



Sesión científica celebrada el 29 de noviembre de 2018 para conmemorar los Premio Nobel 2018 en Fisiología o Medicina y en Química



Juan Ramón Lacadena Calero
Coordinador de la sesión
Sesión celebrada el 29 de noviembre de 2018
e-mail: jrlgbucm@bio.ucm.es

ORDEN DEL DÍA

Presentación:

“El Premio Nobel 2018 en Fisiología o Medicina”

“El Premio Nobel 2018 en Química. Evolución dirigida (mejora genética) de enzimas, péptidos y anticuerpos”

Excmo. Sr. D. Juan-Ramón Lacadena Calero

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Ponentes:

“Premio Nobel de Fisiología y Medicina 2018: interfiriendo la respuesta inmune para favorecer la inmunovigilancia frente a tumores”

Dr. Lisardo Boscá Gomar

Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM. Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

“Nobel de Química 2018: Evolución dirigida e ingeniería de proteínas”

Dr. César Nombela

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense e IRYCIS. Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

El Premio Nobel 2018 en Fisiología o Medicina

Juan-Ramón Lacadena Calero

Un año más, la Real Academia Nacional de Farmacia celebra la sesión científica dedicada a los premios Nobel otorgados en Química y en Fisiología o Medicina y, otra vez más, han sido galardonadas investigaciones relacionadas con algunos campos de la Genética. En lo que va de siglo XXI –es decir, en dieciocho años– la ciencia genética ha sido premiada en diecinueve ocasiones.

La Asamblea Nobel del Instituto Karolinska otorgó el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2018 conjuntamente a James P. Allison y Tasuku Honjo por “su descubrimiento de la terapia del cáncer mediante la inhibición de la regulación inmune negativa”. Hasta ahora, había varias formas de combatir el cáncer: la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, entre otras. Algunas de ellas fueron ocasión de premios Nobel, como el tratamiento del cáncer de próstata mediante hormonas (Charles Brenton Huggins, 1966) y la quimioterapia (Gertrude Eliot y George Hitchings, 1988) y el trasplante de médula para la leucemia (Donnalld Thomas, 1990).

Con las investigaciones de los galardonados, se dispone hoy de una nueva forma esperanzadora de luchar contra el cáncer: la inmunoterapia. Todo partió del conocimiento de cómo actúan dos proteínas: la CTLA-4 y la PD-1, investigadas por Allison y Honjo, respectivamente, que actúan como frenos del sistema inmune.

En la década de los noventa el Dr. James P. Allison y colaboradores demostraron que la proteína CTLA-4 de los linfocitos T actúa como freno de su actividad inmune y, además, habían obtenido un anticuerpo capaz de unirse a CTLA-4, bloqueando su función. De esta manera, a finales de 1974 y principios de 1975 hicieron un primer experimento crucial en el que ratones con cáncer fueron curados al inhibir el freno CTLA-4 y desbloquear la actividad antitumoral de las células T (1). Posteriormente, Allison y colaboradores iniciaron sus estudios en diversos tipos de cáncer humanos (2), siendo especialmente sorprendentes los resultados obtenidos en 2010 en pacientes con melanomas en estado avanzado en los que desapareció cualquier vestigio del cáncer.

Por su parte, el Dr. Tasuku Honjo y sus colaboradores, que habían descubierto en 1992 la proteína PD-1 (3), demostraron que actuaba también como un freno a la actividad inmune de los linfocitos T aunque con un mecanismo diferente al de la proteína CTLA-4 de Allison. En experimentos con animales demostraron que el bloqueo de la proteína PD-1 resulta efectivo en la lucha contra el cáncer. Más tarde, en 2012, realizaron un ensayo clínico con resultados positivos, incluso lograron la remisión del cáncer metastásico en varios pacientes.

En tratamientos de cáncer de pulmón, riñón, linfoma y melanoma, la denominada “terapia de punto de control inmune” de PD-1 ha resultado más eficaz que la de CTLA-

4. Se ha comprobado también que la terapia conjunta, inhibiendo simultáneamente la actividad de CTLA-4 y PD-1, ha resultado eficaz en pacientes con melanoma.

En definitiva, como señala la nota de prensa del Instituto Karolinska, “este año el premio constituye un hito en la lucha contra el cáncer. El descubrimiento realizado por los dos premiados aprovecha la capacidad del sistema inmune de atacar las células cancerosas”.

REFERENCIAS

1. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996; 271:1734-6.
2. Kwon ED, Hurwitz AA, Foster BA, Madias C, Feldhaus AL, Greenberg NM, Burg MB, Allison JP. Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proc Nat Acad Sci* 1997; 94:8099-8103.
3. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992; 11:3887-95.

De todo ello nos hablará el Profesor Lisardo Boscá, Académico Correspondiente de esta Real Academia Nacional de Farmacia.

Premio Nobel de Fisiología y Medicina 2018: interfiriendo la respuesta inmune para favorecer la inmunovigilancia frente a tumores

Lisardo Boscá Gomar

Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Centro Mixto CSIC-UAM. Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

ABSTRACT: Neutralizing monoclonal antibody-based Immunotherapy has been a breakthrough in the treatment of various types of cancer. Their targets are molecules that effectively repress activity of information against tumors of lymphocytes T. The Nobel Prize in Physiology or medicine 2018 recognizes activity pioneer of two research groups that developed the concept of immunotherapy against two co-receptors in T-lymphocytes that prevent its function: CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4) and PD-1 (programmed death-1). These antibodies have proved very effective in advanced tumors using both individually or combined. At the same time, open a new field in Oncology through the regulation of the activity of the immune system, with a great projection in the development of new therapeutic strategies based on these initial reagents.

RESUMEN: La inmunoterapia basada en anticuerpos monoclonales neutralizantes ha supuesto un gran avance en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Sus dianas son moléculas que reprimen eficazmente la actividad de inmunovigilancia frente a tumores de los linfocitos T. El Premio Nobel de Fisiología y Medicina 2018 reconoce la actividad pionera de dos grupos de investigación que desarrollaron el concepto de la inmunoterapia frente a dos co-receptores de los linfocitos T que impiden su función: CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4*) y PD-1 (*programmed death-1*). Estos anticuerpos han demostrado una gran eficacia en tumores avanzados utilizándose tanto de forma individual o combinados. A su vez, abren un campo nuevo en la oncología a través de la regulación de la actividad del sistema inmune, con una gran proyección en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en estos reactivos iniciales.

Corresponding Author: lbosca@iib.uam.es

An Real Acad Farm Vol. 84, N° 4 (2018), pp. 386-394

EL PREMIO NOBEL DE FISIOLOGÍA Y MEDICINA 2018

La Fundación Nobel y la Academia Sueca han concedido *ex aequo* el Premio Nobel de esta área a James P. Allison y Tasuku Honjo por sus descubrimientos sobre la terapia frente al cáncer basada en el uso de la inmunoterapia para bloquear la regulación negativa de la función efectora de los linfocitos T. Las estrategias de ambos investigadores son diferentes, pero conceptualmente convergen en el uso de anticuerpos neutralizantes de dos vías que reprimen la función de inmunovigilancia frente a tumores de los linfocitos T. Si bien la estrategia pionera desarrollada por Allison se centra en el bloqueo de un receptor implicado en la supresión de la función efectora de los linfocitos T, la presentada por Honjo un lustro más tarde, hace uso del bloqueo de un receptor cuya activación suprime induce la muerte programada de los linfocitos T. Como ya se puede anticipar, estas señales desempeñan un papel fisiológico en la regulación de la respuesta inmune, este contexto es aprovechado por la célula tumoral para evitar su reconocimiento y eliminación por parte de los linfocitos T citotóxicos o CD8⁺. Ambas dianas pertenecen a una amplia familia de receptores del sistema inmune que se denominan colectivamente co-receptores. Aquellos co-receptores cuya función es especialmente relevante en la

actividad o viabilidad de la célula T son los que constituirán dianas importantes para el control de la función del sistema inmune. La Figura 1 resume estos mecanismos de acción. Por otro lado, y como era presumible, la actuación sobre estas vías represoras puede acarrear efectos indeseables en los pacientes tratados con los anticuerpos bloqueantes, incluyendo una exacerbación de la respuesta inmune y de las patologías asociadas al mismo (1-3). Estas dos vías, al igual que otras que se han caracterizado en los últimos años, se denominan ‘puntos de control’ o *check points*, y han planteado la posibilidad de modular su función, añadiendo nuevas herramientas terapéuticas –más allá del cáncer-, que seguro veremos trasladadas a la clínica en los próximos años.

BREVE TRAYECTORIA BIOGRÁFICA DE LOS GALARDONADOS

En la nota de prensa correspondiente a la concesión de este Premio Nobel, la academia sueca ha presentado un esquema (Figura 1) que describe visualmente el bloqueo ejercido por los dos frenos identificados por los galardonados: CT por parte del Allison y su grupo y PD-1 en el caso de Honjo. El progreso en la caracterización de ambas vías ha seguido caminos paralelos separados, casi de forma especular, por un quinquenio, desde la identificación de las dianas en 1980 y 1985 hasta la aprobación por parte de la FDA de su uso clínico (Figura

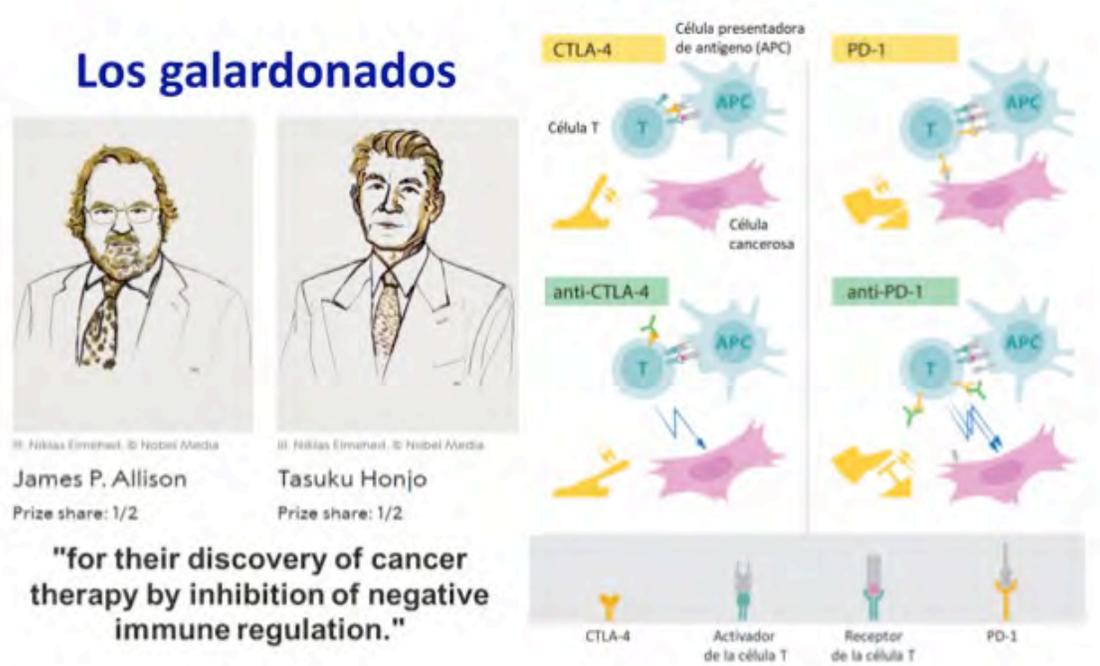


Figura 1. Anuncio de la comunicación del Premio Nobel y descripción gráfica de los mecanismos implicados en la inmunoterapia basada en la inhibición de los puntos de control. Los anticuerpos neutralizantes frente a CTLA-4 y PD-1 bloquean la regulación negativa que ejercen estos co-receptores de los linfocitos T sobre la activación dependiente del TCR.

