

Desarrollo de antagonistas de la interleucina-15 para el tratamiento de enfermedades autoinmunes

Rodríguez-Álvarez Y¹, Gerónimo-Pérez H¹, Castro-Velazco J¹, Martínez-Castillo R¹, Puente-Pérez P¹, Garay-Pérez HE¹, Reyes-Acosta O¹, Chico-Capote A², Estévez M², Santos-Savio A¹

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología; ² Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras; La Habana, Cuba

Email: yunier.rodriguez@cigb.edu.cu

RESUMEN

La Interleucina-15 (IL-15) es una citocina inmunoestimuladora con expresión desregulada en diversas enfermedades autoinmunes. Nuestro proyecto desarrolla 2 estrategias para inhibir la sobre-expresión de la IL-15. La primera consiste en una vacuna terapéutica anti-IL-15 basada en la inmunización activa con la IL-15 humana modificada estructuralmente (IL-15hm) para generar anticuerpos neutralizantes contra la proteína autóloga. La segunda comprende el desarrollo de un péptido antagonista que se une a la subunidad α del receptor (IL-15R α). Los objetivos específicos de este trabajo abarcan la caracterización de la respuesta de anticuerpos anti-IL-15 en monos *Macaca fascicularis* inmunizados con la vacuna anti-IL-15 y la optimización del efecto inhibitorio de un péptido antagonista de la IL-15 denominado CIGB55. Los títulos de anticuerpos anti-IL-15 se determinaron en el suero de los monos inmunizados mediante un sistema ELISA. Su capacidad neutralizante se midió en el ensayo de proliferación en la línea CTLL-2. Mediante la estrategia de barrido de alanina se estudió la contribución de cada aminoácido al efecto antagonista del CIGB55. La inmunización con la IL-15hm genera una respuesta regulada de anticuerpos anti-IL-15, obteniéndose la mayor capacidad neutralizante en el grupo que empleó Alúmina como adyuvante. Los anticuerpos anti-IL-15hm inhiben la actividad biológica de la IL-15 de simio y no afectan la proliferación de las células CTLL-2 inducida por la IL-2. Adicionalmente se demostró que la vacunación no afecta el comportamiento animal, estado

clínico, bioquímica sanguínea ni el número de poblaciones celulares dependientes de IL-15. Se encontró que la Phe y la Cys son residuos importantes en la unión a la IL-15R α . Además se investigaron otras mutaciones simples y se identificó un péptido más activo que el CIGB55 en la inhibición de la actividad biológica de la IL-15. Estas estrategias podrían ser útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes relacionadas con la sobreexpresión de la IL-15.

Palabras clave: IL-15, citocina, anticuerpos neutralizantes, inmunización, células CTLL-2, péptido, receptor alfa, antagonista.

INTRODUCCIÓN

La Interleucina-15 (IL-15) es una citocina proinflamatoria que se ha propuesto como un blanco terapéutico en diversas enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (AR), psoriasis, esclerosis múltiple y enfermedades inflamatorias intestinales.¹⁻³ Entre las estrategias aprobadas para la inhibición de la señalización de las citocinas encontramos la neutralización de la citocina o el bloqueo del receptor. El proyecto de investigación desarrolla dos estrategias para inhibir la IL-15. La primera consiste en la inmunización activa con la IL-15 humana modificada (IL-15hm) estructuralmente para generar anticuerpos neutralizantes⁴ y la segunda comprende el desarrollo de un péptido antagonista con capacidad de unión a la subunidad alfa del receptor de la IL-15 (IL-15R α).⁵

OBJETIVO

General: Desarrollar antagonistas de la IL-15 para su uso en enfermedades relacionadas con la sobre-expresión de esta citocina.

