

Mecanismos inmunológicos asociados a la vacunación terapéutica de cáncer con NGcGM3/VSSP

Autoría principal

Mayrel Labrada Mon¹.

Otros autores

Luis Enrique Fernández Molina¹, Marilyn Clavell Pérez¹.

Colaboradores

Isabel Pablos¹, Judith Raymond¹, Joel de León¹, Yanín Bebelagua¹, Giselle Hevia¹, Daniel F. Alonso², Mariano R. Gabri², Roberto C. Veloso³, Vicente Vérez³, Federica Benvenuti⁴, Francesca Prete⁴.

Entidad ejecutora principal

¹Centro de Inmunología Molecular (CIM).

Entidades participantes

²Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina.

³Centro de Química Biomolecular, La Habana, Cuba.

⁴Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología, Trieste, Italia.

Autor para correspondencia

Mayrel Labrada Mon

Centro de Inmunología Molecular

Calle 216, esq. 15, Atabey, Playa, Habana 11600, Cuba

Email: mayrel@cim.sld.cu

Fax: 272 0644/Telf: 214 3159

Aporte científico de cada autor al resultado

- ✓ **Mayrel Labrada Mon** (40%): Autora principal. Trabajó en el diseño, realización y análisis de todos los experimentos que condujeron a los resultados que dieron lugar a este trabajo. Participó en la concepción y escritura de las dos publicaciones que avalan este trabajo, siendo la primera autora de las mismas. Ha presentado el trabajo en varios eventos nacionales e internacionales.
- ✓ **Luis Enrique Fernández Molina** (40%): Director de Gestión de la Innovación y jefe del proyecto en el que se enmarca este trabajo. Trabajó en el proyecto desde su idea original y participó en el análisis y diseño de los experimentos y sus resultados. Contribuyó a la concepción y escritura de todas las publicaciones, así como revisó las mismas. Ha presentado el trabajo en varios eventos nacionales e internacionales.
- ✓ **Marilyn Clavell Pérez** (20%): Contribuyó a la realización de varios experimentos y es co-autora de las dos publicaciones que avalan este trabajo.

Resumen

Antecedentes: El cáncer es un grave problema de salud por la incidencia y la mortalidad crecientes, así como por el impacto psicológico y el hecho de que los pacientes no mueren generalmente por el tumor primario, sino por las metástasis. Estudios previos describiendo la presencia del gangliósido NGcGM3 en tumores humanos y su rol en la inmunosupresión inducida por los tumores han sido premiados

anteriormente por la ACC. Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos inmunes que pueden explicar el efecto anti-metastásico de la vacuna terapéutica de cáncer NGcGM3/VSSP no ha sido anteriormente presentado.

Objetivos del trabajo: En el presente trabajo se abordó el mecanismo de acción del candidato vacunal NGcGM3/VSSP, cuyo blanco es el gangliósido NGcGM3 expresado específicamente en varios tipos de tumores humanos. Se seleccionó el modelo murino de metástasis espontánea a pulmón con la línea 3LL-D122 después de corroborar que expresa *in vivo* NGcGM3. Esta variante de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) tiene un comportamiento muy similar a la enfermedad metastásica de los pacientes de cáncer, donde en muchos casos las lesiones metastásicas se evidencian después de la cirugía de los tumores primarios, y son las que causan la muerte del paciente.

Resultados: Las principales novedades científicas de este trabajo consisten en la demostración, por primera vez, de que una vacuna de cáncer basada en un gangliósido es capaz de inhibir la metastización mediante un mecanismo efector que involucra tanto células T CD4+ como T CD8+, al mismo tiempo que este efecto antitumoral se correlaciona con el incremento de la infiltración de esos efectores de la inmunidad adquirida en el órgano diana, en particular de las células T CD4. Otro hallazgo es la definición de la presencia del gangliósido NGcGM3 en el modelo tumoral LLC 3LL-D122, validándolo como relevante para estudiar el efecto de terapias antitumorales basadas en el gangliósido NGcGM3. El empleo del gangliósido NGcGM3 sintético en el preparado vacunal confirmó el valor de esta molécula como blanco para la inmunoterapia de cáncer. Los resultados de este estudio están publicados en las revistas *Expert Opinion on Biological Therapies* y *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, y forman parte de una Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Biológicas. El presente trabajo cuenta con los avales del Consejo Científico del CIM y del Director General.

Conclusiones: El acercamiento a la comprensión del mecanismo de acción de la vacuna NGcGM3/VSSP logrado en este trabajo permite pensar en como optimizar su régimen de aplicación en los pacientes, así como diseñar estrategias de combinación con otros agentes. Resultó significativo el hecho de que el efecto antitumoral se asocia a la movilización de los efectores inmunes al foco metastásico tumoral, no bastando simplemente su generación en los órganos secundarios.

