

**UNA VARIANTE MODIFICADA DE LA INTERLEUCINA-15 HUMANA, COMO ANTÍGENO NOVEDOSO PARA LA INMUNOTERAPIA ACTIVA EN LA ARTRITIS REUMATOIDE**

**ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL:** Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

**AUTORES PRINCIPALES:** Yunier Rodríguez Álvarez, Alicia Santos Savio, Yanelys Morera Díaz, Haydee Gerónimo Pérez, Jorge Castro Velazco, Rafael Martínez Castillo, Pedro Puente Pérez y Celia Aurora Arrieta Agüero.

**OTROS AUTORES:** Ricardo Silva Rodríguez, Alejandro Moro Soria, Silvio Ernesto Perea Rodríguez, Klaudia Martínez Cordovez, Yassel Ramos Gómez, Vladimir Besada Pérez, Alexey Llopiz Arzuaga, Eugenio Hardy Rando, Mariela Vázquez Castillo y Gerardo Enrique Guillén Nieto.

**FILIACIÓN:** Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), La Habana.

**COLABORADORES:** Joel Ferrero Bibilonia, José García Suárez, Gerardo García Illera, Yaima Martínez Prieto, Armando Alexey Rodríguez Alfonso, Sonia González Blanco, Karelía Cosme Díaz, Lizet Aldana Velazco, Sara Aymer Clark, Rocío Garateix Suárez, Dayana Labrada Moreno, Alberto Tamayo González, Maribel Mendoza Zayas, Joaquín González Amador, Freya Freyre Almeida, Yahima Chacón Quintero, Victoria María Lugo Hernández, José Ángel Silva Guirado, Regla Estrada Vázquez, María de los A. Fernández Rodríguez, Isela M. García Tamayo, Maydee Núñez Yaugel, Yanet García Aguirre, Caridad González Molina, María de J. Leal Angulo, Blanca R. González Mendoza y Julio Alfonso Navarro.

**AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:**

MSc. Yunier Rodríguez Álvarez

Proyecto Interleucina-15. Departamento de Farmacéuticos.

Investigaciones Biomédicas. CIGB.

Ave 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana 10600, POB 6162.

Teléfono: 72504486; Fax: 271 4764.

E-mail: [yunier.rodriguez@cigb.edu.cu](mailto:yunier.rodriguez@cigb.edu.cu)

## **RESUMEN**

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica, para la cual no existe una terapia efectiva. Nuestro proyecto centra su investigación en el diseño de nuevas estrategias para inhibir la actividad pro-inflamatoria de la IL-15, citocina crucial en la patogénesis de la AR. En el año 2012 obtuvimos un premio de la ACC que abarcó la identificación de un péptido que inhibe los efectos biológicos de esta citocina. El trabajo actual se centra en un novedoso candidato terapéutico basado en una variante modificada de la proteína IL-15 como antígeno; que constituye el primer reporte del uso de la inmunoterapia activa, basado en esta citocina, para el tratamiento de la AR. Esta estrategia presenta ventajas con respecto al uso de anticuerpos monoclonales mediante inmunoterapia pasiva; en cuanto a que requiere una menor dosis, disminuye la frecuencia de administraciones y no tiene lugar la respuesta anti-fármaco, causa principal de la resistencia al tratamiento con los biológicos actuales.

En este trabajo se obtiene, por primera vez, una variante modificada de la IL-15 que expone una conformación de los puentes disulfuros diferente a la citocina natural, lo que favorece el desarrollo de una respuesta inmune contra este antígeno. Se demuestra que la inmunización con esta variante genera una potente respuesta de anticuerpos policlonales en primates no humanos, un modelo donde la IL-15 de la especie comparte un 97% de identidad aminoacídica con la IL-15 humana. Estos resultados demuestran, por primera vez, la ruptura de la tolerancia inmunológica hacia este antígeno propio. Además, resulta particularmente novedoso que estos anticuerpos neutralizan la actividad biológica de la IL-15 sin afectar la actividad de la IL-2, elementos que indican la especificidad de los anticuerpos por la IL-15 autóloga. Se demuestra que la inmunización con la citocina en hidróxido de aluminio genera una respuesta de anticuerpos regulada por la vacunación. Este resultado es muy importante para la aplicación de la vacuna en enfermedades, como la AR, que se caracterizan por etapas de actividad y remisión. El trabajo aporta, además, los primeros elementos de seguridad del candidato vacunal en monos *Macaca fascicularis*. Esta especie constituye un modelo robusto para la prueba de concepto de la vacuna anti-IL-15, lo que está sustentado por la demostración, en esta investigación, del efecto neutralizante de los sueros generados por la vacunación sobre la actividad biológica de la IL-15 de simio. Estos resultados permitieron el avance de la vacuna anti-IL-15 hacia la fase de Desarrollo Tecnológico y formarán parte del expediente que se presentará al CECMED con vistas al primer ensayo clínico con esta vacuna.