James P. Allison nació en 1948 en Alice, Texas (USA), doctorándose en 1973 en la Universidad de Texas en Austin. Desde 1974 a 1977 realizó su formación postdoctoral en la Fundación Scripps de La Jolla, California, pasando a continuación a trabajar en el Centro del Cáncer en Smithville, perteneciente a la Universidad de Texas. Posteriormente, desde 1985 a 2004, trabajó en la Universidad de California, Berkeley y desde 2004 a 2012 en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de Nueva York, en calidad de investigador Howard Hughes. A partir de 2012 regresó a la Universidad de Texas, trabajando en el MD Anderson Cancer Center de Houston, afiliado al Instituto Parker para el estudio de la inmunoterapia frente al cáncer. James P. Allison estudió el co-receptor CTLA-4 que funciona como un freno para el sistema inmunológico. Su punto de partida fue el diseño de reactivos capaces de bloquear este freno y, por lo tanto, permitir al sistema inmune profesional, el 'adquirido', atacar tumores. Su éxito se debe al desarrollo de esta idea para el tratamiento de pacientes mediante anticuerpos neutralizantes de CTLA-4.

Tasuku Honjo nació en 1942 en Kyoto, Japón. En 1966 obtuvo su graduación en medicina, y desde 1971 a 1974 fue investigador en Estados Unidos en la institución Carnegie de Washington, Baltimore, así como en los Institutos Nacionales de Salud (NIH), Bethesda, Maryland. Recibió su grado de doctor en 1975, en la Universidad de Kyoto. Desde 1974 a 1979 fue miembro de la Universidad de Tokio y de 1979 a 1984 de Universidad de Osaka. Desde 1984 ha sido profesor en la Universidad de Kyoto, siendo decano de la facultad de medicina en los periodos 1996-2000 y de 2002 a 2004. Tasuku Honjo descubrió otro co-receptor en las células inmunes, PD-1, que también funciona como un freno, pero con un mecanismo de acción muy distinto a CTLA-4. Lo más destacado de estas estrategias terapéuticas fue comprobar que eran muy efectivas en la lucha contra diversos tipos de tumores experimentales y trasladables a la inmunoterapia frente a tumores en humanos. Los descubrimientos originales de los dos laureados constituyen un hito en la terapia contra el cáncer.

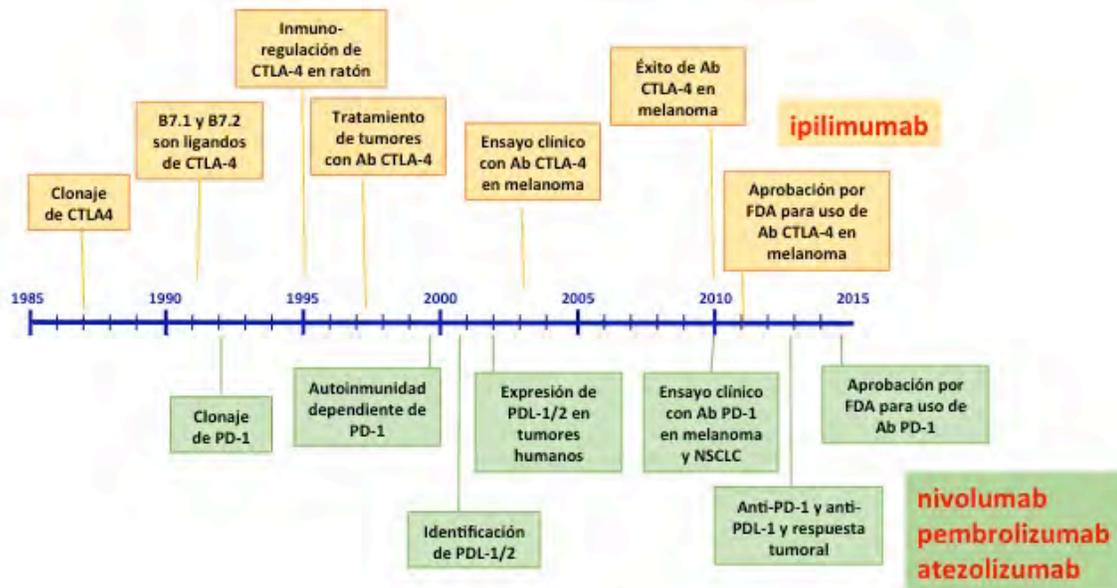


Figura 2. Progreso temporal en la identificación y caracterización funcional de CTLA-4 y PD-1 en el campo de la inmunoterapia. El desarrollo de las distintas fases de estudio, incluidos los ensayos clínicos, sobre la inmunoterapia frente a CTLA-4 y PD-1 tienen un perfil equivalente, pero separado por cinco años de diferencia entre ambos.

EL PROGRESO HACIA LA INMUNOTERAPIA FRENTE AL CÁNCER

Como es bien conocido, el cáncer comprende muchas enfermedades diferentes, todas caracterizadas por una proliferación descontrolada de células con diversas anomalías y con capacidad de diseminarse y metastatizar en órganos y tejidos sanos. Por ello, resulta lógico pensar en el desarrollo de una amplia batería de estrategias terapéuticas. Estas incluyen métodos basados en el tratamiento hormonal para el cáncer de próstata (4), quimioterapia más o menos específica basada en la identificación de dianas moleculares alteradas (5), y trasplante de médula ósea para la leucemia (6). Sin embargo, en estadios avanzados, el cáncer sigue siendo bastante difícil de tratar, quedando clara la necesidad de nuevas aproximaciones terapéuticas en el campo de la oncología. Ya a finales del siglo XIX y principios del XX surgió la idea de que la activación del sistema inmune podría ser una buena estrategia para atacar a la célula tumoral. Se hicieron intentos de infectar pacientes con bacterias para activar los mecanismos de defensa, tanto innatos como adquiridos. Estos esfuerzos solo tuvieron efectos modestos; sin embargo, una variante de esta estrategia se sigue utilizando en la actualidad con excelentes resultados en el tratamiento del cáncer de

vejiga. Muchos científicos dedicados a la investigación básica han identificado los mecanismos fundamentales que regulan la inmunidad y también cómo el sistema inmune puede reconocer las células cancerosas. A pesar del notable progreso científico alcanzado en este campo, los intentos de desarrollar nuevas estrategias generalizables contra el cáncer habían resultado poco exitosos hasta comienzos de la década de los 80.

La propiedad fundamental de nuestro sistema inmunológico es la capacidad de discriminar entre "*lo propio*" y "*lo no-propio*", para que bacterias, virus y otros agentes patogénicos puedan ser atacados y/o eliminados. Los linfocitos T, un tipo de glóbulo blanco, son los actores clave en esta defensa. Se demostró que las células T expresan receptores que se unen a estructuras reconocidas como *no-propias*, a través de la presentación antigénica llevada a cabo por las denominadas células presentadoras, y tales interacciones activan al sistema inmunológico como un mecanismo básico de defensa. A diferencia de lo que sucede en el reconocimiento clásico entre un ligando y su receptor, por ejemplo, en la regulación hormonal, en el sistema inmune existe un reconocimiento adicional mediante sistemas ligando-receptor, denominados co-receptores, que actúan como aceleradores o como frenos de la respuesta mediada por los linfocitos T, lo que permite una regulación muy precisa de ésta y el mantenimiento de

una correcta homeostasis inmune. Este complejo equilibrio entre aceleradores y frenos a través del sistema de co-receptores es esencial para un estricto control de la respuesta y la prevención de manifestaciones adversas como son las reacciones autoinmunes, evitándose el deterioro o destrucción de células y tejidos sanos. La Figura 3 presenta de forma esquemática algunos de estos co-receptores. Durante la década de 1990, J.P. Allison estudió el co-receptor de células T CTLA-4, contribuyendo a su caracterización como un atenuador de los linfocitos T, que veían comprometida su capacidad de respuesta frente a la estimulación antigénica. De hecho, otros grupos de investigación explotaron el uso de este mecanismo como diana en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. La idea de J.P. Allison fue completamente diferente, al sospechar que su activación formaba parte de los mecanismos por los que algunos tumores progresaban. Para demostrar esta idea, partió del uso de un anticuerpo que podía unirse a CTLA-4 bloqueando su función (anticuerpo neutralizante). Mediante esta herramienta, investigó si el bloqueo CTLA-4 podría liberar su acción represora sobre los linfocitos T permitiendo al sistema

inmune atacar eficazmente las células cancerosas. Los primeros experimentos se realizaron a finales de 1994, obteniéndose unos resultados espectaculares. Ratones a los que se les había administrado líneas tumorales de rápido crecimiento, presentaron una excelente curación cuando se les trataba con anticuerpos que inhiben la acción de CTLA-4. Estos resultados no despertaron un claro interés por parte de la industria farmacéutica, más enfocada hacia la búsqueda de moléculas que bloqueasen las vías alteradas en la célula tumoral, conduciendo a la muerte celular. Pese a ello, el grupo de J.P. Allison continuó su esfuerzo para trasladar esta estrategia a una terapia válida para humanos. Pronto se obtuvieron resultados prometedores por parte de varios grupos trabajando en el campo de la inmunoterapia frente a CTLA-4, y en 2010 un importante estudio clínico mostró efectos sorprendentes de estos anticuerpos neutralizantes en pacientes con melanoma avanzado, un tipo de cáncer de difícil tratamiento. En varios de estos pacientes las células de melanoma desaparecieron por completo, observándose una remisión de este cáncer con una efectividad que nunca antes se había alcanzado.