Comunicación Corta

Introducción

La terapia del cáncer se basa en el uso simultáneo de diversas alternativas, entre las que se incluye la inmunoterapia (IT). Numerosas moléculas son consideradas como blanco para la IT de cáncer por sus niveles de expresión y la posibilidad de ser reconocidas por los componentes del sistema inmunológico. Estudios previos describiendo la presencia del gangliósido NGcGM3 en tumores humanos¹⁻⁹ y su rol en la inmunosupresión inducida por los tumores^{10, 11} han sido premiados anteriormente por la ACC. Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos inmunes que pueden explicar el efecto anti-metastásico de la vacuna terapéutica de cáncer NGcGM3/VSSP

no ha sido anteriormente presentado. En este trabajo se estudia el mecanismo de acción de la vacuna NGcGM3/VSSP, que se obtiene por la incorporación hidrofóbica del gangliósido NGcGM3, purificado de eritrocitos de caballo, a las vesículas de membrana externa de la bacteria *Neisseria meningitidis*, que tiene características inmunoestimuladoras¹². El modelo murino de metástasis espontánea a pulmón con el carcinoma de Lewis 3LL-D122 ha sido ampliamente empleado para estudiar terapias antitumorales^{13, 14}. En este modelo tumoral no se había descrito la expresión del gangliósido NGcGM3. La ITAE con otras terapias basadas en gangliósidos genera altos títulos de Ac IgM e IgG, sin embargo, en todos los casos sólo se ha reportado la generación de respuesta humoral¹⁵⁻¹⁷. El estudio del mecanismo de acción del preparado vacunal NGcGM3/VSSP en un modelo animal que exprese el gangliósido NGcGM3 y que haga énfasis en los mediadores inmunológicos celulares asociados a la vacunación es importante para el avance de la IT activa específica (ITAE) contra este antígeno (Ag) tumoral.

Resultados

Se demostró el beneficio terapéutico de la administración del preparado vacunal NGcGM3/VSSP en los ratones portadores del tumor de Lewis 3LL-D122, en el modelo de metastización espontánea a pulmón. Las principales novedades científicas de este trabajo consisten en la demostración, por primera vez, de que una vacuna de cáncer basada en un gangliósido es capaz de inhibir la metastización mediante un mecanismo efector que involucra tanto células T CD4+ como T CD8+, al mismo tiempo que este efecto antitumoral se correlaciona con el incremento de la infiltración de esos efectores de la inmunidad adquirida en el órgano diana, en particular de las células T CD4. Los resultados obtenidos demostraron además que el efecto antimetastásico del preparado vacunal es independiente del carácter emulsivo de la formulación empleada, siendo este el principal aporte práctico de este trabajo. En la vacunación de pacientes con cáncer se ha usado el Montanide ISA 51 como adyuvante oleoso, pero se han observado induraciones, enrojecimiento y dolor en el sitio de inoculación, así como la retención de los efectores T CD8+ generados en el sitio de inyección. Por tanto, un preparado sin adyuvante oleoso sería un mejor candidato a considerar para ser aplicado en pacientes de cáncer. (Labrada, M., Pablos, I., Prete, F., Hevia, G., Clavell, M., Benvenuti, F., and Fernandez, L. E. (2014). "Induction of leukocyte infiltration at metastatic site mediates the protective effect of NGcGM3-based vaccine." *Hum Vaccin Immunother* 10(8)).

Otro resultado científico novedoso es la definición de la presencia del gangliósido NGcGM3 en el modelo tumoral LLC 3LL-D122, validándolo como relevante para estudiar el efecto de terapias antitumorales basadas en el gangliósido NGcGM3. Se demuestra que el modelo se incrementa la expresión del gangliósido NGcGM3 desde el tumor primario hasta la lesión metastásica en pulmón, como se ha observado en muestras de pacientes de cáncer. El empleo del gangliósido NGcGM3 sintético en el preparado vacunal confirmó el valor de esta molécula como blanco para la inmunoterapia de cáncer. Los resultados demostraron que los perfiles de inmunogenicidad del gangliósido NGcGM3 fueron equivalentes independientemente del origen del Ag. Este resultado permite el desarrollo de un producto vacunal más

consistente desde un enfoque regulatorio. (Labrada, M., Clavell, M., Bebelagua, Y., Leon, J., Alonso, D. F., Gabri, M. R., Veloso, R. C., Verez, V. and Fernandez, L. E. (2010). "Direct validation of NGcGM3 ganglioside as a new target for cancer immunotherapy." *Expert Opin Biol Ther* 10(2): 153-162).

Conclusiones

El acercamiento a la comprensión del mecanismo de acción de la vacuna NGcGM3/VSSP logrado en este trabajo permite pensar en como optimizar su régimen de aplicación en los pacientes de cáncer, así como diseñar estrategias de combinación con otros agentes. Resultó significativo el hecho de que el efecto antitumoral se asocia a la movilización de los efectores inmunes al foco metastásico tumoral, no bastando simplemente su generación en los órganos secundarios.

