

Estudio de las bases moleculares de los efectos de los anticuerpos: desarrollo y aplicaciones de una nueva plataforma para el mapeo epitópico fino

Autoría principal

Gertrudis Rojas Dorantes¹, Yanelys Cabrera Infante¹.

Otros autores

Amaury Pupo Meriño¹, Tania Carmenate Portilla¹, Yaima Tundidor Cabado¹.

Colaboradores

Janet Avellanet Martínez¹, Kalet León Monzón¹, Yaquelin Marichal Duvergel¹, Sachdev Sidhu², Raffi Tonikian².

Entidad ejecutora principal

¹Centro de Inmunología Molecular

Entidades participantes

²Universidad de Toronto, Canadá

Autor para correspondencia

Gertrudis Rojas

Centro de Inmunología Molecular

Calle 216 esq 15, apartado 16040, Atabey, Playa, La Habana, CP 11600, Cuba

Fax: (537) 2720644

grojas@cim.sld.cu

Aporte científico de cada autor al resultado

- ✓ **Gertrudis Rojas Dorantes (45%)**: Diseñó las diferentes estrategias y procedimientos de mapeo epitópico comprendidas en la plataforma. Realizó los experimentos de mapeo de cinco anticuerpos monoclonales mediante el tamizaje de cientos de variantes mutadas de la IL-2 humana y de ratón presentadas sobre fagos filamentosos. Supervisó todo el trabajo experimental y dirigió al equipo en su conjunto. Es autora de las cinco publicaciones que avalan el trabajo presentado.
- ✓ **Yanelys Cabrera Infante (20%)**: Desarrolló la estrategia de mapeo mediante exploración por mutagénesis combinatoria del antígeno sobre fagos filamentosos. Realizó los experimentos de mapeo de dos anticuerpos monoclonales contra el EGF por este método. Construyó y tamizó una biblioteca de péptidos aleatorios que se utilizó como herramienta complementaria de mapeo epitópico. Es autora de tres de las publicaciones presentadas y de una tesis de Maestría relacionada con el tema.
- ✓ **Amaury Pupo Meriño (15%)**: Modeló la estructura de la IL-2 de ratón mediante herramientas computacionales. Participó en el diseño de las mutaciones y de los fragmentos antigénicos a evaluar experimentalmente a partir del análisis estructural de los antígenos. Trabajó en la visualización, análisis y representación gráfica de los epitopos identificados. Es autor de tres de las publicaciones presentadas.
- ✓ **Tania Carmenate Portilla (10%)**: Demostró la calidad y actividad biológica de las moléculas de IL-2 (tanto humana como de ratón) presentadas sobre fagos filamentosos que se

utilizaron como antígenos. Complementó los estudios de mapeo de los anticuerpos anti-IL-2 con experimentos de actividad neutralizante de dichos anticuerpos. Es autora de dos de las publicaciones presentadas.

- ✓ **Yaima Tundidor Cabado** (10%): Participó en el desarrollo de las estrategias y procedimientos de mapeo epitópico, fundamentalmente en su extensión a otros sistemas antigénicos como el del receptor de EGF. Es autora de una de las publicaciones presentadas y de una tesis de Maestría relacionada con el tema.