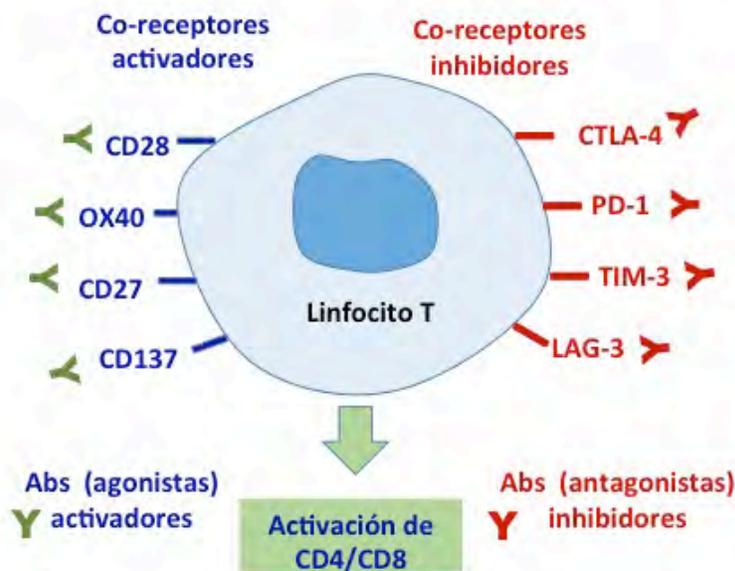


Figura 3. Co-receptores en los linfocitos T. Los linfocitos T expresan una amplia variedad de receptores en la superficie celular, denominados genéricamente co-receptores, que amplifican o reprimen la respuesta primaria mediada a través del TCR. De esta forma se consigue una regulación precisa de la función efectora de las células linfoides, evitando fenómenos adversos como los relacionados con la autoinmunidad.

Aunque resulte paradójico en su desarrollo, en 1992, unos años antes del descubrimiento de J.P. Allison, el grupo de T. Honjo descubrió PD-1, otro co-receptor expresado en la superficie de los linfocitos T. Estos investigadores realizaron una serie de elegantes experimentos demostrando que PD-1, similar al CTLA-4, bloquea la acción de los linfocitos T, pero a través de un mecanismo diferente, ya que induce la muerte de las estas células, tras el reconocimiento de sus ligandos PD-L1 y PD-L2, que se expresan en diversas células, incluidos algunos tumores. En experimentos con animales que

recibían células tumorales, el bloqueo de PD-1 permitió la acción del sistema inmune frente al tumor. Esto ayudó al desarrollo de anticuerpos neutralizantes frente a PD-1 para el tratamiento de algunos pacientes oncológicos. Los ensayos clínicos se produjeron en 2012, y un estudio clave demostró una clara eficacia en el tratamiento de pacientes con diferentes tipos de cáncer, consiguiéndose a largo plazo la remisión y curación en varios pacientes con cáncer metastásico, una de las condiciones que previamente había sido considerada esencialmente intratable. Después de los estudios iniciales que muestran los efectos beneficiosos del bloqueo de CTLA-4 y PD-1, el

desarrollo clínico de la estrategia inmunoterapéutica ha sido espectacular. Ahora sabemos que la inmunoterapia basada en la interacción sobre los *puntos de control* ha cambiado de forma radical las expectativas en diversos grupos de pacientes con cáncer avanzado. No obstante, y al igual que en otras terapias contra el cáncer, se observan efectos secundarios adversos que pueden ser serios e incluso mortales (1,3,7-9). Estos efectos adversos son causados por una respuesta inmune hiperactiva que conduce a reacciones autoinmunes, pero que hoy en día hemos aprendido a manejar clínicamente, atenuando sus acciones indeseables. Por ello, la investigación en inmunoterapia continúa progresando y está centrada en dilucidar los mecanismos de acción, con el objetivo de mejorar las terapias y reducir los efectos secundarios. De las dos estrategias de tratamiento, la terapia de *puntos de control* frente a PD-1 ha demostrado ser más efectiva y está ofreciendo resultados positivos en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de pulmón, cáncer renal, linfoma y melanoma avanzado, entre otros (2,10,11). Es

más, los estudios clínicos en curso sugieren que la terapia combinada de CTLA-4 y PD-1, junto con criterios de inclusión de pacientes basados en la presencia de determinados marcadores moleculares puede ser incluso más efectiva, como se ha demostrado en pacientes con melanoma. Por todos ello, los trabajos de estos dos investigadores han inspirado nuevas ideas para combinar diferentes estrategias destinadas a regular la función de inmunovigilancia frente a tumores por parte del sistema inmunitario, con el objetivo de eliminar de forma eficiente las células tumorales. Un gran número de ensayos basados en la terapia de punto de control están actualmente en curso contra la mayoría de tipos de tumores, a la vez que nuevas estrategias basadas en la regulación de la función de los co-receptores de las células T están en el portafolio de las empresas farmacéuticas. La Figura 4 da una idea de esta magnitud, al representar los ensayos clínicos representados en la plataforma *ClinicalTrials.gov*, donde los ensayos basados en *puntos de control* representan aproximadamente un 10% del total de ensayos registrados.

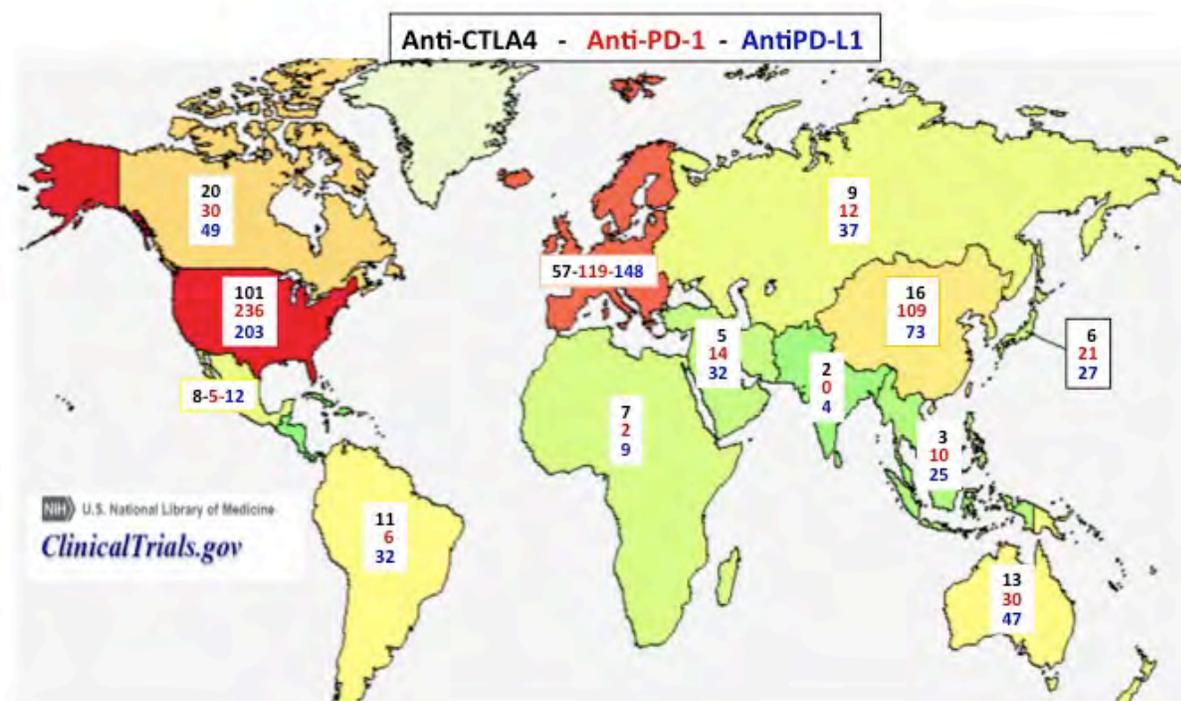


Figura 4. Ensayos clínicos sobre inmunoterapia de los puntos de control. Los datos corresponden a los ensayos en curso en la plataforma *ClinicalTrials.gov* en el mes de noviembre de 2018. De un total de unos 10.000 ensayos registrados, los relativos a la inmunoterapia basados CTLA-4, PD-1 y PD-L1 representan cerca de un 10%. La introducción de inmunoterapia combinada está ofreciendo mejoras significativas en la terapia de algunos tipos de cáncer. Los números corresponden a los ensayos en curso con cada uno de los co-receptores o ligandos.

LOS CO-RECEPTORES EN EL SISTEMA INMUNE

A diferencia de los mecanismos de regulación hormonal, donde la unión de la hormona a su receptor inicia todos los eventos de señalización, incluida la propia regulación de la respuesta, en el sistema inmune, la respuesta primaria de la célula T a través del TCR, viene regulada por otras interacciones en las que participan un conjunto de moléculas presentes en la célula T y que

denominamos globalmente co-receptores (Fig. 3). Estos co-receptores pueden intensificar o atenuar la respuesta a través del TCR, por ejemplo, mediante la interacción con una célula presentadora de antígeno (APC). Entre estos conjuntos de co-receptores CTLA-4 y PD-1 fueron identificados como moléculas importantes en la función del sistema inmune. La activación de CTLA-4 a través de su ligando B7.1 o B7.2 conduce a la anergia de la célula T, impidiendo su función. Es por tanto importante para

prevenir patologías relacionadas con la exacerbación de la autoinmunidad. Curiosamente, paralelo a CTLA-4 existe un co-receptor, CD28 que, reconociendo los mismos ligandos conduce al efecto contrario, promoviendo una sobreactuación a través del TCR. Sin embargo, la afinidad de CD28 por estos ligandos es mucho menor que la que presenta CTLA-4. Por tanto, el uso de anticuerpos neutralizantes frente a CTLA-4, no solo va a impedir su acción negativa sobre la respuesta dependiente del TCR, sino que va a facilitar que ésta aumente si los ligandos de la familia de B7 son capaces de activar a CD28. Con respecto a los ligandos de la familia de B7, estos se expresan de forma prominente en células presentadoras y en diversos linajes del sistema inmune. Esta es la base de la inmunoterapia frente a CTLA-4.

