

Título: Diseño, obtención y evaluación de una muteína derivada de la IL-2 humana para el uso en la terapia antitumoral

Unidad Ejecutora Principal del Resultado: Centro de Inmunología Molecular

Autores: Tania Carmenate Portilla (i), Kalet León Monzón(i), Gertrudis Rojas Dorantes (i),

Colaboradores: Anabel Pacios Michelena (ii), Dasha Fuentes Morales(ii), Ernesto Moreno Frías(ii), Karina Oarcía Martínez(ii), Janet Avellanet Martínez(ii) y Arlem García Delgado(ii).

Filiación

Centro de Inmunología Molecular (CIM)

CENPALAB

Correspondencia: Tania Carmenate Portilla

Centro de Inmunología Molecular

Calle 216, esq. 15, Atabey, Playa

Habana 11600, Cuba

Email: carmenate@cim.sld.cu

Fax: 7272 0644/Telf: 7214 3170

Colaboradores

Neris Michel Enamorado Escalona, Saumel Pérez Rodríguez, Judith Raymond Pous, Agustín Bienvenido Lage Dávila,

Resumen

Antecedentes: La Interleucina 2 humana comenzó a utilizarse en la terapia antitumoral en humanos desde la década del 80 y esta práctica médica se ha mantenido hasta la actualidad. Como resultado de este tratamiento una parte de los pacientes de melanoma metastásico o cáncer renal metastásico tratados con la citocina, han experimentado respuestas objetivas significativas e incluso regresión total de las lesiones malignas. Sin embargo la terapia con IL-2 no ha satisfecho las expectativas de la comunidad científica. Primero, de los pacientes tratados solo del 15 al 30% experimentan algún beneficio clínico. Esto se debe en parte a que la citocina además de inducir la expansión de los linfocitos efectores, linfocitos TCD8+ y células NK, expande también los linfocitos Treg CD4+CD25+Foxp3+ encargados de suprimir la respuesta. Por otra parte la terapia con la IL-2 induce efectos tóxicos severos, lo cual provoca que solo los pacientes con adecuado estado físico pueden recibir la terapia y muchos pacientes se ven obligados a abandonar la terapia por la severidad de los efectos tóxicos.

Objetivos: En el presente trabajo se diseñó, se produjo y se evaluó, una muteína derivada de la IL-2 humana con mejores propiedades terapéuticas que la IL-2 salvaje. A partir de la estructura tridimensional del complejo de la IL-2 con su receptor y con la utilización de técnicas bioinformáticas se diseñó una muteína de la IL-2 humana para expandir preferencialmente a las células efectoras y no a las células Treg. En el trabajo se evalúan las propiedades tanto moleculares como funcionales de esta nueva molécula.

Resultados: Se demostró la validez del diseño racional utilizado a partir de la estructura tridimensional de la citocina y con la utilización de técnicas bioinformáticas. Con la utilización de la tecnología de presentación en fagos filamentosos se validó experimentalmente el diseño teórico, esta tecnología puede aplicarse a otros proyectos para el diseño de nuevas drogas. Se demostró que la muteína obtenida tiene mayor efecto antitumoral que la IL-2 salvaje en varios modelos tumorales *in vivo*, y este efecto está relacionado con la expansión y activación preferencial de las células efectoras, como los linfocitos T CD8+ de memoria, y la no expansión de las células Treg. Por otra parte se demuestra que la muteína induce menos efectos tóxicos que la IL-2 salvaje. Esta nueva molécula diseñada y obtenida en el CIM reúne las propiedades necesarias para superar el efecto terapéutico de la IL-2 salvaje y lograr mejores resultados en la clínica con un uso más extendido. Esta molécula se encuentra actualmente en fase de producción a escala piloto con vistas a la solicitud de aprobación para un estudio clínico Fase I en pacientes de cáncer. Este proyecto dio lugar a una patente concedida en 16 países, entre ellos EUA, y Japón. Los resultados de este estudio están publicados en las revistas *J of Immunology* y *J. of Molecular Recognition*, y forman parte de una Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Biológicas. El presente trabajo cuenta con los avales del Consejo Científico del CIM y del Director General.

