



CIENCIAS BIOMÉDICAS

Artículo original de investigación

Efecto potenciador de la muteína IL-2 no-alfa en la actividad antitumoral de la terapia anti-CD20

Ana Victoria Casadesús Pazos ^{1*} <http://orcid.org/0000-0001-6905-7528>

Jean-Luc Teillaud ² <http://orcid.org/0000-0003-4442-9565>

Katya Sosa ¹ <http://orcid.org/000-0001-7650-238X>

Kalet León Monzón ^{1,3} <http://orcid.org/0000-0002-3709-7091>

Tays Hernández García ¹ <http://orcid.org/0000-0001-8414-0040>

¹ Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba

² Centro de Inmunología y Enfermedades Infecciosas. París, Francia

³ Miembro de la Academia de Ciencias de Cuba. La Habana, Cuba

* Autor para la correspondencia: anav@cim.sld.cu

Editor

Lisset González Navarro
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Traductor

Darwin A. Arduengo García
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

RESUMEN

Introducción: El rituximab (RTX), anticuerpo que reconoce la molécula CD20 humana, representa un beneficio terapéutico para pacientes con linfomas de células B, aunque se necesitan nuevas estrategias para pacientes refractarios o con recaídas. La combinación de este anticuerpo con la IL-2 e inmunocitocinas basadas en anticuerpos anti-CD20 y la IL-2 ha tenido un impacto limitado en la clínica, debido al perfil de toxicidad asociado a IL-2 y a la expansión de las células Tregs. **Objetivo:** Demostrar la potenciación del efecto antitumoral de anticuerpos anti-CD20 basados en el RTX mediante su combinación o fusión con la muteína IL-2 no-alfa. **Métodos:** Se evaluó el efecto antitumoral de un anticuerpo anti-CD20 basado en el RTX en combinación con una variante de la IL-2 humana capaz de expandir selectivamente poblaciones inmunes efectoras (la muteína IL-2 no-alfa), y de inmunocitocinas, basadas en el RTX y dicha muteína, en el modelo EL4-CD20h-C57BL/6. Se estudiaron las poblaciones de células inmunes estimuladas por ambos tipos de tratamientos, mediante citómetro de flujo. **Resultados:** Se demostró que el efecto antitumoral de un anticuerpo anti-CD20 se potenció en combinación con la muteína IL-2 no-alfa. Este efecto se asoció al incremento del potencial lítico de las células NK y T CD8+, a la reducción de la población de Tregs e incremento de macrófagos activados, y se caracterizó por una polarización temprana de la respuesta T auxiliar (Th) 1. La fusión, por primera vez, de la IL-2 no-alfa a una versión IgG1 humana del RTX con Fc funcional generó una molécula trifuncional que mantuvo el reconocimiento del antígeno CD20, la capacidad de señalización e inmunomodulación in vivo de la citocina y mejoró las funciones efectoras in vitro de apoptosis y ADCC de este anticuerpo, lo que resultó en un efecto antitumoral in vivo superior al obtenido con el RTX en bajas dosis. **Conclusiones:** En conjunto los presentes resultados apuntan a la muteína IL-2 no-alfa como una estrategia eficaz para potenciar el efecto de la terapia anti-CD20.

Palabras clave: anti-CD20; muteína de IL-2; inmunocitocina; inmunoterapia; linfoma



Potentiating effect of IL-2 no-alpha mutein on the antitumoral activity of anti- CD20 therapy

ABSTRACT

Introduction: The anti-CD20 antibody rituximab has substantially improved outcomes of patients with B-cell lymphomas, although more efficient therapies are needed for refractory or relapsing lymphomas. The combination of rituximab and IL-2 and the use of immunocytokines based on anti-CD20 antibodies and IL-2 had a limited impact in the clinic due to the toxicity profile associated with IL-2 and the expansion of Treg cells. **Objective:** To demonstrate the potentiation of the anti-tumor effect of rituximab -based anti-CD20 antibodies by combining or fusing with IL-2 no-alpha mutein. **Methods:** We explore the anti-tumor effect of an anti-CD20 antibody combined with a mutated IL-2 (no-alpha mutein) which has a disrupted affinity for the IL-2R $\alpha\beta\gamma$ and immunocytokines based on rituximab and this mutein in an EL4-huCD20/C57Bl/6 model and evaluated immune cell populations by Flow Cytometer. **Results:** We demonstrate that the antitumor effect of an anti-CD20 antibody was enhanced in combination with the no-alpha mutein. This effect was associated with an increase in the lytic potential of NK and CD8+ T cells, a reduction of Tregs, and was characterized by an earlier polarization to Th1. The fusion, for the first time, of no-alpha mutein to a human IgG1 version of rituximab with functional Fc generated a tri-functional molecule that maintained the recognition of the CD20 antigen, the signaling capacity and in vivo immunomodulation of the cytokine, and improved the in vitro effector functions of this antibody: apoptosis and ADCC, resulting in an in vivo antitumor effect superior to that obtained with low-dose rituximab. **Conclusions:** Taken together, our findings suggest that IL-2 mutein is a promising molecule that either combined or fused to antibodies can potentiate anti-CD20 therapy.

Keywords: anti-CD20; IL-2 mutein; immunocytokine; immunotherapy; lymphoma

INTRODUCCIÓN

Los linfomas no Hodgkin (NHL, siglas del inglés *non-Hodgkin lymphoma*) constituyen las neoplasias hematológicas más comunes en Cuba y el mundo, y representan un significativo reto clínico en el manejo del cáncer. ^(1,2,3) A su vez, los NHL tipo B (NHL-B) representan la mayoría de estos linfomas. El rituximab (RTX), que reconoce la molécula CD20 humana expresada en diferentes estadios de las células B, fue el primer anticuerpo monoclonal (AcM) aprobado para el tratamiento de esta enfermedad por la FDA (agencia norteamericana de Administración de Alimentos y Medicamentos, siglas del inglés Food and Drug Administration). ⁽⁴⁾ Algunas observaciones clínicas indican una respuesta de larga duración, probablemente asociada a la inducción de un efecto vacunal relacionado con una activación de la rama inmune adaptativa. ⁽⁵⁾

A pesar de la eficacia clínica del RTX un (25-30) % de los pacientes no responden a la terapia de primera línea R-CHOP (RTX combinado con quimioterapia con ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona), y otros recaen después de una respuesta inicial completa. ⁽⁶⁾ Por tal motivo nuevas estrategias están en investigación para incrementar

la efectividad del RTX, entre las cuales se encuentra el uso de combinaciones con citocinas. ^(7,8,9)

La interleucina 2 (IL-2) es una citocina que activa células T y NK. ^(10,11,12) La combinación del RTX y la IL-2 se evaluó en el escenario preclínico y clínico, con el propósito de incrementar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC, siglas del inglés antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) inducida por este anticuerpo. ^(13,14) Aunque las primeras investigaciones mostraron una respuesta clínica objetiva para algunos pacientes con NHL, estudios posteriores no revelaron beneficios significativos. ^(14,15,16,17) Una posible explicación pudiera ser que la mayoría de estos ensayos utilizaron la IL-2 a bajas dosis, lo cual favorece la expansión de células T reguladoras (Tregs), que algunas investigaciones las correlacionan con mal pronóstico para esta enfermedad. ^(15-18,19,20)

Se destaca, en particular, el trabajo de Abes *et al.* donde se empleó una versión IgG2a de ratón del RTX y se estudió su combinación con altas dosis de IL-2 en el modelo de linfoma EL4-CD20h-C57BL/6. ⁽²¹⁾ En este modelo, de marcada expansión de células Tregs por la presencia del tumor, el efecto del anticuerpo demostró ser dependiente de su región fragmento

cristalizable (Fc) y la presencia de células NK/NKT, junto al reclutamiento de células T CD4+ y CD8+. En dicho estudio la administración de altas dosis de IL-2 a ratones supervivientes luego de la monoterapia con el anticuerpo anti-CD20 reforzó la protección a largo plazo del anticuerpo, mas no mejoró su acción antitumoral al ser coadministrada con este en las etapas iniciales del tratamiento (en los primeros 4 d después de la inoculación del tumor: escenario temprano).

Por otra parte, la IL-2 se caracteriza por un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) corto (15 min a 2 h), lo cual obliga a utilizar en su administración sistémica dosis altas y repetidas, las cuales causan intoxicaciones graves que se manifiestan fundamentalmente en la forma del síndrome de fuga vascular.^(22,23,24,25) Una de las soluciones prácticas para disminuir las dosis, con la consiguiente reducción de toxicidad, es la localización de la IL-2 en el microambiente tumoral, a través del uso de inmunocitocinas (IC).^(25,26)

A pesar de los resultados prometedores en los ensayos clínicos fase II de estas moléculas, mantienen efectos adversos similares a los de la IL-2 recombinante, como su perfil de alta toxicidad y la expansión mayoritaria de células Tregs, potencialmente capaces de inhibir su acción antitumoral.^(26,27,28,29,30,31,32,33,34,35) A esta limitación se suma una subóptima biodistribución y localización en el microambiente tumoral por la interacción con los receptores de IL-2 (RIL-2) triméricos $\alpha\beta\gamma_c$, de alta afinidad.^(32,36) Este escenario ha estimulado el desarrollo de IC basadas en variantes mutadas de la IL-2, generalmente diseñadas para tener capacidad reducida de unión a la cadena alfa del RIL-2 (ejemplo: muteína IL-2v), para la estimulación de subpoblaciones específicas de células inmunes y reducir la toxicidad.⁽³⁷⁾ En estudios clínicos sus propiedades inmunomoduladoras favorecen la proliferación de células efectoras T CD8+ y NK, y no la expansión preferencial de células Tregs.⁽³⁸⁾ A pesar de estas evidencias y la reducción de la toxicidad, en ocasiones no resultaron efectivas como monoterapia o en combinación con inhibidores de punto de control, lo que indica la necesidad de explorar nuevas acciones en torno a esta estrategia. La mayoría de estas IC no poseen, por diseño, las funciones efectoras clásicas de los anticuerpos como la CDC y la ADCC y son monovalentes con respecto a la citocina.⁽³⁸⁾ Aunque estas IC basadas en la IL-2v abarcan diferentes especificidades antigénicas, ninguna se ha dirigido contra la molécula CD20.^(32,36,39)

En el Centro de Inmunología Molecular (CIM) se ha desarrollado una versión de la IL-2 humana (muteína IL-2 no-alfa), que expande preferencialmente células T CD8+ y NK, en comparación con la población de Tregs. Esta muteína tiene acción agonista y ha demostrado en varios modelos tumorales trasplantables un efecto antimetastásico superior a la IL-2 salvaje, a la vez que exhibe una menor toxicidad.^(40,41) Estas

ventajas con respecto a la IL-2 alientan el estudio de su potencial impacto en la terapia antitumoral basada en el RTX, en esquemas de tratamiento donde la variante salvaje de esta citocina no ha tenido un rol potenciador. Asimismo, la muteína es una candidata atractiva para generar una IC basada en el RTX, para localizar simultáneamente en el sitio tumoral, las capacidades efectoras del anticuerpo y la acción inmunomoduladora de la muteína.