Como ya se ha mencionado, otro de los co-receptores importantes en la función de la célula T es PD-1 y su ligando puede ser PD-L1 o PD-L2 (12). El resultado de la interacción de PD-1 con su receptor es la inducción de una parada en la respuesta de la célula T y el inicio de la señalización que conduce a la muerte celular, privando por tanto al paciente de la capacidad de inmunovigilancia frente a tumores que ejercen los linfocitos T. A diferencia de lo que sucede con CTLA-4 y sus ligandos, los de PD-1, además de estar muy expresados en células del linaje linfóide y mielóide pueden estar presentes en otros tipos celulares, incluyendo algunos tumores. Por tanto, el bloqueo de PD-1 elimina la función inmunosupresora de sus ligandos y permite desarrollar una respuesta importante frente al tumor (10,11). Mención especial merecen las células del entorno tumoral, como son los macrófagos y los fibroblastos asociados al tumor (los *tumor associated macrophages* y *tumor associated fibroblasts*, TAMs y TAFs). Estas células son ‘educadas’ por la célula tumoral para expresar un alto contenido de PD-L1 y PD-L2, sobre todo los TAMs. Éste es un mecanismo muy eficiente de escape tumoral pues, además de proporcionarle un ambiente que favorece metabólicamente la proliferación del tumor, a través de la expresión de los ligandos de PD-1 se consigue suprimir la función de los linfocitos T, entre otros la actividad de los linfocitos CD8⁺ (13,14). Nuevamente, éste es un mecanismo de regulación de la función de la célula T que es importante en la prevención de diversas patologías relacionadas con su sobre-activación (1,15). De hecho, patologías autoinmunes semejantes al lupus se han relacionado con la represión de respuestas dependientes de PD-L1/PD-L2 (16,17). De igual manera a lo descrito para CTLA-4, la inmunoterapia basada en el uso de anticuerpos neutralizantes frente a PD-1 previene la pérdida de las células T implicadas en la respuesta frente a antígenos tumorales. Una de las alternativas que se han explorado en el sistema PD-1/PD-L1 es la actuación sobre el ligando, en vez de hacerlo sobre el receptor expresado en linfocitos T. Esta estrategia mantiene la capacidad de activación de la célula T, pero impide la señalización negativa que ejercen las células que presentan estos ligandos en su superficie, al menos en el caso de PD-L1. Esta pauta terapéutica está en

pleno desarrollo y permite combinaciones de anticuerpos que regulan *puntos de control* de forma muy amplia. Otro aspecto importante es el mecanismo por el que la célula tumoral promueve la sobreexpresión de PD-L1 y PD-L2 en las células de su entorno. Se sabe que uno de los factores implicados en la expresión de estos ligandos es el factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1 α . De esta manera, el desarrollo de mecanismos pro-angiogénicos asociados a la proliferación tumoral modula la expresión del ligando y por tanto previene que las células T efectoras actúen sobre el tumor. Además de HIF-1 α , la regulación de la expresión de PD-L1 y PD-L2 está mediada por otros factores de transcripción. De hecho, es muy posible que algunos fármacos con eficacia terapéutica actúen sobre la expresión de estos ligandos, bloqueando su expresión y por tanto favoreciendo la acción de las células T. Como ya se ha mencionado anteriormente, algunos tumores expresan PD-L1 y/o PD-L2, por lo que, independientemente de su acción sobre las células de apoyo, estos son capaces de ejercer una acción inmunosupresora directa sobre el sistema inmune.

¿CÓMO VEMOS EN LA ACTUALIDAD LA PATOLOGÍA ONCOLÓGICA?

Para poner en valor lo que supone la inmunoterapia basada en la actuación sobre los *puntos de control* hay que señalar que, casi en igualdad de condiciones, el tratamiento de los diferentes tipos de cáncer implica el uso de procedimientos complementarios sin que se pueda determinar la eficacia de la pauta terapéutica a utilizar, pues ésta depende de la naturaleza del cáncer y de las condiciones del paciente, orientándose la terapia hacia lo que ha venido en denominarse medicina estratificada, un paso más allá de la medicina de precisión o personalizada, cuya aplicación puede resultar compleja. Al igual que la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia han permitido grandes avances en el tratamiento de los cánceres y constituyen los pilares terapéuticos frente a estas enfermedades (Figura 5). Como ejemplo de la relevancia de la cirugía, baste mencionar su enorme efectividad en la terapia frente al melanoma o el cáncer colorrectal, sobre todo en las fases iniciales de estos. Desde 2011, a estos pilares de acción, se ha incorporado con notable éxito la inmunoterapia basada en el control de los *puntos de control*. No se escapa que ésta es muy dependiente de la capacidad del sistema inmune para actuar sobre la célula tumoral, evitando su proliferación y diseminación. Por esta razón, tumores sobre los que las células del sistema inmune apenas actúan van a ser resistentes a la inmunoterapia dependiente de los *puntos de control*. No obstante, la combinación de terapias frente al cáncer está ofreciendo escenarios que antes eran imprevisibles. Así, el tratamiento mediante radioterapia es capaz de sensibilizar tumores que antes eran refractarios a la inmunoterapia, abriendo un campo nuevo con múltiples posibilidades; por otro lado, algunos fármacos interfieren con el tratamiento inmunoterapéutico, reforzando la necesidad de avanzar en el diseño de protocolos eficaces (15,18).

Las estrategias en terapias oncológicas



Figura 5. Principales procedimientos terapéuticos en oncología. El campo de la oncología combina una serie de estrategias terapéuticas cuya eficacia depende del tipo de cáncer, del grado de desarrollo del mismo y del paciente. Además de los cuatro pilares clásicos: cirugía, quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia, nuevas estrategias están apareciendo en el campo, como son la tecnología basada en la generación de quimeras del TCR (CAR-T) y la nanomedicina. Combinaciones de estas alternativas terapéuticas están demostrando una gran eficacia, como son la radioterapia junto con la inmunoterapia, observándose una significativa mejora en la acción de los agentes inmunoterapéuticos.

Aunque la inmunoterapia ha venido a posicionarse como un arma terapéutica de gran eficacia, su éxito depende en buena manera del conocimiento de las bases moleculares de la patología oncológica, como veremos más adelante. Este conocimiento del ‘*enfermosoma*’ como conjunto de datos genéticos, proteómicos, metabolómicos y del entorno del paciente está especialmente desarrollado en las patologías oncológicas. Hace ya casi una década, en una publicación pionera sobre la integración de la información de todo tipo que se dispone sobre distintas patologías humanas, quedó evidente de manera expresa que la ‘*molecularización*’ de los procesos oncológicos estaba en la base del enorme éxito de las investigaciones realizadas por diversos grupos de todo el mundo (19). Es más, frente a la definición de síndromes en otras patologías donde las bases moleculares tal vez resultan excesivamente complejas, la comunidad científica ha sido capaz de identificar en el caso del cáncer los eventos moleculares que lo caracterizan. A su vez, esto ha permitido el diseño de nuevas estrategias terapéuticas, tanto sobre la célula tumoral como sobre mecanismos de prevención a través de la estimulación del sistema inmune. Curiosamente, muchas de estas dianas moleculares se repiten con cierta frecuencia no solo en diversos tipos de cáncer, sino también en otras patologías, por lo que esta visión integrada del *enfermosoma* marca un camino hacia la prevención de muchas patologías. Baste señalar los avances en los inhibidores de la proliferación del virus de la hepatitis C (mediante el uso de antivirales de acción

directa o AADs) y su posterior complicación en el cáncer hepatocelular, con una tasa de éxito que ronda el 95%, o los inhibidores de BRAF que han supuesto un primer frente en el tratamiento de algunos tumores complejos, como es el melanoma. Se ha llegado incluso a diseñar inhibidores muy selectivos frente a algunas dianas moleculares, como es el caso de la isocitrato deshidrogenasa tipo I mutada y su papel en tumores tan complicados como son los gliomas y glioblastomas (20,21).

En resumen, este conocimiento del *enfermosoma* humano como un conjunto de datos que integran la situación real del paciente oncológico, está permitiendo una estratificación de estos y por tanto el diseño de protocolos terapéuticos seguros y eficaces, minimizando los efectos adversos del tratamiento de elección. Como campo que requiere un especial esfuerzo, aquí cabe mencionar la dificultad que está suponiendo la implantación de estas pautas en el paciente pediátrico o infantil.

CONSIDERACIONES FINALES

El impacto de la inmunoterapia en todos sus frentes, incluido el cáncer, tiene como contrapartida el elevado coste de estos tratamientos y su sostenibilidad por los sistemas de salud. Los costes estimados en 2020 rondan los 150.000 millones de euros, lo que supone un reto en la adecuada estratificación de los pacientes (7,22).

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a Marina Mojena y Adrián Povo-Retana por la revisión crítica del texto. La financiación de la Comunidad de Madrid (S2017/BMD-3686), Fundación Ramón Areces (CIVP18A3864) y RTC-2017-6283 y Fondos FEDER.

REFERENCIAS DESTACADAS

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992; 11(11): 3887-95.

Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996; 271: 1734-36.

Kwon ED, Hurwitz AA, Foster BA, *et al.* Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8099-103.

Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; 11_ 141-51.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; 192: 1027-34.

Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, *et al.* Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 4712-17.

Iwai Y, Terawaki S, Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol* 2005; 17: 133-44.

REFERENCIAS

1. Chamoto K, Al-Habsi M, Honjo T. Role of PD-1 in Immunity and Diseases. *Curr Top Microbiol Immunol* 2017; **410**: 75-97. 10.1007/82_2017_67
2. Kaiser J, Couzin-Frankel J. Cancer immunotherapy sweeps Nobel for medicine. *Science* 2018; **362**: 13. 10.1126/science.362.6410.13
3. Yoshida T, Jiang F, Honjo T, Okazaki, T. PD-1 deficiency reveals various tissue-specific autoimmunity by H-2b and dose-dependent requirement of H-2g7 for diabetes in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 3533-8. 10.1073/pnas.0710951105
4. Mouraviev V, Gleave ME. A meaningful legacy: urologists as Nobel Prize laureates. *Can J Urol* 2003; **10**: 1737-42.
5. Elion EB, Callahan SW, Hitchings GH, Rundles RW, Laszlo J. Experimental, clinical, and metabolic studies

of thiopurines. *Cancer Chemother Rep* 1962; **16**: 197-202.