Referencias

- [1] Carr A, Mullet A, Mazorra Z, Vazquez AM, Alfonso M, Mesa C, Rengifo E, Perez R, Fernandez LE. A mouse IgG1 monoclonal antibody specific for N-glycolyl GM3 ganglioside recognized breast and melanoma tumors. *Hybridoma* 2000; 19:241-7.
- [2] Oliva JP, Valdes Z, Casaco A, Pimentel G, Gonzalez J, Alvarez I, Osorio M, Velasco M, Figueroa M, Ortiz R, et al. Clinical evidences of GM3 (NeuGc) ganglioside expression in human breast cancer using the 14F7 monoclonal antibody labelled with (99m)Tc. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 96:115-21.
- [3] Blanco R, Rengifo E, Cedeno M, Rengifo CE, Alonso DF, Carr A. Immunoreactivity of the 14F7 Mab Raised against N-Glycolyl GM3 Ganglioside in Epithelial Malignant Tumors from Digestive System. *ISRN Gastroenterol* 2011; 2011:645641.
- [4] Blanco R, Rengifo E, Rengifo CE, Cedeno M, Frometa M, Carr A. Immunohistochemical Reactivity of the 14F7 Monoclonal Antibody Raised against N-Glycolyl GM3 Ganglioside in Some Benign and Malignant Skin Neoplasms. *ISRN Dermatol* 2011; 2011:848909.
- [5] Scursioni AM, Galluzzo L, Camarero S, Lopez J, Lubieniecki F, Sampor C, Segatori VI, Gabri MR, Alonso DF, Chantada G, et al. Detection of N-glycolyl GM3 ganglioside in neuroectodermal tumors by immunohistochemistry: an attractive vaccine target for aggressive pediatric cancer. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011:245181.
- [6] Blanco R, Rengifo CE, Cedeno M, Frometa M, Rengifo E, Carr A. Immunoreactivity of the 14F7 Mab (Raised against N-Glycolyl GM3 Ganglioside) as a Positive Prognostic Factor in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Patholog Res Int* 2012; 2012:235418.
- [7] Blanco R, Blanco D, Quintana Y, Escobar X, Rengifo CE, Osorio M, Gutierrez Z, Lamadrid J, Cedeno M, Frometa M, et al. Immunoreactivity of the 14F7 Mab Raised against N-Glycolyl GM3 Ganglioside in Primary Lymphoid Tumors and Lymph Node Metastasis. *Patholog Res Int* 2013; 2013:920972.
- [8] Carr A, Rodriguez E, Arango Mdel C, Camacho R, Osorio M, Gabri M, Carrillo G, Valdes Z, Bebelagua Y, Perez R, et al. Immunotherapy of advanced breast cancer with a heterophilic ganglioside (NeuGcGM3) cancer vaccine. *J Clin Oncol* 2003; 21:1015-21.
- [9] Diaz A, Alfonso M, Alonso R, Saurez G, Troche M, Catala M, Diaz RM, Perez R, Vazquez AM. Immune responses in breast cancer patients immunized with an anti-idiotypic antibody mimicking NeuGc-containing gangliosides. *Clin Immunol* 2003; 107:80-9.

- [10] de Leon J, Fernandez A, Clavell M, Labrada M, Bebelagua Y, Mesa C, Fernandez LE. Differential influence of the tumour-specific non-human sialic acid containing GM3 ganglioside on CD4+CD25-effector and naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells function. *Int Immunol* 2008; 20:591-600.
- [11] de Leon J, Fernandez A, Mesa C, Clavel M, Fernandez LE. Role of tumour-associated N-glycosylated variant of GM3 ganglioside in cancer progression: effect over CD4 expression on T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55:443-50.
- [12] Estevez F, Carr A, Solorzano L, Valiente O, Mesa C, Barroso O, Sierra GV, Fernandez LE. Enhancement of the immune response to poorly immunogenic gangliosides after incorporation into very small size proteoliposomes (VSSP). *Vaccine* 1999; 18:190-7.
- [13] Gorelik E, Segal S, Feldman M. Control of lung metastasis progression in mice: role of growth kinetics of 3LL Lewis lung carcinoma and host immune reactivity. *J Natl Cancer Inst* 1980; 65:1257-64.
- [14] Eisenbach L, Segal S, Feldman M. MHC imbalance and metastatic spread in Lewis lung carcinoma clones. *Int J Cancer* 1983; 32:113-20.
- [15] Chapman PB, Morrissey D, Panageas KS, Williams L, Lewis JJ, Israel RJ, Hamilton WB, Livingston PO. Vaccination with a bivalent G(M2) and G(D2) ganglioside conjugate vaccine: a trial comparing doses of G(D2)-keyhole limpet hemocyanin. *Clin Cancer Res* 2000; 6:4658-62.
- [16] Chapman PB, Morrissey DM, Panageas KS, Hamilton WB, Zhan C, Destro AN, Williams L, Israel RJ, Livingston PO. Induction of antibodies against GM2 ganglioside by immunizing melanoma patients using GM2-keyhole limpet hemocyanin + QS21 vaccine: a dose-response study. *Clin Cancer Res* 2000; 6:874-9.
- [17] Ragupathi G, Livingston PO, Hood C, Gathuru J, Krown SE, Chapman PB, Wolchok JD, Williams LJ, Oldfield RC, Hwu WJ. Consistent antibody response against ganglioside GD2 induced in patients with melanoma by a GD2 lactone-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine plus immunological adjuvant QS-21. *Clin Cancer Res* 2003; 9:5214-20.