Con estos antecedentes la presente investigación de propósito como objetivos demostrar la potenciación del efecto antitumoral de una versión IgG2a de ratón del RTX mediante su combinación con la muteína IL-2 no-alfa, en un modelo de ratones inmunocompetentes; obtener versiones humanas y de ratón de IC trifuncionales, de formato IgG basadas en el RTX y la muteína IL-2 no-alfa, que posean un efecto antitumoral superior respecto a las moléculas parentales o su combinación, en un modelo de ratones inmunocompetentes; así como evaluar la capacidad *in vitro* de la IC trifuncional humana basada en RTX e IL-2 no-alfa de activar células NK y de eliminar células B de sangre periférica de pacientes con NHL-B.

MÉTODOS

El presente trabajo es un estudio preclínico realizado desde el año 2014 al 2022.

Líneas celulares y medios de cultivo

Las células EL4 que expresan CD20 humano (EL4-CD20h) fueron donadas amablemente por la Dra. J. Golay (Ospedali Riuniti di Bergamo, Bergamo, Italia). El cultivo de los transductomas se realizó en medio DMEM-F12 (siglas del inglés Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Gibco, Paisley, Reino Unido). Las células de timoma de ratón EL4-CD20h se cultivaron en medio IMDM (Gibco). Los medios se suplementaron con penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 U/mL) y L-glutamina 2 mM (Gibco). El suero fetal de ternera (SFT; PAA, Pasching, Austria) se empleó como suplemento adicional, a diferentes concentraciones, según el ensayo.

Animales de laboratorio

Se emplearon ratones C57BL/6 hembras de (5 a 8) semanas de edad, provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB. La Habana, Cuba), y de los Laboratorios Charles River (Saint Germain Nuelles, Francia), los cuales se mantuvieron bajo estricto control veterinario durante la realización de los experimentos. Los estudios se realizaron con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del CIM o del Comité de ética para la experimentación animal Charles Darwin (Paris, Francia).

Muestras biológicas humanas

Las muestras biológicas de los pacientes con NHL-B y de los donantes sanos se obtuvieron en la consulta de Hematología del Hospital Hermanos Ameijeiras, en La Habana. Los estudios se realizaron con la aprobación del Comité de Ética del hospital.

Anticuerpos, citocinas e inmunocitocinas

Se emplearon lotes comerciales del anticuerpo RTX (anti-CD20; Rituximab, MabThera- Roche, Turquía). El anticuerpo anti-CD20(γ 2a-r), las IC anti-CD20(γ 2a-r)-IL2 no-alfa y anti-CD20(γ 1h)-IL2 no-alfa fuer obtenidos previamente en el laboratorio de proteínas quiméricas del CIM. El anticuerpo MOPC-173 (BioLegends, San Diego, California, EE.UU.) de isotipo IgG2a de ratón, el anticuerpo humanizado R3 (hR3) y la IC anti-MOPC(γ 1h)-IL2 no-alfa, obtenida previamente en el laboratorio de proteínas quiméricas del CIM (datos no publicados), se utilizaron como controles de isotipo.⁽⁴²⁾

Las IC y los anticuerpos se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo de los respectivos transductomas mediante cromatografía de afinidad con proteína A (MabSelect Protein A, GE Healthcare, Suecia). En el caso de las IC se añadió un paso de pulido por cromatografía de exclusión molecular Superdex S-200 (GE Healthcare). La concentración de las IC y de los anticuerpos se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm y se analizó su pureza en condiciones no reductoras por electroforesis en geles de poli-acrilamida y en una columna analítica de exclusión molecular Superdex S-200 (GE Healthcare).⁽⁴³⁾ La muteína IL-2 no-alfa se produjo y purificó en la dirección de desarrollo del CIM. La IL-2 humana se adquirió de Peprotech (Rocky Hill, NJ, EE.UU.).

Citometría de flujo

Las células provenientes de bazo de ratón se marcaron con los anticuerpos monoclonales (AcMs) siguientes: anti-CD3 ϵ (APCeF780, eBioscience; FITC, BioLegend; Alexa Fluor 700, BD Pharmingen; PE, BD Pharmingen), anti-CD4 (PECy5.5, eBioscience; PE-Texas Red, Medsystems), anti-CD8 α (eF660, eBioscience; eF450, eBioscience; PE, eBioscience), anti-NK1.1 (PE, eBioscience; APC, BD Pharmingen), anti-CD62L (PECy5.5; eBioscience), anti-CD11b (eF450; eBioscience), anti-CD44 (APC- Alexa750, eBioscience), anti-CD45 (PE-Cy7, BD Biosciences), anti-CD45R(B220) (PerCP-Cy5.5; BD Biosciences). Las células de bazo para el marcaje intracelular se estimularon durante 4 h a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂; en presencia de forbol-12-miristato-13-acetato (25 ng/mL) (Sigma-Aldrich) e ionomicina (5 μ g/mL) (Sigma- Aldrich) y con monensina (6,7 μ g/mL) (Sigma-Aldrich) durante las últimas 2 h de cultivo. Los anticuerpos intracelulares utilizados fueron: anti-IL-4 (PE-Cy7;

eBioscience), anti-Perforina (PE, eBioscience), anti-Granzyma B (FITC, eBioscience), anti-IFN- γ (Alexa Fluor 647; BD Biosciences), anti-FoxP3 (PE, BioLegend; PE, eBioscience) y anti-IL-17A (Alexa Fluor 700; BioLegend).

Las muestras de sangre total recibidas en tubos con anticoagulante ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) fueron procesadas y se procedió a la lisis de los hematíes. Se marcaron las células con los anticuerpos seleccionados previa titulación. Las células mononucleares de sangre periférica se marcaron con los AcMs siguientes: anti-CD3 (APC, BD Pharmingen), anti-CD56 (FITC, BD Pharmingen) y anti-CD16 (AF-700; Invitrogen). Las adquisiciones de las células se realizaron en un equipo Gallios (Beckman Coulter, Bélgica) o LSRFortessa (BD Biosciences, CA, EE.UU.), y los datos obtenidos se analizaron con los programas Kaluza 1.5 (Beckman Coulter) o FlowJo (TreeStar), respectivamente.

Ensayo de apoptosis temprana

La exposición de la fosfatidilserina en la monocapa externa de la membrana se determinó en las células Ramos. Para ello, se incubaron 3 x 10⁴ células durante 24 h con 18 nM de las IC (anti-CD20[γ 1h]-IL2 no-alfa y anti-MOPC[γ 1h]-IL2 no-alfa) y cantidades equimolares del RTX, la IL-2 no-alfa o la combinación de estas 2 últimas moléculas, diluidos en medio RPMI y SFT al 2 % (RPMI-SFT). Luego las células se lavaron con salina tamponada con fosfatos (SSTF) y se marcaron con el juego de reactivos de detección de apoptosis TACS Annexin V-FITC, según especificaciones del fabricante (TREVIGEN, MN, EE.UU.).

Ensayo de activación de células NK *in vitro*

Para determinar la activación de las células NK se incubaron células Ramos o células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con desórdenes linfoproliferativos de células B, con CMSP humanas frescas en una proporción de 10:1, en presencia de 6 nM de las IC (anti-CD20(γ 1h)-IL2 no-alfa y anti-MOPC[γ 1h]-IL2 no-alfa), o cantidades equimolares del RTX, solo o en combinación con la IL-2 no-alfa. Transcurridas 21 h de incubación a 37 °C y en atmósfera de 5 % de CO₂, las células se colectaron, lavaron, marcaron y analizaron mediante citometría de flujo.

Ensayo de eliminación de linfocitos B

La capacidad de la IC de eliminar linfocitos B se determinó mediante la incubación de CMSP (3 x 10⁵) de un donante sano y de un paciente con linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, siglas del inglés diffuse large B-cell lymphoma) con las IC y el RTX (18 nM) durante 24 h, a 37 °C y en atmósfera de 5 % de CO₂. El porcentaje de células B dentro de las CMSP se determinó por citometría de flujo mediante marcaje con el anticuerpo anti-CD19 PECy7 (BioLegend) y anti-human-FITC (DAKO).

Ensayo de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo

La ADCC se midió a través de la actividad de la enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH), liberada por las células blanco. Se emplearon CMSP de donantes sanos como fuente de células efectoras. Se incubaron 2 x 10⁴ células blanco (Ramos) y 2 x 10⁵ de CMSP, para obtener una relación célula blanco: CMSP de 1:10, en medio RPMI al 1 % de SFT, con diferentes concentraciones (0,75; 1,5; 3; 6 nM) de los distintos tratamientos. Después de 4 h de incubación a 37 oC y en atmósfera de 5 % de CO₂, se tomaron 100 µL de sobrenadante y se midió la actividad de la enzima LDH liberada por las células blanco con el empleo del juego de reactivos de detección de citotoxicidad (Roche, Mannheim, Alemania), según las especificaciones descritas por el fabricante. Se midió la absorbancia del producto formado (sal de formazán) a 490 nm, con filtro de 620 nm en un lector de ELISA ELX800UV (DIALAB GmbH).

