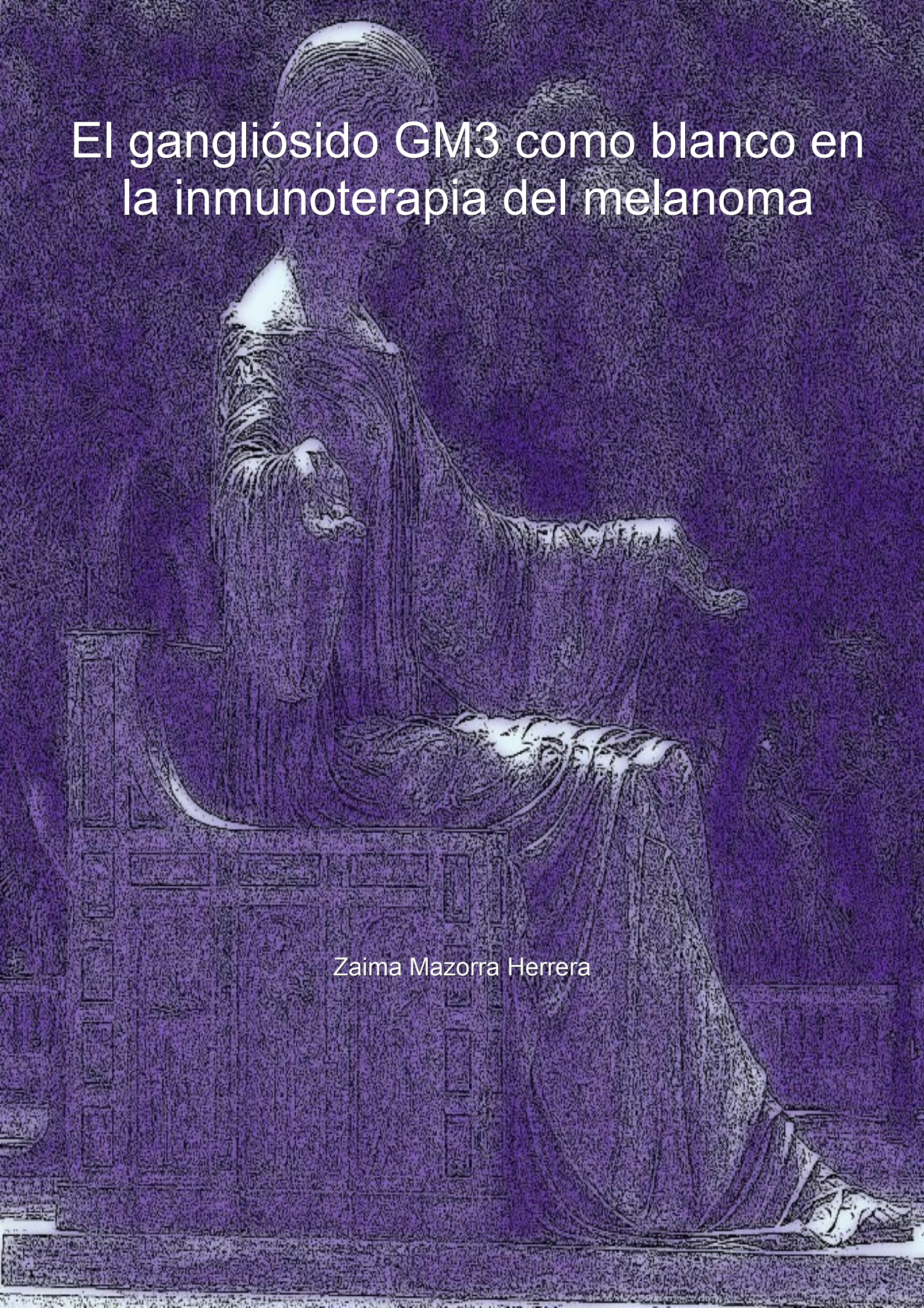


# El gangliósido GM3 como blanco en la inmunoterapia del melanoma

Zaima Mazorra Herrera





República de Cuba - Universidad de La Habana



## **El gangliósido GM3 como blanco en la inmunoterapia del melanoma**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en  
Ciencias Biológicas

Zaima Mazorra Herrera



**Universidad de La Habana**  
**Facultad de Biología**

## **El gangliósido GM3 como blanco en la inmunoterapia del melanoma**

Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias Biológicas

Autor: MCs. Zaima Mazorra Herrera

Tutor: DrCs. Luis E. Fernández Molina



**Centro de Inmunología Molecular**

**Ciudad de la Habana,**

**2007**

571.6-Maz-G

El gangliósido GM3 como blanco en la inmunoterapia del melanoma / Zaima Mazorra Herrera; Luis E. Fernández Molina, tutor. -- Ciudad de La Habana : Editorial Universitaria, 2008. -- ISBN 978-959-16-0800-0. -- 130 pág. -- Universidad de La Habana. -- Tesis (Doctor en Ciencias Biológicas).

1. Mazorra Herrera, Zaima
2. Fernández Molina, Luis E., tutor
3. Ciencias Biológicas

Edición: Luz María Rodríguez Cabral

Corrección: Dr. C. Raúl G. Torricella Morales

Diseño de cubierta: Elisa Torricella Ramirez



Editorial Universitaria del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba, 2008

La **Editorial Universitaria** publica bajo licencia Creative Commons de tipo Reconocimiento No Comercial Sin Obra Derivada, se permite su copia y distribución por cualquier medio siempre que mantenga el reconocimiento de sus autores, no haga uso comercial de las obras y no realice ninguna modificación de ellas. La licencia completa puede consultarse en:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/legalcode>

***Editorial Universitaria***

Calle 23 entre F y G, No. 564,

El Vedado, Ciudad de La Habana, CP 10400, Cuba.

e-mail: [torri@reduniv.edu.cu](mailto:torri@reduniv.edu.cu)

Sitio Web: <http://revistas.mes.edu.cu>

*A mi Carlitos...*

---

## ***ABREVIATURAS***

por orden alfabético:

AcMs	anticuerpos monoclonales
ADCC	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (del inglés "antibody-dependent cellular cytotoxicity")
ADN	ácido deoxyribonucleico
APC	célula presentadora de antígenos (del inglés "antigen presenting cell")
ARN	ácido ribonucleico
ATCC	Colección Americana de Tipos Celulares (del inglés "American Type Culture Collection")
BCG	bacilo Calmette-Guerin
BCIP	5-bromo-4-cloro-indolilfosfato
bmDCs	células dendríticas derivadas de médula ósea (del inglés "bone marrow dendritic cells")
BSA	albúmina de suero bovino (del inglés "bovine serum albumin")
CDC	citotoxicidad del anticuerpo dependiente de complemento (del inglés "citotoxicity dependent complement")
CDn	moléculas de diferenciación expresadas en células del sistema inmune
CEA	antígeno carcinoembrionario (del inglés "carcinoembryonic antigen")
CENPALAB	Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio
CIM	Centro de Inmunología Molecular
CpG	ADN bacteriano no metilado con secuencias CpG
CTL	linfocitos T citotóxicos (del inglés "cytotoxic T lymphocytes")
CTLA-4	antígeno anticitotóxico expresado en células T (del inglés "anti-cytotoxic T lymphocyte antigen")
DAF	factor activante de apagamiento (del inglés "decay-activating factor")
DCs	células dendríticas (del inglés "dendritic cells")
D.O	densidad óptica
ELISA	ensayo inmunoenzimático colorimétrico (del inglés "enzyme immunosorbent assay")

---

---

FACS	citometría de flujo (del inglés "fluorescence activated cell sorter")
FDA	Agencia Americana de Nuevas Drogas (del inglés "Food and Drug Administration")
FITC	isotiocianato de fluoresceína (del inglés "fluorescein iso-thiocyanate")
FSC-H	dispersión del láser hacia adelante (del inglés "forward scatter")
GEM	ratón modificado genéticamente (del inglés "genetically engineered mouse")
GM-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés "granulocyte-macrophage colony stimulating factor")
HER2/neu	receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (del inglés "human epidermal growth factor receptor type 2")
HPTLC	cromatografía en placa delgada de alta resolución (del inglés "high performance thin layer chromatography")
HPV	virus del papiloma humano (del inglés "human papilloma virus")
HSP	proteínas de estrés térmico (del inglés "heat shock proteins")
IFN	Interferón
KLH	hemocianina de la linfa del cangrejo Bayoneta (del inglés "keyhole limpet hemocyanin")
MHC	moléculas del sistema principal de histocompatibilidad (del inglés "major histocompatibility complex")
NK	células asesinas naturales (del inglés "natural killer")
NKT	células asesinas naturales que expresan el receptor de células T (del inglés "natural killer T")
OVA	albúmina de huevo de pollo (del inglés "ovoalbumin")
PBS	solución salina tamponada con fosfato (del inglés "phosphate buffer solution")
PE	ficoeritrina (del inglés "phycoerythrin")
PIBM	poliisobutilmetacrilato
PMA	acetato de forbol miristato (del inglés "phorbol 12-myristate 13-acetate")
pNPP	p-nitrofenilfosfato
PSA	antígeno prostático (del inglés "prostatic-specific antigen")

---

---

QS-21	fracción saponina purificada de la corteza del árbol <i>Quillaja saponaria</i>
SDS	dodecil sulfato de sodio (del inglés "sodium dodecylsulphate")
SFT	suero fetal de ternera
SSC-H	dispersión del láser hacia los lados (del inglés "side scatter")
TA	temperatura ambiente
TCR	receptor de células T (del inglés, " T cell receptor")
TGF $\beta$	factor de crecimiento del tumor (del inglés "tumor growth factor")
Th	linfocitos T auxiliares (del inglés "T helper")
TLR	receptores tipo Toll (del inglés "Toll like receptors")
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad (del inglés "very low density lipoprotein")
VME	vesículas de membrana externa
VSSP	proteoliposomas de muy pequeña talla (del inglés "very small size proteoliposomes")

---



---

**ÍNDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Inmunoterapia del cáncer.....</b>	<b>7</b>
2.1.1 Vacunas terapéuticas .....	7
2.1.2 Inmunosupresión inducida por los tumores.....	12
2.1.3 Vacunas en enfermedad residual mínima .....	13
2.1.4 Vacunas preventivas contra el cáncer .....	14
2.1.5 Mecanismos de acción de las vacunas de cáncer. ....	15
2.1.6 Mecanismos de respuesta inmune en las vacunas preventivas de cáncer. ...	18
<b>2.2 El melanoma como problema de salud. Tratamiento actual.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Los gangliósidos.....</b>	<b>21</b>
2.3.1 Características estructurales, localización y función.....	21
2.3.2 Los gangliósidos como antígenos tumor-asociados .....	22
2.3.3 Inmunosupresión inducida por los gangliósidos. El gangliósido GM3.....	24
2.3.4 Inmunogenicidad de los gangliósidos.....	27
2.3.5 Vacunas de cáncer basadas en gangliósidos.....	29
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Reactivos, líneas celulares y animales de experimentación .....</b>	<b>35</b>
3.1.1 Ratones.....	35
3.1.2 Medios de cultivo .....	35
3.1.3 Líneas celulares .....	35
3.1.4 Extracto de células.....	35
3.1.5 Preparación de los VSSP.....	36
3.1.6 Preparación de la vacuna emulsionada.....	36
3.1.7 Anticuerpos monoclonales .....	37
<b>3.2 Experimentos antitumorales.....</b>	<b>38</b>
3.2.1 Inoculación del tumor .....	38
3.2.2 Escenario de enfermedad residual mínima.....	38
3.2.3 Escenario preventivo-terapéutico .....	39
3.2.4 Escenario profiláctico.....	39
<b>3.3 Ensayos.....</b>	<b>42</b>
3.3.1 Ensayos serológicos.....	42
3.3.2 Ensayos celulares.....	46
3.3.3 Análisis estadísticos .....	48
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Inmunogenicidad en ratones del candidato vacunal VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 .....</b>	<b>51</b>

---

4.1.1	<i>El candidato vacunal VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 induce anticuerpos anti-GM3 de alta especificidad.....</i>	<i>51</i>
4.1.2	<i>Las subclases de IgG predominantes en los sueros hiperinmunes son IgG3 e IgG2b .....</i>	<i>52</i>
4.1.3	<i>Los sueros de los ratones vacunados reconocen la línea de melanoma B16 .....</i>	<i>53</i>
4.1.4	<i>Los sueros de los ratones vacunados tienen actividad citolítica sobre las células de B16.....</i>	<i>54</i>
4.2	<b><i>Actividad antitumoral del candidato vacunal VSSP/GM3+ Montanide ISA 51 en el modelo del melanoma murino B16. Escenario de enfermedad residual mínima</i></b>	<b><i>55</i></b>
4.2.1	<i>El candidato vacunal VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 protege a los ratones de la recurrencia del melanoma B16.....</i>	<i>55</i>
4.3	<b><i>Actividad antitumoral del candidato vacuna VSSP/GM3+ Montanide ISA 51 en el modelo del melanoma murino B16. Escenario preventivo-terapéutico .....</i></b>	<b><i>57</i></b>
4.3.1	<i>La inmunización preventiva-terapéutica con el VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 induce protección contra el reto con el melanoma B16.....</i>	<i>57</i>
4.4	<b><i>Actividad antitumoral del candidato vacunal VSSP/GM3+ Montanide ISA 51 en el modelo del melanoma murino B16. Escenario preventivo.....</i></b>	<b><i>59</i></b>
4.4.1	<i>La inmunización preventiva con el VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 induce protección contra el reto con el melanoma B16 .....</i>	<i>59</i>
4.4.2	<i>La actividad antitumoral del VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 depende del número de dosis y la frecuencia de administración.....</i>	<i>61</i>
4.4.3	<i>La respuesta antitumoral es dependiente del gangliósido presente en el tumor y en la preparación vacunal .....</i>	<i>63</i>
4.4.4	<i>La protección antitumoral es de larga duración .....</i>	<i>64</i>
4.5	<b><i>Mecanismos inmunológicos en la actividad antitumoral inducida por el VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 en el escenario preventivo. ....</i></b>	<b><i>66</i></b>
4.5.1	<i>La actividad antitumoral del candidato vacunal correlaciona con la inducción de anticuerpos IgG específicos por el GM3.....</i>	<i>66</i>
4.5.2	<i>El suero post-inmune de ratones que rechazaron el tumor lisa células de melanoma B16 mediante citotoxicidad dependiente de complemento autólogo .....</i>	<i>70</i>
4.5.3	<i>La actividad antitumoral del VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 no depende de las células T CD4+ en la fase de inducción de la respuesta inmune.....</i>	<i>71</i>
4.5.4	<i>La actividad antitumoral del preparado VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 depende de células T CD8+ y no de células NK durante la fase efectora de la respuesta inmune .....</i>	<i>73</i>
4.5.5	<i>Las células T de ratones inmunizados que rechazaron el tumor reconocen antígenos de melanoma B16 presentados por las bmDCs.....</i>	<i>75</i>
4.5.6	<i>Las células T de ratones inmunizados que rechazaron el tumor reconocen específicamente las células de B16 previamente tratadas con IFN<math>\alpha</math>.....</i>	<i>76</i>
5.	<b><i>DISCUSIÓN.....</i></b>	<b><i>79</i></b>
6.	<b><i>CONCLUSIONES.....</i></b>	<b><i>91</i></b>

<b>7. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>93</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>95</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>115</b>

---

*Todas las universidades de Cuba en una:*

**EDUNIV**  
**Editorial Universitaria**





## **1. INTRODUCCIÓN**

La incidencia del melanoma maligno, el tumor de piel más agresivo, se ha visto incrementada en los últimos años (1, 2). Un número limitado de pacientes se beneficia de las terapias biológicas adyuvantes cuando el melanoma recurre después de haber sido eliminada la lesión primaria. En el caso de los pacientes de melanoma metastásico, sólo el cinco por ciento de ellos sobrevive más de cinco años y los tratamientos convencionales, tales como la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía son muy poco efectivos (3, 4).

Entre los antígenos sobreexpresados en los melanomas están los gangliósidos. Estas moléculas son glicoesfingolípidos de gran variabilidad, que se expresan en las membranas plasmáticas de las células de los vertebrados y cuya síntesis se incrementa en las células tumorales (5-7). En los melanomas de origen humano, el gangliósido más abundante es el GM3 (8). Se ha encontrado una correlación positiva entre la resistencia de las células tumorales a la quimioterapia y la expresión de altos niveles de GM3 (9), lo cual convierte a este gangliósido en un blanco potencial para la inmunoterapia del melanoma. Este hecho se refuerza por la existencia de una gran cantidad de evidencias sobre el carácter inmunosupresor de esta molécula. Uno de los mecanismos a través de los cuales los tumores escapan de la vigilancia inmunológica, es la secreción de los gangliósidos hacia el microambiente del tumor y la circulación sistémica. De esta forma, estas moléculas suprimen la función de células claves del sistema inmune. En este sentido, se ha visto que el GM3 es capaz de inhibir la proliferación de linfocitos humanos inducida por mitógenos (10), así como la diferenciación de células dendríticas (DCs, del inglés "dendritic cells") a partir de progenitores CD34<sup>+</sup> (CDn, moléculas de diferenciación expresadas en células del sistema inmune) (11). Aunque se han ensayado varias estrategias de inmunoterapia basada en los gangliósidos, no hay trabajos en la literatura sobre el uso del GM3 como único antígeno tumor-asociado de una vacuna molecular contra el cáncer. Debido a las características de esta molécula, una terapia activa basada en el GM3 puede inducir una respuesta inmune que conlleve a la eliminación de estas moléculas de la circulación y del microambiente tumoral, con la consiguiente neutralización de su efecto inmunosupresor. Por otra parte, los componentes de la inmunidad humoral y celular que reconozcan a este

gangliósido sobre las células tumorales, y específicamente sobre las de melanoma, pudieran causar su eliminación.

El efecto antitumoral de las vacunas basadas en gangliósidos, principalmente para el tratamiento del melanoma, ha sido estudiado en modelos preclínicos y en ensayos clínicos. Los resultados en ratones inmunizados con vacunas celulares que expresan estas moléculas, han mostrado reducción del crecimiento del tumor y rechazo del inóculo en un número limitado de animales (12, 13). En algunos casos, la frecuencia de inducción de anticuerpos antigangliósidos correlaciona positivamente con la supervivencia (14, 15). Se ha demostrado además, que estos anticuerpos son capaces de eliminar células tumorales mediante el mecanismo de la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, del inglés "complement-dependent cytotoxicity")(16). Estos hallazgos sugieren que la respuesta inmune humoral es el mecanismo efector predominante en este tipo de terapia.

Debido al gran potencial que tiene la respuesta inmunológica celular para erradicar células tumorales, y a que una gran cantidad de estudios clínicos y preclínicos están enfocados a la inducción de células asesinas naturales (NK, del inglés "natural killer") y células T citotóxicas (CTL, del inglés "cytotoxic T lymphocytes") específicas por antígenos de los tumores, es necesario estudiar la inducción de este tipo de respuesta en las terapias basadas en gangliósidos. Se ha publicado la detección de células T específicas por los gangliósidos presentados en moléculas de presentación no clásicas como el CD1 (17). Recientemente, Chapman y cols. demostraron que ratones inmunizados con un melanoma humano que expresaba el GD3 desarrollaban una respuesta de células T asesinas naturales (NKT, del inglés "natural killer T cells") restringidas a CD1d y específicas por este gangliósido (18). Sin embargo, no hay publicaciones en la literatura sobre la inducción de células T o NKT específicas a los gangliósidos por la inmunización con vacunas moleculares basadas en estos glicolípidos.

Varias vacunas, que incluyen gangliósidos en su composición, han sido probadas en ensayos clínicos. Particularmente en el caso del melanoma, dos vacunas fracasaron en ensayos clínicos fase III (19, 20). Con el candidato vacunal VSSP/GM3 multimerizado en Montanide ISA 51 se llevó a cabo un ensayo clínico fase I en pacientes de melanoma metastático. Aunque la vacuna indujo respuesta de anticuerpos contra el gangliósido, la

sobrevida de los pacientes vacunados no fue significativamente mayor que la del control (21). Esta ausencia de efecto clínico parece deberse a las características de los pacientes incluidos en estos ensayos, más que al potencial terapéutico de estas vacunas. Es conocido que en ratones con tumores experimentales, así como en pacientes con cáncer, se induce una respuesta inmune menos potente que en sujetos sanos (22). Esto se debe a que el tumor induce supresión sobre el sistema inmune del hospedero, la cual se refuerza en pacientes con grandes masas tumorales (23, 24). Como consecuencia, en los últimos años, la inmunoterapia en enfermedad residual mínima se ha convertido en una estrategia atractiva para pacientes con alto riesgo de recurrencia de la enfermedad, después de ser tratados con terapias convencionales como cirugía, quimio o radioterapia. Con respecto a este tipo de pacientes existen ya algunos resultados prometedores con vacunas para carcinoma de colon y tumores hematológicos, los cuales deben ser confirmados en ensayos clínicos fase III (25, 26).

Aunque la aplicación de las vacunas profilácticas para la prevención de los tumores en seres humanos está todavía en una fase temprana de su desarrollo, el uso de este tipo de terapia en el caso de virus oncogénicos ha sido exitoso (27-29). Como consecuencia de estos hallazgos, la vacuna contra el virus de la hepatitis B como profilaxis del hepatocarcinoma, y la vacuna contra el virus de papiloma humano (HPV, del inglés "human papilloma virus") contra el carcinoma cervical han sido aprobadas por la Agencia Americana de Nuevas Drogas (FDA, del inglés "Food and Drug Administration") para su uso en humanos (30). El reto actual de las vacunas profilácticas contra el cáncer está en prevenir aquellos tumores que no tienen origen viral. Algunos pacientes con lesiones premalignas o mutaciones genéticas que los hacen susceptibles a desarrollar el cáncer, pudieran ser buenos candidatos para considerar en una vacunación profiláctica.

En el Centro de Inmunología Molecular (CIM), como resultado del esfuerzo por encontrar nuevas terapias efectivas en el tratamiento del cáncer, se diseñó un nuevo inmunógeno (31) para el tratamiento de pacientes de melanoma. Antes de aplicar esta terapia en ensayos clínicos, se estudió su actividad antitumoral en el modelo preclínico del melanoma B16. Esta formulación consistió en el gangliósido GM3, el más abundante en el melanoma B16 (32), combinado con vesículas de membrana externa (VME) de la *Neisseria meningitidis*. Con este proceso se forman proteoliposomas de muy pequeña talla (VSSP, del inglés

"Very Small Size Proteoliposomes") con el GM3 insertado, que poseen conocidas propiedades inmunoestimuladoras (33). El fracaso de la inmunoterapia activa en pacientes con estadios avanzados de la enfermedad, nos motiva a buscar un inmunógeno que sea efectivo contra el melanoma en el escenario de enfermedad residual mínima e incluso en el preventivo. Por otra parte, a pesar de la importancia de conocer los mecanismos de acción antitumorales para aumentar la efectividad de las terapias, existen muy pocos trabajos con candidatos vacunales basados en gangliósidos, en los que se estudien estos mecanismos. En dichas investigaciones sólo se ha abordado el papel de los anticuerpos en la actividad antitumoral de los inmunógenos. Sobre la base de estos antecedentes se formuló la siguiente **hipótesis**:

**La inserción del gangliósido GM3 en el complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* (VSSP) será un procedimiento efectivo para inducir una respuesta antitumoral contra el melanoma B16, tanto en el modelo preventivo como en el de enfermedad residual mínima. Este efecto antitumoral dependerá de las ramas celular y humoral de la respuesta inmune.**

A partir de esta hipótesis se trazaron los siguientes objetivos:

1. Determinar la inmunogenicidad del candidato vacunal VSSP/GM3 en ratones.
2. Evaluar la respuesta antitumoral inducida por el VSSP/GM3 en el modelo del melanoma murino B16, tanto en el escenario preventivo como en el de enfermedad residual mínima.
3. Caracterizar los mecanismos humorales y celulares involucrados en la actividad antitumoral del candidato vacunal VSSP/GM3 contra el melanoma B16 en el escenario preventivo.

Para el cumplimiento de estos objetivos se plantearon las siguientes tareas experimentales:

Objetivo 1

- Determinación del título de anticuerpos específicos por el GM3 inducidos por la inmunización con VSSP/GM3 en ratones C57BL/6 y BALB/c.
- Caracterización de la respuesta de anticuerpos inducidos por la inmunización con VSSP/GM3 en ratones C57BL/6 en cuanto a: isotipo, subclases, especificidad, reconocimiento y actividad lítica *in vitro* sobre el melanoma B16.

Objetivo 2



- Evaluación del efecto sobre la sobrevida y el volumen tumoral de la administración preventiva del candidato vacunal VSSP/GM3 en ratones C57BL/6 inoculados con el melanoma B16.
- Determinación del impacto de la presencia en la formulación vacunal del adyuvante Montanide ISA 51 y el gangliósido GM3, en la actividad antitumoral preventiva del VSSP/GM3 sobre el melanoma B16.
- Determinación de la influencia del esquema de inmunización (frecuencia de administración y número de dosis) en la actividad antitumoral preventiva del VSSP/GM3 sobre el melanoma B16.
- Estudio de la duración de la respuesta antitumoral inducida por la inmunización preventiva con el VSSP/GM3 en el modelo del melanoma murino B16.
- Evaluación del efecto de la administración del candidato vacunal VSSP/GM3 sobre la sobrevida, la recurrencia local y la incidencia de metástasis en ratones C57BL/6 operados del melanoma B16.

### Objetivo 3

- Caracterización de la respuesta de anticuerpos contra el GM3 en cuanto a título, isotipo y frecuencia de respondedores en ratones inmunizados con VSSP/GM3 e inoculados con el melanoma B16. Correlación de esta respuesta con la propiedad de rechazar el tumor.
- Caracterización de la respuesta de anticuerpos en cuanto a capacidad de lisar *in vitro* al melanoma B16 en ratones inmunizados con VSSP/GM3 e inoculados con este tumor.
- Evaluación del impacto sobre la sobrevida de la eliminación de células CD4+, CD8+ y NK en ratones inmunizados con VSSP/GM3 e inoculados con el melanoma B16.
- Caracterización del reconocimiento *in vitro* de las células T de ratones inmunizados con VSSP/GM3 que rechacen el melanoma B16.

**La novedad científica** de estos resultados consiste en que se evidencia, por primera vez, la efectividad de una terapia experimental basada únicamente en el gangliósido GM3 contra el melanoma murino B16, tanto en el escenario preventivo como en el de enfermedad residual mínima. **El aporte principal al conocimiento** de este trabajo

consiste en sustentar la importancia de las ramas humoral y celular de la respuesta inmune en la actividad antitumoral de la inmunoterapia activa basada en gangliósidos.

**El valor práctico de estos hallazgos** es la predicción de como el tratamiento con el candidato vacunal VSSP/GM3 de pacientes de melanoma de estadio II, en los cuales la cirugía es curativa en aproximadamente el 60 por ciento de los casos, pudiera incrementar notablemente el número de pacientes sin recurrencia de lesiones malignas.

Los resultados compilados en este trabajo han sido presentados en cinco eventos internacionales y forman parte de tres publicaciones. Dos de ellas aparecidas en revistas internacionales, una en "Melanoma Research" y la otra en la revista de alto índice de impacto "Clinical Cancer Research". La tercera fue enviada a " Journal of Immunotherapy".

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Inmunoterapia del cáncer**

#### *2.1.1 Vacunas terapéuticas*

Hace más de 100 años, William Coley describió por primera vez la remisión de tumores en pacientes con cáncer tratados con bacterias o sus respectivos extractos (34). Algunos de estos productos bacterianos eran potentes activadores del sistema inmune y como consecuencia los tumores eran destruidos (35). A partir de este descubrimiento se han acumulado una gran cantidad de evidencias sobre el reconocimiento de los tumores por el sistema inmune. Se han descubierto y caracterizado muchos antígenos que se sobreexpresan en las células malignas comparado con el nivel de expresión en células normales. Además, se ha verificado la hipótesis de la vigilancia inmunológica del cáncer, en la cual las células presentadoras de antígenos (APC, del inglés "antigen presenting cells") reconocen células transformadas y mutágenos, y activan a otros componentes del sistema inmune para eliminarlos (36, 37). Las vacunas contra el cáncer son una aplicación de este conocimiento y están basadas en el principio de la inducción de una respuesta inmune eficaz que elimine el tumor.

Debido a que las vacunas de cáncer se evaluaron inicialmente en pacientes con tumores avanzados, se les ha llamado vacunas terapéuticas. Se considera que existen dos generaciones de vacunas anticáncer, que en la actualidad co-existen en diferentes ensayos clínicos. Una primera generación se basa en preparaciones celulares, y la otra en entidades moleculares. Las vacunas de la primera generación, han utilizado células tumorales autólogas irradiadas o extractos de las mismas como fuente de antígenos tumorales, en combinación con adyuvantes (38, 39). Más reciente, se han desarrollado vacunas con células tumorales autólogas o heterólogas modificadas química, enzimática o genéticamente (40-42).

Debido a la poca inmunogenicidad de las células tumorales y a la definición molecular de los antígenos tumorales en la década de los 80, las investigaciones desviaron su atención al uso de entidades moleculares en la terapia activa contra el cáncer (43). Una de las estrategias usadas en este tipo de vacunas ha sido la inserción de los genes codificantes de estos antígenos tumorales en vectores recombinantes virales (44) y aún más reciente el uso

del correspondiente ácido nucleico desnudo (45). Otro tipo de vacuna molecular son las compuestas por péptidos derivados de varios antígenos tumorales. Entre estos, los más usados son aquellos procedentes de antígenos de melanoma como son MART-1, gp-100, tirosinasa y los antígenos de la familia MAGE. La vacunación con estos péptidos ha sido exitosa en la inducción de células T CD8<sup>+</sup> específicas, pero la respuesta clínica ha sido variable y poco efectiva (46, 47). Otras estrategias con vacunas moleculares comprende el uso de proteínas sintéticas o purificadas del tumor (48). Entre estas vacunas se incluyen aquellas que contienen proteínas de estrés térmico (HSP, del inglés "heat shock protein"); oncoproteínas mutadas como K-ras y p53; glicoproteínas de la familia de las mucinas tales como MUC-1; el antígeno carcinoembrionario (CEA, del inglés "carcinoembryonic antigen"), expresado en tumores gastrointestinales; el antígeno prostático específico (PSA, del inglés "prostatic-specific antigen"), sobreexpresado en cáncer de próstata, entre otras. En este sentido, se ha realizado un intenso esfuerzo para diseñar vacunas basadas en las HSP autólogas derivadas de tumores (49). Estas proteínas endógenas, altamente conservadas, forman complejos con péptidos tumorales que inducen una respuesta de células T específicas cuando son presentadas en las APC (50). La vacuna Oncophage, compuesta por la HSP 96 a la cual están acomplejados péptidos tumorales, es un ejemplo del uso de este tipo de terapia, específicamente en pacientes de carcinoma renal de estadio IV. Los resultados de un ensayo clínico fase III, concluido recientemente, mostraron un aumento en el intervalo libre de enfermedad en el grupo de pacientes tratados con la combinación de cirugía, vacuna y la IL-2 comparado con el grupo tratado con cirugía e IL-2 (49). Otra estrategia, que ha sido ampliamente usada, es la vacunación con DCs (51). Estas células presentadoras capturan, procesan y presentan péptidos a células T vírgenes en los órganos linfoides secundarios. Este proceso constituye la primera señal que junto con la interacción de moléculas coestimuladoras entre las DCs y los linfocitos T conduce a la activación de estos últimos y la posterior eliminación de las células tumorales que expresan el antígeno. Las DCs pueden estimularse con células tumorales autólogas o alogénicas (52), extracto de tumores (53, 54) y cuerpos apoptóticos (55). Además, se pueden fusionar mediante electroporación con células tumorales irradiadas (56). Es posible también la incorporación de ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN) exógenos en estas células mediante virus recombinantes, plásmidos o electroporación (57,



58). La mayoría de estas preparaciones han sido inmunogénicas y han provocado rechazo del tumor en los modelos animales. En el escenario clínico, la vacuna más avanzada de DCs es Provenge, también conocida como Sipuleucel-T. Esta vacuna, usada en cáncer de próstata avanzado, se basa en DCs cargadas *ex vivo* con una proteína de fusión recombinante que contiene la fosfatasa ácida prostática y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, del inglés "granulocyte-macrophage colony stimulating factor"). Los resultados del ensayo fase III demostraron un aumento significativo en la supervivencia de los pacientes vacunados respecto al control que sólo recibió placebo, así como una disminución apreciable en los niveles séricos de PSA (59). Esta terapia se convertirá posiblemente en la primera vacuna terapéutica aprobada por la FDA para cáncer.

#### *2.1.1.1 Optimización de las estrategias vacunales*

Las estrategias vacunales requieren ser optimizadas para lograr mayor eficacia y seguridad en los pacientes. Los modelos animales podrían ser útiles en la correlación de la respuesta inmune y la respuesta antitumoral, así como en la optimización del esquema de vacunación, dosis, ruta de administración y el uso de adyuvantes, antes de ser aplicadas en ensayos clínicos.

Aunque no existen en la literatura científica evidencias sólidas sobre los esquemas de tratamiento óptimos en vacunas de cáncer, estudios provenientes de las enfermedades infecciosas han sugerido, que en algunos escenarios, altas dosis de vacunas compuestas por proteínas recombinantes están asociadas a una robusta respuesta específica por el antígeno y a un aumento en la frecuencia de respondedores. Este es el caso de un ensayo realizado en animales, los cuales se inmunizaron con dosis diferentes de una vacuna contra el virus del herpes, dando como resultado mayor respuesta de linfocitos T específicos en aquellos que fueron inmunizados con la dosis mayor (60). En otro ensayo conducido en donantes sanos, la mayor dosis de una vacuna basada en proteínas recombinantes del virus del HPV, generó una mayor frecuencia de respondedores entre los sujetos vacunados (61). Por otra parte, tanto el desarrollo de una respuesta de memoria después de la vacunación, así como de anticuerpos de alta avididad por el antígeno, han sido asociados con la administración de altas dosis de vacuna (62).

La identificación de adyuvantes efectivos puede ser crítica para el progreso de las vacunas contra el cáncer. Estos compuestos actúan mediante una serie de mecanismos como son: servir de depósito para liberar lentamente el antígeno a la zona de inflamación en la cual se reclutan las DCs; madurar las DCs; mediar la presentación cruzada de antígenos acoplados a ellos, modular y polarizar la respuesta inmune, así como activar los CTL. Entre las “señales de peligro” exógenas que han demostrado una excelente capacidad adyuvante se encuentran el bacilo Calmette-Guérin (BCG) y el ADN bacteriano no metilado con secuencias CpG (CpG). El BCG ha sido utilizado con cierto éxito como un agente antitumoral en el tratamiento del cáncer superficial de vejiga y melanoma (63, 64), y el CpG ha mostrado la capacidad de estimular potentes respuestas específicas contra varios tipos de tumores en ensayos preclínicos (65). Estas investigaciones preclínicas condujeron a numerosos ensayos clínicos que se encuentran en curso utilizando las secuencias CpG o al BCG como adyuvantes de vacunas terapéuticas contra el cáncer (66). Otro derivado bacteriano para el cual se han descrito propiedades inmunopotenciadoras importantes y efecto antitumoral en ensayos preclínicos, es la proteína OmpA de la membrana externa de la bacteria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* (67). La capacidad de todos estos derivados de activar las DCs se ha demostrado en diversos escenarios. Por ejemplo, tanto el BCG como el CpG activan a las DCs humanas y murinas, con la promoción del aumento en la expresión de las moléculas de los complejos principales de histocompatibilidad (MHC, del inglés "major hiscompatibility complex") tipo I y II, de las moléculas CD80 y CD86 y la secreción de IL-12 (68, 69). También experimentos realizados con la proteína OmpA de *N. meningitidis* expresada de forma recombinante, mostraron que induce la maduración completa de las DCs a través de los receptores tipo Toll (TLR, del inglés "Toll like receptor") (67).

Se ha descrito que las células necróticas, pero no las apoptóticas, liberan HSP (70). Numerosos grupos han demostrado que diferentes HSP pueden activar a las DCs y los macrófagos, por lo que las HSP se han calificado como la primera gran familia de señales de peligro endógenas (71). Los complejos HSP-péptidos derivados de tumores se han administrado, con resultados alentadores, como vacunas de cáncer personalizadas, y su acción ha sido evaluada en múltiples indicaciones, entre las que se incluyen el carcinoma renal, el melanoma metastásico, el cáncer gástrico y algunos tipos de leucemias (72).

Algunas citocinas como el GM-CSF y el interferón (IFN)  $\alpha$  han sido usados como potentes estimuladores del sistema inmune. El GM-CSF es capaz de reclutar DCs al sitio de la inyección, así como facilita la presentación cruzada de antígenos (73). El IFN $\alpha$  combinado con vacunas aumenta el porcentaje de precursores de monocitos y DCs que expresan un alto nivel de moléculas coestimuladoras. Con el objetivo de evaluar el efecto adyuvante del IFN $\alpha$ , se realizó recientemente un ensayo clínico en pacientes de melanoma en el cual el IFN $\alpha$  se administró con péptidos de Melan-A/MART-1 y gp100. Como resultado se obtuvo un aumento de las células T CD8<sup>+</sup> circulantes específicas por los péptidos, capaces de reconocer células de melanoma que expresaban MART-1 y gp100, así como un aumento en la frecuencia de células T de fenotipo efector (74).

En esquemas de vacunaciones en cáncer se han usado las vías de inmunización subcutánea o intradérmica. En numerosos ensayos preclínicos y algunos estudios clínicos se demuestra que las vías intratumoral o intraganglionar pudieran ser las más eficaces. Kudo-Saito y cols. demostraron que el uso secuencial de la vacuna por vía subcutánea seguida por la vacunación intratumoral es más eficaz en términos de efecto antitumoral, que el uso de una sola vía de inmunización (75).

Por último, recientemente se está aplicando la estrategia de usar terapias combinadas para obtener una respuesta antitumoral eficaz. Para lograr este objetivo se debe tener en cuenta una estrategia que combine la subversión de la tolerancia a los antígenos asociados al tumor, la eliminación de elementos supresores tales como células T reguladoras, células presentadoras y citocinas supresoras; la adición de componentes activos del sistema inmune como la transferencia adoptiva de células T efectoras, las citocinas estimuladoras y el uso de DCs como presentadoras. Además, se deben adicionar moléculas que actúen directamente sobre las células malignas, como son aquellas que inhiben la angiogénesis y el crecimiento del tumor. Como ejemplos de estas estrategias está el uso de anticuerpos contra el antígeno anticitotóxico expresado en células T (CTLA-4, del inglés "anti-cytotoxic T lymphocyte antigen") con lo que se bloquea la señal regulatoria negativa dada por esta molécula. En modelos animales, la combinación de este anticuerpo con vacunas de células completas o vacunas peptídicas tuvo como resultado un significativo aumento de actividad antitumoral de dichos inmunógenos (76, 77). Por otra parte, la combinación de anticuerpos contra las células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> con vacunas de DCs ha sido

otra estrategia prometedora para aumentar la eficacia de la respuesta inmune contra el cáncer (78, 79).

### *2.1.2 Inmunosupresión inducida por los tumores*

El fundamento del poco éxito que ha tenido la inmunoterapia en el escenario clínico ha sido el momento en que se aplica esta terapia respecto a la progresión de la enfermedad. Actualmente, la mayoría de las vacunaciones contra el cáncer se realizan en estadios avanzados de la enfermedad, en los cuales todas las demás terapias convencionales han fallado. La mayoría de los pacientes con cáncer avanzado están inmunosuprimidos y no responden a la inmunización con vacunas.

Ratones con tumores experimentales y pacientes con cáncer muestran una evidente inmunosupresión (22). Este fenómeno se manifiesta con una disminución de la proliferación, la producción de citocinas de tipo Th2 (Th, del inglés "T helper") y una pobre capacidad citolítica de los linfocitos infiltrantes de tumor y de sangre periférica. Un gran número de factores, entre los que se encuentran la edad avanzada y la caquexia, contribuyen al pobre funcionamiento del sistema inmune en estos pacientes (80). Adicionalmente, el papel de los tumores en la supresión del sistema inmune ha sido demostrado en ratones con fibrosarcoma (81). Después de la inoculación del tumor se observó una disminución en los niveles de las moléculas de señalización y en la reactividad de las células T. Este fenotipo es completamente revertido después de la cirugía del tumor, momento en el cual una población de células T es capaz de rechazar el reto tumoral. En otros estudios se ha demostrado que en ratones con el carcinoma mamario metastásico 4T1, existe una supresión de la respuesta específica por determinados antígenos, tanto humoral como celular, comparada con la respuesta inmune en animales libres de tumor. Esta supresión se revirtió cuando los ratones se operaron del tumor primario, incluso en presencia de metástasis (82).