Resumen

La especificidad fina es una propiedad única de cada anticuerpo. La identificación de los epitopos reconocidos es clave para comprender las bases moleculares de las funciones biológicas de los anticuerpos, y diferenciarlos entre sí. Por ello, tanto el empleo de anticuerpos como herramientas de investigación como la ingeniería de anticuerpos para la terapia requieren estar acompañados de métodos robustos y sencillos de mapeo epitópico. El presente trabajo comprende el desarrollo de una nueva plataforma de alto flujo para delinear mapas funcionales detallados de los epitopos, basada en la presentación del antígeno diana sobre fagos filamentosos y su exploración exhaustiva mediante mutagénesis sitio-dirigida y combinatoria. La versatilidad de los métodos desarrollados se demostró a través del mapeo de siete anticuerpos monoclonales contra la Interleucina-2 (IL-2) humana, la IL-2 de ratón y el Factor de crecimiento epidérmico (EGF) humano. El trabajo incluye el primer acercamiento al estudio de las bases moleculares de la dicotomía funcional de los anticuerpos anti-IL-2, fenómeno de gran interés para la comunidad inmunológica internacional por sus implicaciones biológicas y terapéuticas. El análisis de cientos de variantes mutadas de cada antígeno llevó a mapas muy completos y confiables de los epitopos en su contexto natural (el antígeno original). Además de las aplicaciones descritas, el uso de métodos similares se ha extendido a la caracterización de anticuerpos contra el receptor del EGF y el Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). El trabajo está avalado por cinco artículos en revistas internacionales. Tres de ellos (publicados en *Immunobiology* y *mAbs*) describen el desarrollo y aplicaciones de los diferentes enfoques de mapeo con particularidades para cada sistema antigénico. Un capítulo, incluido por invitación de los editores en el volumen *Monoclonal antibodies* de la serie *Methods in Molecular Biology*, describe los procedimientos detallados y los pasos críticos para su aplicación exitosa. Un artículo de revisión en la revista *mAbs* recoge la experiencia acumulada por nuestro grupo en este campo, y resalta la superioridad de la plataforma de mapeo desarrollada sobre otros métodos de uso común, como la mutagénesis sitio-dirigida clásica, la mutagénesis el azar, y el análisis de fragmentos peptídicos del antígeno y de bibliotecas de péptidos aleatorios. El conjunto de métodos comprendidos en esta plataforma aporta nuevas herramientas a los investigadores interesados en comprender y manipular las funciones de los anticuerpos.

Comunicación Corta

Introducción

La disponibilidad de múltiples anticuerpos contra un mismo antígeno, incrementada por los métodos biotecnológicos modernos, impone el reto de elegir los más prometedores

para su ulterior desarrollo y aplicación. Los dos elementos que distinguen a estas moléculas son su afinidad y su especificidad fina. La especificidad epitópica es una propiedad intrínseca de cada anticuerpo y determina en gran medida sus efectos biológicos. De este hecho se desprende la importancia de dilucidar la identidad de los epitopos reconocidos. Un procedimiento ideal de mapeo epitópico debe combinar la rapidez y sencillez con la precisión que lleve a una identificación confiable de los epitopos. Existen métodos estructurales y funcionales de mapeo¹. Aun cuando los métodos estructurales (como el estudio por cristalografía de rayos X) producen imágenes de los complejos antígeno-anticuerpo con una resolución atómica², son laboriosos, requieren equipamiento especializado y no resultan apropiados para el estudio simultáneo de muchos anticuerpos. Los métodos funcionales, además de ser usualmente más sencillos, definen la contribución energética de cada residuo a la interacción, y dan como resultado mapas funcionales concentrados en el subconjunto de aminoácidos que determinan la unión³, a través de la caracterización de mutaciones en el antígeno diana que la perturban⁴. Esta información tiene una relevancia adicional, debido a la existencia de una forma de resistencia al tratamiento con anticuerpos vinculada a la aparición de mutaciones que hacen que el antígeno deje de ser reconocido por el agente terapéutico⁵. El presente trabajo se dirigió al desarrollo de una nueva plataforma para el mapeo funcional rápido y confiable de los epitopos reconocidos por múltiples anticuerpos, sobre la base de la presentación de los antígenos sobre fagos filamentosos y su exploración exhaustiva por mutagénesis sitio-dirigida y/o combinatoria.

Combinación de la presentación del antígeno diana sobre fagos filamentosos con la mutagénesis extensiva para delinear mapas funcionales detallados de los epitopos

Si bien la mutagénesis sitio-dirigida es el método de mapeo funcional por excelencia, el número de variantes mutadas del antígeno que se estudia está restringido por la necesidad de obtener cada proteína recombinante para su caracterización. Esta limitación del enfoque clásico ha conducido a la asignación de algunos epitopos sobre la base de una (o unas pocas) mutacion(es), cuyos efectos pudieran ser indirectos, por lo que señalarían una localización dudosa para el determinante antigénico⁶. Se ha intentado aumentar el flujo de trabajo a través de las plataformas disponibles para la presentación de proteínas. La presentación de proteínas recombinantes sobre la membrana de células de mamífero ha sido útil para estudiar las variantes mutadas sin necesidad de purificarlas, y en su contexto natural en el caso de los antígenos anclados a la membrana⁷. Aun así, la complejidad de la manipulación genética de estas células suele limitar la extensión del tamizaje. El mapeo epitópico funcional de alto flujo ha estado dominado por la combinación de la presentación de los antígenos sobre la superficie de levaduras con la generación de grandes bibliotecas de variantes mutadas por reacción en cadena de la polimerasa de baja fidelidad y el análisis de su reconocimiento por citometría de flujo^{8,9}. La diversificación al azar del antígeno tiene los siguientes inconvenientes: a) se producen solo unas pocas mutaciones útiles por su ubicación en la vecindad del epitopo diana, b) algunas variantes portan más de una mutación, lo cual dificulta definir el papel de cada una, y c) otras mutaciones no aportan información debido a que afectan a los aminoácidos que determinan la estructura

global del antígeno (los residuos de cisteína y los que forman el núcleo no expuesto al solvente de la proteína).