El porcentaje de lisis se calculó según la fórmula (I):

$$lisis(\%) = \frac{lisis\ experimental - lisis\ basal}{lisis\ máxima - lisis\ basal} * 100$$

(I)

donde: lisis experimental = (lisis de la combinación de las IC (anti-CD20[γ1h]-IL2 no-alfa y anti-MOPC[γ1h]-IL2 no-alfa) o anticuerpo + células efectoras + células blanco)-lisis de células efectoras; lisis basal (liberación espontánea de LDH) = lisis de las células blanco tratadas con las IC o anticuerpo; lisis máxima: lisis de las células blanco tratadas con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 1 %.

Modelo tumoral EL4-CD20h-C57BL/6

En todos los experimentos, los ratones se inocularon con las células tumorales y después se aleatorizaron por el método simple en los diferentes grupos de tratamientos. Los ratones se sacrificaron cuando aparecieron signos de enfermedad (por ejemplo, postración, parálisis, descenso del peso corporal). Los diferentes esquemas de tratamientos se representan en las figuras 1A, C, 3A, C, 5A y C.

Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos se utilizaron los programas GraphPad Prism versión 7.0 (GraphPad Software Inc.) o el programa SPSS Statistics (versión 25, IBM, NY, USA). En todas las muestras se comprobó la normalidad mediante la prueba de D'Agostino y Pearson y la homogeneidad de varianza mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov. Las comparaciones se realizaron mediante un análisis de varianza de comparación (ANOVA de una vía), seguido de una prueba de Bonferroni. En los casos en que no existía distribución normal y homogeneidad de va-

rianza, se aplicó el método no paramétrico de Kruskal-Wallis y la post-prueba de Dunn. Para evaluar las diferencias de supervivencia, se utilizaron curvas de Kaplan-Meier y se analizaron mediante pruebas de rango logarítmico (Log-rank).

RESULTADOS

Evaluación del efecto antitumoral de la combinación de un anticuerpo anti-CD20 (γ2a-r) y la muteína IL-2 no-alfa

Para evaluar el efecto antitumoral de la combinación de una versión IgG2a de ratón del RTX (anti-CD20[γ2a-r]) con la IL-2 no-alfa los ratones se inocularon con las células tumorales (0 d) y se trataron con el anti-CD20(γ2a-r) (días 1; 4; 7; 10 y 13), como monoterapia, o en combinación con la IL-2 o la IL-2 no-alfa -1 d y 3 d (ver figura 1A). Este protocolo se repitió 3 veces (ver figura 1B). La terapia anti-CD20 indujo una protección de alrededor del 60 % de los animales, lo que está en concordancia con trabajos previos relacionados con la actividad antitumoral de este AcM. ⁽²¹⁾ La supervivencia fue similar entre los ratones tratados solamente con el anti-CD20(γ2a-r) y los que recibieron la terapia combinada del anticuerpo con la IL-2, en correspondencia con estudios anteriores. ⁽²¹⁾ Por el contrario se observó un aumento significativo de la supervivencia de los ratones tratados con el anticuerpo anti-CD20(γ2a-r) y la IL-2 no-alfa. Este grupo de animales tuvo más de un 80 % de protección.

Se evaluó el impacto del uso concomitante en un escenario temprano de la IL-2 o de la muteína IL-2 no-alfa con el anticuerpo anti-CD20(γ2a-r), en el efecto protector de larga duración. Para ello a los animales supervivientes al reto con células EL4- CD 20 h después de los diferentes tratamientos, se les expuso el día 65 al doble del número inicial de células tumorales EL4-CD20h (4 x 10⁵/ratón) (ver figura 1C). Como se observa en la figura 1D, no hubo diferencias en los porcentajes de supervivencia de los grupos tratados con el anticuerpo solo o en combinación con la muteína IL-2 no-alfa. En contraste, el uso de IL-2 afectó la protección a largo plazo (ver figura 1D).

Ratones con esquemas de tratamiento como se describe en la figura 1A se sacrificaron a los 14 d y 21 d de inoculados con las células tumorales, y se evaluaron los infiltrados linfocitarios del bazo, por citometría de flujo. Los ratones tratados con la combinación del anticuerpo anti-CD20(γ2a-r) y la IL-2 no-alfa exhibieron un porcentaje significativamente mayor de células Th1 en comparación con los animales que recibieron el anticuerpo solo o en combinación con la IL-2, en el día 14 (figura 2A). En el día 21 solo el grupo que recibió la combinación del anticuerpo con la IL-2 no-alfa mostró un incremento de la población Th1 signifi-

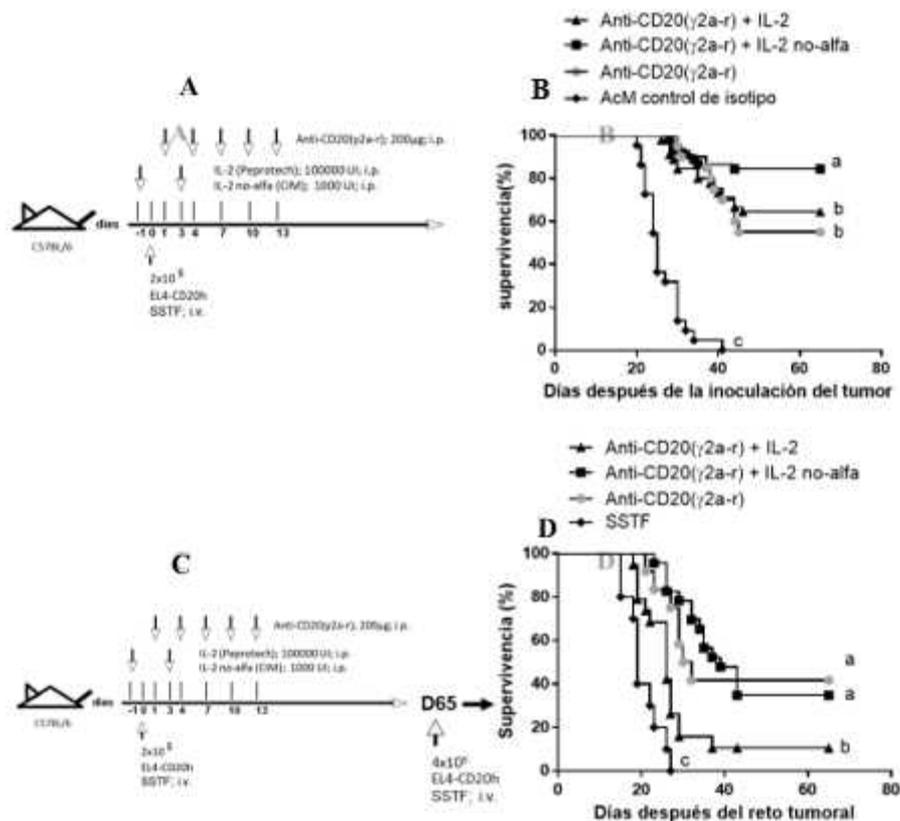


Fig. 1. Efecto antitumoral de la combinación del anticuerpo anti-CD20(γ 2a-r) y la IL-2 no-alfa en el modelo EL4-CD20h-C57BL/6; A-C, diagramas que representan los esquemas de tratamientos; B, gráfico correspondiente a las curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de los animales tratados con el anticuerpo ($n = 21$), anticuerpo + IL-2 ($n = 45$), anticuerpo + IL-2 no-alfa ($n = 45$) o anticuerpo control de isotipo ($n = 21$). El experimento se repitió 3 veces y se muestran los resultados de los 3 experimentos unidos; D, efecto de la muteína IL-2 no-alfa en el efecto protector de larga duración de la terapia con el anticuerpo anti-CD20(γ 2a-r). Como control, ratones vírgenes ($n = 10$) de la misma edad se retaron con 4×10^5 células EL4-CD20h. El experimento se repitió 2 veces y se muestran los resultados de los 2 experimentos unidos. El análisis de supervivencia se realizó mediante la prueba de Log-rank. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

cativamente superior al del grupo tratado con el anticuerpo solo (ver figura 2A). Adicionalmente, la población de células Tregs disminuyó significativamente, tanto en el día 14 como en el 21, en el grupo tratado con la combinación con la muteína IL-2 no-alfa, pero no en los otros 2 grupos (ver figura 2B).

Al tener en cuenta el incremento de la respuesta de Th1 observado en el día 14 se examinó en ese momento la producción de perforina y granzima B por las células T CD8+ y NK1.1+ de bazo. La combinación del anticuerpo anti-CD20(γ 2a-r) y la IL-2 no-alfa fue el único tratamiento que indujo un aumento significativo de subpoblaciones productoras de perforina o granzima B (ver figura 2C y D), lo que indica una potenciación de su capacidad citotóxica. Solo la administración conjunta de la muteína y el anticuerpo anti-CD20(γ 2a-r) mejoró significativamente la producción de granzima B y perforina por las células NK1.1+, en comparación con los que recibieron el anticuerpo y la IL-2 (ver figura