Están descritos una serie de mecanismos que provocan que la inmunidad tumoral esté deprimida en pacientes que portan un tumor. Estos mecanismos incluyen: tolerancia del hospedero a los antígenos tumorales (83); cambios genéticos en el tumor que lo hacen escapar del ataque del sistema inmune (84); secreción de factores inhibidores y/o activación sistémica de células inmunosupresoras (85, 86). En el caso de los factores

inhibidores secretados por el tumor, la ausencia de respuesta del sistema inmune se ha atribuido a la secreción de citocinas inmunosupresoras entre las que se encuentran la IL-10 y el factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF  $\beta$ , del inglés " tumor growth factor  $\beta$ "). Ambas citocinas contribuyen a la actividad supresora de las células T reguladoras. Frecuentemente se detectan grandes cantidades de IL-10 en pacientes de cáncer (87). Esta citocina inhibe la respuesta Th1, así como la diferenciación, maduración y el estado funcional de las DCs (88), con la consiguiente interferencia en la respuesta antitumoral. Altas concentraciones de TGF- $\beta$  son encontradas a menudo en pacientes de cáncer, hallazgo que es asociado a la progresión tumoral y a la baja respuesta a la inmunoterapia (89).

### *2.1.3 Vacunas en enfermedad residual mínima*

Las vacunas antitumorales son efectivas en prevenir el crecimiento antitumoral en animales previamente inmunizados. En estos experimentos, se usan animales de laboratorio jóvenes con un sistema inmunológico competente en los cuales la inmunización contra un antígeno tumoral es seguida por la inoculación de dosis letales de un tumor trasplantable. Cada una de estas vacunas puede ser administrada sola o en combinación con citocinas y factores co-estimuladores. En algunos casos se ha usado, además de la vacunación, la eliminación de células T reguladoras (90, 91).

La diferencia esencial entre prevención y cura no ha sido tomada en cuenta en la transición de los modelos experimentales a la práctica clínica. Esto lo demuestra el hecho de que en pacientes, las vacunas de cáncer han sido usadas en la modalidad terapéutica más que en la preventiva. En el 2005 se ejecutaron más de 200 ensayos clínicos; sin embargo los resultados obtenidos no han sido satisfactorios (92). Sólo en un número reducido de pacientes se observó respuesta clínica parcial o completa y aumento en la supervivencia. Es probable que las vacunas contra el cáncer puedan ejercer su acción de manera eficiente en una etapa temprana de la progresión tumoral o después de terapias convencionales como cirugía, quimio o radioterapia (93, 94). Teóricamente, se espera que un sistema inmune competente pueda ser activado contra los antígenos tumorales y destruir los tumores antes de que estos sean detectables clínicamente, y se vuelvan heterogéneos y capaces de suprimir la respuesta inmune. En este sentido, la vacunación en enfermedad residual

mínima parece ser una terapia eficaz contra el cáncer. Existen algunas evidencias que sustentan este hecho. Vermorken y cols. publicaron que la combinación de cirugía y la administración de Oncovax, una vacuna compuesta por células tumorales autólogas y BCG, incrementó de manera significativa el tiempo sin recurrencia de la enfermedad en pacientes de cáncer de colon de estadio II (95). Estos hallazgos condujeron a la realización de un ensayo fase III randomizado en el cual se comparan los pacientes tratados con cirugía y vacunación con un grupo que sólo recibió cirugía (25). Los resultados exitosos de este ensayo clínico podrían conducir a la aprobación por la FDA de esta vacuna para enfermedad residual mínima. Por otra parte, en pacientes de linfoma, los cuales se vacunaron con la inmunoglobulina que contenía el idiotipo tumoral específico conjugada a la hemocianina de la linfa del cangrejo Bayoneta (KLH, del inglés "keyhole limpet hemocyanin") en combinación con GM-CSF, se encontró que ocho de 11 pacientes con remisión completa después de la quimioterapia estándar, pero con signos moleculares de la enfermedad residual, mostraron remisión molecular después de la vacunación (96). En leucemia, la inmunización de ratones con una vacuna basada en DCs cargadas con células leucémicas fue capaz de erradicar la enfermedad tumoral residual y prevenir la recurrencia del tumor (97). El diseño de protocolos de vacunación para tratar pacientes de leucemia mieloide aguda con enfermedad residual mínima están en fase de diseño (98).

Aunque sin resultados clínicos todavía, también se ha propuesto el uso de la inmunoterapia activa en enfermedad residual mínima para pacientes de cáncer de pulmón de células pequeñas. Estos pacientes tienen un riesgo alto de recurrencia y una corta sobrevida después de que las terapias convencionales eliminan la mayor parte del tumor, por lo que la vacunación pudiera favorecer la respuesta clínica una vez que la supresión inducida por la gran masa tumoral ha sido eliminada (99).

#### *2.1.4 Vacunas preventivas contra el cáncer*

El uso de vacunas para la prevención de los tumores en seres humanos está todavía en una fase temprana de su desarrollo. La observación de que agentes infecciosos eran la causa de ciertos tipos de cáncer impulsó el desarrollo de vacunas profilácticas cuyo blanco son los virus oncogénicos. En el año 2002, Merck & Company Inc. anunció los resultados de una vacuna profiláctica contra el HPV tipo 16. El estudio mostró, después de los dos primeros

años de haberse iniciado, que de 2393 mujeres sanas incluidas, el 3,6 % de las pertenecientes al grupo control se infectó anualmente con el virus, mientras que en el grupo vacunado no hubo incidencia de infección (27). En el caso de la vacunación contra el virus de la hepatitis B, los resultados mostraron una marcada disminución en la incidencia de cáncer hepático en los niños vacunados (28, 29). Debido a estos resultados, la vacuna contra el virus de la hepatitis B como profilaxis del hepatocarcinoma, y la vacuna contra el virus de papiloma humano contra el carcinoma cervical han sido aprobadas por la FDA para su uso en humanos (30). Se viene trabajando además en la idea del uso de las vacunas para la prevención de tumores que no son inducidos por virus, en pacientes con lesiones premalignas o en individuos sanos con alto riesgo de desarrollar la enfermedad. En este caso varios tumores pueden ser candidatos potenciales para el uso de vacunas profilácticas. Por ejemplo, muchas mujeres con alto riesgo de padecer cáncer de mama y ovario debido a mutaciones en los genes que codifican para BRCA 1 ó BRCA 2 (100) pueden ser tratadas con vacunación profiláctica. Otro ejemplo es el cáncer de colon debido al síndrome de poliposis familiar. Se conoce que las mucinas tipo 1 se expresan en las lesiones premalignas y en los adenocarcinomas y no en el tejido normal (101), por lo que una vacuna profiláctica que contenga esta glicoproteína pudiera prevenir la ocurrencia y recurrencia de los pólipos en estos pacientes y el desarrollo posterior del cáncer de colon (90). Por otra parte, Casarino y cols. publicaron recientemente el resultado de la inmunización con una vacuna peptídica en pacientes de melanoma estadio II y III, que estaban en remisión completa después de la cirugía. En el estudio de las biopsias de lesiones premalignas en estos pacientes se observó un aumento en la expresión de p53 y bcl-2, marcadores asociados con el arresto del ciclo celular y los procesos apoptóticos, respectivamente. Este hecho sugiere que la vacunación en este tipo de pacientes pudiera protegerlos de la recurrencia del melanoma (102).

### *2.1.5 Mecanismos de acción de las vacunas de cáncer.*

Basados en el descubrimiento e identificación de los antígenos tumorales es posible atacar los tumores de manera específica a través de los anticuerpos o células citotóxicas (103). La unión de los anticuerpos a los antígenos tumorales puede resultar en la activación de la cascada del complemento. Este fenómeno trae como consecuencia la inflamación (incluye

opsonización, activación de leucocitos y macrófagos y el incremento en la permeabilidad vascular) y la formación del complejo de ataque a la membrana que conduce a la CDC. Estos eventos pueden promover la eliminación de células tumorales circulantes y las micrometástasis. Los anticuerpos de isotipo IgM son los mayores activadores del complemento, lo cual puede deberse a su naturaleza pentamérica que aumenta los sitios de fijación de estas proteínas. En el caso de los anticuerpos de isotipo IgG, la propiedad de mediar CDC la tienen las IgG1 e IgG3 en humanos y las IgG2a e IgG3 en ratones. Los receptores Fc de estas subclases de IgG son además los blancos primarios para las células efectoras que median la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, del inglés "antibody-dependent cellular cytotoxicity"). Los receptores FC $\delta$ R1 (CD64), FC $\delta$ RII (CD32) y FC $\delta$ RIII (CD16), expresados en un amplio rango de células que incluyen células NK, células T y células del linaje mieloide, se unen a los anticuerpos que reconocen antígenos sobre la superficie del tumor, con la consiguiente activación del mecanismo citotóxico intrínseco de estas células efectoras (16).

Por otra parte, debido al gran potencial que tiene la respuesta celular para erradicar células tumorales, una gran cantidad de estudios clínicos y preclínicos están enfocados a la inducción de respuesta celular contra el tumor, que incluye la generación de NK y CTL altamente específicos.

La generación de CTL es un proceso complejo que requiere de al menos dos señales. La primera es el reconocimiento, mediado por la interacción del receptor de células T CD8<sup>+</sup> (TCR, del inglés "T cell receptor") y los péptidos presentados en el MHC I de las APC. La segunda señal es la coestimulación, mediada por determinadas moléculas en la célula presentadora y en las células T CD8<sup>+</sup> o por citocinas derivadas de células Th que se activan al reconocer péptidos presentados en el MHC II de las APC y moléculas coestimuladoras. En sujetos con tumor, los antígenos tumorales pueden ser presentados por el tumor. En la mayoría de los casos, la interacción del tumor con el sistema inmune produce tolerancia en lugar de activación debido a, entre otros factores, que las señales coestimuladoras requeridas para la activación de la células T no son las adecuadas (104).

El objetivo principal de las estrategias vacunales es convertir a la célula T anérgica en célula efectora contra el tumor. Aunque actualmente el principal objetivo de la



optimización de las vacunas de cáncer es lograr el cien por ciento de inducción de CTL específicos, en pocos estudios se ha correlacionado la inducción de estas células y la respuesta clínica. En este sentido, en un ensayo realizado con una vacuna peptídica en pacientes de melanoma se correlacionó el incremento de la respuesta CTL en sangre periférica contra los antígenos MAGE 1 y MAGE 3 con una respuesta clínica favorable en un paciente tratado (105). En otro estudio con vacunas de péptidos derivados de Melan A/MART-1, tirosinasa o gp100, se observó una asociación entre la respuesta clínica y la respuesta CTL específica (106). Algunos pacientes con respuesta clínica favorable mostraron además desarrollo de vitiligo. En otro trabajo publicado en pacientes de cáncer de colon con metástasis hepáticas, inmunizados con la vacuna Oncophage, se demostró la activación de células T CD8+ específicas por los antígenos tumorales. El incremento en la frecuencia de estas células después de la vacunación correlacionó con un aumento en la sobrevida de estos pacientes (107).

Se ha asociado el fenómeno de autoinmunidad provocado por las terapias con un aumento de la sobrevida de los pacientes. Este fenómeno se ha visto más frecuentemente en pacientes de melanoma, lo que sugiere que una respuesta inmune potente puede prolongar la sobrevida pero también producir autoinmunidad. En estudios recientes, el tratamiento del melanoma con un anticuerpo contra la molécula CTLA-4 provocó respuestas autoinmunes que se asociaron con la respuesta antitumoral (108, 109). Por otra parte, Kirkwood y cols. publicaron recientemente que la aparición de autoanticuerpos o manifestaciones clínicas de autoinmunidad durante el tratamiento con IFN $\alpha$ 2b están asociadas con un aumento en el intervalo libre de enfermedad y en la sobrevida de los pacientes de melanoma (110).

En estudios recientes en el campo de la vacunación contra tumores, se ha señalado que la diversificación del reconocimiento antigénico que ocurre con algunas estrategias vacunales puede ser beneficioso para la respuesta antitumoral. Este fenómeno muy bien descrito en los modelos de enfermedades autoinmunes, se inicia con la respuesta contra un simple epítipo antigénico. Este epítipo es presentado en el MHC II de las células presentadoras, lo cual activa células Th y células T efectoras que causan la inflamación crónica y la muerte de la célula blanco. El debris celular, que contiene otros antígenos, es capturado por las células presentadoras y presentado de forma cruzada por el MHC I, con la consiguiente

activación de nuevas células T CD8<sup>+</sup> específicas por otros epítomos en el mismo antígeno (diversificación intramolecular) o en otras moléculas (diversificación intermolecular). Existen algunos ejemplos que evidencian este fenómeno. El-Shami y cols. publicaron que ratones vacunados con el péptido de OVA<sub>257-264</sub> (ovoalbumina) y retados con EG7OVA (línea de timoma EL-4 transfectada con OVA) mostraron una respuesta CTL contra otros antígenos que fue protectora contra el reto con EL-4 que no expresa OVA (111). En el caso de estudios en humanos, se ha publicado que pacientes que sobreexpresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER-2/neu, del inglés "human epidermal growth factor receptor type 2") en tumores de mama y ovario y que se han vacunado con péptidos de esta molécula combinados con el GM-CSF, muestran respuesta inmune contra péptidos no incluidos en la vacuna. La presencia de este tipo de respuesta correlacionó con respuesta antitumoral en los pacientes (112).

Desafortunadamente, es frecuente encontrar en los trabajos publicados, la no asociación de la inducción de respuesta celular con una respuesta clínica favorable en los pacientes. Esto puede estar dado por la poca sensibilidad de las técnicas empleadas o por la incapacidad de medir la respuesta que tiene lugar en el sitio del tumor o de los órganos linfoides secundarios.

#### *2.1.6 Mecanismos de respuesta inmune en las vacunas preventivas de cáncer.*

Debido a que la carcinogénesis es un proceso lento, las vacunas preventivas deben inducir memoria inmunológica por un largo período de tiempo para poder proteger al individuo de la reaparición de células neoplásicas. Los resultados obtenidos por diferentes laboratorios con ratones transgénicos para el gen de rata Erbb2 y que, por tanto, tienen predisposición genética a desarrollar el cáncer de mama, muestran que las vacunas profilácticas deben proteger al animal durante casi toda su vida. En todos los casos la protección se logra con vacunaciones repetidas, por lo que la identificación de señales del sistema inmune que logren reducir el número de inmunizaciones es muy necesaria en el campo de la vacunación preventiva contra el cáncer.

Tanto en humanos como en los ratones, los antígenos tumorales son mayormente antígenos propios que son sobreexpresados por el tumor. Esto implica que las vacunas deben ser capaces de revertir la tolerancia (113, 114), e inducir mecanismos de respuesta inmune de

baja avidéz para escapar de la tolerancia central (115, 116). Los estudios en ratones BALB/c transgénicos para el gen de rata *ErbB2* demuestran que la protección depende de la activación de células T CD4<sup>+</sup> y de anticuerpos anti-ERBB2. Estos anticuerpos, y en especial las IgG2a, son necesarios y suficientes para proteger a estos animales del desarrollo de tumores (117-120). En los ratones protegidos, las células T infiltran las lesiones precancerosas, reclutan granulocitos e inhiben la angiogénesis (120, 121). Experimentos de transferencia adoptiva indican que las vacunas preventivas efectivas deben ser diseñadas para activar tanto a la inmunidad humoral como a la celular. La respuesta de anticuerpos en los ratones vacunados de manera preventiva predice la ausencia de tumores al año de edad (122). Estos parámetros pudieran ser usados para monitorear la eficacia de estas vacunas en los ratones y posiblemente en el escenario clínico, y para diseñar esquemas de vacunación óptimos.

Por otra parte, la modulación de células T reguladoras combinada con la administración de vacunas preventivas parece ser importante para aumentar la eficacia y persistencia de la respuesta antitumoral. Trabajos publicados recientemente por Ercolini y cols., muestran que la eliminación de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> durante la vacunación de ratones genéticamente modificados (GEM, del inglés "genetically engineered mouse") induce células T CD8<sup>+</sup> de alta avidéz (113). En este sentido, se han realizado experimentos recientes en ratones BALB-neu T GEM, transgénicos para el gen de rata *ErbB2* y que tienen predisposición genética a desarrollar cáncer de mama. Estos ensayos dieron como resultado que la eliminación de células T reguladoras en combinación con la vacunación con ADN activa células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> contra la proteína ERBB2, también conocida como HER2/neu, que está sobreexpresada en los tumores de mama. Esta protección dura toda la vida del ratón.

## ***2.2 El melanoma como problema de salud. Tratamiento actual***

El melanoma es un tumor que surge de la transformación maligna del melanocito, célula que proviene de la cresta neural, capaz de formar el pigmento melánico. Se desarrolla fundamentalmente en la piel, aunque puede aparecer en mucosas y en otros sitios en los que las células derivan de la cresta neural. El melanoma maligno es una neoplasia relativamente común, cuya incidencia en el mundo se ha incrementado más rápido que

cualquier otro tipo de cáncer, a un índice de aproximadamente cinco por ciento por año (1, 2).

La detección temprana y la eliminación de las lesiones pueden ser curativas, especialmente en los casos de melanoma *in situ* o superficialmente invasivos. Sin embargo, pacientes con melanoma avanzado tienen una supervivencia de cinco años en el 45 por ciento de los casos para el estadio III y de 10 por ciento para el estadio IV (123). La supervivencia para los pacientes con enfermedad metastásica varía de seis a nueve meses cuando se detecta en múltiples sitios; los pacientes con toma de piel o ganglios linfáticos distantes, tienen la mayor supervivencia, entre 12 y 15 meses; la metástasis pulmonar ocupa el segundo lugar con 11 meses de supervivencia; y por último están las lesiones metastásicas hepáticas, cerebrales u óseas, donde se informan de tres a cuatro meses de supervivencia (124, 125).

La terapia estándar, que incluye cirugía, quimioterapia y/o radiaciones, sólo produce efectos insignificantes en la sobrevida de los pacientes con enfermedad avanzada (126, 127). El melanoma es uno de los tumores mejor estudiados en el campo de la inmunología tumoral, y en el cual casi todas las estrategias de inmunoterapia han sido probadas con muy pocos efectos clínicos (128, 129). Entre las terapias inmunológicas que se han evaluado para prevenir y tratar la recurrencia del melanoma avanzado están: terapia con IFN $\alpha$ 2b, altas dosis de IL-2, terapia de genes, vacunas de péptidos de antígenos de diferenciación, terapia de células dendríticas e infusión selectiva de clones (91, 130, 131).

La administración de altas dosis de IL-2 es una de las inmunoterapias aprobada para el melanoma avanzado, pero la frecuencia de respondedores es baja y además, es significativamente tóxica, por lo que su uso es factible sólo en un limitado número de pacientes.

Las vacunas peptídicas son capaces de inducir tanto respuesta humoral como celular en los pacientes tratados. Se ha demostrado cierta efectividad, en algunos pacientes de melanoma, de la combinación de una vacuna peptídica con el anticuerpo monoclonal inmunomodulador MDX-010 que reconoce a la molécula CTLA-4 (109). Por otra parte, con la vacuna Oncophage también se han obtenido resultados alentadores en un ensayo fase II concluido en el 2002. En este ensayo se demostró la inducción de regresión tumoral completa en dos pacientes y enfermedad estable en tres de los 28 pacientes con lesiones

medibles (49). Un ensayo fase III con la vacuna Oncophage en melanoma está actualmente en curso.

La terapia con altas dosis de IFN $\alpha$ 2b fue aprobada por la FDA en 1995 como terapia adyuvante en pacientes de melanoma con alto riesgo de recurrencia. Debido a la toxicidad de esta citocina, han sido probados varios regímenes de administración (110). Por otra parte, la combinación de vacunas de lisado tumoral con IFN $\alpha$  han mostrado mejores resultados que las vacunas peptídicas. En este ensayo el 64 por ciento de los pacientes de melanoma avanzado mostraron estabilización de la enfermedad durante 16 meses (132).

Actualmente, la inmunoterapia que parece ser más efectiva es la transferencia adoptiva. Aunque pocos pacientes han sido tratados debido a su alto costo, Rosenberg y cols. publicaron que la transferencia de linfocitos T autólogos activados y expandidos *in vitro* junto con la administración de IL-2 a pacientes linfosuprimidos, produjo regresión objetiva en 18 de 35 pacientes (133).

## **2.3 Los gangliósidos.**

### *2.3.1 Características estructurales, localización y función*

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que se expresan en las membranas plasmáticas de las células de la mayoría de los vertebrados, incluyendo los mamíferos (5). Como otros lípidos formadores de membrana, los gangliósidos son moléculas de naturaleza anfipática constituidos por una porción hidrofóbica, dada por la ceramida *N*-acil esfingosina, y por una porción hidrofílica formada por un oligosacárido lineal de hasta cuatro residuos sacarídicos neutros, junto a uno o más residuos de ácido siálico que a pH 7 le confieren carga negativa a la molécula. Se ubican en las superficies celulares exponiendo hacia el exterior sus cadenas de azúcares sialiladas (134).

El sistema que más comúnmente se usa para nombrar a los gangliósidos es el sistema de Svennerholm (135). La letra G, designa que el compuesto es un gangliósido. La letra M, D ó T significan monosialo, disialo o trisialo respectivamente y se usa para especificar la cantidad de ácidos siálicos presentes en la estructura. El número 1, 2 ó 3 significa la cantidad de monosacáridos en la cadena oligosacáridica. En este caso el 1 significa que la cadena tiene 4 monosacáridos; el 2 que falta la galactosa; y el 3, que faltan la galactosa y

la N-acetilgalactosamina. En el Anexo 1 se representan ejemplos de la estructura de varios gangliósidos.

La biosíntesis de los gangliósidos tiene lugar en el retículo endoplasmático y en el complejo de Golgi. Es mediada por la acción de glicotransferasas y sialiltransferasas asociadas a membrana, que catalizan la transferencia de unidades de azúcar de nucleótidos a un aceptor de esfingosina (136, 137).

A los gangliósidos les han sido atribuidas múltiples funciones en los sistemas biológicos, tales como receptores de variadas toxinas bacterianas (138), virus (139), adhesión celular y modulación del crecimiento, así como transmisores de señales intracelulares (140, 141). Los gangliósidos desempeñan un papel fundamental en la formación de los cuerpos celulares neuronales (142) y la transmisión del impulso nervioso (143). Además, son muy importantes como moléculas señalizadoras, pues se ha constatado que la adición de gangliósidos como GM3 ó GM1 a células en crecimiento puede inhibir la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (144, 145).

Los gangliósidos son moléculas esenciales en el mantenimiento de la homeostasia de las funciones biológicas. Su estructura sufre diversas alteraciones durante el desarrollo celular, la diferenciación, la ontogenia, las transformaciones oncogénicas y el envejecimiento, lo cual evidencia una acción reguladora por parte de estas moléculas sobre las funciones asociadas al crecimiento celular (146, 147). En este sentido se ha observado que la adición de gangliósidos a cultivos de timocitos y de líneas celulares de fibroblastos estimula el crecimiento de estas células (148).

### *2.3.2 Los gangliósidos como antígenos tumor-asociados*

El análisis de la respuesta inducida en pacientes con melanoma maligno inmunizados con células tumorales o sus lisados, ricos en proteínas, glicoproteínas y gangliósidos, mostró que los únicos antígenos reconocidos por el suero de más de un paciente fueron el GM2 y el GD2 (149). Otros estudios desarrollados en sujetos sanos y pacientes con melanoma mostraron que los melanocitos normales y los melanomas en estadios tempranos contienen predominantemente GM3, mientras que la expresión de GD3 aumenta cuando el melanoma progresa hacia variantes altamente metastásicas (150).

Aunque la porción hidrofóbica de los gangliósidos es poco inmunogénica, cualquier cambio en la misma puede variar la orientación o el ángulo de la cadena sacarídica, exponiéndola para la neosíntesis o la degradación por las enzimas glicosiltransferasas y deglicosilantes, lo cual puede crear nuevos determinantes antigénicos en la superficie de las células tumorales (151). El GD3 presente en el melanoma posee un porción ceramida con un ácido graso de cadena larga y es más inmunogénico que el GD3 presente en tejidos normales, que tiene un ácido graso de cadena más corta (152).

Varios gangliósidos han sido descrito como antígenos de diferenciación expresados en la superficie celular de melanomas humanos y otros tipos de cáncer. Las primeras evidencias que asociaban a los gangliósidos con el cáncer emergieron al final de la década del 70. En el año 1979, se reportó la presencia del gangliósido GD3 en melanomas humanos (153). Con posterioridad, el GD3 se identificó como uno de los antígenos reconocidos por anticuerpos monoclonales (AcMs), generados en ratones inmunizados con células de melanoma maligno humano (154). Además de los melanomas, otros tumores provenientes de la diferenciación de tejidos de origen neuroectodérmico como los gliomas, los neuroblastomas y el carcinoma de pulmón de células pequeñas, han sido específicamente identificados por AcMs dirigidos contra este tipo de moléculas, particularmente contra el GM2, principal gangliósido expresado en la superficie celular del neuroblastoma humano, así como contra GD2, NGcGM2 (8) y GM3 (155).

La expresión de glicoconjugados, está directamente relacionada con una variación a veces sutil en la cooperación entre diferentes glicosiltransferasas involucradas en estas rutas biosintéticas. Debido a la especificidad poco restringida de estas enzimas, los motivos anómalos generados por la glicosilación aberrante son compartidos por glicoproteínas y glicoesfingolípidos. Los estudios de estos últimos constituyen una fuente asequible y representativa de los epítomos sacarídicos tumorales. Los gangliósidos están distribuidos ampliamente en tejidos normales, así como en gran cantidad de tumores de diferentes orígenes, pero su conformación y configuración cambian durante el proceso de malignización, por lo que pueden constituir blancos de los AcMs y se pueden emplear para la inmunoterapia activa contra el cáncer.

Durante la transformación neoplásica, se detectan alteraciones en la densidad y distribución de los gangliósidos en la superficie celular (156), lo que podría influir en su reconocimiento por los anticuerpos en tejidos normales y tumorales. Por ejemplo, el AcM M2590, capaz de reconocer el GM3 en melanomas humanos, de ratón y de hámster, es incapaz de reconocer el GM3 de tejidos normales (157). Igualmente, se ha descrito la expresión de moléculas de este tipo que normalmente no se encuentran o que están expresadas en pequeñas cantidades en las células progenitoras de las tumorales, y que pueden estar presentes en otros tejidos normales. En este caso, se ha hallado que el GD2 se expresa en melanoma, así como en células del cerebro y de la corteza espinal, pero no se detecta en los melanocitos normales (155).

Otro tipo de cambio que se ha detectado en los gangliósidos tumorales, es la presencia de residuos sacarídicos cuya presencia en las células normales no se ha demostrado bioquímicamente. Se ha visto la presencia de glicolípidos fucosilados y sus derivados sialilados en gran variedad de tumores humanos, particularmente los originados del tejido endodérmico, aunque en este caso también se pueden encontrar en los tejidos normales de forma críptica y no detectables inmunológicamente, así como en el tejido gastrointestinal, en pulmón y glándulas mamarias (158). En este sentido, se ha demostrado la expresión de fucosil GM1 en líneas de cáncer de pulmón de células pequeñas y en biopsias de pacientes con este tipo de tumor (159, 160).

Se han publicado varios trabajos sobre el papel de los gangliósidos en el crecimiento tumoral y el desarrollo de las metástasis. En este sentido, se ha visto que el GD3, comúnmente expresado en varios tumores, estimula el crecimiento de células de glioma humanos (161). Por otra parte, la inhibición de la expresión de este gangliósido en líneas tumorales reduce la capacidad angiogénica al afectarse la producción de factores implicados en la vascularización (162), así como la capacidad metastásica *in vivo* (163, 164).

### 2.3.3 Inmunosupresión inducida por los gangliósidos. El gangliósido GM3.

Existen evidencias que le confieren a los gangliósidos el carácter de molécula mediadora de la inmunosupresión. Se ha observado que estas moléculas tienen la capacidad de inhibir la respuesta proliferativa de los linfocitos humanos a mitógenos y antígenos (165), así



como la proliferación celular dependiente de IL-2 (166). Además, se ha encontrado que desempeñan un importante papel en la inhibición de funciones efectoras citotóxicas (167), y en la modulación de la expresión de la molécula CD4 en las células Th (168). Uno de los mecanismos mediante los cuales los tumores escapan de la vigilancia inmunológica es la liberación o “shedding” de los gangliósidos. Este fenómeno consiste en la secreción continuada de estas moléculas del tumor hacia el microambiente del mismo, y hacia la circulación sistémica, lugares donde pueden interactuar con las células del sistema inmune e inactivarlas. Un número de tumores, incluyendo el neuroblastoma, el melanoma, el retinoblastoma y el hepatoma, sobreexpresan y liberan gangliósidos a la circulación. En este sentido, se han detectado niveles aumentados de GD2 y GM3 en pacientes con retinoblastoma y hepatoma. Los gangliósidos GD3 y GM3 se han identificado en el suero de pacientes con melanoma maligno y carcinoma de cabeza y cuello, respectivamente.

La actividad inmunosupresora de los gangliósidos depende de su estructura molecular, tanto de las características de la porción ceramida como de la localización y número de las moléculas de ácido siálico. Por ejemplo, comparando una serie de gangliósidos purificados de cerebro humano normal, aquellos con un ácido siálico terminal enlazado a un oligosacárido compacto neutro poseen la mayor actividad inmunosupresora (169). Por otra parte, los gangliósidos con cadenas más cortas de ácido graso en la estructura de la ceramida son más potentes inhibiendo la proliferación *in vitro* de los linfocitos humanos en respuesta a un antígeno soluble, que aquellos con cadenas más largas. Precisamente las especies de gangliósidos que tienen cadenas cortas de ácido graso y por tanto mayores propiedades inmunosupresoras, son liberadas preferentemente por las células tumorales en su microambiente, lo cual contribuye a evadir su eliminación por el sistema inmune (170).

El GM3 es el gangliósido más abundante en las membranas plasmáticas de las células extraneurales. Además, junto con el gangliósido GD3, es el que más se expresa en las células tumorales cutáneas, incluyendo a los melanomas. Hay varias publicaciones en las cuales se demuestra el carácter inmunosupresor de esta molécula. Se ha publicado que este gangliósido afecta la capacidad del sistema inmune de rechazar trasplantes alogénicos de corazón (33) o pulmón (171). También se ha publicado que inhibe la proliferación de linfocitos humanos inducida por fitohemaglutinina e IL-2 (10). De igual forma, se ha observado que el GM3 inhibe significativamente la proliferación de linfocitos humanos de

sangre periférica inducida por concanavalina A (172). Por otra parte, el grupo de Prokazova ha demostrado el efecto inhibitorio dependiente de la dosis del GM3 sobre la citotoxicidad de las células NK (167).

En estudios realizados en líneas celulares de neuroblastoma, se observó que el GM3 procedente de estas células era capaz de inhibir la generación de DCs a partir de progenitores CD34<sup>+</sup> (11). Por otra parte, Portoukalian y cols., publicaron que el GM3 purificado de tumores de melanoma humanos inhibía la diferenciación fenotípica y funcional de monocitos a DCs, con la verificación de una disminución en la expresión de marcadores como CD1a, CD54, CD80 y CD40, así como en la capacidad de estas células de inducir la estimulación de células T alogénicas. Además, este gangliósido disminuyó el número de células viables e indujo apoptosis en las DCs (173). Aún más reciente, este mismo grupo publicó que el GM3 también inhibe la maduración y funciones de las células dendríticas de Langerhans de origen humano e induce procesos apoptóticos en las mismas (174).

Se ha demostrado que la adición del GM3 a linfocitos humanos induce la internalización de la molécula CD4. La inserción de esta molécula en la membrana plasmática de las células T CD4<sup>+</sup> permite la fosforilación y activación de la proteína cinasa ERK-2, la cual constituye un factor desencadenante de la cascada de cinasas citoplasmáticas reguladas por Ras. La proteína ERK-2 conduce a la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, la cual provoca la liberación de ácido araquidónico que actúa como segundo mensajero y activa una isoforma de la fosfocinasa C que es independiente de Ca<sup>2+</sup>. Una vez activada, se transloca del citosol hacia la membrana plasmática, donde fosforila residuos de serina de la cola citoplasmática de la molécula CD4, provocando su disociación de la proteína p56<sup>lck</sup> y consecuentemente su endocitosis (175-177).

Estos hallazgos indican que los gangliósidos, y específicamente el GM3, están dentro de las moléculas que los tumores secretan para escapar de la respuesta inmune. Estos mecanismos involucran la supresión de células claves que participan en la inmunidad contra los tumores.

### 2.3.4 *Inmunogenicidad de los gangliósidos*

Los cambios que ocurren en la expresión de los gangliósidos durante las transformaciones oncogénicas los convierten en candidatos atractivos para la inmunoterapia del cáncer. Sin embargo, la inmunización con antígenos sacarídicos genera una respuesta de anticuerpos de baja afinidad y de corta duración, en la que predomina el isotipo IgM a pesar de repetidas inmunizaciones, catalogándose esta respuesta como timo-independiente (178). Esta última definición se ha vuelto controversial en los últimos años, al demostrarse la presencia de células T específicas por los gangliósidos cuando son presentados en una familia de moléculas presentadoras no convencionales llamadas CD1 (179-181).

La poca inmunogenicidad de los gangliósidos está asociada en primer lugar a su naturaleza química oligosacarídica, carente de epítomos T para la cooperación T-B durante la respuesta inmune. Estas moléculas son generalmente antígenos propios debido a su presencia en tejidos normales, lo que determina que sean tolerados inmunológicamente en mayor o menor medida. Esta tolerancia se refuerza durante el crecimiento tumoral debido a que liberan cantidades cada vez mayores del antígeno hacia el microambiente del tumor y hacia la circulación sistémica. Los gangliósidos liberados pueden interactuar con las células del sistema inmunológico e inactivarlas. Además, la presencia en las células tumorales de otros autoantígenos rodeando a los gangliósidos contribuye a la poca inmunogenicidad de estos últimos (16).

La posibilidad de romper esta tolerancia en individuos normales y en pacientes con melanoma, ha sido demostrada por la presencia en el suero de anticuerpos naturales específicos contra estos antígenos propios y de las células B que los producen, lo que indica que los linfocitos B antigangliósidos no han sido eliminados por delección clonal y se encuentran funcionalmente silentes (182, 183). Los mecanismos que controlan la respuesta inmune contra los gangliósidos son aún desconocidos, pero podrían involucrar elementos regulatorios de la red inmune, como ha sido descrito en la respuesta contra otros antígenos sacarídicos (184).

El uso de diferentes adyuvantes y el acoplamiento covalente a proteínas transportadoras han sido algunos de los métodos más empleados para aumentar la inmunogenicidad de estas moléculas. En estudios preclínicos usando al GD3 como antígeno, se comparó la

inmunogenicidad de vacunas conjugadas a diferentes proteínas transportadoras, en presencia de diferentes adyuvantes. Estos estudios establecieron como combinación óptima en este sistema la conjugación a la proteína KLH junto al adyuvante QS-21 (fracción saponina purificada de la corteza del árbol *Quillaja saponaria*), con lo que se logró no sólo aumentar significativamente el título de anticuerpos contra los gangliósidos, sino también inducir altos títulos de inmunoglobulinas específicas de isotipo IgG (185, 186).

Otra aproximación para potenciar la inmunogenicidad de los gangliósidos consiste en el uso de los liposomas. Estas estructuras biodegradables, no tóxicas e inmunológicamente inertes, pueden mejorar la presentación de los antígenos tumorales incorporados en ellos a las células del sistema inmune. Se han obtenido altos títulos de anticuerpos contra los gangliósidos GM1a y GD1b incluidos en bicapas lipídicas con albúmina de suero bovino (BSA, del inglés "bovine serum albumin") metilada (187). Por otra parte, se utilizaron los gangliósidos GM1 y GM2 incorporados en liposomas para inmunizar ratones BALB/c previamente tratados con bajas dosis de ciclofosfamida, lo que les permitió obtener una respuesta de anticuerpos de elevada especificidad contra estos antígenos (188).

Dumontet y cols. demostraron que la incorporación de gangliósidos a lipoproteínas del suero de muy baja densidad (VLDL, del inglés "very low density lipoprotein") aumenta la inmunogenicidad de los gangliósidos y favorece la inducción de una respuesta de isotipo IgG. La inmunización de ratones BALB/c con los gangliósidos 9-*O*-acetil GD3 y NGcGM3 adsorbidos en las VLDL, ha permitido la obtención de respuestas de anticuerpos tanto IgM como IgG contra estas moléculas (189, 190).

También han sido utilizados como adyuvantes los proteoliposomas, los cuales consisten en una preparación de proteínas altamente hidrofóbicas de membrana externa de bacterias, tales como la *Neisseria meningitidis* y que forman espontáneamente vesículas similares a las obtenidas en los liposomas. Estas estructuras tienen la capacidad de incorporar antígenos que poseen dominios hidrofóbicos tales como los gangliósidos. Estos proteoliposomas son considerados potentes adyuvantes, debido a que estas proteínas de membrana constituyen antígenos T dependientes y mitógenos de células B (191). Estas estructuras han sido utilizadas tanto en ratones como en ensayos clínicos en los cuales, se

ha demostrado que incrementan la inmunogenicidad de una gran variedad de antígenos, incluyendo a los gangliósidos (31, 192, 193)

### 2.3.5 *Vacunas de cáncer basadas en gangliósidos*

La inmunización de ratones con vacunas elaboradas con gangliósidos purificados ha resultado exitosa en la obtención de respuesta de anticuerpos contra estas moléculas (194). La utilización del BCG como adyuvante en la inmunización con el gangliósido GM2 purificado en pacientes con melanoma metastásico, fue efectiva en la inducción de respuestas de anticuerpos en la mayoría de los pacientes tratados (195). El uso de vacunas compuestas por GM2 acoplado a KLH y el adyuvante QS-21 en pacientes de melanoma, indujo un incremento significativo de los títulos de anticuerpos contra el gangliósido (196).

Un ensayo clínico aleatorizado que comenzó al final de la década de los 80 en el Centro de Cáncer Memorial Sloan-Kettering de Estados Unidos, usando GM2 y BCG después de ciclofosfamida a bajas dosis, demostró la inducción de IgM anti-GM2 en el 80 por ciento de los pacientes. Al comparar la evolución clínica de los respondedores contra los no respondedores, los autores concluyeron que la presencia de anticuerpos anti-GM2 representaba un factor de pronóstico favorable al curso de la enfermedad. A pesar de que la mayoría de los pacientes mostraron títulos específicos de IgM asociados con una prolongación del intervalo libre de enfermedad y de la sobrevida, en comparación con el control de BCG solo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Posteriormente, se diseñó una nueva formulación en la que se conjugó el GM2 con KLH y se usó el adyuvante QS-21. Esta formulación, llamada GMK, fue administrada a pacientes de melanoma en un ensayo clínico fase I, donde se obtuvieron anticuerpos IgG contra GM2 (197). Con dicha vacuna se llevó a cabo un ensayo clínico fase III en pacientes de alto riesgo de recurrencia del melanoma. En este ensayo se comparó el tratamiento de la vacuna GMK con la terapia de altas dosis de IFN $\alpha$ 2b, lo que dio como resultado una sobrevida mayor en el grupo que recibió este último. Estos resultados han limitado el valor del concepto terapéutico de las vacunas basadas en gangliósidos (19). Otra vacuna de gangliósidos que está en ensayos clínicos consistente en una mezcla de GM2/Hemocianina/ QS-21 con el GD2/Hemocianina/QS-21, concluyó recientemente la

búsqueda de la dosis óptima (198, 199). Ambas vacunas indujeron respuesta de anticuerpos en la mayoría de los pacientes de melanoma tratados.

Otro gangliósido que ha sido usado como blanco en la inmunoterapia del cáncer es el fucosil GM1. En un estudio clínico, 13 pacientes de cáncer de pulmón de células pequeñas se inmunizaron con este gangliósido derivado de la glándula tiroide bovina, conjugado a KLH y administrado con QS-21. En los diez pacientes que recibieron cinco vacunaciones, se generaron anticuerpos contra fucosil GM1 tanto de isotipo IgG como IgM. La formulación vacunal no produjo efectos adversos de consideración, y tres pacientes con enfermedad limitada se mantuvieron libres de recurrencia del tumor durante 18, 24 y 30 meses, respectivamente (200). Recientemente, se publicaron los resultados de un ensayo de escalado de dosis, en el cual se inmunizaron 16 pacientes con la versión sintética del fucosil GM1 en la misma formulación vacunal. Este estudio demostró respuesta de anticuerpos específica por el gangliósido, principalmente de isotipo IgM (201).