Los resultados obtenidos han sido objeto de 4 publicaciones internacionales en revistas arbitradas, 1 patente concedida en Europa, China y EU, 2 Logros del CIGB (1 científico-técnico y 1 institucional), además de 6 reconocimientos en eventos científicos nacionales e internacionales.

## **COMUNICACIÓN CORTA DE DESCRIPCIÓN DEL RESULTADO**

### **Introducción**

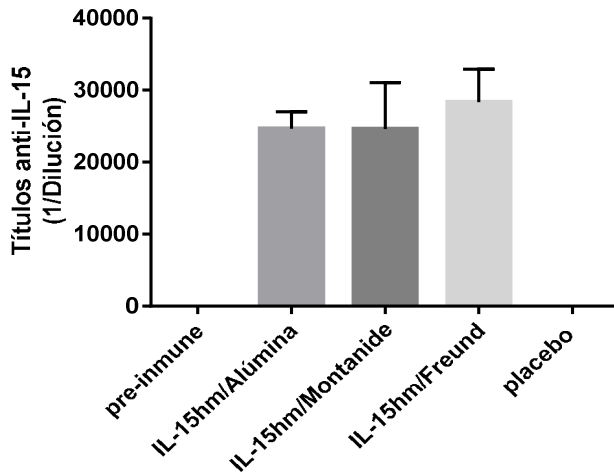
La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta al 1% de la población mundial (Wollheim, 2000). Desde el punto de vista molecular se produce un desbalance en la producción de citocinas anti-

inflamatorias y pro-inflamatorias, encontrándose estas últimas en niveles elevados en el fluido sinovial y el suero de los pacientes. Evidencias experimentales han demostrado que muchas de estas citocinas participan en la patogénesis y el desarrollo de la enfermedad, entre ellas el TNF- $\alpha$ , citocina validada en la práctica clínica (Raza *et al.*, 2005). Si bien el uso de los antagonistas del TNF- $\alpha$  ha resultado en un gran beneficio clínico, se describe que el 50% de los pacientes no responden al tratamiento; de ahí la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. La Interleucina (IL)-15 es una citocina pro-inflamatoria que desempeña un papel crucial en la patogénesis de la AR. Investigaciones precedentes han descrito elevados niveles de la IL-15 en el fluido sinovial y en el suero de los pacientes con AR. Se conoce, además, que esta citocina participa en el desarrollo de una respuesta inflamatoria a través de la inducción de TNF- $\alpha$ , promoviendo la atracción de células T autoreactivas hacia el fluido sinovial (Christodoulou y Choy, 2006). Sobre la base de estos antecedentes, nuestro grupo ha encaminado sus investigaciones hacia el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para inhibir la actividad inflamatoria de la IL-15. En el año 2012 obtuvimos un premio de la ACC que abarcó la identificación de un péptido sintético que inhibe los efectos biológicos de la IL-15, al bloquear la interacción de esta citocina con su receptor específico. Esta nueva propuesta se centra en un novedoso candidato terapéutico basado en una variante modificada de la proteína IL-15, como antígeno para la inmunoterapia activa. El presente trabajo se propuso como objetivos: 1) Obtener, por vía recombinante, una variante modificada de la IL-15 humana, que favorezca la generación de una respuesta inmune humoral contra la IL-15 nativa y 2) Desarrollar una respuesta de anticuerpos contra la IL-15 humana en monos *Macaca fascicularis* mediante la inmunización activa con la IL-15 humana modificada. En este trabajo se obtiene, por primera vez, una variante modificada de la IL-15 que expone una conformación de los puentes disulfuros diferente a la citocina natural. Se demuestra que la inmunización con esta variante genera una potente respuesta de anticuerpos neutralizantes en primates no humanos; resultados que evidencian, por primera vez, la ruptura de la tolerancia de células B hacia este antígeno propio.