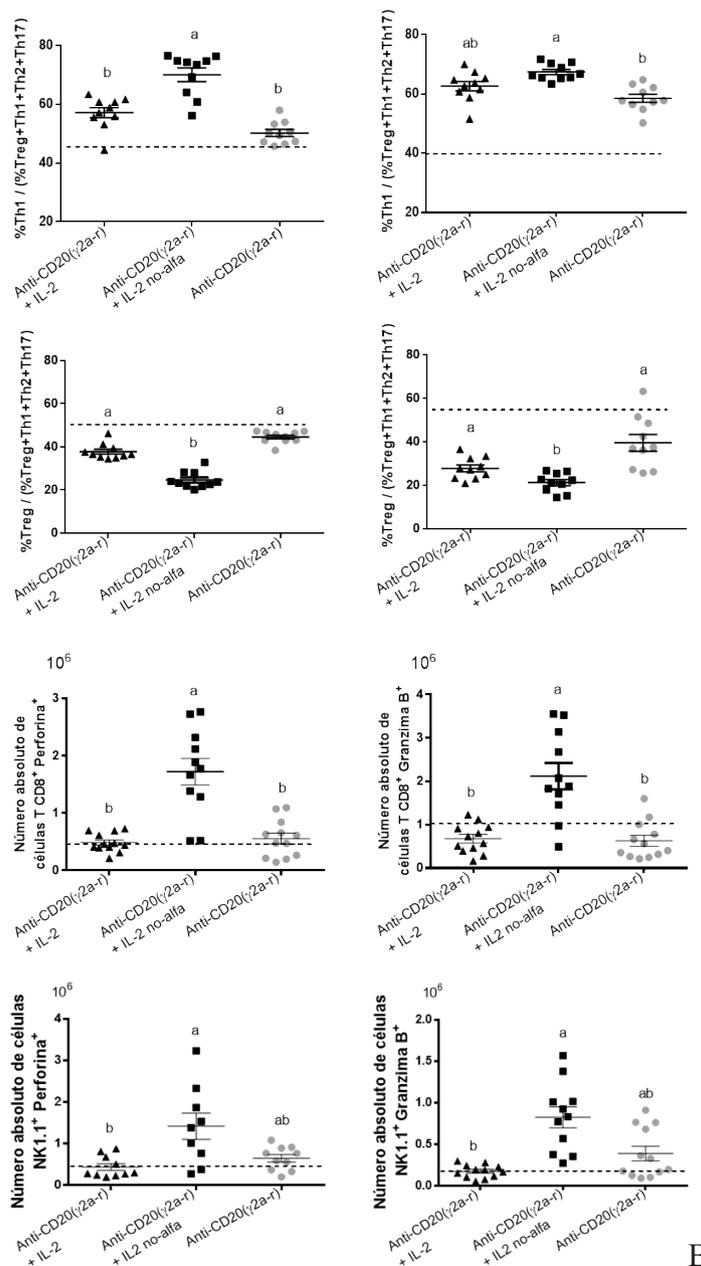
2E y F). Sin embargo, este aumento no fue significativo con respecto a los ratones que recibieron la monoterapia con el anticuerpo (ver figura 2E y F).

Obtención de las IC anti-CD20(γ 2a-r)-IL2 no-alfa y anti-CD20(γ 1h)-IL2 no-alfa

Se diseñaron y generaron las IC trifuncionales, de formato IgG anti-CD20(γ 2a-r)-IL2 no-alfa y anti-CD20(γ 1h)-IL2 no-alfa por tecnología de ADN recombinante, y se demostró su pureza, capacidad de reconocimiento al antígeno CD20 y actividad tipo IL-2 (datos no mostrados).

Efecto antitumoral de la IC anti-CD20(γ 2a-r)-IL2 no-alfa en el modelo EL4-CD20h-C57BL/6

Para evaluar el impacto de la fusión de la muteína IL-2 no-alfa al anticuerpo anti-CD20(γ 2a-r) en su actividad antitumoral, se utilizaron ratones C57BL/6 inoculados con



B

Fig. 2. Efecto de la combinación anticuerpo anti-CD20(γ 2a-r) y muteína IL-2 no-alfa en las subpoblaciones de células T y NK1.1+. Los esplenocitos de ratones tratados según el esquema descrito en la figura 1A se evaluaron por citometría de flujo, en los días 14 y 21. A: Th1(CD3 + CD4+ IFN γ); B, Tregs (CD4+ CD3+ FoxP3+). Th2(CD3+ CD4+ IL4+); (CD3+ CD4+ IL17+). Cada símbolo representa el porcentaje relativo del subconjunto de células respecto al total del compartimento de células T CD4+ (Tregs+Th1+Th2+Th17+) para un ratón individual. Se muestran los resultados de los 2 experimentos unidos; $n = 10$. C-E: los esplenocitos de ratones tratados según el esquema descrito en la figura 1A se evaluaron por citometría de flujo, en el día 14. Números absolutos de células C, T CD8+ que expresan perforina. D, T CD8+ que expresan granzima B. E, NK1.1+ que expresan perforina. F, NK1.1+ que expresan granzima B. Las líneas discontinuas representan los valores medios obtenidos con ratones C57BL/6 tratados con el anticuerpo control de isotipo para la población indicada. Letras distintas indican diferencias significativas en las comparaciones realizadas entre los grupos mediante una ANOVA de una vía (D21-A) o una prueba de Kruskal-Wallis seguidas de las pruebas de Bonferroni ($p < 0,05$) o de Dunn ($p < 0,05$), respectivamente. Las barras horizontales representan la media \pm DEM.

5 x 10⁵ células EL4-CD20h (0 d), según se indican en las figuras 3 A y C. El tratamiento con la IC antiCD20(γ 2a-r)-IL2 no-alfa a bajas dosis (3 administraciones con 20 μ g), fue tan efectivo en el incremento en la supervivencia como el consis-

tente en altas dosis de anti-CD20(γ 2a-r) (5 administraciones con 200 μ g) (ver figura 3B). Sin embargo, a bajas dosis del anticuerpo (16,6 μ g) no se observó actividad antitumoral, aun en combinación con la IL-2 no-alfa (ver figura 3D).

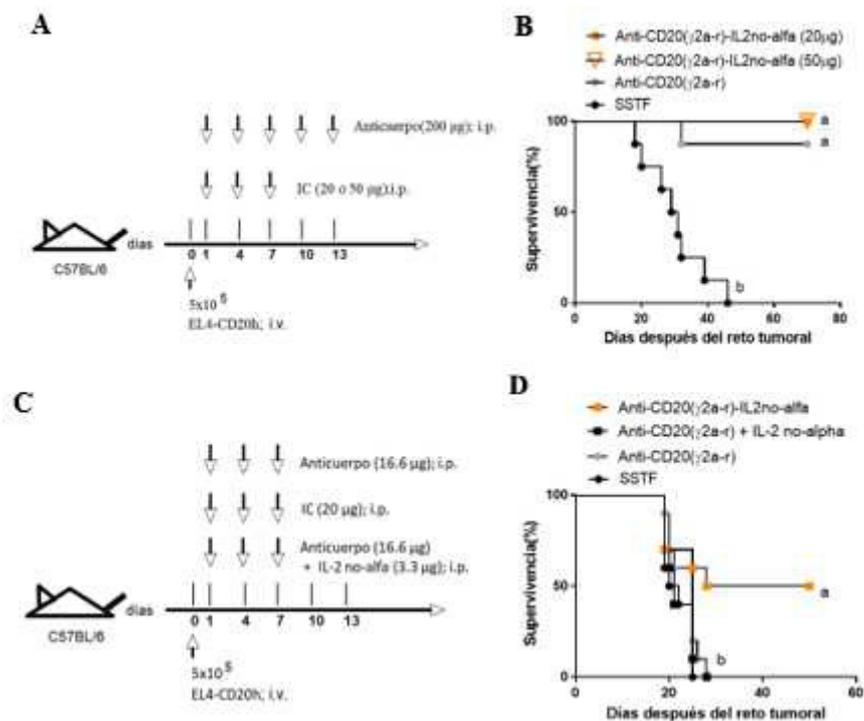


Fig. 3. Efecto antitumoral de la IC anti-CD20(γ2α-r)-IL2 no-alfa en el modelo EL4-CD20h- C57BL/6. A-C, diagramas que representan los esquemas de tratamientos. B-D, gráficos correspondientes a las curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de los animales tratados. B: comparación del efecto terapéutico de la IC anti-CD20(γ2α-r)-IL2 no-alfa (20-50) μg con el anticuerpo parental a altas dosis (200 μg). D: comparación del efecto terapéutico de la IC anti-CD20(γ2α-r)-IL2 no-alfa con el anticuerpo solo o en combinación con la muteína IL-2 no-alfa. El experimento se repitió 3 veces y se muestran los resultados de 1 experimento representativo. El análisis de supervivencia se realizó mediante la prueba de Log-rank. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Funciones efectoras de la IC anti-CD20(γ1h)-IL 2 no-alfa. Inducción de apoptosis

Con el objetivo de analizar si la IC anti-CD20(γ1h)-IL2 no-alfa era capaz de inducir apoptosis en células tumorales, se evaluó la exposición de fosfatidil-serina, que caracteriza etapas tempranas de la apoptosis.⁽⁴⁴⁾ La IC anti-CD20(γ1h)-IL2 no-alfa logró aumentar significativamente el número de células marcadas Anexina V+/IP-, en comparación con los otros 2 tratamientos (figura 4A). Notablemente, con la IL-2 no-alfa unida al anticuerpo en la IC, pero no con la combinación de las 2 moléculas individuales, se obtuvo este efecto.

Efecto citotóxico mediado por células dependiente de anticuerpo

Para determinar la capacidad de la IC de mediar ADCC, se midió la actividad de la enzima LDH liberada por las células diana (Ramos) en presencia de CMSP, como fuente de células efectoras. Este experimento se realizó en una razón CMSP: células diana (10:1). Como se muestra en la figura 4B, la IC anti-CD20(γ1h)-IL2 no-alfa indujo mayor porcentaje de lisis espe-

cífica con respecto al RTX, solo o en combinación con la IL-2 no-alfa. La lisis a 6 nM fue de aproximadamente un 30 % para la IC anti-CD20(γ1h)-IL2 no-alfa, mientras que fue de alrededor del 10 % para la combinación equimolar del anticuerpo y la citocina (ver figura 4B), lo que denota el aporte de la fusión al anticuerpo de la IL-2 no-alfa. No se observó citotoxicidad con la IC control de isotipo (ver figura 4B), lo que demuestra la especificidad antigénica del efecto. De conjunto, los resultados anteriores, indican que la porción Fc de la IC anti-CD20(γ1h)-IL2 no-alfa es funcional y muestra una actividad apoptótica superior a la del RTX.