En el caso del GD3, el uso del BCG como vehiculizador no indujo respuesta humoral específica contra este gangliósido. Sin embargo, cuando la GD3-lactona se asoció con KLH, la presencia de anticuerpos contra GD3 del tipo IgM se observó en todos los pacientes, y en algunos de ellos se indujeron además anticuerpos IgG específicos. Estos anticuerpos que reconocen el GD3 por reacción cruzada, también interactúan con líneas tumorales que expresan GD3 y son capaces de inducir CDC en la mayoría de las líneas de melanoma usadas (202).

Un ensayo clínico con siete pacientes de glioma maligno progresivo se realizó con la vacuna GD2-KLH que contenía monofosforil lípido A como adyuvante. En este ensayo no se obtuvo respuesta de anticuerpos contra el gangliósido ni respuesta clínica contra el tumor (203). Con el objetivo de aumentar la inmunogenicidad del GD2, se inmunizaron 18 pacientes de melanoma con la lactona del GD2 conjugada a KLH y administrada con QS-21. En este caso la vacuna fue inmunogénica en la mayoría de los pacientes, los cuales desarrollaron anticuerpos IgM e IgG específicos por el GD2, capaces de lisar mediante CDC células tumorales que expresan el antígeno (204).

Una vacuna con el gangliósido NGcGM3 insertado en los VSSP y Montanide ISA 51, se evaluó en pacientes de cáncer de mama avanzado (205). De los 21 pacientes incluidos en

este ensayo clínico fase I, se evaluó la respuesta de anticuerpos de 15 pacientes. Todos los pacientes que completaron la fase de inducción desarrollaron respuesta de anticuerpos IgG e IgM contra el NGcGM3, aunque los títulos de anticuerpos fueron mayores en los pacientes de estadio III. Los eventos adversos producidos por la vacunación se clasificaron como leves (205). Estos resultados condujeron a la realización de un ensayo fase II en cáncer de mama avanzado, en el cual 80 pacientes se inmunizaron con la vacuna VSSP/NGcGM3 + Montanide ISA 51. Los resultados de este ensayo, recientemente concluido, demostraron que la vacuna fue inmunogénica en más del 90 por ciento de los pacientes, en los cuales se indujo respuesta de anticuerpos de isotipo IgM y/o IgG contra el gangliósido (manuscrito en preparación).

#### 2.3.5.1 Vacunas de cáncer que contienen el gangliósido GM3

La efectividad de vacunas que contienen el GM3 en su composición ha sido estudiada en modelos preclínicos. Particularmente se ha usado el modelo del melanoma murino B16 puesto que el gangliósido mayoritario es el GM3 (32). Debido a su abundancia en los tejidos normales, este gangliósido es muy poco inmunogénico. Los esfuerzos para aumentar la inmunogenicidad de esta molécula no han sido del todo exitosos. Los resultados obtenidos por Livingston y cols., demostraron que la inmunización de ratones con GM3 unido a un mutante de *Salmonella minnesota* no indujo respuesta de anticuerpos contra el gangliósido (194). Por otra parte, en trabajos publicados por Ravindranath y cols., se inmunizaron ratones con vacunas celulares de melanoma B16 que contenían MPLA. Este preparado indujo respuesta de anticuerpos solo de isotipo IgM contra el gangliósido en todos los ratones inmunizados y rechazo del tumor en menos del 40 por ciento de ellos (12).

En estudios clínicos, una vacuna llamada Canvaxin compuesta por tres líneas alogénicas de melanoma humano adyuvada con BCG, se administró a pacientes de melanoma avanzado. Los resultados del ensayo en un pequeño número de pacientes demostraron una mayor sobrevida en aquellos sujetos con altos títulos de anticuerpos contra GM3 (206). Sin embargo, estos hallazgos no se corroboraron en un ensayo clínico fase III, el cual no mostró ningún beneficio clínico para los pacientes vacunados respecto a los pacientes que recibieron placebo (20). Por otra parte, un ensayo clínico fase I en pacientes de melanoma

avanzado se ejecutó con la vacuna VSSP/GM3 emulsionada en Montanide ISA 51. En este ensayo, se incluyeron 26 pacientes divididos en tres grupos a los cuales se les administró diferentes dosis de la vacuna. El efecto adverso más frecuente fue fiebre leve. El inmunógeno indujo altos títulos de anticuerpos de isotipo IgM en el 44 por ciento de los pacientes, sin evidencias de respuesta celular contra el gangliósido. Desde el punto de vista clínico en un paciente se indujo primero estabilización de la enfermedad y luego una reducción del tumor en lesiones de tejido blando acompañada por aparición de vitiligo (21).

En resumen, la inmunoterapia activa cuyo blanco ha sido el GM3 no ha tenido el éxito esperado. Tanto la poca inmunogenicidad de las preparaciones como la selección de pacientes en estado avanzado de la enfermedad han contribuido al limitado éxito de esta terapia.

#### *2.3.5.2 Mecanismos de acción de las vacunas de cáncer basadas en gangliósidos*

El papel de los anticuerpos en el efecto antitumoral inducido por las vacunas basadas en gangliósidos ha sido considerado predominante en este tipo de terapia (207). Evidencias procedentes de los modelos animales y los estudios clínicos han mostrado que la frecuencia de inducción de anticuerpos antigangliósidos correlaciona con la sobrevida (14, 15). Se ha mostrado un mejor pronóstico en pacientes de melanoma, que desarrollaron anticuerpos contra NGcGM3, cuando se vacunaron con un lisado de células de este tumor (208). En otro trabajo se describió que los niveles de anticuerpos IgM específicos por GD2, GM2, GD3 y GM3 correlacionaba con la sobrevida de pacientes de melanoma en los cuales se habían eliminado las metástasis locales y se habían tratado con una vacuna de células completas (14). Por otra parte, los trabajos de Livingston y cols., han mostrado que pacientes de melanoma estadio III que desarrollaban anticuerpos naturales o inducidos por vacunación contra GM2 tenían un incremento en el intervalo libre de enfermedad y en la sobrevida (209). Los anticuerpos específicos por los gangliósidos son capaces de mediar la CDC de células positivas a la expresión del antígeno. En este sentido, Hsueh y cols. han descrito una correlación significativa entre el intervalo libre de enfermedad y la propiedad del suero de lisar células tumorales mediante CDC, en pacientes de melanoma estadio III vacunados con Canvaxin como terapia adyuvante (210). Recientemente, se ha visto que la



administración de un anticuerpo IgM humano contra GM3 a pacientes de melanoma induce respuestas clínicas completas sin toxicidad significativa (211).

En modelos preclínicos, Ravindranath y cols. han publicado el aumento de la respuesta de anticuerpos contra GM3 después de la inmunización de ratones C57BL/6 con una vacuna celular de melanoma. Se encontró que esta respuesta de anticuerpos correlacionaba con un retardo en el crecimiento del tumor. En este caso, la respuesta humoral protectora se caracterizó por la baja proporción IgG/IgM de los anticuerpos contra GM3 (13). En estos artículos se ha sugerido que los anticuerpos IgM contra GM3 ejercen su acción antitumoral a través de la inhibición directa del crecimiento tumoral y la neutralización del gangliósido GM3 el cual presenta marcadas propiedades inmunosupresoras. En otro estudio sobre el papel de los anticuerpos antigangliósidos de isotipo IgM, Kawashima y cols. demostraron que en ratones transgénicos para anticuerpos IgM contra el gangliósido GD2 se inhibía el crecimiento de la línea de linfoma T EL-4, la cual expresa este gangliósido. Además, en el bazo de estos ratones se encontró un incremento del número de células NK comparado con animales no transgénicos. La eliminación de esta población redujo o eliminó el efecto antitumoral, lo que sugiere que las células NK desempeñan un importante papel en la erradicación del tumor en este tipo de ratones (212).

Se ha publicado la detección de células T específicas por los gangliósidos presentados en moléculas de presentación no clásica como el CD1. Estas células se han encontrado en donantes sanos y pacientes de esclerosis múltiple (17). Recientemente, Chapman y cols. demostraron que ratones inmunizados con células de melanoma humano que expresaban GD3 desarrollaron una respuesta de células NKT restringidas a CD1d y específicas por este gangliósido. En estos estudios se demostró además que el GD3 era presentado de forma cruzada por las APC murinas (18). Los resultados obtenidos en los modelos preclínicos sugieren que aunque no se ha demostrado la inducción de células T ni NKT específicas por los gangliósidos con la inmunización con vacunas compuestas por este tipo de moléculas, no se puede descartar la posibilidad de que la rama celular de la respuesta inmune esté involucrada en los mecanismos antitumorales inducidos por estas terapias.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Reactivos, líneas celulares y animales de experimentación**

##### *3.1.1 Ratones*

Los ratones de las cepas singénicas C57BL/6 y BALB/c utilizados en la experimentación se obtuvieron del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba). Durante la experimentación se mantuvieron en el bioterio del CIM. Los ratones tenían entre ocho y 14 semanas de edad al inicio de los experimentos y un peso entre 20-25 g. Todas las manipulaciones y experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices establecidas por el CIM para el manejo de los animales de laboratorio.

##### *3.1.2 Medios de cultivo*

Para todas las líneas celulares se utilizó el medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Reino Unido) suplementado con 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 50 µM de 2-mercaptoetanol. Las células se mantuvieron a 37 °C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se suplementó con suero fetal de ternera (SFT, HyClone, EUA), al 1 ó al 10%, según se especifique en cada ensayo.

##### *3.1.3 Líneas celulares*

La línea de melanoma murino B16, subtipos F0 (baja capacidad metastásica) y F10 (alta capacidad metastásica) (213), y los hibridomas productores de inmunoglobulinas de rata específicos por las moléculas murinas CD4 (YTS191), NK 1.1 (PK136), y CD8 (YTS169) se obtuvieron de la Colección Americana de Tipos Celulares (ATCC, del inglés “American Type Culture Collection”). La línea celular de carcinoma mamario F3II fue donada por el Dr. Alonso de la Universidad de Quilmes (Argentina) (214). Se utilizó además, el clon metastático 3LL-D122 (215) proveniente de la línea de carcinoma de pulmón de Lewis.

##### *3.1.4 Extracto de células*

El lisado de las células de B16F10 se obtuvo después de seis ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 37 °C. Posteriormente, la muestra se centrifugó a

210 x g, a temperatura ambiente (TA), y el sobrenadante se esterilizó por filtración a través de una membrana de acetato de celulosa (0.2 µm) (Sartorius, Alemania). El extracto tumoral se distribuyó en alícuotas y se mantuvo a -20 °C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (216).

### *3.1.5 Preparación de los VSSP*

Los VSSP se produjeron en el CIM (31). Para ello se partió de las VME de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, cepa 385, purificadas en el Instituto Finlay (Cuba) (217). Para la obtención de los VSSP, las VME se disolvieron a una concentración final de 1 mg/mL en la solución tampón Tris-Cl 0.01 M, pH 8.5, con desoxicolato de sodio 12 mM y dodecil sulfato de sodio (SDS- del inglés “sodium dodecylsulfate”) 1 mM. A esta suspensión se le añadió igual masa de GM3 ó NGcGM3 extraídos de eritrocitos de perro y caballo, respectivamente mediante el método de Folch modificado (218). La mezcla se mantuvo en agitación a 4 °C durante 18 h y posteriormente se sometió a un proceso de diálisis por 14 días a 4 °C, en la solución tampón Tris-Cl 0.01 M pH 8.5, utilizando una membrana Spectra/Por de límite de poro de 3.5 KDa (Spectrum Medical Industries, EUA). La preparación dialisada resultante se centrifugó a  $10^5$  x g durante 1 h, el precipitado se descartó y al sobrenadante se le determinaron las concentraciones de proteínas y gangliósidos por los métodos de Lowry y de resorcinol (219), respectivamente. Finalmente la solución obtenida conteniendo los VSSP se esterilizó por filtración a través de una membrana de acetato de celulosa (0.2 µm) (Sartorius, Alemania) y se almacenó a 4 °C hasta su uso. La proporción proteína: gangliósido fue de una molécula de proteína por 37 moléculas de gangliósido. Esta relación se calculó en base al peso molecular del gangliósido (220) y al promedio del peso molecular de las cinco proteínas principales de la membrana externa de la *Neisseria meningitidis* (221).

### *3.1.6 Preparación de la vacuna emulsionada*

La vacuna VSSP/GM3 ó VSSP/NGcGM3 se emulsionó en el adyuvante oleoso Montanide ISA 51 (Seppic, Francia) usando iguales volúmenes de vacuna y adyuvante. Para lograr la emulsión se agitó la mezcla en un vortex (Hettich, Alemania) durante 5 min. Los ratones se inyectaron en la región dorsolateral con un volumen de 0.1 ml por vía

intramuscular de 120 µg de VSSP/GM3. Esta masa se refiere a la cantidad de gangliósido administrada.

### *3.1.7 Anticuerpos monoclonales*

La determinación de moléculas en la superficie celular se realizó a través de ensayos de citometría de flujo. Para la detección de las moléculas CD3, CD4, CD8 y NK 1.1 en los linfocitos murinos, se emplearon los siguientes AcMs conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC, del inglés "fluorescein iso-thiocyanate") o Ficoeritrina (PE, del inglés "phycoerythrin"):

AcMs de rata específicos por las moléculas murinas CD3 (145-2C11) conjugado a FITC; CD4 (RM4-5) conjugado a FITC; CD8 (53-6.7) conjugado a PE; y NK 1.1 (PK136) conjugado a PE (BD PharMingen, EUA).

Para la determinación de moléculas de superficie en las DCs se utilizaron los siguientes AcMs generados en rata:

AcMs adquiridos de la firma Pharmingen (BD PharMingen, EUA) específicos por las moléculas murinas CD11c (HL3) conjugado a PE; CD40 (3/23) conjugado a FITC; CD80 (16-10A1) conjugado a FITC; CD86 (GL1) conjugado a FITC; I-A/I-E (M5/114.15.2) conjugado a PE.

Para la determinación de la expresión de la molécula de MHC I en las líneas tumorales murinas se usó un AcM específico por H-2K<sup>b</sup> (AF6-88.5) conjugado a FITC (BD PharMingen, EUA).

Para la detección del GM3 en la membrana plasmática de las células tumorales, las células se marcaron con el AcM GMR6 (Seikagaru Corporation, Japón), específico por esta molécula. En el revelado de este anticuerpo se empleó un suero de chivo anti-IgG, IgA e IgM de ratón (STAR87F) conjugado a FITC (Serotec, EUA)

Como anticuerpo control en los distintos ensayos de citometría de flujo, se empleó el AcM irrelevante G155-178, conjugado a FITC o a PE, según correspondiera. Todos los anticuerpos conjugados se emplearon a una dilución final de 1:200 en solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés "phosphate buffered solution") con SFT al 1%.

También se utilizaron los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas productores de AcMs YTS191, PK136 y YTS169 (ATCC, EUA). Estos hibridomas producen AcMs específicos por las moléculas CD4, NK1.1 y CD8 respectivamente, que eliminan dichas poblaciones mediante CDC.

### **3.2 Experimentos antitumorales**

#### **3.2.1 Inoculación del tumor**

Después de tratar las células de melanoma B16 con tripsina, se lavaron con PBS, se resuspendieron en medio libre de suero y se evaluó su viabilidad con el uso del tripán azul, reactivo que penetra en las células muertas y permite contarlas en el microscopio óptico. La viabilidad de las células estuvo entre 95 y 98%. Las células viables se inyectaron en un volumen de 0.2 ml, por vía subcutánea, en el flanco derecho del lomo de los animales de la cepa C57BL/6, los cuales habían sido seleccionados para cada grupo de manera aleatoria. Las cantidades de células empleadas variaron en dependencia del experimento y estuvieron entre  $2,5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^4$  células. El momento de aparición de los tumores se monitoreó por palpación y se confirmó la presencia del mismo por histopatología. La sobrevivencia de los animales se siguió de 90 a 150 días después de la inoculación del tumor. De manera general, los animales tanto vacunados como controles que desarrollaron el melanoma no sobrevivieron más de 60 días después de la inoculación del tumor. El número de animales sin tumor que se informa en cada experimento es igual al número de animales vivos. El tamaño de los tumores se midió periódicamente mediante un pie de rey y el volumen de los tumores se calculó usando la fórmula  $(\pi/6) \times A^2$  (ancho)  $\times$  L (longitud). Por razones éticas, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical cuando los tumores excedían los 15,000 mm<sup>3</sup> o cuando las condiciones generales de salud estaban afectadas. Con el objetivo de investigar la presencia de metástasis espontáneas en los ratones que portaban la variante F10, se fijaron los pulmones en solución de Bouin y se determinó la presencia de nódulos metastásicos en el microscopio de disección.

#### **3.2.2 Escenario de enfermedad residual mínima**

Grupos de ratones C57BL/6 se inocularon con  $5 \times 10^4$  células de B16F10 por vía subcutánea. Los tumores se eliminaron por cirugía, empleando como mezcla anestésica,

ketamina (100 mg)/xilazina (10 mg) por kg de peso. Antes de llevar a cabo estos experimentos se examinó el momento más efectivo para la cirugía en el modelo del B16F10. Este estudio dio como resultado que el momento más propicio para operar los ratones era cuando los tumores tenían un volumen aproximado de 250 mm<sup>3</sup> (de 25 a 31 días después de la inoculación del tumor). La eliminación de tumores de más de 1000 mm<sup>3</sup> no fue efectiva y la enfermedad progresó rápidamente después de la cirugía.

El experimento se realizó con cuatro grupos, que incluyeron entre cuatro y diez ratones. A un grupo se les inoculó el melanoma B16F10 (n = 4), otro grupo (n = 10) se sometió a cirugía de 25 a 31 días después de trasplantar el tumor. Un tercer grupo se inmunizó con cuatro dosis semanales de 120 µg de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51, por vía intramuscular, comenzando el día de la cirugía (n = 10). El último grupo (n = 5) se vacunó con cuatro dosis de 120 µg de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51, por vía intramuscular, cada 14 días comenzando cuando los tumores eran palpables (10-16 días) y 15 días antes de la cirugía. En ambos protocolos la tercera dosis de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 se administró a los 15 días de la cirugía del tumor (ver Anexo 2A). En todos los grupos se estudió la incidencia local del tumor por palpación y la presencia de metástasis en los pulmones en la necropsia de los ratones.

### 3.2.3 Escenario preventivo-terapéutico

Grupos de 20 ratones C57BL/6 por grupo se inmunizaron con cuatro dosis de 120 µg de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51, por vía intramuscular, cada 14 días. Como control se usó PBS emulsionado en Montanide ISA 51. A los 21 días de la primera inmunización se inocularon con 10<sup>3</sup> células de melanoma B16F10 (ver Anexo 2B).

### 3.2.4 Escenario profiláctico

Grupos de diez ratones C57BL/6 por grupo se inmunizaron con cuatro dosis de 120 µg de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51, y como control se usó PBS. Los inmunógenos se administraron cada 14 días, por vía intramuscular. El melanoma B16F10 (5x10<sup>3</sup> células) se inoculó 21 días después de la última inmunización. Para estudiar la importancia del gangliósido en la preparación, un grupo de diez ratones se vacunaron con la variante N-glicolilada del GM3 (NGcGM3) insertado en los VSSP + Montanide ISA 51 usando el

mismo esquema anterior. A los 21 días de la última inmunización se inocularon  $5 \times 10^3$  células de B16F10 (ver Anexo 3A)

#### *3.2.4.1 Frecuencia y número de inmunizaciones*

Para estudiar el efecto de la frecuencia de administración de la vacuna, grupos de nueve ratones cada uno recibieron cuatro dosis de VSSP/GM3 (120  $\mu$ g cada una) + Montanide ISA 51 cada siete días. A los 21 días de la última inmunización se les inocularon con  $5 \times 10^3$  células de B16F10 (ver Anexo 3B). Para estudiar el número de dosis necesarias para una respuesta antitumoral efectiva grupos de ocho ratones C57BL/6 se inmunizaron con una ó dos dosis, y grupos de siete ratones se inmunizaron con tres ó cuatro dosis del inmunógeno ó del PBS, cada 14 días. A los 21 días de la última vacunación se inocularon  $5 \times 10^3$  células de B16F10 (ver Anexo 3C).

#### *3.2.4.2 Duración de la respuesta antitumoral*

Para examinar la duración de la protección antitumoral, los ratones se inmunizaron con cuatro dosis de VSSP/GM3 (120  $\mu$ g cada una) + Montanide ISA 51, por vía intramuscular y se inocularon con  $2,5 \times 10^3$  células de B16F0 a los 21 ( $n = 6$ ), 35 ( $n = 7$ ) ó 49 ( $n = 8$ ) días después de la última vacunación. El grupo control recibió PBS ( $n = 5$ ) en lugar de vacuna y se inoculó con la misma carga de células a los 21 días de la última administración. Los animales vacunados de cada grupo que no desarrollaron tumor palpable se reinocularon con la misma cantidad de células, 70 días después del primer reto y en el flanco contrario a la primera inoculación (ver Anexo 4).

#### *3.2.4.3 Experimentos de eliminación de poblaciones celulares ( $CD4^+$ , $CD8^+$ y $NK1.1^+$ )*

Para evaluar la relevancia de las poblaciones celulares en diferentes fases de la respuesta inmune, grupos de ratones C57BL/6 se vacunaron con cuatro dosis de 120  $\mu$ g de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 ó recibieron PBS (grupos control) cada 14 días, por vía intramuscular. Otros grupos de ratones vacunados y controles se inyectaron por vía intraperitoneal con 1 mg de proteínas totales de diferentes sobrenadantes de cultivo, parcialmente purificadas mediante precipitación con  $NH_4SO_4$ , que contenían AcMs de rata específicos por las moléculas CD4, CD8 ó NK1.1. Estos sobrenadantes provenían de

los hibridomas YTS191, YTS169 y PK136, respectivamente. El experimento de eliminación de las células CD4<sup>+</sup> consistió en cuatro grupos de ratones, dos vacunados y dos controles. Uno de los grupos que recibió el candidato vacunal y un grupo control se trataron con 1 mg de proteínas totales que contenía un AcM específico por CD4 (0.2 ml) durante la fase de inducción de la respuesta, tres días antes de la primera inmunización y manteniendo la administración del anticuerpo cada tres días hasta la cuarta vacunación (ver Anexo 5A). A los 21 días de la última vacunación se inocularon 10<sup>4</sup> células de melanoma B16F10 por vía subcutánea. La cantidad de animales por grupo fue de diez, excepto el grupo vacunado sin tratar con el sobrenadante que tuvo ocho animales. La eliminación de las poblaciones T CD8<sup>+</sup> y NK1.1<sup>+</sup> se realizó durante la fase efectora de la respuesta inmune a grupos de ratones C57BL/6 vacunados y controles que fueron inoculados con 10<sup>4</sup> células de melanoma B16F10 por vía subcutánea, a los 21 días de la última inmunización. Se administró, por vía intraperitoneal, 1 mg de proteínas totales del sobrenadante con los AcMs específicos a CD8 ó NK1.1 (0.2 ml) el día antes de la inoculación del tumor y los días siete y 14 después del reto (ver Anexo 5B). Los grupos consistieron en diez ratones cada uno y tanto, en la eliminación de las poblaciones CD8<sup>+</sup> como NK1.1, se incluyeron grupos de ratones vacunados y controles sin tratar con los sobrenadantes. Las condiciones óptimas de eliminación de las poblaciones se determinaron en un experimento de citometría de flujo que se describe en el epígrafe "3.3.1.5 Determinación de la expresión de moléculas de superficie por citometría de flujo", en el cual se analizaron las poblaciones celulares de bazo, sangre y ganglios linfáticos de los ratones tres y seis días después de la administración de 1 ó 2 mg de proteínas totales de los sobrenadantes específicos. Con 1 mg de proteínas totales se obtuvo que más del 93% de la población NK1.1<sup>+</sup> y más del 95% de las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se eliminaron a los tres días de la administración de los sobrenadantes (ver Anexo 6)



### **3.3 Ensayos**

#### *3.3.1 Ensayos serológicos*

##### *3.3.1.1 Colección del suero*

Para medir la respuesta de anticuerpos inducida por la vacunación, a los ratones BALB/c y C57BL/6 se les extrajo sangre por el plexo retroorbital antes del tratamiento (día 0) y 14 días después de la última inmunización (día 56). En los experimentos de correlación de la respuesta de anticuerpos con la actividad antitumoral del candidato vacunal, se hicieron extracciones en los ratones C57BL/6 los días 0, 56, una semana (día 70) y un mes (día 93) después de la inoculación del tumor. Para retraer el coágulo, la sangre se mantuvo a 37 °C durante 2 h, seguido de 30 min a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 11000 x g y se extrajo el suero, el cual se guardó en alícuotas a -20 °C hasta el momento de su uso.

##### *3.3.1.2 Determinación de anticuerpos séricos.*

Los anticuerpos séricos contra GM3 fueron determinados mediante un ensayo inmunoenzimático colorimétrico (ELISA, del inglés "enzyme-linked immunosorbent assay") indirecto que se realizó según el método de Karlsson y cols. (222) con algunas modificaciones. Una parte de la placa de ELISA Polysorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) se recubrió con el gangliósido (200 ng/ml) disuelto en 50 µl de metanol por pozo, y la otra con el mismo volumen de solvente orgánico sin gangliósido. Posteriormente, los pozos se secaron durante 90 min a 37 °C y se bloquearon por 2 h a TA con el buffer bloqueo que contenía 1% de BSA en tampón Tris-HCl pH 7.8-8. Los sueros de los ratones se diluyeron de forma seriada desde 1: 80 hasta 1: 5120 y se adicionaron a los pozos (50 µl por pozo) por duplicado y las placas se incubaron toda la noche a 4 °C. Después de cuatro lavados con PBS que contenía 0.05% de Tween 20, se añadieron 50 µl de suero de chivo anti-inmunoglobulinas IgM (específico por la cadena µ) o IgG (específico por la cadena γ) de ratón y conjugados con biotina (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., EUA) diluidos 1: 5000 y se incubó 90 min a TA. En el caso de la determinación de las subclases de IgG, los conjugados empleados fueron suero de rata anti-subclases IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) de ratón conjugado a biotina (Pharmingen, EUA), diluido 1: 5000 y en las mismas condiciones de incubación. Las

placas se lavaron nuevamente y se incubaron durante 90 min con 50 µl/pozo de estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina diluida 1: 1000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., EUA). Finalmente, después de lavar las placas, se adicionaron 100 µl por pozo de la solución de sustrato que contenía 1 mg/ml de p-nitrofenilfosfato (pNPP, Sigma, EUA) en tampón dietanolamina pH 9.8. La absorbancia del producto de la reacción se midió a los 30 min en un lector de placas (Organon Teknika, Austria) a 405 nm.

Los sueros se consideraron positivos cuando la absorbancia fue mayor de 0.18. Estos valores se obtuvieron luego de sustraer al valor medio de las absorbancias experimentales obtenida para cada dilución en los pozos recubiertos con el antígeno, los valores obtenidos al enfrentar los sueros a los pozos tratados de igual forma pero donde no se añadió el gangliósido. El valor de 0.18 se determinó del promedio de las absorbancias de los pozos recubiertos con el gangliósido en los que se adicionó buffer bloqueo en vez de suero más tres veces la desviación estándar.

#### *3.3.1.3 Inmunotinción en placas HPTLC*

Con el objetivo de estudiar la especificidad del suero, se realizó una cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, del inglés "high performance thin layer chromatography"). Se utilizaron placas de aluminio pre-recubiertas con sílica-gel 60 F-254 (Merck, Alemania) en las que se aplicaron mezclas de gangliósidos que contenían 2 µg de cada uno de ellos. El sistema de solvente utilizado para desarrollar la cromatografía fue cloroformo: metanol: 0.25% KCl (50: 40:10, v/v). Luego de finalizada la misma, las bandas de gangliósidos se visualizaron mediante el relevado químico con resorcinol.

La inmunotinción enzimática de las placas HPTLC se realizó según los procedimientos descritos previamente (223), con ligeras modificaciones. Luego de llevar a cabo la cromatografía en capa fina descrita anteriormente, las placas de HPTLC se plastificaron por inmersión durante 75 s en una solución de 0.1% de poliisobutilmetacrilato (PIBM) en *n*-hexano. Después de secar las placas, se bloquearon por incubación con PBS que contenía 1% de BSA durante 30 min a TA con agitación suave, y posteriormente se incubaron con los sueros de los ratones diluidos 1:100 en solución de bloqueo, durante 16 h a 4 °C. Luego de realizarse cuatro lavados de 3 min cada uno con PBS 0.05% de Tween

20, las placas se incubaron 90 min a TA con un suero de chivo anti-inmunoglobulinas IgG de ratón conjugado con biotina (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., EUA) diluido 1: 5000. Las placas se lavaron otra vez y se incubaron con el complejo estreptavidina–fosfatasa alcalina diluido 1:1000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., EUA) en las mismas condiciones que el conjugado anterior. Finalmente, las placas se lavaron y se incubaron durante 30 min con la solución sustrato que consistió en 0.1% de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP, Sigma) en solución tampón de glicina 0.1 M pH 10.4. La reacción se detuvo por lavados con agua.

#### *3.3.1.4 Medición de la citotoxicidad mediada por complemento heterólogo*

Para determinar la capacidad de los sueros de lisar células tumorales, se realizó un ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento heterólogo. Las células de melanoma B16F10 ( $3 \times 10^6$ ) se marcaron con 100  $\mu\text{Ci}$  de  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  (Amersham, Reino Unido) disuelto en RPMI 1640 con SFT al 10% durante 2 h a 37 °C en una incubadora con 5% de  $\text{CO}_2$ . Las células se lavaron extensivamente y se incubaron  $1.5 \times 10^4$  células marcadas por pozo en placas de cultivo de 96 pozos de fondo en U (Nunc, Dinamarca), en presencia de los sueros de ratones BALB/c (diluidos 1:5) pre- o postinmunes o medio con SFT durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron y se incubaron con complemento de conejo diluido 1:5 durante 3 h a 37 °C. Las placas se centrifugaron a 90 x g durante 5 min y se extrajeron alícuotas de 150  $\mu\text{l}$  de sobrenadante que se cosecharon en un cosechador automático (Skatron, Noruega). La liberación del isótopo  $^{51}\text{Cr}$  se determinó en un contador automático de radiaciones gamma 1470 (Wallac, Finlandia). Los ensayos se realizaron por triplicado. El control de máxima liberación de  $^{51}\text{Cr}$  se realizó mediante la incubación de las células con 1% de SDS y el control de liberación espontánea se midió en las células cultivadas con medio con 10% de SFT, en ausencia de complemento. El porcentaje de lisis específica se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = \frac{\text{Liberación experimental} - \text{liberación espontánea}}{\text{Liberación máxima} - \text{liberación espontánea}} \times 100$$

### 3.3.1.5 *Determinación de la expresión de moléculas de superficie por citometría de flujo*

Las poblaciones de DCs y de linfocitos se estudiaron a través del marcaje de moléculas en la membrana plasmática. Con este objetivo, las células se incubaron inicialmente durante 15 min en PBS, azida sódica 0.01% y SFT al 1%, para minimizar las uniones inespecíficas. A continuación,  $2 \times 10^5$  células por cada muestra se incubaron durante 15 min a 4 °C, en la oscuridad, con los diferentes AcMs conjugados a fluoróscoros diluidos en una solución de PBS, azida sódica 0.01% y SFT al 1%. Una vez marcadas las células se lavaron extensivamente con la misma solución centrifugando 5 min a 90 x g y se adquirieron en el citómetro de flujo.

En el caso del marcaje con el suero de ratón y el AcM GMR6, las células se incubaron primero con los sueros de los ratones diluidos 1:10 o con el GMR6 diluido 1:200 durante 15 min, se lavaron con PBS, azida sódica 0.01 % y SFT al 1% y se incubaron con suero de chivo anti-IgG, IgA e IgM de ratón (STAR87F) conjugado a FITC (Serotec, EUA) durante otros 15 min. Por último se lavaron y se adquirieron en el citómetro de flujo. Las células solas e incubadas con el anticuerpo secundario fueron incluidas como control del ensayo

En los experimentos anteriores la viabilidad celular se midió adicionando a la solución final ioduro de propidio a 50 µg/ml.

Para medir la citotoxicidad mediada por complemento autólogo a través del marcaje con ioduro de propidio, las células de melanoma B16 se incubaron 4 h con los sueros de los ratones diluidos 1:10 a 37 °C, en una solución de PBS que contenía SFT al 1%. Al cabo de ese tiempo las células se lavaron con la misma solución y se adicionó ioduro de propidio a 100 µg/ml. El porcentaje de lisis se calculó como la sustracción del porcentaje de células muertas del total adquiridas incubadas con el suero del día preimmune al porcentaje de células muertas del día postimmune.

El citómetro de flujo (FACscan, del inglés "fluorescence activated cell sorter") se obtuvo de Becton Dickinson (EUA). Todas las muestras se caracterizaron en cuanto a la intensidad de fluorescencia emitida por los fluoróscoros con los que se marcaron y en cuanto a la granulocidad y al tamaño de las células. Estos dos últimos parámetros están

dados por la dispersión del láser hacia los lados (SSC-H- del inglés “side scatter”) y hacia delante (FSC-H- del inglés “forward scatter”), respectivamente. Todos los datos obtenidos, se analizaron usando el programa CellQuest™ (Becton Dickinson, 1996).

### *3.3.2 Ensayos celulares*

#### *3.3.2.1 Preparación de las células dendríticas murinas a partir de la médula ósea*

Las DCs murinas se obtuvieron a partir de precursores aislados de la médula ósea (bmDCs, del inglés “bone marrow DCs”) (224). Con este objetivo se extrajeron, en condiciones estériles, los huesos fémur y tibia de los ratones recién sacrificados por dislocación cervical. Los extremos de los huesos se cortaron y la médula se aisló mediante el paso de un flujo de medio de cultivo por el interior del hueso con una aguja 23Gx1. Las células extraídas se sembraron en placas de cultivo de seis pozos (TPP, Suiza), a una densidad de  $6 \times 10^5$  células/ml en 3 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 20 ng/mL de GM-CSF (R&D Systems, Reino Unido). Entre las 72 y 90 h de cultivo, se añadieron otros 3 ml de medio de cultivo suplementado con GM-CSF. A los siete días de cultivo las células se colectaron. Para determinar la pureza de la población se estudió la expresión de los marcadores por citometría de flujo. La pureza de las células estuvo entre 70-80%. Las bmDCs generadas se usaron frescas para los experimentos celulares.

#### *3.3.2.2 Tratamiento de líneas tumorales con IFN $\alpha$*

Las líneas tumorales B16F10 y 3LL-D122 se cultivaron en placas de seis pozos (TPP, Suiza) a  $5 \times 10^5$  células/pozo en medio RPMI 1640, que contenía 1000 U/ml de IFN $\alpha$ , durante 16 h. El sobrenadante de cultivo que contenía el IFN $\alpha$ , fue gentilmente donado por el Grupo de Inmunosupresión del Departamento de Vacunas del CIM. La concentración de esa citocina en el sobrenadante se midió mediante un juego de reactivos para IFN $\alpha$  murino (PBL Biomedical laboratories, EUA). La modulación de la expresión de MHC I se evaluó por citometría de flujo mediante un AcM específico por H-2K<sup>b</sup> (AF6-88.5) conjugado a FITC (BD PharMingen, EUA).

### 3.3.2.3 Ensayos de medición *in vitro* de la activación de células T

Las células T totales se aislaron del bazo de ratones vacunados que habían rechazado el tumor y ratones vírgenes. Para la purificación de las células se extrajeron los bazos de los ratones y se maceraron usando el émbolo de una jeringuilla. La suspensión celular se resuspendió en medio RPMI 1640. Para lisar los eritrocitos, las células se incubaron con una solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 0.83% durante 5 min. Posteriormente, se lavaron con PBS, centrifugando a  $90 \times g$  durante 5 min. Las células T se purificaron por selección positiva mediante perlas magnéticas, utilizando el juego de reactivos comerciales para el aislamiento de las células T murinas CD90/MACS (Miltenyi Biotech GmbH, Alemania). Para la purificación, las células se incubaron con una solución de PBS/EDTA 2 mM y BSA al 0.5% que contenía el AcM anti-CD90 conjugado a microperlas durante 15 min, a  $6^\circ\text{C}$ . Este marcador es específico para linfocitos T murinos. Las células marcadas se aplicaron a columnas  $\text{LS}^+/\text{MR}^+$  (Miltenyi Biotech, Alemania) sometidas a un campo magnético. De esta forma, la fracción celular compuesta por las células CD90+ quedó retenida en la columna, mientras que la fracción eluyente, con las posibles células contaminantes, se descartó. Las columnas se lavaron tres veces con 3 ml de PBS/EDTA 2 mM y BSA al 0.5%. Finalmente, se eluyeron las células T al desacoplar las columnas del campo magnético. La evaluación de la pureza de la población T CD3+ se realizó por citometría de flujo y estuvo entre 96-98%. Las células T se incubaron, por triplicado, con bmDCs de ratones C57BL/6 pre-tratadas con medio de cultivo solo ó con lisado tumoral diluido 1:2.5 o con el gangliósido GM3 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). En detalles,  $2 \times 10^4$  bmDCs (100  $\mu\text{l}$ ) se cocultivaron durante 96 h en placas de cultivo de 96 pozos (NUNC, Canadá), con  $2 \times 10^5$  células T purificadas (100  $\mu\text{l}$ ). En estos experimentos se adicionó al cultivo, 16 h antes de colectar los sobrenadantes, el ionóforo de calcio ionomicina a 500 ng/mL (Sigma, EUA) y forbol 12-miristato-13-acetato (PMA del inglés “phorbol 12-myristate 13-acetate”) a 50 ng/mL (Sigma, EUA), para amplificar la secreción total de proteínas por las células. Para determinar el reconocimiento de las células T por líneas tumorales,  $2 \times 10^5$  linfocitos purificados (100  $\mu\text{l}$ ) se incubaron, durante 96 h, con  $2 \times 10^4$  células de melanoma B16F10 ó de carcinoma de pulmón 3LL-D122 (100  $\mu\text{l}$ ) tratadas o no previamente con  $\text{IFN}\alpha$  e inactivadas con una dosis de irradiación de 30 Gy en un emisor de radiaciones gamma (PX $\gamma$ 30, Rusia). Después de irradiadas y antes de ser incubadas con los linfocitos T, las

células tumorales se lavaron extensivamente con RPMI 1640 suplementado con SFT al 10%, 5 min a 60 x g. Por último, los sobrenadantes de cultivo se colectaron y se guardaron a -20 °C para los ensayos de determinación de IFN $\gamma$ .

#### *3.3.2.4 Determinación de IFN $\gamma$ en el sobrenadante de cultivo*

Para la determinación de IFN $\gamma$  en el sobrenadante de cultivo, se utilizó el juego de reactivos de la firma Pharmingen (BD Pharmingen, EUA) y se siguió el procedimiento sugerido por el fabricante. Las placas de ELISA (High Binding Costar, EUA) se recubrieron durante toda la noche con 1  $\mu$ g/ml de anticuerpos específicos por la citocina murina IFN $\gamma$ , diluidos en PBS. Posteriormente, las placas se lavaron con PBS y Tween 20 al 0.05% y se bloquearon durante 1 h a TA con la misma solución, en este caso suplementada con SFT al 5%. Las placas se lavaron exhaustivamente y se adicionaron 100  $\mu$ l del sobrenadante de cultivo. Cada muestra se evaluó por triplicado. La proteína IFN $\gamma$  recombinante, incluida en el juego de reactivos, se empleó como patrón de concentración en el ensayo. A las 4 h de incubación a TA, las placas se lavaron y se añadió el anticuerpo anti-IFN $\gamma$  conjugado a biotina. Después de 1 h de incubación a TA, las placas se lavaron y se añadió un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina, diluido 1: 2000 en la solución tampón. A la hora de incubación, se añadió el pNPP como sustrato, diluido hasta 1 mg/mL en una solución tampón de dietanolamina (pH 8.9). A los 20 min se determinó, la absorbancia de cada pozo a 405 nm en un lector de placas (Organon Teknica, Austria).

#### *3.3.3 Análisis estadísticos*

Para todos los análisis estadísticos realizados, se utilizaron los programas SPSS versión 10.0 y el editor de gráficos GraphPad Prism versión 4.0. En la determinación de la normalidad y homogeneidad de varianza de los datos se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la de Bartlett, respectivamente.