Específicos: Caracterizar la respuesta de anticuerpos anti-IL-15 en monos inmunizados con la IL-15 modificada adyuvada en Alúmina, Montanide y Freund y optimizar el efecto inhibitorio de un péptido antagonista de la IL-15, mediante barrido de alanina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un esquema de inmunización en monos *Macacus fascicularis* con 200 µg de la IL-15 modificada en adyuvante alúmina (1,8 mg/mL), Montanide (50:50 v/v) y adyuvante incompleto de Freund (50:50 v/v). Se realizaron 3 inmunizaciones espaciadas por un mes entre la primera y la segunda y dos meses entre la segunda y la tercera. Se tomó muestra de sangre antes de comenzar el esquema y 15 días después de cada inmunización. Los títulos de anticuerpos se evaluaron mediante un sistema ELISA y el efecto neutralizante de los sueros se determinó en el ensayo de proliferación en CTLL-2.⁴ Este último ensayo nos permitió evaluar el efecto de los sueros sobre la actividad de la IL-15 de simio y sobre la proliferación inducida por la IL-2. Mediante la estrategia de barrido de alanina se estudió la contribución de cada aminoácido al efecto antagonista del péptido CIGBB55. La capacidad de unión a la IL-15R α se evaluó por ELISA mientras que el efecto inhibitorio se determinó en el ensayo en CTLL-2. Para evaluar el efecto del péptido sobre la secreción de TNF- α en células sinoviales de pacientes con AR, se incubaron 2×10^5 células/pozo con 50 µg/mL de péptido o 60 ng/mL de IL-15, o una combinación de ambos. Después de 48 h, la concentración de TNF- α en el sobrenadante de cultivo se determinó mediante un sistema ELISA comercial (R&D).

RESULTADOS

La inmunización con la IL-15hm genera una respuesta regulada de anticuerpos anti-IL-15, obteniéndose la mayor capacidad neutralizante en el grupo que empleó alúmina como adyuvante. Los anticuerpos anti-IL-15hm inhiben la actividad biológica de la IL-15 de simio y no afectan la proliferación de las células CTLL-2 inducida por la IL-2. Adicionalmente se demostró que la vacunación no afecta el comportamiento animal, estado clínico, bioquímica sanguínea ni el número de poblaciones celulares dependientes de IL-15. Se encontró que la Phe y la Cys son residuos importantes en la unión a la IL-15R α . Además se investigaron otras mutaciones simples y se identificó un péptido más activo que el CIGBB55 (IC₅₀ 130 µM) con una IC₅₀ de 24 µM. Este péptido mostró el mayor % de inhibición sobre la secreción de TNF- α por células sinoviales de pacientes con AR.

CONCLUSIONES

En este trabajo se demuestra que la inmunización con la IL-15hm genera una respuesta de anticuerpos anti-IL-15 neutralizante en monos *Macacus fascicularis*. Los anticuerpos generados por la inmunización reconocen y neutralizan la IL-15 autóloga y la de simio. La vacunación resultó segura en estos animales, sin afectar el número de poblaciones celulares dependientes de IL-15: NK CD56⁺ y T CD8⁺. Se identificó un péptido más activo que la molécula original CIGB55 en la inhibición de la actividad biológica de la IL-15.

RECOMENDACIONES

Evaluar la efectividad de ambas estrategias en un modelo animal de AR u otra enfermedad autoinmune donde la IL-15 se ha propuesto como un blanco terapéutico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Burska A, Boissinot M, Ponchel F. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 545493.
2. Yadav PK, Chen C, Liu Z. Potential role of NK cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011: 348530.
3. Patterson KC, Hogarth K, Husain AN, Sperling AI, Niewold TB. The clinical and immunologic features of pulmonary fibrosis in sarcoidosis. *Transl Res.* 2012; 160(5): 321-31.
4. Rodríguez-Álvarez Y, Morera-Díaz Y, Gerónimo-Pérez H, Castro-Velazco J, Martínez-Castillo R, Puente-Pérez P, et al. Active immunization with human Interleukin-15 induces neutralizing antibodies in non-human primates. *BMC Immunology.* 2016; 17: 30.
5. Santos A., Reyes O., Gerónimo H., Rodríguez Y., Chico A., Garay H., Ojeda M., Arrieta C., Estévez M., Guillén G. Enhancement of the inhibitory effect of an IL-15 antagonist peptide by alanine scanning. *Journal of Peptide Science.* 2012; 18: 25-9.