



## El receptor del factor de crecimiento epidérmico y el N-glicolil GM3 y su contribución a la progresión tumoral. Bases para una inmunoterapia combinada

**ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL:** Centro de Inmunología Molecular (CIM). La Habana, Cuba

**AUTORES:** Adys González Palomo<sup>1</sup>, Adriana Carr Pérez<sup>1</sup>, Kalet León Monzón<sup>1</sup>, Rances Blanco<sup>1</sup>, Armando López Medinilla<sup>1</sup>

**Colaboradores:** Valeria Segatori<sup>2</sup>, Mariano Gabri<sup>2</sup>, Xiomara Escobar Pérez<sup>3</sup>, Amparo Macias<sup>1</sup>, Barbara Wilkinson<sup>1</sup>, Liana Martínez<sup>1</sup>, Mercedes Cedeño<sup>1</sup>

**Filiación:** <sup>1</sup>Centro de Inmunología Molecular (CIM), La Habana, Cuba. <sup>2</sup>Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina. <sup>3</sup>Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR)

### RESUMEN

Diversas terapias anti-REGF (receptor del factor de crecimiento epidérmico) se han registrado para el tratamiento contra el cáncer. Sin embargo, su impacto en la supervivencia de los pacientes es limitado, dado el fenómeno de la resistencia tumoral. Los gangliósidos se asocian al REGF y disminuyen su activación dependiente del ligando, pero favorecen una cascada compensatoria/alternativa mediada por la interacción del receptor del activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPAR) y la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . Particularmente, la relación del REGF con la variante N-glicolilada del GM3 (NGcGM3) no se ha abordado. Este trabajo hipotetiza que el incremento de la expresión del NGcGM3 en los tumores refuerza la activación de la vía del REGF y la del uPAR/integrina. La investigación demostró la co-expresión/co-localización del REGF y el NGcGM3 en tumores humanos de diferentes localizaciones, y en dos modelos murinos, como la premisa para el diseño racional de una inmunoterapia combinada. Se demostró, por vez primera, que la combinación de terapia anti-REGF y anti-NGcGM3 incrementó, sinérgicamente, la supervivencia de animales con metástasis pulmonares en dos biomodelos: carcinoma pulmonar de Lewis (3LL-D122) y carcinoma de mama (4T1). Estos resultados demuestran una de las ventajas de la inmunoterapia combinada en la obtención de un efecto a largo plazo, transitando hacia la cronicidad de la enfermedad. La experimentación se desarrolló en sistemas *in vivo* (metástasis espontáneas), lo que se aproxima al escenario clínico, donde la causa fundamental de las muertes están asociadas a las metástasis. Es un trabajo que evidencia los mecanismos de interrelación tumoral del REGF/NGcGM3 para la biología de estos tumores y las perspectivas para la aplicación práctica. De estos resultados se derivaron 4 publicaciones internacionales y una patente concedida en Cuba, EE.UU. y Japón. Los resultados forman parte de una tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Biológicas y condujeron al inicio de los ensayos clínicos siguientes: cáncer de pulmón de células no pequeñas y mama triple negativo metastásico con la vacuna NGcGM3/VSSP y el AcM Nimotuzumab.

### Palabras clave

receptor del factor de crecimiento epidérmico; N-glicolil GM3; progresión tumoral; inmunoterapia

La metastatización es un proceso complejo e involucra diversas vías de señalización que contribuyen a la progresión tumoral y al fracaso de la terapéutica. Entre las modalidades de tratamientos actuales han tomado auge las terapias de combinación dirigidas contra diversas moléculas diana.

El REGF se encuentra sobreexpresado en una gran variedad de tumores de origen epitelial. Existen diversas terapias anti-REGF, pero su impacto en la supervivencia de los pacientes es limitado debido al fenómeno de la resistencia tumoral (1). La activación constitutiva de vías alternativas e independientes del REGF constituye uno de los mecanismos asociados a la resistencia (2). El gangliósido *N*-glicolil GM3 (NGcGM3), calificado como un antígeno específico de tumores (AET), presenta una expresión limitada en los tejidos humanos normales; sin embargo, está sobreexpresado en diversos tumores: melanomas, mama, pulmón, próstata, ovario, estómago, páncreas, hígado (3 y 4). Diversos estudios refieren la asociación del gangliósido NGcGM3 con la progresión tumoral y un mal pronóstico (5-7).

La asociación física del gangliósido GM3 al REGF inhibe la activación dependiente de su ligando (8), pero facilita rutas alternativas/compensatorias mediadas por la sobre activación del receptor del activador del plasminógeno similar a la uroquinasa (uPAR, del inglés *uroquinase plasminogen activator receptor*) y la integrina  $\alpha 5\beta 1$  (9). Específicamente, no se ha evaluado la relación entre el REGF y el gangliósido NGcGM3.