En todos los ensayos los datos se distribuyeron de forma no normal, aún después de realizar las transformaciones de escala. En este caso se utilizó la prueba U de Mann-Whitney, para comparar los volúmenes tumorales entre los dos grupos de animales, vacunados y controles, en el escenario preventivo-terapéutico. También se usó esta

prueba para comparar la mediana de los títulos de anticuerpos y la secreción de IFN $\gamma$  entre dos grupos. En el ensayo donde se compararon los volúmenes tumorales entre tres grupos se usó la prueba de Kruskal-Wallis. La prueba de Spearman se aplicó para determinar la correlación entre los títulos de anticuerpos y la capacidad de los ratones de rechazar el tumor. El análisis de la supervivencia de los ratones inoculados con el tumor se utilizó la prueba de Kaplan-Meier y para las comparaciones entre los grupos la prueba de Log-Rank. En el experimento donde se midió la duración de la respuesta antitumoral se empleó la prueba de  $\chi^2$  cuadrado para la comparación de proporciones. Las diferencias se consideraron significativas para valores de  $P < 0.05$ .



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Inmunogenicidad en ratones del candidato vacunal VSSP/GM3 + Montanide ISA 51

#### 4.1.1 El candidato vacunal VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 induce anticuerpos anti-GM3 de alta especificidad

En nuestro laboratorio se estudió si el preparado vacunal compuesto por el gangliósido GM3 insertado en proteoliposomas de pequeña talla derivadas de las proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, y emulsionado en Montanide ISA 51 era inmunogénico en ratones. Con este objetivo, ratones C57BL/6 y BALB/c se inmunizaron, por vía intramuscular, con cuatro dosis de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 cada 14 días. Los sueros se colectaron antes del comienzo de la inmunización y durante el período que duró el ensayo. La respuesta de anticuerpos séricos se midió por la técnica de ELISA indirecto y la especificidad de los anticuerpos inducidos se confirmó por inmunotinción en placas de HPTLC.

El suero pre-inmune de los ratones no mostró anticuerpos contra GM3 en ninguno de los casos (resultado no mostrado). La respuesta de anticuerpos en el suero dos semanas después de la última inmunización (día 56) se muestra en la tabla 1. Como se puede observar, en ambas cepas de ratones se obtuvieron anticuerpos específicos por el GM3 tanto de isotipo IgG como IgM. En los ratones BALB/c, el 100% de los animales desarrolló anticuerpos IgG, mientras que la respuesta IgM se observó en un 70% de ellos. En el caso de los C57BL/6, la frecuencia de ratones con anticuerpos IgM (33%) fue menor si se compara con los anticuerpos IgG (89%). El preparado VSSP/GM3, administrado en forma no-emulsiva, no fue capaz de inducir anticuerpos contra GM3.

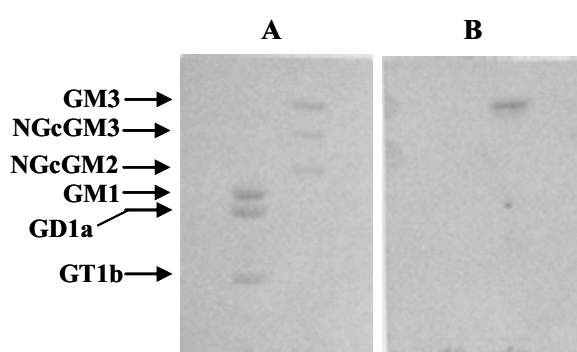
**Tabla 1. Respuesta de anticuerpos contra GM3 en ratones C57BL/6 y BALB/c inmunizados con VSSP/GM3.**

Inmunógenos <sup>a</sup>	Cepa	n	Anticuerpos IgG <sup>b</sup> vs GM3	Anticuerpos IgM <sup>b</sup> vs GM3
VSSP/GM3 + Montanide ISA 51	BALB/c	10	10 240 (3), 5120 (2), 640 (2), 320 (3)	640 (1), 320 (2), 160 (3), 80 (1), 0 (3)
VSSP/GM3	BALB/c	10	0	0
VSSP/GM3 + Montanide ISA 51	C57BL/6	9	160 (2), 320 (1), 640 (1), 1280 (3), 2560 (1), 0 (1)	320 (1), 1280 (2), 0 (6)
VSSP/GM3	C57BL/6	10	0	0

<sup>a</sup> Se administraron cuatro dosis (120 µg/dosis) del inmunógeno cada 14 días, por vía intramuscular.

<sup>b</sup> El título mostrado corresponde a la semana ocho (día 56) de iniciado el protocolo de inmunización. Entre paréntesis se representa el número de animales con ese título.

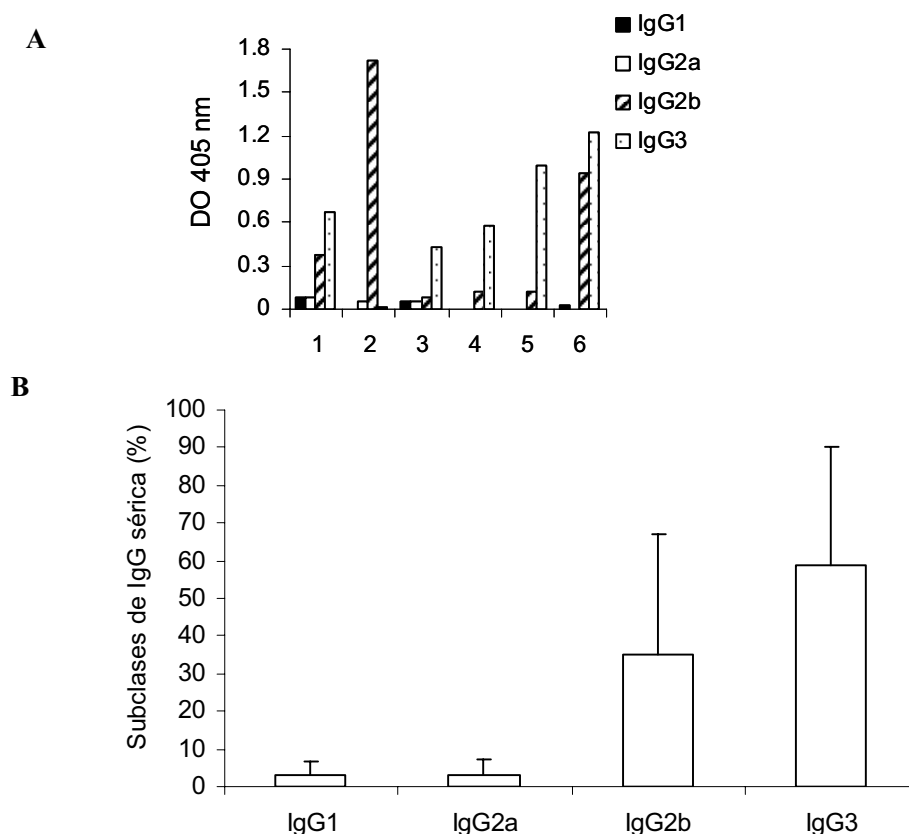
Con el objetivo de estudiar la especificidad de los anticuerpos inducidos por la inmunización con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51, los sueros del día 56 se estudiaron frente a un panel de gangliósidos (GM3, NGcGM3, NGcGM2, GM1, GD1a y GT1b) empleando la técnica de inmunotinción en placas de HPTLC. Los resultados de un experimento representativo, empleando el suero de un ratón, se muestran en la figura 1. Como se puede observar, en el suero de los ratones inmunizados con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 existen anticuerpos con una alta especificidad por el gangliósido usado en el inmunógeno (Figura 1B). Ninguno de los otros gangliósidos fue reconocido.



**Figura 1. Especificidad del suero de ratones C57BL/6 inmunizados con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51.** La mezcla de gangliósidos que contenía GM3, NGcGM3, NGcGM2, GM1, GD1a y GT1b se aplicó a placas de HPTLC. El sistema de solvente utilizado para desarrollar la cromatografía fue cloroformo: metanol: 0,25 % KCl (50:40:10, v/v). **(A)** Tinción de los gangliósidos con el reactivo resorcinol-HCl específico para este tipo de molécula. **(B)** Reconocimiento del gangliósido GM3 por el suero de un ratón representativo del grupo vacunado. Después de la incubación con el suero del ratón inmunizado con cuatro dosis del inmunógeno (120 µg/dosis) cada 14 días, la placa se reveló con un anticuerpo específico por las IgG murinas acoplado a fosfatasa alcalina.

#### 4.1.2 Las subclases de IgG predominantes en los sueros hiperinmunes son IgG3 e IgG2b

La distribución de subclases de IgG en el suero de ratones C57BL/6 inmunizados con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 se estudió por ELISA usando anticuerpos específicos por las subclases de ratón IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. En la figura 2 se observa la distribución de subclases de IgG para cada ratón (Figura 2A) y la media del porcentaje de cada subclase en el suero de los seis ratones inmunizados (Figura 2B). Aunque se detectaron las cuatro subclases de IgG, las IgG3 e IgG2b fueron las predominantes.

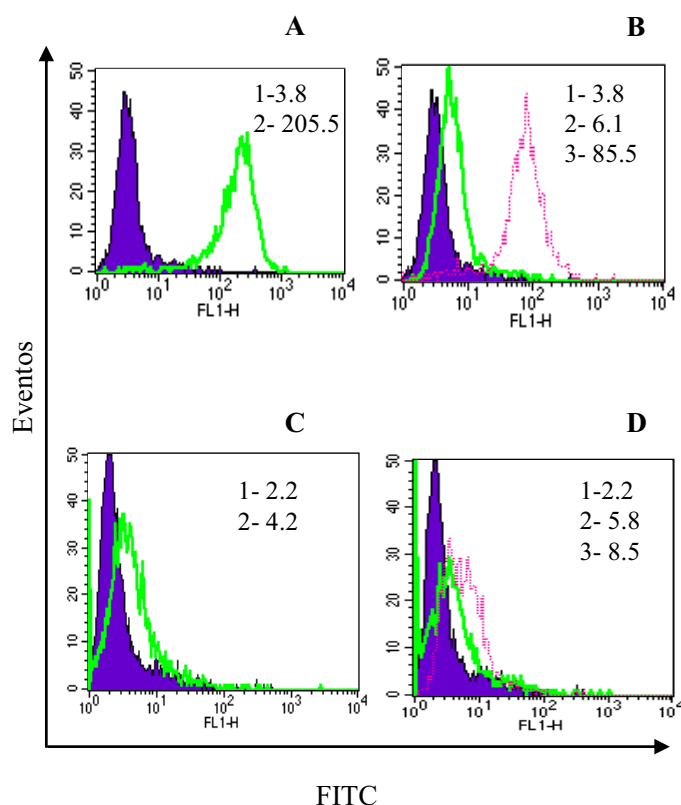


**Figura 2. Distribución de subclases de IgG específicas por el GM3 en el suero de ratones inmunizados.** Seis ratones C57BL/6 se inmunizaron por vía intramuscular, cuatro veces cada 14 días, con 120  $\mu$ g/dosis de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51. Los anticuerpos específicos por el GM3 se detectaron por ELISA en el día 56. **(A)** Distribución de subclases IgG para cada ratón **(B)**. Distribución de subclases de IgG sérica presente en el suero de los seis ratones. Los datos representan la media del porcentaje de cada isotipo  $\pm$  desviación estándar del total de inmunoglobulinas IgG en el suero de los seis ratones. Los gráficos son representativos de tres experimentos realizados de forma independiente.

#### 4.1.3 Los sueros de los ratones vacunados reconocen la línea de melanoma B16

La especificidad de los sueros de los ratones C57BL/6 inmunizados con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 se corroboró por citometría de flujo en la línea de melanoma B16, positiva a la expresión del gangliósido (32), y en el carcinoma mamario F3II, negativa a la expresión de esta molécula (225). Para corroborar la expresión del GM3 en las células de melanoma se usó el AcM GMR6. La figura 3 muestra el reconocimiento del suero de un ratón representativo de un grupo de diez por la línea B16F10. Como se puede observar, el suero del día 56 reconoció el 100% de las células de melanoma con una alta intensidad media de fluorescencia. Por el contrario, no hubo reconocimiento cuando las células se incubaron con los sueros pre-inmunes. La línea F3II no fue reconocida por el suero pre-

inmune y tampoco por el suero post-inmune. Este resultado demuestra que la inmunización induce la producción de anticuerpos específicos por antígenos de la superficie de las células de melanoma B16.



**Figura 3. Reconocimiento de células de melanoma B16 por los sueros de los ratones inmunizados.** (A) Las células de B16 se incubaron en presencia de un AcM específico por el GM3 (#2, línea continua), o con el AcM secundario (#1, histograma relleno). (B) La incubación se realizó con el suero pre-inmune de un ratón C57BL/6 (#2, línea continua), con el suero del día 56 de ratones inmunizados con cuatro dosis de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 cada 14 días (#3, línea de puntos), o con un AcM secundario (#1, histograma relleno). (C) Incubación con el AcM específico a GM3 (#2, línea continua) o con el Ac secundario (#1, histograma relleno) de una línea celular (el carcinoma mamario F3II) que no expresa el gangliósido GM3. (D) Incubación con los sueros pre-inmune (#2, línea continua), post-inmune (#3, línea de puntos) de un ratón inmunizado, ó con el AcM secundario (#1, histograma relleno) de la línea F3II. El reconocimiento del gangliósido en las células de B16 o en las células de F3II se analizó por citometría de flujo usando un anticuerpo secundario específico por inmunoglobulinas de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Se indica además la media de la intensidad de fluorescencia correspondiente a cada histograma. Los datos en la figura corresponden a un ratón representativo de un grupo de diez, de un experimento repetido tres veces.

#### 4.1.4 Los sueros de los ratones vacunados tienen actividad citolítica sobre las células de B16

Con el objetivo de estudiar las funciones efectoras de los anticuerpos específicos por el GM3 se realizó un experimento de citotoxicidad dependiente de complemento usando el suero del día 56 de ratones BALB/c inmunizados, por vía intramuscular, con cuatro dosis cada 14 días de 120 µg de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51. El suero post-inmune de todos los animales estudiados fue capaz de lisar más del 60% de las células de melanoma B16 en presencia de complemento de conejo (Tabla 2). El suero pre-inmune no tuvo

capacidad citolítica sobre las células de melanoma. En ausencia de complemento los anticuerpos del suero post-inmune no mostraron capacidad citotóxica.

**Tabla 2. Capacidad lítica dependiente de complemento sobre la línea de melanoma murino B16F10 mediada por los anticuerpos anti-GM3 en el suero de ratones BALB/c.**

Número del ratón	Respuesta IgG (DO, 405 nm) <sup>a</sup>	Suero pre-inmune + complemento <sup>b</sup> (%)	Suero post-inmune + complemento <sup>b</sup> (%)	Suero post-inmune – complemento <sup>b</sup> (%)
2	0.678	0	89	0
3	1	0	63	0
6	0.934	0	62	0
7	0.826	0	70	0
10	0.4	0	87	0

<sup>a</sup> Valores de densidad óptica (DO) a 405 nm obtenidos en el ELISA después de restar a los valores de DO de los pozos recubiertos con GM3, los valores de la D.O de los pozos recubiertos con metanol. Los sueros de ratones BALB/c inmunizados con cuatro dosis de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 cada 14 días, se colectaron dos semanas después de la última inmunización y se usaron a una dilución de 1: 80.

<sup>b</sup> Porcentaje de células de B16F10 lisadas. Las células tumorales se marcaron con <sup>51</sup>Cr y se incubaron con el suero diluido 1: 5. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

## **4.2 Actividad antitumoral del candidato vacunal VSSP/GM3+ Montanide ISA 51 en el modelo del melanoma murino B16. Escenario de enfermedad residual mínima**

### **4.2.1 El candidato vacunal VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 protege a los ratones de la recurrencia del melanoma B16**

Después de demostrar que la formulación vacunal VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 era inmunogénica en ratones, se estudió su efectividad usando un modelo de melanoma en el contexto de la enfermedad residual mínima. Con este objetivo se empleó el melanoma B16, cuyo gangliósido mayoritario es el GM3, y se combinó la cirugía con la inmunización de ratones C57BL/6 con el preparado vacunal.

El efecto de la inmunización con el VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 se estudió en ratones que habían recibido previamente  $5 \times 10^4$  células de B16F10 por vía subcutánea y que se operaron para eliminar el tumor, cuando el volumen tumoral alcanzó 250 mm<sup>3</sup>. El VSSP/GM3 (120 µg/dosis) + Montanide ISA 51 se administró por vía intramuscular usando dos esquemas diferentes de inmunización (ver figura 4A). Un grupo recibió cuatro dosis semanales (n = 10), comenzando el día de la cirugía, y el otro grupo se inmunizó con cuatro dosis quincenales (n = 5), comenzando antes de la cirugía, cuando los tumores eran ya palpables. En ambos protocolos la tercera dosis de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 se

administró a los 15 días de la cirugía del tumor, tiempo en el cual los ratones tenían alto riesgo de recurrencia local o metástasis. Se midió la sobrevida de los animales, la recurrencia local después de la cirugía y la presencia de metástasis en los pulmones después que los animales murieron. En la figura 4B y en la tabla 3 se muestran los resultados de este experimento. Como se esperaba, todos los animales con tumor no operados ( $n = 4$ ) desarrollaron tumores subcutáneos y murieron entre los 31-38 días después de la inoculación, como consecuencia del crecimiento del tumor primario y sin signos de metástasis pulmonares. Como se observa en la figura 4B la cirugía de los tumores mejoró significativamente la sobrevida de los ratones respecto al control ( $P < 0.05$ , por la prueba de Log-Rank). La administración semanal de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 no produjo ningún beneficio en la sobrevida de los ratones respecto a la cirugía sola. Sin embargo, la combinación de cirugía con la administración del inmunógeno cada 14 días fue superior a la cirugía sola ( $P = 0.04$ , por la prueba de Log-Rank). En este caso el 100% de los animales sobrevivieron al tumor sin signos de recurrencia local o metástasis pulmonares. Por el contrario, en algunos de los animales operados solamente y operados y vacunados cada siete días, hubo recurrencia local del tumor y desarrollo de metástasis (Tabla 3). Estos experimentos sugieren que el candidato vacunal VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 es efectivo contra el melanoma B16 en el escenario de enfermedad residual mínima, siempre que se administre en el esquema de inmunización quincenal.

**Tabla 3. Sobrevida, recurrencia local y metástasis pulmonares en ratones C57BL/6 inoculados con el melanoma B16F10, operados y vacunados con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51**

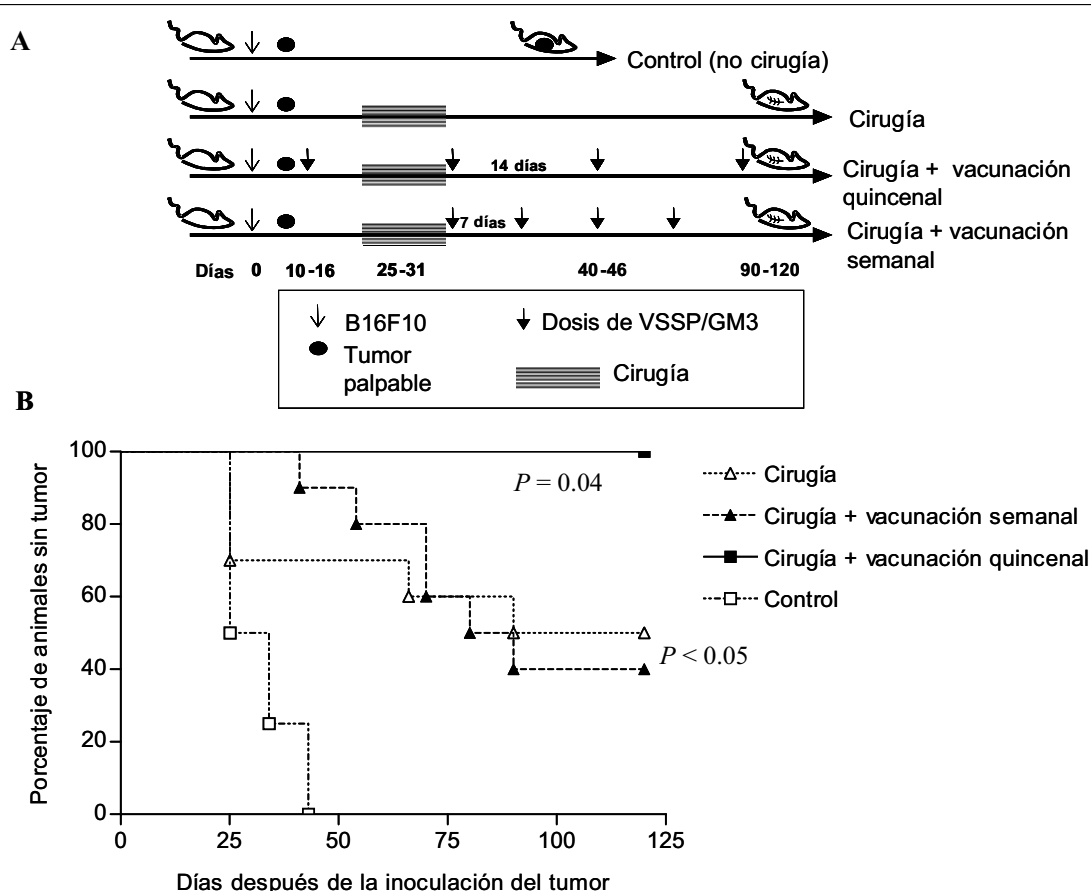
Grupos de tratamiento <sup>a</sup>	Sobrevida al final del experimento (mas de 120 días) <sup>b</sup>	Incidencia de recurrencia local <sup>b</sup>	Incidencia de metástasis pulmonares en la autopsia <sup>b</sup>
Control (sin cirugía)	0 % (0/4)	—	0 % (0/4) <sup>c</sup>
Cirugía	50 % (5/10)	40 % (4/10)	20 % (2/10)
Cirugía + vacunación semanal	40 % (4/10)	30 % (3/10)	40 % (4/10)
Cirugía + vacunación quincenal	100 % (5/5)	0 % (0/5)	0 % (0/5)

<sup>a</sup> Los tumores subcutáneos que alcanzaban  $\sim 250 \text{ mm}^3$  se eliminaron por cirugía entre los días 25-31 después de la inoculación del tumor. Los ratones se inmunizaron con cuatro dosis semanales comenzando el día de la cirugía o con cuatro dosis quincenales comenzando cuando los tumores eran palpables (10-16 días).

<sup>b</sup> Tanto la sobrevida como la incidencia local del tumor se expresan en porcentaje. Entre paréntesis se representa el número de ratones positivos del total de animales por grupo.

<sup>c</sup> Los ratones controles no operados murieron rápidamente como consecuencia del tumor primario, sin signos de metástasis.

Los datos son representativos de dos experimentos realizados de manera independiente



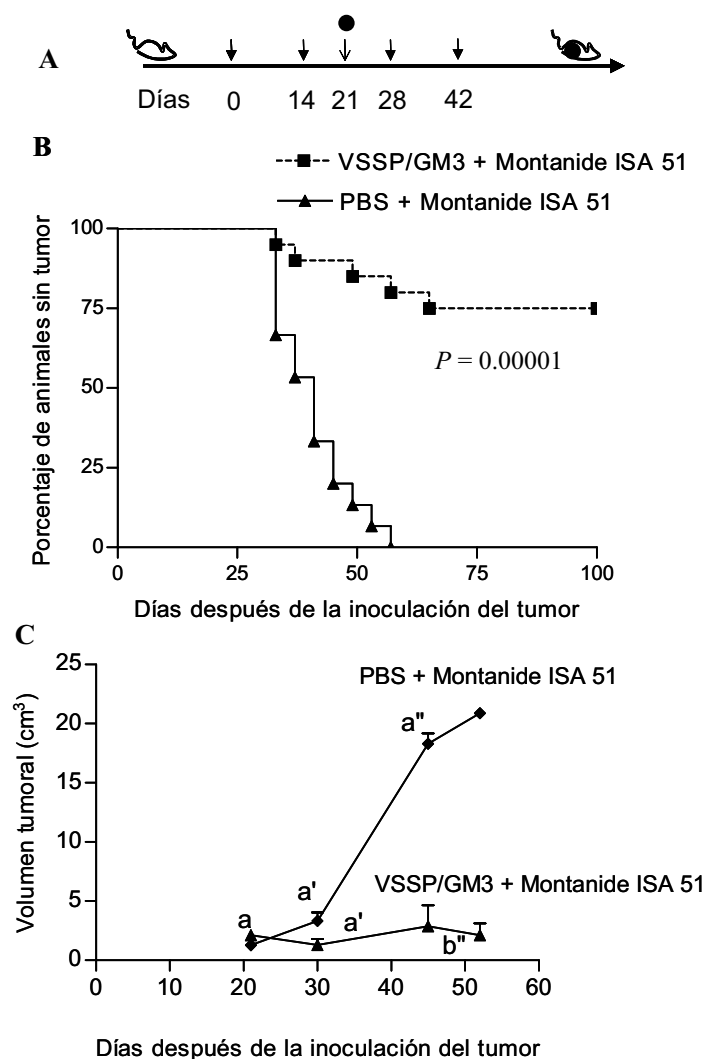
**Figura 4. Inducción de actividad antitumoral en el escenario de enfermedad residual mínima.** En el día cero, grupos de ratones C57BL/6 se inocularon con  $5 \times 10^4$  células de B16F10. El primer grupo recibió sólo cirugía, el segundo recibió cuatro dosis semanales de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 por vía intramuscular, comenzando el día de la cirugía, y el tercer grupo se inmunizó con cuatro dosis quincenales del mismo inmunógeno, comenzando antes de la cirugía cuando los tumores ya eran palpables. El grupo control no recibió ningún tratamiento. En (A) se representa el esquema de tratamiento. (B) Porcentaje de animales libres de tumor después de los diferentes tratamientos representados. Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron a través de la prueba de Log-Rank. La supervivencia de todos los grupos tratados fue significativamente mayor que la del control ( $P < 0.05$ ). Dentro de los grupos tratados, el que recibió cirugía y vacunación quincenal tuvo una supervivencia significativamente mayor que el grupo de cirugía sola y de cirugía con vacunación semanal ( $P = 0.04$ ). El gráfico es representativo de dos experimentos independientes.

### 4.3 Actividad antitumoral del candidato vacuna VSSP/GM3+ Montanide ISA 51 en el modelo del melanoma murino B16. Escenario preventivo-terapéutico

#### 4.3.1 La inmunización preventiva-terapéutica con el VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 induce protección contra el reto con el melanoma B16

Después de los resultados obtenidos en el escenario de enfermedad residual mínima, se estudió si el inmunógeno era efectivo contra el desarrollo del tumor en el contexto preventivo-terapéutico. Con este propósito se inmunizaron ratones C57BL/6 (20 animales por grupo) con cuatro dosis de 120  $\mu$ g de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 por vía

intramuscular, cada 14 días. A los 21 días de comenzado el esquema de inmunización, los ratones se inocularon con  $10^3$  células de B16F10. Dos dosis del candidato vacunal se administraron antes de inocular el tumor y dos dosis después del trasplante. En la figura 5A se muestra el esquema de inmunización y los resultados en la figura 5B y C. El 75% de los ratones inmunizados no desarrollaron tumor. La sobrevida fue significativamente mayor en el grupo vacunado respecto al control ( $P = 0.00001$ , por la prueba de Log-Rank) (Figura 5B). Se pudo constatar además, que el crecimiento de los tumores en los animales del grupo inmunizado fue menor que en el grupo control (Figura 5C), alcanzando significación estadística la comparación en el día 45 ( $P < 0.05$ , por la prueba de la U de Mann Whitney).



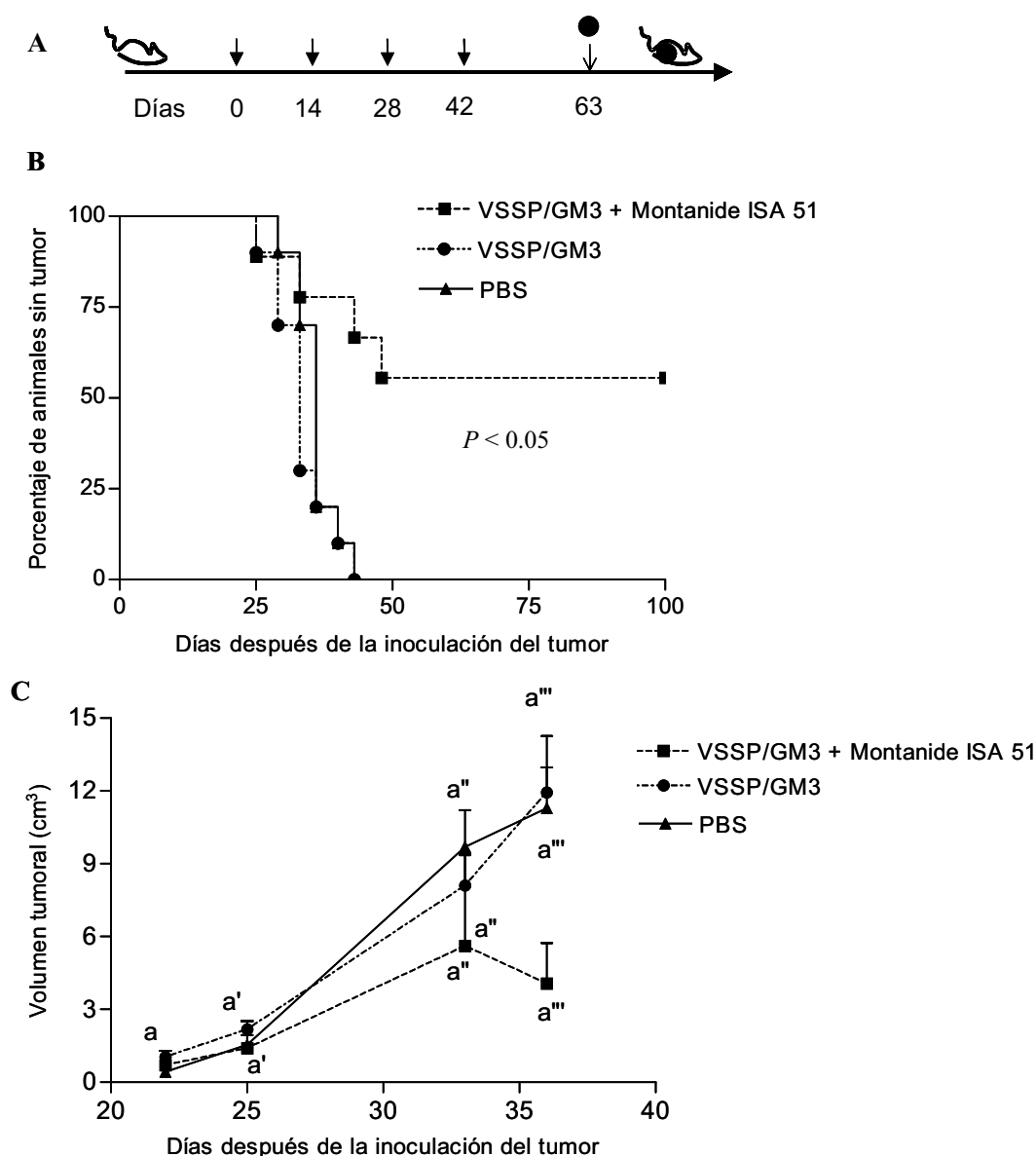
**Figura 5. Actividad antitumoral del VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 sobre el melanoma B16 en el escenario preventivo-terapéutico.** Los ratones C57BL/6 (20/grupo) se inmunizaron, por vía intramuscular, con cuatro dosis de VSSP/GM3 (120  $\mu$ g/dosis) ó PBS, ambos emulsionados en Montanide ISA 51 cada 14 días y se inocularon con  $10^3$  células de B16F10 a los 21 días de iniciarse el protocolo de inmunización. En (A) se muestra el esquema de inmunización. (B) El gráfico muestra el porcentaje de animales sin tumor después del reto con el melanoma B16F10 para ambos grupos de ratones. Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron a través de la prueba de Log-Rank. La sobrevida de los ratones inmunizados con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 fue significativamente mayor que la del grupo que recibió PBS + Montanide ISA 51 ( $P < 0.00001$ ) (C) Efecto de la inmunización con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 sobre el crecimiento del melanoma B16F10 en los animales que desarrollaron tumor. Los datos representan el promedio de los volúmenes del tumor para los días 21, 30, 45 y 52 después de la inoculación del B16F10. Letras diferentes indican significación estadística según la prueba de la U de Mann Whitney ( $P < 0.05$ ). El experimento se repitió tres veces con resultados similares.



#### **4.4 Actividad antitumoral del candidato vacunal VSSP/GM3+ Montanide ISA 51 en el modelo del melanoma murino B16. Escenario preventivo**

##### **4.4.1 La inmunización preventiva con el VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 induce protección contra el reto con el melanoma B16**

Después de conocer que el candidato vacunal fue capaz de proteger a los ratones del reto del melanoma B16 tanto en el modelo de enfermedad residual mínima como en el escenario preventivo-terapéutico, se decidió estudiar su efectividad en el escenario completamente preventivo. Con este objetivo los ratones C57BL/6 ( $n = 10$ ) se inmunizaron, por vía intramuscular, con cuatro dosis del VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 ( $120 \mu\text{g/dosis}$ ) cada 14 días y se inocularon con  $5 \times 10^3$  células de B16F10, 21 días después de la última inmunización. La figura 6A muestra el esquema de inmunización. No hubo diferencias en el tiempo al cual los tumores fueron palpables en los grupos vacunados y controles ( $21 \pm 2$ ,  $19 \pm 4$ , respectivamente). La sobrevida de los ratones inmunizados con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 fue significativamente mayor que la del grupo control, el cual recibió PBS en lugar del inmunógeno ( $P < 0.05$ , por la prueba de Log-Rank) (Figura 6B). En este mismo experimento se estudió si el adyuvante oleoso Montanide ISA 51, presente en la composición vacunal, era importante en la actividad antitumoral. Con este objetivo un grupo de ratones (10/grupo) se inmunizó sólo con el VSSP/GM3 con el mismo esquema anterior. Como se observa en la figura 6B, la sobrevida del grupo vacunado sin usar el adyuvante fue igual que la del control ( $P > 0.05$ , por la prueba de Log-Rank), lo que demostró el papel fundamental del adyuvante oleoso en la actividad antitumoral del preparado usando este esquema y vía de inmunización. El análisis de la evolución de los volúmenes tumorales para los animales que desarrollaron tumor en todos los grupos de tratamiento demostró que el crecimiento fue similar en el grupo tratado con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 comparado con el grupo control y el grupo inmunizado con VSSP/GM3 sin el Montanide ISA 51 ( $P > 0.05$ , por la prueba de Kruskal-Wallis). Basados en los resultados anteriores, los experimentos que se describirán a continuación se realizaron en el escenario totalmente preventivo con la formulación VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 y se usó PBS en el grupo control.

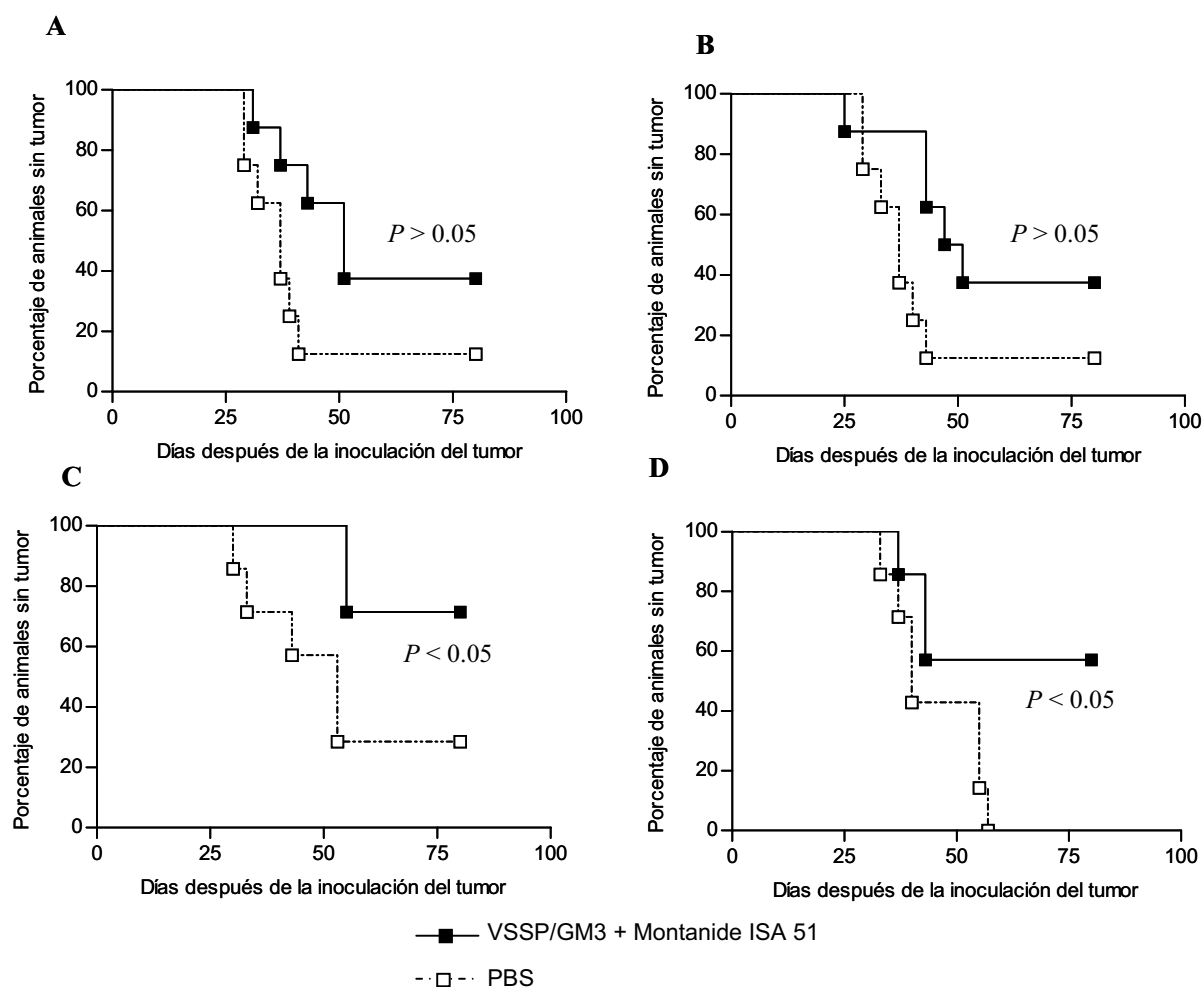


**Figura 6. Actividad antitumoral del candidato vacunal VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 en el escenario preventivo.** Grupos de ratones C57BL/6 (10/grupo) se inyectaron por vía intramuscular con cuatro dosis de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51, y se inocularon con  $5 \times 10^3$  células de melanoma B16F10, 21 días después de la última inmunización. En (A) se muestra el esquema de inmunización. (B) Se representa el porcentaje de animales libres de tumor después del reto con el melanoma B16F10. Un grupo de ratones se inmunizó con VSSP/GM3 sin Montanide ISA 51 usando el mismo esquema de vacunación. La prueba estadística empleada para determinar diferencias entre los grupos fue Log-Rank. La supervivencia del grupo tratado con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 fue significativamente mayor que el grupo que recibió la formulación sin Montanide ISA 51 y que el control ( $P < 0.05$ ). (C) Efecto de la inmunización con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 sobre el crecimiento del melanoma B16F10 en los animales que desarrollaron tumor. Los datos representan el promedio de los volúmenes tumorales para los días 22, 25, 33 y 36 después del reto con el B16. La diferencia en los volúmenes tumorales se evaluó a través de la prueba de Kruskal-Wallis. Letras iguales significan que no hay diferencias estadísticas ( $P > 0.05$ ). Estos experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

---

#### 4.4.2 *La actividad antitumoral del VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 depende del número de dosis y la frecuencia de administración*

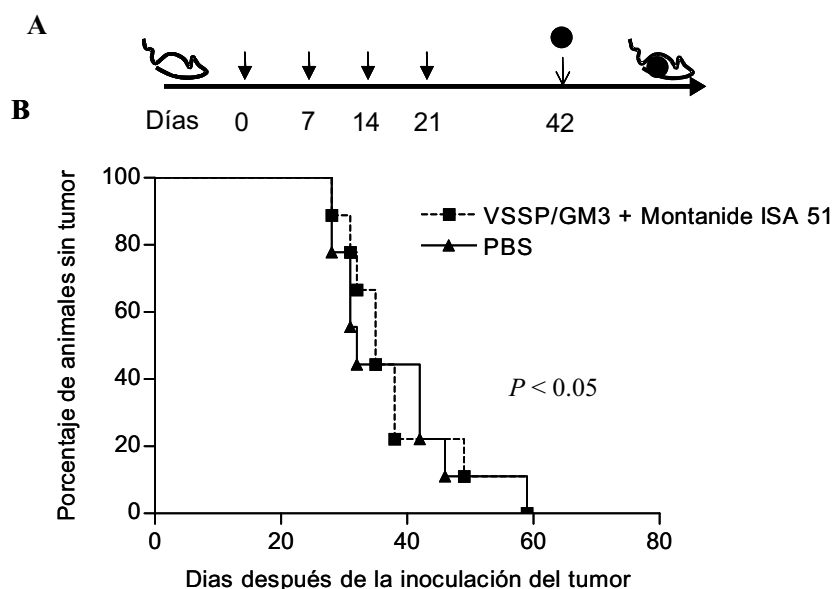
Para examinar si la protección antitumoral dependía del número de dosis del inmunógeno, grupos de ocho ratones C57BL/6 se inmunizaron con una ó dos dosis, y grupos de siete ratones se vacunaron con tres ó cuatro dosis de 120 µg de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 ó con PBS en los grupos controles. El inmunógeno se administró cada 14 días, por vía intramuscular, y a los 21 días de la última dosis, los ratones se inocularon con  $5 \times 10^3$  células de B16F10. En la figura 7 se representan las curvas de sobrevida para los diferentes grupos de ratones. Los ratones inmunizados con tres o cuatro dosis de la formulación vacunal tuvieron una sobrevida significativamente mayor que el control tratado con PBS ( $P < 0.05$ , por la prueba de Log-Rank) (Figura 7C y D). Sin embargo, como se observa en la figura 7A y B, no hubo impacto en la sobrevida respecto al grupo control para los grupos que recibieron una o dos dosis de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 ( $P > 0.05$ , por la prueba de Log-Rank).



