

VAXIRA: VACUNA ANTI-IDIOTÍPICA PARA EL CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS.

Autores principales: Ana María Vázquez¹, Amparo Macías, Saylin Alfonso, Eduardo R. Santiesteban, Ana María Hernandez, Kathya Rashida, Yudisleydi Fortunato, Eric R. Chong y Alejandro Portillo

Otros autores: Yoanna I. Flores, Yoan J. Machado y Anet Valdés-Zayas

Colaboradores: 78

Centro de Inmunología Molecular (CIM). Calle 216, esq. 15, Atabey, Playa, Habana 11 600, Cuba. Telf. 2143175 Fax. 272 0644

¹Autor de correspondencia. Correo electrónico maruchi@cim.sld.cu

Ana María Vázquez (10%). Investigadora de la Dirección de Innovación del Conocimiento. Es la líder científica del proyecto y gerente de la vacuna VAXIRA. Participó en la elaboración y/o revisión de los manuscritos de los resultados de los estudios de comparabilidad y de los ensayos clínicos; siendo coautora de los 5 artículos publicados y del manuscrito en revisión. Ha presentado los resultados científicos del proyecto en varios eventos científicos nacionales e internacionales.

Amparo Macías (10%). Gerente médico de la vacuna VAXIRA. Trabajó en el diseño de los ensayos clínicos en pacientes con cáncer de pulmón y en el seguimiento, evaluación y en la discusión de los resultados de dichos ensayos, siendo el autor de contacto tanto en el artículo ya publicado, como en el manuscrito de los resultados de ensayo clínico Fase 2/3 enviado y en revisión. Es además, coautora de las dos publicaciones de los estudios inmunológicos y de mecanismos de acción de la vacuna. Ha presentado el trabajo en varios eventos científicos en Cuba y el exterior.

Saylin Alfonso (10%). Investigador clínico principal de los ensayos clínicos Fase 1 y 2/3 en pacientes portadores de cáncer de pulmón inmunizados con VAXIRA. Además, participó en el Estudio de Uso Expandido en este tipo de paciente aportando datos de seguridad y supervivencia de estos pacientes tratados con la vacuna formulada con producto de fermentación de tanque agitado. Es la autora principal del artículo de los resultados del estudio de uso compasional y una de las dos primeras autoras del manuscrito que reporta los resultados del ensayo clínico Fase 2/3. Es, además, coautora de otros dos de los artículos que avalan el presente trabajo. Ha presentado el trabajo en varios eventos nacionales e internacionales.

Eduardo R. Santiesteban (10%). Investigador clínico que participó en el estudio de uso compasional y en el ensayo clínico Fase 2/3 en pacientes portadores de cáncer de pulmón inmunizados con VAXIRA. Además, tuvo una participación protagónica en el Programa de Uso Expandido aportando datos de seguridad y supervivencia de estos pacientes tratados con la vacuna formulada con producto de fermentación de tanque agitado. Es coautor de los artículos de los resultados del estudio de uso compasional y del manuscrito acerca de los resultados del ensayo clínico Fase 2/3.

Ana María Hernández (10%). Jefa del grupo de Anticuerpos Naturales. Trabajó en el diseño, realización y análisis de los experimentos de evaluación inmunológica y de los mecanismos de acción de la vacuna en los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas tratados con VAXIRA en el ensayo Fase 1. Autora principal de dos de los artículos que avalan el presente trabajo, coautora de un tercer artículo publicado y de un manuscrito enviado. Ha presentado el trabajo en varios eventos científicos en Cuba y el exterior.

Katya Rashida (10%). Jefa del grupo de Desarrollo de la vacuna VAXIRA. Participó en todo el diseño, realización y análisis de los estudios de equivalencia del producto VAXIRA a partir de fluido ascítico de ratón y de producto de fermentación a escala de 10 y 41 litros. Autora principal de uno de los artículos publicados que avalan el presente trabajo y coautora de otro. Ha presentado el trabajo en eventos nacionales e internacionales.

Eric R. Chong (10%). Jefe del Departamento de Asuntos Regulatorios. Estuvo al frente de toda la estrategia regulatoria de la vacuna VAXIRA y de la confección del documento de Registro que se entregó al CECMED y a ANMAT. Es coautor del manuscrito donde se reportan los resultados del ensayo clínico Fase 2/3. Fue el responsable de todas las solicitudes de Autorización de ensayo clínico del proyecto y sus modificaciones ante el CECMED. Así como responsable por la calidad de los ensayos clínicos realizados. Fue el responsable de proporcionar la información regulatoria exigida por empresa mixta Recombio para la solicitud de Autorización de EC en Argentina.