Activación de células NK por la IC anti-CD20(γ1h)-IL2 no-alfa

Con el propósito de determinar la capacidad de la IC anti-CD20(γ1h)-IL2 no-alfa de activar las células NK, se incubaron células diana (Ramos y CMSP de 3 pacientes de NHL-B) y las CMSP de donantes humanos sanos, como fuente de efectoras, a una razón 1:10, durante 20 h con los diferentes tratamientos. Se conoce que la activación de células NK es un paso crítico para la ADCC, y que esta población es funda-

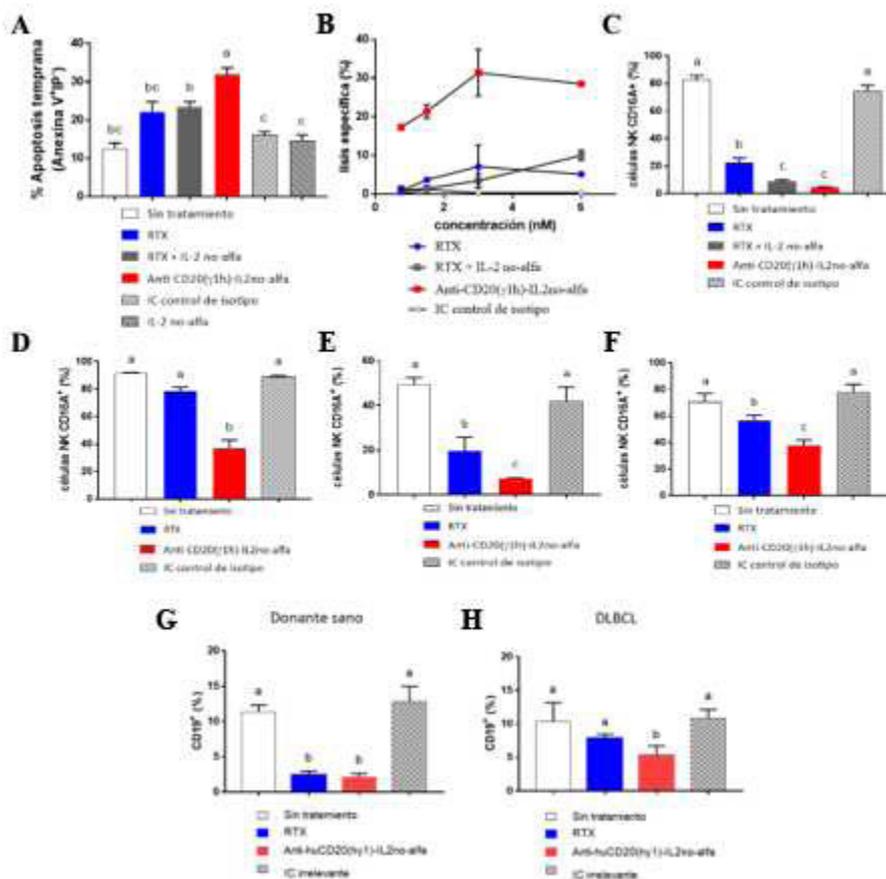


Fig. 4. Funciones efectoras de la IC anti-CD20(γ1h)-IL2 no-alfa; A, representación de la media y DEM de los porcentajes de apoptosis temprana (anexina V⁺/IP⁻) de un experimento representativo de 2 realizados. B: inducción de ADCC por la IC anti-CD20(γ1h)-IL2 no-alfa. C-F, activación de células NK por la IC anti-CD20(γ1h)-IL2 no-alfa. CMSP donantes humanos sanos (utilizadas como fuente de células NK) y células Ramos o CMSP de pacientes con NHL-B utilizadas como células blanco. El marcador de activación CD16A se analizó por citometría de flujo; C, Ramos; D, bajo Grado en recaída; E, leucemia linfocítica crónica; F, DLBCL. Se representan los porcentajes de células positivas dentro de la población NK (CD3-CD56⁺); G-H, Eliminación *in vitro* de linfocitos B de CMSP de un paciente con DLBCL por la IC anti-CD20(γ1h)-IL2 no-alfa. CMSP (3 × 10⁵) de un donante sano y de un paciente con DLBCL (H) se incubaron con la IC anti-CD20(γ1h)-IL2 no-alfa (18 nM) o cantidades equimolares de RTX. Letras distintas indican diferencias significativas en las comparaciones realizadas entre los grupos mediante una prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn ($p < 0,05$)

mental en la actividad antitumoral de la muteína IL-2 no-alfa.^(40,45) Se verificó mayor disminución de la expresión del marcador de superficie CD16 en las células NK coincubadas con las células Ramos con respecto al tratamiento con el RTX (ver figura 4C), lo cual es indicativo de una mayor activación.⁽⁴⁶⁾ No hubo diferencias, sin embargo, al comparar con el tratamiento combinado de RTX e IL-2 no-alfa. En la población de células NK de las muestras de los pacientes tratados con la IC, se observó la mayor disminución de la expresión de este marcador (ver figura 4 D, E y F).

De conjunto, estos resultados demuestran una mayor activación de las células NK en las muestras tratadas con la IC anti-CD20(γ1h)-IL2 no-alfa en comparación con el RTX, lo que pudiera deberse a un efecto potenciador de la IL-2 no-alfa.

Eliminación de células CD19⁺

Finalmente, se estudió su capacidad de eliminar, *in vitro*, células malignas CD19⁺ del paciente con DLBCL, empleando sus CMSP como fuente de células diana y células efectoras. El experimento se realizó también con CMSP de un donante sano. Las CMSP se incubaron con la IC anti-CD20(γ1h)-IL2 no-alfa o el RTX durante 24 h, y el porcentaje de células B en las CMSP se midió por citometría de flujo. Como se muestra en la figura 4G, ambos tratamientos redujeron el porcentaje de células B normales del donante sano. En contraste, solo la IC anti-CD20(γ1h)-IL2 no-alfa disminuyó significativamente la frecuencia de células CD19⁺ de sangre periférica del paciente (ver figura 4H). Este resultado indica la potencialidad del uso de la IC anti-

CD20(γ 1h)-IL2 no-alfa en pacientes cuya resistencia a RTX esté relacionada con una actividad ADCC no óptima.

Actividad antitumoral del tratamiento de la IC anti-CD20(γ 1)-IL-2 no-alfa

Debido a la reactividad cruzada entre los anticuerpos humanos y las células efectoras de ratón, así como de la IL-2 humana y los receptores de IL-2 de ratón, se evaluó la eficacia de la IC anti-CD20(γ 1h)-IL2 no-alfa en un modelo tumoral en ratones inmunocompetentes. ⁽⁴⁷⁾ Ratones C57BL/6 se inocularon por vía intravenosa con 5×10^5 células EL4-CD20h

y posteriormente se trataron con 20 μ g de la IC o 150 μ g de RTX, de probado efecto terapéutico en estudios anteriores (figura 5A). ⁽⁴⁸⁾ Esta dosis de anticuerpo corresponde a la estándar de 375 mg/m² utilizada en la clínica. ⁽⁴⁸⁾ Se observó que una dosis 7,5 veces más baja de la IC que la del RTX, tuvo igual efecto antitumoral que este (ver figura 5B). Posteriormente, se inocularon cantidades equimolares de la IC y el anticuerpo, según el esquema de tratamiento que se describe en la figura 5C. En este caso, el RTX no tuvo efecto antitumoral, a diferencia de la IC anti-CD20(γ 1h)-IL-2 no-alfa (ver figura 5D), que logró proteger hasta el 70 % de los animales.

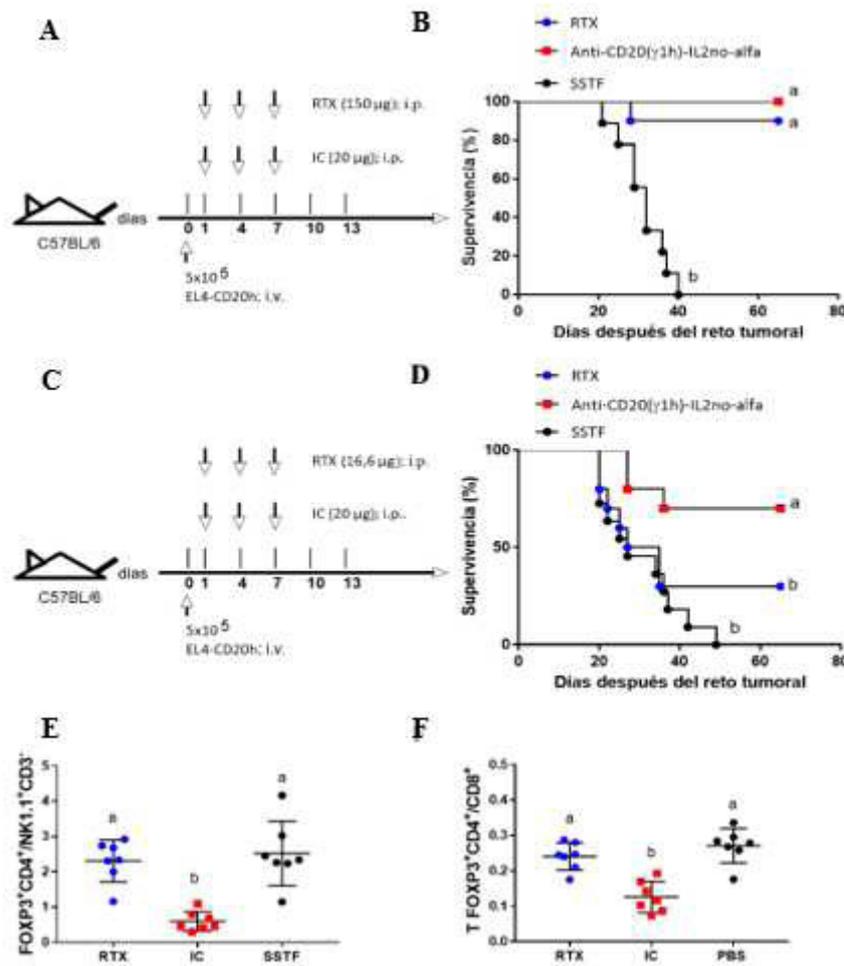


Fig. 5. Efecto antitumoral de la IC anti-CD20(h γ 1)-IL2 no-alfa en el modelo EL4-CD20h-C57BL/6; A-C, diagramas que representan los esquemas de tratamientos; B-D, gráficos correspondientes a las curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de los animales inoculados con los diferentes tratamientos; B, comparación del efecto terapéutico de la IC anti-CD20(h γ 1)-IL2 no-alfa (20 μ g) con el RTX a altas dosis (150 μ g); D, comparación del efecto terapéutico de la IC anti-CD20(h γ 1)-IL-2 no-alfa con cantidades equimolares del RTX. El experimento se repitió 3 veces y se muestran los resultados de 1 experimento representativo. El análisis de supervivencia se realizó mediante la prueba de Log-rank. Letras distintas indican diferencias significativas (p < 0,05). E-F, inmunomodulación inducida por la IC anti-CD20(γ 1h)-IL2 no-alfa en ratones que recibieron los diferentes tratamientos según el esquema de la figura 5 C; pasados 10 días del reto tumoral suspensiones celulares de los bazo se analizaron por citometría de flujo; proporción de células FOXP3+CD4+/CD8+ (E) y FOXP3+ CD4+/NK1.1+ CD3+ (F); las barras horizontales representan la media \pm DEM; letras distintas indican diferencias significativas según una prueba de Dunn de comparación de medias a posteriori (p < 0,05); IC, anti-CD20(h γ 1)-IL2 no-alfa