El Centro de Inmunología Molecular (CIM) cuenta con diversas estrategias terapéuticas contra el REGF y el NGcGM3, tanto en el escenario clínico como en el no clínico. El anticuerpo monoclonal humanizado h-R3/TheraCIM/Nimotuzumab (anti-REGF) resultó en el control del crecimiento tumoral de diversas localizaciones (10 y 11). Además, la vacuna NGcGM3/VSSP (12), basada en el gangliósido NGcGM3, se ha utilizado con éxito en pacientes con cáncer de mama (13) y con melanoma (14). En el escenario murino, el efecto antitumoral del AcM 7A7 (anti-REGF, 15) y la vacuna NGcGM3/VSSP (16), como monoterapias, está descrito aunque no se traduce en un efecto a largo plazo. No obstante, la terapia combinada contra ambos blancos no se ha abordado en la clínica ni en la preclínica.

Los objetivos de este trabajo fueron, primeramente, determinar la coexpresión y co localización del REGF y del gangliósido NGcGM3 en tumores de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas y en dos modelos murinos de metástasis pulmonares 3LL-D122 y 4T1. También, evaluar el efecto antitumoral de la inmunoterapia combinada contra el REGF y del gangliósido NGcGM3, en modelos murinos de metástasis pulmonares que coexpresen ambos blancos tumorales. Finalmente, determinar si la terapia combinada modula la ex-

presión o activación de moléculas relacionadas con las cascadas de señalización del REGF, del uPAR y la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , en las metástasis REGF/NGcGM3-positivas y evaluar el papel de diferentes células efectoras de la respuesta inmunitaria en el efecto de la inmunoterapia combinada contra el REGF y el gangliósido NGcGM3.

## **Coexpresión/colocalización del REGF y el gangliósido NGcGM3 en pacientes con tumores de diferentes localizaciones y en dos modelos murinos de metástasis pulmonares (3LL-D122 y 4T1)**

La expresión del REGF se evaluó con el empleo del AcM *ior egf/r3* (17) y el gangliósido NGcGM3 con el AcM 14F7 (18), a través de métodos inmunohistoquímicos o de inmunofluorescencia. El REGF está co-expresado con el gangliósido NGcGM3 en el 69 % (96/139) en tumores humanos de diferentes localizaciones (adenocarcinomas de mama, ovario, etc.). La positividad doble también se observó en metástasis, tumores recurrentes y tumores postratamientos. Particularmente, en pacientes con CPCNP, se obtuvo un 62,14 % de positividad (64/103) de la doble expresión del REGF y el gangliósido NGcGM3. Los pacientes de CPCNP con fenotipo NGcGM3/REGF positivo mostraron un peor pronóstico, al compararlo la expresión de los blancos por separado. Este resultado muestra que la doble expresión del REGF y el gangliósido NGcGM3 es un fenómeno frecuente en pacientes con CPCNP y que está asociado con mal pronóstico, lo cual lo convierte en un escenario clínico para la extrapolación de esquemas de combinaciones evaluadas en biomodelos.

En el escenario murino, el REGF y NGcGM3 se encontraron colocalizados en las metástasis pulmonares de dos modelos murinos: el carcinoma pulmonar de Lewis (3LL-D122) y el carcinoma de mama (4T1). La colocalización se determinó a través de una inmunofluorescencia con doble tinción, un microscopio confocal y el coeficiente de correlación de Pearson: células 3LL-D122 ( $r = 0,75$ ) y las células 4T1 ( $r = 0,65$ ). Este resultado sugiere una interacción biológica entre ambas moléculas, así como la heterogeneidad en la expresión de estos blancos en los tumores.

## **Efecto sinérgico de la inmunoterapia contra el REGF y el gangliósido NGcGM3 en modelos de metástasis pulmonares espontáneas**

Para estudiar la combinación se empleó del AcM 7A7 como terapia anti-REGF. La vacuna NGcGM3/VSSP y el AcM 14F7 se utilizaron como terapias anti-NGcGM3. En general, la combinación puede afectar o no el crecimiento del tumor

primario así como las macrometástasis pulmonares, pero en ambos, el efecto es similar a la vacuna como monoterapia. Sin embargo, e independientemente del tipo de terapia anti-NGcGM3, su combinación con el AcM anti-REGF incrementa la supervivencia de los animales portadores de metástasis pulmonares 3LL-D122 y 4T1 (60 % vs. 40 %, respectivamente), a diferencia de las monoterapias. Particularmente, la combinación de terapias pasivas (AcMs 7A7+14F7) reproduce parcialmente el efecto sinérgico, lo cual pudiera estar sustentado por el corto período de permanencia de este anticuerpo en la circulación sanguínea. Estos resultados aportan datos que no solo confirman la relevancia de estas moléculas para la biología de estos tumores *in vivo*, si no refuerzan el valor del diseño racional de la terapia combinada.