Yudisleydi Fortunato (10%). Tecnóloga de la vacuna VAXIRA. Estuvo al frente de diseño del proceso productivo de la vacuna VAXIRA, de las validaciones del proceso y elaboración y/o revisión de la documentación del proceso productivo en condiciones GMP necesaria para el registro de la vacuna. Primera autora de dos publicaciones internas del CIM.

Alejandro Portillo (10%). Jefe del Departamento de Control de la Calidad. Estuvo al frente del desarrollo, implementación y validación de las técnicas analíticas de la vacuna para la liberación del producto; así como en la definición de las especificaciones de calidad acorde a las exigencias de las regulaciones nacionales e internacionales. Participó en la elaboración y revisión de todo el sistema documental asociado a las diferentes etapas de desarrollo de la vacuna.

Yoanna I. Flores (4%). Investigador clínico que participó en el ensayo clínico Fase 2 en pacientes portadores de cáncer de pulmón inmunizados con VAXIRA. Es coautora del manuscrito acerca de los resultados del ensayo clínico Fase 2/3.

Yoan J. Machado (3%). Participó en el diseño, realización y análisis del estudio de comparabilidad entre el producto a partir de líquido ascítico y de fermentación a escala de 10 L. Autor principal de uno de los artículos publicados. Ha presentado los resultados en eventos nacionales e internacionales.

Anet Valdés (3%). Investigadora del Laboratorio de Inmunología Clínica del CIM. Trabajó en la realización y análisis de los experimentos de evaluación inmunológica y de los mecanismos de acción de la vacuna en los pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas tratados con VAXIRA en el ensayo Fase 2/3. Es una de las dos primeras autoras del manuscrito que reporta los resultados del ensayo clínico Fase 2/3 que se encuentra enviado y en revisión.

RESUMEN

El presente trabajo recoge los resultados que permitieron el otorgamiento simultáneo por parte de la Agencia Regulatoria Cubana y Argentina del Registro Sanitario Condicionado de la Vacuna VAXIRA para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) avanzado. Esta es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo y en Cuba. Este es el segundo Registro de una Vacuna para el Cáncer de Pulmón en Cuba y la primera Vacuna Anti-Idiotípica (anti-Id) a nivel mundial, que se pone a disposición de este tipo de pacientes que incrementa sus expectativas de supervivencia con una buena calidad de vida.

Nuestro grupo había reportado previamente la generación del AcM anti-Id 1E10 (denominado racotumomab por la OMS) específico contra el AcM P3, que reacciona contra gangliósidos N-glicolilados, sulfátidos y antígenos presentes en tumores; y que era capaz de producir efectos anti-tumorales en modelos de tumores murinos. Posteriormente, se describió la propiedad poco común de este AcM murino de inducir una predominante respuesta contra su idiotipo y su capacidad de generar o no una respuesta de anticuerpos específica contra los gangliósidos N-glicolilados, dependiendo de la presencia o ausencia de dichos antígenos en los tejidos normales de la especie inmunizada. Estos resultados preclínicos y de los primeros ensayos fases 1 en pacientes portadores de tumores de mama y melanoma dieron lugar a 14 artículos, tres objetos de invención que proporcionaron patentes en Cuba y en diferentes países, y merecieron un premio de la ACC en el año 2001 y otro en el 2005.

A partir de entonces, se evaluó el efecto de la vacunación con el AcM racotumomab adyuvado en gel de alúmina (denominada primero vacuna CIMAbid y actualmente VAXIRA) en pacientes portadores de CPCNP en tres nuevos estudios clínicos: estudio de uso compasional, ensayo clínico Fase 2/3 y un

programa de uso expandido en este tipo de pacientes en Cuba. En estos ensayos no solo se confirmó la inmunogenicidad de la vacuna, sino también se determinaron por primera vez los mecanismos de acción de los anticuerpos anti-NeuGcGM3 que se inducían en los pacientes y se demostró que la vacuna era segura e incrementaba la supervivencia en estos pacientes. Estos resultados se reportaron en 3 nuevas publicaciones científicas y un manuscrito enviado que se encuentra en revisión. Los resultados del ensayo clínico Fase 2/3 fueron considerados de los resultados más relevantes en el congreso ESMO 2012 en Austria.