6. Beutler E, McMillan R. Bone marrow transplantation in acute leukemia. *Blood Cells* 1982; **8**: 485-500.
7. Nass SJ, Rothenberg ML, Pentz R, *et al.* Accelerating anticancer drug development - opportunities and trade-offs. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; **15**: 777-86. 10.1038/s41571-018-0102-3
8. Ngwa W, Irabor OC, Schoenfeld JD, Hesser J, Demaria S, Formenti SC. Using immunotherapy to boost the abscopal effect. *Nat Rev Cancer* 2018; **18**: 313-22. 10.1038/nrc.2018.6
9. Stanczak MA, Siddiqui SS, Trefny MP, *et al.* Self-associated molecular patterns mediate cancer immune evasion by engaging Siglecs on T cells. *J Clin Invest* 2018; **128**: 4912-23. 10.1172/jci120612
10. Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* 2006; **27**: 195-201. 10.1016/j.it.2006.02.001
11. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol* 2007; **19**: 813-24. 10.1093/intimm/dxm057
12. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001; **2**: 261-8. 10.1038/85330
13. Blank C, Brown I, Peterson AC, *et al.* PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer Res* 2004; **64**: 1140-5.
14. Iwai Y, Terawaki S, Honjo, T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol* 2005; **17**: 133-44. 10.1093/intimm/dxh194
15. Chamoto K, Chowdhury PS, Kumar A, *et al.* Mitochondrial activation chemicals synergize with surface receptor PD-1 blockade for T cell-dependent antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; **114**: E761-e770. 10.1073/pnas.1620433114
16. Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol* 2013; **14**: 1212-8. 10.1038/ni.2762
17. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; **11**: 141-51.
18. Formenti SC, Rudqvist NP, Golden E, *et al.* Radiotherapy induces responses of lung cancer to CTLA-4 blockade. *Nat Med* 2018; **24**: 1845-51. 10.1038/s41591-018-0232-2
19. Goh KI, Cusick ME, Valle D, Childs B, Vidal M, Barabasi AL. The human disease network. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 8685-90. 10.1073/pnas.0701361104

20. Abedalthagafi M, Barakeh D, Foshay KM. Immunogenetics of glioblastoma: the future of personalized patient management. *NPJ Precis Oncol* 2018; **2**: 27. 10.1038/s41698-018-0070-1
21. Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Biological Role and Therapeutic Potential of IDH Mutations in Cancer. *Cancer Cell* 2018; **34**: 186-95. 10.1016/j.ccell.2018.04.011
22. Verma V. Economic sustainability of immune-checkpoint inhibitors: the looming threat. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; **15**: 721-2. 10.1038/s41571-018-0086-z

Premio Nobel en Química 2018. Evolución dirigida (mejora genética) de enzimas, péptidos y anticuerpos

Juan-Ramón Lacadena Calero

El Premio Nobel en Química 2018 fue otorgado por la Real Academia de Ciencias de Suecia en una mitad a la Dra. Frances H. Arnold “por la evolución dirigida de las enzimas” y en otra mitad conjuntamente a los Dres. George P. Smith y Sir Gregory P. Winter “por la presentación en fagos de péptidos y anticuerpos”.

El contenido formal de la Genética –definida como la “ciencia que estudia el material hereditario bajo cualquier nivel o dimensión”– consiste en responder a diversas preguntas relativas a los genes: ¿qué son? ¿cómo se organizan y transmiten? ¿cómo y cuándo se expresan? ¿cómo cambian? y ¿cuál es su destino en el espacio y en el tiempo? Al analizar las historias paralelas de la Genética – que nació en 1900 con el redescubrimiento de las leyes de Mendel– y los Premios que empezó a otorgar la Fundación Nobel en el año 1901, se puede comprobar que las preguntas antes mencionadas fueron contestadas por científicos galardonados con el Premio Nobel. Todas, excepto la última pregunta que tiene que ver con la evolución. No hay duda que a lo largo de los años ha habido eminentes evolucionistas genetistas (Theodosius Dobzhansky, Francisco J. Ayala, por citar solamente algunos) que podían haber sido galardonados con el premio Nobel si el tema de la evolución fuera tenido en cuenta dentro de las áreas contempladas por la Fundación Nobel. Pero no ha sido el caso. No obstante, para ser más preciso, aquí tendría que mencionar como una excepción parcial al Dr. Jack W. Szostak que, siendo galardonado en el año 2009 con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina “por el descubrimiento de cómo los cromosomas son protegidos por los telómeros y la enzima telomerasa”, sin embargo, posteriormente se dedicó a investigar la evolución prebiótica. En efecto, en 1991, Szostak y sus colaboradores dieron un giro de 180° en sus investigaciones centrando su trabajo en el estudio de la evolución en el tubo de ensayo de moléculas funcionales de ARN y otras moléculas. Para ello pusieron a punto la técnica de “selección *in vitro*” para estudiar la evolución de moléculas biológicas para funciones predeterminadas, como la capacidad de catalizar una reacción química específica o unirse a una molécula diana. De alguna manera, esa “selección *in vitro*” podría ser considerada como una anticipación del Premio Nobel en Química 2018 que ahora conmemoramos.

Por primera vez en la historia de los Premios Nobel, este año 2018 ha aparecido el término “evolución” entre los premios otorgados. Efectivamente, el Premio Nobel en Química 2018 ha sido otorgado por la Real Academia de Ciencias de Suecia a la Dra. Frances H. Arnold “por la evolución dirigida de las enzimas”. Aún más, la nota de prensa de la institución se titula “A (r)evolution in

chemistry” con la letra *r* entre paréntesis para que destaque el término *evolution*. Algunos autores utilizan el término “evolución *in vitro*”.

Como señala el informe, “el Premio Nobel en Química se ha inspirado en el poder de la evolución y ha utilizado los mismos principios –el cambio genético y la selección– para desarrollar proteínas que resuelvan problemas químicos a la humanidad”. Es interesante señalar que las tres *Nobel lectures* pronunciadas por los galardonados incluyen la palabra *evolution* en sus respectivos títulos (ver 5, 6, 7).

El material hereditario –el ADN– tiene cuatro propiedades genéticas fundamentales: la replicación (ser capaz de conservarse a sí mismo), la mutación (fundamento de la variabilidad genética necesaria para que exista la evolución), la recombinación (que potencia la variabilidad genética) y ser portador de información capaz de ser expresada. La mutación y la selección natural son la base de la evolución. Si existiera una vida extraterrestre, su material hereditario no tendría por qué ser necesariamente el ácido desoxirribonucleico, pero sí tener sus mismas propiedades genéticas antes mencionadas.

Las reflexiones anteriores vienen a cuento porque en la investigación de la Dra. Frances H. Arnold –la “evolución dirigida de enzimas”– utilizó las mutaciones inducidas en los genes que codifican para la enzima subtilisina, que degrada la caseína en medio acuoso, “mejorándola” mediante selección artificial hasta hacerla capaz de trabajar en un medio con disolvente orgánico (la dimetilformamida). Es decir, se trata de un proceso de “mejora genética de enzimas”, lo mismo que existe la mejora genética de plantas o la mejora genética de animales. Podría decirse que este es el segundo premio Nobel que se concede dentro del campo de la Mejora Genética. El primero fue el ingeniero agrónomo Norman E. Borlaug que recibió el Premio Nobel de la Paz en 1970 “por su contribución a la revolución verde”.

El método de mejora de la enzima utilizado por la Dra. Arnold en 1993, basado en los procesos de mutación y selección (1,2), fue completado por la técnica desarrollada después por Willem Stemmer (1994) de “apareamiento” (entre comillas) de enzimas en el tubo de ensayo, consistente realmente en la “barajadura del ADN”, cortando y uniendo fragmentos de ADN como equivalente al proceso genético de recombinación. Quizás, Stemmer hubiera compartido el premio Nobel con Arnold si no hubiera fallecido en el año 2013.

Las investigaciones de Arnold le han permitido obtener enzimas capaces de catalizar reacciones químicas hasta ahora inexistentes en la naturaleza que permiten obtener nuevos fármacos, así como aumentar la velocidad de

reacción, disminuir los subproductos innecesarios y excluir los metales pesados necesarios en la química tradicional, reduciendo el impacto ambiental.

A estos trabajos hay que añadir la posibilidad de obtener energía renovable, por ejemplo, desarrollando enzimas capaces de transformar azúcares en isobutanol que puede ser utilizado tanto para la producción de biocombustibles como plásticos “ecológicos” (“greener”).

La otra mitad del premio Nobel de Química de este año, otorgado a los Dres. George P. Smith y Sir Gregory P. Winter, premia las investigaciones sobre la utilización de fagos para identificar los genes desconocidos de proteínas conocidas, de manera que el fago actúa como un enlace entre el fenotipo (la secuencia proteica) y el genotipo (la secuencia del ADN del gen que la codifica).

En 1985 el Dr. George P. Smith puso a punto la técnica de “presentación de péptidos en fagos” (*phage display*), desarrollando bibliotecas de fagos para presentación de péptidos (3). Para ello se siguen las siguientes etapas: 1) inserción del ADN de interés en el gen que codifica para una proteína externa de la cápside del fago, 2) expresión del péptido en cuestión en la superficie del fago, 3) selección del fago por unión del péptido con la diana (ligando) de interés, 4) amplificación por infección de bacterias, y 5) desarrollo de la biblioteca de fagos para presentación de péptidos.

En 1990, el otro galardonado Sir Gregory P. Winter, utilizando la técnica de Smith, consiguió la presentación en fagos de un fragmento de anticuerpo plegado y totalmente funcional (4). La evolución dirigida de proteínas de unión se ha convertido en un protocolo altamente eficaz para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos. El primer anticuerpo terapéutico totalmente humano obtenido mediante presentación en fagos fue el Adalimumab (aprobado en el año 2002), que se une con una muy alta afinidad a la proteína TNF- α , que es una

proteína pro-inflamatoria. El Adalimumab se usa en tratamiento de la artritis reumatoide, la psoriasis y la inflamación intestinal. Como señala el informe de la Institución Nobel, una amplia gamma de anticuerpos humanos han sido y serán identificados utilizando la técnica de presentación en fagos (*phage display*) para ser usados en la clínica en la lucha contra las enfermedades inflamatorias y contra el cáncer.