La alternativa desarrollada en el presente trabajo es la combinación de la presentación del antígeno sobre fagos filamentosos¹⁰ con la mutagénesis de Kunkel¹¹, y ha permitido delinear mapas funcionales mucho más precisos y detallados de los epitopos^{12,13}. El procedimiento consta de tres etapas. La primera es la confirmación de la antigenicidad y el plegamiento correcto del antígeno diana sobre los fagos. Una vez cumplido este requisito, se realiza una primera exploración de la superficie antigénica a través de la introducción de los cambios presentes en una proteína relacionada no reconocida por el anticuerpo de interés (usualmente el antígeno homólogo de otra especie). Se identifican así una o más posiciones críticas que contribuyen a la formación del epitopo y señalan la región antigénica reconocida. En algunos casos es preciso introducir simultáneamente varias mutaciones inter-especies en posiciones cercanas para detectar la región antigénica relevante¹³. En otros, a pesar de no encontrarse posiciones críticas por esta vía, se puede asumir que la región antigénica involucrada es la misma que la de otro anticuerpo competidor¹². Después de identificar una región, se procede a su exploración exhaustiva por aleatorización sitio-dirigida. El patrón global de tolerancia a los cambios en cada posición indica aquellos residuos que son críticos para el reconocimiento, otros que contribuyen a la formación del epitopo, e incluso define cuáles son las propiedades (tamaño de la cadena lateral, carga, hidrofobicidad, carácter aromático) que contribuyen a la interacción. Esta estrategia de diversificación es más informativa que la introducción de mutaciones prediseñadas como la sustitución por alaninas. Tanto la mutagénesis de Kunkel como el tamizaje de la antigenicidad de las variantes presentadas sobre fagos filamentosos pueden ejecutarse en placas de microtitulación de 96 pocillos¹⁴. El formato miniaturizado, junto a la sencillez y rapidez de ambas técnicas permite un alto flujo en la identificación de epitopos. El hecho de concentrar la exploración por mutagénesis en una región antigénica de interés ya identificada aumenta la eficiencia, al evitar el análisis de variantes irrelevantes, como las que se generan por diversificación al azar. La versatilidad de la técnica desarrollada ofrece la posibilidad adicional de confirmar la identidad de los epitopos por trasplante de los residuos relevantes sobre una armazón proteica no reconocida, también presentada sobre fagos filamentosos^{12,13}.

Exploración de la superficie antigénica por mutagénesis combinatoria para generar mapas funcionales más completos

A pesar de su alta precisión y su utilidad, la estrategia de mapeo anterior tiende a subestimar los efectos de aquellos residuos que, sin ser individualmente críticos, contribuyen de manera aditiva o cooperativa a la formación de los epitopos. Esta limitación puede conducir a mapas funcionales incompletos. Cuando el reconocimiento antigénico depende de los efectos combinados de un conjunto de interacciones (débiles por sí solas), puede incluso resultar imposible la identificación de residuos relevantes por mutagénesis sitio-dirigida y la localización de los epitopos. Este reto llevó al desarrollo de una segunda estrategia de mapeo, también basada en la presentación del antígeno diana sobre fagos filamentosos, pero que se distingue por una forma diferente de explorar su superficie: la mutagénesis combinatoria¹⁵. Su

esencia es la aleatorización simultánea de segmentos o grupos discretos de residuos en grandes bibliotecas derivadas del antígeno. De ese modo se detectan las variantes que dejan de ser reconocidas como consecuencia de la modificación del conjunto de residuos que contribuyen a la formación del epitopo. La robustez de este enfoque se incrementa al complementar los resultados de pérdida de reconocimiento con la selección de variantes mutadas que sí son reconocidas por el anticuerpo de interés. Estas variantes positivas muestran regularidades en sus secuencias que apuntan hacia la contribución de determinados residuos que, aún sin ser individualmente críticos, tienden a conservarse¹⁵. Así pueden delinearse mapas funcionales muy completos de los epitopos, donde se destacan todos los contribuyentes (principales o minoritarios) a la unión. Esta estrategia de mapeo permitió expandir la aplicabilidad de la plataforma desarrollada a aquellos epitopos difíciles de mapear por mutagénesis individual¹⁵.