## **RESULTADOS**

La IL-15 se expresó en *E coli* y se purificó hasta un 98% de pureza. Los resultados que describen el proceso de obtención de la proteína están publicados por Santos *et al* en **Biotecnología Aplicada 2000; 17:221-224**. Los estudios de caracterización de la molécula, mediante espectrometría de masas, mostraron que **la IL-15 purificada presenta los puentes disulfuros entre las cisteínas contiguas (Cys<sup>35</sup>-Cys<sup>42</sup> y Cys<sup>85</sup>-Cys<sup>88</sup>), los cuales difieren de los descritos para la proteína nativa (Cys<sup>35</sup>-Cys<sup>85</sup> y Cys<sup>42</sup>-Cys<sup>88</sup>)** (Pettit *et al.*, 1997). Teniendo en cuenta este cambio estructural, a la IL-15 obtenida se le denominó: IL-15 humana modificada (IL-15hm). **Esta modificación estructural puede favorecer la exposición de epítopes que garanticen una respuesta de anticuerpos efectiva contra la IL-15 nativa.** La demostración de la capacidad inmunogénica de la IL-15hm se realizó en monos *Macaca fascicularis* empleando hidróxido de aluminio (Alúmina), Montanide o Adyuvante Incompleto de Freund. Los títulos de anticuerpos, en el suero de los

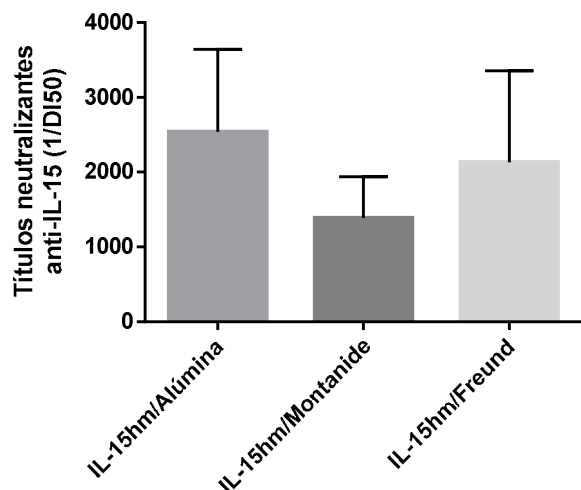
animales inmunizados, alcanzaron valores superiores a 1 en 20000 (Figura 1).



**Figura 1.** Títulos de anticuerpos anti-IL-15 correspondientes a 15 días después de la tercera inmunización. Los títulos se expresan como 1/la dilución del suero.

Estos resultados demuestran, por primera vez, la ruptura de la tolerancia inmunológica hacia este antígeno propio y la generación de una respuesta de anticuerpos específica, en un modelo animal donde la IL-15 de la especie comparte un 97% de identidad aminoacídica con la IL-15 humana.

La capacidad neutralizante de los sueros se determinó en el ensayo de proliferación en CTLL-2. Los detalles de la estandarización de este ensayo, aplicado a la evaluación del efecto de los sueros inmunes sobre la proliferación inducida por la IL-15 nativa, están publicados por Rodríguez *et al* en **Biotecnología Aplicada 2014; 31: 291-296**. Como resultado encontramos que **los sueros de los animales inmunizados con la IL-15hm inhiben la actividad biológica de la IL-15 nativa**, al disminuir la proliferación celular inducida por esta citocina. **Es la primera vez que se describe el uso de la IL-15 en la inmunoterapia activa, para el desarrollo de una respuesta de anticuerpos policlonales que neutralizan la actividad biológica de la IL-15 nativa.** El mayor efecto neutralizante se observó en el grupo que empleó Alúmina (Figura 2), lo que permitió la selección de este adyuvante para la inmunoterapia activa con la IL-15hm.



**Figura 2.** Títulos de neutralización anti-IL-15 nativa, calculados a partir de los datos obtenidos en el ensayo de proliferación en la línea CTLL-2. Los títulos se expresan como 1/la dilución inhibitoria media del suero.

Para estudiar la duración de la respuesta de anticuerpos, se empleó la Alúmina como adyuvante. Los títulos de anticuerpos neutralizantes, generados por la vacunación, tienen un tiempo de vida media de ~3 meses. **Resulta importante señalar que ante una nueva re-inmunización, la respuesta de anticuerpos se recupera de manera similar a la alcanzada en inmunizaciones precedentes; lo que demuestra una regulación de la respuesta de anticuerpos controlada por la vacunación.** Los detalles de este estudio y la demostración, por primera vez, del uso de la IL-15 modificada en la inmunoterapia activa para generar anticuerpos neutralizantes, están publicados por Rodríguez *et al* en **BMC Immunology 2016; 17:30**. Para conocer la especificidad de la actividad neutralizante de los sueros, se evaluó su efecto sobre la proliferación de la línea CTLL-2 inducida por IL-2, citocina que comparte las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  del receptor con la IL-15 (Burton *et al.*, 1994; Grabstein *et al.*, 1994). Los resultados demuestran que **los sueros de los animales inmunizados con la IL-15hm no afectan la proliferación inducida por la IL-2, lo que demuestra que el efecto neutralizante de los sueros es específico para la IL-15.**