REFERENCIAS

1. Chen K, Arnold FH. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc Nat Acad Sci* 1993; 90:5618-22.
2. Arnold FH. Engineering proteins for unusual environments. *FASEB J* 1993; 7:744-9.
3. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228:1315-17.
4. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990; 348:552-4.
5. Arnold FH. Innovation by evolution: Bringing new chemistry to life. Nobel lecture 2018.
6. Smith GP. Phage display: Simple evolution in a Petri dish. Nobel lecture 2018.
7. Winter, G. Harnessing evolution to make medicines. Nobel lecture 2018.

De todas estas investigaciones –que la Institución Nobel denomina abreviadamente como la “revolución de la evolución dirigida”– nos hablará el Profesor César Nombela, Académico de Número de esta Real Academia Nacional de Farmacia.

Premio Nobel de Química 2018: evolución dirigida e ingeniería de proteínas

César Nombela

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense e IRYCIS Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

ABSTRACT: The 2018 Nobel Prize of Chemistry has acknowledged the value of research directed to evolve natural enzymes in order to improve its catalytic capacities such as stability, specificity. The laureate Frances Arnold used procedures based on mutation and selection to generate modified enzymes that even perform abiological activities not known to have taken place in living cells. On the other hand, the award also goes to George P. Smith and Gregory Winter whose efforts to generate, select and improve antibodies using the technique of phage “display” made it possible to produce antibodies without animal immunization in simple systems. The work of the awardees has already generated many applications for the synthesis of drugs, biofuel, detergents and many other products, as well as it leads to emergence of a new Immunotherapy addressed to deal with many human diseases such as cancer or autoimmune processes.

RESUMEN: El Premio Nobel de Química 2018 ha reconocido en primer lugar el valor de investigaciones destinadas a mejorar las capacidades de enzimas naturales, en su vertiente catalítica, de estabilidad o de especificidad de la reacción. Utilizando diversos procedimientos de mutación y selección, la premiada Frances Arnold ha logrado generar enzimas que incluso catalizan reacciones abiológicas que hasta ahora no tenían lugar en los seres vivos. Por otro lado, con este galardón se reconoce a los investigadores George P. Smith y Gregory Winter cuyos esfuerzos para generar, seleccionar y mejorar anticuerpos mediante la técnica de “despliegue en fagos” conducen a la producción de anticuerpos sin inmunización de animales, en sistemas sencillos. El trabajo de los galardonados tiene ya numerosas aplicaciones en síntesis de fármacos, combustibles, detergentes y otros muchos productos, así como en el auge de la Inmunoterapia de enfermedades humanas como el cáncer y patologías autoinmunitarias.

Corresponding Author: cnombela@farm.ucm.es *An Real Acad Farm* Vol. 84, N° 4 (2018), pp. 397-402

En la edición de 2018, la Academia Sueca de Ciencias concedía el Premio Nobel de Química a tres distinguidos científicos: la doctora Frances Arnold (Instituto Tecnológico de California), recibía la mitad de la dotación por su trabajo pionero en evolución forzada de proteínas en condiciones controladas de laboratorio, para modificar y mejorar las capacidades catalíticas de diversas enzimas; por otro lado, la otra mitad de la dotación se otorgaba a los doctores George P. Smith (Universidad de Missouri-Columbia) y Gregory Winter (Universidad de Cambridge) por sus trabajos que han permitido seleccionar y producir anticuerpos por procedimientos tan novedosos que no requieren inmunización de animales, sino que se basan en la clonación de genes de inmunoglobulinas en sistemas basados en bacteriófagos.

El referido organismo justificaba la concesión con estas palabras

El poder de la evolución se refleja en la diversidad de la vida. Los galardonados con el Nobel de Química 2018 han tomado control de la evolución utilizándolo para propósitos que acarrearán grandes beneficios a la condición humana. Enzimas generadas mediante evolución dirigida se emplean para fabricar biofuel o productos farmacéuticos. Los anticuerpos que se han generado mediante el procedimiento denominado “despliegue en

fagos” se pueden usar para combatir enfermedades autoinmunitarias, incluso para curar el cáncer metastásico en algunos casos.

Los laureados con el Nobel de Química de este año se inspiraron en el poder de evolución utilizando los mismos principios –cambio genético y selección– para resolver problemas químicos que tienen los humanos.

Cabe añadir que el Doctor Sir Gregory Winter ya había visto reconocido su trabajo con un galardón de gran relevancia internacional, que se concede en España, el Premio Príncipe de Asturias de Investigación Científica y Técnica 2012, galardón que entonces compartió con el norteamericano Doctor Richard A. Lerner.

EVOLUCIÓN FORZADA DE PROTEÍNAS EN EL LABORATORIO

La primera aportación del laboratorio de Frances Arnold sobre la evolución de proteínas en el laboratorio se publicó (1) en 1991. Suponía la prueba de concepto y el germen de lo que habría de desarrollar con posterioridad. La metodología disponible permitía ya entonces inducir mutaciones en determinados genes, identificar por secuenciación los cambios genéticos inducidos y correlacionar dichos cambios con el fenotipo mutante, así como las características de interés que los cambios genéticos aportan.

Como la actividad de las proteínas enzimáticas naturales funciona en ambientes acuosos, una pregunta fundamental es si cabe modificar la proteína para lograr que su actividad catalítica sea funcional en solventes orgánicos polares. Ampliar esa capacidad catalítica del medio acuoso al medio orgánico podría aportar numerosas ventajas, entre otras la catálisis en un medio en el que la contaminación microbiana se puede evitar fácilmente. El éxito de estos primeros trabajos se logró con el gen de la subtilisina E de la bacteria *Bacillus subtilis*. La subtilisina es una endopeptidasa que reconoce enlaces peptídicos con serina y que puede actuar de forma reversible, por lo que tiene aplicaciones en la síntesis de péptidos.

Por mutagénesis del gen de subtilisina E (serin-endopeptidasa) de *B. subtilis*, empleando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para construir una mini-genoteca de 300 clones del fragmento del gen de subtilisina, y tras dos rondas de mutación y selección en placas con caseína, se lograron diversos mutantes de este

gen con actividad en medio orgánico. Un mutante triple mostraba una actividad notable incrementada en dimetilformamida (85%). La secuenciación del mismo mostró que las mutaciones se situaban en las proximidades de la región de fijación del sustrato y en el centro activo de la subtilisina E (1).

La figura 1 representa un esquema de cómo se puede plantear la evolución de proteínas enzimáticas en el laboratorio. Son muchos los procedimientos para provocar mutagénesis al azar de manera que cabe pensar en cubrir todos los genes y todas las posiciones de su secuencia. Naturalmente, sabemos que muchas de estas mutaciones pueden provocar la pérdida de la proteína correspondiente en la célula o conducir a polipéptidos totalmente carentes de actividad, estabilidad u otras propiedades. Pero, las experiencias relatadas anteriormente con el gen de la subtilisina E demuestran que caben numerosos cambios mutacionales que determinen una proteína con nuevas propiedades.

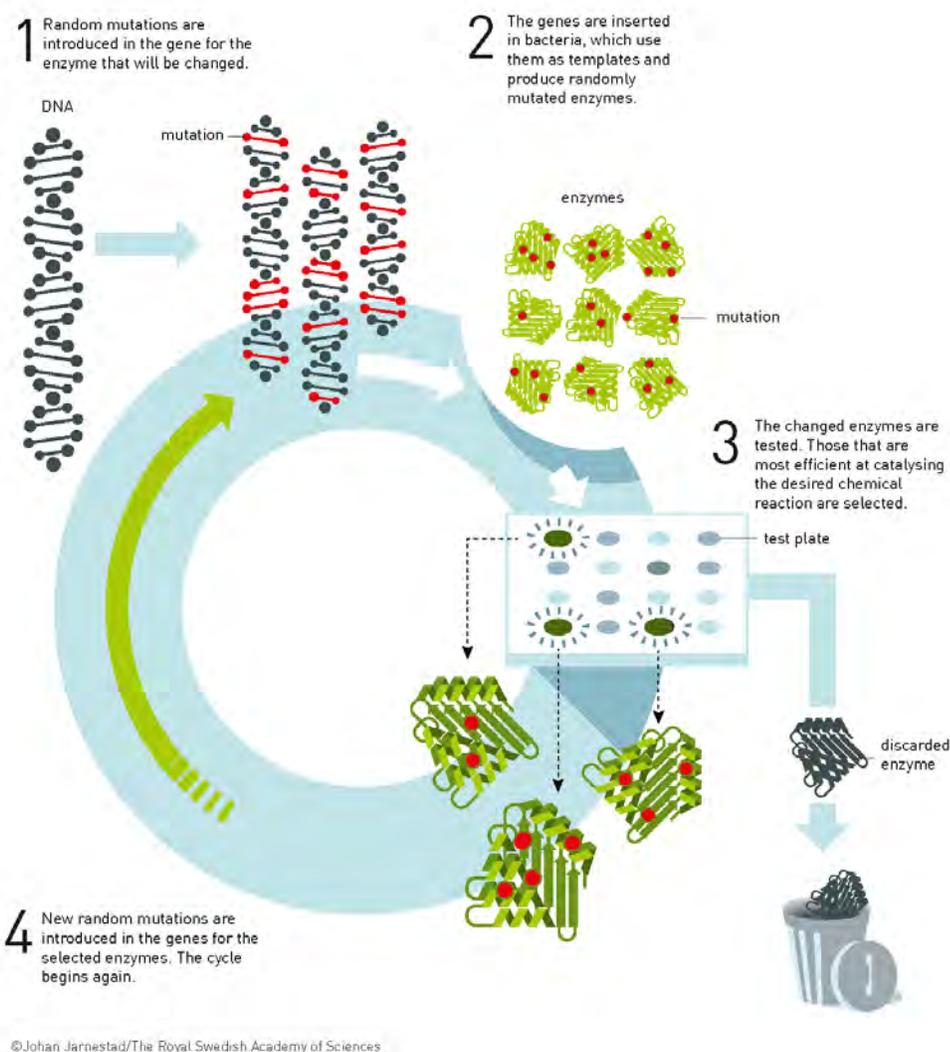


Figura 1. Esquema del proceso de modificación genética de proteínas, mediante mutación, acompañado de la selección de los mutantes con propiedades mejoradas. Tras una elección inicial, los mutantes pueden ser sometidos a sucesivas rondas de mutación y selección, de las cuales pueden derivarse proteínas con propiedades nuevas y actividad incluso abiológica. Reproducida con permiso de la Royal Swedish Academy of Sciences.