Para lograr el Registro se requirió de un enfoque regulatorio novedoso debido a la originalidad de este producto, que es una molécula de anticuerpo, pero a la vez es una vacuna. Se desarrolló un proceso productivo escalable, reproducible, controlado y con cumplimiento de las Buenas Prácticas de Producción Dentro del desarrollo productivo se requirió demostrar la equivalencia de los productos obtenidos a partir de dos procesos diferentes y dos formulaciones diferentes. Los resultados de esta etapa dieron lugar a la publicación de otros dos artículos en revistas internacionales y dos publicaciones internas del CIM.

COMUNICACIÓN CORTA

Introducción

El cáncer de pulmón es la más común causa de muerte por cáncer en el mundo (1) y el CPCNP constituye el 75% de todos los tumores de pulmón. Un alto porcentaje de los pacientes son diagnosticados con enfermedad local avanzada o con enfermedad metastásica (2). Desafortunadamente, el impacto en la supervivencia de los pacientes luego de la primera línea de quimioterapia utilizando nuevas combinaciones de drogas citotóxicas en comparación con solo los dobletes de platino ha sido pobre (3). Por tanto el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento dirigidas específicamente a dianas tumorales para incrementar la eficacia de los tratamientos actuales continúa siendo una prioridad en el tratamiento del CPCNP avanzado.

Nuestro grupo había reportado previamente la generación del AcM anti-Id racotumomab específico contra el AcM P3, que reacciona contra gangliósidos NeuGc, sulfátidos y antígenos presentes en tumores humanos; y que era capaz de producir efectos anti-tumorales en modelos de tumores murinos (4-7). Posteriormente, se describió la propiedad poco común de este AcM murino de inducir una predominante respuesta contra su Id y su capacidad de generar o no una respuesta de anticuerpos específica contra los gangliósidos NeuGc, dependiendo de la presencia o ausencia de dichos antígenos en los tejidos normales de la especie inmunizada (8). Los primeros ensayos Fase 1 realizados en pacientes con cáncer de mama y melanoma tratados con la vacuna VAXIRA demostraron la baja toxicidad y la alta inmunogenicidad de esta vacuna anti-Id (9-11).

En el presente trabajo, presentamos resultados posteriores del desarrollo de esta vacuna que permitieron su Registro Sanitario Condicionado simultáneo en Cuba y Argentina para su uso en el tratamiento de pacientes con CPCNP, estrategia terapéutica no antes evaluada para el tratamiento de este tipo de pacientes.

Los objetivos del presente trabajo fueron: Evaluar la estrategia del tratamiento con la vacuna VAXIRA en pacientes con CPNCP avanzado en cuanto a seguridad e impacto en la supervivencia de los pacientes. Demostrar si en estos pacientes la vacuna era inmunogénica y definir los mecanismos de acción de los anticuerpos anti-NeuGcGM3 inducidos por la vacunación. Desarrollar una estrategia regulatoria novedosa debido a la originalidad de este producto, que es una molécula de anticuerpo, pero a la vez es una vacuna. Diseñar y validar el proceso productivo de la vacuna en condiciones GMP, necesario para su registro, donde había que demostrar la equivalencia de los procesos de obtención del Ingrediente Farmacéutico Activo y el Producto Terminado. Implementar y validar las técnicas analíticas de la vacuna para la liberación del producto; así como definir las especificaciones de calidad acorde a las exigencias de las regulaciones nacionales e internacionales. Obtener el Registro Sanitario para el tratamiento de pacientes con CPCNP simultáneamente en Cuba y Argentina.

Resultados

Se diseñó e implementó una estrategia regulatoria que permitió el Registro simultáneo de VAXIRA en Cuba y Argentina para el tratamiento de los pacientes avanzados de CPCNP.

La estrategia regulatoria para lograr el registro de VAXIRA para el tratamiento de pacientes con CPCNP incluyó el desarrollo del producto a nivel preclínico, clínico y productivo.