Como elementos primarios de seguridad de la vacuna, se estudió el efecto de la inmunización sobre el número de poblaciones celulares dependientes de IL-15. En este caso se determinaron, por citometría de flujo, el número de células NK CD56<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> antes y después de la quinta inmunización. Los resultados evidencian que no existen diferencias estadísticamente significativas (prueba T de student para muestras pareadas) en el número de células CD56<sup>+</sup> (p 0.658) y CD8<sup>+</sup> (p 0.684) antes y después de la vacunación. **Durante los 540 días que duró el esquema de inmunización no se observaron diferencias en los parámetros de peso corporal, temperatura, ritmo cardíaco, respiratorio; ni alteraciones en los principales parámetros bioquímicos de la sangre de los animales inmunizados respecto al grupo control. Todos estos resultados avalan el uso del adyuvante Alúmina en la generación de una respuesta de anticuerpos anti-IL-15 regulada, específica y segura en monos *Macaca fascicularis*.**

Con el propósito de evaluar el efecto de los sueros inmunes sobre la actividad de la IL-15 de la especie en la que se desarrolló el esquema de inmunogenicidad, se obtuvo la IL-15 de simio (IL-15si). Los resultados

detallados sobre la obtención y caracterización de esta citocina, así como el efecto de los sueros inmunes sobre la actividad biológica de la IL-15 de simio, están publicados por Rodríguez *et al* en **Preparative Biochemistry & Biotechnology 2017 Aug 17:1-12; DOI 10.1080/10826068.2017.1365238**.

**A pesar de la alta homología en la secuencia de aminoácidos entre la IL-15 humana y la de simio, los resultados demuestran que los anticuerpos presentes en el suero de los animales inmunizados con la IL-15hm neutralizan la actividad biológica de la IL-15si en las células CTLL-2 y Kit 225. Estos resultados reafirman la utilidad del mono, como especie robusta, para la prueba de concepto de la vacuna anti-IL-15.**

### **APORTE METODOLÓGICO Y CIENTÍFICO**

El aporte metodológico de este trabajo está condicionado al desarrollo de una estrategia novedosa para el tratamiento de la AR, basada en la terapia activa con una variante modificada de la IL-15 humana. Esta estrategia presenta ventajas con respecto a los Biológicos actuales (anticuerpos monoclonales), en cuanto a que requiere una menor frecuencia de inyecciones al paciente, una menor dosis y la ausencia de respuesta anti-fármaco. Desde el punto de vista científico, el principal aporte de este trabajo radica en la obtención de una variante modificada de la IL-15 humana, capaz de generar una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra la IL-15 autóloga en primates no humanos. Es la primera vez, en la comunidad científica, que se describe el uso de la IL-15 como antígeno para la inmunoterapia activa en la AR.

### **APORTE SOCIAL Y ECONÓMICO**

La vacuna anti-IL-15, objeto de este trabajo, se encuentra en fase de Desarrollo y preparación del expediente a presentar al CECMED para la autorización de un ensayo clínico fase I en pacientes con AR; una enfermedad que representa un gran problema de salud y para la cual no existe un tratamiento efectivo. Particularmente en Cuba representaría una opción de tratamiento para aquellos pacientes que requieren terapia con Biológicos y que resultan inaccesibles a nuestro país por su alto costo (~20000 USD/año) y por las limitaciones que impone el bloqueo norteamericano.

### **CONCLUSIONES**

En este trabajo se describe, por primera vez, la obtención de una variante modificada de la IL-15 humana y su capacidad para inducir, mediante la inmunoterapia activa, una respuesta de anticuerpos policlonales neutralizantes en primates no humanos. Esta novedosa estrategia terapéutica está destinada al tratamiento de enfermedades, como la AR, que cursan con una sobreexpresión de la IL-15.

### **REFERENCIAS**

- Burton J.D., Bamford R.N., Peters Ch., Grant J., Kurys G., Goldman C.K., *et al*. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and

produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91:4935-39.

- Christodoulou C., Choy E.H. Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Med.* 2006; 6:13-19.
- Grabstein K.H., Eisenman J., Shanebeck K., Rauch C., Srinivasan S., Fung V., *et al.* Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science.* 1994; 264(5161):965-8.
- Pettit D.K., Bonnert T.P., Eisenman J., Srinivasan S., Paxton R., Beers C., *et al.* Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling. *J Biol Chem.* 1997; 272(4):2312-8.
- Raza K., Falciani F., Curnow S., Ross E., Lee Ch., Akbar A., *et al.* Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res. Ther.* 2005; 7(4):R784-R795.
- Wollheim FA. Approaches to rheumatoid arthritis in 2000. *Curr Opin Rheumatol.* 2001; 13(3):193-201.