Para investigar los mecanismos inmunitarios asociados al aumento de la supervivencia de los ratones portadores de tumores tratados con la IC anti-CD20(γ 1h)-IL2 no-alfa, se estudiaron varias poblaciones celulares esplénicas, que se analizaron por citometría de flujo a los 10 días del reto tumoral. Se observó un significativo incremento de células NK1.1+CD3- (ver figura 5E) y T CD8+ (ver figura 5F), que no se verificó para el tratamiento con el RTX. La IC anti-CD20(γ 1h)-IL2 no-alfa favoreció la expansión de células efectoras con respecto a las células Tregs, según indican las razones FOXP3+CD4+/NK1.1+ y FOXP3+CD4+/T CD8+ (ver figura 5G y H). No se observó incremento de la población de células Tregs (ver figura 5I). Estos hallazgos evidencian que la IC anti-CD20(γ 1h)-IL2 no-alfa cambia el equilibrio hacia las células inmunitarias efectoras en lugar de las Tregs, en concordancia con los resultados obtenidos con la combinación de anticuerpo anti-CD20(γ 2a-r) con dosis altas de IL-2 no-alfa.

DISCUSIÓN

En la presente investigación se demuestra que la administración de un anticuerpo anti-CD20, versión IgG2a del RTX, en combinación con la muteína IL-2 no-alfa, pero no con la IL-2 salvaje, aumentó la supervivencia de ratones inmunocompetentes retados con células tumorales EL4-CD20h, con respecto a la de los animales que recibieron solo el anticuerpo. Esta es la primera demostración de que el uso combinado de un anticuerpo anti-CD20 con una variante optimizada de la IL-2, administrados ambos próximos a la implantación tumoral, permite potenciar la actividad antitumoral in vivo del anticuerpo. En este mismo modelo Abes *et. al.* ⁽²¹⁾ no detectaron efecto de la IL-2 sobre la protección de los ratones. Cuando la muteína IL-2 no-alfa se administró sola no tuvo efecto antitumoral (datos no mostrados). Por lo tanto, el impacto observado con la terapia combinada pudiera deberse a la potenciación por la muteína IL-2 no-alfa de los efectores inmunitarios movilizados por el anticuerpo anti-CD20, en adición a mecanismos inducidos directamente por la citocina.

La combinación del anticuerpo y la muteína IL-2 no-alfa indujo una respuesta Th1 más temprana. Además, la combinación con la muteína IL-2 no-alfa previno la expansión de las Tregs en mayor medida que la monoterapia con el anticuerpo o el tratamiento combinado con la IL-2. La manipulación de estas células supresoras se ha convertido en un foco de atención, ya que las Tregs están significativamente aumentadas en la sangre periférica de pacientes con NHL que reciben o no quimioterapia, y se han asociado con un mal pronóstico. ^(19,49,50,51,52)

Se conoce la importancia de la población Th1 en la orquestación de la actividad antitumoral de otros tipos celulares

a través de la secreción de IFN- γ . ^(53,54) Además, la presencia de infiltrados linfocitarios Th1 en el tumor correlaciona con el éxito de la terapia con el RTX y la quimioterapia en pacientes y en modelos preclínicos. ^(55,56)

Los resultados muestran que el uso de la muteína IL-2 no-alfa en el tratamiento combinado estimula la activación de las células T CD8+ y NK 1.1, como lo indica su capacidad lítica mejorada, representada por el incremento del número de células productoras de perforina y granzima B. Estas moléculas se consideran marcadores del estado funcional de estos linfocitos. ^(57,58) Esta activación pudiera ser consecuencia de la acción directa de la muteína IL-2 no-alfa sobre esta población o al patrón Th1 favorecido por la combinación. ^(53,59)

La inyección de la muteína IL-2 no-alfa al comienzo del tratamiento mantuvo, pero no mejoró, la protección a largo plazo conferida por el anticuerpo anti-CD20, cuando los animales supervivientes se expusieron nuevamente a un reto con una carga superior de células tumorales. En contraste, el tratamiento combinado con la IL-2 salvaje impactó desfavorablemente en la supervivencia de los ratones en comparación con los animales que recibieron exclusivamente el anticuerpo.

Todas estas evidencias constituyen argumentos a favor de la posibilidad del uso de la muteína IL-2 no-alfa en la clínica para aumentar el número de pacientes que responden al tratamiento con R-CHOP en primera línea de terapia. Por otra parte, las citocinas como la IL-2 y la IL-2 no-alfa (datos no publicados), se caracterizan por un t 1/2 corto, lo cual obliga a utilizar dosis altas y repetidas. ⁽²²⁻²⁴⁾ Una de las soluciones prácticas para localizar altas concentraciones de la citocina en el microambiente tumoral, es el uso de IC, consistentes en la fusión de una citocina a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. ^(25,26)

En la presente investigación se describe la evaluación de la actividad antitumoral in vivo de la IC anti-CD20(γ 2a-r)-IL2 no-alfa, en el modelo tumoral EL4-CD20h-C56BL/6. De esta manera se evaluó además, el impacto de la colocalización en el sitio tumoral de las propiedades efectoras del anticuerpo y la modulación específica de la muteína IL-2 no-alfa. Esta IC es una molécula trifuncional, en contraste con otras IC con IL-2 no-alfa descritas en la literatura. ^(32,36,39) En los últimos 6 años, se han diseñado otras IC con variantes no-alfa de la IL-2 para expandir preferentemente células efectoras inmunitarias; reducir los efectos secundarios tóxicos de la IL-2 salvaje; y mejorar las propiedades farmacocinéticas, lo que demuestra la actualidad del tema abordado en este trabajo. ^(32,36,39) A diferencia de estas IC, la diseñada en esta investigación es un formato de inmunoglobulina simétrica, bivalente también con respecto a la citocina, y con una región Fc funcional. El poder de inmunomodulación evaluado para IC que

tienen 2 moléculas de IL-2, en lugar de una, es superior. ⁽⁶⁰⁾ Esta es además la primera descripción de una IC anti-CD20 basada en una IL-2 no-alfa.

El tratamiento con la IC anti-CD20(γ 2a-r)-IL2 no-alfa a bajas dosis, fue tan efectivo en el incremento en la supervivencia como el consistente en altas dosis del anticuerpo anti-CD20(γ 2a-r). Sin embargo, la administración del anticuerpo solo o en combinación con la IL-2 no-alfa en cantidades equimolares, no tuvo efecto antitumoral. Gillies *et al.* ⁽⁶¹⁾ describieron una potenciación de la actividad antitumoral del anticuerpo con la IC basada en un anticuerpo anti-CD20 y la IL-2 salvaje (DI-Leu16-IL2). Esta superioridad antitumoral, sustentó el diseño de su versión con regiones constantes humanas con vistas a una posible nueva terapia.

La inducción directa de apoptosis contribuye al efecto antitumoral del RTX. ⁽⁶²⁾ En esta investigación se determinó la exposición de fosfatidilserina en la monocapa externa de la membrana plasmática de células Ramos tratadas con la IC anti-CD20(γ 1h)-IL2 no-alfa, como un indicador de apoptosis temprana. ⁽⁴⁴⁾ Sorprendentemente, la IC anti-CD20(γ 1h)-IL2 no-alfa indujo niveles más altos de exposición de este fosfolípido que el RTX. La fusión de la muteína IL-2 no-alfa fue esencial para este efecto, ya que la combinación del RTX y de la muteína IL-2 no-alfa fue menos eficaz que la IC. Los linfocitos B normales y las células Ramos se caracterizan por la expresión baja del RIL-2 β gc. ^(63,64) Son necesarios experimentos adicionales para dilucidar el mecanismo molecular que explique la diferencia entre la IC y el RTX en este efecto y que valoren si este incremento es biológicamente relevante.

La ADCC es uno de los mecanismos efectores más importantes de muchos anticuerpos terapéuticos. ⁽⁶⁵⁾ Por otra parte, Cartron *et al.* ⁽⁶⁶⁾ describieron una estrecha relación entre la acción del RTX y el polimorfismo genético del Fc γ RIII, presente en las células NK y en los monocitos.