La estrategia regulatoria para cumplir con los requerimientos preclínicos se basó en demostrar el efecto farmacológico de la vacuna VAXIRA, así como su seguridad en modelos animales. Para la evaluación farmacodinámica de la vacuna se evaluaron aspectos como: el reconocimiento del blanco terapéutico, la inmunogenicidad en los modelos animales relevantes, el efecto antitumoral de la dosis, la vía de administración y el esquema seleccionados. También se investigó el mecanismo de acción que garantiza el efecto terapéutico de VAXIRA. Los resultados de esta etapa fueron publicados en 5 artículos (4-8) y formaron parte de dos premios de la Academia de Ciencias de Cuba en los años 2001 y 2005.

Para demostrar la seguridad del producto terminado se seleccionaron los modelos animales recomendados y se realizaron estudios toxicológicos de tolerancia local, de toxicidad aguda y a dosis repetidas, así como su evaluación mutagénica. Los

resultados de la evaluación toxicológica de la vacuna VAXIRA en conjunto demostraron un perfil adecuado de seguridad para la administración en humanos.

La estrategia del desarrollo clínico de VAXIRA en CPCNP, que será descrita más detalladamente en el próximo acápite, permitió demostrar la seguridad y eficacia del tratamiento con VAXIRA de pacientes portadores de CPCNP. Además, permitió dilucidar los mecanismos de acción anti-tumoral de los anticuerpos anti-NeuGcGM3 producidos por la vacunación y la asociación de la calidad de esta respuesta con la supervivencia de los pacientes (**Artículos 1, 2 y 3; Manuscrito en revisión del presente trabajo**).

La estrategia de desarrollo productivo de la vacuna VAXIRA, se basó principalmente en alcanzar la escala productiva que se requiere para satisfacer las cantidades de producto necesarias para ensayos clínicos y para la comercialización, dentro y fuera de Cuba, cumpliendo con los requerimiento de Buenas Practicas de Fabricación que se exigen para estos procesos. Se partió de una producción basada en la tecnología de líquido ascítico producido en ratones para ensayos clínicos Fase 1 y se pasó a tecnología de tanque agitado con perfusión para ensayos clínicos Fase 2/3 y 3, con lo cual se aumenta considerablemente la eficiencia y los volúmenes productivos así como se eleva el estándar regulatorio, al eliminar los riesgos por contaminación con virus murinos. Estos cambios de tecnología fueron aprobados por las agencias reguladoras cubana y argentina, a partir de la evaluación de amplios estudios de comparación basados en el estado del arte en cuanto a técnicas de caracterización físico química y biológica (**Artículos 4 y 5 del presente trabajo, Informe de Estudio Equivalencia**). La escala y el estándar regulatorio alcanzados en la producción del Ingrediente Farmacéutico Activo y el Producto Terminado permitieron la obtención de la Licencia Sanitaria de Operaciones Farmacéuticas para estas producciones, así como del Registro Condicionado para la comercialización en Cuba y en Argentina (**Artículos 6 y 7, Informe de consistencia del Proceso de producción, Certificados de Registro Sanitario del CECMED y ANMAT, Certificados Licencia de Fabricación, Índice del Expediente de Registro**).

VAXIRA es una vacuna segura, inmunogénica y que aumenta la supervivencia de los pacientes con CPCNP avanzado.

La experiencia clínica con VAXIRA en pacientes con CPCNP avanzado se inició en el año 2004. El primer estudio clínico fue un estudio de uso compasional en el que se incluyeron 71 pacientes en estadios IIIb y IV, que habían concluido el tratamiento estándar con quimioterapia y radioterapia. Aunque los pacientes se inyectaron repetidamente, el tratamiento resultó seguro. Estos resultados corroboraron los reportados previamente con esta vacuna en otros ensayos Fase 1 en pacientes con melanoma y cáncer de mama (9-11). Aunque este estudio no fue diseñado para evaluar la eficacia terapéutica de la vacuna, se observó que la supervivencia de los pacientes vacunados con VAXIRA fue superior a la reportada (12) para un grupo de pacientes con CPCNP que recibieron solo el tratamiento oncoespecífico. En particular, fue de interés conocer que los pacientes que

entraron al estudio con respuesta parcial o enfermedad estable y con un estado general clasificado como 1 (EG1) luego de recibir la primera línea de tratamiento oncoespecífico tuvieron una supervivencia significativamente mayor que en aquellos pacientes con enfermedad en progresión y EG2. Estos resultados sugirieron que el tratamiento con VAXIRA prolongaba la supervivencia de este grupo de pacientes. **Este fue el primer reporte del uso de una vacuna anti-idiotípica relacionada con los gangliósidos NeuGc para la inmunoterapia activa del CPCNP avanzado (Artículo 1 del presente trabajo).**