### **En el efecto de la inmunoterapia combinada se demuestra la reducción de la señalización de las cascadas del REGF y de la uPAR/integrina $\alpha 5\beta 1$ , así como la participación de células del sistema inmunitario**

La activación/señalización del REGF y la del complejo uPAR/integrina  $\alpha 5\beta 1$  en las metástasis 3LL-D122, se determinó a través de la técnica de citometría de flujo y la tinción de inmunofluorescencia. En las metástasis remanentes (postratamientos), el tratamiento anti-REGF (AcM 7A7) en combinación con la vacuna NGcGM3/VSSP no modifica la expresión del REGF, pero sí reduce la fosforilación del REGF y de Stat3, lo cual puede estar mediado por la disminución de la expresión del complejo uPAR/integrina  $\alpha 5\beta 1$ , vía Src y FAK. La baja expresión del gangliósido NGcGM3, por efecto de la terapia combinada, contribuye a disminuir el reforzamiento de la proliferación tumoral vía uPAR/integrina  $\alpha 5\beta 1$ ; en consecuencia, se favorece la ruta del REGF y se rescata la sensibilidad a terapias anti-REGF. El apagamiento simultáneo de ambas vías de señalización, por efecto de la terapia combinada, tiene como impacto funcional la reducción de la angiogénesis intratumoral y, por consiguiente, el incremento de la supervivencia de los animales portadores de metástasis 3LL-D122.

Adicionalmente, la eliminación de las poblaciones celulares efectoras asociadas al efecto anti-metastásico tanto del AcM 7A7 (TCD4<sup>+</sup> y TCD8<sup>+</sup>) como de la vacuna NGcGM3/VSSP (células NK<sup>+</sup>), invalida por completo el efecto de la terapia combinada en la supervivencia de los animales portadores de metástasis 3LL-D122. Estos resultados sugieren que el efecto sinérgico de la inmunoterapia combinada es el resultado de la complementariedad de los mecanismos del sistema inmunitario descritos para las monoterapias.

### **Valor científico y práctico**

El impacto científico de este trabajo radica en la demostración, por vez primera, del efecto sinérgico de la combinación de las terapias anti-REGF y anti-NGcGM3 en el incremento de la supervivencia de los animales portadores de metástasis pulmonares positivos para estos antígenos. Adicionalmente, la terapia combinada redujo la expresión de diversas moléculas que participan en las vías de señalización del uPAR y la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . Este resultado constituye un aporte al conocimiento, al evidenciar que una terapia contra el gangliósido NGcGM3 modula simultáneamente ambas cascadas y su impacto funcional se traduce en la disminución de la angiogénesis intratumoral.

Como impacto práctico, en primer lugar, las evidencias anteriores sugieren la aplicación de esquemas de combinación contra estos blancos tumorales en la clínica, al considerar, además, la coexpresión del REGF y el NGcGM3 como un fenómeno relativamente frecuente en tumores de diferentes localizaciones, según se demuestra también en el presente trabajo. En segundo lugar, la colocalización de ambos blancos tumorales en dos modelos de metástasis pulmonares 3LL-D122 y 4T1 permite la aplicación de diversas estrategias de combinaciones con el objetivo de minimizar la resistencia descrita para las terapias anti-REGF.

Los resultados de este trabajo condujeron al inicio de dos ensayos clínicos con la combinación del preparado vacunal NGcGM3/VSSP y el anticuerpo monoclonal Nimotuzumab (CIMAher®): pacientes con cáncer avanzado de pulmón de células no pequeñas CPCNP (ensayo exploratorio) y pacientes con cáncer de mama triple negativo metastásico (fase II).