La selección de moléculas que portan un conjunto de aminoácidos que determinan la unión al anticuerpo de interés (a partir de las bibliotecas de variantes mutadas del antígeno) es similar a uno de los métodos más comunes de mapeo epitópico (el tamizaje de bibliotecas aleatorias de péptidos que simulan en cierta medida a los epitopos originales¹⁶). A pesar de las coincidencias técnicas entre ambos enfoques, la mutagénesis combinatoria sobre el antígeno brinda resultados mucho más confiables, pues los grupos de residuos seleccionados están en su contexto natural (el antígeno completo correctamente plegado) y tienen por tanto una alta probabilidad de reproducir las interacciones del epitopo original. Esta nueva alternativa conserva las ventajas introducidas por las bibliotecas peptídicas (la posibilidad de tamizar cientos o miles de millones de moléculas en condiciones de alto flujo) y supera su principal limitación: el riesgo de obtener mimotopos que establezcan nuevas interacciones con el paratopo de interés y no se parezcan realmente, ni desde el punto de vista estructural ni funcional, a los epitopos que se persigue identificar¹⁷.

Aplicaciones y perspectivas futuras

La primera aplicación de la plataforma de mapeo desarrollada fue el descubrimiento de las bases moleculares de la dicotomía funcional de los anticuerpos anti-IL-2. Desde el hallazgo de que los inmunocomplejos formados por la IL-2 con diferentes anticuerpos (todos neutralizantes *in vitro*) pueden tener fuertes efectos inmunopotenciadores o inmunorreguladores *in vivo*, se había especulado que la especificidad fina del anticuerpo es el factor determinante de una u otra función¹⁸. La magnitud de ambos efectos hace que, además de revelar distintas facetas de la biología de la IL-2, los diferentes inmunocomplejos sean útiles para la destrucción de tumores o para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes¹⁹. Nuestro estudio demostró por primera vez que los epitopos reconocidos por anticuerpos anti-IL-2 inmunopotenciadores e inmunorreguladores se localizan en regiones divergentes de la molécula^{12,13}. Su reconocimiento conduce al bloqueo diferencial de las interacciones de la IL-2 con las distintas subunidades con su receptor. También se dilucidaron los epitopos reconocidos por anticuerpos neutralizantes contra el EGF humano¹⁵.

Además de las aplicaciones descritas en el presente trabajo, la plataforma desarrollada se ha continuado explotando en nuestro laboratorio y en colaboración con otros grupos

del país. Se caracterizó la especificidad fina del anticuerpo nimotuzumab (registrado por el CIM para la terapia de tumores), que lo distingue de otros anticuerpos comerciales contra la misma diana (el receptor del EGF)²⁰. Se utilizaron métodos similares para el descubrimiento del epítopo reconocido por un anticuerpo anti-VEGF obtenido en el CIGB²¹.

El desarrollo de una plataforma eficiente y confiable para el mapeo de epítopos ha situado al grupo de Ingeniería de Proteínas del CIM en una posición de avanzada en esta materia²², y ha brindado herramientas nuevas a los investigadores interesados en comprender las bases moleculares de las funciones de los anticuerpos. Su disponibilidad debe contribuir a acelerar la obtención de moléculas terapéuticas derivadas de la biotecnología, campo dentro del cual los anticuerpos son uno de los grupos de drogas más representados y exitosos.