En este estudio clínico caracterizamos la respuesta inmune humoral contra el NeuGcGM3 inducida en los primeros 20 pacientes que entraron al estudio y se corroboró, que al igual que en los ensayos clínicos Fase 1 en pacientes con melanoma y cáncer de mama (9-11), la vacuna fue muy inmunogénica, desarrollándose anticuerpos que compartían la capacidad del AcM P3 de reconocer al NeuGcGM3 por técnicas inmunoquímicas y que estos anticuerpos se caracterizaron por ser Id

Agg. En este estudio mostramos las primeras evidencias de que los pacientes que desarrollaron anticuerpos anti-NeuGcGM3 tuvieron mayores tiempos de supervivencia. Además, se demostró por primera vez que estos anticuerpos anti-NeuGcGM3 eran capaces de reconocer al gangliósido en el contexto de la membrana de células tumorales que lo expresan y de provocar su muerte por un mecanismo independiente de la activación del complemento (Artículo 2 del presente trabajo). Posteriormente, profundizamos en la caracterización del mecanismo citotóxico mediado por los anticuerpos inducidos por la vacunación con VAXIRA en los pacientes con CPCNP. El mecanismo de muerte fue diferente de la apoptosis porque ocurrió independiente de la temperatura, no se detectó condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN que se produjo tuvo un patrón diferente al observado para la apoptosis. Más aún, la muerte celular se acompañaba por un aumento del tamaño celular, formación de lesiones en las membranas celulares y activación del citoesqueleto, como ocurre en el fenómeno de oncosis. **Este fue el primer reporte en la literatura de la inducción activa en pacientes con cáncer de anticuerpos específicos contra NeuGcGM3 capaces de producir necrosis oncótica (Artículo 3 del presente trabajo).**

Tomando en consideración estos resultados, se llevó a cabo un ensayo clínico Fase 2/3, aleatorizado, multicéntrico, y a doble ciegas en pacientes con CPCNP avanzado con el objetivo de obtener la prueba de concepto de beneficio clínico del tratamiento con VAXIRA. En este ensayo se incluyeron 176 pacientes en estadio IIb/IV que luego de la primera línea de tratamiento oncoespecífico hubieran alcanzado al menos estabilización de la enfermedad y con un $EG \leq 2$. De nuevo el tratamiento con VAXIRA fue muy bien tolerado. La vacunación no tuvo impacto en el tiempo de supervivencia libre de progresión (SLP). En cambio, cuando se realizó el análisis de la supervivencia global por intención de tratar, la de los pacientes vacunados fue significativamente superior que la del grupo que recibió placebo. Cuando se realizó el análisis de la supervivencia por protocolo (pacientes que recibieron al menos 5 inyecciones de VAXIRA o del placebo), la diferencia fue

aún más significativa. El alcanzar un beneficio en la supervivencia global sin haber observado un aumento en la SLP, indica que el efecto de VAXIRA se obtiene a más largo plazo. Este resultado está en correspondencia con el paradigma emergente para las vacunas de cáncer y otros biológicos, donde un impacto en la supervivencia puede obtenerse sin disminución del tamaño tumoral, y el efecto terapéutico puede demorarse en el tiempo y continuar luego de la progresión (13). **Este fue el primer reporte de eficacia de una vacuna anti-Id contra gangliósidos NeuGc como terapia de mantenimiento de cambio en pacientes con CPCNP avanzado (Manuscrito enviado y en revisión).**

En el ensayo clínico Fase 2/3 se pudo evaluar la respuesta inmunológica en pacientes tratados con VAXIRA. Un resultado importante de este estudio fue la asociación con una mayor supervivencia de los pacientes que desarrollaron anticuerpos IgM anti-NeuGcGM3 capaces de unir y matar las células que expresan el gangliósido. **Este es el primer reporte que muestra una asociación entre la inducción activa de anticuerpos anti-NeuGcGM3 citotóxicos y la supervivencia de pacientes con CPCNP tratados con VAXIRA (Manuscrito enviado y en revisión).**