Como se esquematiza en esta figura el proceso desarrollado por la galardonada con el Premio Nobel, la Dra. Arnold, y por muchos otros laboratorios, supone incluir varias rondas más de mutación y selección, siempre que existan procedimientos experimentales para seleccionar genes mutantes que den lugar a proteínas convenientemente modificadas. Un gen mutado que muestra capacidad de codificar una proteína con nuevas propiedades enzimáticas puede ser susceptible de nuevas rondas de mutación que amplíe las mejoras aportadas. La pregunta entonces es si serán factibles muchos cambios, incluso algunos que lleven a catalizar reacciones que no sean propias de los seres vivos, precisamente por parte de proteínas que de ellos derivan.

NUEVA QUÍMICA, LA QUÍMICA QUE SOBREPASA LOS LÍMITES BIOLÓGICOS ESTABLECIDOS

La evolución forzada de proteínas en condiciones de laboratorio ha permitido logros fundamentales con aplicaciones prácticas que ya están en el mercado (2). De alguna forma esta tecnología mimetiza fenómenos que ya se han dado en la naturaleza. Por ejemplo, sabemos que las bacterias han evolucionado para hacerse resistentes a los antibióticos generando actividades enzimáticas que inactivan a los antimicrobianos (3) y que antes no existían. Igualmente, se ha producido la evolución de proteínas enzimáticas con capacidades de degradar nuevos sustratos químicos que antes no aparecían en el medio natural. En el análisis de los fundamentos de la ingeniería de proteínas que nos ocupa también cabe pensar en el diseño, una vez que el conocimiento de las secuencias de genes puede permitir predecir estructuras polipeptídicas que pudieran tener actividades biológicas determinadas, lo que llevaría a su síntesis biológica por expresión de los correspondientes genes diseñados y sintetizados en el laboratorio. Sin embargo, no cabe duda de que plantear en el laboratorio las condiciones que utiliza la naturaleza para la evolución (mutación y selección) ha resultado mucho más productivo (2).

La ingeniería del Citocromo P450 y otras hemoproteínas, que en distintas modalidades existen en la naturaleza en muchos organismos, incluidas las bacterias, ha resultado de gran utilidad en manos de la galardonada Frances Arnold. Las actividades de Citocromo P450 para catalizar reacciones de hidroxilación, epoxidación, oxidación heteroatómica, nitración, etc. se han podido adaptar por evolución dirigida con diversos propósitos (2) que, entre otros, incluyen (i) Actividad en ambientes no habituales (solventes orgánicos); (ii) modificación de la actividad para actuar sobre sustratos diferentes; (iii) incremento de la termo-estabilidad; (iv) cambio en la enantio-selectividad de la reacción catalizada.

Ejemplos recogidos en la referencia 2 se refieren a la producción de estereoisómeros con alta selectividad mediante ciclopropanación, catalizada por una variante de globina de *B. subtilis*, que ha resultado de utilidad en la producción del antitrombótico ticagrelor. Una variante

mutada de citocromo C de *Rhodothermus marinus* permitió lograr un enzima con actividad catalítica abiológica capaz de estimular la formación de enlaces C-Si y C-B. Compuestos con estos enlaces encuentran aplicaciones en la producción de contrastes, elastómeros, etc. Finalmente, tras diez rondas de mutación y selección de citocromo P450 de *Labrenzia aggregata* se obtuvieron variantes de esta proteína, que acumulaban hasta doce cambios de aminoácidos, algunos en posiciones alejadas de centro activo de la proteína. Esta proteína ejerce nuevas actividades catalíticas enzimáticas, desconocidas en los seres vivos y en la química de síntesis, como puede ser la epoxidación o la funcionalización de alquenos (2).

El repertorio de posibilidades de aplicación de la ingeniería de proteínas, basada en la evolución forzada en el laboratorio, se ha seguido ampliando. La plasticidad de las enzimas para adaptarse a nuevos desempeños, en función de cambios mutacionales en su estructura, ha continuado ampliándose de forma notable. Algunos ejemplos incluyen, la modificación de las capacidades de plegamiento de las proteínas, con su consiguiente aplicación para su estudio en las células o su empleo en Biotecnología (4); la generación de nanoestructuras proteicas covalentemente enlazadas (5); la formación de consorcios celulares estructurados sintéticos (6); la alquilación selectiva de enlaces C-H mediante catálisis basada en el Fe (7).

PRODUCIR ANTICUERPOS SIN INMUNIZACIÓN

Uno de los capítulos más fascinantes de la Inmunología, escrito en el pasado siglo, consistió en desvelar las bases bioquímicas y genéticas de la inmunidad humoral. Conocida la estructura de los anticuerpos (Edelman y Porter), integrados por cadenas proteicas pesadas y ligeras, que se ensamblan entre sí, con regiones de secuencias constantes o variables, quedaba por establecer los fundamentos genéticos de la capacidad de los metazoos de producir una “aparentemente ilimitada” variedad de anticuerpos, es decir de inmunoglobulinas.

El reconocimiento de todo tipo de antígenos, produciendo una respuesta específica, demandaba el que la codificación genética de las proteínas inmunoglobulinas pudiera acomodarse en unos pocos genes con capacidad de combinar sus secuencias. Se trata de una capacidad muy amplia para dar lugar a millones de combinaciones posibles. Por inmunización de un animal con un antígeno cabe obtener suero de su sangre, que será portador de una notable variedad de anticuerpos, muchos de ellos inmunoglobulinas diferentes capaces de reconocer a dicho antígeno y reaccionar con él. Son las preparaciones de anticuerpos policlonales.

El descubrimiento de los anticuerpos monoclonales, en el inicio de los ochenta (Köhler y Milstein) fue posible gracias a la posibilidad de inmortalizar clones de células productoras de anticuerpos (células B) capaces de segregar ahora ya una sola inmunoglobulina. La utilidad de sueros de anticuerpos policlonales, tenía ya una larga tradición en Medicina, de hecho uno de los objetivos de la Farmacia

fue producir sueros medicinales desde el comienzo del siglo XX. Los anticuerpos monoclonales se revelaban entonces con enormes posibilidades, pero era necesario perfeccionar los procedimientos para su producción y su potencial aplicación en tratamientos. Es más, el manejo de anticuerpos de diversos animales, ratón en especial, debía dar paso a la utilización de anticuerpos humanos, para el tratamiento en la clínica humana. Ese era el desiderátum que estaba a punto de abrirse y que comenzó a llegar cuando el galardonado con este premio nobel de Química 2018, George P. Smith, publicó el primer trabajo de los que abrieron el desarrollo de la técnica denominada “despliegue en fagos” (8) (*phage display*).

Mediante esta metodología se pudo producir anticuerpos sin inmunizar un animal o un ser humano, clonando genes de inmunoglobulinas en el DNA de bacteriófagos de los más sencillos que se conocen. Se trata de fagos filamentosos, cuyo material genético es DNA

monocatenario, en el cual se pueden insertar genes de inmunoglobulinas y lograr su expresión eficiente al tiempo que plantear la selección de clones capaces de producir la inmunoglobulina de interés. Es la bacteria infectada por el fago recombinante la que dará lugar a la proteína inmunoglobulina seleccionada.

Como se ilustra en la Figura 2, Smith desarrolló este vector fágico en principio para clonar cualquier gen, no solo de inmunoglobulinas. El bacteriófago recombinante, que ha incorporado el fragmento génico puede expresar la proteína como parte de la proteína de su cápsida (virión) y ser reconocida por algún reactivo que sea capaz de interactuar con ella, en este caso un anticuerpo también. En este trabajo (8) y en otro posterior (9) se ponía de manifiesto la enorme potencialidad de este método para generar una gran variedad de clones y seleccionar algunos portadores de péptidos específicos con un poder de discriminar entre uno por cada 10^6 - 10^8 .

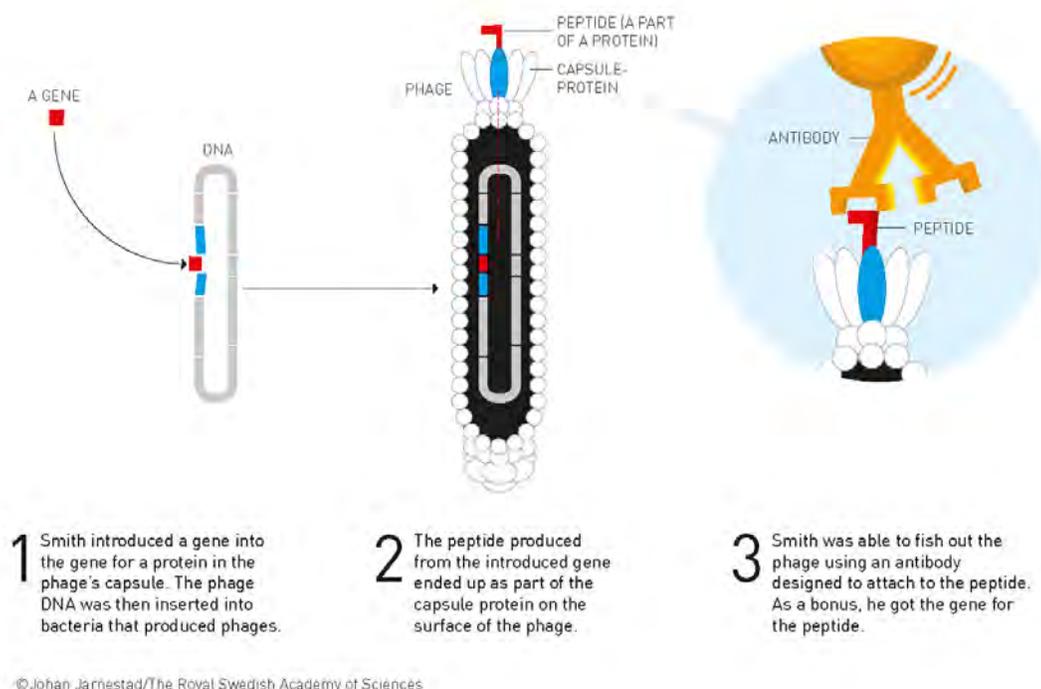


Figura 2. La introducción de las secuencias de un determinado gen da lugar al DNA de un fago filamentosos recombinante. El trabajo de Smith puso de manifiesto que la multiplicación de dicho fago en la bacteria a la que afecta conduce a la expresión de proteína recombinante, que expresa el gen clonado. Con anticuerpos frente a esa proteína cabe seleccionar clones del fago recombinante de interés con alta eficacia. Es el origen de la técnica de “despliegue en fagos”. Reproducida con permiso de la Royal Swedish Academy of Sciences.