Referencias

- [1] Greenspan, N.S., DiCera, E. (1999) Defining epitopes: It's not as easy as it seems. *Nat. Biotechnol.* 17, 936-937.
- [2] Davies, D.R., Cohen, G.H. (1996) Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7-12.
- [3] van Regenmortel, M.H. (1989) Structural and functional approaches to study the study of protein antigenicity. *Immunol. Today* 10, 266-272.
- [4] Benjamin, D.C., Perdue, S.S. (1996) Site-directed mutagenesis in epitope mapping. *Methods* 9, 508-515.
- [5] Montagut, C., Dalmases, A., Belosillo, B., Crespo, M., Pairet, S., Iglesias, M., Salido, M., Gallen, M., Marsters, S., Tsai, S.P. (2012) Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat. Med.* 18, 221-223.
- [6] Kamat, V., Donaldson, J.M., Kari, C., Quadros, M.R., Lelkes, P.I., Chaiken, I., Cocklin, S., Williams, J.C., Papazoglou, E., Rodeck, V. (2008) Enhanced EGFR inhibition and distinct epitope recognition by EGFR antagonistic mAbs C225 and 425. *Cancer Biol. & Therapy* 7, 726-733.
- [7] Voigt, M., Braig, F., Gothel, M., Schulte, A., Lamszus, K., Bokemeyer, C., Binder, M. (2012) Functional dissection of the epidermal growth factor receptor epitopes targeted by panitumumab and cetuximab. *Neoplasia* 14, 1023-1031.
- [8] Chao, G., Cochran, R., Wittrup, K.D. (2004) Fine Epitope Mapping of anti-Epidermal Growth Factor receptor antibodies through random mutagenesis and yeast surface display. *J. Mol. Biol.* 342, 539-550.
- [9] Mata-Fink, J., Kriegsman, B., Yu, H-X., Zhu, H., Hanson, M.C., Irvine, D.J., Wittrup, K.D. (2013) Rapid conformational epitope mapping of anti-gp120 antibodies with a designed mutant panel displayed on yeast. *J. Mol. Biol.* 425, 444-456.
- [10] Smith, G.P., Petrenko, V.A. (1997) Phage display. *Chem. Rev.* 97, 391-410.
- [11] Kunkel, T.A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 488-492.

- [12] Rojas, G., Pupo, A., Leon, K., Avellanet, J., Carmenate, T., Sidhu, S. (2013) Deciphering the molecular bases of the biological effects of antibodies against Interleukin-2: a versatile platform for fine epitope mapping. *Immunobiol.* 218, 105-113.
- [13] Rojas, G., Infante, Y.C., Pupo, A., Carmenate, T. (2014) Fine specificity of antibodies against Interleukin-2 explains their paradoxical immunomodulatory effects. *mAbs* 6, 273-285.
- [14] Rojas, G. (2014) Fine epitope mapping based on phage display and extensive mutagenesis of the target antigen. *Methods Mol. Biol.* 1131, 447-476.
- [15] Infante, Y.C., Pupo, A., Rojas, G. (2014) A combinatorial mutagenesis approach for functional epitope mapping on phage-displayed target antigen: application to antibodies against epidermal growth factor. *mAbs* 6, 637-648.
- [16] Felici, F., Castagnoli, L., Musacchio, A., Japelli, R., Cesareni, G. (1991) Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J. Mol. Biol.* 222, 301-310.
- [17] Saphire, E.O., Montero, M., Menendez, A., van Houten, N.E., Irving, M.B., Pantophlet, R., Zwick, M.B., Parren, P.W.H.I., Burton, D.R., Scott, J.K., Wilson I.A. (2007) Structure of a high affinity "minotope" peptide bound to HIV-1-neutralizing antibody b12 explains its inability to elicit gp120 cross-reactive antibodies. *J. Mol. Biol.* 369, 696-709.
- [18] Boyman, O., Kovar, M., Rubinstein, M.P., Surh, C., Sprent, J. (2006) Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science* 311, 1924-1927.
- [19] Boyman, O., Surh, C.D., Sprent, J. (2006) Potential use of IL-2/anti-IL-2 antibody immune complexes for the treatment of cancer and autoimmune disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* 6, 1323-1331.
- [20] Lamdan, H., Gavidondo, J.V., Munoz, Y., Pupo, A., Huerta, V., Musacchio, A., Perez, L., Ayala, M., Rojas, G., Balint, R.F., Larrick, J.W. (2013) Affinity maturation and fine functional mapping of an antibody fragment against a novel neutralizing epitope on human vascular endothelial growth factor. *Mol.Biosyst.* 9, 2097-2106.
- [21] Tundidor, Y., Garcia-Hernandez, C.P., Pupo, A., Infante, Y.C., Rojas, G. (2014) Delineating the functional map of the interaction between nimotuzumab and the epidermal growth factor receptor. *mAbs* 6, 1013-1025.
- [22] Rojas, G., Tundidor, Y., Infante, Y.C. (2014). High throughput functional epitope mapping: revisiting phage display platform to scan target antigen surface. *mAbs* (en imprenta).