**Figura 7. Influencia del número de dosis en la actividad antitumoral del preparado VSSP/GM3 + Montanide ISA 51.** Diferentes grupos de ratones C57BL/6 se inmunizaron con una (A), dos (B), tres (C) ó cuatro (D) dosis del VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 cada 14 días o con PBS. Los ratones se inocularon con  $5 \times 10^3$  células de B16F10 a los 21 días de la última inmunización. En los gráficos se representan los porcentajes de ratones libres de tumor después del reto con el melanoma B16F10. Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron a través de la prueba de Log-Rank. En los casos de la administración de una o dos dosis (A y B), no hubo diferencias entre el grupo vacunado y el control ( $P > 0.05$ ). En los grupos donde se administraron tres o cuatro dosis del inmunógeno (C y D), la sobrevida del vacunado fue significativamente mayor que la del control ( $P < 0.05$ ). Los datos representados son el resultado de un experimento repetido dos veces.

En todos estos estudios se demostró que el candidato vacunal era efectivo cuando se administraba cada 14 días. Para estudiar si la frecuencia de administración del VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 era determinante en su efecto antitumoral sobre el B16, nueve ratones C57BL/6 se inmunizaron cada siete días con cuatro dosis del preparado. A los 21 días de la última inmunización, se inocularon con  $5 \times 10^3$  células de B16F10. Como se observa en la

figura 8 la administración del inmunógeno semanal no fue capaz de inducir efecto antitumoral sobre el melanoma B16 ( $P > 0.05$ , por la prueba de Log-Rank).

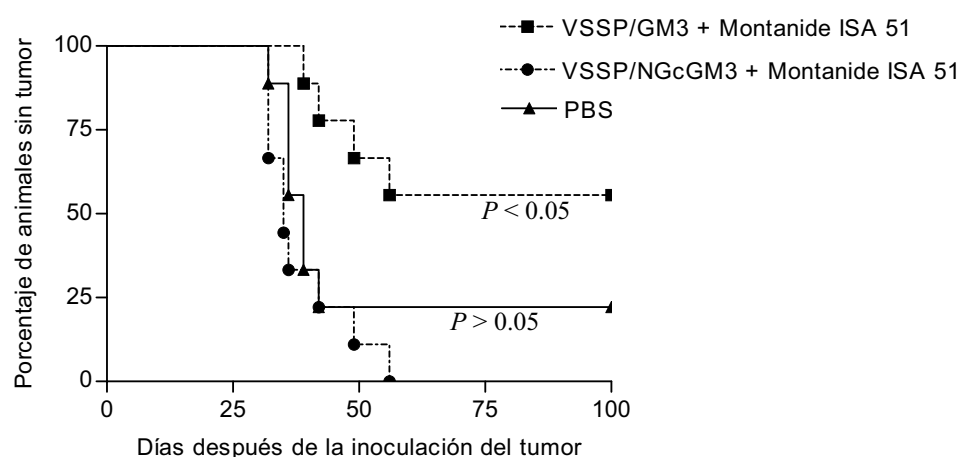


**Figura 8. Impacto de la frecuencia de administración semanal del inmunógeno en la supervivencia de los ratones retados con el melanoma B16F10.** En (A) se muestra el esquema de tratamiento. (B) Ratones C57BL/6 se inmunizaron con cuatro dosis de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 cada siete días, vía intramuscular. A los 21 días de la cuarta inmunización, se retaron con  $5 \times 10^3$  células de melanoma B16F10. El gráfico representa el porcentaje de animales sin tumor después de la inoculación del B16F10. Las diferencias entre los grupos se evaluaron a través de la prueba de Log-Rank. La supervivencia de los ratones de ambos grupos fue similar ( $P > 0.05$ ). El experimento representado se repitió dos veces con resultados similares.

#### 4.4.3 La respuesta antitumoral es dependiente del gangliósido presente en el tumor y en la preparación vacunal

Para verificar que la respuesta antitumoral era específica, se usó la variante glicolilada de este gangliósido (NGcGM3) en la preparación vacunal. La única diferencia entre estos dos gangliósidos es que la variante glicolilada presenta un grupo hidroxilo (OH-) en lugar de un átomo de hidrógeno en el grupo metilo del radical acilo unido al átomo de nitrógeno, enlazado al carbono de la posición 5 del ácido siálico. Grupos de diez ratones C57BL/6 se inmunizaron con cuatro dosis de VSSP/NGcGM3 + Montanide ISA 51, cada 14 días y a los 21 días de la última dosis se trasplantaron con  $10^4$  células de B16F10. Como se observa en la figura 9, la curva de supervivencia de los ratones inmunizados con este inmunógeno no fue diferente a la del control ( $P = 0.21$ , por la prueba de Log-Rank). Como en los experimentos anteriores, la inmunización con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 tuvo efecto

antitumoral sobre el melanoma B16. Este resultado indica que la presencia del gangliósido GM3, que es el mayoritario en el B16, es fundamental para la actividad antitumoral del preparado en este modelo.

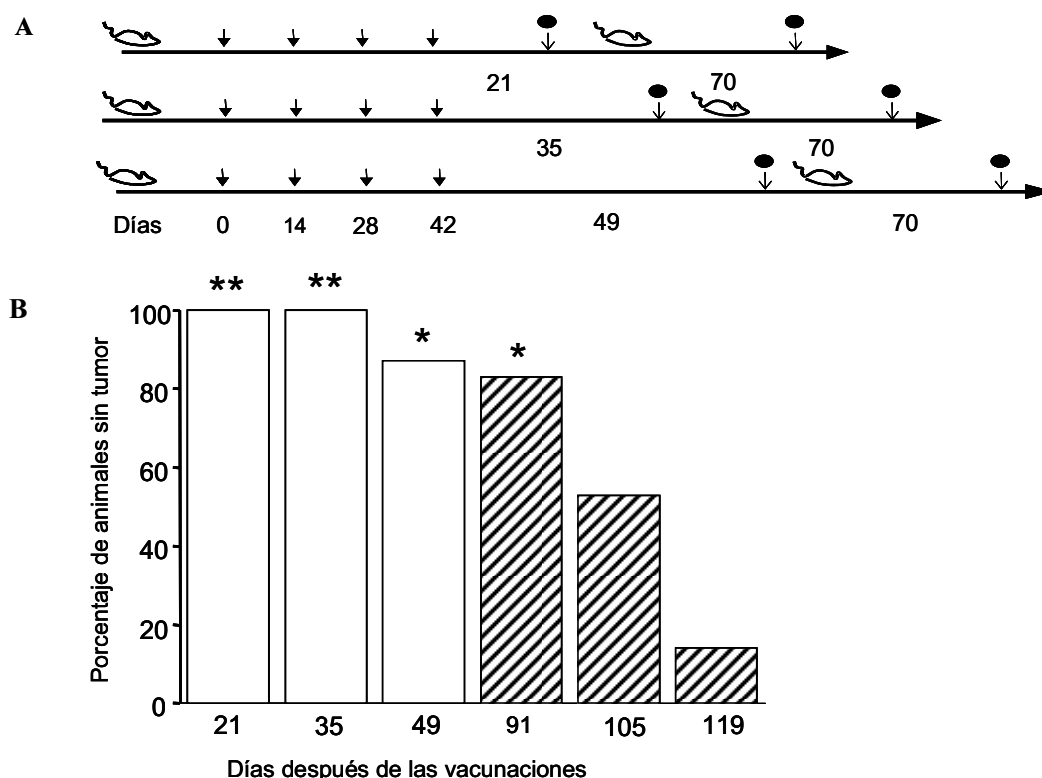


**Figura 9. Especificidad molecular de la actividad antitumoral del candidato vacunal contra el melanoma B16.** Grupos de diez ratones C57BL/6 se inyectaron con PBS, VSSP/GM3 ó VSSP/NGcGM3 estos dos últimos emulsionados en Montanide ISA 51. A los 21 días de la última inmunización, los ratones se inocularon con  $10^4$  células de melanoma B16F10. El gráfico representa el porcentaje de animales libres de tumor después del reto con el melanoma. La diferencia estadísticas entre los grupos se evaluaron a través de la prueba de Log-Rank. La sobrevida del grupo vacunado con VSSP/NGcGM3 + Montanide ISA 51 no fue diferente al del grupo con PBS ( $P > 0.05$ ), mientras que la sobrevida del grupo que recibió VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 fue significativamente mayor que la del control ( $P < 0.05$ ). Este experimento se repitió dos veces con resultados similares.

#### 4.4.4 La protección antitumoral es de larga duración

Con el propósito de estudiar la duración de la protección contra el melanoma B16, inducida por la inmunización con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51, grupos independientes de ratones C57BL/6 se inmunizaron con cuatro dosis de 120  $\mu$ g del inmunógeno cada 14 días por vía intramuscular, y se trasplantaron con  $2,5 \times 10^3$  células de B16F0 (variante de baja capacidad metastásica). El grupo control ( $n = 5$ ) se trató con PBS y se inoculó con igual cantidad de células a los 21 días de la última dosis de PBS. Su sobrevida fue de 41-52 días, tiempo en el cual murieron el 80% de los animales. Se usó un solo grupo control debido a que se ha demostrado que en ratones C57BL/6 tratados sólo con PBS, esta carga tumoral causa el desarrollo del melanoma en la mayoría de los animales que la reciben. En la figura 10A se muestra el esquema de tratamiento y en la 10B el porcentaje de ratones sin tumor después de la inoculación del melanoma B16F0 a diferentes tiempos de la última

dosis. Como se puede observar, el 100% de los animales inmunizados rechazó el tumor cuando éste se implantó 21 ( $n = 6$ ) y 35 días después de la cuarta dosis del inmunógeno ( $n = 7$ ), comparado con el control ( $P < 0.01$ , por la prueba de  $\chi^2$ ). Cuando el tumor se inoculó 49 días después de la cuarta dosis ( $n = 8$ ), el 89% de los ratones rechazó el tumor, lo que fue estadísticamente significativo respecto al porcentaje de rechazo en el grupo control ( $P < 0.05$ , por la prueba de  $\chi^2$ ). Los animales que resultaron negativos al primer trasplante se volvieron a inocular con el mismo número de células tumorales a los 70 días después de la primera inoculación (91, 105 y 119 días, respectivamente). La sobrevida de los animales inoculados 91 días después de la cuarta dosis fue significativamente mayor que la del grupo control ( $P < 0.05$ , por la prueba de  $\chi^2$ ), mientras que cuando el trasplante se realizó 105 y 119 días después, el preparado no tuvo efecto antitumoral. De estos experimentos se concluye que el efecto antitumoral se mantiene hasta tres meses después de la última inmunización.



**Figura 10. Duración de la protección antitumoral contra el melanoma B16 inducida por el candidato vacunal VSSP/GM3 + Montanide ISA 51.** Grupos de ratones C57BL/6 se inmunizaron con cuatro dosis (120  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ ) de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 por vía intramuscular cada 14 días, y se inocularon con  $2,5 \times 10^3$  células de B16F0. El grupo 1 recibió el reto a los 21 días de la última inmunización, el grupo 2 a los 35 días y el grupo 3 a los 49 días. Posteriormente, a los ratones que no desarrollaron tumor después del primer inóculo se les volvió a retar con el melanoma B16F0, a los 70 días del primer reto. En (A) se ilustra el esquema de tratamiento. (B) En el gráfico de barras se muestra el porcentaje de ratones sin tumor después del primer reto (barras blancas), y de animales sin tumor después del segundo inóculo (barras a rayas). En el grupo control el 80% de los animales desarrollaron tumor y murieron después de la primera inoculación del B16. Los símbolos (\*\*) y (\*) representan el nivel de significación para las diferencias estadísticas respecto al grupo control (\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ , por la prueba de  $\chi^2$ ). Los datos mostrados son representativos de dos experimentos con resultados similares.

#### 4.5 Mecanismos inmunológicos en la actividad antitumoral inducida por el VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 en el escenario preventivo.

##### 4.5.1 La actividad antitumoral del candidato vacunal correlaciona con la inducción de anticuerpos IgG específicos por el GM3

Para estudiar si en la actividad antitumoral contra el melanoma B16 era importante la inducción de anticuerpos específicos por el GM3, se colectó el suero de ratones C57BL/6 inmunizados con cuatro dosis de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51, por vía intramuscular cada 14 días e inoculados con  $10^4$  células de melanoma B16F10 a los 21 días de la última inmunización. La respuesta de anticuerpos se estudió en el suero pre-inmune, una semana



antes de inocular el tumor (día 56) y una semana (día 70) y un mes (día 93) después del reto con el melanoma. Se estudió tanto el título como la frecuencia de animales con anticuerpos IgG e IgM específicos por el GM3. El crecimiento de los tumores se verificó por palpación. A los 60 días de la inoculación del tumor, los animales se sacrificaron. En la Tabla 4 se muestra la frecuencia de animales respondedores con anticuerpos IgM e IgG, tanto del grupo que rechazó el tumor como del vacunado que desarrolló tumor. Los ratones vacunados que no desarrollaron tumor tuvieron mayor frecuencia de anticuerpos IgG e IgM en los tres momentos analizados. Además, en este grupo, el número de ratones con anticuerpos IgG se mantuvo prácticamente constante en el tiempo, incluso un mes y medio después de la última inmunización. Contrariamente, en el grupo de ratones vacunados que desarrolló tumor, el número de respondedores con anticuerpos IgG disminuyó después de que se inculó el tumor.

**Tabla 4. Frecuencia de la respuesta de anticuerpos IgG e IgM específicos por el GM3 en ratones C57BL/6 inmunizados con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 e inoculados con el melanoma B16F10.**

	IgM frecuencia de respondedores			IgG frecuencia de respondedores		
	D56	D70	D93	D56	D70	D93
Rechazaron el tumor (n=18)	9 (50 %)	7 (39 %)	5 (28 %)	18 (100 %)	18 (100 %)	17 (94 %)
No rechazaron el tumor (n=8)	2 (25 %)	2 (25 %)	1 (12 %)	6 (75 %)	3 (37 %)	3 (37 %)

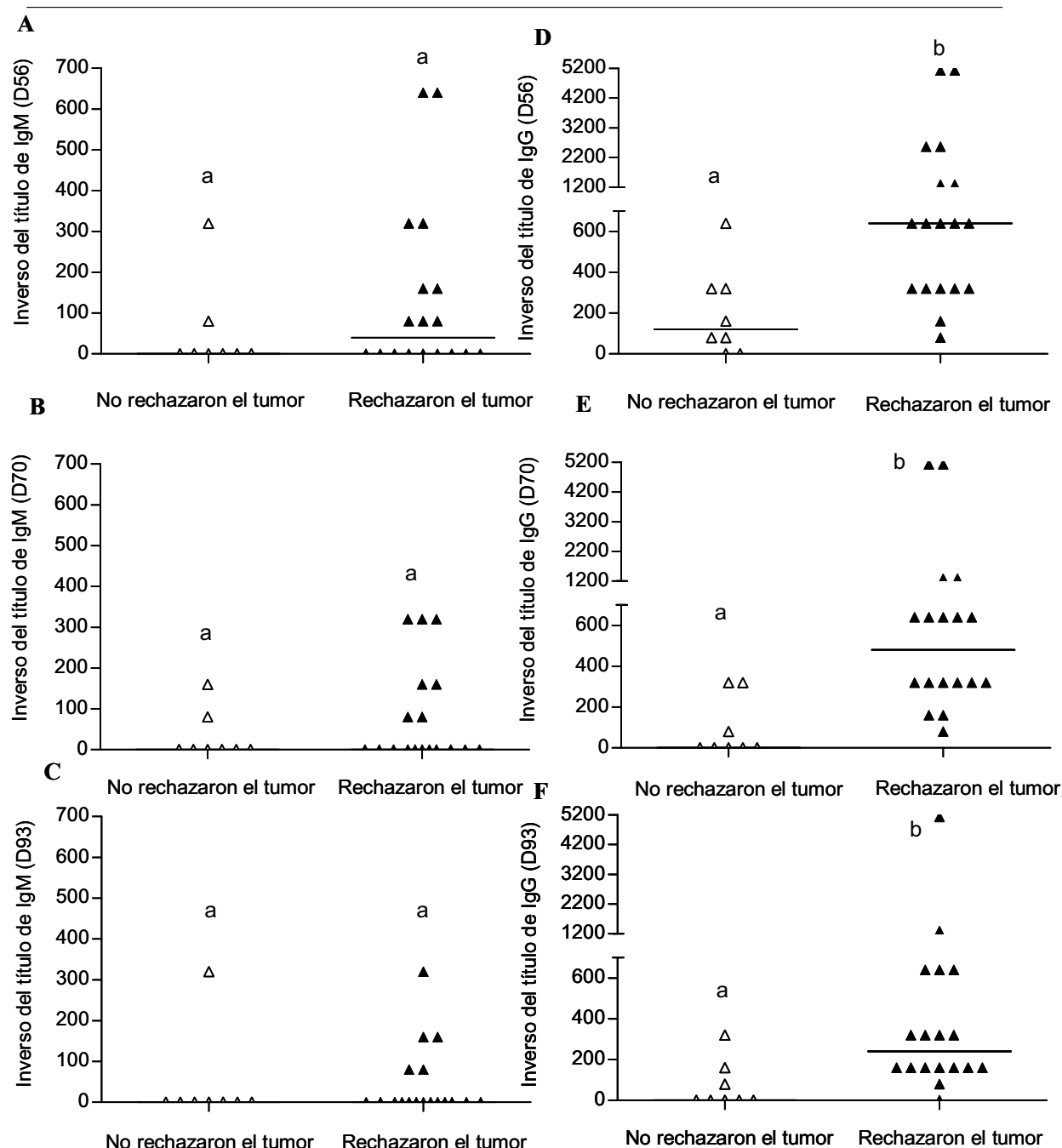
Los ratones C57BL/6 se inmunizaron cuatro veces cada 14 días con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 y a los 21 días de la última vacunación se inocularon con  $10^4$  células de melanoma B16F10. Se muestran el número de ratones cuyos sueros contenían anticuerpos específicos por el GM3 (porcentaje del total).

En la tabla se muestran los resultados de dos experimentos independientes.

En la figura 11 se muestra el título de anticuerpos IgM e IgG contra GM3 en ratones vacunados de dos experimentos independientes. La mediana de los títulos de anticuerpos de isotipo IgM específicos a GM3 para los días 56, 70 y 93 en los ratones que rechazaron el reto tumoral fue 40, cero y cero, respectivamente. Para el caso de los ratones que desarrollaron tumor, la mediana de los títulos fue cero para todos los días (Figura 11A, B y C). No hubo diferencias significativas en cuanto a los títulos de anticuerpos IgM entre los ratones que rechazaron el tumor y los que no lo rechazaron ( $P > 0.05$ , por la prueba de la U de Mann Whitney).

En cambio los títulos de anticuerpos IgG en aquellos animales que rechazaron el tumor fueron mayores que en los ratones que desarrollaron tumor (Figura 11D, E y F). En el caso del primer grupo, la mediana de los títulos para los días 56, 70 y 93 fue 640, 480 y 240, respectivamente, mientras que en los animales que desarrollaron tumor fue de 120, cero y cero para los mismos días. La diferencia entre la mediana de los títulos de anticuerpos IgG en el grupo que rechazó el tumor y el que no lo rechazó, fue estadísticamente significativa para cada uno de los días estudiados ( $P < 0.05$ , por la prueba de la U de Mann Whitney). Además se demostró que existía correlación negativa entre la respuesta de anticuerpos IgG y la capacidad de desarrollar el tumor para cada uno de los días analizados (día 56,  $r = -0.577$ ,  $P = 0.002$ ; día 70,  $r = -0.676$ ,  $P = 0.000$ ; día 93,  $r = -0.587$ ,  $P = 0.002$ , por la prueba de correlación de Spearman). Para verificar que la sola presencia del tumor no inducía respuesta de anticuerpos, se estudió la respuesta humoral de los ratones del grupo control que habían recibido la carga tumoral. En ninguno de ellos se detectaron anticuerpos específicos contra GM3 (resultados no mostrados).

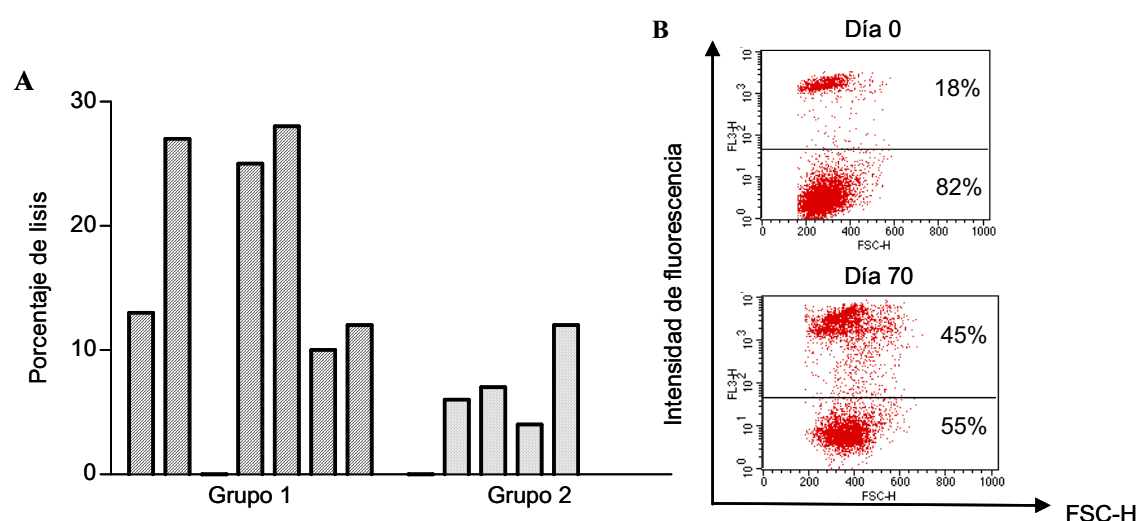
Estos resultados sugieren que los anticuerpos contra GM3 de isotipo IgG, están involucrados en el mecanismo antitumoral del candidato vacunal VSSP/GM3 + Montanide ISA 51



**Figura 11. Título de anticuerpos específicos por el GM3 en ratones vacunados e inoculados con el melanoma B16F10.** Ratones C57BL/6 se inmunizaron por vía intramuscular con cuatro dosis (120  $\mu$ g/dosis) de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51. A los 21 días de la última inmunización, se inocularon con  $10^4$  células del melanoma B16F10. Se colectó el suero de los animales una semana antes (D56), una semana (D70) y un mes después de la inoculación del tumor (D93). El título de anticuerpos IgG e IgM se determinó por ELISA. Los símbolos representan los títulos de anticuerpos detectados para cada ratón. Los triángulos blancos representan los ratones vacunados que no desarrollaron tumor y los triángulos negros son los ratones vacunados que lo desarrollaron. Las líneas horizontales representan la mediana de los títulos para cada día. El inverso de los títulos de IgM se representa en **A**, **B** y **C**, para los días 56, 70 y 93, respectivamente. El inverso de los títulos de IgG se representa en **D**, **E** y **F** para los días 56, 70 y 93, respectivamente. Letras diferentes indican significación estadística según la prueba de la U de Mann-Whitney ( $P < 0.05$ ). La respuesta de anticuerpos IgG correlacionó negativamente con la capacidad de desarrollar tumor (día 56,  $r = -0.577$ ,  $P = 0.002$ ; día 70,  $r = -0.676$ ,  $P = 0.000$ ; día 93,  $r = -0.587$ ,  $P = 0.002$ , por la prueba de correlación de Spearman). Los datos mostrados son los resultados de dos experimentos independientes.

#### *4.5.2 El suero post-inmune de ratones que rechazaron el tumor lisa células de melanoma B16 mediante citotoxicidad dependiente de complemento autólogo*

La función efectora de los anticuerpos específicos por el GM3 en el suero de los ratones vacunados que rechazaron o desarrollaron tumor se evaluó midiendo la capacidad de lisar células de B16 en presencia del complemento autólogo. En este experimento, las células de B16F10 se incubaron con los sueros del día cero y del día 70 (una semana después de la inoculación del tumor), y el porcentaje de células muertas se determinó por citometría de flujo mediante la incorporación de yoduro de propidio. El porcentaje de lisis se calculó respecto al total de células adquiridas. Como se muestra en la figura 12A, cinco de los siete ratones que habían rechazado el tumor (grupo 1), mostraron un incremento por encima del 10% de la lisis del suero post-inmune comparado con el día pre-inmune. Por otra parte, en los ratones vacunados que no rechazaron el tumor (grupo 2), sólo en uno de cinco ratones la diferencia entre la lisis del suero del día cero y el día post-inmune fue mayor del diez por ciento. Para todos los ratones la lisis del suero del día cero osciló entre un ocho y un 22% y fue similar al porcentaje de células muertas espontáneamente durante el experimento.

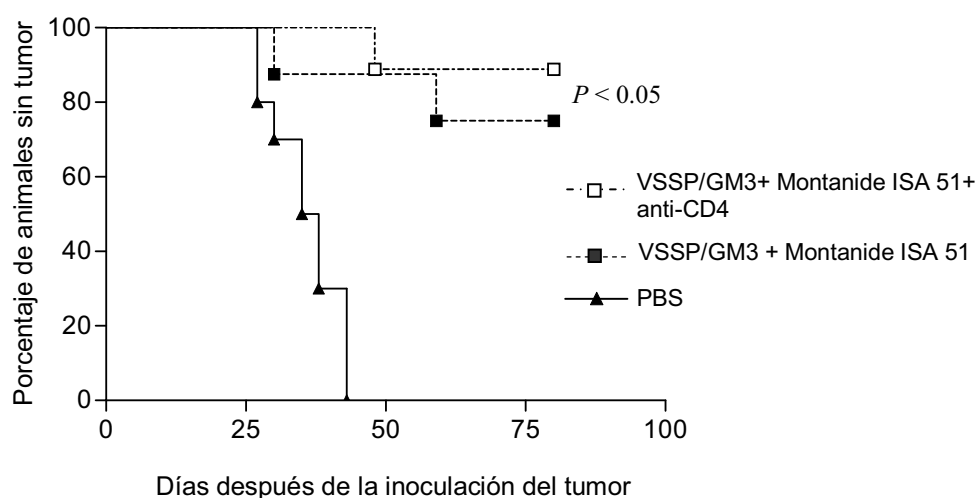


**Figura 12. Citotoxicidad sobre el melanoma B16 de los sueros de los ratones inmunizados e inoculados con el tumor.** Los ratones se inmunizaron con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51, cuatro dosis cada 14 días por vía intramuscular, y se inocularon con el melanoma B16F10 ( $10^4$  células) a los 21 días de la última inmunización. Los sueros del día pre-inmune y del día 70 de los ratones vacunados, se incubaron con células de melanoma B16F10 durante 4 h. La citólisis de las células tumorales se midió a través de la incorporación de yoduro de propidio en las células muertas. En (A) se representa el incremento del porcentaje de lisis inducida por el suero del día 70 después de restar el porcentaje de lisis del día cero. El grupo 1 (barras con rayas) incluyó siete ratones vacunados que rechazaron el tumor. El grupo 2 (barras con puntos) incluyó cinco ratones vacunados que no rechazaron el tumor. En (B) se representa el porcentaje de células de melanoma B16F10 vivas y muertas después de incubarlas con los sueros de un ratón representativo del grupo 1. Las células se marcaron con yoduro de propidio; las de alta intensidad de fluorescencia son las células muertas, mientras que las de baja son las células vivas. Los gráficos mostrados son representativos de un experimento repetido dos veces.

#### 4.5.3 La actividad antitumoral del VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 no depende de las células T CD4+ en la fase de inducción de la respuesta inmune

Con el propósito de estudiar el papel de las células T CD4+ en la fase inductora de la respuesta antitumoral, se eliminó dicha población mediante la administración intraperitoneal de 1 mg de proteínas totales semi-purificadas del sobrenadante de la línea YTS 191 que contenían un AcM, con actividad fijadora de complemento específico por la molécula CD4. Los ratones (diez por grupo) se inmunizaron con cuatro dosis (120  $\mu$ g/dosis) de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 cada 14 días, por vía intramuscular, y a los 21 días de la última inmunización se inocularon con  $10^4$  células de melanoma B16F10. Un grupo independiente de ocho ratones, recibió igual tratamiento que el anterior y además se inyectaron con 1 mg de proteínas que contenían el AcM, comenzando tres días antes de la primera inmunización y durante todo este período, cada tres días, hasta la última

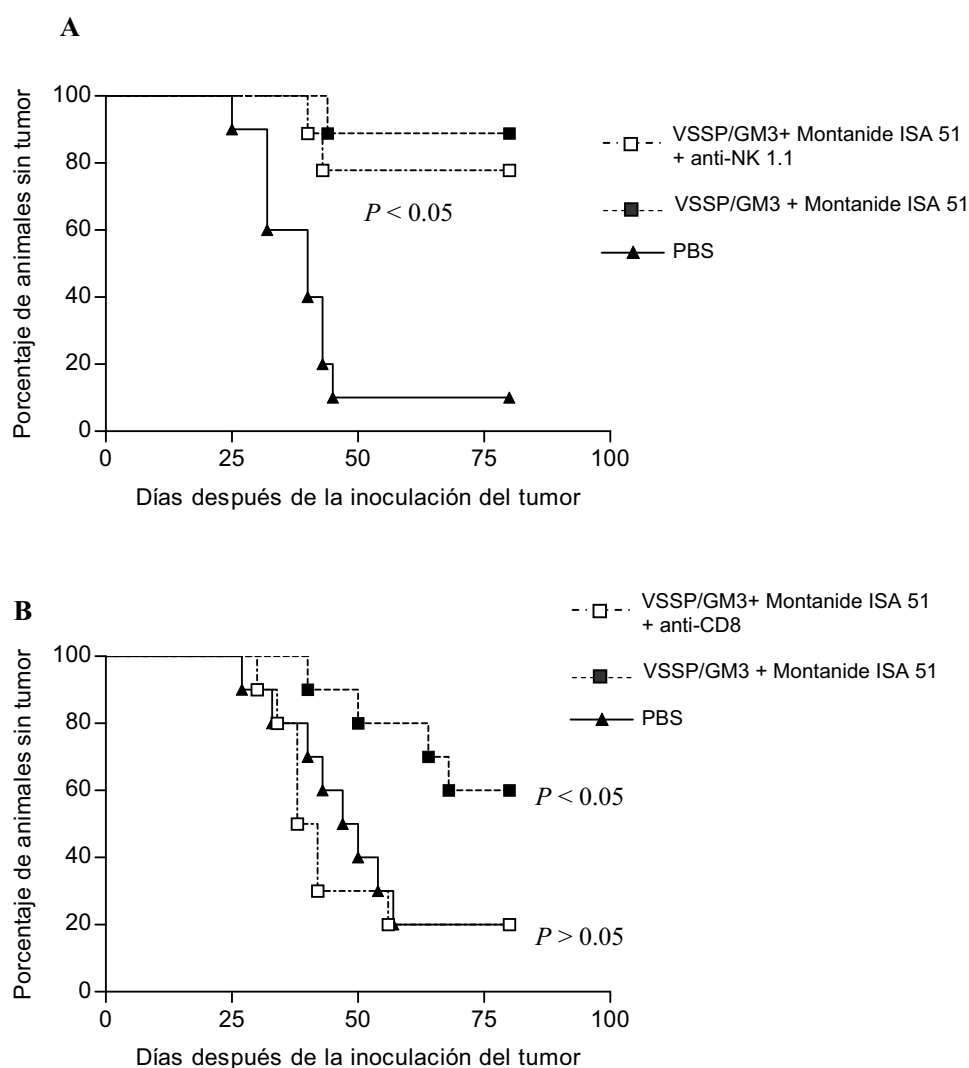
vacunación (ver Anexo 5). Como se muestra en la figura 13, la eliminación de la población T CD4<sup>+</sup> durante la fase de inducción de la respuesta inmune no tuvo impacto en la sobrevivencia de los animales inmunizados. De aquí se concluye que esta población linfocitaria no es necesaria para la inducción de la respuesta antitumoral, al menos durante el tiempo que duran las vacunaciones. Es conocido que el tratamiento con un AcM específico a CD4 no sólo elimina las células T colaboradoras sino también las células T reguladoras, lo que puede favorecer la respuesta antitumoral natural en ratones inoculados con un tumor que no han recibido tratamiento. Para descartar el efecto inespecífico de este anticuerpo sobre los ratones C57BL/6, grupos de diez ratones inyectados con PBS se trataron con el AcM anti-CD4 usando el mismo esquema del grupo inmunizado con la formulación vacunal. Los resultados obtenidos fueron iguales al control sin tratar con el AcM (resultados no mostrados), lo que nos demuestra que la eliminación de esta población celular, al menos usando este esquema de tratamiento, no influye en la respuesta inmune antitumoral natural contra el melanoma B16.



**Figura 13. Influencia de las células T CD4<sup>+</sup> en la actividad antitumoral del candidato vacunal VSSP/GM3 + Montanide ISA 51.** Grupos independientes de diez ratones C57BL/6 se inmunizaron cuatro veces con 120 µg de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 cada 14 días, por vía intramuscular. En uno de los grupos vacunados (ocho ratones) se eliminaron las células T CD4<sup>+</sup>, mediante 1 mg de la solución de proteínas que contenía el AcM específico por el CD4, el cual se administró por vía intraperitoneal, cada tres días, durante el período de inmunización. A los 21 días de la última vacunación, los ratones se inocularon con 10<sup>4</sup> células de B16F10. El grupo control recibió el mismo esquema de tratamiento, pero en lugar del preparado vacunal se les administró PBS. Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron a través de la prueba de Log-Rank. Las sobrevivencias de los ratones del grupo vacunado y del vacunado y tratado con el anticuerpo anti-CD4 fue significativamente mayor que la del grupo de PBS ( $P < 0.05$ ). Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos realizados de forma independiente.

#### 4.5.4 *La actividad antitumoral del preparado VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 depende de células T CD8+ y no de células NK durante la fase efectora de la respuesta inmune*

Para estudiar las poblaciones linfocitarias que estaban involucradas en la fase efectora de la respuesta antitumoral, grupos de diez ratones se inmunizaron con cuatro dosis (120 µg/dosis) de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 cada 14 días, por vía intramuscular, y se inocularon con  $10^4$  células de B16F10 a los 21 días de la última inmunización. La administración de los AcM semi-purificados anti-CD8 ó anti-NK1.1 del sobrenadante de las líneas YTS169 o PK136, respectivamente, que eliminaban las poblaciones T CD8+ ó NK, se realizó un día antes de la inoculación del tumor y siete y 14 días después del reto tumoral, por vía intraperitoneal. Como se observa en la figura 14B, la administración del AcM anti-CD8 eliminó la actividad antitumoral del inmunógeno ya que el porcentaje de animales sin tumor en este grupo no fue diferente al grupo control ( $P > 0.05$ , por la prueba de Log-Rank). En contraste con este resultado, la eliminación de la población NK no tuvo impacto sobre el efecto antitumoral del inmunógeno (Figura 14A). En ambos casos se pudo ponderar el efecto inespecífico de la eliminación de estas poblaciones, mediante estos anticuerpos, en ratones tratados solamente con PBS e inoculados con el tumor. La sobrevida de los ratones de estos grupos fue similar a la del control de PBS sin tratar con dichos anticuerpos. Este hallazgo, es interesante para el caso de los ratones del grupo control tratados con anti-NK1.1 puesto que la población NK es conocida por su importante papel en la respuesta antitumoral innata. En nuestro modelo del melanoma B16 los resultados indican que la población NK no está involucrada la inmunidad natural contra este tumor.

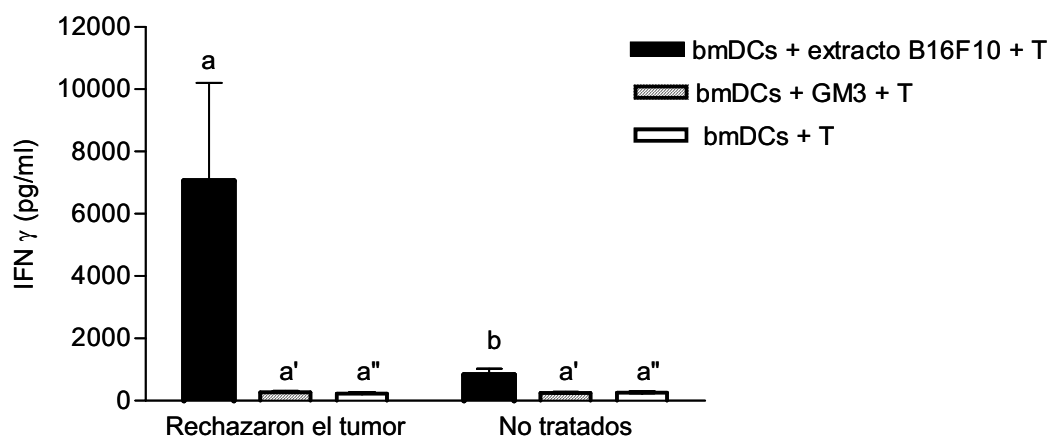


**Figura 14. Influencia de las células CD8+ y NK en la actividad antitumoral del candidato vacunal VSSP/GM3 + Montanide ISA 51.** Grupos independientes de diez ratones C57BL/6 se inmunizaron cuatro veces por vía intramuscular con 120 µg de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51, cada 14 días. A los 21 días de la última inmunización, se inocularon con  $10^4$  células de melanoma B16F10. En dos de los grupos vacunados, los ratones se trataron con 1 mg de proteínas semi-purificadas que contenían los anticuerpos específicos por NK1.1 ó CD8. El tratamiento se realizó durante la fase efectora de la respuesta inmune, comenzando un día antes de la inoculación del tumor y administrando las dos dosis siguientes a la semana y a los 14 días del reto tumoral. Se representa la influencia de las células NK (**A**) y T CD8+ (**B**) en la actividad antitumoral del candidato vacunal durante la fase efectora de la respuesta inmune. Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron a través de la prueba de Log-Rank. La supervivencia del grupo vacunado que recibió el anticuerpo específico por NK1.1 fue similar a la del grupo vacunado y significativamente mayor que la del grupo control ( $P < 0.05$ ). En el caso del grupo que recibió el anticuerpo específico por CD8, la supervivencia no fue diferente a la del control ( $P > 0.05$ ). Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos realizados de forma independiente en el caso de la eliminación de las células CD8+ y de dos en el caso de las células NK.



#### 4.5.5 *Las células T de ratones inmunizados que rechazaron el tumor reconocen antígenos de melanoma B16 presentados por las bmDCs*

Debido al papel de las células T en la fase efectora de la respuesta inmune antitumoral, se decidió evaluar si estas células eran capaces de secretar IFN $\gamma$  en presencia de determinados estímulos. Para ello, a las ocho semanas de la inoculación del tumor las células del bazo de los ratones C57BL/6 vacunados, que habían rechazado el tumor, se purificaron y se enfrentaron a los siguientes estímulos: bmDCs pulsadas con extractos de células de B16F10; bmDCs pulsadas con el gangliósido GM3 (10  $\mu$ g/ml) y bmDCs sin estímulo. Como control se usaron células de ratones no tratados que se purificaron y estimularon en las mismas condiciones anteriores. Como se observa en la figura 15, las células T de ratones vacunados que habían rechazado el tumor fueron capaces de secretar IFN $\gamma$  en presencia de bmDCs pulsadas con extractos de melanoma B16F10. Estos valores fueron significativamente mayores ( $P < 0.05$ , por la prueba de la U de Mann Whitney) que los obtenidos para los linfocitos T de ratones no tratados en presencia de este estímulo. Por otra parte, bmDCs cargadas con el gangliósido de la preparación vacunal no fueron capaces de estimular células T. Las células T enfrentadas a bmDCs sin estímulos no secretaron IFN $\gamma$  (Figura 15).