La muteína IL-2 no-alfa activa las células NK, que ejercen ADCC a través de la participación del Fc γ RIIIa (CD16a). ^(40,45) La IC anti-CD20(γ 1h)-IL2 no-alfa mostró, *in vitro*, mayor capacidad de inducir ADCC que el RTX. Este efecto fue incluso mayor que la combinación del RTX y la IL-2 no-alfa, lo que indica una ventaja de la fusión de la citocina al anticuerpo. Esta ADCC mejorada es notablemente importante, ya que este mecanismo es considerado actualmente como el dominante para la eficacia de los anticuerpos anti-CD20 en los tratamientos de los NHL. ^(67,68,69)

La IC anti-CD20(γ 1h)-IL2 no-alfa aumentó la activación de las células NK coincubadas con células de linfoma de Burkitt humano y CMSP de pacientes con linfoma de células B de bajo grado refractarias, LLC o DLBCL, como lo demostró la disminución de CD16. Además, la activación de las células NK

estuvo en correspondencia con la capacidad de la IC de eliminar células B de un paciente con DLBCL, a diferencia del RTX. Este resultado sugiere que la IC pudiera compensar las limitaciones encontradas cuando se utiliza el RTX, como el polimorfismo del Fc γ RIII (CD16), su baja expresión, las interacciones inhibitorias KIR/HLA, la disminución de la presentación de la molécula CD20, entre otras. ^(70,71)

En el efecto citotóxico superior de la IC anti-CD20(γ 1h)-IL2 no-alfa sobre CMSP del paciente de DLBCL pudiera contribuir la ADCC potenciada por la porción IL-2 no-alfa de la IC, el incremento de la apoptosis, la activación de las células NK, y también la acción directa de esta población celular sobre las células tumorales mediada por RIL-2 y no por el Fc γ RIII. ⁽⁷²⁾ Esta ventaja potencial de la IC sobre el RTX debe confirmarse en un grupo más grande de muestras de pacientes.

Con respecto a la actividad *in vivo* una dosis baja de la IC anti-CD20(γ 1h)-IL2 no-alfa, a diferencia del RTX, aumentó significativamente la supervivencia de los ratones retados con células EL4-CD20h. Este efecto terapéutico pudiera estar relacionado con la inmunomodulación inducida por la IC, caracterizada por el aumento de las células NK y T CD8+, pero no de las células Tregs. En el año 2022, Carmentate *et al.* ⁽⁴¹⁾ observaron en modelos resistentes al tratamiento con la IL-2, un incremento de la razón CD8+/Tregs en ratones donde la muteína IL-2 no-alfa tuvo una actividad antitumoral potente.

La potenciación del efecto antitumoral de anticuerpos anti-CD20 mediante el uso de las IC anti-CD20 (γ 2a)-IL2 no-alfa y anti-CD20(γ 1h)-IL2 no-alfa sugiere que la localización simultánea de las funciones efectoras de anticuerpos capaces de inducir ADCC y de la acción inmunomoduladora de la muteína IL-2 no alfa, mediante la generación de IC con el formato descrito en este trabajo, pudiera ser una aproximación terapéutica contra el cáncer.

Conclusiones

En resumen, en este trabajo se describen 2 formas novedosas en que la muteína IL-2 no alfa pudiera potenciar la terapia anti-CD20 basada en RTX; una, a través de la combinación, y otra, a través de su fusión al anticuerpo. La IC basada en la IL-2 no-alfa generada es primera de su tipo en el mundo. Estas estrategias pudieran tener un potencial beneficio terapéutico en la terapia de primera línea en la clínica, y la IC, en particular, pudiera ser útil para aquellos pacientes cuya resistencia al RTX esté relacionada con una inducción fallida de apoptosis o una actividad ADCC no óptima.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Salud Pública. Anuario Estadístico de Cuba 2020. La Habana: MINSAP: Dirección Nacional de Registros Médicos y Esta-

- dísticas de Salud; 2021 [citado 19 ago 2022]. Disponible en: <https://salud.msp.gob.cu/wp-content/Anuario/Anuario-2020.pdf>
2. Thandra KC, Barsouk A, Saginala K *et al.* Epidemiology of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Med Sci (Basel)*. 2021 ene 30;9(1):5. DOI: 10.3390/medsci9010005.
 3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 may;71(3):209-49. DOI: 10.3322/caac.21660.
 4. Zhou X, Hu W, Qin X. The role of complement in the mechanism of action of rituximab for B-cell lymphoma: implications for therapy. *Oncologist*. 2008 sep;13(9):954-66. DOI: 10.1634/theoncologist.2008-0089.
 5. Cartron G, Watier H, Golay J *et al.* From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*. 2004 nov 1;104(9):2635-42. DOI: 10.1182/blood-2004-03-1110.
 6. Nowakowski GS, Blum KA, Kahl BS *et al.* Beyond RCHOP: A Blueprint for Diffuse Large B Cell Lymphoma Research. *J Natl Cancer Inst*. 2016 dic 16;108(12):djw257. DOI: 10.1093/jnci/djw257.
 7. Kohrt HE, Houot R, Marabelle A *et al.* Combination strategies to enhance antitumor ADCC. *Immunotherapy*. 2012 may;4(5):511-27. DOI: 10.2217/imt.12.38.
 8. Ochoa MC, Minute L, Rodriguez I *et al.* Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunol Cell Biol*. 2017 abr;95(4):347-55. DOI: 10.1038/icb.2017.6.
 9. Zhang J, Zhong M, Zhong W *et al.* Construction of tandem diabody (IL-6/CD20)-secreting human umbilical cord mesenchymal stem cells and its experimental treatment on diffuse large B cell lymphoma. *Stem Cell Res Ther*. 2022 sep 14;13(1):473. DOI: 10.1186/s13287-022-03169-4.
 10. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*. 1976 sep 10;193(4257):1007-8. DOI: 10.1126/science.181845.
 11. Hank JA, Weil-Hillman G, Surfus JE *et al.* Addition of interleukin-2 *in vitro* augments detection of lymphokine-activated killer activity generated *in vivo*. *Cancer Immunol Immunother*. 1990;31(1):53-9. DOI: 10.1007/BF01742496.
 12. Farag SS, VanDeusen JB, Fehniger TA *et al.* Biology and clinical impact of human natural killer cells. *Int J Hematol*. 2003 jul;78(1):7-17. DOI: 10.1007/BF02983234.
 13. Hooijberg E, Sein JJ, van den Berk PC *et al.* Eradication of large human B cell tumors in nude mice with unconjugated CD20 monoclonal antibodies and interleukin 2. *Cancer Res*. 1995 jun 15;55(12):2627-34.
 14. Eisenbeis CF, Grainger A, Fischer B *et al.* Combination immunotherapy of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with rituximab and interleukin-2: a preclinical and phase I study. *Clin Cancer Res*. 2004 sep 15;10(18 Pt 1):6101-10. DOI: 10.1158/1078-0432.
 15. Gluck WL, Hurst D, Yuen A *et al.* Phase I studies of interleukin (IL)-2 and rituximab in B-cell non-hodgkin's lymphoma: IL-2 mediated natural killer cell expansion correlations with clinical response. *Clin Cancer Res*. 2004 abr 1;10(7):2253-64. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-1087-3
 16. Khan KD, Emmanouilides C, Benson DM Jr *et al.* A phase 2 study of rituximab in combination with recombinant interleukin-2 for rituximab-refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2006 dic 1;12(23):7046-53. DOI: 10.1158/1078-0432.
 17. Bachanova V, Burns LJ, McKenna DH *et al.* Allogeneic natural killer cells for refractory lymphoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 nov;59(11):1739-44. DOI: 10.1007/s00262-010-0896-z.
 18. Yu A, Snowwhite I, Vendrame F *et al.* Selective IL-2 responsiveness of regulatory T cells through multiple intrinsic mechanisms supports the use of low-dose IL-2 therapy in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2015 jun;64(6):2172-83. DOI: 10.2337/db14-1322.
 19. Shin HJ, Kim DY, Chung J *et al.* Prognostic Impact of Peripheral Blood T-Cell Subsets at the Time of Diagnosis on Survival in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Acta Haematol*. 2021;144(4):427-437. DOI: 10.1159/000510912.
 20. Sumransub N, Cao Q, Wangen R *et al.* High Proliferating Regulatory T Cells Post-Transplantation Are Associated with Poor Survival in Lymphoma Patients Treated with Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transplant Cell Ther*. 2022 abr;28(4):184.e1-184.e8. DOI: 10.1016/j.jctc.2022.01.016.
 21. Abès R, Gélizé E, Fridman WH *et al.* Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. *Blood*. 2010 ago 12;116(6):926-34. DOI: 10.1182/blood-2009-10-248609.
 22. Donohue JH, Rosenberg SA. The fate of interleukin-2 after *in vivo* administration. *J Immunol*. 1983 may;130(5):2203-8.
 23. Bessard A, Solé V, Bouchaud G *et al.* High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (IL-15)-IL-15 receptor alpha fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer. *Mol Cancer Ther*. 2009 sep;8(9):2736-45. DOI: 10.1158/1535-7163.
 24. Cesana GC, DeRaffele G, Cohen S *et al.* Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006 mar 1;24(7):1169-77. DOI: 10.1200/JCO.2005.03.6830.
 25. Jiang T, Zhou C, Ren S. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2016 abr 25;5(6):e1163462. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1163462.
 26. Pretto F, Elia G, Castioni N *et al.* Preclinical evaluation of IL2-based immunocytokines supports their use in combination with dacarbazine, paclitaxel and TNF-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2014 sep;63(9):901-10. DOI: 10.1007/s00262-014-1562-7.
 27. Kaufman HL, Wong MK, Daniels GA *et al.* The Use of Registries to Improve Cancer Treatment: A National Database for Patients Treated with Interleukin-2 (IL-2). *J Pers Med*. 2014 mar 7;4(1):52-64. DOI: 10.3390/jpm4010052.
 28. Danielli R, Patuzzo R, Ruffini PA *et al.* Armed antibodies for cancer treatment: a promising tool in a changing era. *Cancer Immunol Immunother*. 2015 ene;64(1):113-21. DOI: 10.1007/s00262-014-1621-0.
 29. Lansigan F, Nakamura R, Quick D *et al.* IL-2, an anti-CD20-Interleukin-2 immunocytokine, is safe and active in patients with relapsed and refractory b-cell lymphoma: A report of maximum tolerated dose, optimal biologic dose, and recommended phase 2 dose. *Blood*. 2016 dic; 128(22):620. DOI:10.1182/blood.V128.22.620.620.
 30. Panelli MC, White R, Foster M *et al.* Forecasting the cytokine storm following systemic interleukin (IL)-2 administration. *J Transl Med*. 2004 jun 2;2(1):17. DOI: 10.1186/1479-5876-2-17.
 31. Skrombolas D, Frelinger JG. Challenges and developing solutions for increasing the benefits of IL-2 treatment in tumor