La potencialidad de este sistema para generar y seleccionar polipéptidos representativos de las inmunoglobulinas llegó pronto de la mano de otro galardonado, Greg Winter, que lo utilizó para seleccionar clones del fago con fragmentos de inmunoglobulina. De ellos se pueden seleccionar aquellos que interactúan con un antígeno determinado, todo ello en función del poder de selección de la técnica, al que hemos aludido. La prueba de concepto del potencial de este sistema se formula en el trabajo publicado por Winter y sus colaboradores ya en 1990 (10). En dicha publicación documentan cómo

podieron seleccionar fragmentos de anticuerpos frente a lisozima de gallina, cuya especificidad era tan alta que no reaccionaban frente a la lisozima de pavo. El trabajo ponía de manifiesto la alta resolución del sistema así como la posibilidad de abrir el camino para la producción de anticuerpos humanizados y humanos. Los primeros responden a una estructura híbrida, murino-humano, y los segundos constituyen inmunoglobulinas con las estructura completa propia de la de los humanos, de indudable interés para la terapia.

La Figura 3 ilustra el procedimiento de Winter de despliegue en fagos. La incorporación de fragmentos de genes de inmunoglobulinas al DNA del bacteriófago permite su expresión en el virión como parte de las proteínas de la cápsida. Todo ello posibilita la selección de aquellos clones que son portadores del fragmento del anticuerpo de interés. Sucesivas rondas de mutación de estos genes y selección basada en el reconocimiento del antígeno permiten ampliar la especificidad. De nuevo, mediante mutación y selección se puede provocar la

evolución de genes de inmunoglobulinas en condiciones de laboratorio, sin que sea preciso inmunizar a un animal ni crear un hibridoma a partir del animal inmunizado.

El sistema se ha revelado como muy versátil hasta el punto de propiciar la inserción del fragmento génico del anticuerpo en las más variadas regiones del gen de la proteína del fago (11), lo que permite su expresión en los más diversos lugares del virión de acuerdo con los propósitos experimentales que se persigan.

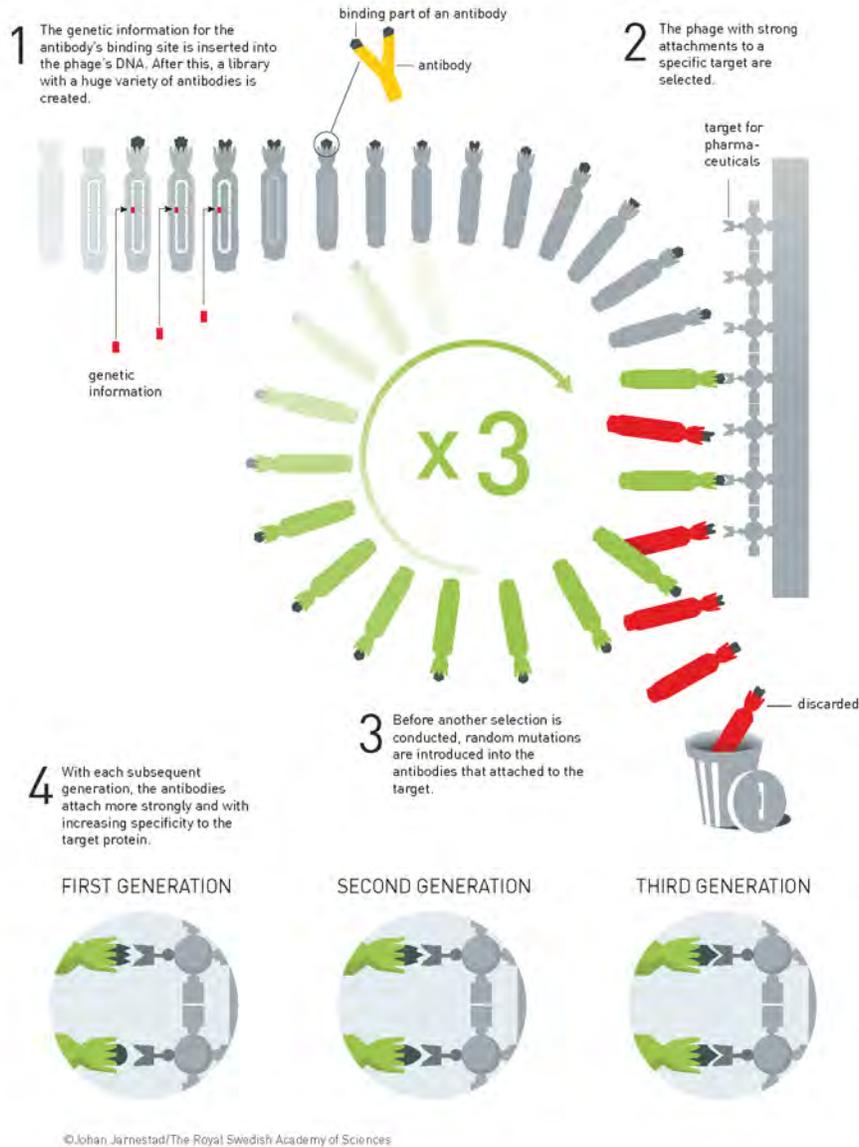


Figura 3. El procedimiento de Winter para generar fagos recombinantes, portadores de secuencias de inmunoglobulinas, implica clonar en el DNA del fago la información genética propia de las regiones de la inmunoglobulina que determinan el reconocimiento de antígenos a través de sus epítomos. El sistema permite clonar fagos recombinantes, que expresan los fragmentos de reconocimiento de los antígenos, así como someter a esos clones a rondas de mutación y selección para generar las formas más adecuadas del anticuerpo.

LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES, UNA PARTE DE NUEVO PARADIGMA DE LA INMUNOTERAPIA

La posibilidad de diseñar y producir con precisión anticuerpos monoclonales ha puesto a estos materiales en el centro de la Inmunoterapia, la que surgiera hace más de un siglo con la introducción de las vacunas y los sueros medicinales. Hoy la Inmunoterapia plantea la modulación farmacológica de multitud de dianas moleculares, mediante proteínas humanas (anticuerpos) capaces de interactuar con diversas regiones de las mismas (epítomos).

Los primeros anticuerpos monoclonales en terapéutica aparecieron en la mitad de los ochenta, basados en la tecnología de hibridomas. La tecnología de despliegue en fagos ha resultado decisiva para desarrollar anticuerpos monoclonales totalmente humanos. El denominado Adalimumab (Humira), una inmunoglobulina (IgG1κ) dirigida frente al Factor Necrótico Tumoral (TNF) en la terminología inglesa fue introducido en 2002 para el tratamiento de la artritis reumatoide. Se trata del primer anticuerpo totalmente humano introducido y desarrollado en aplicación de la tecnología de despliegue en fagos que pusiera a punto Winter. Sus ventas en el momento actual alcanzan cifras que superan la docena de miles de millones de dólares.

El paso gradual de anticuerpos murinos a aquellos que incorporaban de manera creciente las características de los humanos ha tenido lugar en apenas dos décadas, pero los logros convierten a este grupo de fármacos en el de mayor crecimiento y valor en Terapéutica. Actualmente están en uso y se comercializan unos 60 anticuerpos monoclonales para diversas indicaciones, tales como procesos autoinmunitarios, infecciosos y especialmente cáncer. La inmunoterapia del cáncer, para interferir con los procesos de bloqueo que la célula tumoral ejerce frente al sistema inmunitario que podría destruirla, avanza día a día con nuevos tratamientos que cubren una cantidad creciente de tumores. No sorprende que de camino estén casi un millar de nuevos productos, muchos de los cuales naturalmente no tendrán éxito, pero que aseguran la introducción de novedades importantes en los años venideros. La versatilidad de los sistemas de diseño, producción y selección permiten plantear todo un conjunto de variables entre otras, (i) anticuerpos modificados por ejemplo como gluco-conjugados, (ii) anticuerpos conjugados con fármacos para vectorizar a estos hacia la diana correspondiente, (iii) anticuerpos bi-específicos que reconocen dos epítomos diferentes; (iv) fragmentos de anticuerpos de diversa índole; o mezclas de anticuerpos.

UN NOBEL QUE IMPACTA EN LA INDUSTRIA

Como señala en un reciente editorial la revista Nature Biotechnology (12) no es común el que la concesión del Premio Nobel suponga no sólo el reconocimiento de avances en el conocimiento fundamental, sino que en poco tiempo se haya trasladado tanto el trabajo académico a aplicaciones industriales y sanitarias de notable interés para la calidad de vida.

La evolución de proteínas en el laboratorio ha facilitado la emergencia de nuevas enzimas con aplicaciones inmediatas para producción de fármacos, de combustibles de detergentes, de contrastes y de otros muchos productos. El empleo de fagos como vectores ha disparado las enormes posibilidades de los anticuerpos en la terapia de muchas enfermedades sin tratamiento. La conclusión sigue siendo que el potencial de los hallazgos aquí comentados está aún en buena medida por explotar.

REFERENCIAS

1. Chen K, Arnold FH. Enzyme engineering for non-aqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media. *Biotechnology* 1991; 8:1773-1777.
2. Arnold FH. Directed evolution: bringing new chemistry to life. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018; 57:4143 – 4148.
3. Baker S, Thomson N, Weill FX, Holt KE. Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens. *Science* 2017; 360:733-738.
4. Sachsenhauser V, Bardwell JCA. Directed evolution to improve protein folding in vivo. *Current Opinion in Structural Biology* 2018; 48:117–123.
5. Banerjee A, Howarth M. Nanoteamwork: covalent protein assembly beyond duets towards protein ensembles and orchestras. *Current Opinion in Biotechnology* 2018; 51:16–23.
6. Basu S, Gerchman Y, Collins CH, Arnold FH, Weiss R. A synthetic multicellular system for programmed pattern formation. *Nature* 2005; 434:1130-1134.
7. Zhang R, Chen K, Huang X, Wohlschlagel L, Renata H, Arnold FH. Enzymatic assembly of carbon-carbon bonds via iron-catalysed *sp3* C-H functionalization. *Nature* 2019; 565:67-72.
8. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1982; 228:1315-1317.
9. Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 1988; 73:305-318.
10. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990; 348:552-554.
11. Phage display. Smith GP, Petrenko V. *Chem. Rev.* 1997; 97:391-410.
12. Comentario Editorial. Nobel work that galvanized an industry. *Nat. Biotech.* 2018; 36:1023.