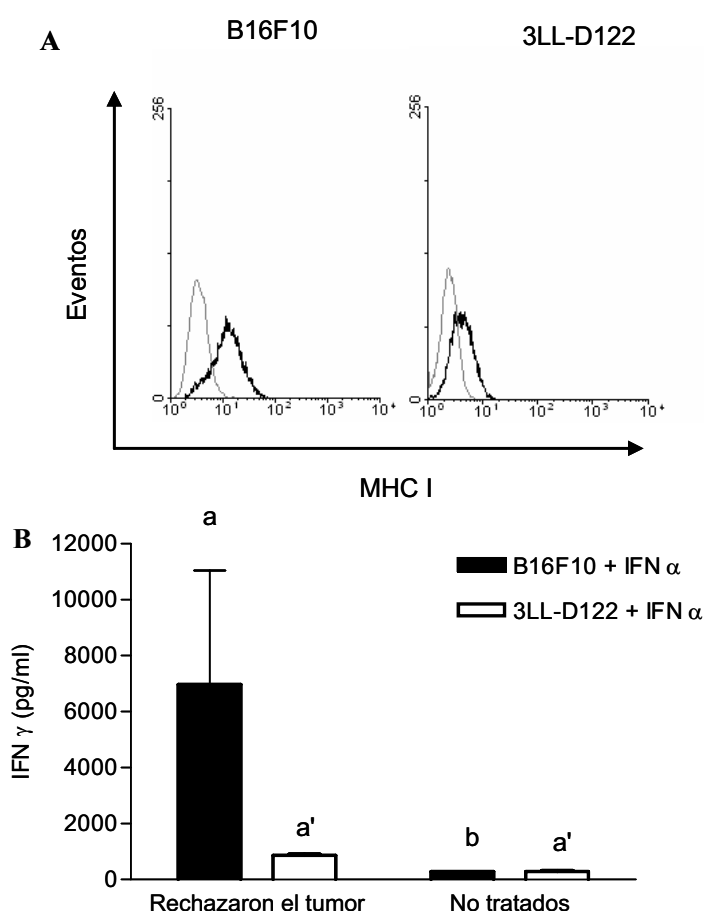


**Figura 15. Reconocimiento de antígenos de la línea de melanoma B16F10 por células T de ratones C57BL/6 vacunados que rechazaron el tumor.** Las células T del bazo de ratones C57BL/6 inmunizados con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 y que rechazaron el trasplante de células de B16F10, se purificaron usando el sistema de perlas magnéticas a las ocho semanas de la inoculación del tumor. Los linfocitos T se estimularon con bmDCs pulsadas con extracto de células de melanoma B16F10 ó el gangliósido GM3. Como control del experimento, las células T se estimularon con bmDCs solas. Después de 96 h de incubación, el sobrenadante de cultivo se colectó y se determinó la liberación de IFNγ mediante un ELISA. En el gráfico se representa la media  $\pm$  desviación estándar de la concentración de IFNγ para cinco ratones que rechazaron el tumor y tres ratones no tratados. Letras diferentes indican significación estadística según la prueba de la U de Mann Whitney ( $P < 0.05$ ). Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos realizados de forma independiente.

#### 4.5.6 Las células T de ratones inmunizados que rechazaron el tumor reconocen específicamente las células de B16 previamente tratadas con IFNα

Es conocido que el melanoma B16 en cualquiera de sus variantes tiene baja expresión de MHC I (226). Esta expresión aumenta cuando se tratan las células con IFNα (227). Para evaluar si los linfocitos T eran capaces de reconocer células de B16F10, ocho semanas después de inocular el tumor se purificaron los linfocitos T de ratones que habían rechazado el inóculo y se enfrentaron a células de B16 irradiadas, previamente tratadas o no con IFNα. La secreción de IFNγ se midió en el sobrenadante de cultivo 96 h después. Como control de la especificidad de la respuesta se usó la línea de pulmón 3LL- D122 tratada también con IFNα. Ambas líneas aumentaron la expresión de MHC I respecto a la línea no tratada (Figura 16A). Como se muestra en la figura 16B, la secreción de IFNγ fue significativamente mayor para las células T de los ratones que rechazaron el tumor cuando se enfrentaron a células de B16F10 previamente tratadas con IFNα, comparado con las células T de ratones no tratados ( $P < 0.05$ , por la prueba de la U de Mann Whitney). En las

mismas condiciones no hubo reconocimiento de la línea 3LL-D122. Por otra parte, ambas líneas sin tratar con IFN $\alpha$  no fueron reconocidas por las células T (resultados no mostrados). Estos datos sugieren que en animales vacunados con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 que rechazan el reto tumoral, se expanden células T que secretan IFN $\gamma$ . Estos linfocitos reconocen específicamente al melanoma B16 con alta expresión de moléculas MHC clase I.



**Figura 16. Reconocimiento de las células tumorales por células T de ratones inmunizados que rechazaron el tumor.** Las células T del bazo de ratones C57BL/6 inmunizados con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 y que rechazaron el trasplante del melanoma B16F10, se purificaron usando el sistema de perlas magnéticas a las ocho semanas de la inoculación del tumor. Como control del experimento se purificaron también las células T de ratones C57BL/6 no tratados. Los linfocitos T se estimularon con células tumorales de B16F10 o una línea irrelevante (el carcinoma de pulmón 3LL-D122), irradiadas y tratadas con IFN $\alpha$ . Después de 96 h de incubación, el sobrenadante de cultivo se colectó y se determinó la liberación de IFN $\gamma$  mediante un ELISA. **(A)** El histograma muestra el aumento de la expresión de MHC I en células de B16F10 ó 3LL-D122 tratadas 16 h antes con 1000 U/ml de IFN $\alpha$  (línea oscura), o con un anticuerpo control (línea clara). **(B)** Cada barra representa la media  $\pm$  desviación estándar de la concentración de IFN $\gamma$  para cinco ratones que rechazaron el tumor y tres ratones no tratados. Letras diferentes indican significación estadística según la prueba de la U de Mann Whitney ( $P < 0.05$ ). En el gráfico se muestran los resultados de un experimento representativo de tres realizados de forma independiente.

## 5. DISCUSIÓN

El melanoma maligno es una neoplasia relativamente común, cuya incidencia en el mundo se ha incrementado más rápido que cualquier otro tipo de cáncer, a una proporción de aproximadamente cinco por ciento por año (1, 2). Esta neoplasia es una de las mejor estudiadas en el campo de la inmunología tumoral y en la cual casi todas las estrategias de inmunoterapia han sido probadas con muy pocos efectos clínicos (127-129). En este sentido, un significativo número de ensayos clínicos en melanoma han incluido pacientes en estado avanzado de la enfermedad, en los cuales la inmunosupresión inducida por los tumores interfiere significativamente con la inducción de respuesta inmune contra el tumor (228). La inmunoterapia en enfermedad residual mínima se ha convertido en una estrategia atractiva para pacientes con alto riesgo de recurrencia de la enfermedad, como son los pacientes de melanoma estadio II. La reducción del tumor con cirugía u otras terapias convencionales antes o durante la administración de las vacunas, podría incrementar el beneficio terapéutico. Por otra parte, recientemente se aprobó el uso de una vacuna preventiva contra la infección del HPV, una de las causas fundamentales del carcinoma de cerviz. Las vacunas preventivas contra tumores sólidos están en fase de desarrollo (30). En el caso del melanoma, una vacuna de este tipo pudiera proteger a la población de alto riesgo genético del desarrollo de este tipo de neoplasia.

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos de gran variabilidad, que se expresan en las membranas plasmáticas de las células de vertebrados. Estas moléculas se expresan también en las células tumorales, en las cuales se incrementa significativamente su síntesis en comparación con el tejido normal (229). Las vacunas basadas en gangliósidos han sido probadas en diferentes tipos de cáncer, principalmente en el melanoma, teniendo en cuenta que la expresión alterada de estas moléculas en las células tumorales correlaciona con su potencial metastásico (230, 231). Particularmente, el gangliósido GM3, uno de los menos inmunogénicos por su abundancia en células de tejidos normales, se sobreexpresa tanto en melanomas murinos como humanos, y además es uno de los más estudiados en cuanto a sus propiedades supresoras sobre las células del sistema inmune (194, 232). Estos hallazgos lo convierten en un blanco importante para las terapias específicas contra el melanoma. El estudio en los modelos preclínicos constituye un predictor de la posible eficacia de estos tratamientos en el escenario clínico.

En trabajos anteriores, se han usado diferentes estrategias para inducir respuesta antitumoral contra el melanoma. Entre ellas se encuentran las vacunas celulares de melanoma murino B16 ó humano, los cuales tienen alta expresión de GM3 (12, 13). Con estos inmunógenos se ha demostrado la inducción de respuesta de anticuerpos IgM específica contra el GM3, así como reducción del crecimiento tumoral y rechazo del inóculo en menos del 40 por ciento de los ratones. En el caso de las vacunas moleculares, algunas estrategias para revertir la tolerancia al GM3 han fallado en los modelos preclínicos (195).

En nuestro trabajo se usó un nuevo inmunógeno contra el melanoma murino, en el cual se combinaron las VME de *Neisseria meningitidis* de conocidas propiedades inmunoestimuladoras, con el gangliósido GM3, rindiendo proteoliposomas de muy pequeña talla en los que está insertado el GM3 (VSSP/GM3). En experimentos *in vitro* se ha demostrado que los VSSP tienen la capacidad de activar DCs humanas y murinas, promover la secreción de citocinas inflamatorias, así como activar CTL específicos contra antígenos foráneos (33, 233). Los resultados obtenidos demostraron que la formulación VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 era inmunogénica en ratones, lo cual se midió por su capacidad de inducir altos títulos de anticuerpos IgG e IgM específicos por el GM3 en ratones C57BL/6 y BALB/c. La alta especificidad de estos anticuerpos se probó por HPTLC, y además se demostró, a través de citometría de flujo, que eran capaces de reconocer al melanoma B16. Este resultado fue obtenido también por el grupo de Alonso y cols. En este caso el suero de los ratones inmunizados con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 reconoció las células de melanoma B16 tanto por citometría de flujo como por inmunohistoquímica (234)

En cuanto a la actividad antitumoral de este candidato vacunal, se demostró que su administración preventiva a ratones C57BL/6 les confirió protección contra el trasplante de células de melanoma B16. En el conjunto de experimentos realizados se obtuvo que entre un 60 y un 90 por ciento de estos animales nunca desarrollaron tumor. Este resultado fue superior al obtenido con las vacunas celulares usadas contra el B16 también en el escenario profiláctico (12, 13).

Un componente importante en las formulaciones vacunales es el uso de adyuvantes oleosos efectivos. El adyuvante Montanide ISA 51 ha sido usado con éxito en vacunas probadas en ensayos clínicos (235, 236). Como otros adyuvantes oleosos, tiene como mecanismo de acción el mantenimiento prolongado del antígeno en el sitio de la inyección. Esto permite el contacto del antígeno con las APC y las células efectoras y el inicio de la respuesta inmune, lo cual es crucial para la inmunización por vía intramuscular en la cual hay menos acceso a las APC. En nuestro sistema, el uso del Montanide ISA 51 en la formulación administrada por vía intramuscular fue crucial para la inducción de anticuerpos específicos por el GM3 y para la actividad antitumoral del inmunógeno, lo que se muestra en los experimentos en los cuales no se obtuvo actividad antitumoral cuando el VSSP/GM3 se administró sin adyuvante oleoso.

Otro parámetro de interés a tener en cuenta en la optimización de un preparado inmunogénico es el esquema de inmunización. Sin embargo, en el caso de las vacunas de cáncer, tanto el número de dosis empleadas como la frecuencia de vacunación han sido parámetros establecidos de manera empírica y se dificulta encontrar en la literatura un esquema óptimo de inmunización, basado en los mecanismos inductores de respuesta inmune efectiva, para cada tipo de vacuna y tumor (43). Los estudios provenientes de las enfermedades infecciosas han sugerido que, en algunos casos, altas dosis de vacunas de proteínas recombinantes están asociadas a una robusta respuesta antígeno-específica y a un aumento en la frecuencia de respondedores (237). Los resultados obtenidos en nuestros experimentos demostraron que al menos tres dosis del inmunógeno eran necesarias para inducir un efecto antitumoral sobre el B16. En este caso, se ha observado que la respuesta de anticuerpos específicos por el GM3, principalmente de isotipo IgG, se induce a partir de la tercera dosis del VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 en ratones C57BL/6 inmunizados cada 14 días. Este hecho sugiere que la respuesta de anticuerpos forma parte del mecanismo antitumoral de este inmunógeno y que son necesarias al menos tres dosis del inmunógeno para inducir una respuesta humoral efectiva.

La frecuencia de administración de un inmunógeno puede determinar su eficacia en inducir una respuesta inmune. En nuestro caso, la administración del VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 cada 14 días fue efectiva sin embargo, la inmunización semanal no tuvo impacto en la supervivencia de los animales inmunizados respecto al control. En experimentos en los

cuales se estudió la respuesta de anticuerpos contra GM3 cuando el inmunógeno se administraba cada siete días, se demostró que este esquema de inmunización no inducía inmunoglobulinas de isotipo IgG (manuscrito en preparación). Este fenómeno puede ser explicado a través de algunos hallazgos publicados en la literatura. Se ha demostrado que la persistencia del antígeno debido a una infección crónica o a la administración frecuente del mismo puede inducir al agotamiento de la respuesta de células T, las cuales expresan moléculas co-inhibidoras como el PD-1 y el CTLA-4 y no responden adecuadamente frente a determinados estímulos (238, 239). Este fenómeno, aunque menos estudiado para las células B, pudiera ser una de las causas de la importancia del esquema de vacunación para inducir una respuesta de anticuerpos específicos, los cuales pueden ser cruciales para la respuesta antitumoral.

Teniendo en cuenta estos resultados, el mejor esquema de vacunación preventiva ensayado para obtener una respuesta antitumoral fue la administración de cuatro dosis de 120 µg de VSSP/GM3 + Montanide cada 14 días, por vía intramuscular, con la inoculación del tumor 21 días después de la última inmunización.

La presencia del GM3 en la preparación fue imprescindible para ejercer su efecto antitumoral sobre un tumor que expresa este gangliósido como mayoritario. El cambio de este gangliósido por su variante *N*-glicolilada, fue suficiente para eliminar la actividad antitumoral sobre el B16. Esto sugiere una alta dependencia de la respuesta inmune específica por el GM3 en la protección antitumoral. Otros resultados obtenidos por el grupo de Gabri y cols., confirman este hallazgo. En estos experimentos se inmunizaron ratones C57BL/6 con el VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 usando el esquema óptimo de inducción de actividad antitumoral, y se les inoculó el carcinoma mamario F3II. Este tumor no contiene GM3, ni es reconocido por el suero de los ratones con anticuerpos específicos por el GM3 inducidos por la vacunación con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51, como se demostró por citometría de flujo y por inmunohistoquímica (225). En este caso, la formulación vacunal no fue efectiva.

Estudios en la literatura demuestran que la intensidad de la respuesta inmune a una vacuna correlaciona con su actividad antitumoral (240). Particularmente, en las vacunas basadas en gangliósidos, el papel de los anticuerpos ha sido predominante en su actividad

antitumoral. Se ha informado de un mejor pronóstico en pacientes de melanoma con anticuerpos contra NGcGM3 después de la vacunación con un oncolisado de células de melanoma (208). Por otra parte, los trabajos de Livingston y cols. han mostrado que pacientes de melanoma estadio III que desarrollan anticuerpos naturales o inducidos por la vacunación contra el GM2 tienen un incremento en el intervalo de tiempo libre de enfermedad y en la sobrevida (209). Entre las propiedades funcionales de los anticuerpos antigangliósidos está su capacidad de mediar la CDC en células positivas al antígeno. En este sentido, Hsueh y cols. han descrito una correlación significativa entre el intervalo libre de enfermedad y la propiedad del suero de promover la CDC en pacientes de melanoma estadio III vacunados con Canvaxin como terapia adyuvante (210). En numerosos ensayos clínicos con vacunas que contienen gangliósidos, se ha visto la inducción de CDC *in vitro* contra células tumorales que expresan el antígeno (199, 200, 241). En nuestro trabajo, esta propiedad de los anticuerpos antigangliósidos se estudió en ratones BALB/c inmunizados con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51, experimentos en los cuales se usó complemento heterólogo, y en ratones C57BL/6 inmunizados con la misma formulación vacunal e inoculados con el melanoma B16. En estos últimos ensayos, el suero se enfrentó a las células tumorales en presencia de complemento autólogo. En el caso de los ratones BALB/c, los sueros de todos los animales fueron citotóxicos sobre las células tumorales de manera dependiente del complemento de conejo. Sin embargo, en ratones C57BL/6, la citotoxicidad dependiente de complemento autólogo se detectó, con mayor frecuencia en ratones con anticuerpos anti-GM3 que habían rechazado el tumor, en comparación con el grupo que no lo rechazó. Este último hallazgo, aunque debe ser corroborado en un mayor número de muestras, es importante en el mecanismo efector del inmunógeno, puesto que algunos tumores tienen mecanismos de escape que incluyen la expresión de factores inhibidores del complemento autólogo como son el DAF (factor activante de apagamiento, del inglés "decay activating factor") el cual interfiere en el ensamblaje de C3, y el CD59 que inhibe la formación del complejo de ataque a membrana (242-244), lo que resulta en la ineffectividad del complemento autólogo y por tanto de los anticuerpos específicos por los antígenos tumorales para eliminar las células que los expresan.

Existe correlación entre el isotipo de los anticuerpos antigangliósidos inducidos por la vacunación y la actividad antitumoral del inmunógeno. En trabajos publicados por



Ravindranath y cols. (12), se mostró una asociación entre la inducción de anticuerpos IgM específicos por el GM3 y un aumento en la supervivencia de los ratones. En este caso, el mecanismo por el cual esta inmunoglobulina es efectiva, reside en su capacidad para neutralizar el GM3, y eliminar su efecto supresor sobre células claves del sistema inmune. En otro estudio sobre el papel de los anticuerpos antigangliósidos de isotipo IgM, Kawashima y cols. demostraron que ratones transgénicos para anticuerpos IgM específicos por el gangliósido GD2 eran capaces de inhibir el crecimiento de la línea tumoral de linfoma T EL-4, que expresa el GD2 (212). Recientemente, se ha visto que la administración de un anticuerpo IgM humano contra GM3 a pacientes de melanoma es capaz de inducir respuestas clínicas completas sin toxicidad significativa (211). En contraste con estos resultados, en nuestro modelo se obtuvo, que la respuesta de IgG contra GM3 correlacionaba negativamente con la propiedad de desarrollar el tumor. Los anticuerpos de isotipo IgG son moléculas de mayor afinidad por los antígenos y además en el caso de las IgG3, típica de la respuesta contra carbohidratos y predominante en la respuesta humoral inducida por el VSSP/GM3 + Montanide ISA 51, son capaces de lisar células tumorales mediante CDC (16) y ADCC (245). Por otra parte, nuestros resultados mostraron que la protección contra el melanoma se mantenía durante tres meses lo que puede considerarse un tiempo prolongado si se tiene en cuenta la vida media de un ratón. Aunque no se ha estudiado el mecanismo por el cual se mantiene la protección antitumoral durante este tiempo, la disminución de los títulos de IgG después de inoculado el tumor que se observa en nuestros experimentos, podría justificar la pérdida de protección a los tres meses. Experimentos que estudien la respuesta de anticuerpos durante un tiempo mayor después de inoculado el tumor podrían confirmar esta hipótesis.

Debido al gran potencial que tiene la respuesta celular para erradicar células tumorales, una gran cantidad de estudios clínicos y preclínicos están enfocados a la inducción de respuesta celular contra el tumor, la cual incluye la generación de células NK y CTL altamente específicos. De hecho, se ha publicado recientemente que la infiltración de células CD3 en tumores de colon correlaciona positivamente con la supervivencia de los pacientes (246). En el caso de los gangliósidos, se han detectado células T específicas por estas moléculas, las cuales se presentan en moléculas de presentación no clásica pertenecientes a la familia del CD1. Estas células se han encontrado en donantes sanos y

pacientes de esclerosis múltiple (17). Por otra parte, Chapman y cols. han demostrado, recientemente, que ratones inmunizados con melanoma humano que expresaba el GD3 desarrollaron una respuesta de células NKT restringidas a CD1d y específicas por este gangliósido. En estos estudios se demostró además que el GD3 era presentado de forma cruzada por las APC murinas (18). No hay trabajos precedentes sobre la dependencia de las células T para la actividad antitumoral de vacunas compuestas por gangliósidos. Mediante experimentos de eliminación de poblaciones celulares hemos encontrado, por primera vez, que la actividad antitumoral del VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 depende de células T CD8+. Este hallazgo rompe con el paradigma de que el mecanismo por el cual actúan las vacunas basadas en gangliósidos es fundamentalmente a través de la inducción de anticuerpos, y que los inmunógenos basados en este tipo de moléculas no son capaces de inducir una respuesta celular efectiva. Un resultado interesante fue que la actividad antitumoral de nuestro preparado no dependía de la presencia de células T CD4+ en la fase de inducción de la respuesta inmune. El papel de las células T CD8+ y T CD4+ en la respuesta antitumoral contra el melanoma murino B16 es un tema controvertido y depende del tipo de terapia. En experimentos en los cuales se han usado como terapia del B16 en el contexto profiláctico, DCs cargadas ya sea con células de melanoma apoptóticas o sometidas a "estrés" (tratadas con irradiación  $\gamma$  y choque térmico), inducen protección dependiente tanto de células T CD4+ como T CD8+ (79, 247). En estos y otros trabajos se ha enfatizado en el importante papel de las células Th en la generación de una efectiva respuesta CTL. Estas células tienen la función de cooperar con las células T CD8+ en el ganglio linfático, permitiendo la infiltración de los CTL en el tumor (248), la secreción de factores como el IFN $\gamma$  que contribuyen directamente a la resistencia directa contra el tumor (36, 249, 250), e incluso la movilización de otras células efectoras. También se ha demostrado su importante papel en la cooperación con linfocitos B para la secreción de anticuerpos (251). En contraste con estos resultados, existen trabajos publicados por el grupo de Allison y cols. en los cuales se demuestra que las células T CD4+ no se requieren para la terapia exitosa del B16 (252, 253). Este es el caso del uso de la terapia combinada de un anticuerpo monoclonal contra la molécula supresora CTLA-4 y células de melanoma B16 que se han modificado genéticamente para secretar GM-CSF. Los autores de estos trabajos plantean que el bloqueo de la interacción CTLA-4/B7 mediante un

anticuerpo monoclonal disminuye los niveles de coestimulación requeridos para la activación de células T CD8+ vírgenes. En este caso ocurre una activación y expansión de los linfocitos T CD8+ por las DCs que no han sido condicionadas por las células T CD4+ activadas (254).

A pesar que las células T CD4+ no parecen ser importantes en la inducción de la respuesta inmune antitumoral, las inmunoglobulinas de isotipo IgG juegan un importante papel en la efectividad del candidato vacunal. Una posible explicación para este resultado es que la activación de células B para la secreción de IgG pudiera depender de otras células como las NK, puesto que se ha publicado que las NK y las NKT pueden activar células B independientemente de las células T CD4+ (255-257). Por otra parte, algunos resultados obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que las células encargadas de la secreción de anticuerpos contra gangliósidos son los linfocitos B1. Se ha publicado que estas células son las responsables de secretar los anticuerpos naturales y no necesitan de la cooperación de linfocitos T CD4+ para inducir respuesta de inmunoglobulinas de isotipo IgG (258). Además, Ravindranath y cols., han sugerido que las células B1 secretan IgM contra gangliósidos en enfermedades neuronales (259). En experimentos realizados por nuestro grupo, se obtuvo que la inmunización de ratones XID (ratones deficientes en células B1) con el GM3 insertado en liposomas y adyuvados con monofosforil lípido A no indujo anticuerpos IgG específicos por el gangliósido. Sin embargo, en ratones de la misma base genética (BALB/c) pero con el sistema inmune intacto, la vacunación con el inmunógeno producía IgG contra GM3 en la mayoría de los ratones (manuscrito en preparación). Estos hallazgos sugieren la participación de estas células en la respuesta de anticuerpos contra gangliósidos, lo que pudiera ser confirmado en experimentos de inmunización con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 de ratones deficientes en esta población celular.

En cuanto a la especificidad de las células T de ratones que habían rechazado el tumor, se encontró que dichas células eran capaces de reconocer DCs cargadas con extracto de células de B16. En otros trabajos se ha publicado que la inmunización de ratones con DCs cargadas con células de B16 apoptóticas, genera células T específicas por péptidos de B16, específicamente por el Trp2 (247, 251). En nuestro caso no encontramos células T específicas por el GM3 presente en nuestro inmunógeno. Esto pudiera estar dado por la baja frecuencia de estas células, no detectables en nuestro sistema de ELISA, o a que la

vacunación produce otras especificidades diferentes al gangliósido, lo que quedaría por determinar en futuros experimentos. Este hallazgo pudiera sugerir que el candidato vacunal induce una diversificación de la respuesta inmune contra otros antígenos presentes en las células tumorales. Por otra parte, estas células T secretaron IFN $\gamma$  cuando se cultivaron con células de B16 irradiadas y tratadas con IFN $\alpha$ , y esta respuesta fue específica por el melanoma B16. Está publicado que bajas dosis de IFN $\alpha$  aumentan los niveles de expresión de moléculas MHC clase I (260), lo que se comprobó en nuestro sistema. Es posible que *in vivo* la inmunización induzca la secreción de interferones tipo I que aumenten la expresión de MHC clase I en las células de B16 inoculadas, y estas puedan ser eliminadas por células T CD8 $^{+}$ , las cuales además pueden secretar IFN $\gamma$ . Esta citocina es indispensable en el mecanismo de las vacunas contra melanoma, como indican los experimentos realizados en ratones GEM que no secretan IFN $\gamma$  (261). Este hallazgo aporta otra evidencia a las ya publicadas sobre el éxito de combinar IFN $\alpha$  con vacunas (262, 263). Se ha visto que terapias específicas para melanoma donde se combina el IFN $\alpha$  con vacunas de extracto tumoral, han mostrado mejores resultados que las vacunas peptídicas. En este caso, el 64 por ciento de los pacientes con enfermedad metastásica mostraron estabilidad de la enfermedad durante 16 semanas (132). Otras poblaciones de células efectoras con actividad antitumoral son las células NK y las NKT. En el caso de las NK, se ha demostrado que pueden eliminar células tumorales en ausencia del reconocimiento específico de antígenos y la expansión clonal. En algunos modelos de terapia antitumoral usando la respuesta inmune contra gangliósidos, se ha involucrado a los linfocitos NK como células efectoras. Este es el caso de ratones transgénicos para anticuerpos IgM contra el GD2 inoculados con el tumor EL4, que expresa dicho gangliósido. En estos ratones se encontró un aumento de células NK activadas. Debido a este hallazgo, los autores especularon que las células NK pudieran ser activadas directamente por anticuerpos antigangliósidos o que dichos anticuerpos, al neutralizar el GD2 secretado por los tumores, pudieran revertir la supresión de las células NK (212). En otro modelo, en este caso de neuroblastoma, las NK son las mediadoras del efecto antitumoral cuando se tratan los animales con una proteína de fusión compuesta por un anticuerpo contra GD2 e IL-2 (264). Por otra parte, se ha informado que las células NKT desempeñan un importante papel en la respuesta contra tumores en el hígado de los

ratones, en el cual son el 30 por ciento de los linfocitos totales (265). En nuestro caso, el uso de un anticuerpo anti-NK1.1 que eliminó tanto la población NK como NKT durante la fase efectora de la respuesta inmune, no produjo ningún efecto sobre la actividad antitumoral del VSSP/GM3 + Montanide ISA 51, de lo que se infiere que estas células no están involucradas en la respuesta inmune efectora contra el tumor inducida por la formulación vacunal. Por otra parte, la eliminación de estas poblaciones en ratones tratados sólo con PBS e inoculados con el melanoma B16, no produjo ningún efecto sobre el crecimiento del tumor, lo que sugiere que estas poblaciones no son importantes en la respuesta inmune natural, al menos en su fase efectora, contra el melanoma murino.

El conjunto de resultados obtenidos en el escenario preventivo, sugieren que este candidato vacunal pudiera ser efectivo como profilaxis del melanoma en pacientes con alto riesgo de padecer la enfermedad, ya sea por su genotipo o por la presencia de lesiones premalignas.

En la literatura hay varios trabajos en los que se demuestra que los ratones con tumores experimentales, así como los pacientes de cáncer avanzado tienen una respuesta inmunológica poco potente (22). Se han identificado varios mecanismos mediante los cuales el tumor suprime la respuesta inmune. En el caso del melanoma tanto murino como humano se ha demostrado la presencia de células T reguladoras en el microambiente tumoral (266, 267), así como la disminución en la expresión de MHC clase I por parte del tumor (268). También se ha visto la secreción de citocinas supresoras como la IL-10 y ligandos solubles que inhiben la función citotóxica de las CTL (269, 270). Esta inmunosupresión ha contribuido al poco beneficio clínico observado en pacientes de cáncer en estadios avanzados tratados con inmunoterapia activa. En este sentido, dos vacunas en pacientes de melanoma han fracasado en ensayos clínicos fase III (19, 20). En nuestra experiencia con el VSSP/GM3 en melanoma, los resultados de un ensayo clínico fase I mostraron inmunogenicidad de este candidato vacunal en la mayoría de los pacientes, pero no hubo diferencias en cuanto a la sobrevida de los vacunados respecto al control (21). Como consecuencia de lo anterior, en los últimos años, la aplicación de las vacunas de cáncer se ha movido hacia pacientes con estadios menos avanzados de la enfermedad o con enfermedad residual mínima, los cuales tienen mejor respuesta a la vacunación (96, 97). En modelos preclínicos, se ha publicado que la eliminación del tumor

en combinación con una vacuna de células tumorales autólogas es efectiva en un modelo de neuroblastoma. En estos estudios se demostró que las células del bazo de ratones portadores de tumor no eran capaces de secretar IFN $\gamma$  cuando eran estimuladas con antígenos tumorales. Sin embargo, esta inhibición se abrogó después de la cirugía del tumor primario (271). Tomando en consideración estos hallazgos, en este trabajo se exploró la inmunización con VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 en combinación con la cirugía del tumor primario. En este escenario, se obtuvo que el cien por ciento de los ratones sometidos a cirugía e inmunizaciones con dicho candidato vacunal cada 14 días, rechazaron el tumor sin indicios de recurrencia local o metástasis pulmonares. Sin embargo, la administración semanal del inmunógeno en animales operados no tuvo impacto en la sobrevivencia de los ratones si se compara con el tratamiento quirúrgico solo. Este resultado corrobora el obtenido en el escenario preventivo con la inmunización semanal, lo que demuestra que el esquema de vacunación es importante para la inducción de una respuesta inmune antitumoral. Los mecanismos de acción del candidato vacunal en el escenario de enfermedad residual mínima serán estudiados en próximos experimentos. Una de las explicaciones posibles del éxito de combinar cirugía con inmunoterapia activa en este modelo, está en el hallazgo de que los ratones que portan el melanoma B16, muestran una disminución en la capacidad proliferativa de las células T CD4 $^{+}$  frente a antígenos foráneos, lo que constituye uno de los mecanismos que usa el tumor para evadir la respuesta inmune. La funcionabilidad de estas células, medida a través de la secreción de citocinas, se recupera completamente un mes después de eliminar el tumor primario (272), lo que sugiere que en la combinación de cirugía y vacunación se debe tener en cuenta el tiempo que demora el sistema inmune en recuperarse de la supresión inducida por el tumor. Los resultados obtenidos en nuestro modelo demuestran por primera vez el éxito de una inmunoterapia basada en gangliósidos en el escenario de enfermedad residual mínima, lo que representa un importante hallazgo para ser aplicado en el escenario clínico. En este sentido, los pacientes de melanoma estadio II tienen un alto riesgo de recurrencia de la enfermedad, al quedar presente micrometástasis que no son eliminadas por la cirugía del tumor primario. Aproximadamente el 60 por ciento de los pacientes sobreviven cinco años después de ser operados (123, 273). Además, la persistencia de la respuesta antitumoral obtenida en los estudios de inmunización realizados en el escenario

profiláctico, y presentados en este trabajo, indican que estos pacientes operados pudieran ser inmunizados cada tres meses con al menos tres dosis del inmunógeno, lo que pudiera aumentar el número de pacientes libres de enfermedad a los cinco años. La confirmación definitiva del valor práctico de estos resultados debe ser obtenida de futuros ensayos clínicos con este candidato vacunal, en pacientes de melanoma estadio II sometidos a tratamiento quirúrgico.

## 6. CONCLUSIONES

1. El preparado VSSP/GM3, emulsionado en Montanide ISA 51, se muestra inmunogénico en ratones al inducir anticuerpos específicos contra el gangliósido con capacidad citotóxica sobre células tumorales de melanoma B16.
2. El candidato vacunal VSSP/GM3, emulsionado en Montanide ISA 51, protege a los ratones de la recurrencia del melanoma B16 cuando se administra cada dos semanas después de la cirugía del tumor primario, sugiriendo una posibilidad de éxito terapéutico mayor en el escenario de enfermedad residual mínima.
3. El candidato vacunal VSSP/GM3, emulsionado en Montanide ISA 51, previene la implantación del melanoma B16 en el ratón hasta 90 días después de recibir la última dosis, indicando potencial para una estrategia preventiva de la enfermedad.
4. Los anticuerpos de isotipo IgG específicos a GM3 participan en el mecanismo inmunológico antitumoral inducido por el inmunógeno en el escenario preventivo.
5. El candidato vacunal VSSP/GM3, emulsionado en Montanide ISA 51, estimula la expansión de células T CD8<sup>+</sup> secretoras de IFN  $\gamma$  específicas al melanoma B16 en los animales portadores de tumor, que están involucradas en la capacidad antitumoral del preparado.



## **7. RECOMENDACIONES**

1. Estudiar los mecanismos de respuesta inmune inducidos por el candidato vacunal mediante los cuales se mantiene la protección durante tres meses contra el melanoma B16
2. En el contexto preventivo, profundizar en las propiedades funcionales de los anticuerpos específicos a GM3 relacionados con la protección contra el melanoma B16.
3. Determinar la especificidad molecular del reconocimiento de las células T secretoras de IFN $\gamma$  en ratones vacunados que rechazaron el tumor.
4. Evaluar los mecanismos de respuesta inmune celular inducida en ratones vacunados que no rechazaron el tumor.
5. Estudiar la eficacia de este candidato vacunal en ensayos clínicos en enfermedad residual mínima, con pacientes de melanoma en estadio II, los cuales tienen alto riesgo de recurrencia del tumor.

---

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bataille, V. 2003. Genetic epidemiology of melanoma. *Eur J Cancer* 39:1341-1347.
2. Weinstock, M. A. 1998. Issues in the epidemiology of melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 12:681-698.
3. Bajetta, E., M. Del Vecchio, R. Mortarini, R. Nadeau, A. Rakhit, L. Rimassa, C. Fowst, A. Borri, A. Anichini, and G. Parmiani. 1998. Pilot study of subcutaneous recombinant human interleukin 12 in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 4:75-85.
4. Bear, H. D., G. G. Hamad, and P. J. Kostuchenko. 1996. Biologic therapy of melanoma with cytokines and lymphocytes. *Semin Surg Oncol* 12:436-445.
5. Fishman, P. H., R. O. Brady, and S. T. Aaronson. 1976. A comparison of membrane glycoconjugates from mouse cells transformed by murine and primate RNA sarcoma viruses. *Biochemistry* 15:201-208.
6. Fredman, P., K. Hedberg, and T. Brezicka. 2003. Gangliosides as therapeutic targets for cancer. *BioDrugs* 17:155-167.
7. Birkle, S., G. Zeng, L. Gao, R. K. Yu, and J. Aubry. 2003. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie* 85:455-463.
8. Hamilton, W. B., F. Helling, K. O. Lloyd, and P. O. Livingston. 1993. Ganglioside expression on human malignant melanoma assessed by quantitative immune thin-layer chromatography. *Int J Cancer* 53:566-573.
9. Kiura, K., S. Watarai, H. Ueoka, M. Tabata, K. Gemba, K. Aoe, H. Yamane, T. Yasuda, and M. Harada. 1998. An alteration of ganglioside composition in cisplatin-resistant lung cancer cell line. *Anticancer Res* 18:2957-2960.
10. Sharom, F. J., A. L. Chiu, and T. E. Ross. 1990. Gangliosides and glycophorin inhibit T-lymphocyte activation. *Biochem Cell Biol* 68:735-744.
11. Shurin, G. V., M. R. Shurin, S. Bykovskaia, J. Shogan, M. T. Lotze, and E. M. Barksdale, Jr. 2001. Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer Res* 61:363-369.
12. Ravindranath, M. H., S. M. Brazeau, and D. L. Morton. 1994. Efficacy of tumor cell vaccine after incorporating monophosphoryl lipid A (MPL) in tumor cell membranes containing tumor-associated ganglioside. *Experientia* 50:648-653.
13. Ravindranath, M. H., M. C. Kelley, R. C. Jones, A. A. Amiri, P. M. Bauer, and D. L. Morton. 1998. Ratio of IgG:IgM antibodies to sialyl Lewis(x) and GM3 correlates with tumor growth after immunization with melanoma-cell vaccine with different adjuvants in mice. *Int J Cancer* 75:117-124.
14. Takahashi, T., T. D. Johnson, Y. Nishinaka, D. L. Morton, and R. F. Irie. 1999. IgM anti-ganglioside antibodies induced by melanoma cell vaccine correlate with survival of melanoma patients. *J Invest Dermatol* 112:205-209.
15. Zhang, H., S. Zhang, N. K. Cheung, G. Ragupathi, and P. O. Livingston. 1998. Antibodies against GD2 ganglioside can eradicate syngeneic cancer micrometastases. *Cancer Res* 58:2844-2849.
16. Livingston, P. O., S. Zhang, and K. O. Lloyd. 1997. Carbohydrate vaccines that induce antibodies against cancer. 1. Rationale. *Cancer Immunol Immunother* 45:1-9.

17. Shamshiev, A., A. Donda, I. Carena, L. Mori, L. Kappos, and G. De Libero. 1999. Self glycolipids as T-cell autoantigens. *Eur J Immunol* 29:1667-1675.
18. Wu, D. Y., N. H. Segal, S. Sidobre, M. Kronenberg, and P. B. Chapman. 2003. Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J Exp Med* 198:173-181.
19. Kirkwood, J. M., J. G. Ibrahim, J. A. Sosman, V. K. Sondak, S. S. Agarwala, M. S. Ernstoff, and U. Rao. 2001. High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801. *J Clin Oncol* 19:2370-2380.
20. Kelland, L. 2006. Discontinued drugs in 2005: oncology drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 15:1309-1318.
21. Guthmann, M. D., R. J. Bitton, A. J. Carnero, M. R. Gabri, G. Cinat, L. Koliren, D. Lewi, L. E. Fernandez, D. F. Alonso, D. E. Gomez, and L. Fainboim. 2004. Active specific immunotherapy of melanoma with a GM3 ganglioside-based vaccine: a report on safety and immunogenicity. *J Immunother* 27:442-451.
22. Kiessling, R., K. Wasserman, S. Horiguchi, K. Kono, J. Sjoberg, P. Pisa, and M. Petersson. 1999. Tumor-induced immune dysfunction. *Cancer Immunol Immunother* 48:353-362.
23. Egorov, I. K. 2006. Mouse models of efficient and inefficient anti-tumor immunity, with emphasis on minimal residual disease and tumor escape. *Cancer Immunol Immunother* 55:1-22.
24. Pawelec, G., S. Heinzel, R. Kiessling, L. Muller, Q. Ouyang, and J. Zeuthen. 2000. Escape mechanisms in tumor immunity: a year 2000 update. *Crit Rev Oncog* 11:97-133.
25. Hanna, M. G., Jr., H. C. Hoover, Jr., H. M. Pinedo, and M. Finer. 2006. Active specific immunotherapy with autologous tumor cell vaccines for stage II colon cancer: logistics, efficacy, safety and immunological Pharmacodynamics. *Hum Vaccin* 2:185-191.
26. Mocellin, S., G. Semenzato, S. Mandruzzato, and C. Riccardo Rossi. 2004. Part II: Vaccines for haematological malignant disorders. *Lancet Oncol* 5:727-737.
27. Schultz, J. 2003. Success of vaccine offers promise of cervical cancer prevention. *J Natl Cancer Inst* 95:102-104.
28. Huang, K., and S. Lin. 2000. Nationwide vaccination: a success story in Taiwan. *Vaccine* 18 Suppl 1:S35-38.
29. Viviani, S., A. Jack, A. J. Hall, N. Maine, M. Mendy, R. Montesano, and H. C. Whittle. 1999. Hepatitis B vaccination in infancy in The Gambia: protection against carriage at 9 years of age. *Vaccine* 17:2946-2950.
30. Levy, F., and S. Colombetti. 2006. Promises and limitations of murine models in the development of anticancer T-cell vaccines. *Int Rev Immunol* 25:269-295.
31. Estevez, F., A. Carr, L. Solorzano, O. Valiente, C. Mesa, O. Barroso, G. V. Sierra, and L. E. Fernandez. 1999. Enhancement of the immune response to poorly immunogenic gangliosides after incorporation into very small size proteoliposomes (VSSP). *Vaccine* 18:190-197.
32. Vedralova, E., J. Borovansky, and P. Hach. 1995. Ganglioside profiles of experimental melanomas and of their melanosomal fractions. *Melanoma Res* 5:87-92.