Se realizó un Programa de uso expandido en pacientes con CPCNP avanzado que luego del tratamiento estándar establecido se encontraban en progresión de la enfermedad y que solamente eran tributarios de terapia paliativa no oncoespecífica. En este se evaluó la eficacia terapéutica de la vacuna VAXIRA en cuya preparación el AcM racotumomab se obtuvo mediante el proceso de fermentación utilizando la tecnología de tanque agitado (TA). Este estudio demostró que la vacuna aportaba similar beneficio terapéutico que cuando era formulada con el AcM producido a partir de líquido ascítico. Se mostró la equivalencia en cuanto al nivel y características de la respuesta inmune humoral generada **(Reporte clínico actualizado del PUCE 106, Informe de serie de pacientes con CPCNP tratados con la vacuna producida con el AcM obtenido de fermentación en tanque agitado).** Hasta el momento se han tratado con VAXIRA 970 pacientes con CPCNP avanzado.

Estos resultados se están validando en dos ensayos clínicos Fase 3 en curso, uno multicéntrico en Cuba y otro multinacional, que deben incluir 670 y 1082, respectivamente.

Referencias bibliográficas

- (1) Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:69-90.
- (2) Minna JD. Neoplasmas of the lung. In: Kasper AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editors. *Harrison's principles of internal medicine*. New York: McGraw-Hill; 2005. p.506-16.
- (3) Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002; 346:92-98.
- (4) Vázquez A.M., Pérez A., Hernández AM, Macías A., Alfonso M., Bombino G., Pérez. R. Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody. *Hybridoma* 1998; 17:527-34.
- (5) Vázquez, A.M; Alfonso, M; Lanne, B; Karlsson, K.-A; Carr, A; Barroso, O; Fernández, L.E; Rengifo, E; Lanio, M.E; Lanio, Álvarez, C; Zeuthe, J; Pérez, R. Generation of a murine monoclonal antibody specific for N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides that also recognizes sulfated glycolipids. *Hybridoma* 1995; 14:551-6.
- (6) E. Moreno, B. Lanne, Vázquez A.M., Kawashima I., Tai T., Fernández L.E., Karlsson K.-A., Ångström J., Pérez R. Delineation of the epitope recognized by an antibody specific for N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides. *Glycobiology* 8: 695-706, 1998.
- (7) Díaz Y, Gonzalez A, Lopez A, Perez R, Vazquez AM, Montero E. Anti-ganglioside anti-idiotypic monoclonal antibody-based cancer vaccine induces apoptosis and antiangiogenic effect in a metastatic lung carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58:1117-28.
- (8) Hernández, A. M., M. Rodríguez, A. López-Requena, I. Beausoleil, R. Pérez, A. M. Vázquez. 2005. Generation of anti-Neu-glycolyl-ganglioside antibodies by immunization with an anti-idiotypic monoclonal antibody: a self versus non-self matter. *Immunobiology* 210: 11–21.
- (9) Alfonso M, Díaz A, Hernandez AM, Perez A, Rodriguez E, Bitton R, Perez R, Vazquez AM. An antiidiotypic vaccine elicits a specific response to N-glycolyl sialic acid residues of glycoconjugates in melanoma patients. *J Immunol* 2002; 168:2523-9.
- (10) Díaz A, Alfonso M, Alonso R, Saurez G, Troche M, Catalá M, Díaz RM, Pérez R, Vázquez AM. Immune responses in breast cancer patients immunized

with an anti-idiotypic antibody mimicking NeuGc-containing gangliosides. Clin Immunol 2003; 107:80-9.

(11) Guthmann, M. D., M. A. Castro, G. Cinat, C. Venier, L. Koliren, R. J. Bitton, A. M. Vázquez, and L. Fainboim. 2006. Cellular and humoral immune response to N-Glycolyl-GM3 elicited by prolonged immunotherapy with an anti-idiotypic vaccine in high-risk and metastatic breast cancer patients. J. Immunother. 29:215–223.

(12) González G, Crombet T, Neninger E, Viada C, Lage A. Therapeutic vaccination with epidermal growth factor (EGF) in advanced lung cancer: Analysis of pooled data from three clinical trials. Hum Vaccin 2007; 3:8- 13.

(13) Lage A, Crombet T. Control of advanced cancer: the road to chronicity. Int J Environ Res Public Health 2011; 8:683-97.