se ha demostrado durante 6 horas cuando se conservaba a temperatura ambiente (hasta 30 °C). Proteger el medicamento de la luz solar directa. Tras la reconstitución, si el medicamento no se utiliza en un plazo de 6 horas, se debe desechar. Desde el punto de vista microbiológico, el medicamento se debe utilizar inmediatamente después de la reconstitución. De lo contrario, los tiempos de conservación durante el uso y las condiciones previas al uso serán responsabilidad del usuario. **Precauciones especiales de conservación** Conservar en nevera (entre 2 °C y 8 °C). No congelar. Conservar el vial en el embalaje exterior para protegerlo de la luz. Para las condiciones de conservación tras la reconstitución del medicamento, de Período de validez. **Naturaleza y contenido del envase** Cada envase contiene: polvo en un vial de vidrio tipo 1 con un tapón de goma de clorobutilo, 3 ml de disolvente en una jeringa precargada de vidrio tipo 1 con un tapón de émbolo de goma de bromobutilo, un vástago del émbolo, un adaptador del vial estéril para la reconstitución, un equipo de perfusión estéril, dos toallitas con alcohol, dos tiritas, una gasa. Tamaño de envase: 1. **Precauciones especiales de eliminación y otras manipulaciones** El polvo liofilizado inyectable del vial se debe reconstituir con el disolvente suministrado (agua para preparaciones inyectables) de la jeringa precargada utilizando el adaptador del vial estéril para la reconstitución. El vial se debe mover suavemente en círculos hasta que todo el polvo se haya disuelto. Consultar el prospecto para información adicional sobre la reconstitución y la administración. La solución reconstituida debe ser transparente a ligeramente opalescente e incolora. Las soluciones que presenten un aspecto turbio o contengan depósitos no se deben utilizar. El medicamento reconstituido se debe inspeccionar visualmente en busca de material particulado y signos de cambio de color antes de la administración. La eliminación del medicamento no utilizado y de todos los materiales que hayan estado en contacto con él se realizará de acuerdo con la normativa local. **TITULAR DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN** Swedish Orphan Biovitrum AB (publ) SE-112 76 Stockholm Suecia **NÚMERO(S) DE AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN** EU/1/15/1046/001, EU/1/15/1046/002, EU/1/15/1046/003, EU/1/15/1046/004, EU/1/15/1046/005, EU/1/15/1046/006, EU/1/15/1046/007, EU/1/15/1046/008, EU/1/15/1046/009, EU/1/15/1046/010. FECHA DE LA PRIMERA AUTORIZACIÓN/RENOVACIÓN DE LA AUTORIZACIÓN Fecha de la primera autorización: 19/noviembre/2015 **FECHA DE LA REVISIÓN DEL TEXTO** 09/07/2019 **PRESENTACIONES, PVL Y CONDICIONES DE PRESTACIÓN DEL S.N.S.** Envase de 1 vial + 1 jeringa precargada. PVL: ELOCTA 250 UI polvo y disolvente para solución inyectable: 146,97 €; ELOCTA 500 UI polvo y disolvente para solución inyectable: 293,95 €; ELOCTA 1.000 UI polvo y disolvente para solución inyectable: 587,90 €; ELOCTA 1.500 UI polvo y disolvente para solución inyectable: 881,84 €; ELOCTA 2.000 UI polvo y disolvente para solución inyectable: 1.175,79 €; ELOCTA 3.000 UI polvo y disolvente para solución inyectable: 1.763,69 €. Uso hospitalario. Medicamento sujeto a prescripción médica. La información detallada de este medicamento está disponible en la página web de la Agencia Europea de Medicamentos http://www.ema.europa.eu.

NP-11162

sobi
rare strength