- therapy. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014 feb;10(2):207-17. DOI: 10.1586/17446666X.2014.875856.
32. Klein C, Waldhauer I, Nicolini VG *et al*. Cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), a CEA-targeted IL-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: Overcoming limitations of aldesleukin and conventional IL-2-based immunocytokines. *Oncoimmunology*. 2017 ene 11;6(3):e1277306. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1277306.
33. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood*. 2006 mar 15;107(6):2409-14. DOI: 10.1182/blood-2005-06-2399.
34. Jensen HK, Donskov F, Nordsmark M *et al*. Increased intratumoral FOXP3-positive regulatory immune cells during interleukin-2 treatment in metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009 feb 1;15(3):1052-8. DOI: 10.1158/1078-0432.
35. Sim GC, Martin-Orozco N, Jin L *et al*. IL-2 therapy promotes suppressive ICOS+ Treg expansion in melanoma patients. *J Clin Invest*. 2014 ene;124(1):99-110. DOI: 10.1172/JCI46266.
36. Waldhauer I, Gonzalez-Nicolini V, Freimoser-Grundschober A *et al*. Simlukafusp alfa (FAP-IL2v) immunocytokine is a versatile combination partner for cancer immunotherapy. *MAbs*. 2021 ene-dic;13(1):1913791. DOI: 10.1080/19420862.2021.1913791.
37. Runbeck E, Crescioli S, Karagiannis SN *et al*. Utilizing Immunocytokines for Cancer Therapy. *Antibodies (Basel)*. 2021 mar 9;10(1):10. DOI: 10.3390/antib10010010.
38. Mullard A. Engineered IL-2 cytokine takes pivotal immuno-oncology blow. *Nat Rev Drug Discov*. 2022 may;21(5):327. DOI: 10.1038/d41573-022-00069-3.
39. Codarri Deak L, Nicolini V, Hashimoto M *et al*. PD-1-cis IL-2R agonism yields better effectors from stem-like CD8+ T cells. *Nature*. 2022 oct;610(7930):161-72. DOI: 10.1038/s41586-022-05192-0.
40. Carmenate T, Pacios A, Enamorado M *et al*. Human IL-2 mutein with higher antitumor efficacy than wild type IL-2. *J Immunol*. 2013 Jun 15;190(12):6230-8. DOI: 10.4049/jimmunol.1201895.
41. Carmenate T, Montalvo G, Lozada SL *et al*. The antitumor effect induced by an IL-2 'no-alpha' mutein depends on changes in the CD8+ T lymphocyte/Treg cell balance. *Front Immunol*. 2022 ago 17;13:974188. DOI: 10.3389/fimmu.2022.974188.
42. Mateo C, Moreno E, Amour K *et al*. Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the epidermal growth factor receptor: recovery of antagonistic activity. *Immunotechnology*. 1997 mar;3(1):71-81. DOI: 10.1016/s1380-2933(97)00065-1.
43. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 ago 15;227(5259):680-5. DOI: 10.1038/227680a0.
44. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA *et al*. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994 sep 1;84(5):1415-20.
45. Vivier E, Tomasello E, Baratin M *et al*. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008 may;9(5):503-10. DOI: 10.1038/ni1582.
46. Bowles JA, Weiner GJ. CD16 polymorphisms and NK activation induced by monoclonal antibody-coated target cells. *J Immunol Methods*. 2005 sep;304(1-2):88-99. DOI: 10.1016/j.jim.2005.06.018.
47. Arenas-Ramirez N, Woytschak J, Boyman O. Interleukin-2: Biology, Design and Application. *Trends Immunol*. 2015 dic;36(12):763-77. DOI: 10.1016/j.it.2015.10.003.
48. Di Gaetano N, Cittera E, Nota R *et al*. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol*. 2003 ago 1;171(3):1581-7. DOI: 10.4049/jimmunol.171.3.1581.
49. Shi YX, Zhang XS, Liu DG *et al*. [CD4+CD25+T regulatory cells in peripheral blood of B-NHL patients with or without chemotherapy]. *Ai Zheng*. 2004 may;23(5):597-601.
50. D'Arena G, Vitale C, Coscia M *et al*. Regulatory T Cells and Their Prognostic Relevance in Hematologic Malignancies. *J Immunol Res*. 2017;2017:1832968. DOI: 10.1155/2017/1832968.
51. Balsas P, Veloz L, Clot G *et al*. SOX11, CD70, and Treg cells configure the tumor-immune microenvironment of aggressive mantle cell lymphoma. *Blood*. 2021 Dec 2;138(22):2202-15. DOI: 10.1182/blood.2020010527.
52. Jiménez-Cortegana C, Palazón-Carrión N, Martín García-Sancho A *et al*. Circulating myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells as immunological biomarkers in refractory/relapsed diffuse large B-cell lymphoma: translational results from the R2-GDP-GOTEL trial. *J Immunother Cancer*. 2021 jun;9(6):e002323. DOI: 10.1136/jitc-2020-002323.
53. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*. 2010;28:445-89. DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101212.
54. Aune TM, Collins PL, Chang S. Epigenetics and T helper 1 differentiation. *Immunology*. 2009 mar;126(3):299-305. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.03026.
55. Haabeth OA, Lørvik KB, Hammarström C *et al*. Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nat Commun*. 2011;2:240. DOI: 10.1038/ncomms1239.
56. Ding ZC, Huang L, Blazar BR *et al*. Polyfunctional CD4^{hi} T cells are essential for eradicating advanced B-cell lymphoma after chemotherapy. *Blood*. 2012 sep 13;120(11):2229-39. DOI: 10.1182/blood-2011-12-398321.
57. Smith HA, McNeel DG. The SSX family of cancer-testis antigens as target proteins for tumor therapy. *Clin Dev Immunol*. 2010; 2010:150591. DOI: 10.1155/2010/150591.
58. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. 2011 oct;23(5):598-604. DOI: 10.1016/j.coi.2011.08.003.
59. Janeway CA Jr. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 jun 19;98(13):7461-8. DOI: 10.1073/pnas.131202998.
60. Gout DY, Groen LS, van Egmond M. The present and future of immunocytokines for cancer treatment. *Cell Mol Life Sci*. 2022 sept 6;79(10):509. DOI: 10.1007/s00018-022-04514-9.
61. Gillies SD, Lan Y, Williams S *et al*. An anti-CD20-IL-2 immunocytokine is highly efficacious in a SCID mouse model of established human B lymphoma. *Blood*. 2005 May 15;105(10):3972-8. DOI: 10.1182/blood-2004-09-3533.
62. Pierpont TM, Limper CB, Richards KL. Past, Present, and Future of Rituximab-The World's First Oncology Monoclonal Antibody Therapy. *Front Oncol*. 2018 jun 4;8:163. DOI: 10.3389/fonc.2018.00163.
63. Zola H, Weedon H, Thompson GR *et al*. Expression of IL-2 receptor p55 and p75 chains by human B lymphocytes: effects of activation and differentiation. *Immunology*. 1991 feb;72(2):167-73.
64. Tanaka T, Saiki O, Doi S *et al*. Expression of novel interleukin 2 binding molecules and their functional roles in human B cell di-

- fferentiation. *J Clin Invest*. 1988 jul;82(1):316-21. DOI: 10.1172/JC1113589.
65. Lin MZ, Teitell MA, Schiller GJ. The evolution of antibodies into versatile tumor-targeting agents. *Clin Cancer Res*. 2005 ene 1;11(1):129-38.
66. Cartron G, Dacheux L, Salles G *et al*. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*. 2002 feb 1;99(3):754-8. DOI: 10.1182/blood.v99.3.754.
67. Clynes RA, Towers TL, Presta LG *et al*. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000 abr;6(4):443-6. DOI: 10.1038/74704.
68. Boross P, Jansen JH, de Hajj S *et al*. The in vivo mechanism of action of CD20 monoclonal antibodies depends on local tumor burden. *Haematologica*. 2011 dic;96(12):1822-30. DOI: 10.3324/haematol.2011.047159.
69. Decaup E, Rossi C, Gravelle P *et al*. A Tridimensional Model for NK Cell-Mediated ADCC of Follicular Lymphoma. *Front Immunol*. 2019 ago 14;10:1943. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01943.
70. Freeman CL, Sehn LH. A tale of two antibodies: obinutuzumab versus rituximab. *Br J Haematol*. 2018 jul;182(1):29-45. DOI: 10.1111/bjh.15232.
71. Kusowska A, Kubacz M, Krawczyk M *et al*. Molecular Aspects of Resistance to Immunotherapies-Advances in Understanding and Management of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Int J Mol Sci*. 2022 ene 28;23(3):1501. DOI: 10.3390/ijms23031501.
72. Gubbels JA, Gadbow B, Buhtoiarov IN *et al*. Ab-IL2 fusion proteins mediate NK cell immune synapse formation by polarizing CD25 to the target cell-effector cell interface. *Cancer Immunol Immunother*. 2011 dic;60(12):1789-800. DOI: 10.1007/s00262-011-1072-9.

Recibido: 2/02/2024

Aprobado: 2/08/2024

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses entre ellos, ni con la investigación presentada.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Ana Victoria Casadesús Pazos, Jean-Luc Teillaud, Kalet León, Tays Hernández García

Curación de datos: Ana Victoria Casadesús Pazos

Investigación: Ana Victoria Casadesús Pazos, Katya Sosa

Administración del proyecto: Tays Hernández Gracia

Redacción-borrador original: Ana Victoria Casadesús Pazos

Redacción-revisión y edición: Ana Victoria Casadesús Pazos, Tays Hernández

Financiamientos

Este trabajo fue financiado por el Centro de Inmunología Molecular.

Cómo citar este artículo

Casadesús AV, Teillaud JL, Sosa K, León K y Hernández T. Efecto potenciador de la muteína IL-2 no-alfa en la actividad antitumoral de la terapia anti-CD20. *An Acad Cienc Cuba* [internet] 2024 [citado en día, mes y año];14(3):e1639. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1639>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).[®] Los autores, 2024.