33. Mesa, C., and L. E. Fernandez. 2004. Challenges facing adjuvants for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol* 82:644-650.
34. Wiemann, B., and C. O. Starnes. 1994. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther* 64:529-564.
35. Krieg, A. M., and H. Wagner. 2000. Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. *Immunol Today* 21:521-526.
36. Kaplan, D. H., V. Shankaran, A. S. Dighe, E. Stockert, M. Aguet, L. J. Old, and R. D. Schreiber. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7556-7561.
37. Sahin, U., O. Tureci, H. Schmitt, B. Cochlovius, T. Johannes, R. Schmits, F. Stenner, G. Luo, I. Schobert, and M. Pfreundschuh. 1995. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11810-11813.
38. Mitchell, M. S., J. Kan-Mitchell, R. A. Kempf, W. Harel, H. Y. Shau, and S. Lind. 1988. Active specific immunotherapy for melanoma: phase I trial of allogeneic lysates and a novel adjuvant. *Cancer Res* 48:5883-5893.
39. Morton, D. L., E. C. Hsueh, R. Essner, L. J. Foshag, S. J. O'Day, A. Bilchik, R. K. Gupta, D. S. Hoon, M. Ravindranath, J. A. Nizze, G. Gammon, L. A. Wanek, H. J. Wang, and R. M. Elashoff. 2002. Prolonged survival of patients receiving active immunotherapy with Canvaxin therapeutic polyvalent vaccine after complete resection of melanoma metastatic to regional lymph nodes. *Ann Surg* 236:438-448; discussion 448-439.
40. Berd, D., T. Sato, H. Cohn, H. C. Maguire, Jr., and M. J. Mastrangelo. 2001. Treatment of metastatic melanoma with autologous, hapten-modified melanoma vaccine: regression of pulmonary metastases. *Int J Cancer* 94:531-539.
41. Mach, N., and G. Dranoff. 2000. Cytokine-secreting tumor cell vaccines. *Curr Opin Immunol* 12:571-575.
42. Salgia, R., T. Lynch, A. Skarin, J. Lucca, C. Lynch, K. Jung, F. S. Hodi, M. Jaklitsch, S. Mentzer, S. Swanson, J. Lukanich, R. Bueno, J. Wain, D. Mathisen, C. Wright, P. Fidias, D. Donahue, S. Clift, S. Hardy, D. Neuberg, R. Mulligan, I. Webb, D. Sugarbaker, M. Mihm, and G. Dranoff. 2003. Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 21:624-630.
43. Lage, A., R. Perez, and L. E. Fernandez. 2005. Therapeutic cancer vaccines: at midway between immunology and pharmacology. *Curr Cancer Drug Targets* 5:611-627.
44. Liu, M. A. 1998. Vaccine developments. *Nat Med* 4:515-519.
45. Polo, J. M., and T. W. Dubensky, Jr. 1998. DNA vaccines with a kick. *Nat Biotechnol* 16:517-518.
46. Akiyama, Y., R. Tanosaki, N. Inoue, M. Shimada, Y. Hotate, A. Yamamoto, N. Yamazaki, I. Kawashima, I. Nukaya, K. Takesako, K. Maruyama, Y. Takaue, and K. Yamaguchi. 2005. Clinical response in Japanese metastatic melanoma patients treated with peptide cocktail-pulsed dendritic cells. *J Transl Med* 3:4.

47. Slingluff, C. L., Jr., G. R. Petroni, G. V. Yamshchikov, D. L. Barnd, S. Eastham, H. Galavotti, J. W. Patterson, D. H. Deacon, S. Hibbitts, D. Teates, P. Y. Neese, W. W. Grosh, K. A. Chianese-Bullock, E. M. Woodson, C. J. Wiernasz, P. Merrill, J. Gibson, M. Ross, and V. H. Engelhard. 2003. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *J Clin Oncol* 21:4016-4026.
48. Naftzger, C., Y. Takechi, H. Kohda, I. Hara, S. Vijayasaradhi, and A. N. Houghton. 1996. Immune response to a differentiation antigen induced by altered antigen: a study of tumor rejection and autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14809-14814.
49. Belli, F., A. Testori, L. Rivoltini, M. Maio, G. Andreola, M. R. Sertoli, G. Gallino, A. Piris, A. Cattelan, I. Lazzari, M. Carrabba, G. Scita, C. Santantonio, L. Pilla, G. Tragni, C. Lombardo, F. Arienti, A. Marchiano, P. Queirolo, F. Bertolini, A. Cova, E. Lamaj, L. Ascani, R. Camerini, M. Corsi, N. Cascinelli, J. J. Lewis, P. Srivastava, and G. Parmiani. 2002. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings. *J Clin Oncol* 20:4169-4180.
50. Rivoltini, L., C. Castelli, M. Carrabba, V. Mazzaferro, L. Pilla, V. Huber, J. Coppa, G. Gallino, C. Scheibenbogen, P. Squarcina, A. Cova, R. Camerini, J. J. Lewis, P. K. Srivastava, and G. Parmiani. 2003. Human tumor-derived heat shock protein 96 mediates in vitro activation and in vivo expansion of melanoma- and colon carcinoma-specific T cells. *J Immunol* 171:3467-3474.
51. Nestle, F. O., J. Banchereau, and D. Hart. 2001. Dendritic cells: On the move from bench to bedside. *Nat Med* 7:761-765.
52. Celluzzi, C. M., and L. D. Falo, Jr. 1998. Physical interaction between dendritic cells and tumor cells results in an immunogen that induces protective and therapeutic tumor rejection. *J Immunol* 160:3081-3085.
53. Ashley, D. M., B. Faiola, S. Nair, L. P. Hale, D. D. Bigner, and E. Gilboa. 1997. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors. *J Exp Med* 186:1177-1182.
54. Nair, S. K., D. Snyder, B. T. Rouse, and E. Gilboa. 1997. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts. *Int J Cancer* 70:706-715.
55. Chang, A. E., B. G. Redman, J. R. Whitfield, B. J. Nickoloff, T. M. Braun, P. P. Lee, J. D. Geiger, and J. J. Mule. 2002. A phase I trial of tumor lysate-pulsed dendritic cells in the treatment of advanced cancer. *Clin Cancer Res* 8:1021-1032.
56. Siders, W. M., K. L. Vergilis, C. Johnson, J. Shields, and J. M. Kaplan. 2003. Induction of specific antitumor immunity in the mouse with the electrofusion product of tumor cells and dendritic cells. *Mol Ther* 7:498-505.
57. Akiyama, Y., M. Watanabe, K. Maruyama, F. W. Ruscetti, R. H. Wiltout, and K. Yamaguchi. 2000. Enhancement of antitumor immunity against B16 melanoma tumor using genetically modified dendritic cells to produce cytokines. *Gene Ther* 7:2113-2121.

- 
58. Esslinger, C., P. Romero, and H. R. MacDonald. 2002. Efficient transduction of dendritic cells and induction of a T-cell response by third-generation lentivectors. *Hum Gene Ther* 13:1091-1100.
  59. Basler, M., and M. Groettrup. 2007. Advances in prostate cancer immunotherapies. *Drugs Aging* 24:197-221.
  60. Martina, B. E., M. W. van de Bildt, T. Kuiken, G. van Amerongen, and A. D. Osterhaus. 2003. Immunogenicity and efficacy of recombinant subunit vaccines against phocid herpesvirus type 1. *Vaccine* 21:2433-2440.
  61. de Jong, A., T. O'Neill, A. Y. Khan, K. M. Kwappenberg, S. E. Chisholm, N. R. Whittle, J. A. Dobson, L. C. Jack, J. A. St Clair Roberts, R. Offringa, S. H. van der Burg, and J. K. Hickling. 2002. Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16 L2E7E6 fusion protein vaccine. *Vaccine* 20:3456-3464.
  62. Kundig, T. M., M. F. Bachmann, S. Oehen, U. W. Hoffmann, J. J. Simard, C. P. Kalberer, H. Pircher, P. S. Ohashi, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1996. On the role of antigen in maintaining cytotoxic T-cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9716-9723.
  63. Alexandroff, A. B., A. M. Jackson, M. A. O'Donnell, and K. James. 1999. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet* 353:1689-1694.
  64. Soiffer, R., F. S. Hodi, F. Haluska, K. Jung, S. Gillessen, S. Singer, K. Tanabe, R. Duda, S. Mentzer, M. Jaklitsch, R. Bueno, S. Clift, S. Hardy, D. Neuberg, R. Mulligan, I. Webb, M. Mihm, and G. Dranoff. 2003. Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 21:3343-3350.
  65. Brunner, C., J. Seiderer, A. Schlamp, M. Bidlingmaier, A. Eigler, W. Haimel, H. A. Lehr, A. M. Krieg, G. Hartmann, and S. Endres. 2000. Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol* 165:6278-6286.
  66. Speiser, D. E., D. Lienard, N. Rufer, V. Rubio-Godoy, D. Rimoldi, F. Lejeune, A. M. Krieg, J. C. Cerottini, and P. Romero. 2005. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest* 115:739-746.
  67. Jeannin, P., T. Renno, L. Goetsch, I. Miconnet, J. P. Aubry, Y. Delneste, N. Herbault, T. Baussant, G. Magistrelli, C. Soulas, P. Romero, J. C. Cerottini, and J. Y. Bonnefoy. 2000. OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway. *Nat Immunol* 1:502-509.
  68. Goldmann, O., M. Rohde, and E. Medina. 2002. Phagocytosis of bacille Calmette-Guerin-infected necrotic macrophages induces a maturation phenotype and evokes antigen-presentation functions in dendritic cells. *Immunology* 107:500-506.
  69. Jakob, T., P. S. Walker, A. M. Krieg, M. C. Udey, and J. C. Vogel. 1998. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* 161:3042-3049.
-

70. Basu, S., R. J. Binder, R. Suto, K. M. Anderson, and P. K. Srivastava. 2000. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 12:1539-1546.
71. Colaco, C. A. 1998. Towards a unified theory of immunity: dendritic cells, stress proteins and antigen capture. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44:883-890.
72. Hoos, A., and D. L. Levey. 2003. Vaccination with heat shock protein-peptide complexes: from basic science to clinical applications. *Expert Rev Vaccines* 2:369-379.
73. Mellstedt, H., J. Fagerberg, J. E. Frodin, L. Henriksson, A. L. Hjelm-Skoog, M. Liljefors, P. Ragnhammar, J. Shetye, and A. Osterborg. 1999. Augmentation of the immune response with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other hematopoietic growth factors. *Curr Opin Hematol* 6:169-175.
74. Ferrantini, M., I. Capone, F. M. Marincola, G. Parmiani, and F. Belardelli. 2007. International meeting "Immunotherapy of cancer: challenges and needs". *Cancer Immunol Immunother* 56:581-585.
75. Kudo-Saito, C., J. Schlom, and J. W. Hodge. 2005. Induction of an antigen cascade by diversified subcutaneous/intratumoral vaccination is associated with antitumor responses. *Clin Cancer Res* 11:2416-2426.
76. Davila, E., R. Kennedy, and E. Celis. 2003. Generation of antitumor immunity by cytotoxic T lymphocyte epitope peptide vaccination, CpG-oligodeoxynucleotide adjuvant, and CTLA-4 blockade. *Cancer Res* 63:3281-3288.
77. Hurwitz, A. A., P. Yanover, M. Markowitz, J. P. Allison, and E. D. Kwon. 2003. Prostate cancer: advances in immunotherapy. *BioDrugs* 17:131-138.
78. Kudo-Saito, C., J. Schlom, K. Camphausen, C. N. Coleman, and J. W. Hodge. 2005. The requirement of multimodal therapy (vaccine, local tumor radiation, and reduction of suppressor cells) to eliminate established tumors. *Clin Cancer Res* 11:4533-4544.
79. Prasad, S. J., K. J. Farrand, S. A. Matthews, J. H. Chang, R. S. McHugh, and F. Ronchese. 2005. Dendritic cells loaded with stressed tumor cells elicit long-lasting protective tumor immunity in mice depleted of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 174:90-98.
80. Pawelec, G., Y. Barnett, R. Forsey, D. Frasca, A. Globerson, J. McLeod, C. Caruso, C. Franceschi, T. Fulop, S. Gupta, E. Mariani, E. Mocchegiani, and R. Solana. 2002. T cells and aging, January 2002 update. *Front Biosci* 7:d1056-1183.
81. Salvadori, S., G. Martinelli, and K. Zier. 2000. Resection of solid tumors reverses T cell defects and restores protective immunity. *J Immunol* 164:2214-2220.
82. Danna, E. A., P. Sinha, M. Gilbert, V. K. Clements, B. A. Pulaski, and S. Ostrand-Rosenberg. 2004. Surgical removal of primary tumor reverses tumor-induced immunosuppression despite the presence of metastatic disease. *Cancer Res* 64:2205-2211.
83. Pardoll, D. 2003. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 21:807-839.
84. Seliger, B., T. Cabrera, F. Garrido, and S. Ferrone. 2002. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol* 12:3-13.
85. Kusmartsev, S., and D. I. Gabrilovich. 2002. Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer Immunol Immunother* 51:293-298.

86. Shevach, E. M. 2002. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2:389-400.
87. Pisa, P., E. Halapi, E. K. Pisa, E. Gerdin, C. Hising, A. Bucht, B. Gerdin, and R. Kiessling. 1992. Selective expression of interleukin 10, interferon gamma, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer biopsies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7708-7712.
88. De Smedt, T., M. Van Mechelen, G. De Becker, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. 1997. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 27:1229-1235.
89. Doran, T., H. Stuhlmiller, J. A. Kim, E. W. Martin, Jr., and P. L. Trionzi. 1997. Oncogene and cytokine expression of human colorectal tumors responding to immunotherapy. *J Immunother* 20:372-376.
90. Finn, O. J. 2003. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat Rev Immunol* 3:630-641.
91. Rosenberg, S. A., J. C. Yang, and N. P. Restifo. 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10:909-915.
92. Lollini, P. L., F. Cavallo, P. Nanni, and G. Forni. 2006. Vaccines for tumour prevention. *Nat Rev Cancer* 6:204-216.
93. Cuadros, C., A. L. Dominguez, G. I. Frost, P. Borgstrom, and J. Lustgarten. 2003. Cooperative effect between immunotherapy and antiangiogenic therapy leads to effective tumor rejection in tolerant Her-2/neu mice. *Cancer Res* 63:5895-5901.
94. Mihich, E. 2003. Cellular immunity for cancer chemoimmunotherapy--an overview. *Cancer Immunol Immunother* 52:661-662.
95. Vermorken, J. B., A. M. Claessen, H. van Tinteren, H. E. Gall, R. Ezinga, S. Meijer, R. J. Scheper, C. J. Meijer, E. Bloemena, J. H. Ransom, M. G. Hanna, Jr., and H. M. Pinedo. 1999. Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet* 353:345-350.
96. Bendandi, M., C. D. Gocke, C. B. Kobrin, F. A. Benko, L. A. Sternas, R. Pennington, T. M. Watson, C. W. Reynolds, B. L. Gause, P. L. Duffey, E. S. Jaffe, S. P. Creekmore, D. L. Longo, and L. W. Kwak. 1999. Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma. *Nat Med* 5:1171-1177.
97. Deeb, D., X. Gao, H. Jiang, G. Divine, S. A. Dulchavsky, and S. C. Gautam. 2006. Vaccination with leukemia-loaded dendritic cells eradicates residual disease and prevent relapse. *J Exp Ther Oncol* 5:183-193.
98. Houtenbos, I., T. M. Westers, G. J. Ossenkoppele, and A. A. van de Loosdrecht. 2006. Leukemia-derived dendritic cells: towards clinical vaccination protocols in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 91:348-355.
99. Patel, J. D., L. M. Krug, C. G. Azzoli, J. Gomez, M. G. Kris, and V. A. Miller. 2003. Targeting lethal minimal residual disease in small cell lung cancer. *Semin Oncol* 30:79-85.
100. Parmiani, G., C. Castelli, P. Dalerba, R. Mortarini, L. Rivoltini, F. M. Marincola, and A. Anichini. 2002. Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *J Natl Cancer Inst* 94:805-818.
101. Li, A., S. Yonezawa, S. Matsukita, K. Hasui, M. Goto, S. Tanaka, K. Imai, and E. Sato. 2001. Comparative study for histology, proliferative activity, glycoproteins,



- and p53 protein between old and recent colorectal adenomas in Japan. *Cancer Lett* 170:45-52.
102. Cassarino, D. S., W. J. Miller, A. Auerbach, A. Yang, R. Sherry, and P. H. Duray. 2006. The effects of gp100 and tyrosinase peptide vaccinations on nevi in melanoma patients. *J Cutan Pathol* 33:335-342.
103. Rosenberg, S. A. 1999. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10:281-287.
104. Dutoit, V., R. N. Taub, K. P. Papadopoulos, S. Talbot, M. L. Keohan, M. Brehm, S. Gnjjatic, P. E. Harris, B. Bisikirska, P. Guillaume, J. C. Cerottini, C. S. Hesdorffer, L. J. Old, and D. Valmori. 2002. Multiepitope CD8(+) T cell response to a NY-ESO-1 peptide vaccine results in imprecise tumor targeting. *J Clin Invest* 110:1813-1822.
105. Jager, D., E. Jager, and A. Knuth. 2001. Vaccination for malignant melanoma: recent developments. *Oncology* 60:1-7.
106. Jager, E., D. Jager, and A. Knuth. 1999. CTL-defined cancer vaccines: perspectives for active immunotherapeutic interventions in minimal residual disease. *Cancer Metastasis Rev* 18:143-150.
107. Mazzaferro, V., J. Coppa, M. G. Carrabba, L. Rivoltini, M. Schiavo, E. Regalia, L. Mariani, T. Camerini, A. Marchiano, S. Andreola, R. Camerini, M. Corsi, J. J. Lewis, P. K. Srivastava, and G. Parmiani. 2003. Vaccination with autologous tumor-derived heat-shock protein gp96 after liver resection for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 9:3235-3245.
108. Dranoff, G. 2005. CTLA-4 blockade: unveiling immune regulation. *J Clin Oncol* 23:662-664.
109. Sanderson, K., R. Scotland, P. Lee, D. Liu, S. Groshen, J. Snively, S. Sian, G. Nichol, T. Davis, T. Keler, M. Yellin, and J. Weber. 2005. Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 monoclonal antibody with multiple melanoma peptides and Montanide ISA 51 for patients with resected stages III and IV melanoma. *J Clin Oncol* 23:741-750.
110. Gogas, H., J. Ioannovich, U. Dafni, C. Stavropoulou-Giokas, K. Frangia, D. Tsoutsos, P. Panagiotou, A. Polyzos, O. Papadopoulos, A. Stratigos, C. Markopoulos, D. Bafaloukos, D. Pectasides, G. Fountzilas, and J. M. Kirkwood. 2006. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N Engl J Med* 354:709-718.
111. el-Shami, K., B. Tirosh, E. Bar-Haim, L. Carmon, E. Vadai, M. Fridkin, M. Feldman, and L. Eisenbach. 1999. MHC class I-restricted epitope spreading in the context of tumor rejection following vaccination with a single immunodominant CTL epitope. *Eur J Immunol* 29:3295-3301.
112. Brossart, P., S. Wirths, G. Stuhler, V. L. Reichardt, L. Kanz, and W. Brugger. 2000. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 96:3102-3108.
113. Ercolini, A. M., B. H. Ladle, E. A. Manning, L. W. Pfannenstiel, T. D. Armstrong, J. P. Machiels, J. G. Bieler, L. A. Emens, R. T. Reilly, and E. M. Jaffee. 2005. Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *J Exp Med* 201:1591-1602.
114. Reilly, R. T., J. P. Machiels, L. A. Emens, A. M. Ercolini, F. I. Okoye, R. Y. Lei, D. Weintraub, and E. M. Jaffee. 2001. The collaboration of both humoral and

- cellular HER-2/neu-targeted immune responses is required for the complete eradication of HER-2/neu-expressing tumors. *Cancer Res* 61:880-883.
115. Lustgarten, J., A. L. Dominguez, and C. Cuadros. 2004. The CD8<sup>+</sup> T cell repertoire against Her-2/neu antigens in neu transgenic mice is of low avidity with antitumor activity. *Eur J Immunol* 34:752-761.
116. Pannellini, T., G. Forni, and P. Musiani. 2004. Immunobiology of her-2/neu transgenic mice. *Breast Dis* 20:33-42.
117. Katsumata, M., T. Okudaira, A. Samanta, D. P. Clark, J. A. Drebin, P. Jolicoeur, and M. I. Greene. 1995. Prevention of breast tumour development in vivo by downregulation of the p185neu receptor. *Nat Med* 1:644-648.
118. Nanni, P., L. Landuzzi, G. Nicoletti, C. De Giovanni, I. Rossi, S. Croci, A. Astolfi, M. Iezzi, E. Di Carlo, P. Musiani, G. Forni, and P. L. Lollini. 2004. Immunoprevention of mammary carcinoma in HER-2/neu transgenic mice is IFN-gamma and B cell dependent. *J Immunol* 173:2288-2296.
119. Park, J. M., M. Terabe, Y. Sakai, J. Munasinghe, G. Forni, J. C. Morris, and J. A. Berzofsky. 2005. Early role of CD4<sup>+</sup> Th1 cells and antibodies in HER-2 adenovirus vaccine protection against autochthonous mammary carcinomas. *J Immunol* 174:4228-4236.
120. Quaglino, E., M. Iezzi, C. Mastini, A. Amici, F. Pericle, E. Di Carlo, S. M. Pupa, C. De Giovanni, M. Spadaro, C. Curcio, P. L. Lollini, P. Musiani, G. Forni, and F. Cavallo. 2004. Electroporated DNA vaccine clears away multifocal mammary carcinomas in her-2/neu transgenic mice. *Cancer Res* 64:2858-2864.
121. Rovero, S., A. Amici, E. D. Carlo, R. Bei, P. Nanni, E. Quaglino, P. Porcedda, K. Boggio, A. Smorlesi, P. L. Lollini, L. Landuzzi, M. P. Colombo, M. Giovarelli, P. Musiani, and G. Forni. 2000. DNA vaccination against rat her-2/Neu p185 more effectively inhibits carcinogenesis than transplantable carcinomas in transgenic BALB/c mice. *J Immunol* 165:5133-5142.
122. Croci, S., G. Nicoletti, L. Landuzzi, C. De Giovanni, A. Astolfi, C. Marini, E. Di Carlo, P. Musiani, G. Forni, P. Nanni, and P. L. Lollini. 2004. Immunological prevention of a multigene cancer syndrome. *Cancer Res* 64:8428-8434.
123. Balch, C. M., A. C. Buzaid, S. J. Soong, M. B. Atkins, N. Cascinelli, D. G. Coit, I. D. Fleming, J. E. Gershenwald, A. Houghton, Jr., J. M. Kirkwood, K. M. McMasters, M. F. Mihm, D. L. Morton, D. S. Reintgen, M. I. Ross, A. Sober, J. A. Thompson, and J. F. Thompson. 2001. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19:3635-3648.
124. Balch, C. M., A. C. Buzaid, S. J. Soong, M. B. Atkins, N. Cascinelli, D. G. Coit, I. D. Fleming, J. E. Gershenwald, A. Houghton, Jr., J. M. Kirkwood, K. M. McMasters, M. F. Mihm, D. L. Morton, D. S. Reintgen, M. I. Ross, A. Sober, J. A. Thompson, and J. F. Thompson. 2003. New TNM melanoma staging system: linking biology and natural history to clinical outcomes. *Semin Surg Oncol* 21:43-52.
125. Barth, A., L. A. Wanek, and D. L. Morton. 1995. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg* 181:193-201.
126. McMasters, K. M., V. K. Sondak, M. T. Lotze, and M. I. Ross. 1999. Recent advances in melanoma staging and therapy. *Ann Surg Oncol* 6:467-475.

127. McMasters, K. M., and S. M. Swetter. 2003. Current management of melanoma: benefits of surgical staging and adjuvant therapy. *J Surg Oncol* 82:209-216.
128. Rosenberg, S. A. 2001. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411:380-384.
129. Rosenberg, S. A., J. C. Yang, D. E. White, and S. M. Steinberg. 1998. Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg* 228:307-319.
130. Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, P. F. Robbins, J. C. Yang, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, R. Sherry, N. P. Restifo, A. M. Hubicki, M. R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C. A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, D. E. White, and S. A. Rosenberg. 2002. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298:850-854.
131. Rosenberg, S. A., and M. E. Dudley. 2004. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14639-14645.
132. Vaishampayan, U., J. Abrams, D. Darrah, V. Jones, and M. S. Mitchell. 2002. Active immunotherapy of metastatic melanoma with allogeneic melanoma lysates and interferon alpha. *Clin Cancer Res* 8:3696-3701.
133. Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, J. C. Yang, R. M. Sherry, S. L. Topalian, N. P. Restifo, R. E. Royal, U. Kammula, D. E. White, S. A. Mavroukakis, L. J. Rogers, G. J. Gracia, S. A. Jones, D. P. Mangiameli, M. M. Pelletier, J. Gea-Banacloche, M. R. Robinson, D. M. Berman, A. C. Filie, A. Abati, and S. A. Rosenberg. 2005. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 23:2346-2357.
134. Sonnino, S., L. Mauri, V. Chigorno, and A. Prinetti. 2007. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology* 17:1R-13R.
135. Svennerholm, L. 1963. Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides. *J Neurochem* 10:613-623.
136. Huwiler, A., T. Kolter, J. Pfeilschifter, and K. Sandhoff. 2000. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim Biophys Acta* 1485:63-99.
137. Kolter, T., and K. Sandhoff. 2005. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:81-103.
138. Takamizawa, K., M. Iwamori, S. Kozaki, G. Sakaguchi, R. Tanaka, H. Takayama, and Y. Nagai. 1986. TLC immunostaining characterization of Clostridium botulinum type A neurotoxin binding to gangliosides and free fatty acids. *FEBS Lett* 201:229-232.
139. Markwell, M. A., L. Svennerholm, and J. C. Paulson. 1981. Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:5406-5410.
140. Hakomori, S., and Y. Igarashi. 1993. Gangliosides and glycosphingolipids as modulators of cell growth, adhesion, and transmembrane signaling. *Adv Lipid Res* 25:147-162.

141. Yates, A. J., and A. Rampersaud. 1998. Sphingolipids as receptor modulators. An overview. *Ann N Y Acad Sci* 845:57-71.
142. Kotani, M., I. Kawashima, H. Ozawa, T. Terashima, and T. Tai. 1993. Differential distribution of major gangliosides in rat central nervous system detected by specific monoclonal antibodies. *Glycobiology* 3:137-146.
143. Lo, Y. L., T. H. Leoh, Y. F. Dan, L. L. Lim, A. Seah, S. Fook-Chong, and P. Ratnagopal. 2006. Presynaptic neuromuscular transmission defect in the Miller Fisher syndrome. *Neurology* 66:148-149.
144. Li, R., Y. Liu, and S. Ladisch. 2001. Enhancement of epidermal growth factor signaling and activation of SRC kinase by gangliosides. *J Biol Chem* 276:42782-42792.
145. Miljan, E. A., E. J. Meuillet, B. Mania-Farnell, D. George, H. Yamamoto, H. G. Simon, and E. G. Bremer. 2002. Interaction of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor with gangliosides. *J Biol Chem* 277:10108-10113.
146. Hakomori, S. 1985. Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res* 45:2405-2414.
147. Saito, M. 1993. Bioactive gangliosides: differentiation inducers for hematopoietic cells and their mechanism(s) of actions. *Adv Lipid Res* 25:303-327.
148. Gouy, H., P. Debre, and G. Bismuth. 1995. Triggering of a sustained calcium response through a p56lck-dependent pathway by exogenous ganglioside GM1 in human T lymphocytes. *J Immunol* 155:5160-5166.
149. Livingston, P. O., T. Watanabe, H. Shiku, A. N. Houghton, A. Albino, T. Takahashi, L. A. Resnick, R. Michitsch, C. M. Pinsky, H. F. Oettgen, and L. J. Old. 1982. Serological response of melanoma patients receiving melanoma cell vaccines. I. Autologous cultured melanoma cells. *Int J Cancer* 30:413-422.
150. Ravindranath, M. H., T. Tsuchida, D. L. Morton, and R. F. Irie. 1991. Ganglioside GM3:GD3 ratio as an index for the management of melanoma. *Cancer* 67:3029-3035.
151. Wiegandt, H. 1980. Introductory remarks on chemical structures of gangliosides. *Adv Exp Med Biol* 125:3-10.
152. Nudelman, E., S. Hakomori, R. Kannagi, S. Levery, M. Y. Yeh, K. E. Hellstrom, and I. Hellstrom. 1982. Characterization of a human melanoma-associated ganglioside antigen defined by a monoclonal antibody, 4.2. *J Biol Chem* 257:12752-12756.
153. Portoukalian, J., G. Zwingelstein, and J. F. Dore. 1979. Lipid composition of human malignant melanoma tumors at various levels of malignant growth. *Eur J Biochem* 94:19-23.
154. Dippold, W. G., K. O. Lloyd, L. T. Li, H. Ikeda, H. F. Oettgen, and L. J. Old. 1980. Cell surface antigens of human malignant melanoma: definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:6114-6118.
155. Tsuchida, T., R. E. Saxton, D. L. Morton, and R. F. Irie. 1987. Gangliosides of human melanoma. *J Natl Cancer Inst* 78:45-54.
156. Hoon, D. S., E. Okun, H. Neuwirth, D. L. Morton, and R. F. Irie. 1993. Aberrant expression of gangliosides in human renal cell carcinomas. *J Urol* 150:2013-2018.
157. Hirabayashi, Y., M. Sugimoto, T. Ogawa, M. Matsumoto, M. Tagawa, and M. Taniguchi. 1986. Reactivity of mouse monoclonal antibody M2590 against B16

- melanoma cells with chemically synthesized GM3 ganglioside. *Biochim Biophys Acta* 875:126-128.
158. Hakomori, S. 2003. Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. *Curr Opin Hematol* 10:16-24.
159. Brezicka, F. T., S. Olling, O. Nilsson, J. Bergh, J. Holmgren, S. Sorenson, F. Yngvason, and L. Lindholm. 1989. Immunohistological detection of fucosyl-GM1 ganglioside in human lung cancer and normal tissues with monoclonal antibodies. *Cancer Res* 49:1300-1305.
160. Macher, B. A., T. Pacuszka, B. R. Mullin, C. C. Sweeley, R. O. Brady, and P. H. Fishman. 1979. Isolation and identification of a fucose-containing ganglioside from bovine thyroid gland. *Biochim Biophys Acta* 588:35-43.
161. Hedberg, K. M., B. Dellheden, C. J. Wikstrand, and P. Fredman. 2000. Monoclonal anti-GD3 antibodies selectively inhibit the proliferation of human malignant glioma cells in vitro. *Glycoconj J* 17:717-726.
162. Zeng, G., L. Gao, S. Birkle, and R. K. Yu. 2000. Suppression of ganglioside GD3 expression in a rat F-11 tumor cell line reduces tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor production. *Cancer Res* 60:6670-6676.
163. Kawamura, S., C. Ohyama, R. Watanabe, M. Satoh, S. Saito, S. Hoshi, S. Gasa, and S. Orikasa. 2001. Glycolipid composition in bladder tumor: a crucial role of GM3 ganglioside in tumor invasion. *Int J Cancer* 94:343-347.
164. Zeng, G., L. Gao, and R. K. Yu. 2000. Reduced cell migration, tumor growth and experimental metastasis of rat F-11 cells whose expression of GD3-synthase is suppressed. *Int J Cancer* 88:53-57.
165. Li, R. X., and S. Ladisch. 1991. Shedding of human neuroblastoma gangliosides. *Biochim Biophys Acta* 1083:57-64.
166. Merritt, W. D., J. M. Bailey, and D. H. Pluznik. 1984. Inhibition of interleukin-2-dependent cytotoxic T-lymphocyte growth by gangliosides. *Cell Immunol* 89:1-10.
167. Prokazova, N. V., E. V. Dyatlovitskaya, and L. D. Bergelson. 1988. Sialylated lactosylceramides. Possible inducers of non-specific immunosuppression and atherosclerotic lesions. *Eur J Biochem* 172:1-6.
168. Sorice, M., A. Pavan, R. Misasi, T. Sansolini, T. Garofalo, L. Lenti, G. M. Pontieri, L. Frati, and M. R. Torrisi. 1995. Monosialoganglioside GM3 induces CD4 internalization in human peripheral blood T lymphocytes. *Scand J Immunol* 41:148-156.
169. Ladisch, S., H. Becker, and L. Ulsh. 1992. Immunosuppression by human gangliosides: I. Relationship of carbohydrate structure to the inhibition of T cell responses. *Biochim Biophys Acta* 1125:180-188.
170. Ladisch, S., R. Li, and E. Olson. 1994. Ceramide structure predicts tumor ganglioside immunosuppressive activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1974-1978.
171. Hachida, M., R. Irie, and D. L. Morton. 1990. Significant immunosuppressive effect of ganglioside GM3 in organ transplantation. *Transplant Proc* 22:1663-1665.
172. Takahashi, K., K. Ono, Y. Hirabayashi, and M. Taniguchi. 1988. Escape mechanisms of melanoma from immune system by soluble melanoma antigen. *J Immunol* 140:3244-3248.
173. Peguet-Navarro, J., M. Sportouch, I. Popa, O. Berthier, D. Schmitt, and J. Portoukalian. 2003. Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic

- cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J Immunol* 170:3488-3494.
174. Bennaceur, K., I. Popa, J. Portoukalian, O. Berthier-Vergnes, and J. Peguet-Navarro. 2006. Melanoma-derived gangliosides impair migratory and antigen-presenting function of human epidermal Langerhans cells and induce their apoptosis. *Int Immunol* 18:879-886.
175. Garofalo, T., L. Lenti, A. Longo, R. Misasi, V. Mattei, G. M. Pontieri, A. Pavan, and M. Sorice. 2002. Association of GM3 with Zap-70 induced by T cell activation in plasma membrane microdomains: GM3 as a marker of microdomains in human lymphocytes. *J Biol Chem* 277:11233-11238.
176. Garofalo, T., R. Misasi, V. Mattei, A. M. Giammarioli, W. Malorni, G. M. Pontieri, A. Pavan, and M. Sorice. 2003. Association of the death-inducing signaling complex with microdomains after triggering through CD95/Fas. Evidence for caspase-8-ganglioside interaction in T cells. *J Biol Chem* 278:8309-8315.
177. Garofalo, T., M. Sorice, R. Misasi, B. Cinque, M. Giammatteo, G. M. Pontieri, M. G. Cifone, and A. Pavan. 1998. A novel mechanism of CD4 down-modulation induced by monosialoganglioside GM3. Involvement of serine phosphorylation and protein kinase c delta translocation. *J Biol Chem* 273:35153-35160.
178. Livingston, P. O. 1995. Approaches to augmenting the immunogenicity of melanoma gangliosides: from whole melanoma cells to ganglioside-KLH conjugate vaccines. *Immunol Rev* 145:147-166.
179. Gadola, S. D., N. R. Zaccari, K. Harlos, D. Shepherd, J. C. Castro-Palomino, G. Ritter, R. R. Schmidt, E. Y. Jones, and V. Cerundolo. 2002. Structure of human CD1b with bound ligands at 2.3 Å, a maze for alkyl chains. *Nat Immunol* 3:721-726.
180. Naidenko, O. V., Y. Koezuka, and M. Kronenberg. 2000. CD1-mediated antigen presentation of glycosphingolipids. *Microbes Infect* 2:621-631.
181. Shamshiev, A., A. Donda, T. I. Prigozy, L. Mori, V. Chigorno, C. A. Benedict, L. Kappos, S. Sonnino, M. Kronenberg, and G. De Libero. 2000. The alphabeta T cell response to self-glycolipids shows a novel mechanism of CD1b loading and a requirement for complex oligosaccharides. *Immunity* 13:255-264.
182. Alfonso, M., and J. Zeuthen. 1996. Generation of human monoclonal antibodies against ganglioside antigens and their applications in the diagnosis and therapy of cancer. *Acta Oncol* 35:287-295.
183. Marcus, D. M. 1984. A review of the immunogenic and immuno-modulatory properties of glycosphingolipids. *Mol Immunol* 21:1083-1091.
184. Rademaekers, A., C. Specht, and E. Kolsch. 2001. T-cell enforced invariance of the antibody repertoire in the immune response against a bacterial carbohydrate antigen. *Scand J Immunol* 53:240-244.
185. Helling, F., and P. O. Livingston. 1994. Ganglioside conjugate vaccines. Immunotherapy against tumors of neuroectodermal origin. *Mol Chem Neuropathol* 21:299-309.
186. Helling, F., A. Shang, M. Calves, S. Zhang, S. Ren, R. K. Yu, H. F. Oettgen, and P. O. Livingston. 1994. GD3 vaccines for melanoma: superior immunogenicity of keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines. *Cancer Res* 54:197-203.
187. Watarai, S., K. Kiura, R. Shigeto, T. Shibayama, I. Kimura, and T. Yasuda. 1994. Establishment of monoclonal antibodies specific for ganglioside GM1: detection of

- ganglioside GM1 in small cell lung carcinoma cell lines and tissues. *J Biochem (Tokyo)* 116:948-954.
188. Alfonso, M., A. M. Vazquez, A. Carr, T. Haerslev, L. E. Fernandez, M. E. Lanio, C. Alvarez, J. Zeuthen, and R. Perez. 1995. T cell-independent B cell response to self-monosialogangliosides: primary response monoclonal antibodies. *Hybridoma* 14:209-216.
189. Carr, A., A. Mullet, Z. Mazorra, A. M. Vazquez, M. Alfonso, C. Mesa, E. Rengifo, R. Perez, and L. E. Fernandez. 2000. A mouse IgG1 monoclonal antibody specific for N-glycolyl GM3 ganglioside recognized breast and melanoma tumors. *Hybridoma* 19:241-247.
190. Dumontet, C., A. Rebbaa, and J. Portoukalian. 1997. Very low density lipoproteins and interleukin 2 enhance the immunogenicity of 9-O-acetyl-GD3 ganglioside in BALB/c mice. *J Immunol Methods* 206:115-123.
191. Steeghs, L., B. Kuipers, H. J. Hamstra, G. Kersten, L. van Alphen, and P. van der Ley. 1999. Immunogenicity of outer membrane proteins in a lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis*: influence of adjuvants on the immune response. *Infect Immun* 67:4988-4993.
192. Livingston, P. O. 1993. Approaches to augmenting the IgG antibody response to melanoma ganglioside vaccines. *Ann N Y Acad Sci* 690:204-213.
193. Livingston, P. O., M. J. Calves, F. Helling, W. D. Zollinger, M. S. Blake, and G. H. Lowell. 1993. GD3/proteosome vaccines induce consistent IgM antibodies against the ganglioside GD3. *Vaccine* 11:1199-1204.
194. Livingston, P. O., G. Ritter, and M. J. Calves. 1989. Antibody response after immunization with the gangliosides GM1, GM2, GM3, GD2 and GD3 in the mouse. *Cancer Immunol Immunother* 29:179-184.
195. Livingston, P. O., G. Ritter, P. Srivastava, M. Padavan, M. J. Calves, H. F. Oettgen, and L. J. Old. 1989. Characterization of IgG and IgM antibodies induced in melanoma patients by immunization with purified GM2 ganglioside. *Cancer Res* 49:7045-7050.
196. Helling, F., S. Zhang, A. Shang, S. Adluri, M. Calves, R. Koganty, B. M. Longenecker, T. J. Yao, H. F. Oettgen, and P. O. Livingston. 1995. GM2-KLH conjugate vaccine: increased immunogenicity in melanoma patients after administration with immunological adjuvant QS-21. *Cancer Res* 55:2783-2788.
197. Ferrante, K., B. Winograd, and R. Canetta. 1999. Promising new developments in cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 43 Suppl:S61-68.
198. Chapman, P. B., D. Morrissey, K. S. Panageas, L. Williams, J. J. Lewis, R. J. Israel, W. B. Hamilton, and P. O. Livingston. 2000. 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* 6:4658-4662.
199. Chapman, P. B., D. M. Morrissey, K. S. Panageas, W. B. Hamilton, C. Zhan, A. N. Destro, L. Williams, R. J. Israel, and P. O. Livingston. 2000. Induction of antibodies against GM2 ganglioside by immunizing melanoma patients using GM2-keyhole limpet hemocyanin + QS21 vaccine: a dose-response study. *Clin Cancer Res* 6:874-879.
200. Dickler, M. N., G. Ragupathi, N. X. Liu, C. Musselli, D. J. Martino, V. A. Miller, M. G. Kris, F. T. Brezicka, P. O. Livingston, and S. C. Grant. 1999.