Introducción

La interleucina-2 (IL-2) es una citocina con una función determinante en el balance entre la inmunidad y la tolerancia (Malek y Castro, 2010; Boyman y Sprent, 2012). Por su capacidad para estimular la activación y la expansión de la respuesta inmune se ha utilizado en la terapia del melanoma metastásico y del cáncer renal metastásico (Rosenberg, 2000; Malek, 2008). Como resultado de esta terapia una parte de los pacientes experimentan respuestas objetivas de larga duración (Atkins et al, 2000; Fisher et al, 1997). Sin embargo esta terapia tiene dos limitaciones fundamentales, solo reciben algún beneficio clínico del 15 al 30% de los pacientes tratados (Rosenberg et al, 1998) y además las altas dosis de IL-2 necesarias para lograr el efecto terapéutico, inducen efectos tóxicos que pueden llegar a ser severos (Vial y Descotes, 1992). Por otra parte la administración de las altas dosis de IL-2 necesarias para la terapia, también induce la expansión de las células T reguladoras (Treg), y estas a su vez inhiben el desarrollo de la respuesta antitumoral (Ahmadzadeh y Rosenberg, 2006; Cesana et al, 2006). En este trabajo se describe la caracterización de una muteína derivada de la IL-2 humana, concebida como un posible candidato para la terapia antitumoral. La muteína se obtuvo a partir de un diseño racional, basado en la estructura tridimensional del complejo de la citocina con su receptor, disponible en la literatura y en la distribución de las diferentes formas de este receptor en las diferentes poblaciones de linfocitos.

Resultados

Se diseñó, se obtuvo y se caracterizó una muteína derivada de la IL-2 humana para su uso en la terapia anti cáncer. El diseño se realizó con herramientas bioinformáticas, mediante las cuales se seleccionaron cuatro mutaciones puntuales en la molécula, R38A, F42A, Y45A y E62A, capaces de interrumpir la interacción de la IL-2 con la cadena alfa (CD25) de su receptor. La molécula se obtuvo en el sistema de expresión de *E. coli*, se purificó por técnicas cromatográficas y se renaturalizó *in vitro*. Se demostró que la capacidad de la muteína de inducir la proliferación de la línea CTLL-2 es 40 veces menor que la de la IL-2 salvaje. Este comportamiento coincide con lo esperado, ya que la línea CTLL-2 expresa la cadena alfa del receptor de la IL-2. Se demostró además, que la muteína induce mayor efecto anti metastásico que la IL-2 salvaje en el modelo de metástasis experimental con la línea de melanoma MB16F0. Con estos resultados se presentó la patente: WO 2012/062228 A2

Polipéptidos derivados de la IL-2, con actividad agonista para la terapia del cáncer e infecciones crónicas. León K, Carmenate T, Pérez S, Enamorado N, Lage A. Hasta la actualidad la patente ha sido concedida en 16 países incluidos Cuba, EUA, Europa y Japón.

Se determinó la contribución de cada una de las mutaciones introducidas en la molécula a la disminución de la interacción de la IL-2 con la cadena alfa del receptor de la IL-2. Para ello se construyeron variantes de la IL-2 con cada una de las mutaciones individuales presentes en la muteína así como la combinación de las mutaciones y se presentaron en fagos filamentosos. Se demostró que las diferentes mutaciones individuales seleccionadas contribuyen a la interrupción de la interacción con la cadena alfa, pero que con la combinación de las cuatro mutaciones R38A, F42A, Y45A, E62A se logra la mayor disminución de la interacción y como consecuencia las propiedades de la muteína. Este resultado validó el diseño *in silico* de la muteína y demostró que la tecnología de presentación en fagos filamentosos es una herramienta útil para el desarrollo y evaluación rápida de variantes de esta u otras citocinas. Rojas, G, Carmenate, T y León K. "Molecular dissection of the interactions of an antitumor Interleukin-2-derived mutein on a phage display-based platform" J. of Molecular Recognition. 2015; 28: 261–268

Se demostró que la muteína, se comporta *in vitro* como un agonista de la IL-2 que mantiene la misma capacidad que la IL-2 salvaje de expandir los linfocitos efectores como las células TCD8+y las células NK, mientras que tiene 1000 veces menos capacidad para inducir la proliferación de los linfocitos Treg. Además se demostró que la muteína tiene mayor efecto antitumoral que la IL-2 salvaje en los modelos de metástasis experimental y metástasis espontánea con la línea de carcinoma pulmonar 3LL-D122. Y que tanto las células NK, como los linfocitos T CD8+ participan como mediadores en el efecto antitumoral *in vivo* de la muteína. Se demostró que la muteína induce menos efectos tóxicos que la IL-2 salvaje, lo cual es otro de sus atributos importantes ya que se conoce que la toxicidad es una de las limitantes fundamentales de la terapia con la IL-2. Carmenate, T., Pacios, A., Enamorado, M., Moreno, E., García-Martínez, K., Fuentes, D., León K. (2013) Human IL-2 mutein with higher antitumor efficacy than wild type IL-2. J Immunol;190(12):6230-8.