### **Referencias bibliográficas**

1. Nicholson RI, Gee JM y Harper ME. (2001). EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer* 37 Supl 4 S9-15.
2. Hanahan, D and Weinberg, RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646-674.
3. Marquina, G, Waki, H, Fernandez, LE, Kon, K, Carr, A, Valiente, O y cols. (1996). Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Research* 56(22):5165-5171.
4. Blanco, R, Blanco, D, Quintana, Y, Escobar, X, Rengifo, CE, Osorio, M, y cols. (2013). Immunoreactivity of the 14F7 Mab Raised against N-Glycolyl GM3 Ganglioside in Primary Lymphoid Tumors and Lymph Node Metastasis. *Patholog Res Int* 2013(920972).
5. Segatori, VI, Vazquez, AM, Gomez, DE, Gabri, MR and Alonso, DF. (2012). Preclinical evaluation of racotumomab, an anti-idiotypic monoclonal antibody to N-glycolyl-containing gangliosides, with or without chemotherapy in a mouse model of non-small cell lung cancer. *Frontiers in Oncology* 2(160).
6. Casadesus, AV, Fernandez-Marrero, Y, Clavell, M, Gomez, JA, Hernandez, T, Moreno, E and Lopez-Requena, A. (2013). A shift from N-glycolyl- to N-acetyl-sialic acid in the GM3 ganglioside impairs

- tumor development in mouse lymphocytic leukemia cells. Glycoconjugate Journal 30(7):687-699.
7. Lahera, T, Calvo, A, Torres, G, Rengifo, CE, Quintero, S, Arango Mdel, C, y cols. (2014). Prognostic Role of 14F7 Mab Immunoreactivity against N-Glycolyl GM3 Ganglioside in Colon Cancer. Journal of Oncology 2014(482301).
  8. Huang, X, Li, Y, Zhang, J, Xu, Y, Tian, Y and Ma, K. (2013). Ganglioside GM3 inhibits hepatoma cell motility via down-regulating activity of EGFR and PI3K/AKT signaling pathway. Journal of Cellular Biochemistry 114(7):1616-1624.
  9. Wang, XQ, Sun, P, Go, L, Koti, V, Fliman, M and Paller, AS. (2006). Ganglioside GM3 promotes carcinoma cell proliferation via urokinase plasminogen activator-induced extracellular signal-regulated kinase-independent p70S6 kinase signaling. The Journal of Investigative Dermatology 126(12):2687-2696.
  10. Crombet-Ramos, T, Rak, J, Perez, R and Vilorio-Petit, A. (2002). Antiproliferative, antiangiogenic and proapoptotic activity of h-R3: A humanized anti-EGFR antibody. International journal of cancer Journal International du Cancer 101(6):567-575.
  11. Crombet, T, Osorio, M, Cruz, T, Roca, C, del Castillo, R, Mon, R, y cols. (2004). Use of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody h-R3 in combination with radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer patients. Journal of clinical oncology. Official Journal of the American Society of Clinical Oncology 22(9):1646-1654.
  12. Estevez, F, A. Carr, L, Solorzano, O, Valiente, C, Mesa, O, Barroso, G, y cols. (1999). Enhancement of the Immune Response to Poorly Immunogenic Gangliosides After Incorporation Into Very Small Size Proteoliposomes (VSSP) Vaccine 18(1-2):190-197.
  13. Mulens, V, de la Torre, A, Marinello, P, Rodriguez, R, Cardoso, J, Diaz, R, y cols. (2010). Immunogenicity and safety of a NeuG-cGM3 based cancer vaccine: Results from a controlled study in metastatic breast cancer patients. Human Vaccines 6(9).
  14. Osorio, M, Gracia, E, Rodriguez, E, Saurez, G, Arango Mdel, C, Norris, E, y cols. (2008). Heterophilic NeuGcGM3 ganglioside cancer vaccine in advanced melanoma patients: results of a Phase Ib/IIa study. Cancer Biology & Therapy 7(4):488-495.
  15. Garrido, G, Sánchez, B, Pérez, R and Fernández, LE. (2007). The anti-tumor activity of the 7A7 antibody, specific to murine EGFR, is independent of target expression levels in immunocompetent mice. Biotecnología Aplicada 24: 26-32.
  16. Labrada, M, Clavell, M, Bebelagua, Y, Leon, J, Alonso, DF, Gabri, MR, y cols. (2010). Direct validation of NgcGM3 ganglioside as a new target for cancer immunotherapy. Expert Opinion on Biological Therapy 10(2):153-162.
  17. Fernandez, A y cols. (1996). A new monoclonal antibody for detection of EGF-receptors in western blots and paraffin-embedded tissue sections. Journal of Cellular Biochemistry 49(2): 157-65.
  18. Carr, A, Mullet, A, Mazorra, Z, Vázquez, AM, Alfonso, M, Mesa, C, y cols. (2000). A mouse IgG1 monoclonal antibody specific for N-glycolyl GM3 ganglioside recognized breast and melanoma tumors. Hybridoma 19(3):241-247.

#### AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA

**Dr. C. Adys González Palomo.** Centro de Inmunología Molecular. Calle 216, esq. 15, Atabey, Playa. Habana 11600, Cuba. Correo electrónico: [addys@cim.sld.cu](mailto:addys@cim.sld.cu)