- Immunogenicity of a fucosyl-GM1-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 5:2773-2779.
201. Krug, L. M., G. Ragupathi, C. Hood, M. G. Kris, V. A. Miller, J. R. Allen, S. J. Keding, S. J. Danishefsky, J. Gomez, L. Tyson, B. Pizzo, V. Baez, and P. O. Livingston. 2004. Vaccination of patients with small-cell lung cancer with synthetic fucosyl GM-1 conjugated to keyhole limpet hemocyanin. *Clin Cancer Res* 10:6094-6100.
202. Ragupathi, G., M. Meyers, S. Adluri, L. Howard, C. Musselli, and P. O. Livingston. 2000. Induction of antibodies against GD3 ganglioside in melanoma patients by vaccination with GD3-lactone-KLH conjugate plus immunological adjuvant QS-21. *Int J Cancer* 85:659-666.
203. Becker, R., M. K. Eichler, R. Jennemann, and H. Bertalanffy. 2002. Phase I clinical trial on adjuvant active immunotherapy of human gliomas with GD2-conjugate. *Br J Neurosurg* 16:269-275.
204. Ragupathi, G., P. O. Livingston, C. Hood, J. Gathuru, S. E. Krown, P. B. Chapman, J. D. Wolchok, L. J. Williams, R. C. Oldfield, and W. J. Hwu. 2003. 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* 9:5214-5220.
205. Carr, A., E. Rodriguez, C. Arango Mdel, R. Camacho, M. Osorio, M. Gabri, G. Carrillo, Z. Valdes, Y. Bebelagua, R. Perez, and L. E. Fernandez. 2003. Immunotherapy of advanced breast cancer with a heterophilic ganglioside (NeuGcGM3) cancer vaccine. *J Clin Oncol* 21:1015-1021.
206. Chung, M. H., R. K. Gupta, E. Hsueh, R. Essner, W. Ye, R. Yee, and D. L. Morton. 2003. Humoral immune response to a therapeutic polyvalent cancer vaccine after complete resection of thick primary melanoma and sentinel lymphadenectomy. *J Clin Oncol* 21:313-319.
207. Livingston, P. O., and G. Ragupathi. 1997. Carbohydrate vaccines that induce antibodies against cancer. 2. Previous experience and future plans. *Cancer Immunol Immunother* 45:10-19.
208. Dore, J. F., J. Portoukalian, O. Berthier-Vergnes, R. Jacubovich, J. Geneve, M. Bailly, E. Leftheriotis, A. Weissbrod, and M. Mayer. 1990. [Response in patients with melanoma to immunization using melanoma oncolysates of vaccine virus]. *Bull Cancer* 77:881-891.
209. Livingston, P. O., G. Y. Wong, S. Adluri, Y. Tao, M. Padavan, R. Parente, C. Hanlon, M. J. Calves, F. Helling, G. Ritter, and et al. 1994. Improved survival in stage III melanoma patients with GM2 antibodies: a randomized trial of adjuvant vaccination with GM2 ganglioside. *J Clin Oncol* 12:1036-1044.
210. Hsueh, E. C., E. Famatiga, R. K. Gupta, K. Qi, and D. L. Morton. 1998. Enhancement of complement-dependent cytotoxicity by polyvalent melanoma cell vaccine (CancerVax): correlation with survival. *Ann Surg Oncol* 5:595-602.
211. Irie, R. F., D. W. Ollila, S. O'Day, and D. L. Morton. 2004. Phase I pilot clinical trial of human IgM monoclonal antibody to ganglioside GM3 in patients with metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 53:110-117.
212. Kawashima, I., Y. Yoshida, C. Taya, H. Shitara, H. Yonekawa, H. Karasuyama, N. Tada, K. Furukawa, and T. Tai. 2003. Expansion of natural killer cells in mice



- transgenic for IgM antibody to ganglioside GD2: demonstration of prolonged survival after challenge with syngeneic tumor cells. *Int J Oncol* 23:381-388.
213. Stackpole, C. W. 1983. Generation of phenotypic diversity in the B16 mouse melanoma relative to spontaneous metastasis. *Cancer Res* 43:3057-3065.
214. Alonso, D. F., E. F. Farias, A. Urtreger, V. Ladeda, M. C. Vidal, and E. Bal De Kier Joffe. 1996. Characterization of F3II, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 62:288-297.
215. Eisenbach, L., N. Hollander, L. Greenfeld, H. Yakor, S. Segal, and M. Feldman. 1984. The differential expression of H-2K versus H-2D antigens, distinguishing high-metastatic from low-metastatic clones, is correlated with the immunogenic properties of the tumor cells. *Int J Cancer* 34:567-573.
216. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
217. Campa, C., Sierra, G.V., Gutierrez, M.M., Garcia, L., Puentes, G.C., Sampedro, M.C., Sotolongo, F., Le Riverend, E.X. and Galguera, M.A. 1988. Vaccine against group B Neisseria meningitidis, gammaglobulin and transfer factor. In *European patent 0 301 992. US patent US5597572*, Cuba.
218. Folch, J., I. Ascoli, M. Lees, J. A. Meath, and B. N. Le. 1951. Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J Biol Chem* 191:833-841.
219. Svennerholm, L., and P. Fredman. 1980. A procedure for the quantitative isolation of brain gangliosides. *Biochim Biophys Acta* 617:97-109.
220. Marquina, G., H. Waki, L. E. Fernandez, K. Kon, A. Carr, O. Valiente, R. Perez, and S. Ando. 1996. Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res* 56:5165-5171.
221. Tsai, C. M., C. E. Frasch, and L. F. Mocca. 1981. Five structural classes of major outer membrane proteins in Neisseria meningitidis. *J Bacteriol* 146:69-78.
222. Karlsson, G., J. E. Mansson, C. Wikstrand, D. Bigner, and L. Svennerholm. 1990. Characterization of the binding epitope of the monoclonal antibody DMAb-1 to ganglioside GM2. *Biochim Biophys Acta* 1043:267-272.
223. Kawashima, I., H. Ozawa, M. Kotani, M. Suzuki, T. Kawano, M. Gomibuchi, and T. Tai. 1993. Characterization of ganglioside expression in human melanoma cells: immunological and biochemical analysis. *J Biochem (Tokyo)* 114:186-193.
224. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176:1693-1702.
225. Gabri, M. R., G. V. Ripoll, D. F. Alonso, and D. E. Gomez. 2002. Role of cell surface GM3 ganglioside and sialic acid in the antitumor activity of a GM3-based vaccine in the murine B16 melanoma model. *J Cancer Res Clin Oncol* 128:669-677.
226. Seliger, B., U. Wollscheid, F. Momburg, T. Blankenstein, and C. Huber. 2001. Characterization of the major histocompatibility complex class I deficiencies in B16 melanoma cells. *Cancer Res* 61:1095-1099.
227. Hofbauer, G. F., R. Geertsens, E. Laine, G. Burg, and R. Dummer. 2001. Impact of interferons on the expression of melanoma-associated antigens in melanoma short-term cell cultures. *Melanoma Res* 11:213-218.

228. Malmberg, K. J. 2004. Effective immunotherapy against cancer: a question of overcoming immune suppression and immune escape? *Cancer Immunol Immunother* 53:879-892.
229. Ritter, G., and P. O. Livingston. 1991. Ganglioside antigens expressed by human cancer cells. *Semin Cancer Biol* 2:401-409.
230. Kavanagh, D., A. D. Hill, B. Djikstra, R. Kennelly, E. M. McDermott, and N. J. O'Higgins. 2005. Adjuvant therapies in the treatment of stage II and III malignant melanoma. *Surgeon* 3:245-256.
231. Ravindranath, M. H., E. C. Hsueh, M. Verma, W. Ye, and D. L. Morton. 2003. Serum total ganglioside level correlates with clinical course in melanoma patients after immunotherapy with therapeutic cancer vaccine. *J Immunother* 26:277-285.
232. Morton, D. L., M. H. Ravindranath, and R. F. Irie. 1994. Tumor gangliosides as targets for active specific immunotherapy of melanoma in man. *Prog Brain Res* 101:251-275.
233. Mesa, C., J. de Leon, and L. E. Fernandez. 2006. Very small size proteoliposomes derived from *Neisseria meningitidis*: An effective adjuvant for generation of CTL responses to peptide and protein antigens. *Vaccine* 24:2692-2699.
234. Alonso, D. F., M. R. Gabri, M. D. Guthmann, L. Fainboim, and D. E. Gomez. 1999. A novel hydrophobized GM3 ganglioside/*Neisseria meningitidis* outer-membrane-protein complex vaccine induces tumor protection in B16 murine melanoma. *Int J Oncol* 15:59-66.
235. Aucouturier, J., S. Ascarateil, and L. Dupuis. 2006. The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines. *Vaccine* 24 Suppl 2:S2-44-45.
236. Aucouturier, J., L. Dupuis, S. Deville, S. Ascarateil, and V. Ganne. 2002. Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Rev Vaccines* 1:111-118.
237. Disis, M. L., K. Schiffman, K. Guthrie, L. G. Salazar, K. L. Knutson, V. Goodell, C. dela Rosa, and M. A. Cheever. 2004. Effect of dose on immune response in patients vaccinated with an her-2/neu intracellular domain protein--based vaccine. *J Clin Oncol* 22:1916-1925.
238. Keir, M. E., L. M. Francisco, and A. H. Sharpe. 2007. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol* 19:309-314.
239. Melero, I., S. Hervas-Stubbs, M. Glennie, D. M. Pardoll, and L. Chen. 2007. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 7:95-106.
240. Perez-Diez, A., P. J. Spiess, N. P. Restifo, P. Matzinger, and F. M. Marincola. 2002. Intensity of the vaccine-elicited immune response determines tumor clearance. *J Immunol* 168:338-347.
241. Sabbatini, P. J., V. Kudryashov, G. Ragupathi, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, W. Bornmann, M. Spassova, A. Zatorski, D. Spriggs, C. Aghajanian, S. Soignet, M. Peyton, C. O'Flaherty, J. Curtin, and K. O. Lloyd. 2000. Immunization of ovarian cancer patients with a synthetic Lewis(y)-protein conjugate vaccine: a phase 1 trial. *Int J Cancer* 87:79-85.
242. Davies, A., D. L. Simmons, G. Hale, R. A. Harrison, H. Tighe, P. J. Lachmann, and H. Waldmann. 1989. CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J Exp Med* 170:637-654.

243. Jarvis, G. A., J. Li, J. Hakulinen, K. A. Brady, S. Nordling, R. Dahiya, and S. Meri. 1997. Expression and function of the complement membrane attack complex inhibitor protectin (CD59) in human prostate cancer. *Int J Cancer* 71:1049-1055.
244. Nicholson-Weller, A., J. Burge, D. T. Fearon, P. F. Weller, and K. F. Austen. 1982. Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay-accelerating activity for C3 convertases of the complement system. *J Immunol* 129:184-189.
245. Ortaldo, J. R., C. Woodhouse, A. C. Morgan, R. B. Herberman, D. A. Cheresch, and R. Reisfeld. 1987. Analysis of effector cells in human antibody-dependent cellular cytotoxicity with murine monoclonal antibodies. *J Immunol* 138:3566-3572.
246. Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pages, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoue, P. Bruneval, P. H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W. H. Fridman, and F. Pages. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960-1964.
247. Goldszmid, R. S., J. Idoyaga, A. I. Bravo, R. Steinman, J. Mordoh, and R. Wainstok. 2003. Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell immunity against B16 melanoma. *J Immunol* 171:5940-5947.
248. Marzo, A. L., B. F. Kinnear, R. A. Lake, J. J. Frelinger, E. J. Collins, B. W. Robinson, and B. Scott. 2000. Tumor-specific CD4<sup>+</sup> T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol* 165:6047-6055.
249. Bohm, W., S. Thoma, F. Leithauser, P. Moller, R. Schirmbeck, and J. Reimann. 1998. T cell-mediated, IFN-gamma-facilitated rejection of murine B16 melanomas. *J Immunol* 161:897-908.
250. Weber, J. S., and S. A. Rosenberg. 1988. Modulation of murine tumor major histocompatibility antigens by cytokines in vivo and in vitro. *Cancer Res* 48:5818-5824.
251. Hung, K., R. Hayashi, A. Lafond-Walker, C. Lowenstein, D. Pardoll, and H. Levitsky. 1998. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 188:2357-2368.
252. van Elsas, A., A. A. Hurwitz, and J. P. Allison. 1999. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med* 190:355-366.
253. van Elsas, A., R. P. Suttmoller, A. A. Hurwitz, J. Ziskin, J. Villasenor, J. P. Medema, W. W. Overwijk, N. P. Restifo, C. J. Melief, R. Offringa, and J. P. Allison. 2001. Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy. *J Exp Med* 194:481-489.
254. McCoy, K. D., I. F. Hermans, J. H. Fraser, G. Le Gros, and F. Ronchese. 1999. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) can regulate dendritic cell-induced activation and cytotoxicity of CD8(+) T cells independently of CD4(+) T cell help. *J Exp Med* 189:1157-1162.
255. Galli, G., P. Pittoni, E. Tonti, C. Malzone, Y. Uematsu, M. Tortoli, D. Maione, G. Volpini, O. Finco, S. Nuti, S. Tavarini, P. Dellabona, R. Rappuoli, G. Casorati, and

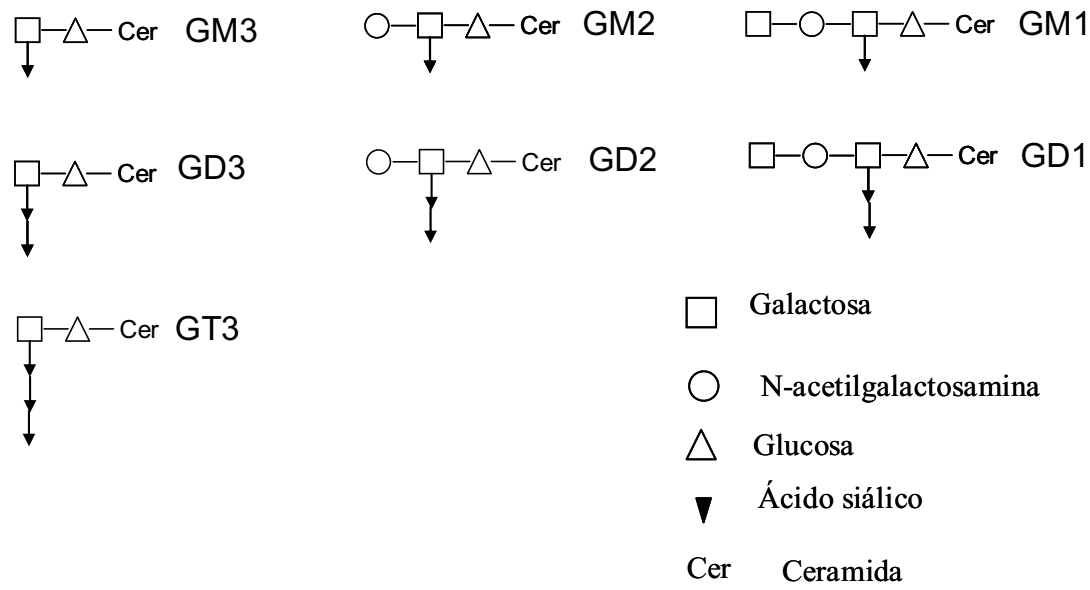
- S. Abrignani. 2007. Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3984-3989.
256. Gray, J. D., and D. A. Horwitz. 1995. Activated human NK cells can stimulate resting B cells to secrete immunoglobulin. *J Immunol* 154:5656-5664.
257. Yuan, D., J. Wilder, T. Dang, M. Bennett, and V. Kumar. 1992. Activation of B lymphocytes by NK cells. *Int Immunol* 4:1373-1380.
258. Hardy, R. R. 2006. B-1 B cells: development, selection, natural autoantibody and leukemia. *Curr Opin Immunol* 18:547-555.
259. Ravindranath, R. M., M. H. Ravindranath, and M. C. Graves. 1997. Augmentation of natural antiganglioside IgM antibodies in lower motor neuron disease (LMND) and role of CD5+ B cells. *Cell Mol Life Sci* 53:750-758.
260. Propper, D. J., D. Chao, J. P. Braybrooke, P. Bahl, P. Thavas, F. Balkwill, H. Turley, N. Dobbs, K. Gatter, D. C. Talbot, A. L. Harris, and T. S. Ganesan. 2003. Low-dose IFN-gamma induces tumor MHC expression in metastatic malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 9:84-92.
261. Winter, H., H. M. Hu, K. McClain, W. J. Urban, and B. A. Fox. 2001. Immunotherapy of melanoma: a dichotomy in the requirement for IFN-gamma in vaccine-induced antitumor immunity versus adoptive immunotherapy. *J Immunol* 166:7370-7380.
262. Di Pucchio, T., L. Pilla, I. Capone, M. Ferrantini, E. Montefiore, F. Urbani, R. Patuzzo, E. Pennacchioli, M. Santinami, A. Cova, G. Soven, F. Arienti, C. Lombardo, A. Lombardi, P. Caporaso, S. D'Atri, P. Marchetti, E. Bonmassar, G. Parmiani, F. Belardelli, and L. Rivoltini. 2006. Immunization of stage IV melanoma patients with Melan-A/MART-1 and gp100 peptides plus IFN-alpha results in the activation of specific CD8(+) T cells and monocyte/dendritic cell precursors. *Cancer Res* 66:4943-4951.
263. Prell, R. A., B. Li, J. M. Lin, M. VanRoey, and K. Jooss. 2005. Administration of IFN-alpha enhances the efficacy of a granulocyte macrophage colony stimulating factor-secreting tumor cell vaccine. *Cancer Res* 65:2449-2456.
264. Lode, H. N., R. Xiang, T. Dreier, N. M. Varki, S. D. Gillies, and R. A. Reisfeld. 1998. Natural killer cell-mediated eradication of neuroblastoma metastases to bone marrow by targeted interleukin-2 therapy. *Blood* 91:1706-1715.
265. Zhang, C., J. Zhang, and Z. Tian. 2006. The regulatory effect of natural killer cells: do "NK-reg cells" exist? *Cell Mol Immunol* 3:241-254.
266. Ahmadzadeh, M., and S. A. Rosenberg. 2006. IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 107:2409-2414.
267. Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6:345-352.
268. Gajewski, T. F. 2006. Identifying and overcoming immune resistance mechanisms in the melanoma tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 12:2326s-2330s.
269. Kubsch, S., E. Graulich, J. Knop, and K. Steinbrink. 2003. Suppressor activity of anergic T cells induced by IL-10-treated human dendritic cells: association with IL-2- and CTLA-4-dependent G1 arrest of the cell cycle regulated by p27Kip1. *Eur J Immunol* 33:1988-1997.
270. Overwijk, W. W. 2005. Breaking tolerance in cancer immunotherapy: time to ACT. *Curr Opin Immunol* 17:187-194.

- 271. Ohashi, K., G. Kobayashi, S. Fang, X. Zhu, S. J. Antonia, A. M. Krieg, and A. D. Sandler. 2006. Surgical excision combined with autologous whole tumor cell vaccination is an effective therapy for murine neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 41:1361-1368.
- 272. Gabri, M. R., Z. Mazorra, G. V. Ripoll, C. Mesa, L. E. Fernandez, D. E. Gomez, and D. F. Alonso. 2006. Complete antitumor protection by perioperative immunization with GM3/VSSP vaccine in a preclinical mouse melanoma model. *Clin Cancer Res* 12:7092-7098.
- 273. Ross, M. I. 2006. Early-stage melanoma: staging criteria and prognostic modeling. *Clin Cancer Res* 12:2312s-2319s.

---

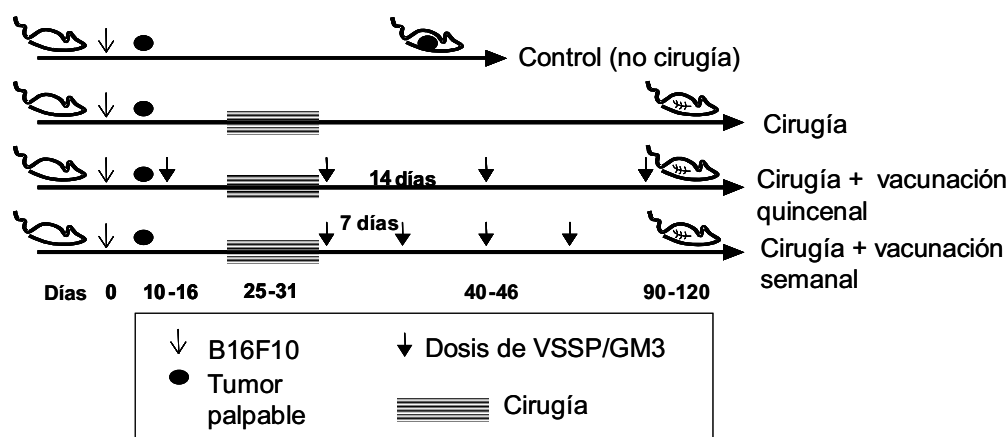
## **9. *ANEXOS***

**Anexo 1: Esquema de la estructura de algunos gangliósidos.** La nomenclatura usada para identificarlos fue la de Svennerholm.

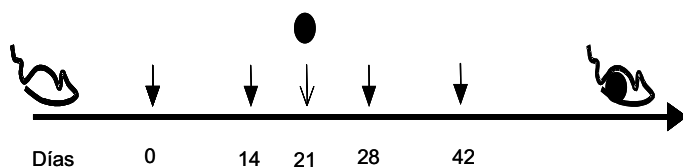


**Anexo 2. Esquema de tratamiento en el escenario de enfermedad residual mínima y en el escenario preventivo-terapéutico. (A)** En el día cero, grupos de ratones C57BL/6 se inocularon con  $5 \times 10^4$  células de B16F10. El primer grupo recibió sólo cirugía, el segundo recibió cuatro dosis semanales de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 (120  $\mu\text{g}$ /dosis) por vía intramuscular, comenzando el día de la cirugía, y el tercer grupo se inmunizó con cuatro dosis quincenales del mismo inmunógeno, comenzando antes de la cirugía cuando los tumores ya eran palpables. El grupo control no recibió ningún tratamiento. **(B)** Los ratones C57BL/6 se inmunizaron, por vía intramuscular, con cuatro dosis de VSSP/GM3 (120  $\mu\text{g}$ /dosis) ó PBS, ambos emulsionados en Montanide ISA 51 cada 14 días y se inocularon con  $10^3$  células de B16F10 a los 21 días de iniciarse el protocolo de inmunización

**A**



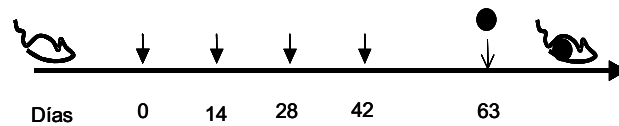
**B**



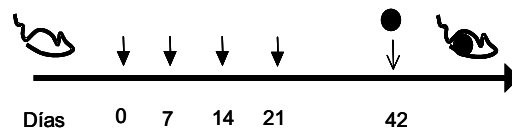


**Anexo 3. Esquemas de tratamiento en el escenario preventivo.** (A) Grupos de ratones C57BL/6 se inyectaron por vía intramuscular con cuatro dosis de 120  $\mu$ g de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51, y se inocularon con  $5 \times 10^3$  células de melanoma B16F10, 21 días después de la última inmunización. (B) Grupos de ratones C57BL/6 se inmunizaron con cuatro dosis de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 cada siete días, vía intramuscular. A los 21 días de la cuarta inmunización, se retaron con  $5 \times 10^3$  células de melanoma B16F10. (C) Grupos de ratones C57BL/6 se inmunizaron con una, dos, tres ó cuatro dosis de 120  $\mu$ g VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 cada 14 días o con PBS. Los ratones se inocularon con  $5 \times 10^3$  células de B16F10 a los 21 días de la última inmunización

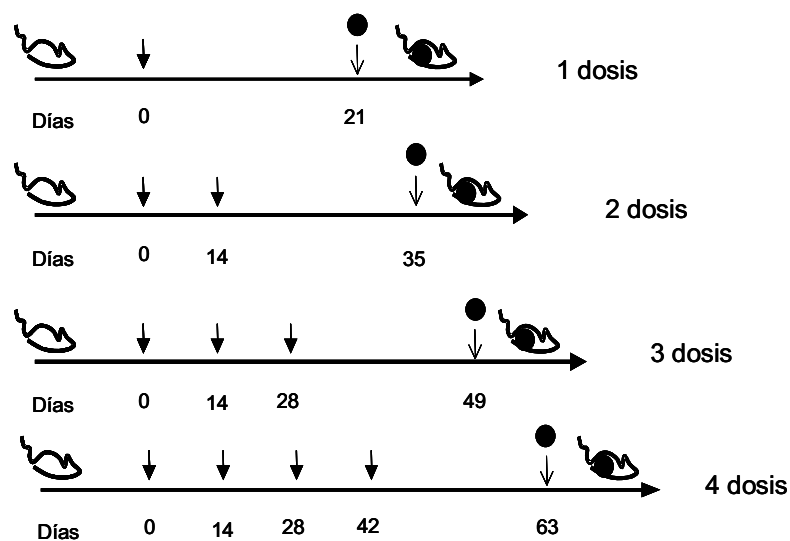
**A**



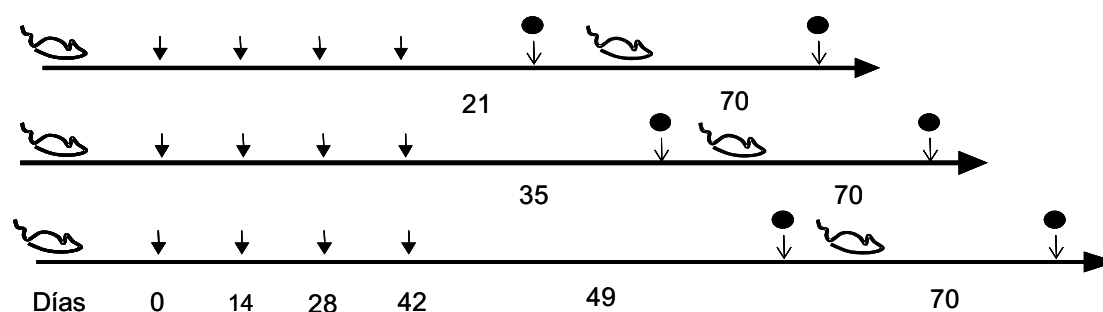
**B**



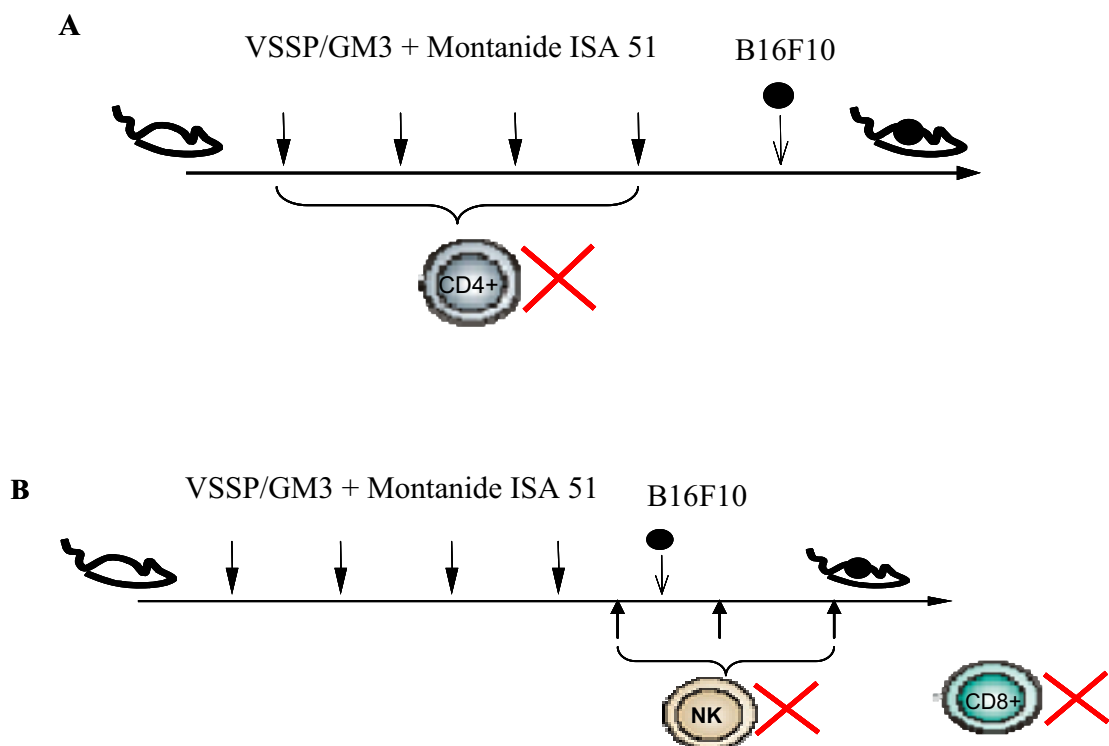
**C**



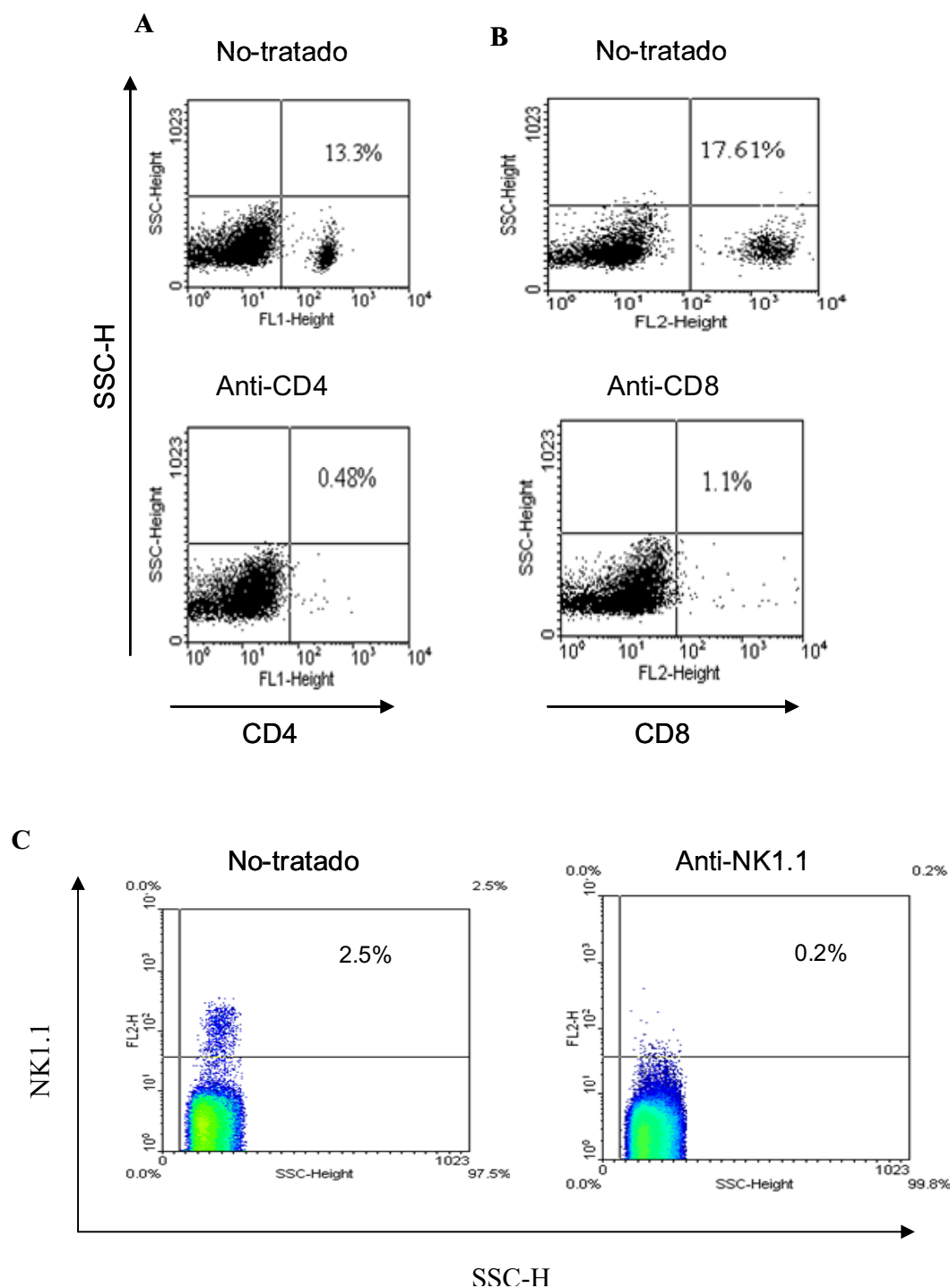
**Anexo 4. Esquema de tratamiento en el experimento de duración de la protección contra el melanoma B16.** Grupos de ratones C57BL/6 se inmunizaron con cuatro dosis (120 µg/dosis) de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 por vía intramuscular cada 14 días, y se inocularon con  $2,5 \times 10^3$  células de B16F0. El grupo 1 recibió el reto a los 21 días de la última inmunización, el grupo 2 a los 35 días y el grupo 3 a los 49 días. Posteriormente, a los ratones que no desarrollaron tumor después del primer inóculo se les volvió a retar con la misma cantidad de células de melanoma B16F0, a los 70 días del primer reto.



**Anexo 5. Esquema de tratamiento en los experimentos de eliminación de poblaciones mediante anticuerpos específicos. (A)** Grupos de ratones C57BL/6 se inmunizaron cuatro veces con 120 µg de VSSP/GM3 + Montanide ISA 51 cada 14 días, por vía intramuscular. En uno de los grupos vacunados se eliminaron las células T CD4<sup>+</sup>, mediante 1mg de proteínas totales semi-purificadas que contenía un AcM específico por el CD4, el cual se administró por vía intraperitoneal, cada tres días, durante el período de inmunización. A los 21 días de la última vacunación, los ratones se inocularon con 10<sup>4</sup> células de B16F10. El grupo control recibió el mismo esquema de tratamiento, pero en lugar del preparado vacunal se les administró PBS. **(B)** Grupos de ratones C57BL/6 recibieron el mismo esquema de inmunización e inoculación del tumor que en el experimento anterior. En dos de los grupos vacunados, los ratones se trataron con 1 mg de proteínas totales semi-purificadas que contenían los AcM específicos por NK1.1 ó CD8. El tratamiento se realizó durante la fase efectora de la respuesta inmune, comenzando un día antes de la inoculación del tumor y administrando las dos dosis siguientes a la semana y a los 14 días del reto tumoral.



**Anexo 6. Porcentaje de linfocitos CD4 (A), CD8 (B), NK (C), en el bazo de ratones C57BL/6 después del tratamiento con los anticuerpos específicos.** Ratones C57BL/6 (3/grupo) recibieron por vía intraperitoneal 1 mg de proteínas totales de los sobrenadantes de las líneas celulares YTS191, YTS169 y PK136 que contenían los anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 ó anti-NK1.1, respectivamente. Tres días después, se estudiaron las poblaciones de CD4+, CD8+ y NK1.1+ en el bazo de los ratones por citometría de flujo. Los datos en la figura corresponden a un ratón representativo de un grupo de tres, de un experimento repetido dos veces.



---

## AUTOBIBLIOGRAFÍA

### Publicaciones de la autora relacionadas con el tema de la tesis

1. Carr A, **Mazorra Z**, Alonso DF, Mesa C, Valiente O, Gómez DE, Pérez R, Fernández LE. A purified GM3 ganglioside conjugated vaccine induces specific, adjuvant-dependent and non-transient antitumour activity against B16 mouse melanoma in vitro and in vivo. *Melanoma Res.* 2001 Jun; 11 (3): 219-27
2. Mariano R. Gabri<sup>1\*</sup>, **Zaima Mazorra<sup>2\*</sup>**, Giselle V. Ripoll<sup>1</sup>, Circe Mesa<sup>2</sup>, Luis E. Fernandez<sup>2</sup>, Daniel E. Gomez<sup>1</sup>, Daniel F. Alonso<sup>1</sup>. Complete antitumor protection by perioperative immunization with GM3/VSSP vaccine in a preclinical mouse melanoma model. *Clin Cancer Res.* 2006 Dec 1;12 (23):7092-8. \*Estos autores contribuyeron de igual forma
3. **Mazorra Z**, Mesa C, Fernández A, Fernández LE. Immunization with a GM3 ganglioside nanoparticulated vaccine confers an effector CD8<sup>+</sup> T cells mediated protection against melanoma B16 challenge. *J of Immunotherapy.* (Enviado)

### Presentaciones en eventos científicos relacionados con el tema de la tesis

1. International Workshop “Immunotherapy for the new century “. C. Habana, Cuba, Nov- 2004. Poster.
2. 3<sup>rd</sup> International Workshop on Vaccine Adjuvants and Glycoconjugates. Varadero, Cuba, Abril-2006. Presentación oral
3. Biotecnología Habana 2006 “Aplicaciones Biomédicas de la Biotecnología”, C. Habana, Cuba, Nov-2006. Poster
4. International Workshop “Targeting complexity“. C. Habana, Cuba, Nov-2006. Poster.
5. Keystone Symposia "The Potent New Anti-tumor Immunotherapies". Banff, Alberta, Canadá, Marzo -2007. Poster

### Otras publicaciones de la autora:

1. Carr A., Marquina G., Fernández L. E., **Mazorra Z.**, Valiente O. Vázquez A. M., Pérez R., M. Waki H., Kon K. And Ando S. “Differences in immunological behavior between NAcGM3 and NGcGM3 gangliosides”. *Biotecnologia Aplicada* Vol.14 (1) p 48. 1996.
  2. Carr A., Mullet A., **Mazorra Z.**, Mesa C et al. A mouse IgG1 monoclonal antibody specific for N-Glycolyl GM3 ganglioside recognised breast and melanoma tumors. *Hybridoma* 2000 Vol 19, No 3, P 241
-

- 
3. Shamshiev A, Gober HJ, Donda A, **Mazorra Z**, Mori L, De Libero G. Presentation of the same glycolipid by different CD1 molecules. *J Exp Med*. 2002 Apr 15; 195(8):1013-21
  4. De Libero G, Donda A, Gober HJ, Manolova V, **Mazorra Z**, Shamshiev A, Mori L. A new aspect in glycolipid biology: glycosphingolipids as antigens recognized by T lymphocytes. *Neurochem Res*. 2002 Aug; 27(7-8):675-85.
  5. Gilleron M\*, Stenger S\*, **Mazorra Z\***, Wittke F, Mariotti S, Bohmer G, Prandi J, Mori L, Puzo G, De Libero G. Diacylated sulfoglycolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*. 2004 Mar 1; 199 (5):649-59. Epub 2004 Feb 23. \*Estos autores contribuyeron de igual forma
  6. De Libero G, Moran AP, Gober HJ, Rossy E, Shamshiev A, Chelnokova O, **Mazorra Z**, Vendetti S, Sacchi A, Prendergast MM, Sansano S, Tonevitsky A, Landmann R, Mori L. Bacterial infections promote T cell recognition of self-glycolipids. *Immunity*. 2005 Jun; 22 (6):763-72.