Conclusiones

1. A partir de la estructura tridimensional de la IL-2 humana con su receptor es posible introducir mutaciones puntuales que afectan selectivamente la interacción de la IL-2 humana con diferentes subunidades del receptor y obtener variantes con diferentes propiedades inmuno-moduladoras y capacidad antitumoral.
2. Introducir las mutaciones R38A, F42A, Y45A y E62A, es suficiente para eliminar la interacción de la IL-2 humana con la cadena alfa del receptor y disociar las propiedades inmuno-estimuladoras de las propiedades reguladoras de la IL-2.
3. La muteína que no se une a la cadena alfa del receptor de la IL-2 se comporta como un súper-agonista de la IL-2 con mayor efecto antimetastásico y menor toxicidad, por lo que constituye un candidato promisorio para la terapia anti cáncer.

Aportes del trabajo

La **novedad científica** de este trabajo radica en que: se demostró por primera vez que una muteína agonista, que no se une a la cadena alfa del receptor de la IL-2h tiene mayor efecto antitumoral *in vivo* que la IL-2 salvaje. Además se describió un conjunto de mutaciones, no descrito con anterioridad que elimina selectivamente la interacción de la IL-2h con la cadena α del receptor. Se demostró que eliminar la interacción de la IL-2h con la cadena α del receptor es suficiente para obtener una muteína de la IL-2h que induce preferencialmente la proliferación de las células efectoras con respecto a las células Tregs.

El **aporte teórico** de este trabajo radica en que se demostró que es posible realizar un diseño racional, basado en la estructura tridimensional del complejo de la IL-2h con su receptor (IL-2/RIL-2) para obtener variantes mutadas derivadas de esta citocina. Estas nuevas moléculas tienen afectada selectivamente la capacidad de unirse a diferentes cadenas del receptor y como consecuencia tienen propiedades inmuno -estimuladoras específicas y diferentes de la citocina salvaje. Esta experiencia puede extenderse a trabajos similares con la propia IL-2 u otras citocinas, para obtener variantes con características apropiadas para diferentes fines terapéuticos. Además este trabajo incluye la demostración experimental de algunas de las predicciones derivadas de un modelo matemático desarrollado en la dirección de Biología de Sistemas del CIM; por lo cual constituye un ejemplo exitoso de trabajo de investigación en el

cuál se ha combinado la modelación matemática con la experimentación clásica de biología molecular, inmunología celular y modelos animales, dichas experiencias pueden y deben ampliarse considerablemente en el futuro.

El **aporte práctico** de este trabajo consiste en que se obtuvo y caracterizó un posible candidato para la terapia del cáncer y se recomendó su paso a la fase de desarrollo en el CIM, para su futura evaluación como terapia antitumoral en humanos. Esta muteína no induce la activación y proliferación de las células Tregs por lo que mostró mayor efecto antitumoral que la IL-2h salvaje. Además la muteína induce menor toxicidad que la IL-2h por lo que parece ser un candidato para la terapia del cáncer con mejores propiedades que la IL-2.

Referencias

- Ahmadzadeh, M., and S.A. Rosenberg. 2006. IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 107:2409-24144.
- Atkins MB1, Kunkel L, Sznol M, Rosenberg SA.2000. High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. *Cancer J Sci Am.* 6 Suppl 1:S11-4.
- Boyman, O., and J. Sprent. 2012. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 12:180-190.
- Cesana, G.C., G. DeRaffele, S. Cohen, D. Moroziewicz, J. Mitcham, J. Stoutenburg, K. Cheung, C. Hesdorffer, S. Kim-Schulze, and H.L. Kaufman. 2006. 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* 24:1169-1177.
- Fisher, R.I., S.A. Rosenberg, M. Sznol, D.R. Parkinson, and G. Fyfe. 1997. High-dose aldesleukin in renal cell carcinoma: long-term survival update. *Cancer J Sci Am* 3 Suppl 1:S70-72.
- Malek, T.R. 2008. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 26:453-479.
- Malek TR, Castro I. 2010. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and autoimmunity. *Immunity* 33: 153–165.
- Rosenberg SA. 2000 Interleukin-2 and the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *Cancer J Sci Am.* Suppl 1:S2-7.
- Vial, T., and J. Descotes. 1992. Clinical toxicity of interleukin-2. *Drug Saf* 7:417-433.